



Beata Tepper

**Rola receptorów neurotrofin TrkB i TrkC w rozwoju mózgu
oposa
*Monodelphis domestica***

Praca doktorska
wykonana w Pracowni Białek Wiążących Wapń
Instytutu Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN

PROMOTOR:
Dr hab. Ruzanna Dżawadian,
profesor Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN

Warszawa, 2022 r.

PODZIĘKOWANIA

Serdecznie dziękuję:

dr hab. Ruzannie Dżawadian (Djavadian)
za życzliwość, wyrozumiałość i pomoc merytoryczną

dr hab. Katarzynie Bartkowskiej
za cierpliwość, wspaniałą atmosferę w pracy i cenne
wskazówki

kochanym Rodzicom
za wsparcie.

Osiągnięcia naukowe

Publikacje:

- Tepper, B., Koguc-Sobolewska, P., Jaslan, K., Turlejski, K., Bartkowska, K., i Djavadian, R. (2021). Impaired olfactory neurogenesis affects the performance of olfactory-guided behavior in aged female opossums. *Scientific reports*, 11(1), 4418. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83834-5>
- Bartkowska, K., Turlejski, K., Tepper, B., Rychlik, L., Vogel, P., i Djavadian, R. (2021). Effects of Brain Size on Adult Neurogenesis in Shrews. *International journal of molecular sciences*, 22(14), 7664. <https://doi.org/10.3390/ijms22147664>
- Rafa-Zabłocka, K., Zelek-Molik, A., Tepper, B., Chmielarz, P., Kreiner, G., Wilczkowski, M., i Nalepa, I. (2021). Chronic restraint stress induces changes in the cerebral Galpha 12/13 and Rho-GTPase signaling network. *Pharmacological reports : PR*, 73(4), 1179–1187. <https://doi.org/10.1007/s43440-021-00294-4>
- *Tepper, B., Bartkowska, K., Okrasa, M., Ngati, S., Braszak, M., Turlejski, K., i Djavadian, R. (2020). Downregulation of TrkC Receptors Increases Dendritic Arborization of Purkinje Cells in the Developing Cerebellum of the Opossum, *Monodelphis domestica*. *Frontiers in neuroanatomy*, 14, 56. <https://doi.org/10.3389/fnana.2020.00056>
- Tepper, B., Aniszewska, A., Bartkowska, K., Grochocka, L., Turlejski, K., i Djavadian, R. (2019). Aged Opossums Show Alterations in Spatial Learning Behavior and Reduced Neurogenesis in the Dentate Gyrus. *Frontiers in neuroscience*, 13, 1210. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01210>
- *Bartkowska, K., Tepper, B., Gawda, A., Jarosik, M., Sobolewska, P., Turlejski, K., i Djavadian, R. L. (2019). Inhibition of TrkB- and TrkC-Signaling Pathways Affects Neurogenesis in the Opossum Developing Neocortex. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 29(9), 3666–3675. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhy246>
- Bartkowska, K., Tepper, B., Turlejski, K., i Djavadian, R. L. (2018). Roles of the exon junction complex components in the central nervous system: a mini review. *Reviews in the neurosciences*, 29(8), 817–824. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0113>

*publikacje, w których opisano większość wyników zawartych w niniejszej rozprawie doktorskiej

Udział w realizacji grantów:

Grant pt. „Molekularne mechanizmy rozwoju komórek Purkiniego mózdzku u oposa. Skonstruowanie transgenicznego oposa”, nr 2015/17/B/NZ4/02410 finansowany przez Narodowe Centrum Nauki

Spis treści

Osiągnięcia naukowe	3
Wykaz skrótów używanych w rozprawie	6
Streszczenie	9
Abstract	11
1. Wstęp	13
1.1. Opos jako zwierzę laboratoryjne	13
1.2. Rozwój ośrodkowego układu nerwowego u ssaków	14
1.2.1. <i>Rozwój kory nowej mózgu u ssaków</i>	17
1.2.2. <i>Mózdzek u ssaków i jego rozwój</i>	21
1.3. Neurotrofiny i ich receptory	25
1.3.1. <i>Funkcja neurotrofin i ich receptorów - badania na myszach knockout</i>	28
1.3.2. <i>Rola neurotrofin i ich receptorów w rozwoju kory nowej i mózdzku</i>	31
2. Cele pracy	35
3. Materiały i metody	36
3.1. Zwierzęta doświadczalne	36
3.2. Podawanie BrdU	36
3.3. Elektroporacja <i>in vivo</i>	37
3.4. Pierwotne hodowle neuronalne	39
3.5. Przygotowanie tkanki do analizy	39
3.5.1. <i>Przygotowanie tkanki do określenia poziomu białek metodą Western Blot</i>	39
3.5.2. <i>Przygotowanie tkanki do barwienia histochemicznego metodą Nissla</i>	40
3.5.3. <i>Przygotowanie tkanki i komórek do barwienia immunohistochemicznego z użyciem DAB oraz immunofluorescencyjnego</i>	40
3.6. Analiza ilościowa zawartości białka metodą Western Blot	41
3.7. Barwienie histochemiczne metodą Nissla	42
3.8. Barwienia immunohistochemiczne skrawków mózgow na obecność BrdU z użyciem odczynnika DAB	43
3.9. Barwienia immunofluorescencyjne tkanki mózgowej i komórek z pierwotnych hodowli neuronalnych	43
3.10. Analiza danych i statystyka	45
4. Wyniki	47
4.1. Rozwój oposa <i>Monodelphis domestica</i>	47
4.2. Wpływ receptorów TrkB i TrkC na rozwój kory nowej oposa <i>Monodelphis domestica</i>	49

4.2.1. Wydajność transfekcji komórek kory po elektroporacji i oznaczenie warstw korowych przy pomocy markerów molekularnych	49
4.2.2. Wpływ receptorów TrkB i TrkC na podziały komórek	53
4.2.3. Wpływ zmian w ekspresji receptorów TrkB i TrkC na przeżywalność komórek	57
4.2.4. Wpływ aktywności receptorów TrkB i TrkC na migrację neuronów	59
4.3. Rozwój mózdzku u oposa <i>Monodelphis domestica</i>	61
4.4. Wpływ receptorów TrkC na rozwój drzewek dendrytycznych komórek mózdzku	75
5. Dyskusja	84
5.1. Wpływ receptorów TrkB i TrkC na rozwój kory mózgu oposa	84
5.2. Porównania budowy i cyklu rozwoju mózdzku u różnych rzędów ssaków	92
5.3. Wpływ neurotrofin na rozwój mózdzku	96
6. Podsumowanie i wnioski	99
7. Piśmiennictwo	101
8. Finansowanie	118

Wykaz skrótów używanych w rozprawie

aRGCs - wierzchołkowe komórki gleju promienistego (ang. apical radial glial cells)

BDNF - czynnik pochodzenia mózgowego (ang. brain-derived neurotrophic factor)

BMP - białko morfogenetyczne kości (ang. bone morphogenetic protein)

BrdU - bromodeoksyurydyna (ang. bromodeoxyuridine)

bRGCs - podstawne komórki gleju promienistego (ang. basal radial glial cells)

CP - płytko korowa (ang. cortical plate)

DAB - 3,3 diaminobenzzydina (ang. diaminobenzidine)

DAPI - 4',6-diamidyno-2-fenylindol (ang. 4',6-diamidino-2-phenylindole)

DCN - głębokie jądra mózdzku (ang. deep cerebellar nuclei)

DIV - dzień *in vitro* (ang. day *in vitro*)

DRG - zwoje rdzeniowe (ang. dorsal root ganglia)

DTT - ditiotreitrol (ang. dithiothreitol)

E - dzień embrionalny (ang. embryonic day)

ECL - odczynnik wzmacniający chemiluminescencję (ang. enhanced chemiluminescence reagent)

EGL - zewnętrzna warstwa ziarnista (ang. external granular layer)

ERK - kinaza regulowana przez sygnały zewnątrzkomórkowe (ang. extracellular signal-regulated kinases)

FBS - płodowa surowica bydlęca (ang. fetal bovine serum)

FGF2 - czynnik wzrostu fibroblastów 2 (ang. fibroblast growth factor 2)

FGF8 - czynnik wzrostu fibroblastów 8 (ang. fibroblast growth factor 8)

GAPDH - dehydrogenaza gliceroaldehydofosforanowa (ang. glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)

GCPs - progenitory komórek ziarnistych (ang. granule cells progenitors)

GFP - zielone białko fluorescencyjne (ang. green fluorescent protein)

HEPES - kwas hydroksyetylopiperazynoetanosulfonowy (ang. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)

IGL - wewnętrzna warstwa ziarnista (ang. internal granular layer)

IPC - pośrednia komórka progenitorowa (ang. intermediate progenitor cell)

ISVZ - wewnętrzna część strefy przykomorowej (ang. inner subventricular zone)

IZ - strefa pośrednia (ang. intermediate zone)

LTP - długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (ang. long-term potentiation)
MAP2 - białko związane z mikrotubulami 2 (ang. microtubule-associated protein 2)
MAPK - kinaza aktywowana mitogenami (ang. mitogen-activated protein kinase)
MZ - warstwa brzeżna (ang. marginal zone)
NChS - surowica krwi kurczęcej (ang. normal chicken serum)
NEC - komórki nabłonka nerwowego (ang. neuroepithelial cells)
NeuN - marker jąder neuronów (ang. neuronal nuclei)
NGF - czynnik wzrostu nerwów (ang. nerve growth factor)
NGS - surowica krwi koziej (ang. normal goat serum)
NT-3 - neurotrofina 3 (ang. neurotrophin 3)
NT-4/5 - neurotrofina 4/5 (ang. neurotrophin 4/5)
Olig2 - czynnik transkrypcyjny oligodendrocytów (ang. oligodendrocyte transcription factor)
OSVZ - zewnętrzna część strefy przykomorowej (ang. outer subventricular zone)
P - dzień po urodzeniu (ang. postnatal day)
p75^{NTR} - receptor neurotrofin p75 (ang. p75 neurotrophin receptor)
PB - bufor fosforanowy (ang. phosphate buffer)
PBS - sól fizjologiczna buforowana fosforanem (ang. phosphate-buffered saline)
PCNA - jądrowy antygen proliferujących komórek (ang. proliferating cell nuclear antigen)
PFA - paraformaldehyd (ang. paraformaldehyde)
pHH3 – ufosforylowana forma histonu H3 (ang. phosphorylated H3 histone)
PI3K - kinazę fosfatydyloinozytolu (ang. phosphatidylinositol 3-kinase)
PLC γ - fosfolipaza C γ (ang. phospholipase C gamma)
PP - płytka pierwotna (ang. preplate)
RGCs - komórki gleju promienistego (ang. radial glia cells)
RP - płytka stropowa (ang. roof plate)
RTKs - receptor kinaz tyrozynowych (ang. receptor tyrosine kinases)
SAPs - progenitory okołowierzchołkowe (ang. subapical progenitors)
SDS - sól sodowa siarczanu dodecyłu (ang. sodium dodecyl sulfate)
SHH - homolog sonic hedgehog (ang. sonic hedgehog homolog)
SP - warstwa podpłytkowa (ang. subplate)
SSC - sól fizjologiczna-cytrynian sodu (ang. saline-sodium citrate)
SVZ - strefa przykomorowa (ang. subventricular zone)

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

TNF - czynnika martwicy nowotworów (ang. tumor necrosis factor)

Trk - kinaza receptora tropomiozyny (ang. tropomyosin receptor kinase)

TrkA - kinaza receptora tropomiozyny A (ang. tropomyosin receptor kinase A)

TrkB - kinaza receptora tropomiozyny B (ang. tropomyosin receptor kinase B)

TrkC - kinaza receptora tropomiozyny C (ang. tropomyosin receptor kinase C)

VZ - strefa komorowa (ang. ventricular zone)

Streszczenie

Opos *Monodelphis domestica* jest niewielkim, wszystkożernym torbaczem pochodzącym z Brazylii. Jak wszystkie torbacze, oposy rodzą się na wcześniejszym etapie rozwoju niż ssaki łożyskowe. Noworodki oposa, ważące zaledwie 100-120 mg, są w stadium rozwoju porównywalnym do tego, które jest widoczne u myszy w 12 dniu po zapłodnieniu, a u człowieka w szóstym tygodniu rozwoju embrionalnego. Prawie wszystkie struktury mózgu oposa, także kora nowa, rozwijają się w ciągu trzech tygodni po urodzeniu, czyli wolniej, niż u myszy czy szczura. Powolny i przebiegający w znacznej części po urodzeniu rozwój mózgu oposa ułatwia wyjaśnienie mechanizmów wczesnych etapów rozwoju różnych struktur mózgu ssaków.

Neurotrofiny i ich receptory odgrywają ważną rolę w procesach związanych z kształtowaniem się układu nerwowego. Wykazano, że wpływają one na tempo podziałów komórek progenitorowych, przeżywanie neuroblastów, ich różnicowanie, a także na plastyczność synaptyczną, która jest niezbędna do uczenia się i pamięci.

Celem niniejszej pracy było określenie roli receptorów neurotrofin, głównie TrkB, specyficznego receptora neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego (BDNF) i TrkC, specyficznego receptora neurotrofiny 3 (NT-3) w rozwoju dwóch struktur mózgu – kory nowej i mózdzku. Wykorzystano metodę elektroporacji *in vivo*. Iniekcja plazmidu shRNA dla genu *trkB* lub *trkC* została wykonana do komór bocznych mózgu 7-dniowych oposów, w czasie gdy rozpoczyna się powstawanie głębokich warstw kory. Mózgi oposów analizowano 2 lub 5 dni po elektroporacji. Obniżenie poziomu ekspresji receptorów TrkB lub TrkC w korze nowej oposa w wieku siedmiu dni po urodzeniu (P7) doprowadziło do zmniejszenia liczby dzielących się komórek progenitorowych, nie było to jednak spowodowane nasileniem apoptozy. Ponadto, zahamowanie ekspresji receptorów TrkB lub TrkC powodowało zatrzymanie migracji nowo powstałych neuronów w warstwie pośredniej kory mózgu i uniemożliwiało im dotarcie do obszaru podpłytkowego.

Badania roli receptorów TrkC w procesach rozwoju mózdzku oposa rozpoczęto od określenia sekwencji rozwoju i czasu powstawania różnych typów komórek mózdzku oposa. W tym celu oposy w różnym wieku (od noworodków do zwierząt dorosłych) otrzymywały iniekcje bromodeoksyurydyny (BrdU), a następnie po jednym lub trzech miesiącach wykonywano barwienia immunohistochemiczne na obecność BrdU w komórkach mózdzku oraz barwienia z użyciem molekularnych markerów różnych typów

komórek mózdzku. Wykazano, że komórki Purkiniego oraz komórki budujące głębokie jądra mózdzku powstają między P1-P5. Około trzy tygodnie później rozpoczyna się proliferacja komórek ziarnistych. Badania wpływu receptora TrkC na rozwój komórek Purkiniego i ziarnistych prowadzono *in vitro* w hodowli pierwotnej komórek wyizolowanych z mózdków oposów w wieku P3 i P22. Wykorzystując transfekcję komórkową shRNA dla genu *trkC* obniżono aktywność receptora TrkC w komórkach, które następnie hodowano przez kolejne 8 dni, po czym analizowano proces kształtowania się ich drzewek dendrytycznych. Obniżenie poziomu ekspresji TrkC spowodowało zwiększenie liczby dendrytów i ich rozgałęzień w komórkach Purkiniego, czego nie stwierdzono w przypadku komórek ziarnistych. Przedstawione wyniki doświadczeń dowodzą, że u oposa wybrane receptory neurotrofin mają istotny wpływ na proliferację i migrację komórek progenitorowych kory nowej, natomiast w mózdzku wpływają na rozwój drzewek dendrytycznych komórek Purkiniego, a więc ich działanie może różnić się nie tylko zależnie od struktury, lecz również od rodzaju komórek na których występują.

Abstract

The opossum, *Monodelphis domestica* is a small, omnivorous marsupial species from Brazil. Like other marsupials, opossums are born at an earlier stage of development than eutherians. Newborn opossums weighing only 100-120 mg, are at a developmental stage comparable to that of mice at day 12 after conception, and at 6 weeks of embryonic development in humans. Almost all brain structures, including the neocortex, develop within three weeks after birth, which is slower than in mice or rats. The slow and protracted postnatal development of the opossum brain allows to study early stages of the development in the mammalian brain structures.

Neurotrophins and their receptors play an important role in processes involved in shaping the nervous system. They have been shown to be essential for division, migration, survival and differentiation of progenitor cells, as well as in synaptic plasticity which is crucial for learning and memory.

The aim of the current study was to investigate the role of neurotrophin receptors, mainly TrkB, a specific receptor for brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and TrkC, a specific receptor for neurotrophin 3 (NT-3) in the development of two brain structures, the neocortex and the cerebellum. The *in vivo* electroporation technique was used. The shRNA construct for the *trkB* or *trkC* gene was injected into the lateral ventricles of the opossum brain at postnatal day 7 (P), when deep layers of the cerebral cortex begin to form. The effect of injections on the development of neocortex in opossums was analyzed 2 or 5 days after electroporation. The inhibition of TrkB or TrkC receptors activity in the neocortex of opossums at P7, resulted in a reduction of the number of proliferating progenitor cells *in vivo*, which was not due to an increase in apoptosis. Moreover, the lack of TrkB or TrkC receptors activity stopped the migration and caused the arrest of newborn neurons in the intermediate zone, therefore, they could not penetrate the subplate zone.

In order to study the role of neurotrophin receptors in development of the opossum cerebellum, first, developmental sequences and timing of different types of cerebellar cells generation were examined using BrdU injections into opossums at different ages (from newborn to adult). After a month or three, the immunohistochemical staining was performed to label BrdU cells of the cerebellum and detect specific cellular markers in various cell types. The presented study showed that Purkinje neurons and deep cerebellar nuclei cells are formed between P1-P5. Approximately three weeks later, the

proliferation of granule cells started. Cerebellar cell cultures from P3 or P22 opossums were used to study the influence of the TrkC receptor on the development of Purkinje or granule cells, respectively. The plasmid shRNA targeting *trkC* was used to reduce TrkC receptors activity in cells that were cultured for the next 8 days after electroporation. Analysis of dendritic arbor structures showed that TrkC downregulation resulted in an increase in the number of dendrites and branching of Purkinje cells but had no effect on cerebellar granule cells. The presented results show that the selected neurotrophin receptors have a significant impact on the proliferation and migration of neocortical progenitor cells and development of the dendritic tree in Purkinje cells of the opossum cerebellum, demonstrating region-specific and cell-specific effects.

1. Wstęp

1.1. Opos jako zwierzę laboratoryjne

Wszystkie współcześnie żyjące gatunki ssaków (gromada Mammalia) dzieli się na 2 podgromady: ssaki jajorodne, obejmujące rząd stekowców (Monotremata) z pięcioma gatunkami, oraz rząd ssaków żyworodnych (Theria), do których należą podrzędy torbaczy (Marsupialia, 377 gatunków) i ssaków łożyskowych (Placentalia, około 6000 gatunków) (Burgin i wsp., 2018). Odkrycie nowego zapisu kopalnego związanego z nowym gatunkiem *Juramaia sinensis*, pozwoliło ustalić czas dywersyfikacji między torbaczami i ssakami łożyskowymi. Według tych danych torbacze i łożyskowce rozdzieliły się około 160 milionów lat temu (Luo i wsp., 2011; Graves i Renfree, 2013). Pomimo wielu podobieństw spajających takson żyworodnych, istnieją też różnice. Jedną z głównych różnic między łożyskowcami i torbaczami jest organizacja procesu rozmnażania. Okres ciąży wszystkich torbaczy jest krótki i wynosi od 12 dni do 5 tygodni (Rose, 1989). Torbacze rodzą niedojrzałe potomstwo, a po urodzeniu oseski przyczepiają się do sutków (Hickford i wsp., 2009) pozostając długo w torbie matki.

Obecnie żyjące torbacze dzielą się na 2 główne grupy, torbacze amerykańskie (Ameridelphia, około 30% gatunków) i torbacze australijskie (Australidelphia, około 70% gatunków). Opos krótkoogonowy (*Monodelphis domestica*), przedstawiciel rodziny *Didelphidae*, to gatunek torbacza należący do Ameridelphia, który występuje w północnej Brazylii i Boliwii.

W 1978 r. oposy tego gatunku zostały przywiezione z Brazylii do ogrodu zoologicznego w Waszyngtonie (USA), rozmnożone i подарowane laboratorium w San Antonio pod kierownictwem Johna L. VandeBerga, w którym sprawdzano przydatność tego gatunku jako zwierzęcia laboratoryjnego. Niewielkie rozmiary ciała, duża liczebność miotów i ich stosunkowo szybki rozwój, oraz swobodny dostęp do noworodków sprawiły, że *Monodelphis domestica* stał się najpopularniejszym gatunkiem torbacza wykorzystywanym w badaniach naukowych (Ryc. 1). Opos okazał się przydatnym zwierzęciem laboratoryjnym w wielu dziedzinach nauki, a w związku z tym jego genom został zsekwencjonowany w 2007 roku (Mikkelsen i wsp., 2007). Jest jedynym znanym zwierzęciem, poza człowiekiem, u którego samo promieniowanie ultrafioletowe (bez wspomaganie chemicznego) wywołuje czerniaka (Kusewitt i wsp., 1991), co spowodowało, że znalazł zastosowanie w badaniach nad nowotworami. Ponadto, w

przeciwieństwie do myszy, opos jest zwierzęciem wszystkożernym, toteż jego układ pokarmowy i metabolizm bardziej przypominają te u człowieka, niż u gryzoni więc oposów używa się w badaniach nad hiperlipidemią i hipercholesterolemią wywołaną dietą (Kushwaha i wsp., 2004). Oposy są też wykorzystywane w badaniach regeneracji uszkodzonego rdzenia kręgowego. Ponieważ torbacze rodzą się na bardzo wczesnym etapie rozwoju (nowonarodzony opos jest na etapie odpowiadającym 14-dniowemu embrionowi szczura, 11-dniowemu embrionowi myszy i 40-dniowemu embrionowi człowieka), to są doskonałym modelem badań wczesnych etapów rozwoju ssaków.



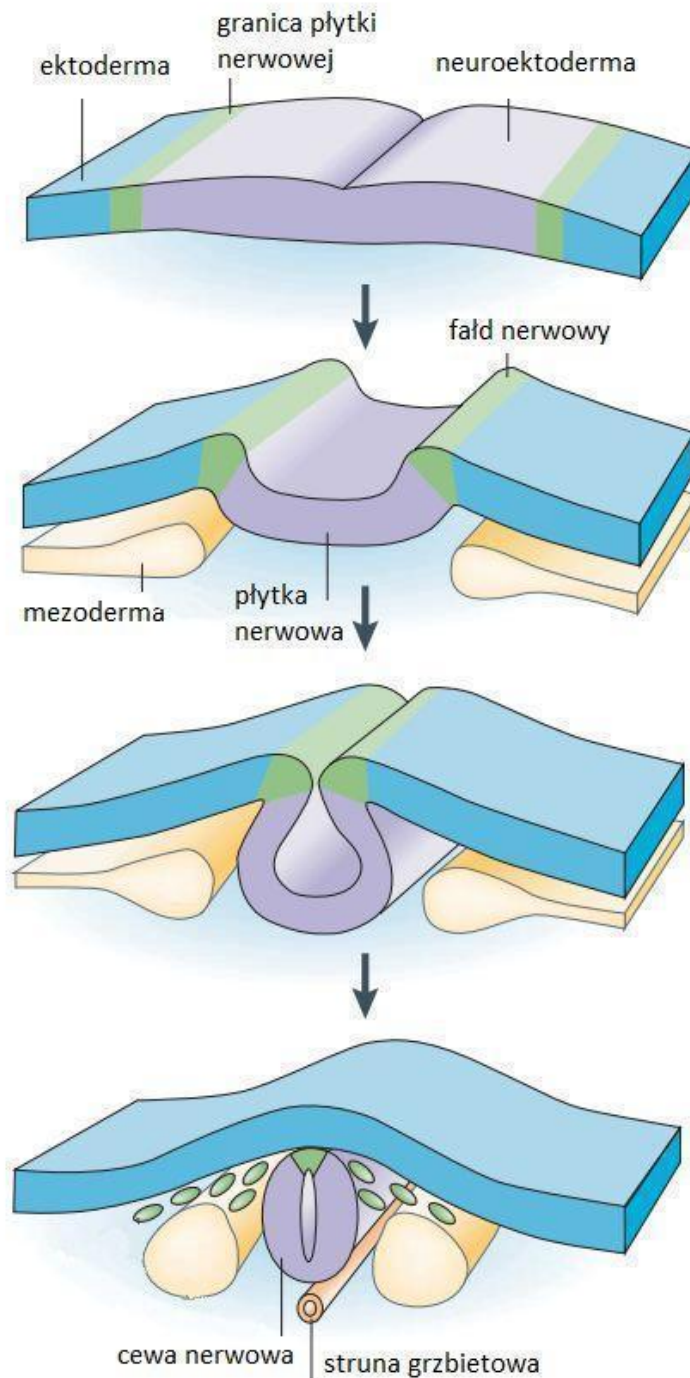
Ryc. 1. Samica oposa *Monodelphis domestica* z 40-dniowym potomstwem.

W niniejszej pracy opos został wybrany jako model zwierzęcy do badań rozwojowych wybranych struktur mózgu.

1.2. Rozwój ośrodkowego układu nerwowego u ssaków

Ośrodkowy układ nerwowy (OUN) kształtuje się stopniowo w okresie rozwoju embrionalnego i płodowego, a część procesów rozwojowych jest kontynuowana po urodzeniu. U ssaków proces ten zaczyna się na etapie gastruli, kiedy to tworzy się mezoderma (Ryc. 2). Struna grzbietowa, która jest strukturą mezodermalną położoną wzdłuż osi ciała po stronie grzbietowej, wydziela substancje chemiczne będące sygnałami molekularnymi, w tym białko morfogenetyczne kości (ang. bone morphogenetic proteins, BMP), które ze strony struny grzbietowej dyfunduje w stronę ektodermy i jest sygnałem molekularnym zmieniającym właściwości komórek

grzbietowej części ektodermy tak, że stają się one neuroblastami (komórkami prekursorowymi neuronów).



Ryc. 2. Etapy procesu neurulacji u ssaków. Gammill i Bronner-Fraser, 2003, modyfikowane.

Struna grzbietowa pełni kluczową rolę w zapoczątkowaniu rozwoju płytki nerwowej (ang. neural plate) i w konsekwencji - całego układu nerwowego. Znajdująca

się bezpośrednio nad struną grzbietową warstwa ektodermy otrzymuje ze struny grzbietowej sygnały indukujące tworzenie się prekursorów komórek nerwowych zgrupowanych w postaci płytki nerwowej. Następnie w procesie neurulacji brzezi płytki nerwowej zawijają się do wewnątrz tworząc zamkniętą rurkę zwaną cewą nerwową (ang. neural tube). Proces tworzenia cewy nerwowej u człowieka jest ukończony 4 tygodnie po zapłodnieniu, a u myszy po około 10-ciu dniach.

Nowo powstała cewa nerwowa zbudowana jest z dwubiegunowych komórek, których wyrostki podczas interfazy cyklu komórkowego rozciągają się przez całą jej szerokość (Ryc. 2). Komórki w obrębie ściany bocznej cewy nerwowej są dłuższe niż komórki tworzące płyty grzbietową i brzuszna (ang. roof plate, floor plate). Tylko komórki ścian cewy nerwowej dzieląc się generują neurony. Płytki grzbietowa i brzuszna wydzielają białka, morfogeny które kontrolują i ukierunkowują rozwój cewy nerwowej. Komórki płytki grzbietowej indukują syntezę białek BMP i innych białek z nadrodziny transformującego czynnika wzrostu beta (ang. transforming growth factor β , TGF- β) natomiast płytka brzuszna wykazuje ekspresję homologu sonic hedgehog (ang. Sonic hedgehog homolog, SHH) (Liu i Niswander, 2005). Komórki nabłonka nerwowego (ang. neuroepithelial cells, NEC) są morfologicznie spolaryzowane. Od strony podstawnej kontaktują się płaskim połączeniem z blaszką podstawną (ang. basal lamina) na obwodzie zewnętrznym cewy. Części wierzchołkowe komórek neuroepitelium mają kontakt ze światłem cewy nerwowej i tworzą specjalistyczne połączenia, nieobecne ani na ich bocznych ścianach ani przy podstawach (Hinds i Ruffett, 1971; Aaku-Saraste i wsp., 1996).

Komórki NEC dzielą się, produkując wciąż nowe komórki, które migrują ku obwodowi ściany, w związku z czym grubość ścian cewy nerwowej stale się zwiększa. W krótkim czasie powstaje warstwa różnicujących się komórek, ułożonych po zewnętrznej stronie warstwy aktywnie dzielących się komórek (de Lahunta i wsp., 2016). Warstwa złożona z dzielących się komórek nazywana jest warstwą rozrodczą (ang. germinal layer), lub strefą komorową (ang. ventricular zone). Różnicujące się komórki tworzą warstwę płaszczową (ang. mantle layer). Komórki położone na zewnętrznej powierzchni cewy nerwowej tworzą warstwę brzezną (ang. marginal layer) (de Lahunta i wsp., 2016).

W trakcie dalszego rozwoju cewy nerwowej powstają 3 koncentryczne warstwy. Bezpośrednio przy świetle cewy znajduje się warstwa rozrodcza (ang. neuroepithelium) złożona z dzielących się komórek NEC. Po zaprzestaniu podziałów, warstwa rozrodcza zostanie jednokomórkową warstwą komórek wyściółkowych (ang. ependymal cells),

wyścielających światło cewy nerwowej – komory, wodociągu mózgu i kanału środkowego rdzenia kręgowego. Kolejną warstwę, płaszczową, tworzą zróżnicowane komórki - młode neurony i komórki gleju. Warstwa ta daje początek istocie szarej rdzenia kręgowego, jądom pnia mózgu, jądom i korze mózdzku, jądom podstawnym i korze mózgowej kresomózgowia. Warstwa zewnętrzna cewy nerwowej czyli warstwa brzeźna jest początkowo zbudowana z rozrastających się aksonów neuronów warstwy płaszczowej. Te aksony zostaną zmielinizowane przez oligodendrocyty i utworzą połączenia istoty białej. Natomiast w kresomózgowiu dochodzi do migracji neuronów z warstwy płaszczowej ku powierzchni zewnętrznej warstwy brzeźnej cewy nerwowej. Powoduje to powstanie w dalszym rozwoju tej struktury istoty szarej usytuowanej tuż pod cienką istotą białą, która przekształca się w pierwszą warstwę kory.

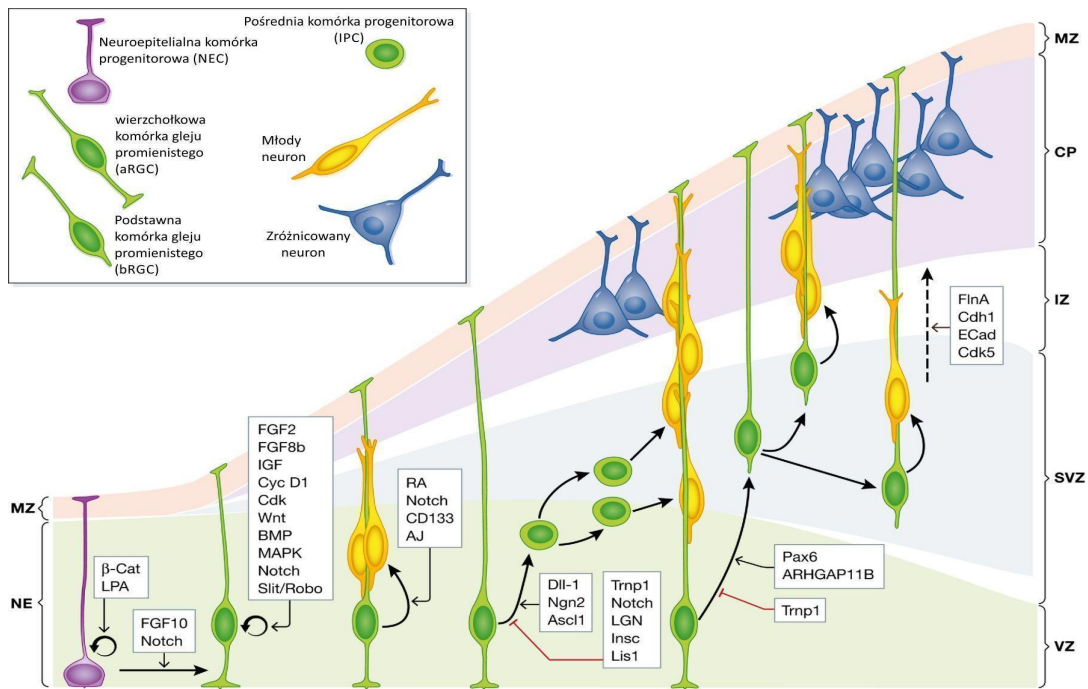
1.2.1. Rozwój kory nowej mózgu u ssaków

Rozwój kory nowej mózgu ssaków zaczyna się na wczesnym etapie rozwoju embrionalnego. U 9-dniowego embrionu myszy w przedniej części cewy nerwowej powstają dwa z pięciu pęcherzyków mózgowia tworzące przodomózgowie, a grzbietowa część pierwszego pęcherzyka jest miejscem, w którym powstaje kora mózgowa. Na tym etapie ściana pęcherzyka składa się z jednej warstwy komórek NEC (Bayer i Altman, 1991), które podlegają wyłącznie podziałom symetrycznym (Ryc. 3). Przy pewnej wielkości puli NEC w niektórych komórkach zachodzi transformacja morfogenetyczna, w wyniku której przekształcają się one w progenitorowe komórki gleju radialnego (Rakic, 1972; Levitt i wsp., 1981). Progenitory te są dwubiegunowymi komórkami, które wykazują ekspresję typowych dla nich białek takich jak wimentyna i Pax6, i tym samym stają się wierzchołkowymi komórkami gleju promienistego (ang. apical radial glial cells, aRGCs). Symetryczne podziały zwiększają pulę tych komórek, które następnie zaczynają dzielić się asymetrycznie, w wyniku czego odtwarza się jedna komórka aRGC i powstaje jedna komórka neuronalna bądź pośrednia komórka progenitorowa (ang. intermediate progenitor cell, IPC). Komórki NEC pozostają po stronie wierzchołkowej (na obrzeżu światła cewy lub komory), a komórki IPC, zajmują część podstawną zawiązka kory mózgowej. IPCs są progenitorami drugiego rzędu, które nie wykazują cech polarności. Umiejscowione są bezpośrednio na zewnątrz od strefy komorowej (ang. ventricular zone, VZ) i w strefie przykomorowej (ang. subventricular zone, SVZ). Wykazują one ekspresję charakterystycznego dla siebie białka - Tbr2 (ang. T-box brain protein 2). U myszy

większość komórek IPC dzieli się tylko raz i daje początek dwóm neuronom. Podziały IPCs generują większość korowych neuronów pobudzających (Attardo i wsp., 2008, Kowalczyk i wsp., 2009).

Oprócz aRGCs i IPCs w rozwijającej się korze mózgowej myszy wyróżnia się też inne, mniej liczne komórki progenitorowe. W VZ występują wierzchołkowe progenitory pośrednie (ang. apical intermediate progenitors, aIPs), które dzielą się na powierzchni wierzchołkowej wytwarzając neurony oraz progenitory okołowierzchołkowe (ang. subapical progenitors, SAPs). W obszarze SVZ występują podstawne komórki gleju promienistego (ang. basal radial glial cells, bRGCs), które są podobne do aRGCs i również wykazują ekspresję Pax6, ale ich ciało komórkowe nie przemieszcza się i ulega podziałom w podstawnej części SVZ (Ryc. 3) (Wang i wsp., 2011).

U ssaków z pofałdowaną korą mózgową takich jak ludzie, małpy czy fretki, liczebność aRGCs jest znacznie wyższa niż u przedstawicieli gatunków z gładką korą takich jak mysz. Powoduje to rozszerzenie VZ i wynika bezpośrednio z większej liczby NECs we wcześniejszych fazach rozwoju. Ponadto, u ssaków z pofałdowaną korą występuje pogrubiona SVZ złożona z licznych progenitorów podstawnych, co jest widoczne zwłaszcza na późniejszych etapach neurogenezy, gdzie ich liczba znacznie przewyższa liczbę progenitorów wierzchołkowych. Powoduje to podział SVZ na część wewnętrzną (ang. inner subventricular zone, ISVZ) oraz zewnętrzną (ang. outer subventricular zone, OSVZ), który nie występuje u ssaków z korą gładką np. myszy. OSVZ złożona jest z wielu różnych typów komórek progenitorowych. Wszystkie one mają dużą zdolność do proliferacji, co jest kluczowe do rozrostu kory i jej fałdowania. U ssaków z pofałdowaną korą tylko nieliczne progenitory podstawne zaliczane są do IPCs, większość z nich to bRGCs.

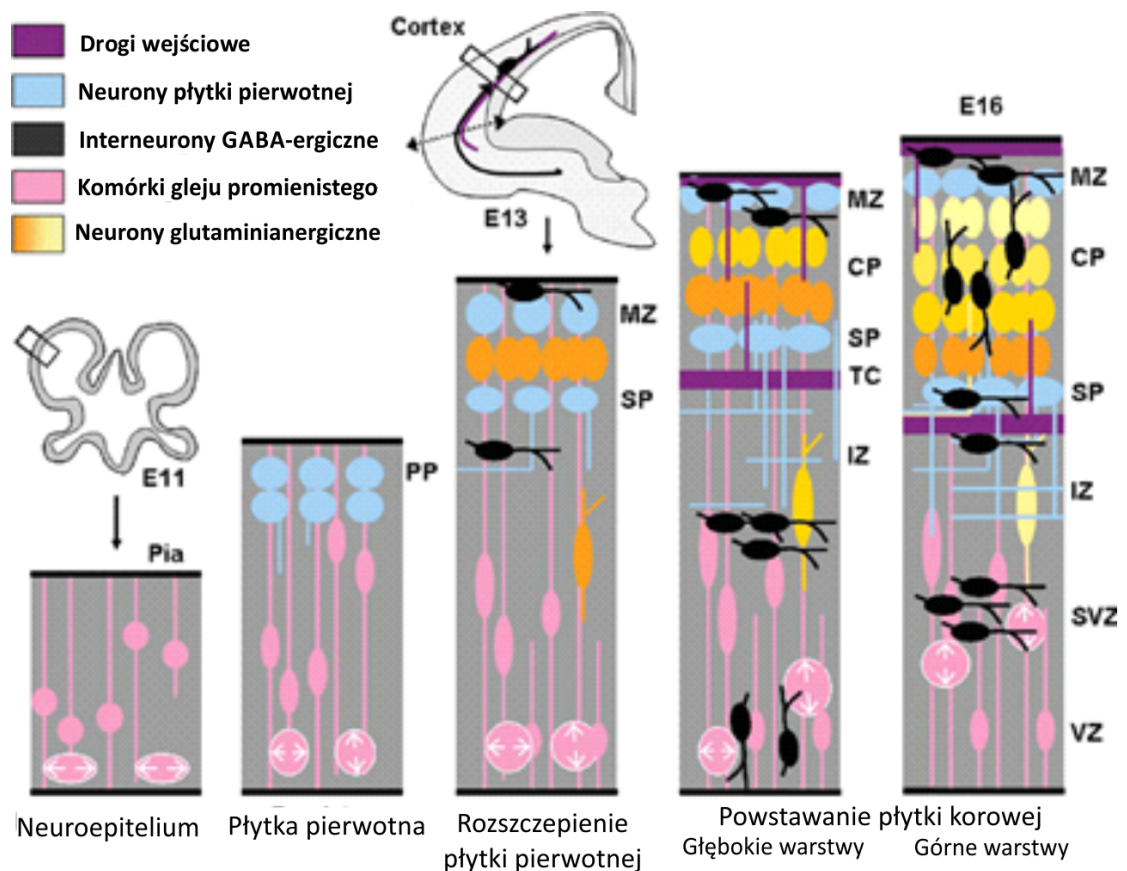


Ryc. 3. Główne typy komórek progenitorowych w rozwijającej się korze mózgowej oraz zależności między nimi wyznaczone strzałkami. W białych prostokątach wymienione są białka wpływające na poszczególne procesy. MZ - strefa brzeżna; CP - płytka korowa; IZ - strefa pośrednia; SVZ - strefa przykomorowa; VZ- strefa komorowa. Fernández i wsp., 2016, modyfikowane.

Po podziałach komórek RGC w różnych częściach VZ powstają neurony piramidowe lub interneurony korowe. Neurony piramidowe powstają w okolicy VZ bezpośrednio pod ścianą przodomózgowia i przemieszczają się radialnie w kierunku powierzchni opony miękkiej. Natomiast, interneurony hamujące (GABA-ergiczne) powstają w bocznych i środkowych wyniosłościach zwojowych przodomózgowia (przyszłe prążkowie i jądra podstawy) i migrują bocznie do kory. Pierwsze neurony postmitotyczne tworzą płytkę pierwotną (preplate, PP) (Caviness, 1982). Nowo powstające neurony przemieszczają się do PP i rozdzielają ją na 2 części: pierwotną warstwę podpłytkową (ang. subplate, SP) po wewnętrznej stronie i warstwę brzeżną (ang. marginal zone, MZ) po stronie zewnętrznej. Dwie warstwy, PP i VZ oddzielone są od siebie strefą pośrednią (ang. intermediate zone, IZ), która składa się z ciasno ułożonych włókien i stanowi początek przyszłej istoty białej znajdującej się pod korą. U myszy PP pojawia się w 12.5 dniu embrionalnym (E), a dzień później, w E13.5 inicjuje tworzenie warstw korowych. PP znajduje się po zewnętrznej stronie ściany półkuli mózgu i budowana jest zgodnie z zasadą „dodawania na zewnątrz” (ang. outside-in), czyli komórki powstające później mijają starsze i wypychają je do wewnątrz. Tak więc,

najstarsze neurony, zlokalizowane najbliżej strefy przykomorowej stworzą w przyszłości warstwę VI (Ryc. 4).

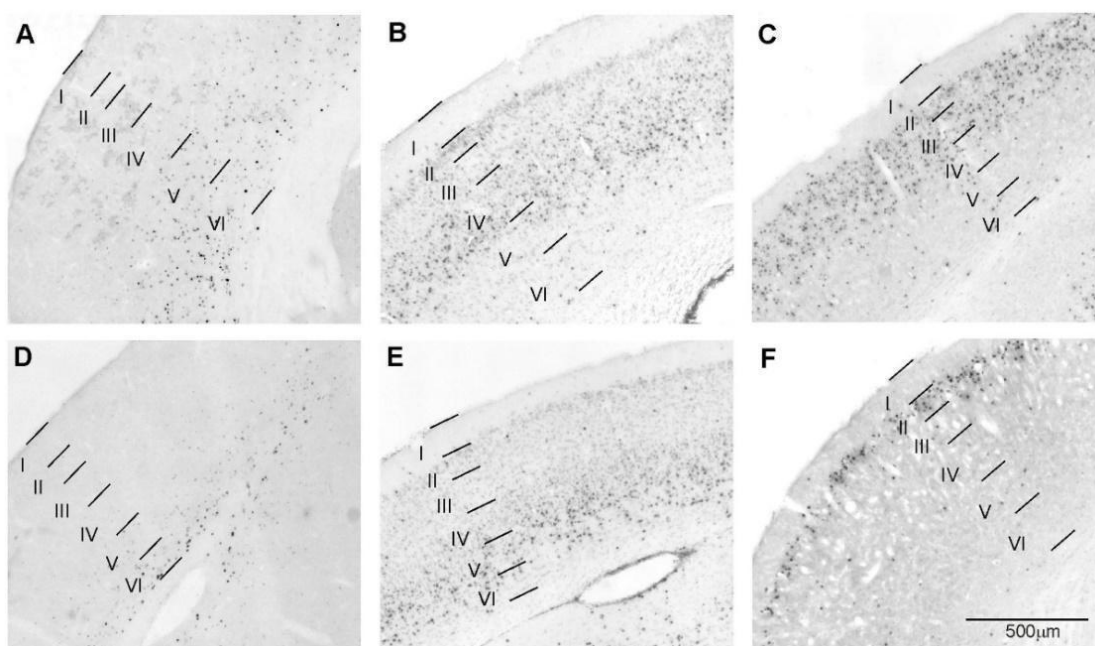
Prekursory neuronów przemieszczają się zewnątrz w stosunku do komory, mijają poprzednio osiadłe neurony, zatrzymują się, ulegają ostatecznemu różnicowaniu, tworzą warstwę V, a następnie po kolei warstwy IV i II/III. Miejscem zakończenia migracji jest warstwa pionierskich neuronów Cajala-Retziusa, które na wczesnym etapie rozwoju migrują stycznie do powierzchni kory. Ze względu na to, że są one ciągle wypychane na zewnątrz, stanowią odstępstwo od reguły inside-out (Ryc. 4).



Ryc. 4. Kora mózgowa u myszy na różnych etapach rozwoju. Pia opona miękka, PP płytką pierwotną, SP warstwa podpłytkowa, TC aksony neuronów korowo-wzgórzowych, MZ strefa brzeżna, CP płytką korowa, IZ strefa pośrednia, SVZ strefa przykomorowa, VZ strefa komorowa. Vitalis i Rossier, 2011, modyfikowane.

U myszy, proces tworzenia wszystkich warstw kory trwa zaledwie kilka dni, do E18 (Gillies i Price, 1993; Price i wsp., 1997; Levers i wsp., 2001).

Kora nowa u wszystkich ssaków wykazuje charakterystyczną 6-warstwową budowę. Ogólny wzór podziałów komórkowych jest porównywalny u oposa i myszy, chociaż czas i tempo rozwoju są inne. Rozwój kory nowej u torbaczy rozpoczyna się później i przebiega wolniej niż u ssaków łożyskowych. U oposa z gatunku *Monodelphis domestica* głębokie warstwy kory (VI i V) powstają przez 5 dni od P3 do P7, natomiast wyższe warstwy (IV, III i II) rozwijają się przez 11 kolejnych dni od P7 do P18 (Ryc. 5) (Cheung i wsp., 2010; Puzzolo i Mallamaci, 2010; Bartkowska i wsp., 2013).

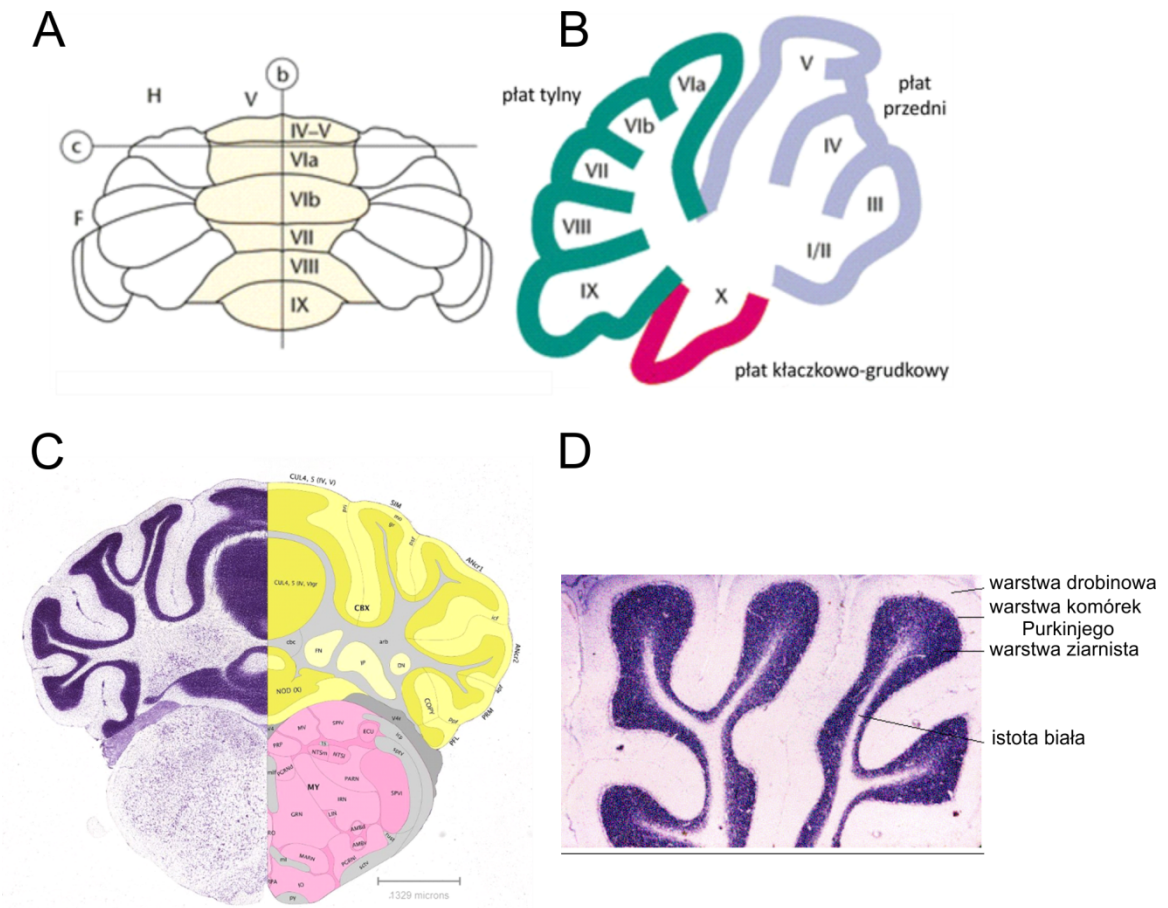


Ryc. 5. Rozwój kory u oposa. A-F umiejscowienie jąder komórek wybarwionych immunohistochemicznie na obecność BrdU na skrawkach czołowych u 3-miesięcznego oposa, który otrzymał iniekcję BrdU w wieku P3 (A, D), P7 (B, E) i P12 (C, F). Bartkowska i wsp., 2013.

1.2.2. Mózdzek u ssaków i jego rozwój

Anatomicznie mózdzek jest dzielony na dwie półkule pomiędzy którymi znajduje się robak (łac. vermis). Od zewnętrznej strony mózdzku rozróżnia się korę, której pofałdowana struktura podzielona jest na 10 płatów (Ryc. 6). Pod korą, w istocie białej znajdują się głębokie jądra mózdzku (ang. deep cerebellar nuclei, DCN). Mózdzek formuje się z kilku rodzajów neuronów: drobne i liczne komórki ziarniste, komórki Purkinjego o rozbudowanym drzewku dendrytycznym oraz interneurony - komórki Golgiego, komórki gwiazdziste, komórki koszyczkowe, komórki Lugaro oraz komórki kandelabrowe (Marzban i wsp., 2015). Kora mózdzku ma charakterystyczną warstwową

budowę, z usytuowaną wewnątrz warstwą ziarnistą z licznymi komórkami ziarnistymi, warstwą zwojową składającą się z pojedynczego rzędu komórek Purkiniego oraz najbardziej zewnętrzną warstwą drobinową zawierającą drzewka dendrytyczne komórek Purkiniego oraz interneurony (Ryc. 6).



Ryc. 6. Anatomia mózdzku myszy. Schemat mózdzku, widzianego w rzucie grzbietowym (A), podział na płaty i płaciki mózdzku widziany w przekroju strzałkowym wykonanym według linii pionowej ze schematu A (B), skrawek czołowy mózdzku myszy wybarwiony metodą Nissla z nałożonymi strukturami anatomicznymi (C), fragment kory mózdzku z zaznaczonymi warstwami (D). A, B Hawkes, 2019, modyfikowane; C Allen Mouse Brain Atlas and Allen Reference Atlas - Mouse Brain; D <http://staff.um.edu.mt/acus1/Cerebellum.htm>, modyfikowane.

Mózdzek rozwija się w górnej części tyłomózgowia, które jest czwartą z pięciu części mózgowia. Jego rozwój rozpoczyna się z chwilą utworzenia się w embrionalnej cewie nerwowej granicy pomiędzy śródmózgowiem i tyłomózgowiem. Powstaje ona jeszcze na etapie płytki nerwowej na skutek aktywacji kaskady genów w wąskim pasie poprzecznym do osi mózgu. Kluczowa jest tu odmienna topografia ekspresji dwóch

czynników transkrypcyjnych: *Otx2* (ang. orthodenticle homeobox 2) i *Gbx2* (ang. gastrulation brain homeobox 2). Ekspresja genu *otx2* zachodzi nieco bardziej do przodu, definiując tę część embrionalnej cewy nerwowej jako tylną część śródmózgowia, a genu *gbx2* tuż za nim, indukując rozwój struktur przedniej części tyłomózgowia (Simeone i wsp., 1992; Simeone i wsp., 1993; Wassarman i wsp., 1997). Na granicy ekspresji tych dwóch genów, która biegnie w poprzek osi embrionalnej cewy nerwowej, powstaje tak zwany organizator cieśni (ang. isthmus organizer; Broccoli i wsp., 1999; Millet i wsp., 1999; Li i Joyner, 2001). Jest to obszar przejściowej ekspresji genów, w którym wydzielane są liczne białka sygnałowe wyznaczające granicę między śródmózgowiem i tyłomózgowiem, a w górnej części tego ostatniego - obszar przyszłego mózdzku. Najważniejsza jest tu ekspresja genów *FGF-8* (ang. fibroblast growth factor 8) po stronie śródmózgowia i *WNT1* po stronie tyłomózgowia. Ekspresja tych genów jest niezbędna do namnożenia odpowiedniej liczby komórek i ich różnicowania się w zawiązku mózdzku. U myszy dzieje się to między 8-mym i 11.5 dniem rozwoju płodu (McMahon i Bradley, 1990; Thomas i Capecchi, 1990; Mastick i wsp., 1996). Tylną granicę zawiązku mózdzku wyznacza przednia granica ekspresji genu *hoxa2* (ang. Homeobox protein Hox-A2), która również biegnie poprzecznie do osi cewy nerwowej. Ekspresja tego genu zachodzi w całej tylnej części cewy nerwowej, poczynając od granicy między rombomerami 1 i 2 tyłomózgowia.

Podziały komórek generujących neurony mózdzku zachodzą w dwóch strefach rozrodczych: strefie rozrodczej (VZ) IV komory, gdzie u myszy komórki NEC zaczynają się dzielić asymetrycznie około 10-tego dnia rozwoju płodowego i w drugorzędowej strefie rozrodczej, uchyłku romboidalnym (ang. rhombic lip), która wykształca się w tym samym czasie. Powstanie tej strefy indukowane jest przez sygnały molekularne wydzielane z płytki stropowej (ang. roof plate, RP) czwartej komory mózgu. RP jest przejściową strukturą cewy nerwowej, istniejącą tylko w życiu płodowym. Wytwarza ona i uwalnia cząsteczki sygnałowe (białka), które powodują wykształcenie się mózdzku po stronie grzbietowej tyłomózgowia. RP wydzielają białka z rodziny BMP które powodują powstanie uchyłka romboidalnego i indukują ekspresję *Ptf1a* w VZ powstającego mózdzku. Granica ekspresji genu *ptf1a* wyznacza brzuszną granicę mózdzkowego obszaru rombomeru 1. Uchyłek romboidalny jest miejscem powstawania neuronów glutaminianergicznych, w tym neuronów budujących DCN mózdzku oraz neuronów ziarnistych (ang. granule cells) mózdzku. U myszy pomiędzy E10.5 i E12.5 w uchyłku romboidalnym w wyniku podziałów asymetrycznych NEC powstają neurony projekcyjne

jąder mózdzku (Miale i Sidman, 1961; Wang i wsp., 2005), które następnie przemieszczają się wzdłuż wypustek gleju radialnego na powierzchnię zawiązka mózdzku i tworzą jądrową strefę przejściową (ang. nuclear transitory zone, Goffinet, 1983; Altman i Bayer, 1985). Glej radialny powstaje w wyniku asymetrycznych podziałów NEC, w obecności białka Notch, które jest niezbędne do różnicowania się progenitorów w astrocyty. W tym okresie (około E10.5) rozpoczyna się proliferacja progenitorów mózdzku w obrębie strefy VZ komory IV (Wang and Zoghbi 2001). Z podziałów tych powstają komórki GABA-ergiczne Purkiniego (Zhang i Goldman, 1996; Wang i Zoghbi, 2001). Między E11 a E12 następuje intensywne proliferacja progenitorów neuronów ziarnistych, które przemieszczają się w przestrzeni podoponowej zawiązka mózdzku, tworząc tam zewnętrzną warstwę ziarnistą (ang. external granular layer, EGL). Komórki Purkiniego przemieszczają się w kierunku powstającego EGL aby utworzyć wielowarstwową strukturę. Komórki Purkiniego, które powstają wcześniej migrują stycznie, lecz około E13.5 zmieniają kierunek po tym jak wytworzą wypustki do obszaru kory mózdzku. W ten sposób powstaje płytka komórek Purkiniego (ang. Purkinje cell plate). Te neurony Purkiniego, które powstają nieco później, przemieszczają się dalej, wykorzystując do tego rusztowanie wytworzone przez komórki gleju radialnego (Miyata i wsp., 2010). Początkowo komórki Purkiniego migrują po rusztowaniu utworzonym przez glej radialny (promienisty) aż do płytki komórek Purkiniego. Następnie glej radialny odcepią swoją wypustkę od powierzchni mózdzku, a jego ciała komórkowe przemieszczają się przez zawiązek mózdzku, kończąc wędrówkę w obrębie warstwy komórek Purkiniego i przekształcając się w glej Bergmanna. Glej Bergmanna, który jest kluczowy w rozwoju mózdzku, powstaje w E13.5 (Sudarov i Joyner, 2007). Badania wykazały, że w przekształcaniu gleju radialnego w glej Bergmanna ważną rolę odgrywa białko PTPN11 (Li i wsp., 2014; Heng i wsp., 2017). Rozmieszczenie gleju Bergmanna w warstwie komórek Purkiniego jest zależne od interakcji pomiędzy białkiem Notch obecnym w gleju Bergmanna a receptorem DNER obecnym na komórkach Purkiniego (Eiraku i wsp., 2005).

Oprócz komórek Purkiniego w VZ powstają również interneurony hamujące, które w postaci aktywnych mitotycznie prekursorów migrują do obszaru przyszłej istoty białej. U myszy największe nasilenie proliferacji tych komórek przypada na P0-P7. Pierwsze powstają interneurony DCN, a ostatnie neurony koszyczkowe i gwiazdziste obecne w warstwie drobinowej kory mózdzku. Komórki Purkiniego wpływają na komórki progenitorowe, oraz różnicowanie i rozrost rozgałęzień aksonalnych

interneuronów mózdkowych. Oddziałują one przez wydzielanie białek SHH, neurofascyny i semaforyny (SEMA3A/neuropilina) (Buttermore i wsp., 2012; Cioni i wsp., 2013; Leto i wsp., 2016; De Luca i wsp., 2016; Fleming i Chiang, 2015).

Spośród glutaminergicznych neuronów mózdku, najpóźniej powstają neurony ziarniste. Są one generowane z progenitorowych komórek ziarnistych warstwy EGL, która jest drugorzędową strefą rozrodczą. U myszy, szczyt proliferacji komórek progenitorów ziarnistych przypada na dwa pierwsze tygodnie po urodzeniu. Wzmożone tempo podziałów tych komórek jest zależne głównie od białka SHH wydzielanego przez komórki Purkiniego znajdujące się w płycie komórek Purkiniego, umiejscowionej poniżej EGL. Po zakończeniu podziałów, neurony ziarniste przemieszczają się stycznie po wewnętrznej stronie EGL, a następnie promieniście opuszczają tę strefę i migrują w głąb, poniżej rozwijającej się warstwy komórek Purkiniego, tworząc wewnętrzną warstwę ziarnistą (ang. internal granule layer, IGL). Wzmożona proliferacja komórek EGL prowadzi do gwałtownego zwiększenia rozmiaru mózdku i wytworzenia jego pofałdowanej struktury. Fałdowanie mózdku rozpoczyna się od utworzenia specjalnych miejsc kotwiczących, które tworzą podstawę każdej ze szczelin oddzielającej fałdy. W robaku mózdku myszy można wyróżnić cztery obszary, które dają początek pięciu podstawowym płacikom. W obrębie tych obszarów następuje wzmożona proliferacja progenitorów i związana z tym zmiana pozycji wiązek gleju Bergmanna, co prowadzi do powiększania się fałdów mózdku w osi przednio-tylnej. Różnice w czasie wzmożenia podziałów na danym obszarze determinują formę dorosłego mózdku.

1.3. Neurotrofiny i ich receptory

Neurotrofiny są rodziną białek które są niezbędne zarówno do rozwoju układu nerwowego jak i do jego normalnego funkcjonowania przez całe życie. W latach 50-tych XX wieku Rita Levi Montalcini odkryła pierwsze białko z tej rodziny, zwane czynnikiem wzrostu nerwów (ang. nerve growth factor, NGF). Odgrywa ono kluczową rolę w proliferacji, przeżywalności i różnicowaniu neuronów w rozwijającym się obwodowym i ośrodkowym układzie nerwowym, wpływając na ich aktywność na wiele sposobów (Hamburger i Levi-Montalcini, 1949; Levi-Montalcini, 1987). Później u ssaków wykryto jeszcze inne białka o działaniu podobnym do NGF. Obecnie, do rodziny białek zwanych klasycznymi neurotrofinami zalicza się NGF, neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (ang. brain-derived neurotrophic factor, BDNF), neurotrofinę 3 (NT-3) oraz

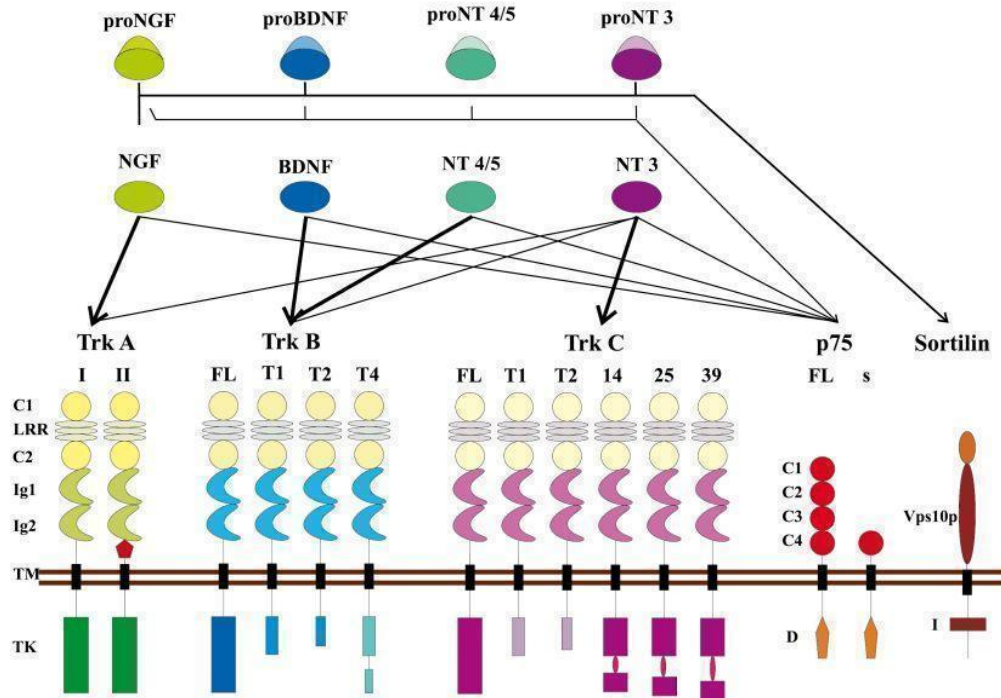
neurotrofinę 4/5 (NT-4/5). Struktura wszystkich neurotrofin jest podobna. Są one syntetyzowane jako proneurotrofiny, białka o masie ~30 – 34 kDa, które po modyfikacjach potranslacyjnych w siateczce śródplazmatycznej i aparacie Golgiego są cięte przez furyny lub prokonwertazy, w wyniku czego stają się dojrzałymi neurotrofinami (Bibel i Barde, 2000). Dojrzałe neurotrofiny wielkości ~13 kDa tworzą stabilne, niekowalencyjne homodimery, ale niektóre neurotrofiny mogą tworzyć heterodimery z innymi neurotrofinami (Teng i wsp., 2010).

Neurotrofiny działają przez dwa różne typy receptorów: kinazy receptora tropomiozyny (ang. tropomyosin receptor kinase, Trk) należące do rodziny receptorów kinaz tyrozynowych (ang. receptor tyrosine kinases, RTKs) oraz przez receptor neurotrofin p75 (ang. p75 neurotrophin receptor, p75^{NTR}), który należy do nadrodziny receptorów czynnika martwicy nowotworów (ang. tumor necrosis factor, TNF) (Rodríguez-Tébar i wsp., 1991). U ssaków występują 3 receptory Trk (TrkA, TrkB i TrkC) i każdy z nich wiąże się z innymi neurotrofinami: NGF ma duże powinowactwo do receptorów TrkA, BDNF charakteryzuje się wysokim powinowactwem wiązania do receptorów TrkB, NT-3 wiąże się najsilniej z receptorem TrkC, lecz wykazuje również słabsze powinowactwo do pozostałych receptorów (Kaplan i wsp., 1991; Klein i wsp., 1991). NT-4/5 najsilniej wiąże się z receptorem TrkB (Ip i wsp., 1992).

Geny *trk* kodują białka pełnej długości, ale transkrypty ich egzonów mogą ulegać alternatywnemu składaniu, co prowadzi do powstawania wielu izoform receptorów Trk, w których brak jest krótkich sekwencji aminokwasów w domenie pozakomórkowej lub kinazy tyrozynowej w domenie wewnątrzkomórkowej.

Domena zewnątrzkomórkowa wszystkich receptorów Trk składa się z elementu bogatego w cysteinę, trzech segmentów bogatych w leucynę, kolejnego elementu bogatego w cysteinę i dwóch domen podobnych do immunoglobulin. Druga z nich odpowiada za selektywne wiązanie receptorów TrkA, TrkB i TrkC do poszczególnych neurotrofin. Każdy z receptorów Trk przecina błonę komórkową jednokrotnie i jest zakończony domeną cytoplazmatyczną składającą się z domeny kinazy tyrozynowej otoczonej przez tyrozyny, które służą za zależne od fosforylacji miejsce do przyłączania adaptorów cytoplazmatycznych i enzymów. Przyłączenie neurotrofiny do receptora Trk powoduje jego dimeryzację i aktywację na skutek transfosforylacji kinaz znajdujących się w ich domenach cytoplazmatycznych. Również inne pozakomórkowe domeny regulują aktywność katalityczną receptorów Trk (Arevalo i wsp., 2000). Co ciekawe, aktywacja kinaz tyrozynowych receptorów Trk może nastąpić również bez związania

neurotrofiny, poprzez zahamowanie N-glikozylacji domeny zewnątrzkomórkowej (Watson i wsp., 1999). Ponadto fosforylacja tyrozyny występuje również poza domeną kinazy tyrozynowej, na końcu C receptora Trk.



Ryc. 7. Schemat przedstawiający budowę receptorów neurotrofin i odpowiadające im ligandy. Neurotrofiny wiążą się ze swoimi receptorami z wysokim (grube strzałki) lub niskim (cienkie strzałki) powinowactwem. FL - receptor o pełnej długości; T1, T2, T4 - skrócone warianty receptora; 14,25,39 - liczba aminokwasów; C1, C2, C3, C4 - elementy bogate w cysteinę; LRR - segment bogaty w leucynę; Ig1, Ig2 - domeny podobne do immunoglobulin; TM - domena transbłonowa; TK - domena kinazy tyrozynowej; D - domena "śmierci"; Vps10p - zewnątrzkomórkowa domena sortiliny (Bartkowska i wsp., 2010).

Związanie neurotrofiny przez receptor Trk powoduje jego dimeryzację, co z kolei aktywuje kinazę tyrozynową znajdującą się w domenie cytoplazmatycznej receptora. Dalsza transdukcja sygnału odbywa się poprzez aktywację szeregu różnych białek, takich jak kinazy ERK (ang. extracellular signal-regulated kinases), 3-kinazę fosfatydyloinozytolu (PI3K) oraz fosfolipazę C γ (PLC γ). Szlaki sygnałowe związane z receptorami Trk wpływają na proliferację, przeżywalność, różnicowanie się neuronów, regulują wzrost i rozgałęzienie drzewek dendrytycznych, powstawanie synaps oraz plastyczność synaptyczną (Reichardt, 2006).

W przeciwieństwie do receptorów Trk, które ulegają autofosforylacji po związaniu liganda, receptor p75^{NTR} nie wykazuje wewnętrznej aktywności katalitycznej. Receptor ten współpracuje z receptorami TrkA, TrkB i TrkC, lecz również z nieneurotrofinowymi receptorami – sortiliną i Nogo. Tworząc kompleksy z receptorami, Trk zwiększa powinowactwo dojrzałych neurotrofin i wspiera sygnalizację wspomagającą przeżywanie i wzrost (Hempstead i wsp., 1991). Proneurotrofiny silnie wiążą się z kompleksem receptorów p75^{NTR}/sortilina aktywując ścieżkę apoptotyczną (Friedman, 2000; Beattie i wsp., 2002; Nykjaer i wsp., 2004). Wraz z receptorami Nogo i Lingo-1, p75^{NTR} wspiera wycofywanie się stożka wzrostu w odpowiedzi na białka wydzielane przez mielinę (Wang i wsp., 2002; Wong i wsp., 2002; Mi i wsp., 2004). Podczas rozwoju, receptor p75^{NTR} pełni ważną rolę we wzmacnianiu połączeń synaptycznych i selekcji neuronów (Dechant i Barde, 2002). Również w układzie nerwowym dorosłych zwierząt receptor p75^{NTR} pełni istotne funkcje, takie jak modyfikacja synaps w hipokampie (Rosch i wsp., 2005; Woo i wsp., 2005; Zagrebelsky i wsp., 2005) i regulacja neurogenezy (Bernabeu i Longo, 2010).

Sortilina należy do rodziny białek błonowych typu 1 zawierających domenę VPS10P (ang. vacuolar protein sorting 10 protein) (Nykjaer i Willnow, 2012). Sortilina jest receptorem wiążącym proNGF i proBDNF, co jest kluczowe do uruchomienia programowanej śmierci neuronów (Nykjaer i wsp., 2004; Teng i wsp., 2005). Oprócz regulacji wydzielania proneurotrofin, sortilina kontroluje również przekazywanie sygnału razem z receptorem p75^{NTR} (Nykjaer i wsp., 2004).

1.3.1. Funkcja neurotrofin i ich receptorów - badania na myszach knockout

Ekspresja neurotrofin i ich receptorów w układzie nerwowym rozpoczyna się na bardzo wczesnym etapie rozwoju, już w okresie kształtowania się cewy nerwowej (Bernd, 2008). Pomimo, że budowa różnych neurotrofin i ich receptorów Trk jest bardzo zbliżona, to ich funkcje mogą się różnić w zależności od komórek na których są zlokalizowane oraz od etapu rozwoju. Funkcje neurotrofin i ich receptorów zostały badane między innymi na modelach transgenicznymy myszy pozbawionych jakiegoś genu lub genów, kodujących neurotrofiny lub ich receptory.

Większość obwodowych aksonów neuronów czuciowych, których ciała komórkowe znajdują się w zwojach rdzeniowych (ang. dorsal root ganglia, DRG) kończy się w powierzchniowych warstwach skóry, gdzie na wczesnych etapach rozwoju syntezowany

jest NGF. U myszy pozbawionych NGF lub receptora TrkA stwierdzono ubytek około 70% neuronów w DRG, co prowadzi do braku reaktywności na bodźce bólowe i zmiany temperatury (Crowley i wsp., 1994; Smeyne i wsp., 1994). Myszy heterozygotyczne pod względem genu kodującego TrkA lub NGF wykazują niewielką utratę neuronów w DRG, jednak ich próg reakcji na bodziec bólowy jest podniesiony (Crowley i wsp., 1994; Silos-Santiago i wsp., 1995). Ponadto u myszy *ngf(-/-)* lub *trkA(-/-)* zwoje szyjne górne są znacznie mniejsze i mają mniej neuronów, w wyniku czego myszy te mają opadające powieki i źrenice niezdolne do rozszerzenia się (Crowley i wsp., 1994; Smeyne i wsp., 1994). Oprócz tego, u myszy *ngf(-/-)* zauważono zmniejszoną syntezę acetylotransferazy cholinowej, a u myszy *trkA(-/-)* redukcję aktywności cholinesterazy w aksonach hipokampa i docelowych miejscach w korze mózgu, co sugeruje, iż transmisja cholinergiczna w tych neuronach jest zaburzona (Crowley i wsp., 1994; Smeyne i wsp., 1994). Myszy pozbawione jednego allelu genu kodującego NGF charakteryzują się gorszą pamięcią przestrzenną, co jest związane z redukcją liczby połączeń cholinergicznym z neuronami hipokampa (Chen i wsp., 1997).

BDNF oraz NT-4/5 działają przez ten sam receptor, TrkB. Badania na myszach pozbawionych BDNF, lub NT-4/5 albo też receptora TrkB pozwoliły na ustalenie ich wpływu na rozwój. W przypadku braku genu kodującego BDNF lub TrkB, myszy umierają w początkowych tygodniach życia i wykazują duże trudności z utrzymaniem równowagi (Ernfors i wsp., 1994; Jones i wsp., 1994), natomiast myszy pozbawione NT-4/5 nie mają zauważalnych braków behawioralnych, a ich długość życia jest normalna (Conover i wsp., 1995; Liu i wsp., 1995). Myszy pozbawione BDNF lub NT-4/5 wykazują charakterystyczną utratę neuronów czuciowych, natomiast nie zauważono u nich redukcji liczby neuronów ruchowych, ani też neuronów podstawnej części kresomózgowia (Ernfors i wsp., 1994; Jones i wsp., 1994; Conover i wsp. 1994; Liu i wsp., 1995). Inne badania zademonstrowały, że BDNF jest niezbędny do przeżycia neuronów przedsionkowych, a wraz z NT-4/5 do przetrwania niektórych populacji neuronów zwojów czuciowych (Conover i wsp. 1994; Liu i wsp., 1995, Erickson i wsp., 1996). Badania rozwoju heterozygotycznych myszy przeprowadzone przez Ericksona i in. (1996) pokazały, że NT-4/5 i BDNF mają różny wpływ na przeżywalność trzewnych neuronów czuciowych oraz, że utrata BDNF powoduje nieregularny i zaburzony oddech. Myszy z obniżoną ekspresją BDNF wykazują większą agresję co jest związane z zaburzeniami w układzie serotonergicznym (Lyons i wsp., 1999). Ponadto zaobserwowano, że myszy BDNF^{+/-} jedzą dużo więcej, co prowadzi do otyłości (Lyons i

wsp., 1999; Kernie i wsp., 2000). Obniżony poziom BDNF prowadzi również do zaburzeń w pamięci przestrzennej i uczeniu się (Linnarsson i wsp., 1997). Obniżenie ekspresji BDNF u myszy po urodzeniu powodowało wzmożoną aktywność w odpowiedzi na stres, wyższy poziom lęku, i podobnie jak myszy genetycznie pozbawionych jednego allelu BDNF, otyłość, która korelowała ze zwiększonym poziomem leptyny, cholesterolu, insuliny i glukozy (Rios i wsp., 2001). Brak lub obniżona ekspresja BDNF wpływa również na utrudnioną indukcję LTP w hipokampach transgenicznym myszy (Korte i wsp., 1995). Patterson i wsp. (1996) wykazali, że podanie rekombinowanego białka BDNF do skrawków hipokampa pochodzących od transgenicznym myszy pozbawionych ekspresji BDNF przywracało prawidłową indukcję LTP. Natomiast Dluzen i wsp. (2001) odkryli, że poziom dopaminy w prążkowie heterozygotycznym mutantów myszy *bdnf*(+/-) jest podwyższony. Prawidłowy poziom ekspresji BDNF jest również niezbędny do przekazywania sygnału przez wolno adaptujące się mechanoreceptory (Carroll i wsp., 1998). Ponadto, brak BDNF wpływa na degenerację zwojów czuciowych co prowadzi do problemów z równowagą i koordynacją ruchową (Ernfors i wsp., 1994). Bianchi i wsp. (1996) wykazali, że do rozwoju neuronów przedsionkowych potrzebna jest obecność BDNF.

Neurotrofina NT-3 jest ważna dla prawidłowego rozwoju neuronów i ich połączeń w różnych strukturach mózgu. Myszy transgeniczne pozbawione ekspresji NT-3 wykazują zaburzenia ruchowe i umierają niedługo po urodzeniu (Ernfors i wsp., 1994). Dalsze badania wykazały, że NT-3 jest kluczowa dla przeżywania neuronów czuciowych i współczulnych (Fariñas i wsp., 1994; Ernfors i wsp., 1995; ElShamy i wsp., 1996; Liebl i wsp., 1997) oraz niektórych mechanoreceptorów (Airaksinen i wsp., 1996). Liczba progenitorów oligodendrocytów jest niższa u myszy pozbawionych tej neurotrofiny (Kahn i wsp., 1999), a grubość otoczki mielinowej jest zredukowana (Woolley i wsp., 2008). Natomiast, myszy pozbawione specyficznego receptora TrkC dla NT-3 mają podobne, lecz mniej zaawansowane zaburzenia.

Myszy pozbawione receptora p75 w przeciwieństwie do myszy pozbawionych receptorów Trk są zdolne do życia. Fenotyp ten ma obniżoną wrażliwość na ból i bodźce związane z temperaturą, co związane jest z deficytem neuronów czuciowych, wykazuje też charakterystyczne zmiany w układzie współczulnym, takie jak nieprawidłowe unerwienie szyszynki i redukcja lub brak unerwienia gruczołów potowych w poduszkach łap (Lee i wsp., 1992; Lee i wsp., 1994).

1.3.2. Rola neurotrofin i ich receptorów w rozwoju kory nowej i mózdzku

Podczas rozwoju układu nerwowego ssaków, ekspresja neurotrofin i ich receptorów w korze nowej zachodzi na wczesnych etapach jej rozwoju (Bartkowska i wsp., 2010). Badania czasu i miejsca ekspresji neurotrofin i ich receptorów wykazały, że BDNF i TrkB oraz NT-3 i TrkC są obecne już w komórkach progenitorowych RGCs, neuronach podpłytkowych i komórkach Cajala-Retziusa w rozwijającej się korze u szczurów w embrionalnym dniu E13 i E15 (Fukumitsu i wsp. 1998). Poziom BDNF w CP jest dwukrotnie wyższy niż w VZ (Behar i wsp. 1997). W korze 15-dniowego embrionu szczura receptor TrkB był obecny w komórkach NEC w dzielących się prekursorach i w komórkach Cajala-Retziusa. Dwa dni później receptor TrkB był obecny w migrujących neuroblastach, w IZ i CP, ale nie występował w komórkach tworzących VZ (Behar i wsp., 1997). W swoich badaniach nad chemotaktycznymi właściwościami neurotrofin Behar i wsp. (1997) wykorzystali komórki korowe wyizolowane ze szczurzych embrionów w wieku E15-E21. Dodanie do hodowli inhibitora kinazy tyrozynowej powodowało zablokowanie przemieszczania się komórek korowych pod wpływem BDNF, co wskazuje na to, że aktywacja receptora TrkB wpływa na proces migracji komórek. Z kolei podanie BDNF do komór mózgu 13.5-dniowego embrionu myszy zmieniało wzór ekspresji genów i lokalizację neuronów, które miały utworzyć warstwę IV kory tak, że stawały się podobne do neuronów warstw głębszych - V i VI (Fukumitsu i wsp., 2006). Odmienne skutki miało podanie przeciwciała anty-BDNF: pod jego wpływem neurony warstwy IV wykazywały cechy neuronów zewnętrznych warstw kory, II/III (Fukumitsu i wsp., 2006). Aktywacja różnych ścieżek sygnałowych na skutek fosforylacji receptora TrkB w progenitorach RGCs wywołuje różne skutki. Jak wykazali Ortega i Alcantra (2010) aktywacja ścieżki PI3K jest niezbędna dla zachowania właściwego rusztowania utworzonego z RGCs, natomiast aktywacja ścieżki aktywującej MAPK może prowadzić do przedwczesnego różnicowania RGCs w neurony, na skutek aktywacji BMP7. Ponadto, BDNF może aktywować Anoctaminę1 (Ano1), tworząc kanał chlorkowy zależny od jonów wapnia, który występuje w RGCs (Hong i wsp., 2019). Aktywność tego kanału powoduje wzrost wypustek podstawnych neuronów powstających z RGCs. Brak tych wypustek w neuronach myszy pozbawionych aktywności Ano1 prowadzi do nieprawidłowego ukształtowania warstw kory mózgu oraz małogłowia (Hong i wsp., 2019). Zahamowanie aktywności receptorów TrkB lub TrkC *in vivo* w wieku E13-E14 myszy powoduje zmniejszenie liczby dzielących się progenitorów

korowych, opóźnienie ich różnicowania w neurony oraz nieprawidłową migrację, natomiast nadekspresja BDNF wzmagą proliferację tych progenitorów i neurogenezę (Bartkowska i wsp., 2007).

Badanie na szczurzych progenitorach korowych wyizolowanych z embrionów w wieku E13-E14 wykazały, że dodanie do hodowli NT-3 przyspiesza ich różnicowanie, a zablokowanie endogennej NT-3 działa odwrotnie (Ghosh i Greenberg, 1995). Dodanie NT-4 do korowych hodowli organotypowych uzyskanych z embrionów myszy w wieku E13.5 - E14.5 powodowało powstanie nadmiarowej liczby neuronów gromadzących się w MZ (Brunstorm i wsp., 1997). Tworzyły one wyróżniającą się strukturę, która zaburzała budowę niższych warstw kory. Również po iniekcji NT-4 *in vivo*, do komórek mózgu szczurzych embrionów w wieku E16 i E18 analiza mózgów szczurów w wieku E19 wykazała podobne nagromadzenie komórek w MZ (Brunstrom i wsp., 1997). Badania McAllister i wsp. (1997) na organotypowych hodowlach rozwijającej się kory wzrokowej fretki wykazały, że BDNF i NT-3 mają przeciwstawne działanie na wzrost dendrytów neuronów piramidowych. W warstwie IV, zarówno endogenna jak i dodana NT-3 hamowała rozwój drzewek dendrytycznych, natomiast BDNF stymulowała ich rozwój. Odwrotne zjawisko występowało w warstwie VI, gdzie endogenne lub egzogenne BDNF hamował rozwój dendrytów, a NT-3 pobudzał go. Podanie NT-4/5 lub BDNF do pierwotnej kory wzrokowej kota w wieku P28-P42 hamuje tworzenie się kolumn dominacji ocznej w bezpośrednim sąsiedztwie miejsca podania, ale nie w innych rejonach kory wzrokowej (Cabelli i wsp., 1995). W korowych hodowlach organotypowych dodanie każdej z czterech neurotrofin powoduje wzmożony wzrost dendrytów i rozbudowę drzewek dendrytycznych neuronów piramidowych kory (McAllister i wsp., 1995). Ponadto, nadekspresja BDNF w komórkach piramidowych powoduje zmniejszenie liczby kolców dendrytycznych, natomiast zwiększona liczba nowych dendrytów w tych neuronach (Horch i wsp., 1999).

Neurotrofiny BDNF, NT-3 i NT-4 występują w dużych ilościach w rozwijającym się mózdzku szczura (Friedman i wsp., 1998). U myszy w wieku P8 neurotrofina BDNF jest obecna w ciałach komórkowych i dendrytach neuronów Purkiniego, a także w wiązki aksonów w istocie białej. Badania wykazały, że receptor TrkC jest niezbędny do rozwoju dendrytów w komórkach Purkiniego mózdzku myszy. W eksperymentach *in vivo* zmniejszenie liczby receptorów TrkC spowodowało redukcję złożoności drzewka dendrytycznego, natomiast ich całkowite usunięcie nie miało wpływu na rozwój dendrytów (Minichiello i Klein, 1996; Joo i wsp., 2014). Neveu i Arenas (1996)

zaobserwowali, że działanie NT-3 powoduje zwiększenie długości i stopnia rozgałęzienia drzewka dendrytycznego w komórkach Purkiniego u szczurów z niedoczynnością tarczycy.

U myszy pozbawionych receptora TrkB w prekursorach komórek mózdzku interneurony GABA-ergiczne mają zmniejszoną liczbę synaps (Rico i wsp., 2002). Niski poziom ekspresji BDNF występuje również w komórkach ziarnistych IGL. W mózdzku, BDNF działając na receptor TrkB reguluje przeżywalność i migrację GCPs (Schwartz i wsp., 1997; Borghesani i wsp., 2002). Wysoki poziom ekspresji TrkB występuje zarówno w całym EGL i IGL (Carter i wsp., 2002). BDNF działając przez receptor TrkB sprzyja przeżywalności GCPs i wspiera ich migrację do IGL. (Borghesani i wsp., 2002; Minichiello and Klein, 1996; Zhou i wsp., 2007). NT-3 podobnie jak BDNF zwiększa przeżywalność GCPs, (Bates i wsp., 1999; Joo i wsp., 2014). Ponadto, myszy pozbawione ekspresji BDNF charakteryzują się o 45% wyższym poziomem apoptozy komórek ziarnistych w wieku P8, kiedy to nasilenie apoptozy rozwojowej tych komórek jest największe (Cheng i wsp., 2010). Mózdzki myszy BDNF $-/-$ są mniejsze od mózdzków myszy typu dzikiego, a liczba umierających komórek ziarnistych w przeliczeniu na powierzchnię jest ponad dwukrotnie wyższa niż u myszy dzikich na tym samym etapie rozwoju. Grubość EGL w P8 jest porównywalna u myszy dzikich i pozbawionych ekspresji BDNF, natomiast już w wieku P14 EGL u myszy BDNF $-/-$ jest wyraźnie większa niż u myszy dzikich. W wieku P21 warstwa EGL u myszy dzikich zanika, natomiast u myszy transgenicznych BDNF $-/-$ jest nadal widoczna (Schwartz i wsp., 1997).

U myszy brak BDNF w czasie rozwoju powoduje również nieprawidłowe fałdowanie kory mózdzku (Schwartz i wsp., 1997). Myszy transgeniczne pozbawione NT-3 umierają zaraz po urodzeniu. Aby sprawdzić, jaki wpływ na rozwój mózdzku ma deficyt NT-3, Bates i wsp. (1999) wykorzystali warunkowe mutanty pozbawione ekspresji tej neurotrofiny wyłącznie w ośrodkowym układzie nerwowym. W wieku P8 myszy te, podobnie jak myszy pozbawione BDNF, miały nieprawidłowo pofałdowaną korę mózdzku, co nie było spowodowane opóźnieniem, lecz nieprawidłowym wzorcem procesu fałdowania kory mózdzku. W wieku P8 myszy pozbawione ekspresji NT-3 mają o 75% wyższą częstotliwość apoptozy w warstwie ziarnistej niż myszy dzikie. Badania Doughty'ego i wsp. (1998), w których implanty Elvax stale uwalniające NT-3 umieszczano w tylnej części mózdzku szczura w wieku P6 wykazały, że w wieku P10 płaciki VII i VIII mózdzku miały znacznie mniejszą grubość w grupie szczurów z

implantami uwalniającymi NT-3 w porównaniu ze szczurami z grupy kontrolnej. Ponadto liczba postmitotycznych komórek ziarnistych (oznaczonych jako niewykazujące ekspresji PCNA), które nie rozpoczęły jeszcze migracji była mniejsza u szczurów otrzymujących NT-3, co wskazuje na rolę tej neurotrofiny w przyspieszaniu migracji tych komórek z EGL (Doughty i wsp., 1998).

Nie tylko dojrzałe neurotrofiny i ich receptory pełnią istotną funkcję w rozwoju mózdzku ssaków. Receptor p75NTR jest obecny w EGL, ale nie ma go w IGL (Carter i wsp., 2003). W trakcie rozwoju mózdzku u myszy widoczny jest wysoki poziom ekspresji p75NTR w EGL. U 3-tygodniowej myszy, gdy EGL jest już prawie niewidoczna, obecność receptorów p75NTR została stwierdzona w komórkach Purkinjego (Zanin i wsp., 2016). Eksperymenty Zanina i wsp. (2016) wykazały, że p75NTR kontroluje cały proces powstawania progenitorów mózdkowych, włącznie z zahamowaniem podziałów progenitorów komórek ziarnistych i zatrzymaniem generacji nowych neuronów. Myszy z mutacją genu kodującego białko p75NTR wytwarzają zbyt wiele nowych komórek, co powoduje przerost mózdzku i patologie związane z kontrolą ruchów. W powyższym badaniu wykazano również, że proneurotrofina 3, która wiąże się z p75NTR jest w stanie zatrzymać podziały komórek ziarnistych mózdzku, nawet gdy obecne są inne białka sprzyjające podziałom.

Neurotrofiny i ich receptory są również niezbędne do wytworzenia prawidłowych połączeń między komórkami mózdzku a komórkami innych struktur mózgu. Zahamowanie ekspresji receptora TrkB w rozwijającym się mózdzku powoduje, że komórki Purkinjego tworzą synapsy z wieloma włóknami pnącymi także po etapie rozwoju, w którym zachodzi eliminacja nadprogramowych synaps (Bosman i wsp., 2006; Johnson i wsp., 2007). BDNF z komórek Purkinjego działając wstecznie przez receptory TrkB ułatwia rozwojową eliminację połączeń synaptycznych z włóknami pnącymi (Choo i wsp., 2017).

2. Cele pracy

W taksonomii ssaki zalicza się do jednej gromady zwierząt, która dzieli się na trzy podgromady: stekowce, łożyskowce i torbacze. Najstarsze z nich są stekowce, znane od 180 milionów lat. Przyjmuje się, że rozdzielenie linii ewolucyjnych łożyskowców i torbaczy nastąpiło około 160 milionów lat temu (Bi i wsp., 2018). Najważniejsze różnice między nimi wynikają z odmiennych strategii reprodukcji i systemu połączeń kory nowej obu półkul mózgu. Przedstawiciele torbaczy rodzą się na bardzo wczesnym etapie rozwoju, który przypomina pewne fazy rozwoju embrionalnego łożyskowców (Ashwell, 2010). Po urodzeniu, młode są zależne od matki dłużej, a ich rozwój przebiega wolniej niż u ssaków łożyskowych. Wolniejszy przebieg rozwoju mózgu sprawia, że można uchwycić i przeanalizować wybrane procesy dokładniej, z tego powodu opos *Monodelphis domestica* stał się wygodnym modelem do badań rozwojowym.

Pośród wielu czynników wpływających na neurogenezę u ssaków bardzo ważną rolę pełnią neurotrofiny oraz ich receptory (Huang i Reichardt, 2001; Bernd 2008). Wiele procesów zależnych od tej ścieżki sygnalizacji nie zostało jeszcze opisanych i wyjaśnionych, zwłaszcza u torbaczy.

Celem niniejszej pracy było:

- zbadanie wpływu aktywności receptorów TrkB i TrkC na proliferację, przeżywalność oraz migrację różnych typów komórek progenitorowych w trakcie powstawania kory nowej u oposa laboratoryjnego *Monodelphis domestica in vivo*;
- zbadanie komórkowej i molekularnej organizacji procesów rozwojowych w mózdzku oposa, z uwzględnieniem czasu powstawania różnych typów komórek;
- stworzenie pierwotnych hodowli neuronalnych komórek Purkiniego i komórek ziarnistych mózdzku oposa, przy wykorzystaniu wiedzy na temat czasu tworzenia się tych komórek, uzyskanej we wcześniejszych doświadczeniach;
- zbadanie wpływu aktywacji receptora neurotrofin TrkC na rozwój drzewka dendrytycznego w komórkach Purkiniego i komórkach ziarnistych *in vitro* z zastosowaniem konstruktów genetycznych (shRNA).

3. Materiały i metody

3.1. Zwierzęta doświadczalne

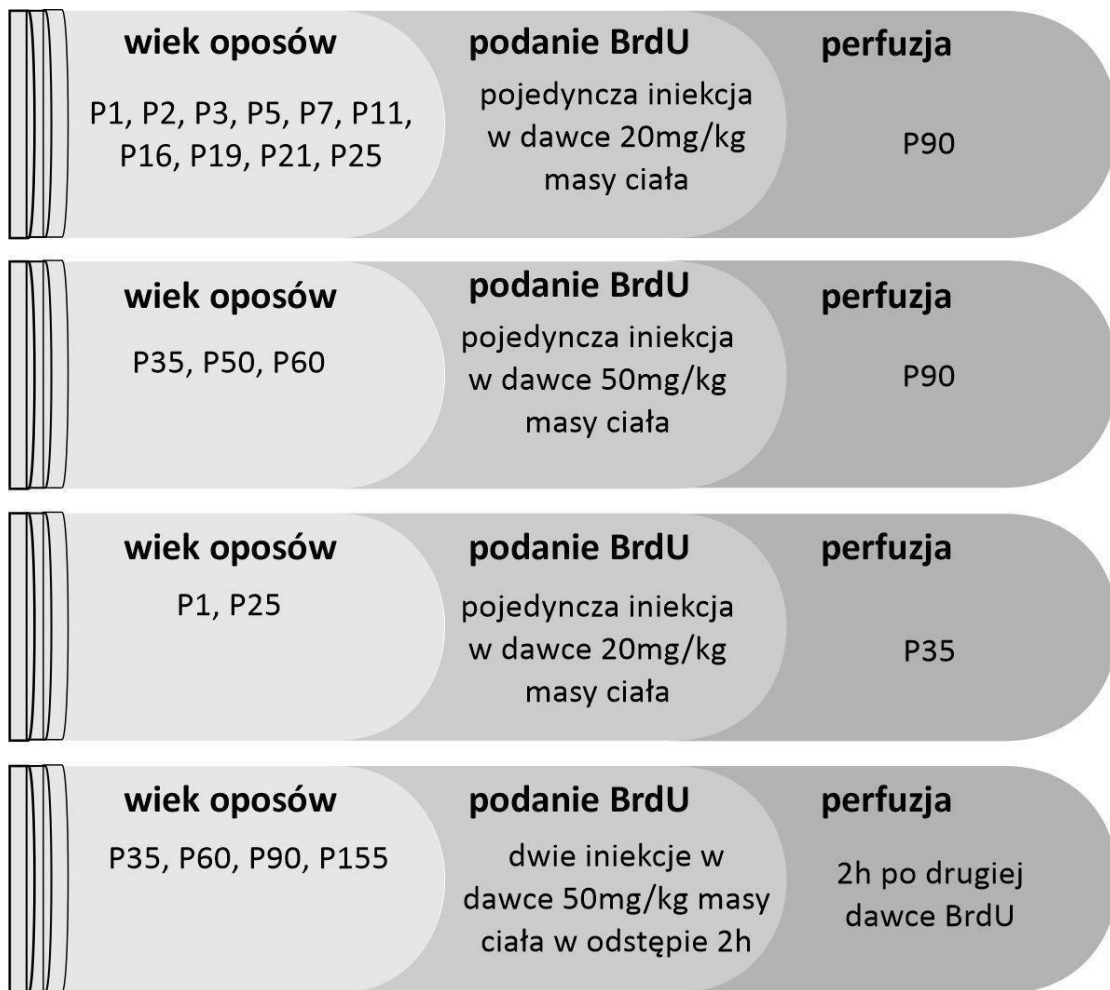
W doświadczeniach wykorzystano opozy *Monodelphis domestica* pochodzące z hodowli Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN. W pokoju bytowym zwierzęta miały zapewnione optymalne warunki: temperaturę 25-26°C i wilgotność powietrza 50-70% oraz dostosowany do gatunku cykl dobowy oświetlenia dzień/noc - 14/10 godzin. Opozy miały stały dostęp do odpowiednio zbilansowanej karmy i wody z dodatkiem HCl. Opozy do 2 miesiąca życia przebywały z matką, następnie oddzielano od niej miot, który był hodowany we wspólnej klatce kolejny miesiąc. Dorosłe opozy przebywały w klatkach pojedynczo. Eksperymenty zaplanowano i przeprowadzono w taki sposób, żeby zredukować liczbę osobników oraz ewentualny stres zwierząt, związany z przeprowadzanymi procedurami. Wszystkie wykonywane badania były zaakceptowane przez Lokalną Komisję Etyczną nr 1 w Warszawie zgodnie z wydanymi uchwałami numer 549/2014; 8/2015 oraz 486/2017.

3.2. Podawanie BrdU

Aby wyznakować dzielące się komórki użyto bromodeoksyurydyny (BrdU, Sigma-Aldrich). Opozy w wieku pomiędzy 1 a 25 dniem życia otrzymały pojedynczą iniekcję BrdU w dawce 20 mg na kilogram masy ciała, a opozy w wieku 35, 50 lub 60 dni w dawce 50 mg/kg (Ryc. 8). W wieku 3 miesięcy zwierzęta były uśmiercone, poddane perfuzji solą fizjologiczną a następnie 4% roztworem paraformaldehydu (PFA) w 0.1 M buforze fosforanowym (PB, ang. phosphate buffer, pH 7.4), w celu utrwalenia tkanki. Część oposów (3 z 6), które otrzymały BrdU w wieku P1 i P25 została poddana perfuzji wcześniej - w 35 dniu życia (Ryc. 8).

Aby uwidocznić proliferację w EGL opozy w wieku P35, P60, P90, P155 otrzymały iniekcję BrdU (50 mg/kg) dwukrotnie, w odstępie 2 h, a następnie zostały uśmiercone i poddane perfuzji 2 h po drugim podaniu. W każdej grupie wiekowej n=3-6 oposów. Mózgi oposów po perfuzji były umieszczane w 4% roztworze PFA w 0.1 M PB (pH 7.4) na 14 dni a następnie umieszczone w roztworach sacharozy (Sigma-Aldrich) o rosnącym stężeniu (10%, 20%, 30% w 0.1 M PB) w 4°C przez kolejne 3 dni. Następnie mózgi osuszono i zamrożono w heptanie w 70°C i pokrojono na kriostacie (Leica) na

skrawki o grubości 40 μm w 10 seriach, z czego 8 serii stanowiły skrawki wolnoptywające a 2 serie skrawki na szkiełkach.

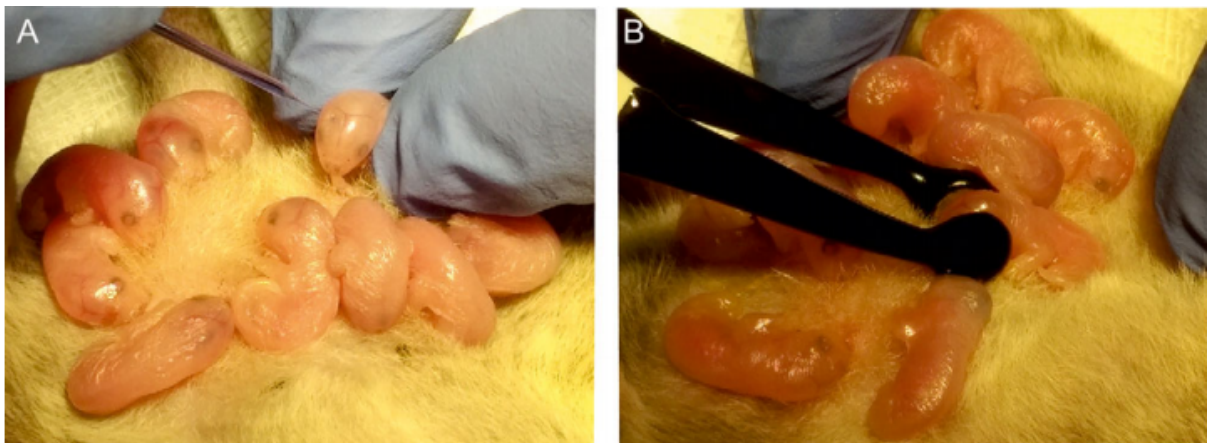


Ryc. 8. Schemat przedstawiający procedurę podawania BrdU dla każdego z opisanych powyżej przypadków.

3.3. Elektroporacja *in vivo*

Samice z siedmiodniowymi oseskami przyczepionymi do sutków usypiano poprzez wziewne podanie 5% izofluranu. Oseskom pozostającym pod narkozą, używając szklanej kapilary połączonej z plastikową tubą i gumowym wężym z ustnikiem (Ryc. 9 A) podano jednostronnie do komory bocznej mózgu roztwór z shRNA. Zawierał on DNA kodujący plazmid z odpowiednim shRNA (4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 0.05% Trypan Blue (Sigma)-użyty w celu wizualizacji iniekcji, rozpuszczone w buforze PBS (sól fizjologiczna buforowana fosforanem, ang. phosphate-buffered saline). Po podaniu plazmidu przeprowadzono elektroporację przy pomocy elektroporatora NEPAGENE (Japonia) przy

parametrach: 7 impulsów po 50 ms przy napięciu 50 V z 850 ms przerwami pomiędzy impulsami. Połowa osesków z 7 różnych miotów (n=24) otrzymała iniekcję plazmidu shRNA obniżającego ekspresję receptora TrkB (shTrkB): pGPU6/GFP/Neo-shRNATrkB(5'CACCGCTGCCTTCAGCTGGATAATCTTCAAGAGAGATTATCCAGCTGAAGGCAGCTTTTTTG-3'). Połowa osesków z 8 innych miotów (n=27) otrzymała iniekcję plazmidu shRNA obniżającego ekspresję receptora TrkC (shTrkC): pGPU6/GFP/Neo-shRNATrkC (5'-CACCGGAGCTCTATACTGGACTTCATTCAAGAGATGAAGTCCAGTATAGAGCTCCTTTTTTG-3'). Druga połowa osesków ze wszystkich miotów otrzymała plazmid stanowiący kontrolę negatywną pGPU6/GFP/Neo-shRNA (5'-CACCGTTCTCCGAACGTGTCACGTCAAGAGATTACGTGACACGTTCCGGAGAATTTTTTG3'). Wszystkie plazmidy zawierały sekwencję kodującą zielone białko fluorescencyjne (ang. green fluorescent protein, GFP), które pozwoliło uwidocznić komórki, w których wprowadzony konstrukt uległ ekspresji. Kontrolna sekwencja shRNA została odpowiednio dopasowana, tak aby nie pokrywała się z żadną znaną sekwencją kodującą geny myszy i człowieka (EZBiolab). Część miotów oposów została uśmiercona po 2 dniach od elektroporacji, w P9, a część po 5 dniach, w P12.



Ryc. 9. Iniekcja plazmidów shRNA TrkB do komórek progenitorowych kory nowej 7-dniowego oposa. (A) zdjęcie oposa z 9-cioma oseskami podczas iniekcji shRNA TrkB do strefy przykomorowej komory bocznej jednego z nich. (B) Elektroporacja in vivo z elektrodami umieszczonymi na głowie wybranego oposa.

3.4. Pierwotne hodowle neuronalne

W celu założenia pierwotnej hodowli komórek Purkiniego mózgi oposów izolowano w wieku P3, natomiast aby założyć hodowlę pierwotną komórek ziarnistych mózgi oposów izolowano w 22 dniu po urodzeniu. Wyizolowane mózdzki homogenizowano mechanicznie pipetą automatyczną o objętości 1 ml, a następnie określano liczbę uzyskanych żywych komórek przy pomocy automatycznego licznika komórek EVE™ (NanoEn Tek Inc.). Komórki posiewano na 2-dołkowe komory hodowlane (BIOLOGIX group), pokryte poli-L-lizyną (40 µg/ml, Sigma-Aldrich) i lamininą (4 µg/ml, Sigma-Aldrich) w ilości 3×10^5 komórek w 1.5 ml pożywki na jeden dołek. Pożywka składała się z 1% B27 (Gibco), 2 mM Glutamax (Gibco), 1% penicilliny/streptomycyny (Gibco), 0.45% glukozy (Sigma-Aldrich), 3 mM KCl, 1% HEPES (Sigma-Aldrich), 1% FBS (Gibco) i 400 ng FGF2 (Sigma-Aldrich) rozpuszczonych w medium Neurobasal A (Gibco). Po 24 godzinach komórki transfekowano plazmidem z shRNA dla receptora TrkC lub shRNA kontrolnym kodujących jednocześnie GFP jako białko reporterowe przy pomocy odczynnika Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific). Sekwencja użytego plazmidu shRNA TrkC była następująca:
5'-CACCGCAGTAAGACAGAGATCAATTTCAAGAGAATTGATCTCTGTCTTACTGCTTTTTTG-3'. Sekwencja kontrolnego shRNA (5'-CACCGTTCTCCGAACGTGTCACGTCAAGAGATTACGTGACACGTTCCGAG AATTTTTTG3') została dobrana tak by nie była zbieżna z żadnymi genami mysimi i ludzkimi (EZBiolab). Co drugi dzień wymieniano połowę pożywki na świeżą, a płytki hodowlane przechowywano w inkubatorze w temperaturze 33°C i w powietrzu zawierającym 5% CO₂.

3.5. Przygotowanie tkanki do analizy

3.5.1. Przygotowanie tkanki do określenia poziomu białek metodą Western Blot

W celu określenia poziomu wyciszenia ekspresji receptora TrkC w komórkach kory nowej oposów przeprowadzono analizę Western blot. Tkanekę do badania pozyskano od oposów poddanych transfekcji w 7 dniu po urodzeniu, jak opisano powyżej. Wykorzystano 2 mioty oposów, z czego 17 osesków otrzymało iniekcję plazmidu shRNA TrkC, a 15 - iniekcję plazmidu shRNA kontrolnego. Po każdej iniekcji przeprowadzano

elektroporację. Dwa dni później oseski zostały uśmiercone, a ich mózgi wyizolowane na lodzie. Ponieważ użyte plazmidy zawierały również sekwencję kodującą GFP, wszystkie stransfekowane komórki wykazywały obecność tego fluorescencyjnego białka. W celu uwidocznienia stransfekowanych komórek przeniesiono mózg na szalkę i obserwowano w odwróconym mikroskopie fluorescencyjnym (Nikon ECLIPSE Ts2), a następnie przy pomocy pęsety i nożyczek mikrochirurgicznych wyizolowano do dalszej analizy jedynie stransfekowaną część kory.

Aby określić ilościowe zmiany w poziomie białka receptora TrkC na różnym etapie rozwoju mózdzku oposa wykorzystano metodę Western Blot badając tkankę wyizolowaną w wieku P4, P24 i P35. Zwierzęta zostały uśmiercone poprzez szybkie schłodzenie lub przez dootrzewnowy zastrzyk z pentobarbitalu. Mózgi zostały wyizolowane na lodzie, a mózdzki precyzyjnie oddzielone przy pomocy narzędzi mikrochirurgicznych.

Zarówno próbki zawierające stransfekowane części kory jak i mózdzki zostały mechanicznie zhomogenizowane w buforze RIPA (50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl) z inhibitorami proteaz (Complete mini EDTA-free, Roche). Następnie dodano do nich detergent 1% NP40 (Igepal CA 630, Fluka) i 0.1% sól sodową siarczanu dodecyłu (ang. sodium dodecyl sulfate, SDS, Sigma) i inkubowano na lodzie przez 15 minut. Po tym czasie homogenaty umieszczono w wirówce i wirowano przez 45 minut z szybkością 14000 rpm w 4°C. Lizaty zebrano do probówek, podzielono na mniejsze porcje, by uniknąć wielokrotnego rozmrażania i umieszczono w -70°C.

3.5.2. Przygotowanie tkanki do barwienia histochemicznego metodą Nissla

Mózgi oposów w wieku P2, P11, P19, P28, P50 (n=3-5 w każdej grupie wiekowej) zostały utrwalone w 4% PFA przez 14 dni, następnie zanurzone w roztworach sacharozy o rosnącym stężeniu (10%, 20%, 30%) w 0.1 M PB, przez kolejne 3 dni. Osuszone mózgi zamrożono, zatopiono w medium OCT (Leica) i krojono na kriostacie (Leica) na skrawki grubości 20 µm (P2, P11, P19, P28) lub 40 µm (P50) w płaszczyźnie czołowej.

3.5.3. Przygotowanie tkanki i komórek do barwienia immunohistochemicznego z użyciem DAB oraz immunofluorescencyjnego

Mózgi oposów, które otrzymały BrdU w wieku P3, P5, P11, P16, P35 do barwień immunofluorescencyjnych zostały wyizolowane na lodzie i umieszczone w 4% PFA w

0.1 M PB, w 4°C na 2-3 doby. Przez kolejne 3 doby mózgi były zatapiane w roztworach sacharozy (Sigma-Aldrich) o rosnącym stężeniu (10%, 20%, 30% w 0.1 M PB) i inkubowane w 4°C. Następnie mózgi osuszano i mrożono w heptanie o temperaturze -70°C. Zamrożone mózgi zatapiano w medium OCT (Leica) i krojono na kriostacie (Leica) w -20°C na skrawki o grubości 20 µm, umieszczając je na szkiełkach podstawowych w 10 seriach (P3, P5, P11, P16) lub 40 µm (P35, P60, P90, P155) w 10 seriach, w tym 2 serie umieszczano na szkiełkach podstawowych, a 8 serii stanowiły skrawki wolnopływające. Szkiełka z umieszczonymi na nich skrawkami przechowywano w lodówce. Skrawki wolnopływające umieszczono w dołkach płytki 24-dołkowej w medium zapobiegającym zamrożeniu i przechowywano w -20°C do czasu barwienia.

Hodowle pierwotne komórek mózgu oposa były przygotowywane do barwień immunofluorescencyjnych na 8-my lub 10-ty dzień *in vitro* (ang. day *in vitro*, DIV). Usuwno z hodowli medium, a następnie płukano trzykrotnie buforem PBS w temperaturze pokojowej. W celu utrwalenia na szkiełka nałożono 4% roztwór PFA w 0.1 M PB (pH 7.4) o temperaturze 4°C na 10 minut, następnie płukano w PBS i inkubowano przez 5 minut z 0.1% NP40 (Sigma-Aldrich).

3.6. Analiza ilościowa zawartości białka metodą Western Blot

W celu określenia ilości białka w badanych próbkach wykorzystano metodę Bradforda, w której błękit kumasyny - pierwotnie brunatny, po związaniu białka przyjmuje niebieską barwę, której intensywność jest wprost proporcjonalna do ilości białka. Próbki białka wzorcowego, o znanym stężeniu, oraz badane próbki rozcieńczone 1:10 w buforze RIPA nakładano na 96-dołkową płytkę w 4 powtórzeniach i inkubowano z błękitem kumasyny przez 10 minut. Następnie mierzono absorbancję przy długości fali 595 nm i obliczano ilość białka w próbkach na podstawie krzywej wzorcowej wyznaczonej dla białka o znanym stężeniu.

Próbki białka (30 µg każda) denaturowano przy pomocy 20 mM DTT w 95°C przez 5 minut. Następnie nakładano je na żel poliakrylamidowy (górną część zagęszczająca 4%, część rozdzielająca 7.5%) i rozdzielano elektroforetycznie przez 1.5 godziny przy napięciu 70-150 V. Następnie białka w żelu przenoszone były na membranę nitrocelulozową (BioRad) przez 2 godziny przy natężeniu 390 mA w 4°C. W celu kontroli jakości rozdzielania elektroforetycznego i transferu, białka na membranie zostały odwracalnie wybarwione przy pomocy odczynnika Ponceau Red. Po przepłukaniu

membran w TBS (sól fizjologiczna buforowana Tris ang. Tris buffered saline) z 0.2% Tween 20 (Sigma-Aldrich, TBS-Tween) blokowano je w 5% roztworze odtłuszczonego mleka w proszku w TBS-Tween przez 1.5 godziny, a następnie nakładano przeciwciała pierwszorzędowe królicze rozpoznające TrkC (α -TrkC, Cell Signaling 1:1200) lub królicze wykrywające receptor p75^{NTR} (α -p75^{NTR}, Abcam, 1:1000) na całą noc w 4 °C. Następnego dnia membrany były inkubowane z przeciwciałem drugorzędowym wyprodukowanym w kozie, rozpoznającym epitopy królicze, sprzężonym z peroksydazą chrzanową (Bio-Rad, 1:2000). Po trzykrotnym przepłukaniu w TBS-Tween i TBS po 10 minut zastosowano odczynnik chemiluminescencyjny ECL (Advansta) i przeprowadzono wizualizację w urządzeniu G Box z kamerą (Syngene). Otrzymane zdjęcia zapisano w formie cyfrowej do dalszej analizy. Jako białko referencyjne wybrano GAPDH i po usunięciu poprzednio użytych przeciwciał przy pomocy Re-Blot Plus Stripping Solution (Sigma-Aldrich) użyto przeciwciała pierwszorzędowego mysiego, rozpoznającego białko GAPDH (Millipore, 1:10000) oraz drugorzędowego wyprodukowanego w kozie rozpoznającego epitopy mysie, sprzężonego z peroksydazą chrzanową (Chemicon, 1:7000) i analogicznie jak w przypadku białek badanych przeprowadzono reakcję z odczynnikami chemiluminescencyjny ECL (Advansta), wizualizację i zapisano wyniki.

3.7. Barwienie histochemiczne metodą Nissla

Szkiełka ze skrawkami zostały odtłuszczone w mieszaninie chloroformu i etanolu (1:1) przez 20 minut. Następnie skrawki były stopniowo uwodniane w szeregu roztworów alkoholu etylowego o malejącym stężeniu (100%, 96%, 70%, 50%) po 2 minuty i na końcu umieszczone w wodzie destylowanej na 2 minuty. Potem skrawki zostały umieszczone w 1% roztworze fioletu krezyłu w buforze octanowym (0.34 M kwas octowy, 0.06 M octan sodu; pH 3.6) na około 5 minut, aż do uzyskania satysfakcjonującego natężenia barwienia. Następnie szkiełka ze skrawkami płukano kilka minut w wodzie destylowanej, inkubowano w 50% etanolu przez 2 minuty i umieszczano w roztworze 70% etanolu z 10% kwasem octowym na około 30 sekund. Skrawki zostały odwodnione kolejno w 96% i 100% etanolu po 2 minuty. Zabarwione skrawki na szkiełkach były następnie wysycane ksylenem poprzez umieszczanie ich w mieszaninie ksylenu z etanolem o rosnącym stężeniu (1/3 ksylenu + 2/3 etanolu, 2/3 ksylenu + 1/3 etanolu, 100% ksylen). Tak przygotowane preparaty zatopiono w medium DePeX (Serva) i zamknięto szkiełkiem nakrywkowym.

3.8. Barwienia immunohistochemiczne skrawków mózgow na obecność BrdU z użyciem odczynnika DAB

Barwienie immunohistochemiczne na obecność BrdU zostało przeprowadzone na skrawkach wolnopływających. W celu zablokowania endogennych peroksydaz skrawki inkubowano w 3% H₂O₂, 10% metanolu w soli fizjologicznej buforowanej Trisem (ang. Tris-buffered saline, TBS) przez 30 minut w temperaturze 22°C. Tkanka została przepłukana w TBS, a następnie skrawki były umieszczane w dwukrotnie stężonym buforze SSC na 5 minut. W celu zniszczenia wiązań krzyżowych białek, odkrycia epitopów, skrawki zalano 2N roztworem HCl i inkubowano przez 30 minut w temperaturze 37°C, a następnie w 0.1 M H₃BO₃ przez 10 minut w temperaturze 22°C. Po przepłukaniu po 10 minut kolejno w TBS, TBS-A (TBS + 0.1% Triton X-100) i TBS-B (TBS-A + 0.05% BSA), skrawki umieszczono w roztworze blokującym (10% NGS w TBS-B) na 60 minut w temperaturze pokojowej. Potem skrawki były inkubowane przez noc, w 4°C, ze szczurzym przeciwciałem pierwszorzędowym rozpoznającym BrdU (Santa Cruz, 1:500) w TBS-B. Następnego dnia skrawki przepłukano w TBS-A i TBS-B po 15 minut i inkubowano z kozim biotynylowanym przeciwciałem drugorzędowym rozpoznającym epitopy szczurze (Jackson ImmunoResearch, 1:200), a po trzykrotnym płukaniu w TBS-B z roztworem ExtrAvidin (Sigma, 1:400) w TBS po 60 minut każdy. Po kilkukrotnym wypłukaniu w TBS przeprowadzono reakcję barwną z roztworem 3,3'-diaminobenzydyny z solami niklu (DAB Substrate Kit, Vector), ponownie przepłukano 3 razy w TBS, umieszczono na szkiełkach podstawowych a po wyschnięciu przeprowadzono przez mieszaniny ksyleny z etanolem o rosnącym stężeniu (1/3 ksyleny + 2/3 etanolu, 2/3 ksyleny + 1/3 etanolu, 100% ksylen), zatopiono w medium DePeX (Serva) i zamknięto szkiełkiem nakrywkowym.

3.9. Barwienia immunofluorescencyjne tkanki mózgowej i komórek z pierwotnych hodowli neuronalnych

Barwienia immunofluorescencyjne mózgow oposów w wieku P1-P25 wykonano na skrawkach krojonych bezpośrednio na szkiełka, natomiast w przypadku mózgow oposów w wieku P35 korzystano ze skrawków wolnopływających. Przy barwieniu na obecność białka Tbr1 i Tbr2 wykonano dodatkowy krok - odkrywanie epitopów poprzez inkubację skrawków w 0.1 M buforze cytrynianowym (pH 6.0) w temperaturze 65°C przez całą noc, następnie przepłukano skrawki trzykrotnie w PBS i traktowano dalej jak

w przypadku pozostałych barwień. Skrawki były inkubowane w roztworze blokującym z 10% NGS lub 10% NChS oraz 1% BSA w 0.1% PBS-T przez 60 minut w temperaturze 22°C. Następnie nakładano wybrane przeciwciała pierwszorzędowe: królicze α -Kalbindyna (Chemicon, 1:1000), królicze α -NeuN (Cell Signaling, 1:50), mysie α -Olig2 (Millipore, 1:100), królicze α -Tbr1 (Abcam, 1:200), królicze α -GFAP (Dako, 1:500), królicze α -TrkC (Cell Signaling, 1:500), królicze α -NT-3 (Alomone Labs, 1:300), królicze α -GFP (Millipore, 1:750), mysie α -GFP (Millipore, 1:750), mysie α -HuD (Santa Cruz Biotechnology, 1:100), mysie α -Tle4 (Santa Cruz Biotechnology, 1:100), królicze α -Tbr2 (Abcam, 1:500), królicze α -PCNA (Abcam, 1:200), królicze α -pHH3 (Cell Signaling Technology, 1:500), królicze α -kaspaza 3 (Cell Signaling Technology, 1:500) na całą noc w 4°C. Następnego dnia skrawki płukano trzykrotnie w PBS i nakładano odpowiednie przeciwciała drugorzędowe: kozie α -królik 568 (Abcam, 1:600), kurczące α -koza 488 (Alexa Fluor, 1:600) lub kozie α -mysz 488 (Abcam, 1:600) na 60 minut w temperaturze 22°C. Aby uwidocznić jądra komórkowe, po przepłukaniu w PBS skrawki na szkiełkach były inkubowane z DAPI (Sigma-Aldrich, 1:5000), następnie ponownie przepłukane, zatopione przy pomocy Mounting Medium (Invitrogen) i przykryte szkiełkiem nakrywkowym.

Podwójne barwienia immunofluorescencyjne na obecność BrdU i wybranego markera były robione analogicznie do immunohistochemicznych BrdU, ale łącznie z przeciwciałem rozpoznającym BrdU używano jednego z następujących przeciwciał pierwszorzędowych: królicze α -Kalbindyna (Chemicon, 1:1000), królicze α -NeuN (Cell Signaling, 1:50), królicze α -GFAP (DAKO, 1:500), mysie α -Olig2 (Millipore, 1:100) wraz z przeciwciałem szczurzym α -BrdU (Abcam, 1:1000) rozpuszczonych w 50% roztworze buforu blokującego na całą noc w 4 °C. Do powyższych przeciwciał dobierano odpowiednie przeciwciała drugorzędowe: kozie α -królik 568 (Abcam, 1:600), kozie α -mysz 568 (Alexa Fluor, 1:600) oraz kozie α -szczur biotynylowane (Jackson Immunoresearch, 1:200) i inkubowano 60 minut w temperaturze 22 °C, a następnie płukano i inkubowano z roztworem Streptavidin 488 (Alexa Fluor, 1:600) w TBS. Po przepłukaniu w TBS nakładano DAPI (Sigma-Aldrich, 1:5000), ponownie przepłukano i zaklejało szkiełka 65% roztworem glicerolu w PBS.

Barwienia komórek z hodowli *in vitro* przeprowadzono na utrwalonych komórkach na płytkach hodowlanych. Po blokowaniu w roztworze 10% NGS i 1% BSA w PBS przez 60 minut, nakładano wybrane przeciwciała pierwszorzędowe: mysie α -GFP (Sigma-Aldrich, 1:750), królicze α -GFP (Millipore, 1:750), kurczące α -MAP2 (Abcam,

1:200), królicze α -Kalbindyna (Chemicon, 1:1000), mysie α -Kalbindyna (Swant, 1:2000), królicze α -NT-3 (Alomone Labs, 1:300) i królicze α -TUJ-1 (Covance, 1:750) rozpuszczone w PBS, na całą noc w 4°C. Następnego dnia płytki zostały przepłukane trzykrotnie w PBS i inkubowane z odpowiednimi przeciwciałami drugorzędowymi: koza α -królik 568 (Abcam, 1:600), koza α -królik 488 (Abcam, 1:600), koza α -kurczak 568 (Alexa Fluor, 1:600), koza α -mysz 488 (Abcam, 1:600) rozpuszczonymi w PBS, przez 60 minut w 22°C. Po przepłukaniu, w celu uwidocznienia jąder komórkowych, hodowle były inkubowane z odczynnikiem DAPI (Invitrogen, 1:5000) rozpuszczonym w PBS, przez 7 minut. Po trzykrotnym przepłukaniu w PBS płytki zostały pokryte 65% roztworem glicerolu i zamknięte szkiełkiem nakrywkowym.

3.10. Analiza danych i statystyka

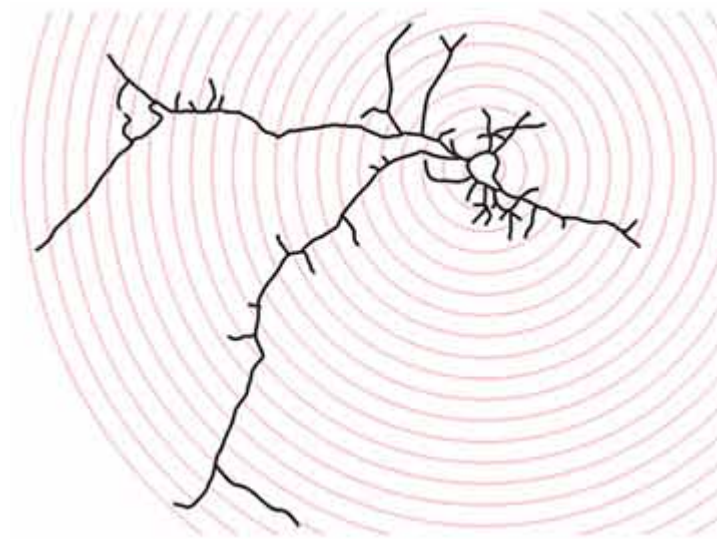
Wszystkie obliczenia densytometryczne w analizie ilościowej poziomu białek metodą Western Blot wykonano przy pomocy programu GeneSys (Syngene). Przy obliczaniu ilości białka badanego wzięto pod uwagę ilość białka referencyjnego (GAPDH) w danej próbce aby zwiększyć rzetelność pomiaru.

Zdjęcie preparatów z barwieniem Nissla wykonano przy użyciu mikroskopu Nikon Eclipse 90i połączonego z komputerem wyposażonym w oprogramowanie Image Pro (Media Cybernetics).

Do analizy i wykonania zdjęć skrawków mózgu barwionych immunofluorescencyjnie użyto mikroskopu fluorescencyjnego Nikon i oprogramowania Image Pro. Przy pomocy mikroskopu konfokalnego (Zeiss) zobrazowano kolokalizację fluorescencyjnych barwień wybranych białek i GFP.

Z kory mózgu każdego zwierzęcia przeanalizowano co najmniej 50-100 stransfekowanych komórek, wykazujących ekspresję GFP w celu policzenia jaki procent stanowiły komórki podwójnie wybarwione. Policzono stransfekowane komórki, które wykazywały kolokalizację z następującymi markerami: GFAP, PCNA, pHH3 i kaspazą 3. Średnia liczba podwójnie wybarwionych komórek była obliczana oddzielnie dla grupy otrzymującej kontrolny plazmid z shRNA oraz osobników otrzymujących plazmid z shRNA TrkC lub shRNA TrkB. Porównanie wyników w grupie kontrolnej i doświadczalnej były przeprowadzane w obrębie każdego miotu. W celu sprawdzenia czy różnice między grupami są statystycznie istotne wykorzystano test t-Studenta i przyjęto istotność dla $p > 0.05$.

Zdjęcia z barwień immunofluorescencyjnych zarówno tkanek jak i hodowli komórkowych wykonano przy pomocy laserowego mikroskopu konfokalnego z wirującym dyskiem (Zeiss). Analiza morfologii komórek Purkiniego oraz komórek ziarnistych została przeprowadzona przy pomocy programu Neurolucida (MBF Bioscience). Policzono dendryty pierwszego rzędu, a poziom skomplikowania drzewka dendrytycznego określono poprzez analizę Sholla z 10- μm odstępami między współśrodkowymi okręgami.



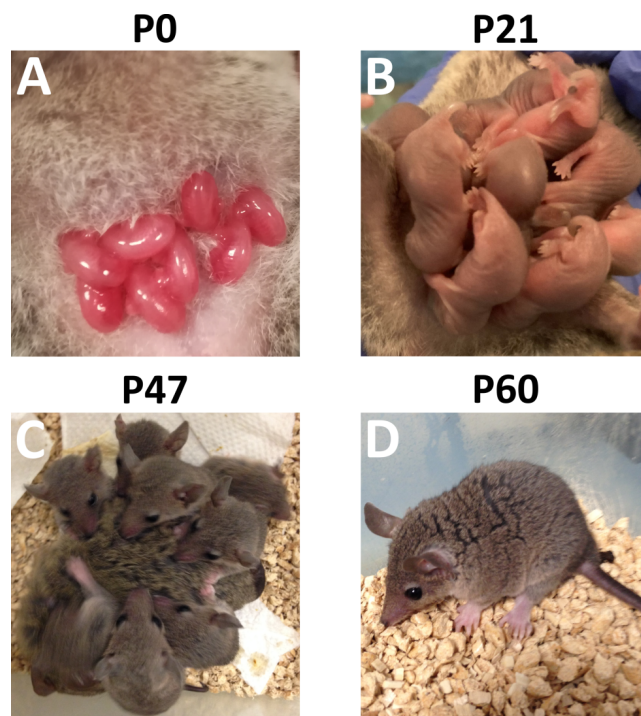
Ryc. 10. Komórka Purkiniego obrysowana w programie Neurolucida z nałożoną siatką ze współśrodkowymi okręgami w odstępach co 10 μm .

Różnice pomiędzy liczbą dendrytów pierwszorzędowych, ogólną długością wypustek i liczbą ich przecięć z okręgami w grupie z wyciszeniem ekspresji receptora TrkC i kontrolnej określano za pomocą testu t-Studenta w programie GraphPad Prism. Różnice uznano za istotne przy $p < 0.05$.

4. Wyniki

4.1. Rozwój oposa *Monodelphis domestica*

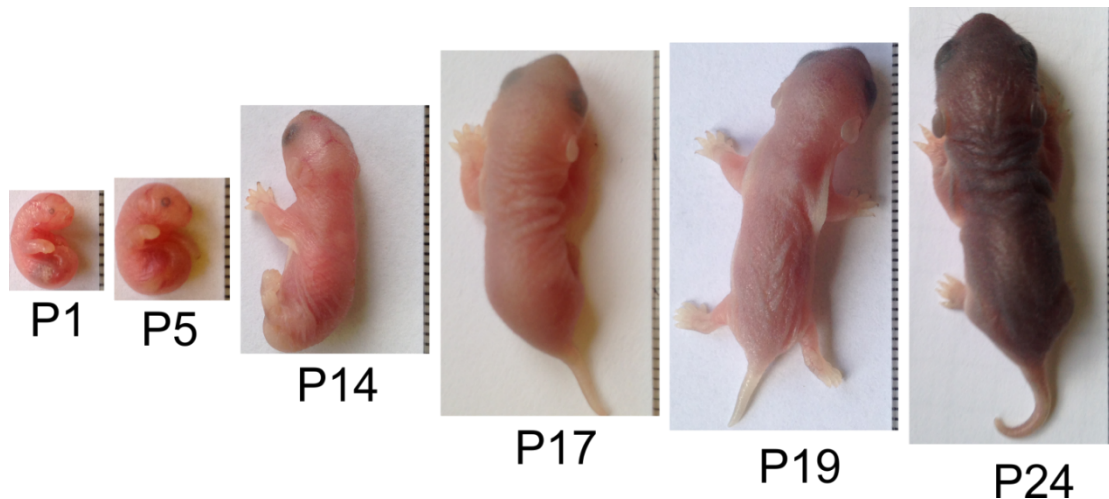
Opos krótkoogonowy (*Monodelphis domestica*), przedstawiciel rodziny Didelphidae, jest małym zwierzęciem nocnym, wszystkożernym, osiągającym 12-18 cm długości ciała i 80-120 g masy (masa ciała samic 90-130 g, masa ciała samców 60-90 g). Dojrzałość seksualną osiąga w wieku około 18-20 tygodni, a ich ciąża trwa 14 dni. Samica oposa rodzi do kilkunastu osesków, które są na bardzo wczesnym etapie rozwoju (Ryc. 11 A). Średnio oposy rodzą 7-8 osesków, czasami zdarza się że rodzą więcej osesków niż matka ma sutków (zazwyczaj 13). Jednak przeżywają tylko te, które zdołają przyczepić się do sutka.



Ryc. 11. Opos *Monodelphis domestica* na różnych etapach rozwoju. Nowonarodzone oseski przyczepione do sutków matki (A), 3-tygodniowe oseski, wciąż przyczepione do sutków (B), oseski na grzbiecie matki (C), ponad 8-tygodniowy, samodzielny opos (D). P – liczba dni po urodzeniu

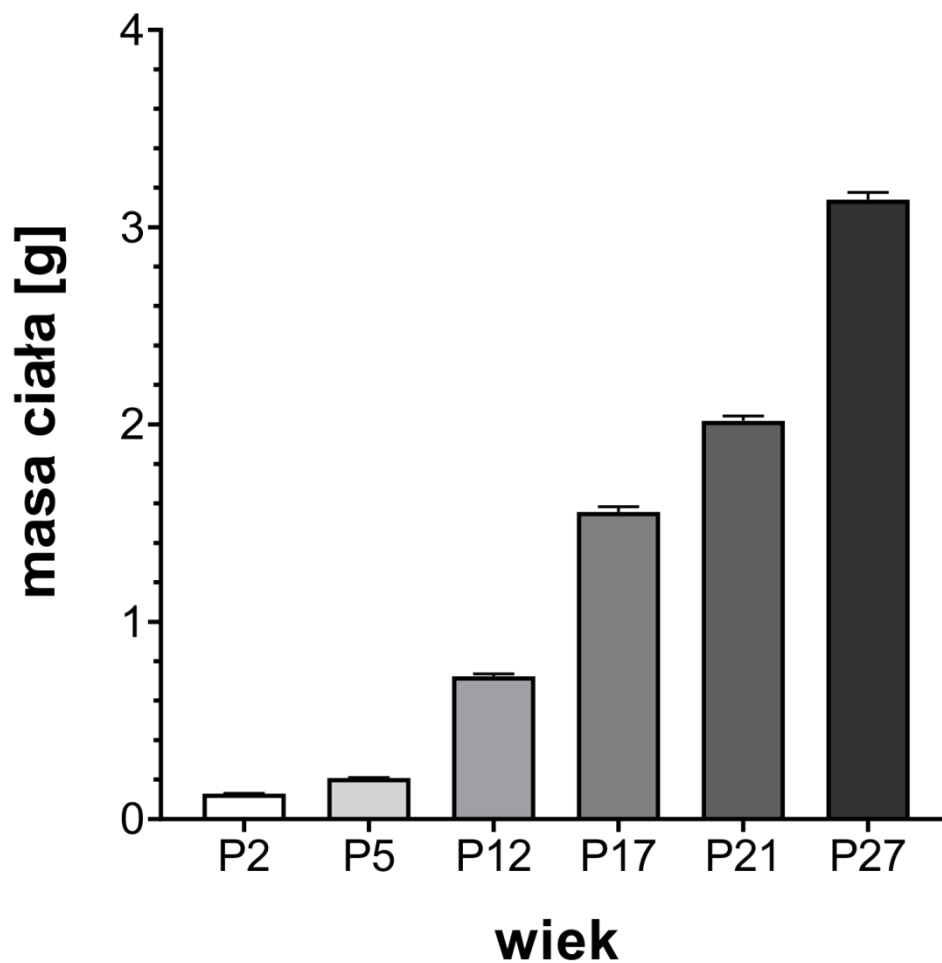
W wieku P1 po urodzeniu opos waży około 0,1 g, a w wieku P2 opos waży jedynie 0,129 g ($\pm 0,006$) i stopniem rozwoju przypomina 14-dniowy embrion szczura (Torres i wsp., 2008). Przednie kończyny są bardziej rozwinięte od tylnych, a wiele

struktur mózgu nie jest jeszcze w pełni wykształcona. W wieku P5 oseski oposa ważą już niemal dwukrotnie więcej, ich masa ciała osiąga $0,208 \pm 0,001$ g (Ryc. 13) i zaczynają być widoczne ukształtowane kończyny tylne (Ryc. 12). Po kolejnym tygodniu życia, w wieku P12, oseski ważą już $0,274$ g ($\pm 0,037$) (Ryc. 13). Przez około dwa tygodnie po narodzinach oseski są na stałe przyczepione do sutków matki. Po tym czasie są przez nią dalej karmione, ale mogą się swobodnie odcepić i ponownie przysssać do sutka.



Ryc. 12. Oseski oposa laboratoryjnego w różnym wieku. P- liczba dni po urodzeniu.

W wieku P17 oposy osiągają ponad dwukrotnie wyższą wagę niż 5 dni wcześniej ($1,557 \pm 0,078$ g). U 3-tygodniowych oposów, ważących średnio $2,019 \pm 0,099$ g, zaczynają pojawiać się włosy (Ryc. 11 B). Po ukończeniu czwartego tygodnia życia, aż do osiągnięcia samodzielności, oseski przyczepiają się do futra matki, która przemieszcza się z nimi (Ryc. 11 C). W wieku około 8 tygodni oposy są już w pełni samodzielne (Ryc. 11 D).



Ryc. 13. Średnia masa ciała oposów w różnym wieku wyrażona w gramach [g] \pm SD. P-dzień po urodzeniu.

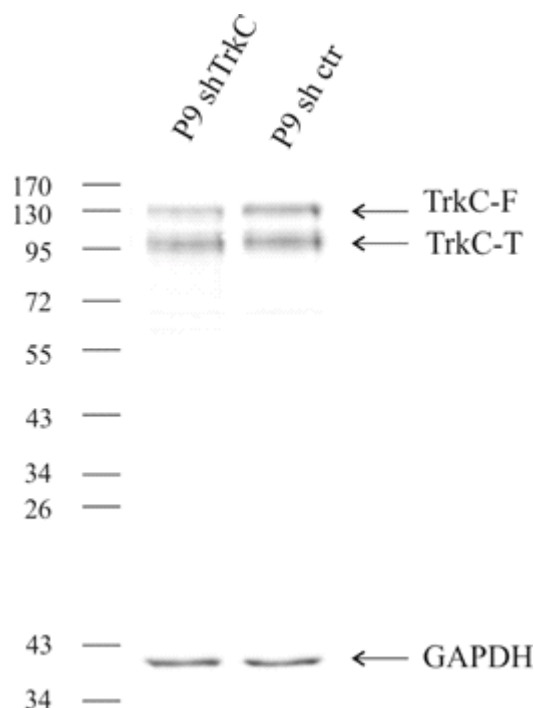
4.2. Wpływ receptorów TrkB i TrkC na rozwój kory nowej oposa *Monodelphis domestica*

4.2.1. Wydajność transfekcji komórek kory po elektroporacji i oznaczenie warstw korowych przy pomocy markerów molekularnych

U przedstawiciela torbaczy, oposa *Monodelphis domestica* proces powstawania poszczególnych warstw kory jest bardziej rozciągnięty w czasie niż u ssaków łożyskowych. Głębokie warstwy kory (VI i V) rozwijają się przez 5 kolejnych dni, od P3 do P7, natomiast warstwy wierzchnie (IV, III i II) pojawiają się w czasie następnych 11 dni, od P7 do P18 (Cheung i wsp., 2010; Puzzolo i Mallamaci, 2010; Bartkowska i wsp., 2013). Badania na hodowlach pierwotnych neuronów korowych oposa wykazały, że

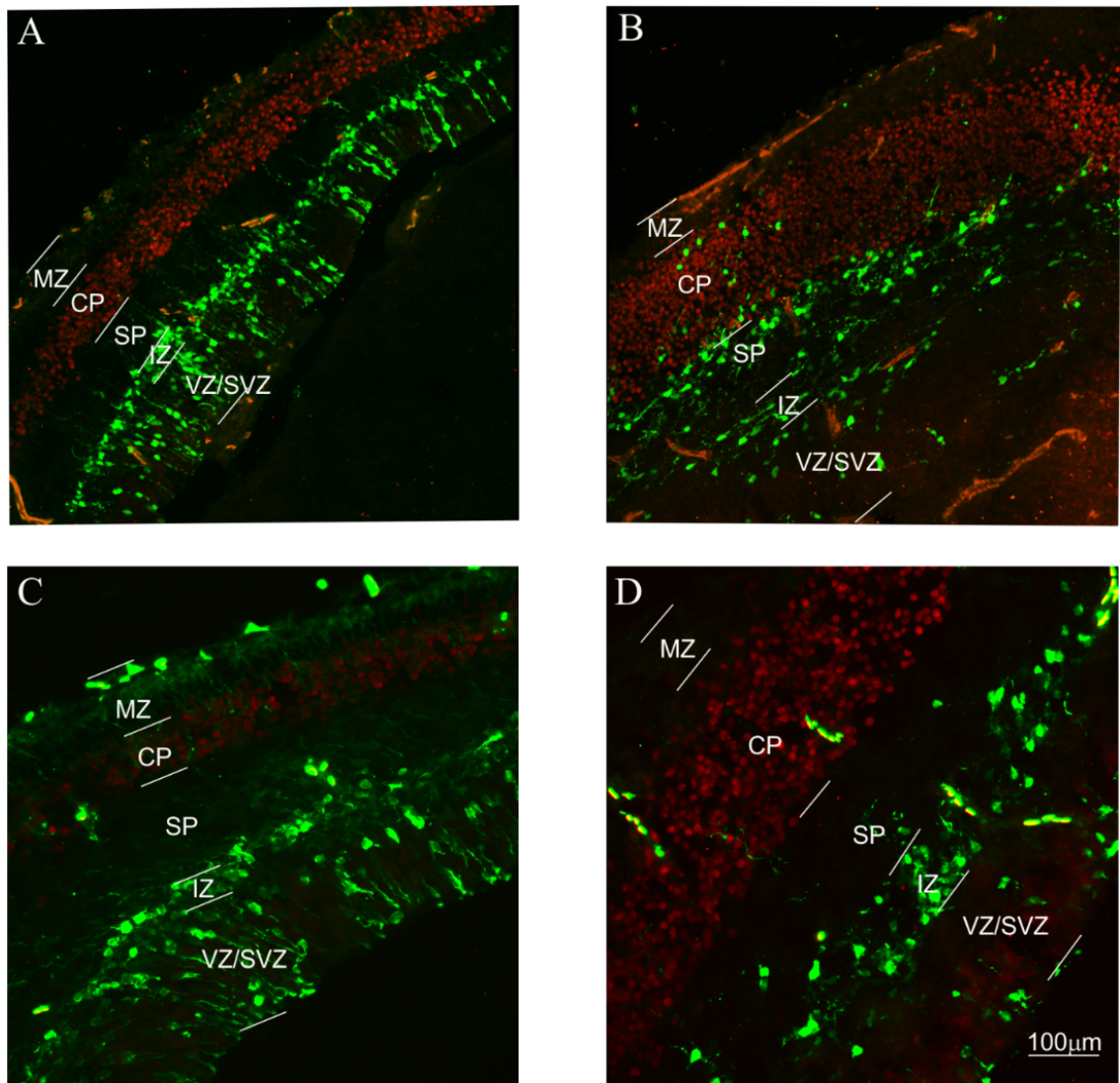
obniżenie ekspresji receptorów TrkB lub TrkC powoduje wzmożoną apoptozę komórek progenitorowych. Ponadto TrkB jest zaangażowany w proces różnicowania komórek progenitorowych kory (Bartkowska i wsp., 2013, Bartkowska i wsp., 2014). Dane te były podstawą planu doświadczeń, celem których było zbadanie wpływu receptorów TrkB i TrkC na rozwój kory nowej oposa. Doświadczenia przeprowadzono na oposach w wieku P7. W tym dniu powstają progenitory komórek głębokich warstw kory nowej. W celu zahamowania aktywności receptorów TrkB lub TrkC podczas rozwoju tej kory, 7-dniowe oposy otrzymały iniekcję plazmidu shRNA specyficznego dla sekwencji receptora TrkB lub TrkC, lub też plazmidu kontrolnego zawierającego sekwencja shRNA nie pokrywającą się z żadną znaną sekwencją kodującą geny myszy i człowieka. Każdy z wymienionych plazmidów kodował również białko GFP, a jego równoczesna ekspresja pozwalała na uwidocznienie komórek, w których zaszła ekspresja badanego genu, ponieważ białko będące produktem ekspresji genu *gfp* świeci na zielono po oświetleniu światłem ultrafioletowym, służy więc za marker ekspresji badanego genu. Po podaniu plazmidów stosowano elektroporację, która tworzy pory w błonach komórkowych, co umożliwia wprowadzenie plazmidów do komórek progenitorów. Wydajność transfekcji była określana za pomocą barwienia immunofluorescencyjnego GFP.

W celu określenia poziomu zmniejszenia ekspresji receptora TrkC w korze mózgu oposa po elektroporacji, wykonano analizę Western blot. Wykorzystano dwa mioty oposów w wieku P9, z czego 17 osesków otrzymało iniekcję plazmidu shRNA TrkC, a 15 osesków iniekcję shRNA kontrolnego. We wszystkich iniekcjach zastosowano elektroporację. Po 2 dniach oseski zostały uśmiercone, po czym wyizolowano korę mózgu zawierającą komórki GFP-immunopoztywne, zhomogenizowano je i na homogenacie przeprowadzono analizę Western blot. Wykazała ona, że przeciwciała przeciwko TrkC wykrywało białko receptora z masą cząsteczkową około 145 kDa (ang. full-length TrkC, TrkC-F), która jest w pełni glikozylowaną formą białka TrkC i jedną skróconą izoformę receptora (ang. truncated TrkC, TrkC-T) z masą cząsteczkową około 95 kDa (Ryc. 14). Ponadto, obliczenia ilości białek pokazały że poziom białka TrkC w tkance pochodzącej z kory oposów, które dostały iniekcję plazmidu shRNA TrkC jest obniżony o 40-50% w stosunku do grupy kontrolnej, w której iniekcję przeprowadzano z użyciem plazmidu kontrolnego.



Ryc. 14. Analiza Western blot lizatu komórek kory oposów w wieku P9, stransfekowanych plazmidem shTrkC lub plazmidem kontrolnym. Przeciwciało przeciw TrkC wykrywa pełną (TrkC-F) jak i jedną izoformę (TrkC-T) receptora. Jako białko referencyjne, w stosunku do którego obliczano ogólną ilość białka na żelu wykorzystano GAPDH.

W celu zbadania procesu tworzenia się warstw kory nowej, oposom w wieku P7 wstrzyknięto plazmid shRNA, a uśmiercano je po dwóch dniach (w wieku P9) lub pięciu dniach (w wieku P12). Skrawki mózgów badanych oposów zostały wybarwione immunohistochemicznie przy użyciu markerów molekularnie specyficznych dla różnych typów komórek kory nowej. Transfekowane komórki zostały wybarwione na obecność GFP, a komórki płytki korowej na obecność białka Tle4, które jest markerem nowopowstałych neuronów głębokich warstw kory nowej. U oposa, neurony warstwy VI powstały w dniu P9, natomiast 3 dni później, w dniu P12 grubość płytki korowej była dwa razy większa, co wskazuje na powstanie warstw VI i V (Ryc. 15).



Ryc. 15. Rozmieszczenie komórek GFP-pozytywnych w korze nowej ośpasa 2 (A) i 5 (B) dni po elektroporacji shRNA TrkB, oraz 2 (C) i 5 (D) dni po elektroporacji shRNA TrkC. Czołowe skrawki mózgu wybarwiono na Tle4 (kolor czerwony) i GFP (kolor zielony). W P9 płytkę korową stanowi warstwa VI kory, natomiast w P12 można wyróżnić warstwę VI i V. MZ - warstwa brzeżna, CP - płytkę korową, SP - warstwa podpłytkowa, IZ - warstwa pośrednia, VZ/SVZ - warstwa komorowa/warstwa przykomorowa.

Liczne komórki GFP-pozytywne rozsiane w obrębie rozwijającej się kory nowej stwierdzono zarówno w wieku P9 i P12, odpowiednio 2 i 5 dni po przeprowadzonej elektroporacji. W wieku P9 większość stansfekowanych komórek kontrolnych umiejscowiła się poniżej płytki korowej, kilka znajdowało się w warstwie podpłytkowej i nieliczne w płytce korowej (Ryc. 15 A, C). Ponadto, większość komórek w strefie komorowej i przykomorowej wykazywały cechy komórek gleju promienistego, a

komórki w strefie pośredniej miały odmienną morfologię. Populację komórek z plazmidem kontrolnym w strefie pośredniej cechowały krótkie wypustki wydłużone poziomo wzdłuż tej warstwy. U oposów w wieku P12, 5 dni po transfekcji, większość komórek wykazujących ekspresję GFP była obecna w warstwie pośredniej, podpłytkowej i w płycie korowej (Ryc. 15 B, D).

4.2.2. Wpływ receptorów *TrkB* i *TrkC* na podziały komórek

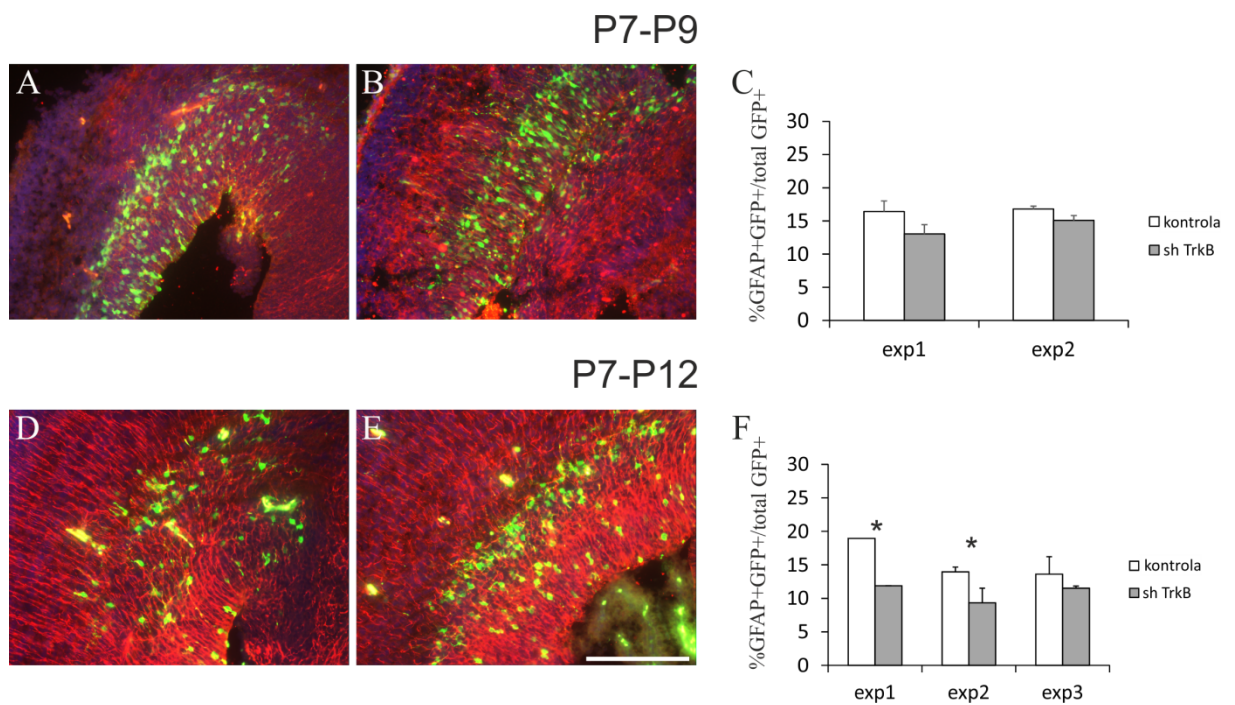
Podziały komórkowe zbadano używając markerów GFAP, PCNA i pHH3. GFAP jest jednym z białek występujących w filamentach pośrednich astrocytów. Przeciwciała anti-GFAP są powszechnie używane do znakowania astrocytów w dorosłym mózgu. Białko GFAP jest jednym z markerów komórek gleju promienistego. W czasie rozwoju embrionalnego glej radialny jest komórką progenitorową neuroblastów, która dzieląc się asymetrycznie generuje neuroblast, a jednocześnie odtwarza komórkę gleju radialnego, którego długa wypustka, sięgająca powierzchni kory, służy za rusztowanie dla migrujących neuroblastów.

Jądrowy antygen dzielącej się komórki (ang. Proliferating Cell Nuclear Antigen, PCNA), pełni kluczową rolę w metabolizmie kwasów nukleinowych, jako element zaangażowany w replikację i naprawę DNA. Ekspresja tego białka rośnie od późnej fazy G1, a najwyższy poziom osiąga w fazie S cyklu komórkowego (Kurki i wsp., 1986). Przeciwciała anti-PCNA wykorzystywane są jako marker dzielących się komórek.

Ufosforylowany histon H3 (ang. phosphohistone H3, pHH3) jest związany z kondensacją chromatyny i występuje niemal wyłącznie podczas mitozy. U ssaków fosforylacja histonu H3 na serynie 10 zapoczątkowuje fosforylację w trakcie profazy, jest najwyższa w czasie metafazy, zanika w anafazie i jest niewykrywalna podczas telofazy (Gurley i wsp., 1978; Paulson i Taylor, 1982). Przeciwciała anti-pHH3 są stosowane jako marker dzielących się komórek.

U oposów w wieku P9, 2 dni po elektroporacji, liczba stransfekowanych komórek (GFP) wykazujących jednocześnie ekspresję GFAP była taka sama w grupie kontrolnej i w grupie shTrkB. Jednak 5 dni po transfekcji, w wieku P12 w grupie shTrkB liczba RGC w korze nowej była obniżona. U oposów z różnych miotów, które otrzymały iniekcję plazmidu kontrolnego $15.5\% \pm 0.99$ komórek GFP wykazywała jednocześnie ekspresję białka GFAP. W dwóch miotach znaleziono znacząco mniej komórek wykazujących jednoczesną ekspresję GFP i GFAP w rozwijającej się korze, po zastosowaniu plazmidu

shTrkB w porównaniu do grupy otrzymującej plazmid kontrolny. Te dane pokazano na Ryc. 16 jako exp 1 i exp2. Ze wszystkich trzech użytych miotów, u oposów które otrzymały shRNA TrkB $10.9\% \pm 1.2$ stransfekowanych komórek wykazywało ekspresję GFAP, natomiast u oposów z tych samych miotów, które otrzymały plazmid kontrolny komórki te stanowiły $15.5\% \pm 2.1$, różnica między tymi grupami była nieistotna statystycznie ($p > 0.07$).

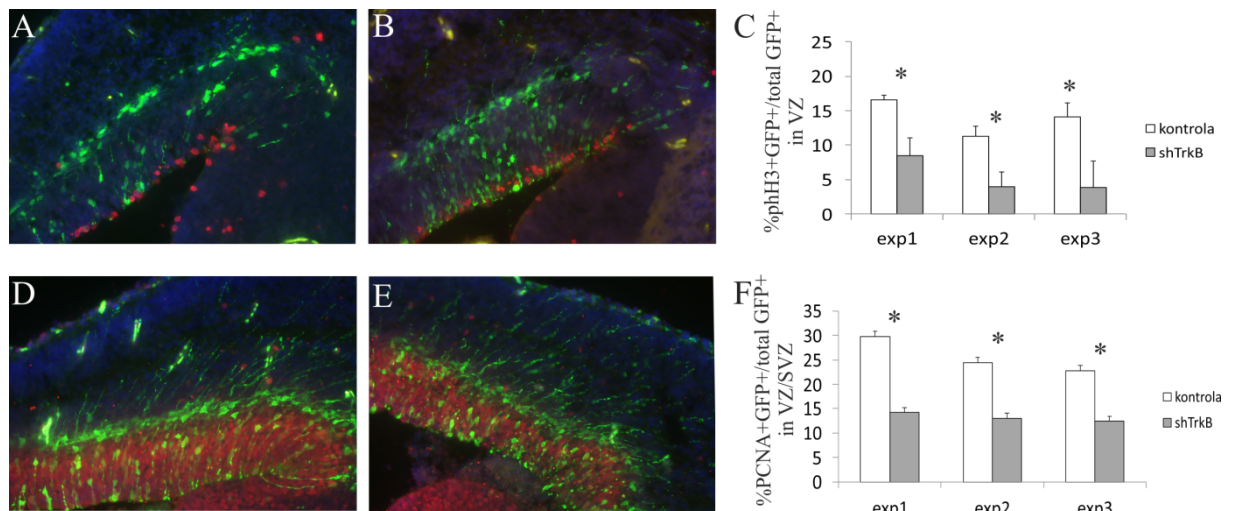


Ryc. 16. Skrawki mózgow w płaszczyźnie czołowej oposów w wieku P9 i P12 wybarwione na GFAP (czerwony) i GFP (zielony). A, B, D, E —zdjęcia z komórkami kory nowej w P9 (A, B,) i P12 (D, E) wyznakowane na GFAP i GFP. Komórki były stransfekowane kontrolnym shRNA (A, D) lub plazmidem hamującym aktywność receptora TrkB (B, E). C, F — liczba komórek wykazujących kolokalizację barwienia na GFAP i GFP w P9 (C) i P12 (F). Komórki zliczono z 2 lub 3 różnych miotów oznaczonych jako exp1, exp2 i exp3. Skala odnosi się do wszystkich zdjęć i jest równa 100 μ m.

Zaobserwowano, że w mózgu oposa, komórki wykazujące ekspresję pHH3 występują w strefie przykomorowej, tworząc grubą warstwę przy świetle komory (Ryc. 17 A, B). Pojedyncze komórki zaobserwowano również nieco wyżej, w strefie przykomorowej (Ryc. 17 A, B). W VZ średnio $13.9\% \pm 1.4$ komórek stransfekowanych plazmidem kontrolnym wykazywało ekspresję pHH3, natomiast u osesków w grupie z obniżoną ekspresją TrkB komórki te stanowiły średnio $5.1\% \pm 2.6$ (Ryc. 17 C).

Komórki z ekspresją następnego z markerów proliferacji - PCNA tworzyły dużą populację komórek znajdującą się zarówno w VZ jak i SVZ komórek bocznych (Ryc. 17 D, E). W grupie kontrolnej około 25% stransfekowanych komórek wykazywała ekspresję PCNA, natomiast w grupie shTrkB było ich prawie 2 razy mniej - $13.2\% \pm 1.6$ (Ryc. 17 F).

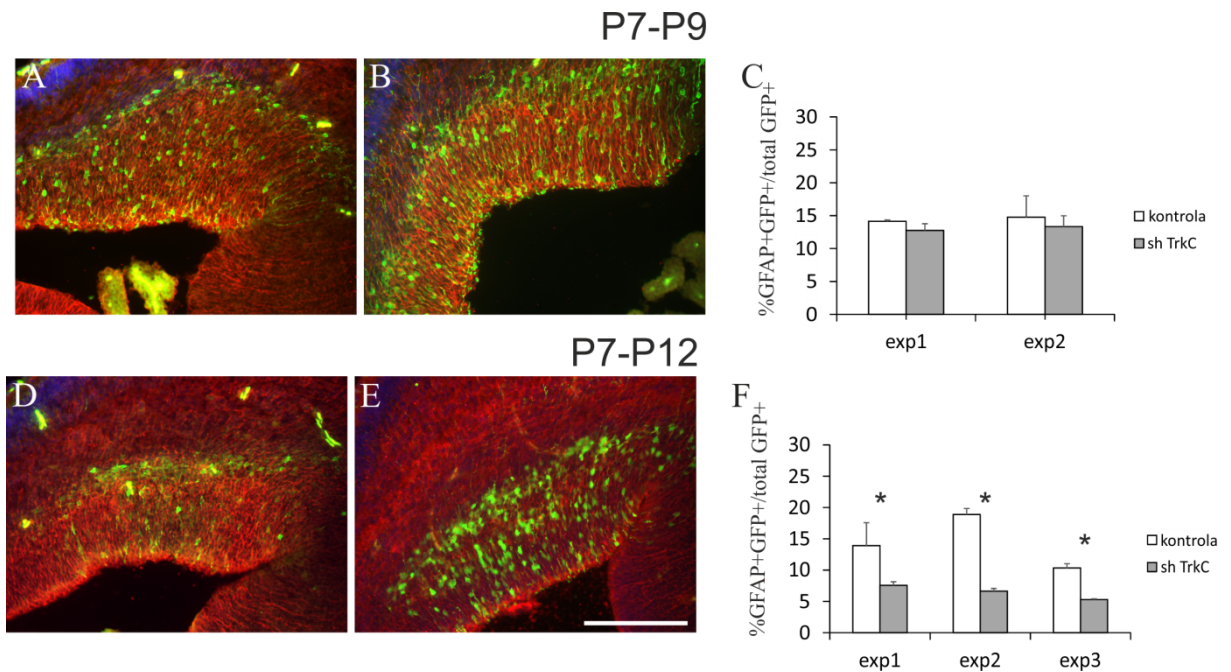
Ogólnie, obniżona aktywność TrkB w korze nowej powodowała obniżenie liczby dzielących się komórek o około 50% (Ryc. 17).



Ryc. 17. Skrawki czołowe mózgow oposów wieku P9 wybarwione na pHH3 (kolor czerwony), PCNA (kolor czerwony) i GFP (kolor zielony). A, B — komórki kory nowej wyznakowane na pHH3 i GFP. Komórki stransfekowano kontrolnym shRNA (A, D) lub shRNA TrkB (B, E). C — liczba komórek z kolokalizacją barwienia na pHH3 i GFP zliczona z 3 różnych miotów (exp1, exp2, exp3). D, E — komórki kory nowej wyznakowane na PCNA i GFP. Komórki zostały stransfekowane kontrolnym shRNA (D) lub shRNA TrkB (E). F — liczba komórek z kolokalizacją barwienia na PCNA i GFP zliczona z 3 różnych miotów. Skala odnosi się do wszystkich zdjęć i jest równa 100 μ m.

U osesków oposów w wieku P9, 2 dni po elektroporacji, liczba skutecznie transfekowanych komórek (GFP), wykazujących również ekspresję GFAP była taka sama w grupie kontrolnej i grupach doświadczalnych, w których oposom wstrzykiwano plazmid shRNA TrkC. Jednak już 5 dni po transfekcji, w wieku P12 w grupie doświadczalnej można było zauważyć obniżoną liczbę RGC w korze nowej. U osesków z różnych miotów, które otrzymały iniekcję plazmidu kontrolnego $14.4\% \pm 1.76$ stransfekowanych komórek wykazywała ekspresję GFAP.

Obniżona ekspresja TrkC obniżyła liczbę komórek wykazujących jednoczesną ekspresję GFP i GFAP o około 50%. W 3 różnych grupach opesów, którym podano shRNA TrkC, zaobserwowano obniżenie liczby stransfekowanych komórek wykazujących ekspresję GFAP, względem opesów z tych samych miotów które otrzymały iniekcję shRNA kontrolnego. We wszystkich 3 użytych do doświadczeń miotach (określonych jako exp1, exp2, exp3) następujący % komórek stransfekowanych shRNA TrkC vs shRNA kontrolnym wykazywała ekspresję GFAP $13.9\% \pm 1.9$ vs $7.5\% \pm 0.58$ (Ryc. 18 F, exp1), $18.9\% \pm 0.95$ vs $6.6\% \pm 0.43$ (Ryc. 18 F, exp2), i $10.4\% \pm 0.69$ vs $5.3\% \pm 0.12$ (Ryc. 18 F, exp3). Ponadto, różnica w liczbie komórek z jednoczesną ekspresją GFP i GFAP pomiędzy wszystkimi grupami doświadczalnymi i kontrolnymi była istotna statystycznie ($p < 0.03$).

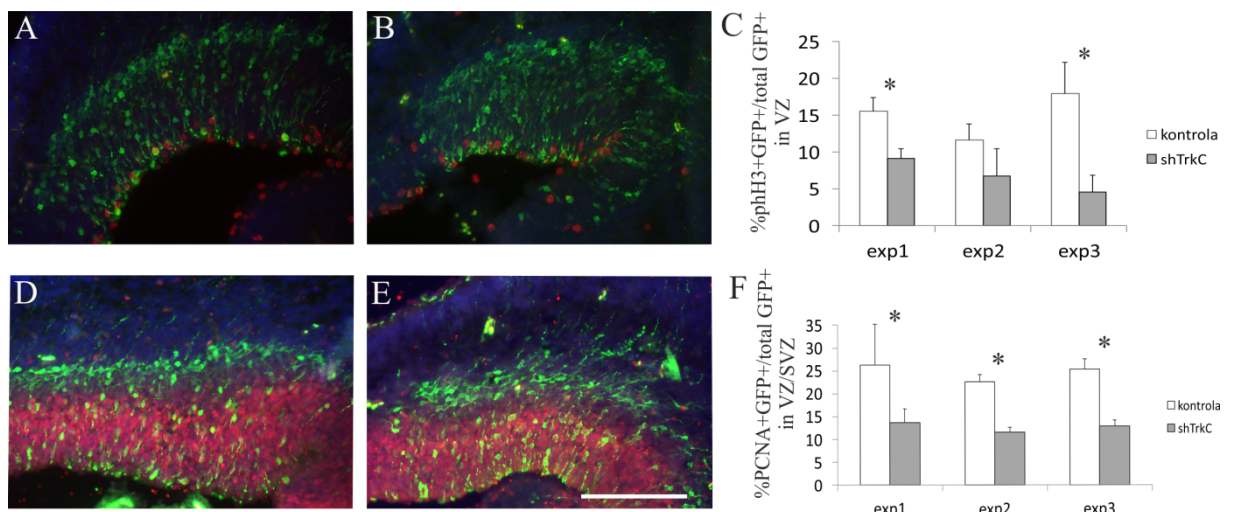


Ryc. 18. Skrawki mózgow w płaszczyźnie czołowej opesów w wieku P9 i P12 wybarwione na GFAP (kolor czerwony) i GFP (kolor zielony). A, B, D, E —zdjęcia z komórkami kory nowej w P9 (A, B), i P12 (D, E) wyznakowane na GFAP i GFP. Komórki były stransfekowane kontrolnym shRNA (A, D) lub plazmidem hamujących aktywność receptora TrkC (B, E). C, F — liczba komórek wykazujących kolokalizację barwienia na GFAP i GFP w P9 (C) i P12 (F). Komórki zliczono z 2 lub 3 różnych miotów oznaczonych jako exp1, exp2 i exp3. Skala odnosi się do wszystkich zdjęć i jest równa 100 μm .

Zaobserwowano, że w mózgu oposa, komórki wykazujące ekspresję pHH3 występują w strefie przykomorowej, tworząc grubą warstwę przy świetle komory (Ryc. 19 A, B). Pojedyncze komórki zaobserwowano również nieco wyżej, w strefie

przykomorowej (Ryc. 19 A, B). W VZ średnio $13.9\% \pm 1.4$ komórek stansfekowanych plazmidem kontrolnym wykazywało ekspresję pHH3, natomiast w korze osesków z obniżoną ekspresją TrkC komórki wykazujące ekspresję pHH3 stanowiły $6.8\% \pm 2.5$ a w odpowiadającej grupie kontrolnej $15.0\% \pm 2.8$ (Ryc. 19 C).

Komórki z ekspresją PCNA tworzyły dużą populację komórek znajdującą się zarówno w VZ jak i SVZ komór bocznych (Ryc. 17 D, E). W grupie kontrolnej około 25% stansfekowanych komórek wykazywała ekspresję PCNA, natomiast w grupie shTrkC było ich prawie 2 razy mniej - $12.6\% \pm 1.8$ (Ryc. 19 F).



Ryc. 19. Skrawki czołowe mózgow oposów wieku P9 wybarwione na pHH3 (kolor czerwony), PCNA (kolor czerwony) i GFP (kolor zielony). A, B — komórki kory nowej wyznakowane na pHH3 i GFP. Komórki stansfekowano kontrolnym shRNA (A) lub shRNA TrkC (B). C — liczba komórek z kolokalizacją barwienia na pHH3 i GFP zliczona z 3 różnych miotów (exp1, exp2, exp3). D, E — komórki kory nowej wyznakowane na PCNA i GFP. Komórki zostały stansfekowane kontrolnym shRNA (D) lub shRNA TrkC (E). F — liczba komórek z kolokalizacją barwienia na PCNA i GFP zliczona z 3 różnych miotów. Skala odnosi się do wszystkich zdjęć i jest równa 100 μm .

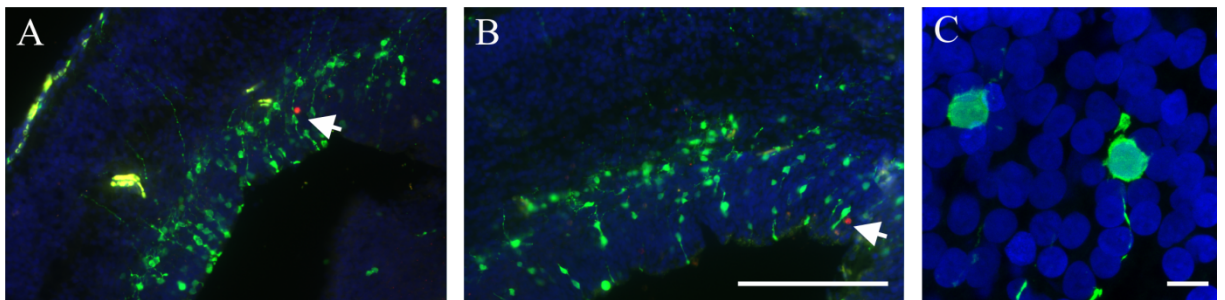
Ogólnie, obniżona aktywność TrkB i TrkC w korze nowej powodowała obniżenie liczby dzielących się komórek o około 50%.

4.2.3. Wpływ zmian w ekspresji receptorów TrkB i TrkC na przeżywalność komórek

Kaspaza 3 jest konserwatywną ewolucyjnie proteazą, pełniącą istotną rolę w procesie apoptozy. Kaspaza 3 jest syntetyzowana jako nieaktywny proenzym, który ulega aktywacji podczas apoptozy (Nicholson, 1999). Ponadto, badania na zwierzętach

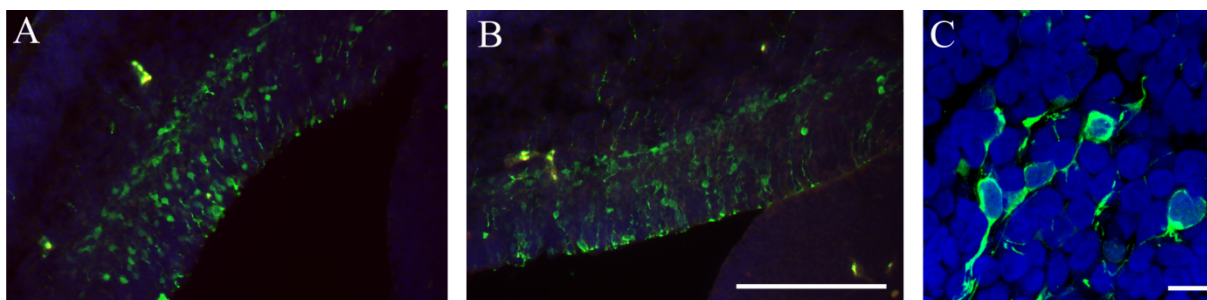
wykazały, że kaspaza-3 jest najpowszechniej występującą kaspazą w mózgu i pełni istotną rolę w jego rozwoju. Ponieważ obniżona liczba dzielących się komórek po obniżeniu ekspresji receptorów TrkB lub TrkC może wynikać ze zwiększonego poziomu umieralności progenitorów w grupach doświadczalnych, na skrawkach kory wykonano barwienie na kaspazę-3.

Na kilku skrawkach z kory mózgowej osesków z obniżoną ekspresją receptora TrkB zauważono pojedyncze komórki wybarwione na kaspazę-3, umiejscowione przypadkowo w obrębie całej kory (Ryc. 20). Ponadto analiza barwienia odczynnikami DAPI nie wykazała zwiększonej liczby skondensowanych jąder komórkowych, charakterystycznych dla umierających komórek w grupie osesków z obniżoną ekspresją TrkB w porównaniu do grupy kontrolnej. Na Ryc. 20 pokazano, że wszystkie komórki wybarwione DAPI, w tym komórki stransfekowane, wyglądają na zdrowe.



Ryc. 20. Skrawki czołowe mózgow osesków wyznakowane na kaspazę-3 (czerwony), GFP (zielony) i DAPI (niebieski). Komórki stransfekowano kontrolnym shRNA (A) lub shRNA TrkB (B, C). Tylko jedna komórka na tym obszarze kory nowej wybarwiła się na obecność kaspazy 3. Żadna z widocznych komórek wybarwionych na DAPI nie miała skondensowanej chromatyny. Skala na zdjęciu B jest równa 100 μm i odnosi się do zdjęć A i B, natomiast skala na zdjęciu C jest równa 10 μm .

Podobnie jak w przypadku TrkB, wśród skrawków pochodzących od osesków z obniżoną ekspresją TrkC można było zaobserwować pojedyncze komórki apoptotyczne wykazujące ekspresję kaspazy-3, rozsiane w obrębie całej kory (Ryc. 21). Barwienie odczynnikami DAPI wykazała, że komórki, w tym komórki stransfekowane, są zdrowe i nie posiadają skondensowanych jąder zarówno na skrawkach kory od osesków z grupy sh TrkC jak i z grupy kontrolnej.



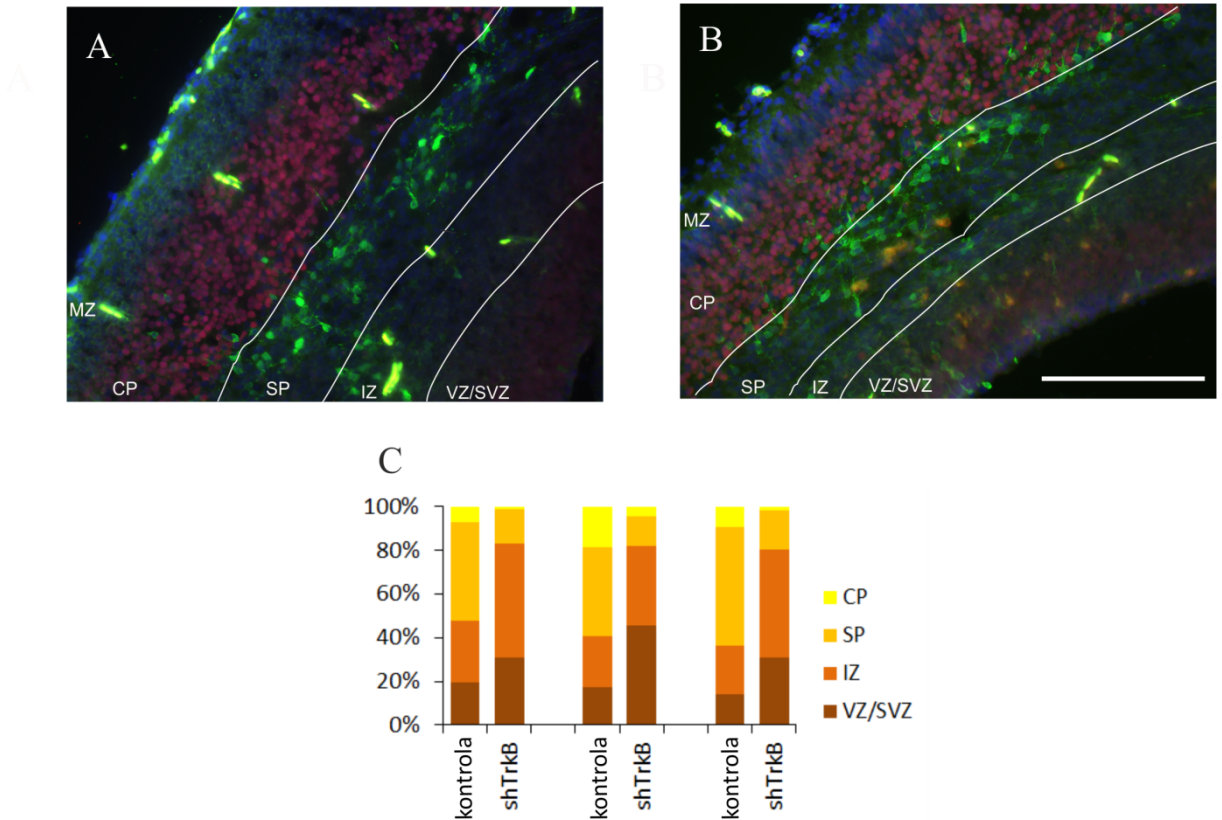
Ryc. 21. Skrawki czołowe mózgow oposów wyznakowane na kaspazę-3 (czerwony), GFP (zielony) i DAPI (niebieski). Komórki stransfekowano kontrolnym shRNA (A) lub shRNA TrkC (B, C). Tylko jedna komórka na tym obszarze kory nowej wybarwiła się na obecność kaspazy 3. Żadna z widocznych komórek wybarwionych na DAPI nie miała skondensowanej chromatyny. Skala na zdjęciu B jest równa 100 μm i odnosi się do zdjęć A i B, natomiast skala na zdjęciu C jest równa 10 μm .

4.2.4. Wpływ aktywności receptorów *TrkB* i *TrkC* na migrację neuronów

Precyzyjne określenie stref neurogennych i warstw kory w rozwijającej się korze nowej oposa oraz analiza umiejscowienia stransfekowanych komórek wykazujących ekspresję GFP pozwoliło na prześledzenie procesu migracji podczas powstawania głębokich warstw kory. Użyto różnych markerów dla zobrazowania stref neurogennych i warstw kory nowej: PCNA dla VZ/SVZ, *Tbr2* dla progenitorów pośrednich i neuroblastów oraz *Tle4* i *HuD* dla neuronów głębokich warstw kory, które pozwoliły na zidentyfikowanie granicy pomiędzy strefą podpłytkową i VI warstwą kory. W celu prześledzenia procesu migracji zróżnicowanych neuroblastów/neuronów, policzono stransfekowane komórki które dotarły do kolejnych warstw kory u zwierząt, które otrzymały plazmid kontrolny lub wyciszający ekspresję jednego z receptorów Trk, 5 dni po przeprowadzonej iniekcji.

Na skrawkach kory pochodzących od osesków, które otrzymały iniekcję shTrkB średnio 35% wszystkich stransfekowanych komórek znajdowało się w VZ/SVZ, natomiast w grupie kontrolnej jedynie 16.7% (Ryc. 22). Liczba stransfekowanych komórek znajdujących się w strefie pośredniej była niemalże dwukrotnie wyższa w korze pochodzącej od osesków z obniżoną ekspresją *TrkB* w porównaniu do grupy kontrolnej (46% vs 24%). Z drugiej strony, liczba komórek które dotarły do warstwy podpłytkowej była prawie 3 razy niższa w korze oposów, które otrzymały iniekcję shRNA *TrkB* w porównaniu z grupą kontrolną (15% vs 42%). Wiele ze stransfekowanych komórek zgromadzonych w strefie pośredniej kory nie przemieszczało się przez warstwę

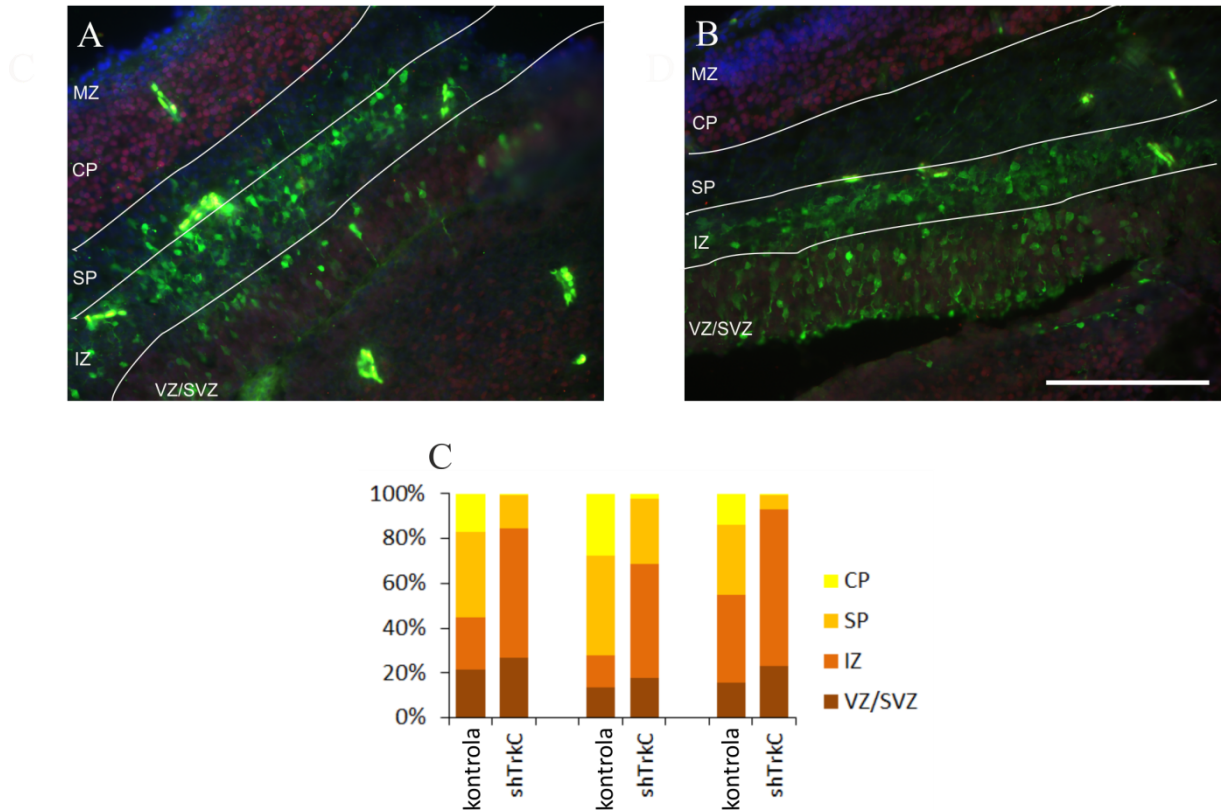
podpłytkową aby dostać się do płytki korowej. Jak pokazano na Ryc. 22 C tylko 2% nowopowstałych neuronów z obniżoną ekspresją receptora TrkB docierało do płytki korowej, natomiast w grupie kontrolnej aż 15%.



Ryc. 22. Migracja stransfekowanych komórek w korze nowej u oposa w wieku P12 - 5 dni po transfekcji. A, B - zdjęcia skrawków czołowych wyznakowanych na GFP (zielony), Tle4 (czerwony) i DAPI (niebieski). Oposy otrzymały iniekcję kontrolnego shRNA (A) lub shRNA TrkB (B). C - na wykresie przedstawiono procentowy udział komórek GFP-pozytywnych w określonej warstwie kory nowej. MZ - warstwa brzeżna, CP - płytki korowa, SP - warstwa podpłytkowa, IZ - warstwa pośrednia, VZ/SVZ - warstwa przykomorowa/warstwa okołokomorowa. Skala na zdjęciu B odnosi się do zdjęć A i B i jest równa 100 μ m.

W wyniku obniżonej aktywności receptora TrkC komórki gromadziły się w strefie rozrodczej. W grupie shTrkC średnio 22% wszystkich stransfekowanych komórek znajdowało się w VZ/SVZ, natomiast w grupie kontrolnej 16.7% (Ryc. 23). W obrębie strefy pośredniej, liczba stransfekowanych komórek była ponad dwukrotnie większa w grupie shTrkC w porównaniu do grupy kontrolnej (59% vs 24%). W warstwie podpłytkowej, liczba komórek wykazujących ekspresję GFP była niemal 3 razy niższa w grupie shTrkC w porównaniu z grupą kontrolną (15% vs 42%). Wiele ze

stransfekowanych komórek na skrawkach kory osesków z grupy shTrkC umiejscowionych w strefie pośredniej nie migrowało przez warstwę podpłytkową aby dostać się do płytki korowej. Na Ryc. 23. C pokazano, że jedynie 1% nowo powstałych neuronów z obniżoną ekspresją receptora TrkC docierało do płytki korowej, a w grupie kontrolnej aż 15%.

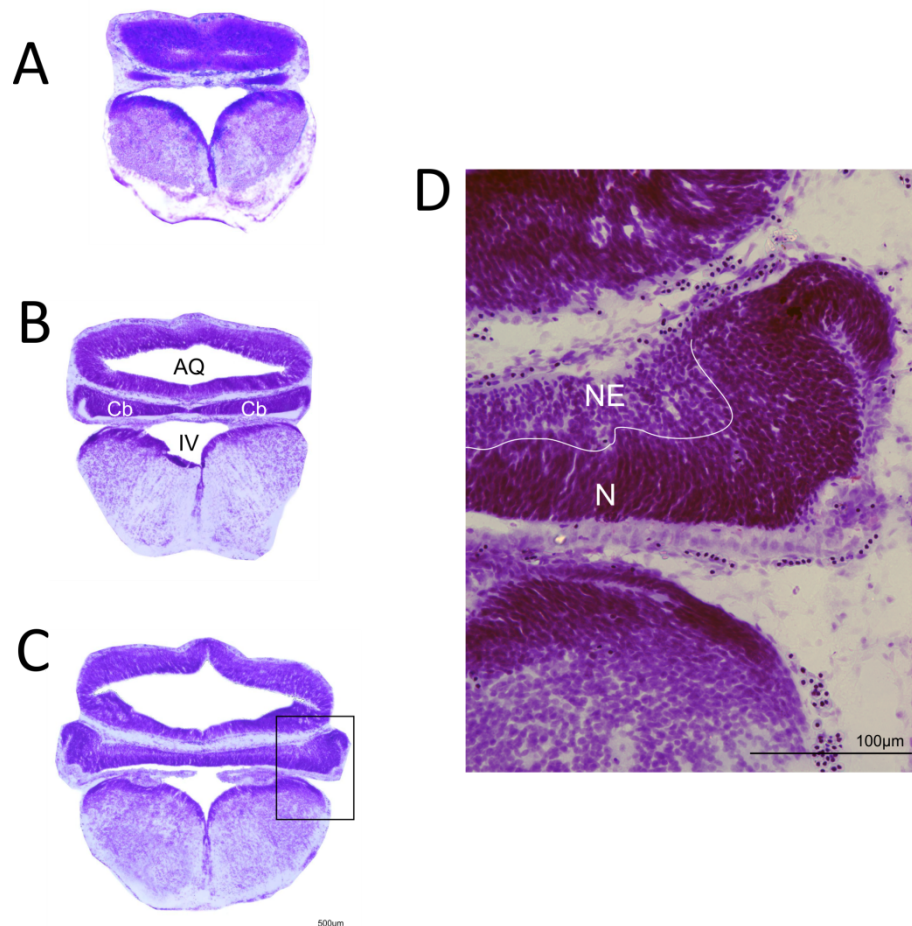


Ryc. 23. Migracja stransfekowanych komórek w korze nowej u oposa w wieku P12 - 5 dni po transfekcji. A, B - zdjęcia skrawków czołowych wyznakowanych na GFP (zielony), Tle4 (czerwony) i DAPI (niebieski). Oposy otrzymały iniekcję kontrolnego shRNA (A) lub shRNA TrkC (B). C - na wykresie przedstawiono procentowy udział komórek GFP-pozytywnych w określonej warstwie kory nowej. MZ - warstwa brzeżna, CP - płytka korowa, SP - warstwa podpłytkowa, IZ - warstwa pośrednia, VZ/SVZ - warstwa komorowa/warstwa przykomorowa. Skala na zdjęciu B odnosi się do zdjęć A i B i jest równa 100 μ m.

4.3. Rozwój mózdzku u oposa *Monodelphis domestica*

Rozwój mózdzku oposa został zbadany przy pomocy metod histologicznych i immunohistochemicznych. Skrawki mózgow oposów w różnym wieku zostały zabarwione metodą Nissla. Na skrawkach mózgu oposa w wieku P2 widać, że w tym wieku mózg oposa jest na bardzo wczesnym etapie rozwoju. W tylnej części mózgu

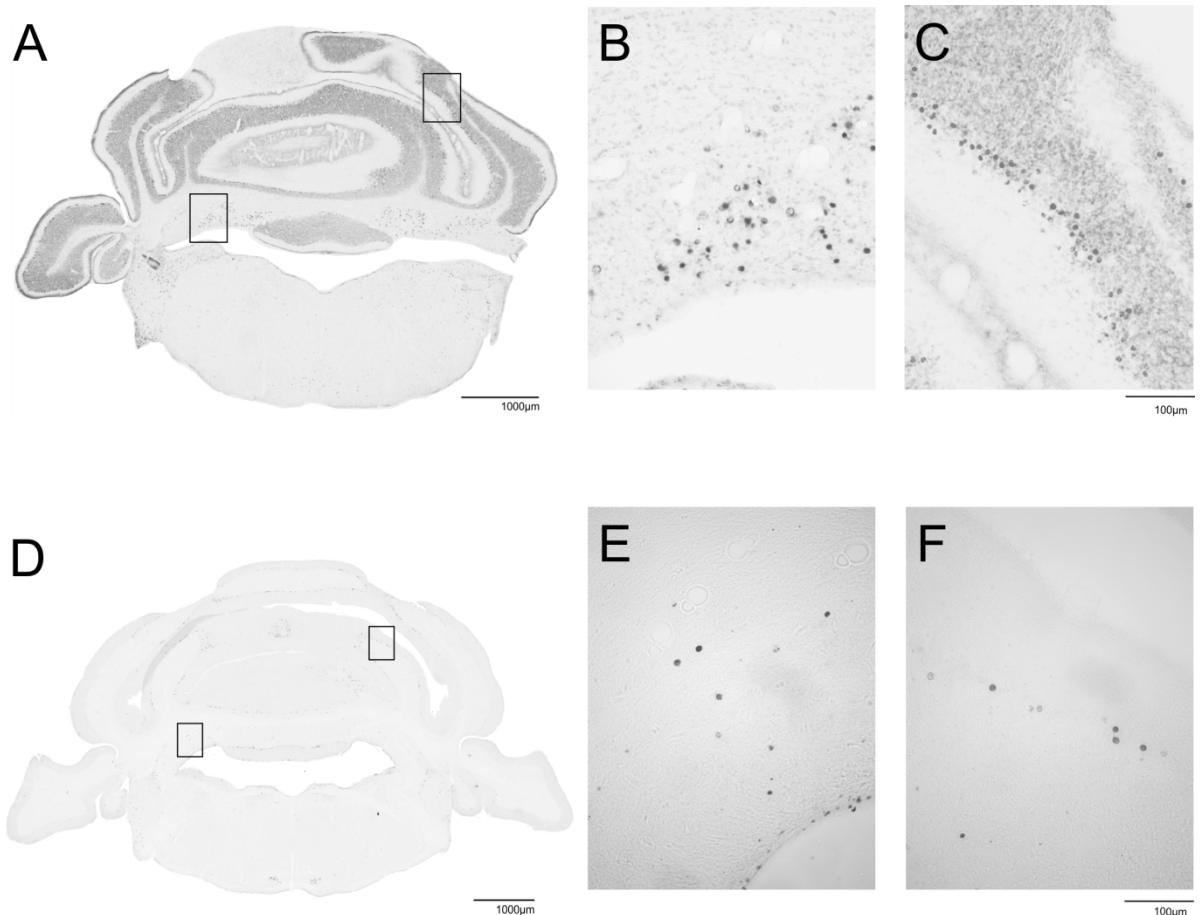
widać pień mózgu, w którym wiele struktur jest już zbudowanych z neuronów (Ryc. 24). W pozostałych strukturach widoczne są głównie komórki progenitorowe. W tym okresie rozwojowym zawiązek mózdzku składa się z masy jednolicie zabarwionych komórek progenitorowych i nielicznych zróżnicowanych neuronów. Na Ryc. 24 widać zabarwione metodą Nissla komórki progenitorowe charakteryzujące się wydłużonym ciałem komórkowym i silniejszym wybarwieniem niż neurony (Ryc. 24 D).



Ryc. 24. Skrawki czołowe mózgu oposa w wieku P2 pokazujące pień mózgu i mózdzek wybarwione metodą Nissla. (A) część przednia, (B) część środkowa, (C) część tylna mózdzku, (D) zaznaczony na skrawku C obszar w powiększeniu. AQ - wodociąg, Cb - zawiązek mózdzku, IV - komora czwarta, N - neuroepitelium, NE - neurony.

W celu prześledzenia procesu tworzenia się i migracji komórek, z których zbudowany jest mózdzek oraz ich ostatecznej lokalizacji, oseski oposa w różnym wieku, od P1 do osobników dorosłych, otrzymały iniekcję BrdU, a po jednym lub trzech miesiącach ich mózgi były utrwalane, krojone, a następnie barwione immunohistochemiczne na obecność BrdU. Wyniki pokazują, że u oposów, które

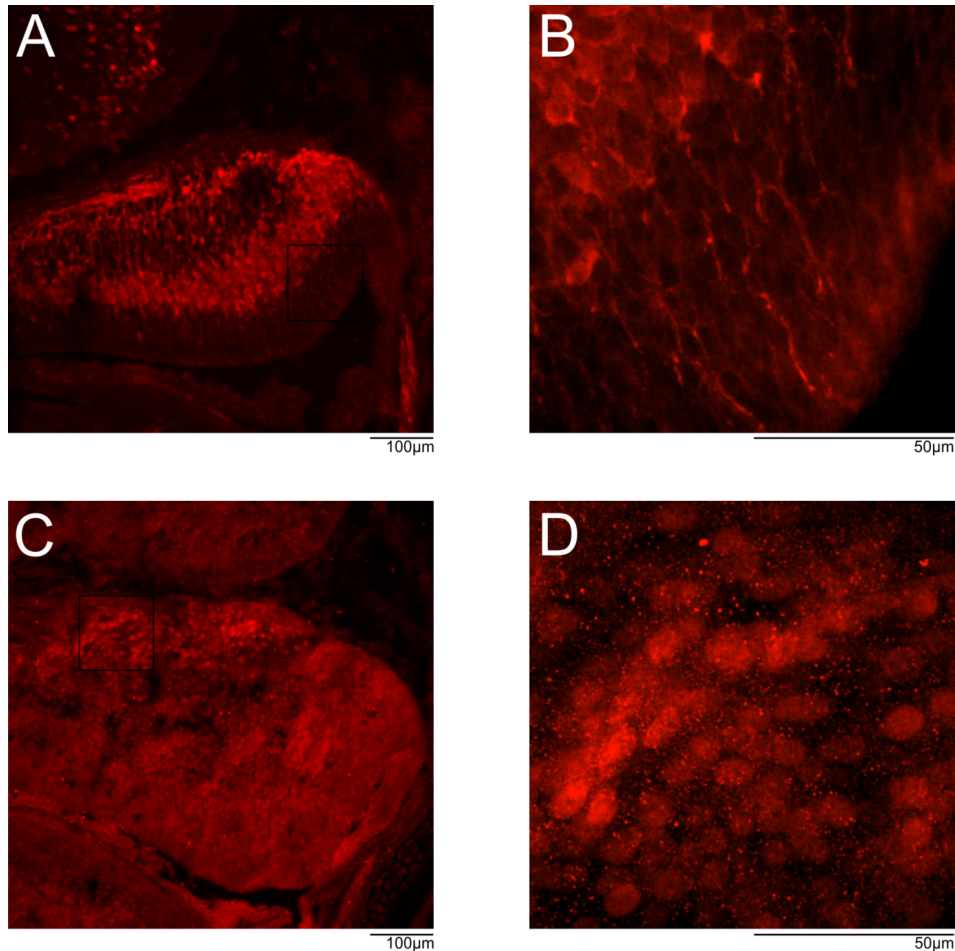
otrzymały BrdU w wieku P1, komórki wyznakowane BrdU znajdowały się w głębokich jądrach mózdzku (DCN) (Ryc. 25 B) oraz w warstwie komórek Purkinjego (Ryc. 25 C). Ten proces trwał nadal w wieku P3 (Ryc. 25 D), ale komórek DCN (Ryc. 25 E) i komórek Purkinjego (Ryc. 25 F), które powstały w tym wieku było mniej.



Ryc. 25. A Skrawek czołowy mózgu oposa w wieku P35, który otrzymał iniekcję BrdU w wieku P1. Na powiększeniach obszarów oznaczonych prostokątami w (A) widać jądra komórek DCN (B) i komórek Purkinjego (C) wyznakowane na obecność BrdU. (D) skrawek czołowy mózgu oposa w wieku P90, który otrzymał iniekcję BrdU w wieku P3. Na powiększeniach zaznaczonych obszarów widać komórki DCN (E) i komórki Purkinjego (F) wyznakowane na obecność BrdU. Skala na zdjęciu C odnosi się do zdjęć B i C, natomiast skala na zdjęciu F odnosi się do zdjęć E i F.

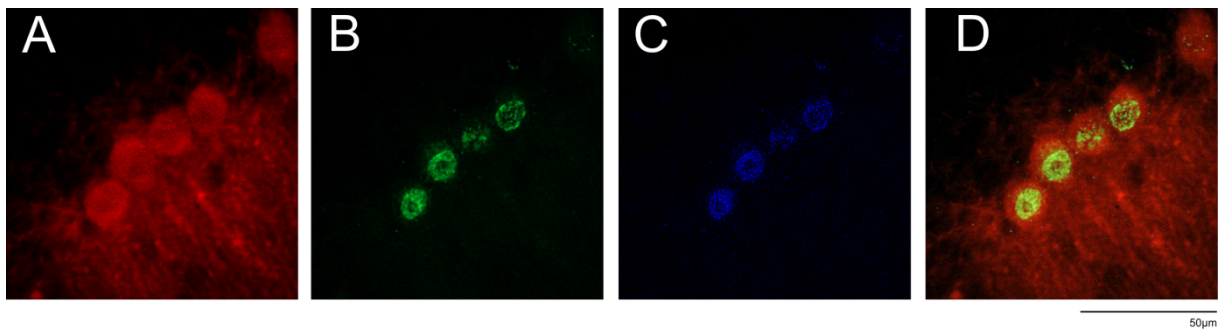
Ponieważ niektóre czynniki transkrypcyjne ulegają ekspresji podczas powstawania mózdzku, wykorzystano je jako molekularne markery określonych typów komórek. Użyto barwienia na obecność czynnika Tbr1 (ang. T-box brain transcription factor 1) i kalbindyny (CB). W mózdzku 3-dniowego oposa stwierdzono zarówno komórki wykazujące ekspresję CB (Ryc. 26 A, B) jak i Tbr1 (Ryc. 26 C, D), jednak były

to różne typy komórek. Neurony Purkinjego wybarwiały się na obecność CB (Ryc. 26 A, B), natomiast neurony, które tworzą jądra mózdzku DCN wykazywały obecność Tbr1 (Ryc. 26 C, D). W kolejnych dniach komórki Tbr1+ tworzące jądrową strefę przejściową (ang. nuclear transitory zone, NTZ) wędrowały niżej, aby osiągnąć swoje miejsce docelowe i utworzyć DCN (Ryc. 30).



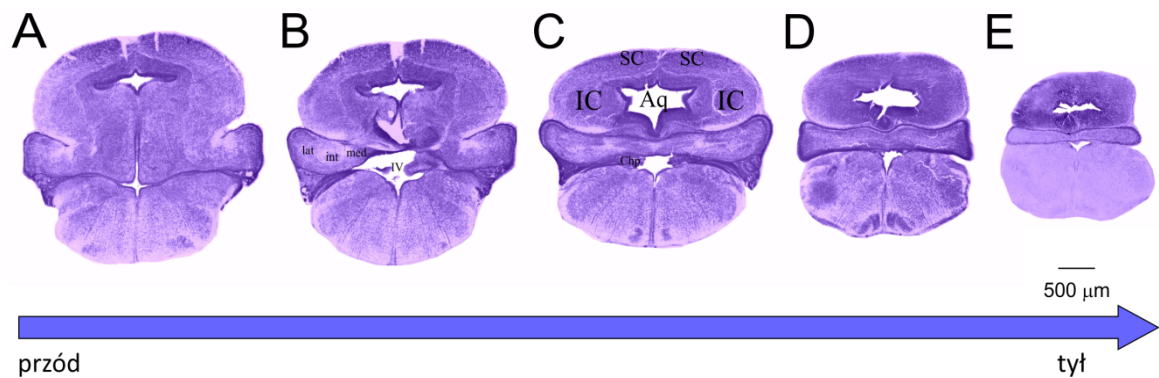
Ryc. 26. A komórki wyznakowane na obecność kalbindyny (CB) w mózdzku 3-dniowego, (B) zaznaczony na skrawku A obszar w powiększeniu, (C) komórki wyznakowane na Tbr1 w mózdzku 3-dniowego oposa, (D) zaznaczony na skrawku C obszar w powiększeniu.

Aby potwierdzić fenotyp komórek powstających w wieku P3 w mózdzku oposa, wykonano podwójne barwienie na BrdU i CB. Barwienie skrawków mózdków 90-dniowych oposów, które otrzymały iniekcję BrdU w wieku P3 wykazało, że w większości komórek jest obecne BrdU i CB (Ryc. 27).



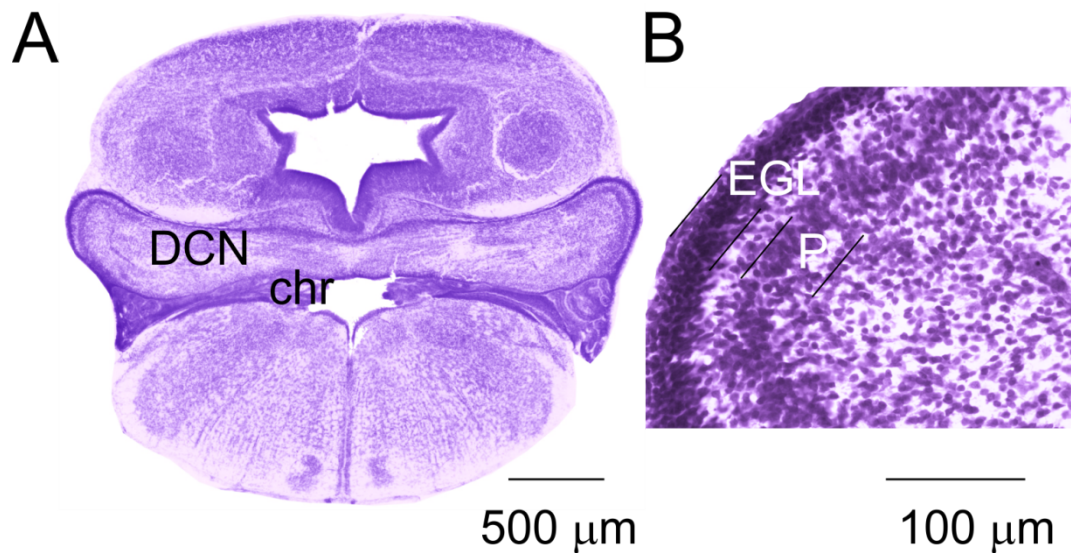
Ryc. 27. Skrawek mózgu oposa w wieku P90, który otrzymał iniekcję BrdU w wieku P3. (A) komórki wyznakowane na obecność CB (kolor czerwony), (B) komórki wyznakowane na obecność BrdU (kolor zielony), (C) komórki wybarwione DAPI (kolor niebieski), (D) nałożone zdjęcia obrazujące obecność wszystkich trzech markerów.

W P11 rozpoczyna się fałdowanie EGL (Ryc. 28), ale żaden z płacików robaka ani półkul mózdzku nie jest jeszcze ostatecznie wykształcony. Wyraźnie widać cytoarchitektonikę warstw kory mózdzku. Komórki Purkiniego, widoczne jako największe neurony (Ryc. 29 B) tworzą w tym wieku wielowarstwową strukturę. W obszarze półkul wyodrębniają się głębokie jądra mózdzku.



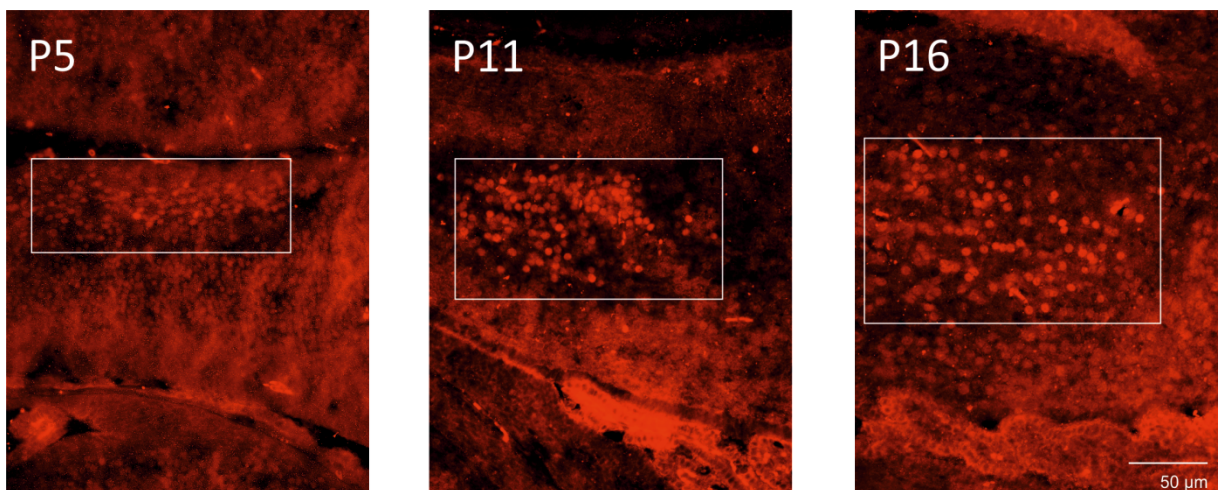
Ryc. 28. Skrawki czołowe mózgu oposa w wieku P11 zawierające mózdzek. Sekwencja od A (część przednia mózdzku) do E (część tylna). lat, int, med – części DCN; IC - wzgórek dolny, SC - wzgórek górny, Aq - wodociąg, Chp - splot naczyniówkowy, IV – komora czwarta

Na Ryc. 29, gdzie został ilustrowany obszar mózdzku pod większym powiększeniem skrawka półkuli mózdzku widać wyraźnie warstwę drobinową (EGL) i warstwę komórek Purkiniego.



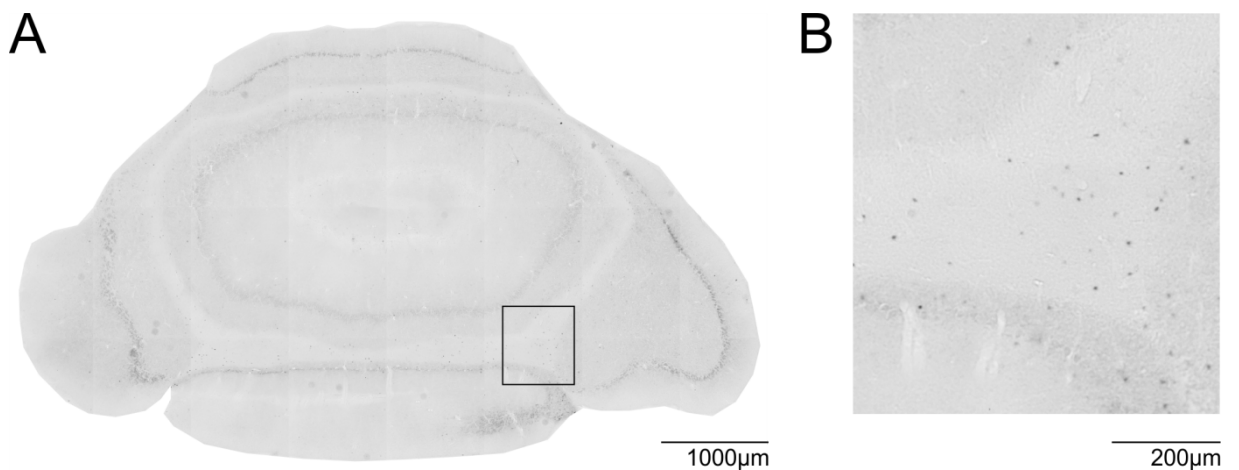
Ryc. 29. Skrawek czołowy mózdzku oposa w wieku P11, wybarwiony metodą Nissla (A), powiększony obszar zewnętrznej warstwy rozrodczej (B). DCN - głębokie jądra mózdzku, chr - spłot naczyńnkowy, EGL - zewnętrzna warstwa rozrodcza, P - komórki Purkiniego.

W celu ustalenia fenotypów komórek mózdzku wykonano barwienie immunohistochemiczne na obecność białka Tbr1. Na skrawkach mózdzku oposa w wieku P5, P11 i P16 wyraźnie widać komórki Tbr1-immunopoztywne tworzące DCN.



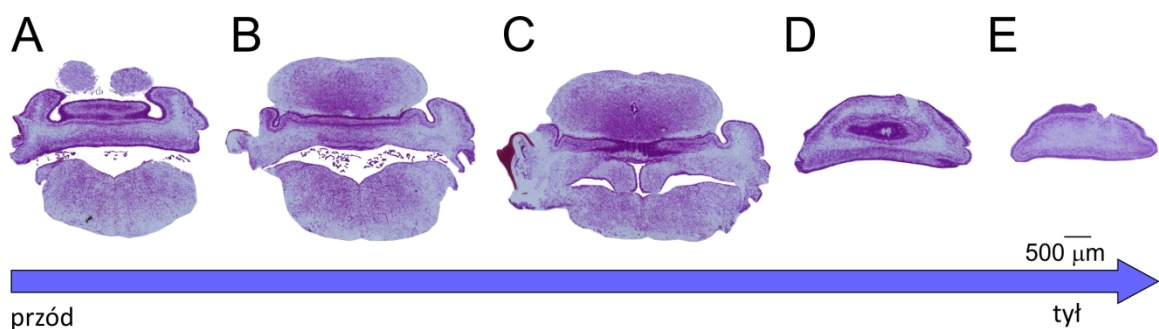
Ryc. 30. Skrawki czołowe mózdzku oposa w wieku P5, P11 i P16 wybarwione na marker komórek DCN, białko Tbr1. Na zdjęciach białym prostokątem wyznaczono obszar tworzących się DCN.

W wieku P16 stwierdzono obecność pierwszych komórek w istocie białej. Aby sprawdzić ich fenotyp, przeprowadzono podwójne barwienie na BrdU i białko Olig2, które jest markerem oligodendrocytów.

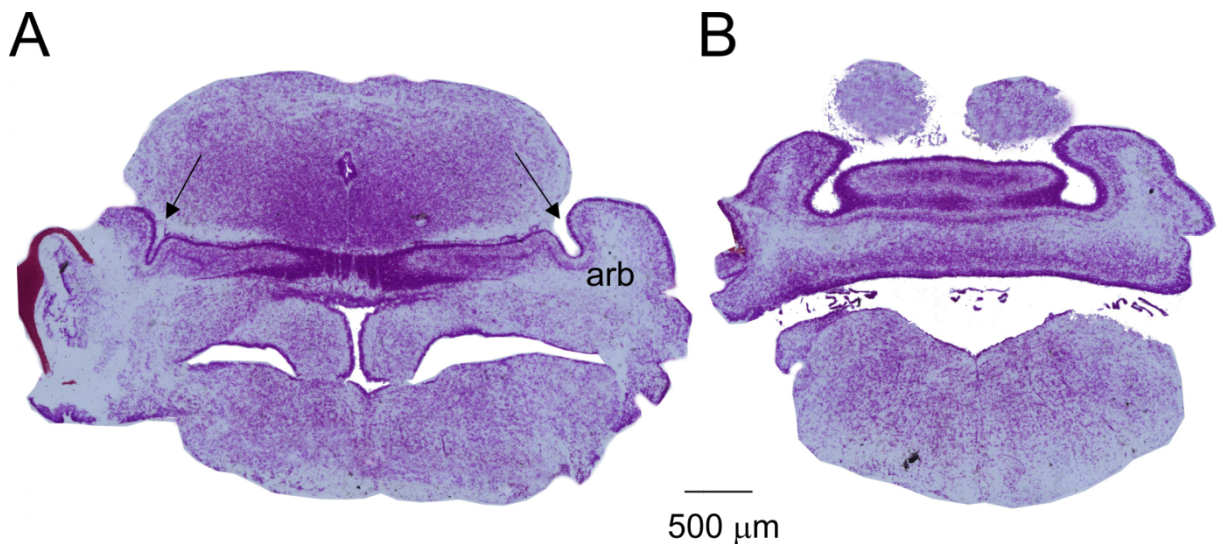


Ryc. 31. (A) skrawek czołowy mózdzku oposa w wieku P90, który otrzymał iniekcję BrdU w wieku P16, (B) zbliżenie przedstawia jądra komórkowe BrdU-immunopoztywne w obrębie istoty białej.

Przez następne dwa tygodnie zachodzi proces fałdowania się kory mózdzku. Jako pierwsze powstają szczeliny oddzielające robak od półkuli mózdzku, następnie pojawiają się dodatkowe szczeliny dzielące robak i półkule na płaciki. W wieku P19 (Ryc. 32), szczeliny oddzielające robak od półkul były dobrze widoczne (Ryc. 33 A). Ponadto pojawiła się charakterystycznie rozgałęziona istota biała mózdzku zwana drzewem życia (łac. arbor vitae, Ryc. 33 B).

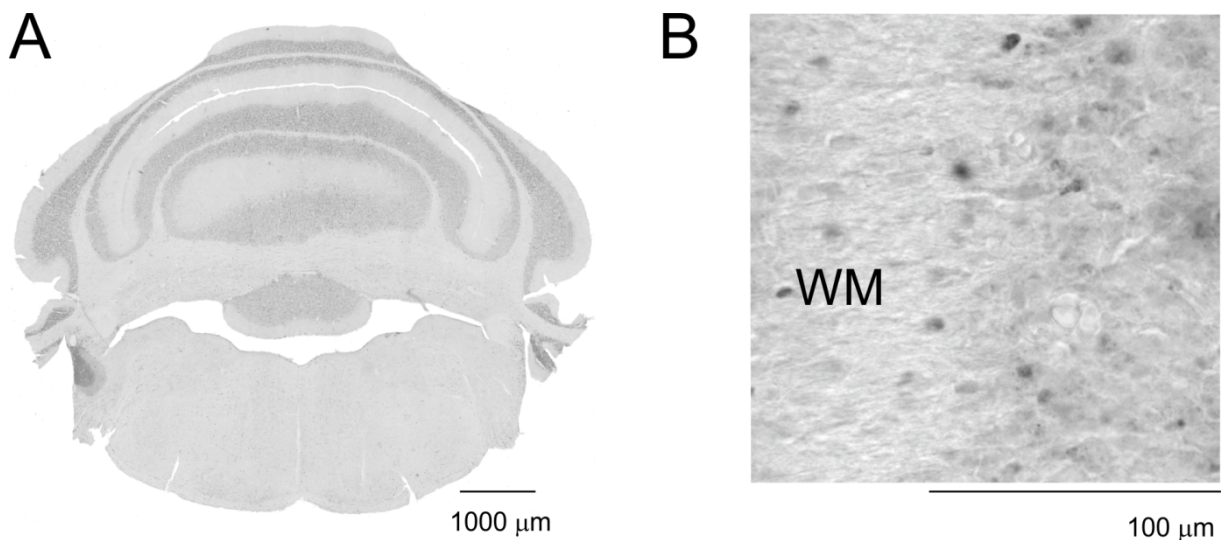


Ryc. 32. Skrawki czołowe mózgu oposa w wieku P19. (A) część przednia, B-E kolejne przekroje w kierunku części tylnej.



Ryc. 33. Skrawki czołowe mózdzku oposa w wieku P19. (A) część przednia; (B) część tylna. Strzałki wskazują na szczeliny oddzielające robaka od półkul mózdzku. arb - drzewo życia

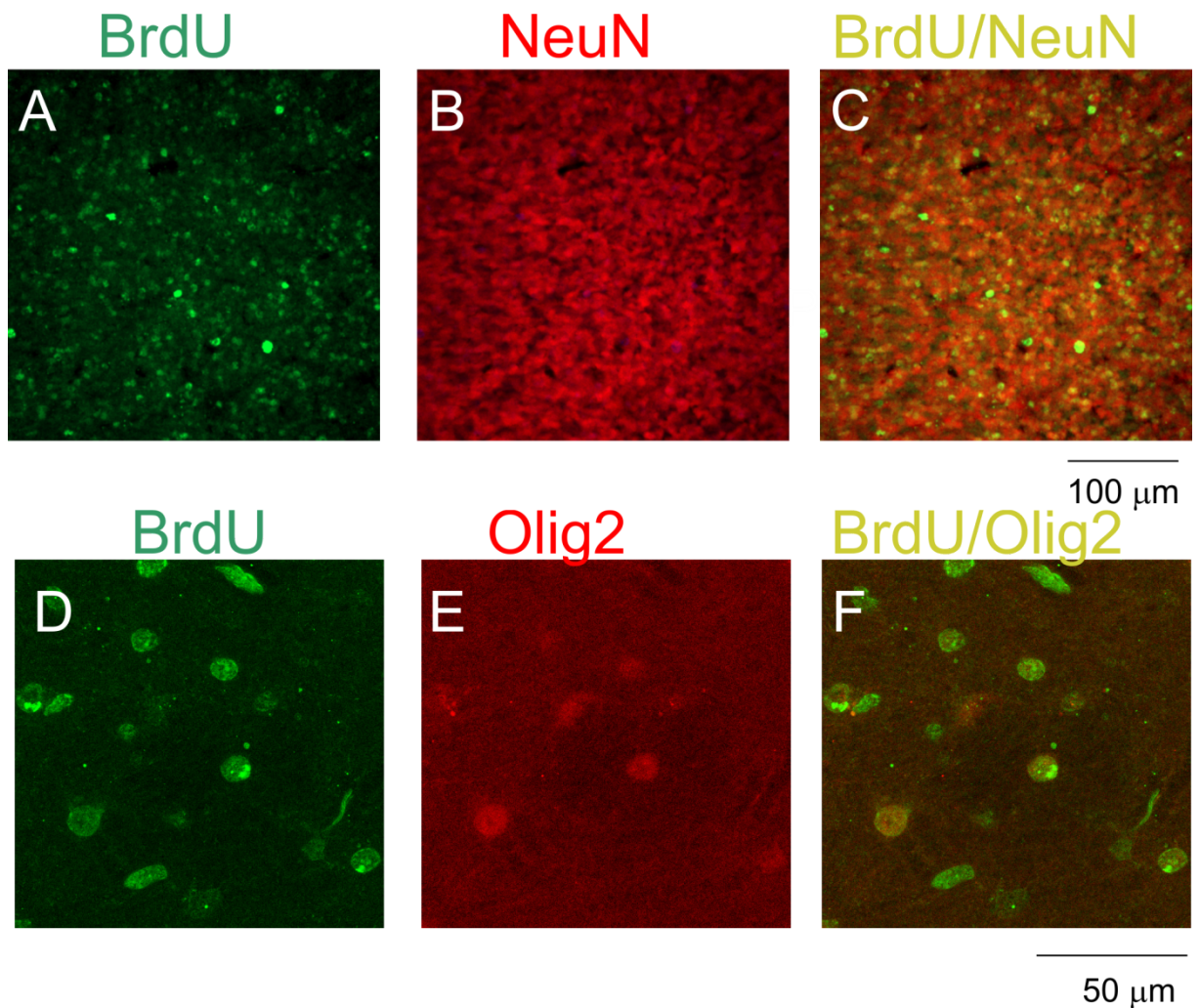
Jednocześnie w tym wieku zaczynają powstawać komórki ziarniste. Liczne komórki zawierające BrdU były widoczne na skrawkach mózgow 3-miesięcznych oposów, które otrzymały iniekcję BrdU w wieku P19 (Ryc. 34).



Ryc. 34. Komórki wyznakowane na obecność BrdU w mózdzku 3-miesięcznego oposa, który otrzymał iniekcję BrdU w wieku P19 (A), powiększony fragment zdjęcia A pokazujący warstwę ziarnistą i istotę białą mózdzku. WM- istota biała.

Podwójne barwienie skrawków mózdków oposów, które otrzymały iniekcję BrdU w wieku P25 wykazało, że większość komórek BrdU-immunopozytywnych w

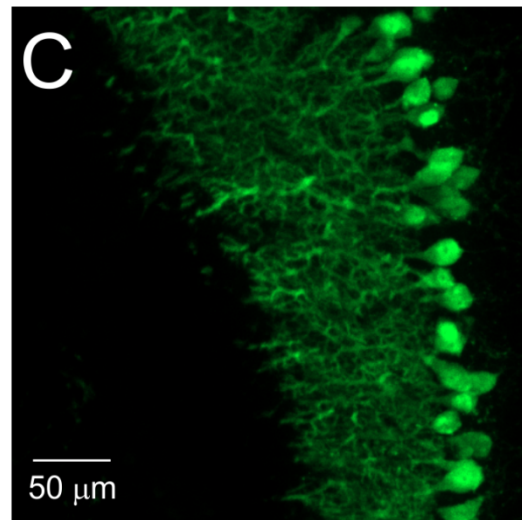
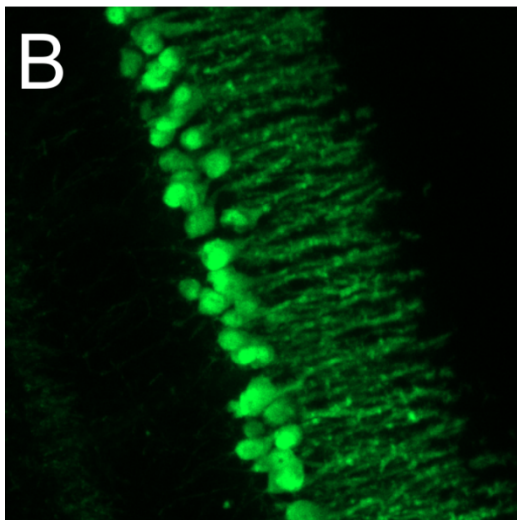
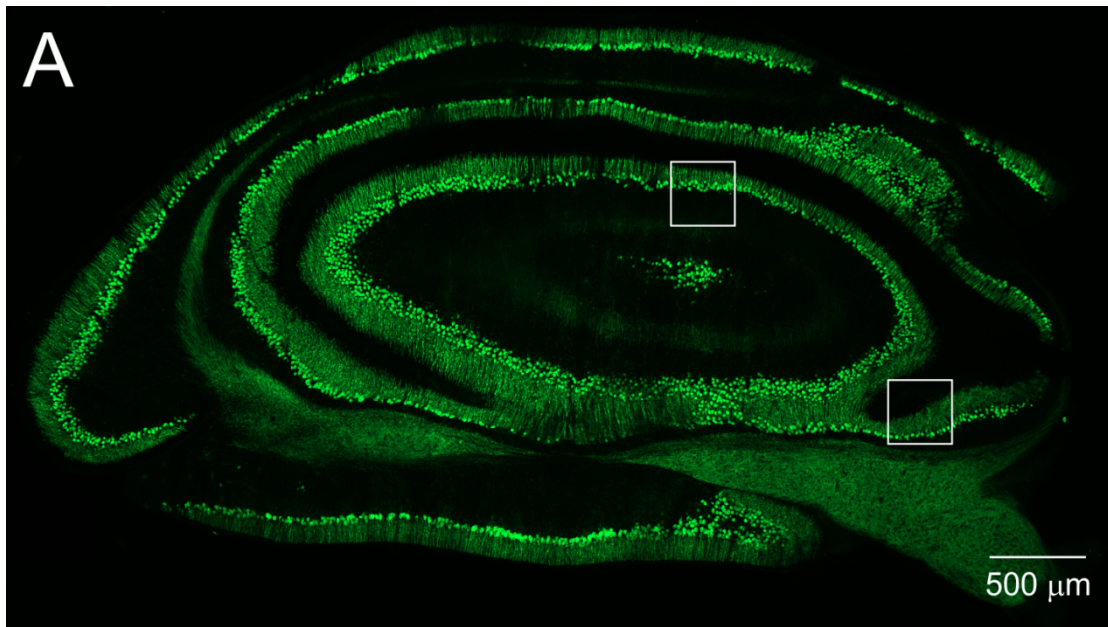
istocie białej zawiera białko Olig2 (Ryc. 35 A, B, C), a komórki BrdU-immunopoztywne znajdujące się w warstwie ziarnistej wykazywały jednocześnie obecność białka neuronalnego NeuN (Ryc. 35 D, E, F).



Ryc. 35. Skrawek mózgu oposa w wieku P90, który otrzymał iniekcję BrdU w wieku P25. A, B, C-komórki warstwy ziarnistej, D, E, F- komórki istoty białej. (A) komórki wyznakowane na obecność BrdU (kolor zielony), (B) komórki wyznakowane na obecność NeuN (kolor czerwony), (C) nałożone zdjęcia obrazujące obecność obu markerów, (D) komórki wyznakowane na obecność BrdU (kolor zielony), (E) komórki wyznakowane na obecność Olig2 (kolor czerwony), (F) nałożone zdjęcia obrazujące obecność obu markerów.

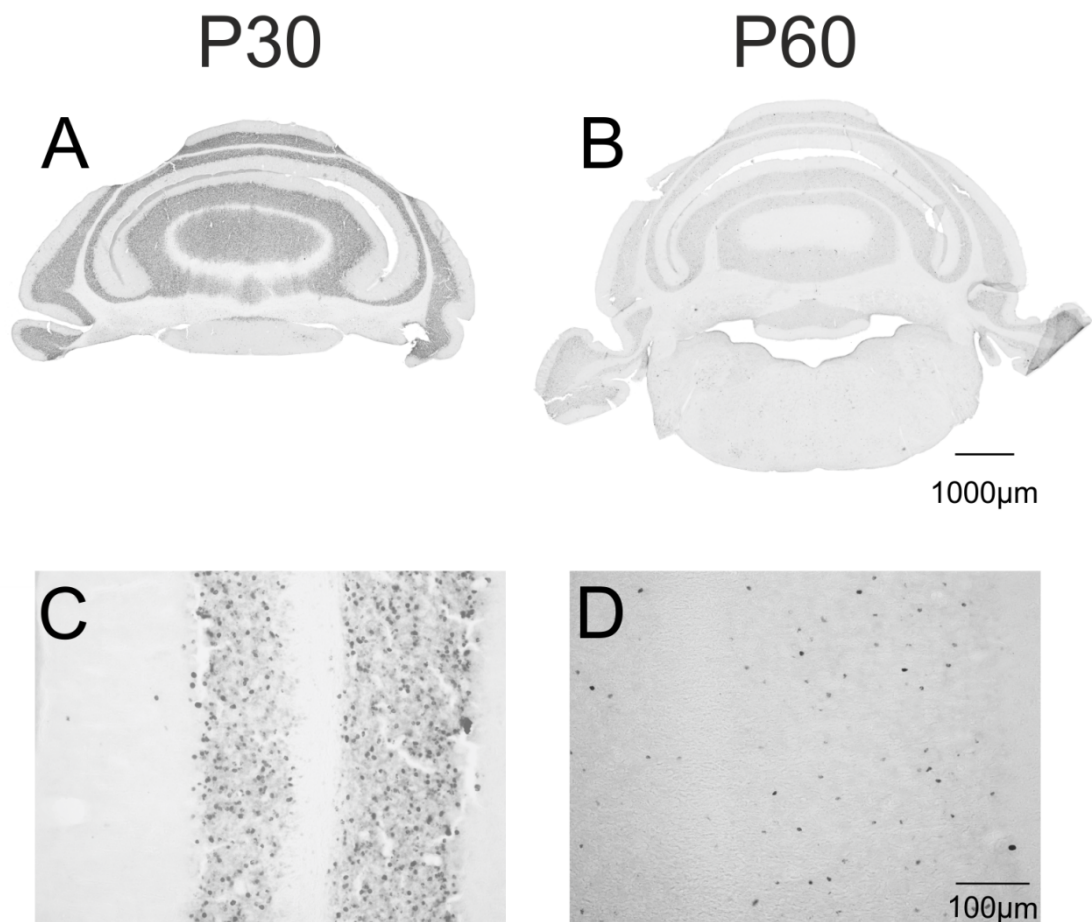
Na czołowym skrawku mózdzku oposa w wieku P35 (Ryc. 36) widać bardzo intensywnie wybarwione neurony Purkinjego z rozłożystymi drzewkami

dendrytycznymi, ułożone w jednym rzędzie, co jest charakterystyczne dla warstwy komórek Purkiniego w mózdzku dorosłych ssaków.



Ryc. 36. Komórki wyznakowane na obecność CB w mózdzku 35-dniowego oposa. Skrawek czołowy mózdzku oposa z wybarwionymi na zielono komórkami Purkiniego (A); (B, C) zdjęcia obszarów zaznaczonych na zdjęciu A w powiększeniu. Skala na zdjęciu C odnosi się do zdjęć B i C.

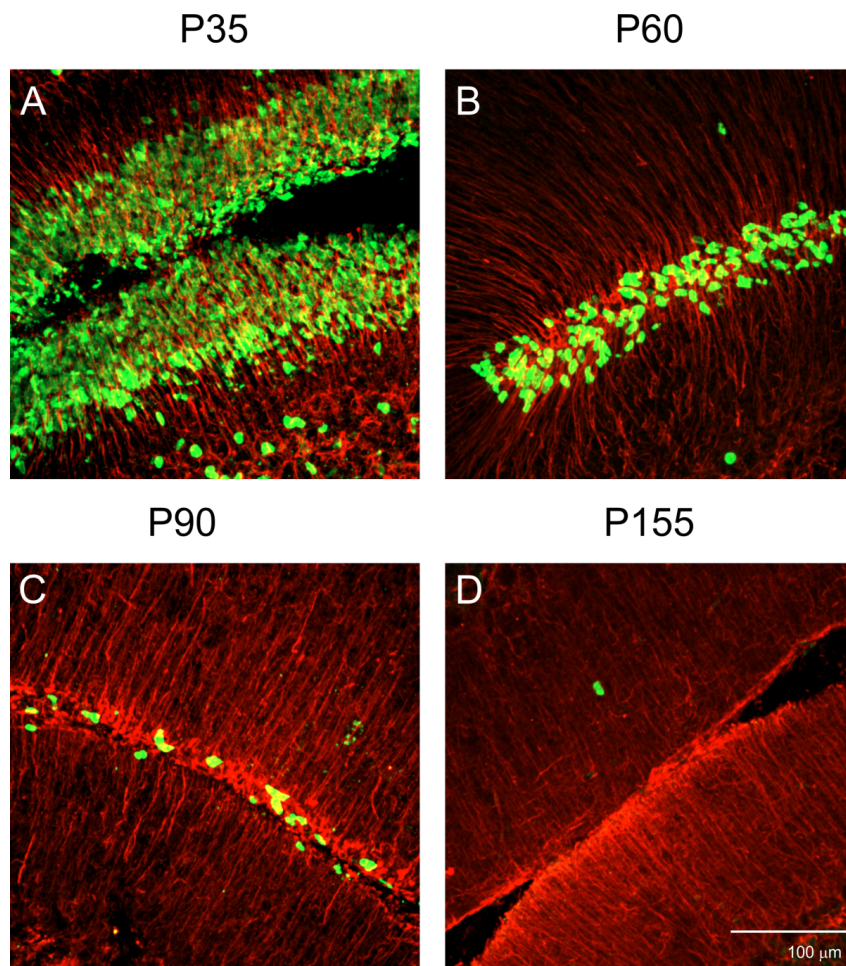
W kolejnych dniach liczba nowopowstałych komórek ziarnistych rosła, osiągając szczyt proliferacji w wieku P25-P30, a nieliczne komórki ziarniste powstawały aż do wieku P60.



Ryc. 37. Wybarwione na BrdU skrawki czołowe mózdków 3-miesięcznych oposów, które otrzymały iniekcję BrdU w wieku P30 (A) lub P60 (B). Poniżej odpowiadające każdemu ze skrawków powiększenia warstwy ziarnistej mózdku (C, D). Skala na zdjęciu B odnosi się do zdjęć A i B, natomiast skala na zdjęciu D odnosi się do zdjęć C i D.

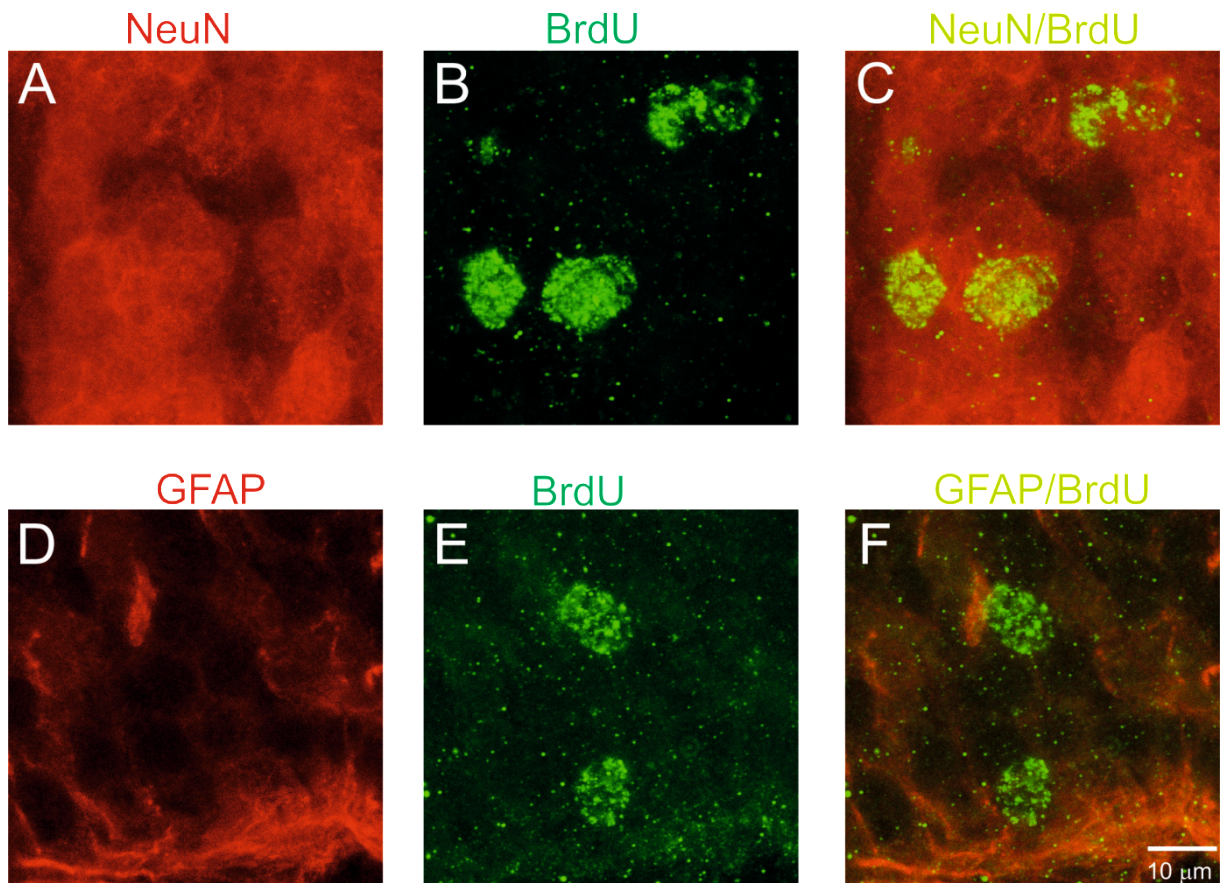
Następnie zbadano proces rozwoju drugorzędowej strefy rozrodczej EGL, w której powstają progenitory komórek ziarnistych. U oposa, EGL zaczyna być widoczna w mózdku w wieku P5, jednak pierwsze komórki ziarniste pojawiają się w niej dopiero w wieku P16. W celu zbadania dynamiki tego procesu opozy otrzymały iniekcję BrdU dwukrotnie z 2-godzinną przerwą w wieku P35, P60, P90 i P155, po czym zostały uśmiercone w dwie godziny po ostatniej iniekcji. Barwienie immunohistochemiczne skrawków mózdku na obecność BrdU potwierdziło, że w tym wieku progenitory komórek ziarnistych nadal się dzieliły. Podwójne barwienie na BrdU i GFAP wykazało,

że komórki gleju Bergmanna zostały wyznakowane przy pomocy markera GFAP (Ryc. 38). W wieku P35 EGL była zbudowana z dość grubej warstwy komórek (Ryc. 38 A), jednak jej grubość stopniowo malała w kolejnych miesiącach (Ryc. 38 B,C). W wieku P155 widoczne były tylko pojedyncze komórki zawierające BrdU (Ryc. 38 D), co wskazuje na wygaśnięcie procesu podziałów komórkowych w EGL. Z niemal wszystkich komórek powstałych z podziałów progenitorów w EGL wykształciły się neurony. Analiza komórek podwójnie wybarwionych na BrdU i NeuN w mózdkach oposów, które otrzymały iniekcję BrdU w wieku P60 i zostały uśmiercone miesiąc później wykazała, że wszystkie powstałe w tym czasie komórki są neuronami (Ryc. 39 A, B, C). Równoległą serię skrawków wybarwiono na BrdU i GFAP (Ryc. 39 D, E, F).



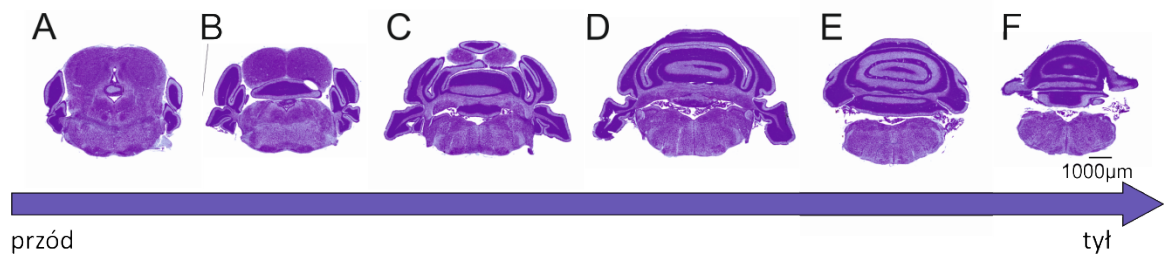
Ryc. 38. Proliferacja komórek w rozwijającym się mózdku oposa. Oposy otrzymały iniekcję BrdU dwukrotnie w wieku P35 (A), P60 (B), P90 (C), P155 (D) z 2-godzinną przerwą i zostały uśmiercone po ostatniej iniekcji. A, B, C, D - zdjęcia skrawków mózdku z widoczną EGL wybarwione immunofluorescencyjnie na BrdU (kolor zielony) i GFAP (kolor czerwony).

W celu zbadania migracji komórek EGL i ich fenotypu, wykonano podwójne barwienie na skrawkach mózgow oposa, który otrzymał iniekcję BrdU w P60 i został uśmiercony miesiąc później. Komórki BrdU-immunopoztywne wykazywały ekspresję NeuN, natomiast nie zauważono kolokalizacji z markerem gleju GFAP.

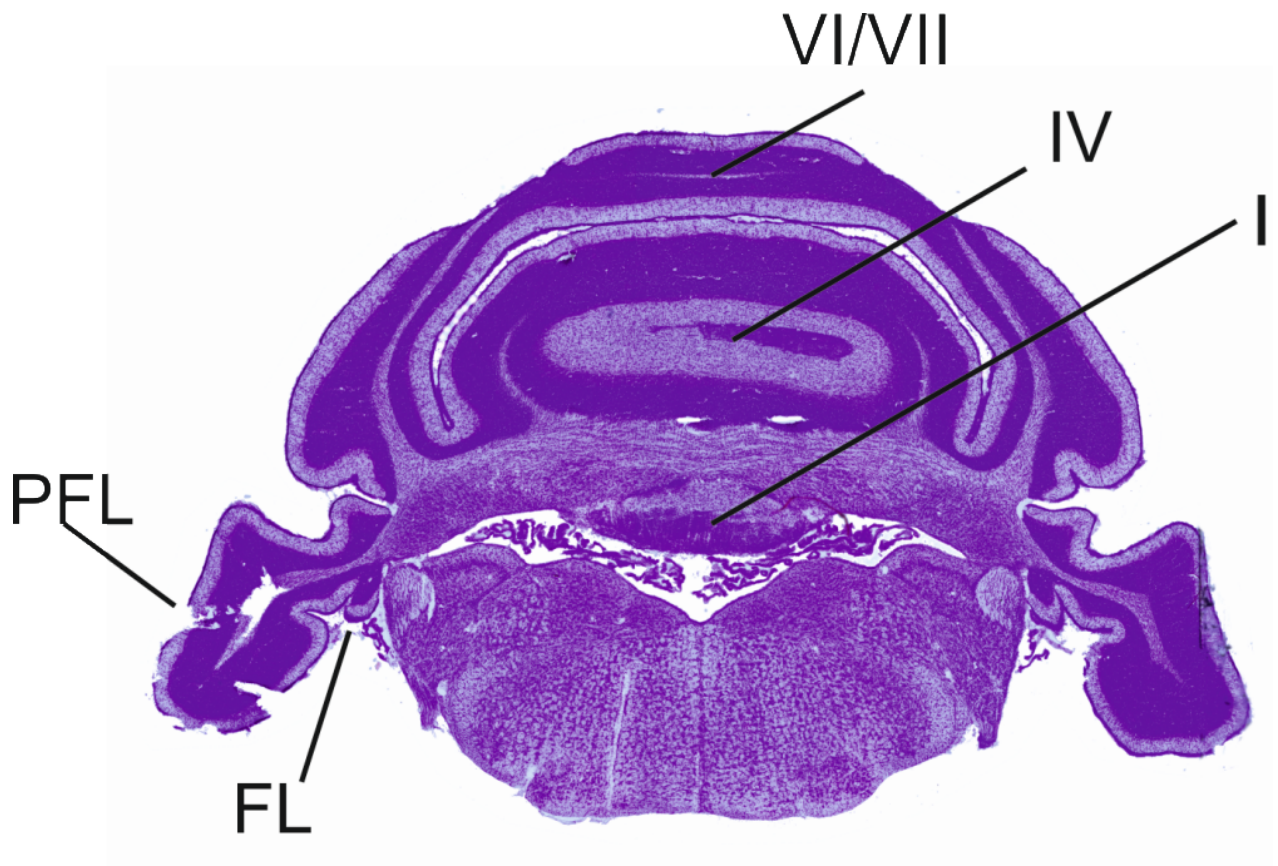


Ryc. 39. Zdjęcia o dużym powiększeniu z mikroskopu konfokalnego pokazujące barwienie na NeuN (kolor czerwony) (A) i BrdU (kolor zielony) (B) oraz nałożone zdjęcia NeuN/BrdU (C) lub GFAP (kolor czerwony) (D) i BrdU (kolor zielony) (E) oraz nałożone zdjęcia GFAP/BrdU (F) wykonane na wybarwionych skrawkach mózdzku 3-miesięcznego oposa, który otrzymał iniekcję BrdU w wieku P60.

W wieku P50 mózdzek oposa ma już wszystkie elementy charakterystyczne dla dojrzałej struktury, różni się tylko wielkością (Ryc. 40). Na skrawkach wybarwionych metodą Nissla można zauważyć w pełni wykształcony płat kłaczkowo-grudkowy, płacik I, IV oraz VI/VII (Ryc. 41).



Ryc. 40. Skrawki czołowe mózgu oposa w wieku P50. Od lewej część przednia i kolejne przekroje w kierunku części tylnej (A-F).



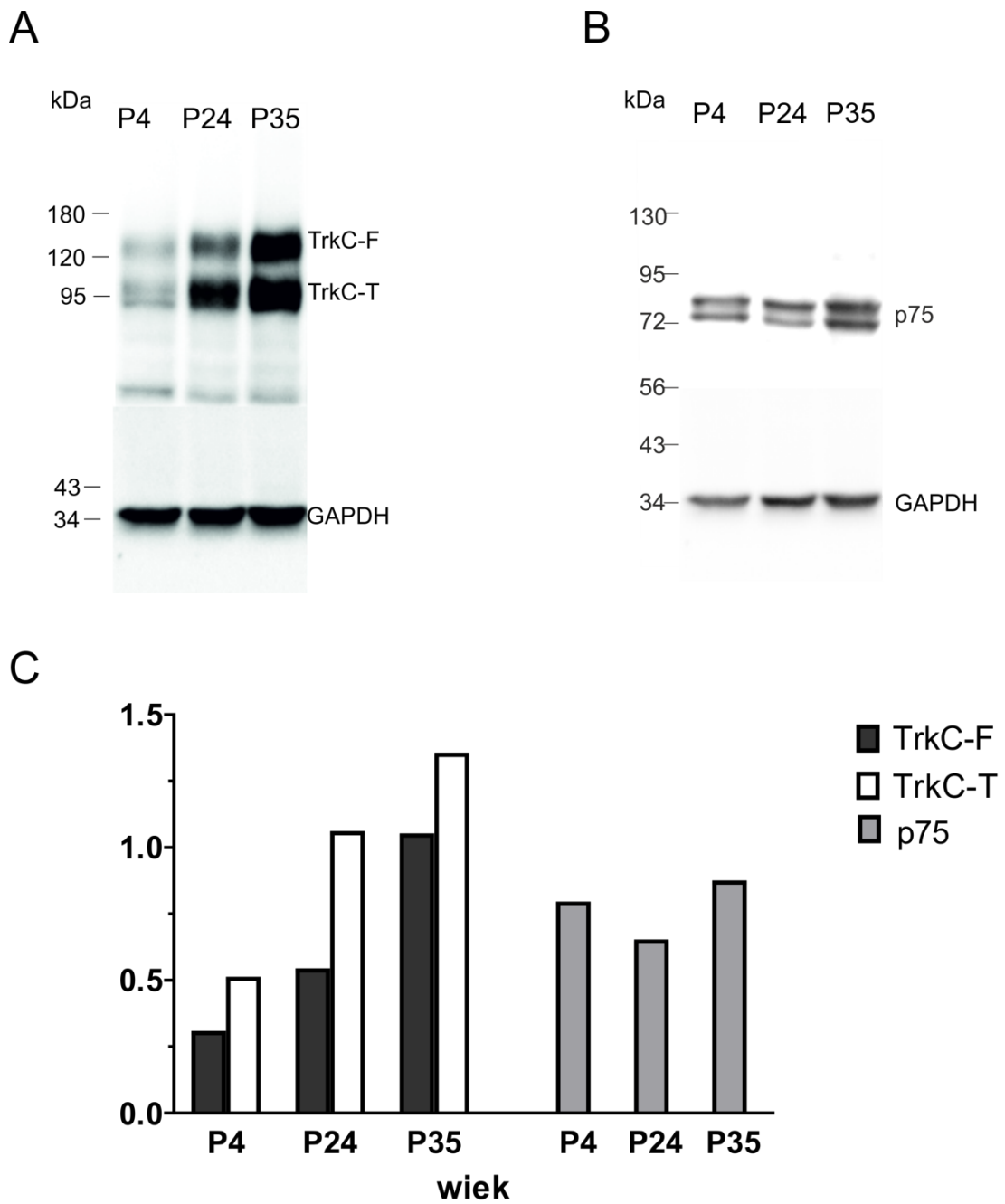
Ryc. 41. Skrawek czołowy środkowej części mózdzku oposa w wieku P50 z zaznaczonymi płacikami.

PFL - przykłączek (łac. paraflocculus), FL - kłączek (łac. flocculus), I-VII oznaczenia płacików.

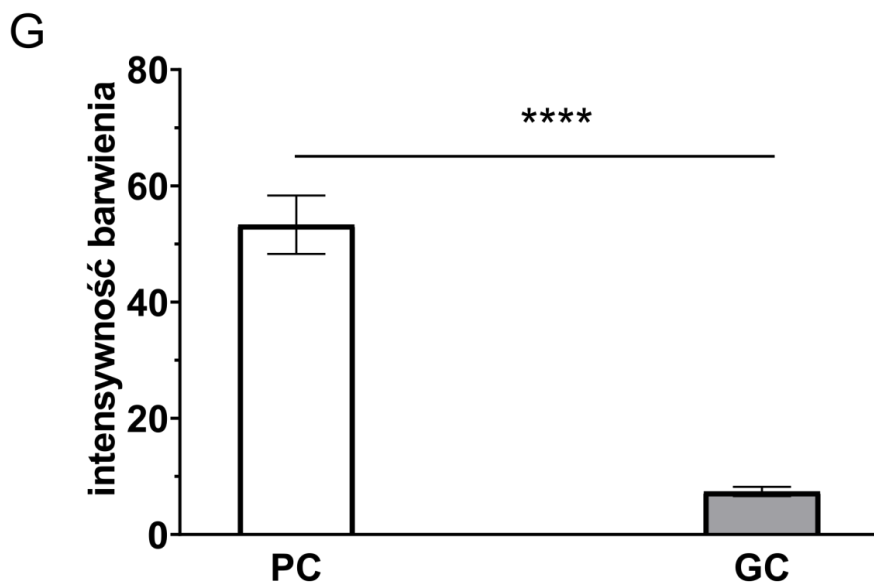
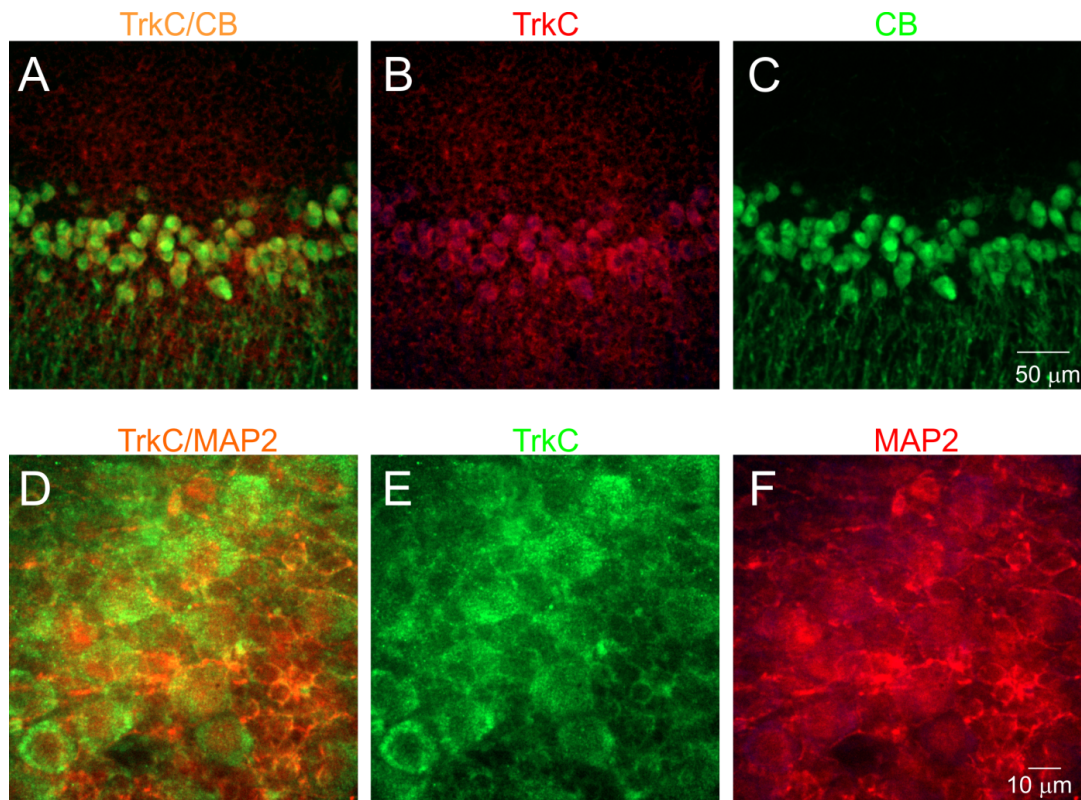
4.4. Wpływ receptorów TrkC na rozwój drzewek dendrytycznych komórek mózdzku

Receptor TrkC jest obecny w mózgach oposów od urodzenia, a prawdopodobnie także wcześniej. Wcześniejsze prace wykazały że w czasie rozwoju mózgu oposa poziom tego białka stopniowo rośnie aż do dnia P35, w którym oposy otwierają oczy (Bartkowska i wsp., 2013). W celu zbadania poziomu ekspresji receptora TrkC w mózdzku rozwijających się oposów przeprowadzono badania metodą Western blot. Na podstawie wyników badań cytoarchitektoniki i molekularnej organizacji mózdzku, opisanych w poprzednim rozdziale, wybrano czas badania tak, by przypadał on na trzy okresy rozwojowe mózdzku: w dniach P4, P24 i P35. W dniu P4 powstają komórki Purkiniego, a na dni P24 i P35 przypadają początkowa faza i maksimum procesu generacji neuronów ziarnistych. Wyniki wykazały, że w dniu P4 poziom białka TrkC w mózdzku oposa był niski (Ryc. 42 A, C). W wieku P24 ilość białka TrkC w mózgu oposa była wyższa, niż w wieku P4, a najwyższa była w wieku P35 (Ryc. 42 A, C). Ponadto, w tych samych dniach zbadano poziom ekspresji receptora p75, który ma słabsze powinowactwo do liganda NT-3. Stwierdziliśmy, że jego ekspresja w mózdzku rozwijających się oposów jest wysoka. Analiza Western blot wykazała podobny wzorzec ekspresji tego białka w mózdzku oposów we wszystkich trzech badanych dniach (Ryc. 42 B, C).

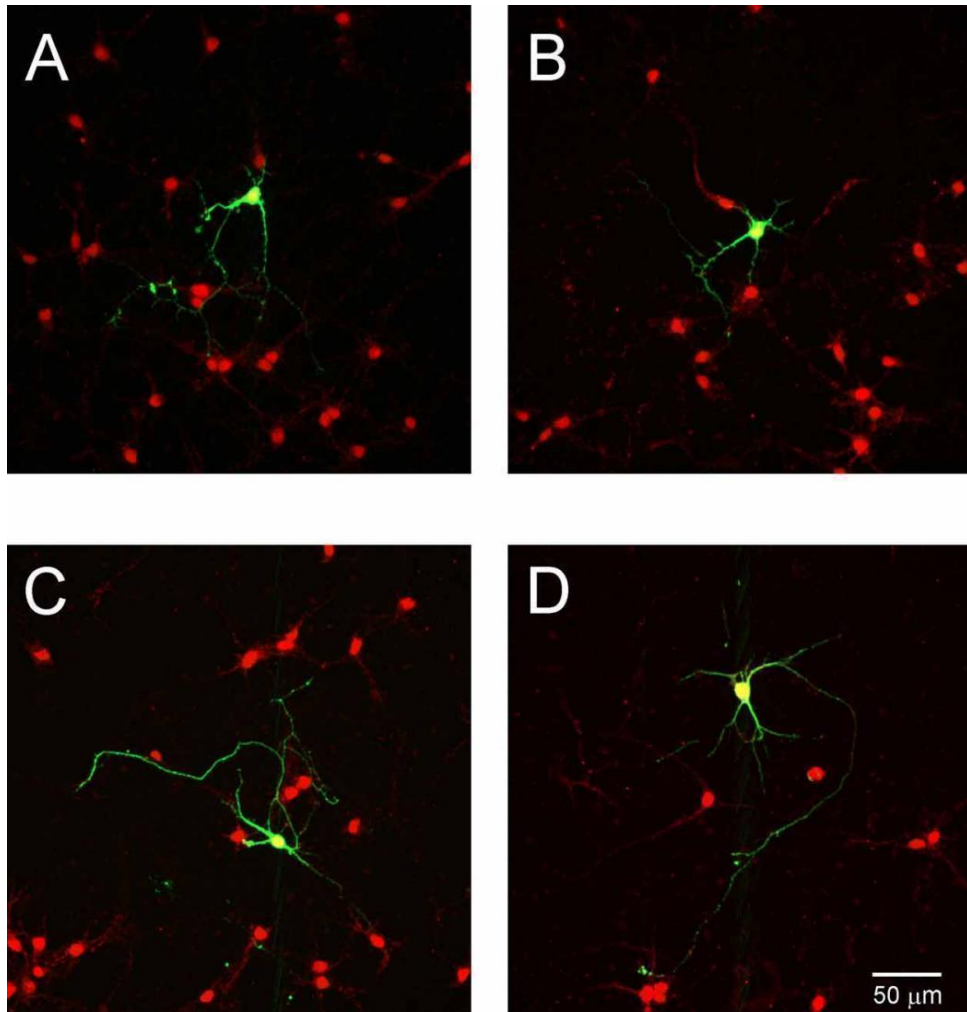
W celu określenia ilości białka TrkC w różnych typach komórek mózdzku, wykonano podwójne barwienie immunohistochemiczne wykorzystując przeciwciała przeciwko TrkC i CB, który jest markerem komórek Purkiniego lub TrkC i MAP2, markera neuronów ziarnistych. TrkC był obecny zarówno w komórkach Purkiniego jak i komórkach ziarnistych, lecz jego ilość była wyraźnie większa w komórkach Purkiniego. Zarówno w ciele komórkowym i dendrytach komórek Purkiniego zawartość białka TrkC była wysoka (Ryc. 43 A-C), natomiast w komórkach ziarnistych receptory były obecne tylko w błonie komórkowej i było ich wyraźnie mniej (Ryc. 43 D-F). Analiza intensywności barwienia na obecność TrkC (Ryc. 43 G) wykazała, że jego poziom jest wyższy w komórkach Purkiniego w porównaniu z komórkami ziarnistymi (53.3 ± 15.88 vs 7.4 ± 2.5) a różnica ta jest statystycznie istotna ($t = 9.028$, $df = 18$, $p < 0.0001$).



Ryc. 42. Poziom białka TrkC i p75 w rozwijającym się mózdzku oposa. Analiza Western blot ukazuje prążki wyznakowane na obecność TrkC (A), p75 (B) i GAPDH w mózdkach oposów w wieku P4, P24 i P35. (C) Analiza ilościowa uzyskanych danych densytometrycznych. TrkC-F, białko TrkC pełnej długości; TrkC-T - skrócona izoforma receptora TrkC.



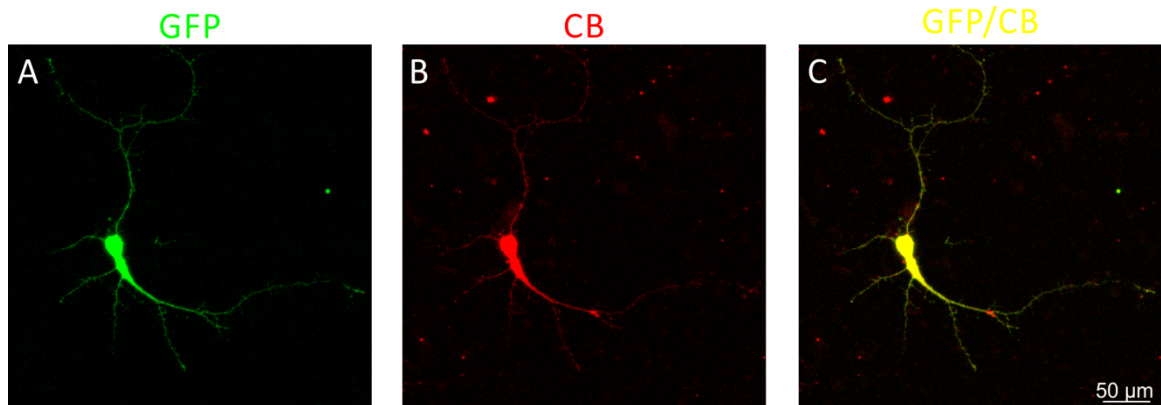
Ryc. 43. (D–F) Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego przedstawiające podwójnie wybarwione skrawki na TrkC/CB, TrkC (kolor czerwony) i CB (kolor zielony) z mózdzku 35-dniowego oposa. (G–I) Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego przedstawiające podwójnie wybarwione skrawki na TrkC/MAP2, TrkC (kolor zielony) i MAP2 (kolor czerwony) z mózdzku 35-dniowego oposa. (J) natężenie barwienia TrkC w komórkach Purkinjego (PC) i komórkach ziarnistych (GC) mózdzku. **** $p < 0.0001$



Ryc. 44. Ekspresja NT-3 w hodowli komórkowej. Reprezentatywne zdjęcia komórek Purkiniego stransfekowanych plazmidem kontrolnym (A, B) i plazmidem z shRNA TrkC (C, D). Komórki zostały wyznakowane na GFP (kolor zielony) i NT-3 (kolor czerwony). Skala widoczna na zdjęciu D odnosi się również do zdjęć (A-D).

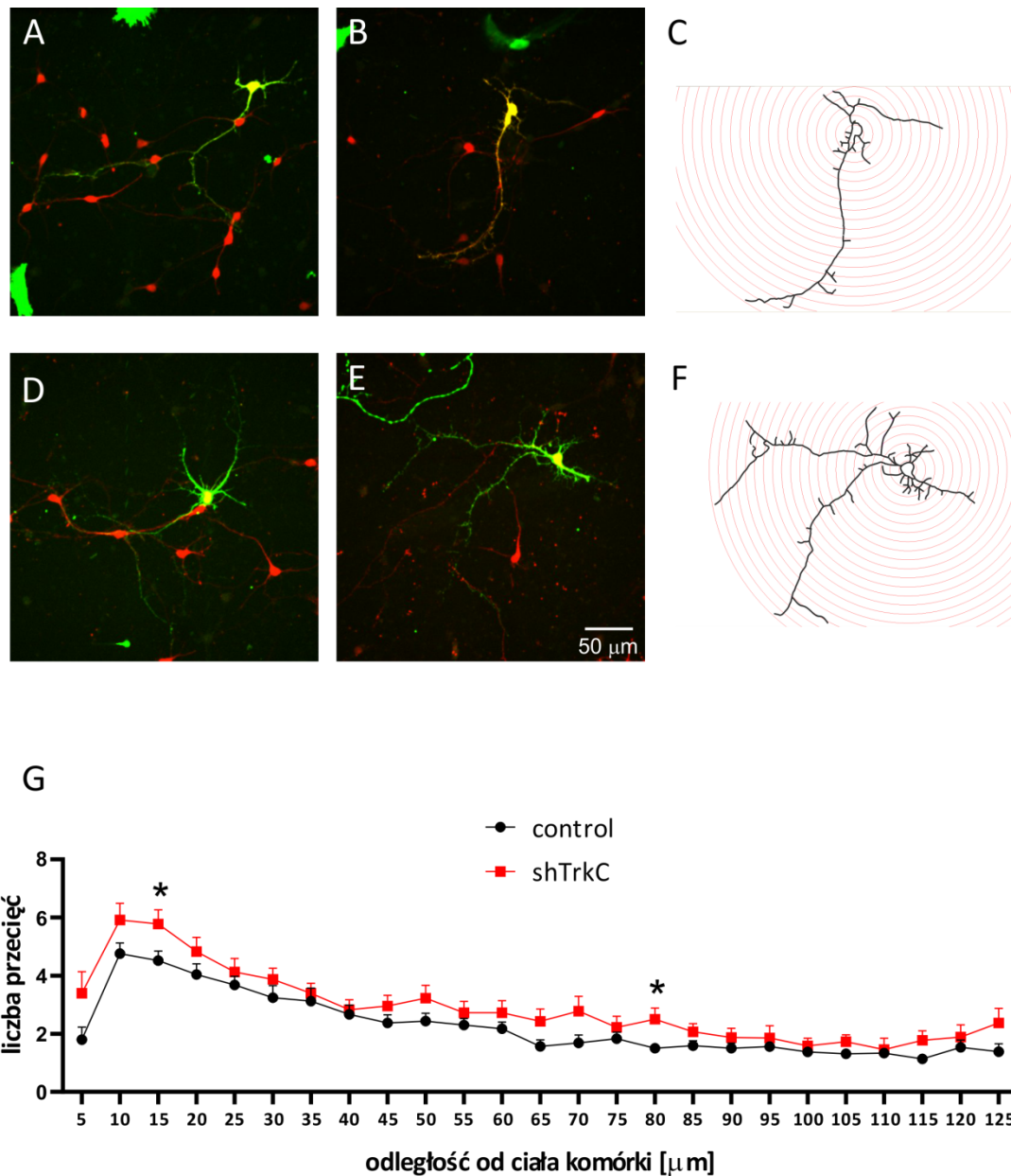
Neurotrofiny wraz ze swoimi receptorami biorą udział w rozwoju wypustek neuronalnych. W celu zbadania wpływu TrkC, receptora dla NT-3, użyto plazmidów shRNA TrkC. Komórki izolowano z mózdków oseków oposa w wieku P3, dysocjowano oraz transfekowano przy pomocy plazmidów shRNA i hodowano przez kolejne dni. Progenitory komórek Purkiniego były hodowane 8-10 dni in vitro (DIV). Po tym czasie hodowle utrwalono i wybarwiono na obecność GFP oraz CB. W analizie uwzględniono jedynie komórki wykazujące podwójne wybarwienie na GFP i CB - marker komórek Purkiniego. Zauważono, że znacznie więcej progenitorów, które dzieliły się i różnicowały w komórki Purkiniego przeżywało do 8 dnia hodowli w porównaniu z 10 dniem. Pomiędzy 7 a 10 DIV ponad połowa stransfekowanych komórek umierała,

zarówno w grupie komórek z plazmidem kontrolnym jak i w grupie z plazmidem wyciszającym ekspresję receptorów TrkC. Podobne obserwacje w hodowlach mysich komórek Purkiniego opisała Tabata i wsp. (2000).



Ryc. 45. Przykładowa komórka z pierwotnej hodowli neuronów mózdkowych, wyizolowanych od 3-dniowych oposów. Komórka Purkiniego stransfekowana plazmidem shRNA kontrolnym, wybarwiona na GFP (A), CB (B) i z widokiem nałożonych obu markerów (C).

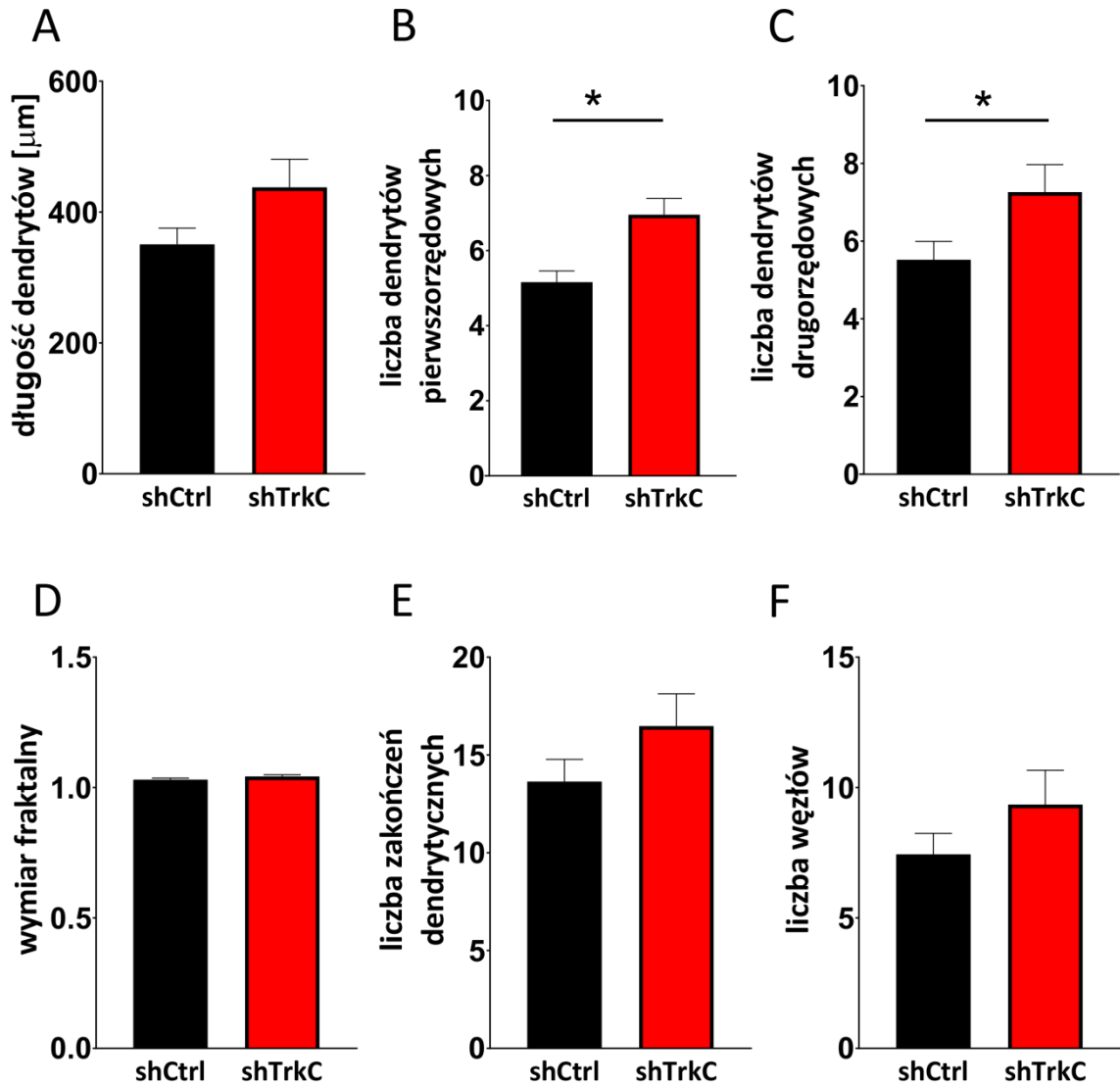
W związku z tym badania przeprowadzono na komórkach hodowanych 8 DIV od posiania i 7 DIV po transfekcji. Przykładowe komórki Purkiniego z rozwiniętym drzewkiem dendrytycznym zostały przedstawione na Ryc. 45 i 46. Zauważono, że komórki Purkiniego stransfekowane shRNA TrkC miały więcej dendrytów (Ryc. 46 D, E) niż komórki stransfekowane plazmidem kontrolnym (Ryc. 46 A, B). Analiza liczby i długości dendrytów komórek Purkiniego została przeprowadzona na neuronach stransfekowanych plazmidem kontrolnym ($n=25$) i plazmidem shRNA TrkC ($n=23$) w programie Neurolucida (Ryc. 46 C, F). Analiza Sholla wykazała, że liczba przecięć dendrytów z okręgiem oddalonym od ciała komórki o 15 µm była większa w neuronach z obniżoną ekspresją receptora TrkC (Ryc. 46 G). Różnica między nimi a neuronami z grupy kontrolnej była istotna statystycznie ($p < 0.02$) i wynikała ze zwiększonej liczby pierwszorzędowych ($t = 3.464$, $df = 46$, $p < 0.001$) i drugorzędowych ($t = 2.078$, $df = 46$, $p < 0.04$) dendrytów (Ryc. 47 B, C).



Ryc. 46. Reprezentatywne zdjęcia komórek Purkiniego stransfekowanych plazmidem kontrolnym (A, B) i plazmidem shRNA TrkC (D, E). Po 8 dniach, komórki utrwalono i wybarwiono na GFP (zielony) i CB (czerwony). Schematyczne przedstawienie analizy Sholla na wybranych komórkach stransfekowanych plazmidem shRNA kontrolnym (C) i shRNA TrkC (F). (G) liczba przecięć wypustek dendrytycznych z określonymi okręgami (wybrano 10- μm odstępy pomiędzy okręgami). Skala na zdjęciu (E) odnosi się również do zdjęć (A-F). * $p < 0.02$.

Ponadto, analiza parametrów związanych z morfologią drzewka dendrytycznego wykazała, że sumaryczna średnia długość dendrytów komórek Purkiniego w grupie neuronów transfekowanych shRNA kontrolnym wynosiła 350.7 μm (± 24.8) a w grupie neuronów transfekowanych shRNA TrkC 437.8 μm (± 42.96) (Ryc. 47 A), jednak różnica

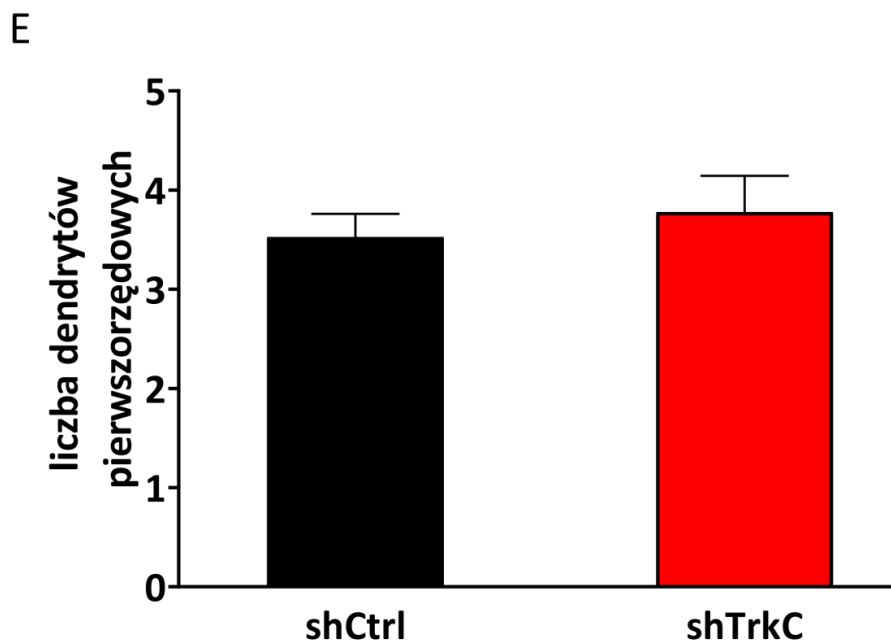
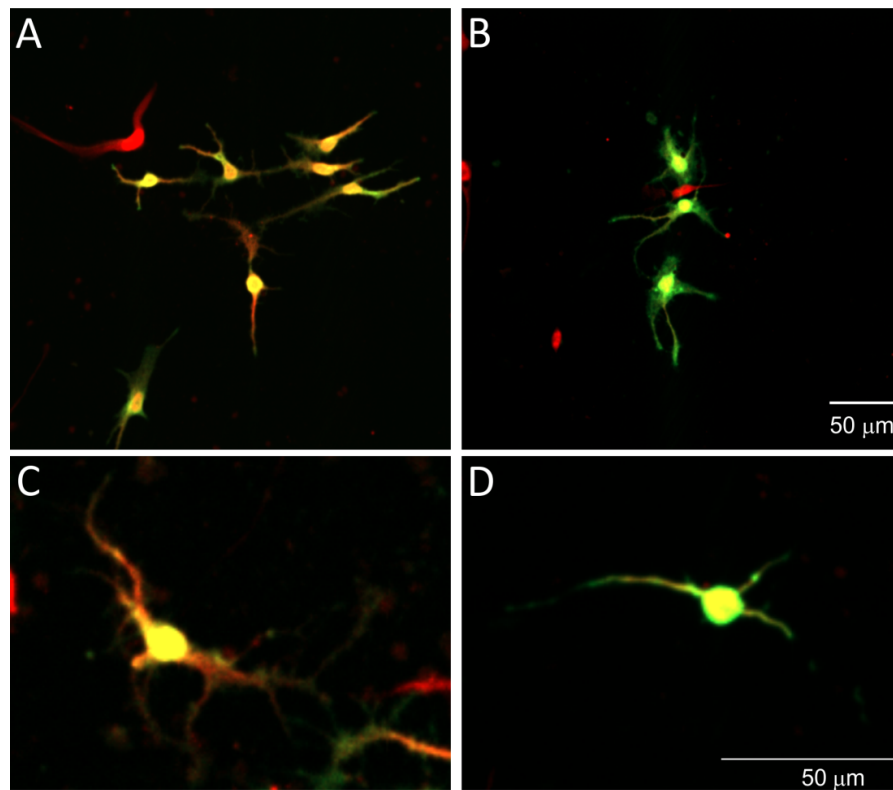
ta nie była statystycznie istotna ($t = 1.789$, $df = 46$, $p > 0.08$). Inne parametry analizy takie jak wymiar fraktalny (Ryc. 47 D), liczba zakończeń dendrytycznych (Ryc. 47 E) i liczba węzłów (Ryc. 47 F) nie wykazały istotnych statystycznie różnic między komórkami w grupie shRNA TrkC a komórkami kontrolnymi.



Ryc. 47. Analiza ilościowa pomiarów związanych z morfologią dendrytów. (A) Średnia sumaryczna długość dendrytów w komórkach Purkinjego. (B, C) Liczba pierwszorzędowych (B) i drugorzędowych (C) wypustek dendrytycznych. (D) Wymiar fraktalny. (E, F) liczba zakończeń dendrytycznych (E) i węzłów (E). W (B) $*p < 0.001$, a w (C) $*p < 0.04$.

W celu określenia czy efekt wyciszenia aktywności TrkC będzie widoczny również na komórkach ziarnistych mózdzku, izolowano komórki z mózdzku oposów w wieku P22 i posiewano je na płytki do hodowli. Następnego dnia komórki były transfekowane plazmidami shTrkC i kontrolnym, identycznie jak w przypadku hodowli

komórek Purkinjego i hodowane 7 DIV (Ryc. 48 A-D). Analiza wypustek dendrytycznych komórek ziarnistych została przeprowadzona na 18-19 neuronach z każdej grupy. Z zebranych danych wynika, że drzewka dendrytyczne komórek ziarnistych w grupie kontrolnej (n=18) i grupie shTrkC (n=19) były identyczne. Liczba dendrytów pierwszego rzędu wynosiła 3.5 (± 0.25) w neuronach ziarnistych stransfekowanych plazmidem kontrolnym i 3.8 (± 0.43) w neuronach ziarnistych stransfekowanych plazmidem shTrkC. Podobnie sumaryczna długość dendrytów każdego z analizowanych neuronów ziarnistych wynosiła średnio około 50 μm w obu grupach. Nie znaleziono statystycznie istotnych różnic w mierzonych parametrach pomiędzy grupą komórek kontrolnych i komórek z zahamowaną aktywnością receptora TrkC (Ryc. 48 E).



Ryc. 48. Reprezentatywne zdjęcia komórek ziarnistych po 7 dniach w hodowli, wyizolowanych z mózdków 22-dniowych oposów. Komórki wyznakowano na GFP (zielony) i MAP2 (czerwony). (A, C) Komórki ziarniste stransfekowane plazmidem z shRNA kontrolnym. (B, D) Komórki ziarniste stransfekowane plazmidem z shRNA TrkC. (E) Analiza ilościowa liczby dendrytów pierwszorzędowych. Skala na zdjęciu (B) odnosi się do zdjęć (A, B), a skala na zdjęciu (D) odnosi się do zdjęć (C, D).

5. Dyskusja

W niniejszej rozprawie doktorskiej zaprezentowałam wyniki badań dotyczących udziału receptorów neurotrofin TrkB i TrkC w wybranych procesach rozwoju kory nowej mózgu i mózdzku ssaków, przeprowadzonych na oposie laboratoryjnym jako gatunku modelowym. W badaniach *in vivo* obniżenie poziomu ekspresji receptorów TrkB lub TrkC w rozwijającej się korze nowej oposa w wieku P7 powodowało zmniejszenie liczby komórek progenitorowych, przy czym procedura ta nie wpływała na proces programowanej śmierci komórek (apoptozy rozwojowej). Ponadto, migracja nowo powstałych komórek kory, w których wyciszono ekspresję TrkC lub TrkB była wyraźnie zaburzona: komórki te migrowały przez warstwę pośrednią kory, lecz zatrzymywały się w warstwie podpłytkowej, nie docierając do SP. Drugą strukturą, której rozwój badałam, był mózdzek oposa. Badania rozwoju tej struktury, w których określano czas powstawania różnych typów jej komórek, przeprowadzono na oposach w różnym wieku, używając metod histologicznych i immunohistochemicznych, markerów molekularnych oraz iniekcji BrdU. Wyniki doświadczeń wykazały, że w ciągu pierwszych pięciu dni po urodzeniu, w zawiązku mózdzku oposa powstają komórki Purkiniego oraz komórki jąder mózdzku (DCN). Największe nasilenie procesu generacji tych neuronów zaobserwowano między trzecim i czwartym dniem. W P19 rozpoczyna się proliferacja komórek ziarnistych, która u oposa trwa długo, przez prawie trzy miesiące. Badania wpływu receptora TrkC na rozwój wybranych typów komórek mózdzku prowadzono *in vitro*, na komórkach Purkiniego wyizolowanych z mózdzków oposów w wieku P3 oraz neuronach ziarnistych pozyskanych z mózdzków oposów w wieku P22. Obniżenie ekspresji TrkC skutkowało zwiększeniem liczby dendrytów i ich rozgałęzień w komórkach Purkiniego, nie wpłynęło natomiast na rozwój dendrytów komórek ziarnistych.

5.1. Wpływ receptorów TrkB i TrkC na rozwój kory mózgu oposa

Opos krótkoogonowy *Monodelphis domestica* jest zwierzęciem laboratoryjnym używanym do różnych badań biologicznych. Od czasu rozpoczęcia jego hodowli do tych celów, opos stał się najpopularniejszym i najlepiej poznanym torbaczem wykorzystywanym jako organizm modelowy (VandeBerg i wsp., 1997). Jego użyteczność w naukach biomedycznych znacznie wzrosła po opublikowaniu pełnej sekwencji jego

genomu (Mikkelsen i wsp., 2007). Ciekawym przystosowaniem procesów rozwojowych do biologii rozrodu torbaczy jest szybkie tempo rozwoju struktur anatomicznych ich twarzoczaszki. Badania Smitha i współpracowników (Smith 1994, 2001, 2006; Vagila i Smith 2003) wykazały, że wzorzec tempa i czasu rozwoju różnych struktur twarzoczaszki torbaczy jest inny, niż u pozostałych owodniowców, w tym ssaków łożyskowych. Te struktury anatomiczne twarzoczaszki, które są ważne dla wykonywania ruchów ssących, rozwijają się u torbaczy na wcześniejszym etapie rozwoju, niż u łożyskowców, ponieważ noworodki torbaczy, choć ogólnie słabiej rozwinięte w momencie porodu, to tuż po urodzeniu muszą trwale przyssać się do sutka matki (Skok, 2018). Większość etapów rozwoju kory mózgu oposa ma miejsce po urodzeniu, jednak sekwencja tych etapów jest bardzo podobna do sekwencji rozwoju kory mózgu ssaków łożyskowych, u których większość tych etapów zachodzi przed urodzeniem (Caviness, 1982).

Podczas formowania się kory nowej ssaków, dzielące się komórki prekursorowe reagują na różne sygnały molekularne, a nieprawidłowy poziom tych cząsteczek sygnalizacyjnych zaburza rozwój. W badaniach prowadzonych na myszach stwierdzono, że około płodowego dnia 11.5 neuronalne komórki progenitorowe znajdujące się w warstwie VZ zaczynają dzielić się asymetrycznie, wytwarzając dwie różne komórki potomne, z których jedna migruje do warstwy MZ stając się wtórnym progenitorem, jednocześnie tworząc rusztowanie dla migrujących neuronów. Komórki te, po raz pierwszy opisane w korze nowej płodu małpy przez Rakica (1972), są znane jako progenitory RGC. Od tego czasu stwierdzono, że progenitory te są głównym źródłem wszystkich komórek korowych, w tym komórek progenitorowych pośrednich IP i astrocytów (Smart 1973; Noctor i wsp. 2001, 2004; Malatesta i wsp. 2003; Haubensak i wsp. 2004). We wczesnym okresie rozwoju mózgu istnieją dwa typy komórek progenitorowych: progenitory wierzchołkowe (RGC), które są generowane w wyniku podziałów zachodzących blisko powierzchni komory i progenitory pośrednie (IP), które są generowane przez RGC w warstwach VZ lub SVZ (Kowalczyk i wsp., 2009; Noctor i wsp., 2004; Haubensak i wsp., 2004). Te typy progenitorów różnią się nie tylko miejscem, w którym powstają, lecz także profilem ekspresji genów (Gotz i wsp. 1998; Malatesta i wsp. 2003; Englund i wsp. 2005; Noctor i wsp. 2008). Dane dotyczące SVZ u oposa *Monodelphis domestica* są kontrowersyjne (Cheung i wsp., 2010; Puzzolo i Mallamaci, 2010). Według danych Puzzolo i Mallamaci (2010) neurony kory nowej oposa są generowane przez prekursorów wierzchołkowe i autorzy ci twierdzą, że u tego ssaka nie ma prekursorów podstawnych rozmieszczonych w SVZ. W przeprowadzonych

przez nas badaniach stwierdzono, że komórki wykazujące ekspresję Tbr2 są zlokalizowane w tej części SVZ, w której ekspresji ulega gen kodujący białko PCNA, marker komórek progenitorowych. Uzyskane przez nas wyniki dowodzą istnienia dzielących się komórek w warstwie SVZ rozwijającej się kory nowej oposa, potwierdzając wcześniejsze doniesienie Cheung i wsp. (2010).

U myszy wykazano, że receptory TrkB i TrkC wpływają na rozwój kory mózgu. Doświadczenia te prowadzono na płodach myszy w wieku E14. Ponadto w badaniach *in vitro* na hodowlach komórkowych wykazano, że aktywność receptorów TrkB i TrkC wpływa na neurogenezę, zwłaszcza na tempo podziałów komórkowych i na przeżywalność neuronów (Bartkowska i wsp., 2013).

Podczas wprowadzania konstruktów do komórek kory oposów, samica z przyczepionymi do sutków oseskami była usypiana przy pomocy anestezji wziewnej, a nieuśpionym 7-dniowym noworodkom wykonywano iniekcje plazmidu wkluwając cienką igłę przez skórę, chrząstkę czaszki i korę półkuli do komory bocznej mózgu, po czym wykonywano elektroporację. Do moich badań dostosowałam metodę elektroporacji z powodzeniem stosowaną *in utero* u ssaków łożyskowych (Bartkowska i wsp., 2007). Po raz pierwszy użyli jej Fukuchi-Shimogori i Grove (2001) w celu wprowadzenia konstruktów genów do kory nowej 12-dniowych płodów myszy. Autorzy ci wkluwali cienkie elektrody w półkulę mózgu, przy czym miejsce wkłucia elektrody dodatkowo było kluczowe dla skutecznej transfekcji komórek w wybranym obszarze kory. W późniejszych badaniach metodę nieco zmieniono (obecnie stosuje się płaskie elektrody przykładane do skóry czaszki), jednak i po tej zmianie obszar kory mózgu, który zostaje poddany skutecznej elektroporacji zależy od umiejscowienia elektrod (Bai i wsp., 2003; Borrell i wsp., 2005). Metoda ta była używana w badaniach na gryzoniach laboratoryjnych takich jak myszy (Takahashi i wsp., 2002) i szczury (LoTurco i wsp., 2009), a także na fretkach (Matsumoto i wsp., 2017) i torbaczach australijskich - grubogonikach (Paolino i wsp., 2018). Do naszych badań zmodyfikowano nieco parametry elektroporacji stosowanej wcześniej na płodach myszy (Bartkowska i wsp., 2007). Najbardziej skuteczne w przypadku 7-dniowych noworodków oposów okazały się stosunkowo krótkie (50 ms) impulsy o wysokim napięciu (50 V) powtarzane siedmiokrotnie. Doświadczenia przedstawione w tej pracy były prowadzone na takim etapie rozwoju kory nowej oposów, że widoczne były wszystkie jej warstwy rozrodcze oraz głębokie warstwy kory nowej mózgu. Wybrano siódmy dzień po urodzeniu (P7), w którym rozwój kory mózgu oposa jest na podobnym etapie co u 12-dniowego płodu

myszy (Saunders i wsp., 1989; Bartkowska i wsp., 2013). U oposa w wieku P9, dwa dni po iniekcji plazmidem kontrolnym shRNA, wszystkie komórki GFP+ znajdowały się w warstwie VZ/SVZ, a po 5 dniach od iniekcji (w wieku P12), większość tych komórek migrowała do wyższych warstw rozwijającej się kory przez warstwy rozrodcze, dochodząc do warstwy płytki korowej. Tak więc, w ciągu pierwszych pięciu dni po urodzeniu (do 20-go dnia od zapłodnienia) u oposa wykształcają się jedynie głębokie warstwy kory, natomiast u noworodka myszy w tym samym wieku (od zapłodnienia) widoczne są już wszystkie warstwy kory (Caviness i wsp., 1982). To stosunkowo wolne tempo rozwoju kory nowej oposa ułatwia rozróżnianie jego faz i badanie wpływu receptorów TrkB i TrkC na procesy neurogenezy, szczególnie na podziały komórek, ich migracje i przeżywalność.

Wyniki opisanych tu moich doświadczeń pokazują, że obniżenie ekspresji genów kodujących receptory TrkB lub TrkC na wczesnych etapach rozwoju kory nowej oposa powoduje obniżenie liczby progenitorów RGCs. Nasza hipoteza zakładała, że receptory TrkB i TrkC mogą różnie wpływać na różne typy komórek progenitorowych. Do badań fenotypu progenitorów użyto trzech markerów: GFAP, PCNA i pHH3. W korze nowej oposa białko pHH3 występuje w formie ufosforylowanej podczas fazy M cyklu komórkowego, kiedy to jest białkiem histonu H3 ufosforylowanego na serynie 10 (Wei i wsp., 1999). U oposa jest ono obecne tylko w niewielkiej puli komórek umiejscowionych w VZ (Cheung i wsp., 2010). Podobne komórki można znaleźć w mózgu myszy na wczesnych etapach rozwoju (Ka i wsp., 2014). W badaniach prowadzonych na myszach w podobnym wieku dla oposa uzyskano odmienne wyniki (Sessa i wsp., 2008). W przodomózgowiu myszy fenotypu dzikiego w dniu E15.5 komórki wykazujące ekspresję pHH3 są obecne zarówno w VZ jak i SVZ, natomiast u myszy pozbawionych ekspresji *Tbr2*, komórki pHH3+ występują głównie w VZ, co wskazuje na to, że podstawne komórki progenitorowe wykazują ekspresję genu kodującego białko pHH3. Z kolei *Tbr2* ulega ekspresji w komórkach podstawnych IP rozwijającej się kory nowej, jednak mutanty myszy pozbawione ekspresji genu *tbr2* nie przeżywają, zatem funkcje tego genu podczas rozwoju kory nie były poznane. Badania Sessa i wsp. (2008) wykazały, że u mutantów myszy pozbawionych ekspresji *Tbr2* w rozwijającym się przodomózgowiu liczba komórek IP jest zmniejszona. Ponadto, wczesna utrata komórek IP prowadzi do zmniejszenia powierzchni kory i grubości jej warstw (Sessa i wsp., 2008), a myszy pozbawione ekspresji *Tbr2* w OUN mają obniżoną liczbę neuronów w górnych warstwach kory, co jest skutkiem zmniejszenia liczby komórek IP w SVZ kiedy rozwija

się kora mózgu (Arnold i wsp., 2008). Powyższe wyniki są zgodne z wynikami badań wykazujących udział komórek IP w tworzeniu wszystkich warstw kory, zarówno dolnych jak i górnych (Tarabykin i wsp., 2001; Vasistha i wsp., 2015).

Podobnie jak u myszy, białko PCNA występuje w komórkach progenitorowych kory mózgu rozwijających się oposów (Haubensak i wsp., 2004). Komórki wykazujące ekspresję PCNA są obecne w VZ i SVZ zarówno w populacji progenitorów podstawnych i wierzchołkowych. Obniżenie aktywności TrkB lub TrkC w rozwijającej się korze oposa miało bardzo podobny skutek: powodowało dwukrotne zmniejszenie liczby dzielących się komórek. Z kolei pula komórek podwójnie zabarwionych na obecność GFP/GFAP była większa niż komórek GFP+/pHH3+ i GFP+/PCNA+, jednak niezależnie od zahamowania aktywności receptorów TrkB czy też TrkC, liczba komórek progenitorowych kory nowej GFP+/GFAP+ zmieniała się podobnie. Podsumowując, zarówno zahamowanie aktywności receptorów TrkB i TrkC wpływa na proliferację komórek progenitorowych. Podwójne barwienia wykorzystujące markery dla trzech typów komórek progenitorowych nie wykazały różnic między wpływem zahamowania aktywności receptorów TrkB i TrkC. Na podstawie tych wyników można wnioskować że aktywność receptorów TrkB i TrkC ma podobny wpływ na różne typy komórek progenitorowych w rozwijające się korze nowej oposa.

Poprzednie badania przeprowadzone w naszej pracowni wykazały, że obniżenie poziomu aktywności receptorów TrkB lub TrkC w pierwotnych hodowlach neuronów korowych oposa nasila wymieranie (apoptozę) komórek (Bartkowska i wsp., 2013; Bartkowska i wsp., 2014). Ponadto, badania na hodowlach pierwotnych neuronów korowych myszy wykazały, że zablokowanie endogennych ligandów receptorów TrkB i TrkC (BDNF i NT-3) za pomocą przeciwciał wzmagało wymieranie komórek progenitorowych w korze nowej aż o 50% (Barnabe-Heider i Miller, 2003). Dane z kilku badań wskazują, że receptor TrkC pośredniczy w procesie programowanej śmierci komórek (apoptozy), zależnej od aktywności kaspaz, która jest ważnym mechanizmem rozwoju (Tauszig-Delamasure i wsp., 2007; Nikolettou i wsp., 2010; Ichim i wsp., 2013; Ménard i wsp., 2018). Receptory tego typu miały by monitorować obecność lub brak określonych czynników troficznych, będących jego ligandami. W badaniach *in vitro* prowadzonych na liniach komórkowych HEK293T oraz unieśmiertelnionych neuroblastach opuszki węchowej 13.S.24 stwierdzono, że receptor TrkC wykazuje aktywność proapoptotyczną zależną od przecięcia przez kaspazę jego domeny wewnątrzkomórkowej, co skutkuje uwolnieniem peptydu, który uruchamia proces

apoptozy. Peptyd ten aktywuje śmierć komórki poprzez mechanizm zależny od kaspazy 9 (Tauszig-Delamasure i wsp., 2007). Inne badania, przeprowadzone przez Nikolettou i wsp. (2010), wykazały, że jedynie aktywność receptorów TrkC (ale nie TrkB) może indukować śmierć rozwijających się neuronów zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. W związku z tymi doniesieniami sprawdzono, czy obniżenie liczby progenitorów korowych *in vivo* u oposa jest związane z nasileniem programowanej śmierci komórek (apoptozy rozwojowej). W tym celu użyto przeciwciała rozpoznającego kaspazę 3, która jest obecna w komórkach wymierających w procesie apoptozy. W korze nowej oposów z grup, które otrzymały plazmid shRNA TrkB lub shRNA TrkC jedynie pojedyncze komórki były wybarwione na kaspazę 3, co sugeruje że obniżenie aktywności receptora TrkB lub TrkC nie było związane z przeżywalnością komórek progenitorowych. Oprócz tego barwienie jąder komórek w rozwijającej się korze przy użyciu DAPI nie wykazało umierających komórek, w których widoczna byłaby skondensowana chromatyna. Najprawdopodobniej jest to związane z tym, że w początkowych okresach powstawania kory mózgowej u oposa jest zbyt wcześnie na konkurencyjne oddziaływania między komórkami, które prowadzą do apoptozy. Podczas badanego okresu rozwoju mózgu oposa powstają jedynie głębokie warstwy kory nowej, a liczba podziałów progenitorów nie jest wystarczająca do utworzenia wszystkich warstw kory. Wobec tego można uważać, że w tak wczesnym okresie rozwoju kory mózgu mechanizm odpowiedzialny za rozwojowe wymieranie komórek nie został jeszcze uruchomiony.

Poprzednie badania przeprowadzone w naszej pracowni wykazały, że odpowiedni poziom białek TrkB i TrkC w rozwijającym się mózgu oposa jest niezbędny do prawidłowego rozwoju korowych komórek progenitorowych (Bartkowska i wsp., 2013; Bartkowska i wsp., 2014). Migracja komórek i ich umiejscowienie w odpowiedniej strukturze są ważnymi mechanizmami rozwoju układu nerwowego. Badania przedstawione w tej rozprawie wykazały, że obniżenie poziomu ekspresji receptorów TrkB i TrkC zaburza proces migracji neuronów tworzących głębokie warstwy kory nowej oposa. U myszy, w okresie rozpoczęcia formowania się warstw kory (E11.5-E13), receptory TrkB i TrkC występują w migrujących neuronach VZ i SVZ (Maisonpierre i wsp., 1990). W badaniach przeprowadzonych przez Puehringera i wsp. (2013) wykazano, że receptory TrkB i TrkC były aktywowane w trakcie wczesnych stadiów rozwoju kory, a ich aktywność nie była zaburzona u myszy pozbawionych BDNF (Ernfors i wsp., 1994) lub NT-3 (Ernfors i wsp., 1994). Aktywacja EGFR przez EGF w izolowanych komórkach prekursorowych kory skutkowałą silną transaktywacją receptorów TrkB i TrkC.

Zaobserwowana transaktywacja jest odpowiedzialna za wpływ EGF na przemieszczanie się wczesnych neuronów korowych z VZ i SVZ w kierunku tworzących się warstw kory. Wyniki te wskazują na to, że rola receptorów TrkB i TrkC w nowo powstałych neuronach rozwijającej się kory, nie ogranicza się do reakcji na obecność BDNF i NT-3, ale receptory te pośredniczą w integracji innych, dodatkowych sygnałów (Puehringer i wsp., 2013).

W celu prześledzenia procesu migracji komórek w rozwijającej się korze, przeanalizowano lokalizację progenitorów, które uległy transfekcji w wyniku iniekcji plazmidów do warstwy VZ. W ciągu pięciu dni od iniekcji plazmidu kontrolnego niektóre komórki GFP+ dotarły do najbardziej zewnętrznej warstwy kory położonej w pobliżu MZ i pozostały tam, natomiast w grupach z obniżoną ekspresją receptorów TrkB lub TrkC, duża liczba komórek GFP-immunopozytywnych pozostała w IZ. Uzyskane wyniki sugerują, że zahamowanie aktywności receptorów TrkB lub TrkC powoduje zaburzenie migracji komórek i zatrzymanie ich w warstwie IZ. Dowodzi to, że ścieżki sygnalizacyjne powiązane z receptorami TrkB lub TrkC wraz z innymi sygnałami molekularnymi kontrolują ostatni etap migracji neuronów w tworzącej się korze i pozwalają na dotarcie przez nie do ostatecznej lokalizacji. Inne badania wykorzystujące transplantację neuronów korowych pochodzących od myszy pozbawionych ekspresji TrkB do kory myszy dzikich wykazały, że neurony te mają opóźnioną migrację i różnicowanie (Gates i wsp., 2000). Aktywacja receptora TrkB i uruchomienie ścieżki sygnałowej kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K) pełni istotną rolę w kontrolowaniu migracji interneuronów w rozwijającej się korze myszy (Polleux i wsp., 2002). W badaniach Medina i wsp. (2004) neuroblasty korowe myszy pozbawionych ekspresji TrkB w OUN przejawiają nieprawidłowości w procesie migracji i różnicowania a miejsca wiązania dla Shc i PLC γ oraz aktywacja ścieżek Ras/MAPK i PI3K/AKT okazały się niezbędne dla prawidłowego przemieszczania się i różnicowania neuronów podczas rozwoju kory. Ponadto, BDNF wpływa na proces migracji progenitorów regulując ich ostateczną lokalizację w mysiej korze poprzez obniżenie ekspresji Pax6, pełniącego kluczową rolę w przemieszczaniu się komórek progenitorowych w warstwach VZ i SVZ (Fukumitsu i wsp., 2006). Podobnie jak TrkB, również TrkC może hamować proces migracji nowo powstałych neuronów. Pokazano to w korze słuchowej myszy (Hossai i wsp., 2008). Wyniki powyższych badań pokazują, że aktywacja receptora TrkB przez aktywację PI3K jest jednym z powszechnie występujących mechanizmów

odpowiedzialnych za oba rodzaje przemieszczania się komórek migrujących radialnie, czyli poprzecznie do powierzchni kory (Nadarajah i wsp., 2001).

Niedawne badania Parthasarathy i wsp. (2021) wykazały, że izoforma receptora TrkC-T1, która nie ma zdolności katalitycznej, wpływa na podziały progenitorów w taki sposób, że komórki progenitorowe tworzące głębokie warstwy kory zaczynają generować neurony typowe dla warstw górnych. Podwyższony poziom TrkC-T1 we wczesnych komórkach progenitorowych wspiera powstawanie neuronów głębokich warstw kory, a obniżenie poziomu tego receptora powoduje, że powstają z nich neurony górnych warstw kory. Ponadto wykazano, że TrkC-T1 reguluje ten proces w interakcji z białkiem adaptorowym ShcA. TrkC-T1 zapobiega fosforylacji Shc i hamuje aktywację ścieżki sygnalizacyjnej MAPK/Erk.

Z kolei Ohtaka-Maruyama i wsp. (2018) opisują tworzenie się synaps przez neurony warstwy podpłytkowej, które regulują proces migracji podczas rozwoju kory nowej. Warstwa podpłytkowa u oposa *Monodelphis domestica* pojawia się w wieku P4 a jej neurony wykazują ekspresję charakterystycznych dla tej warstwy markerów takich jak Ctgf i Moxd1 (Molnár i wsp. 1998; Wang i wsp., 2011). W badaniach przedstawionych w niniejszej rozprawie nie zdefiniowano obszaru podpłytkowego przy pomocy specyficznego markera. Zamiast tego, warstwy SP zostały zidentyfikowane przy użyciu charakterystycznych znaczników molekularnych. Neurony w obrębie płytki korowej wybarwione zostały na Tle4, co pozwoliło na ustalenie górnej granicy SP, natomiast dolna granica została wyznakowana poprzez użycie HuD, którego ekspresję wykazują specyficzne wielobiegunowe neurony o charakterystycznej morfologii, znajdujące się w IZ. Obniżenie ekspresji receptorów TrkB lub TrkC powoduje zatrzymanie się migrujących neuronów w IZ co uniemożliwia im dotarcie do warstwy podpłytkowej. Uzyskane wyniki sugerują, że transmisja synaptyczna neuronów SP regulowana poprzez receptory TrkB i TrkC prowadzi do zahamowania migracji neuronów.

Podsumowując, przeprowadzone badania wykazały, że elektroporacja jest efektywną metodą wprowadzania wybranych genów do kory oposa. Hamowanie aktywności receptorów TrkB i TrkC w rozwijającej się korze nowej oposa zaburza proces dzielenia się komórek progenitorowych, z tym że TrkC powoduje bardziej wyraźne zmiany tempa podziałów komórek. Ponadto, sygnalizacja związana z receptorami Trk jest kluczowa dla migracji komórek progenitorowych rozwijającej się kory oposa. Te wyniki wykazują dość interesujący mechanizm migracji, nieopisany do tej pory. W okresie gdy są generowane neurony głębokich warstw kory proces migracji jest dzielony

na dwie fazy. W pierwszej fazie komórki po podziałach migrują w obrębie warstwy SVZ i receptory neurotrofin TrkB lub TrkC nie są zaangażowane do tego procesu. Natomiast w drugiej fazie komórki przechodzą przez warstwę podpłytkową żeby docierać do płytki korowej. Ta faza jest kontrolowana przez receptory TrkB i TrkC. Hamowanie aktywności tych receptorów wpływa na proces przemieszczania się neuronów i zatrzymuje ich ruch pod warstwą podpłytkową.

5.2. Porównania budowy i cyklu rozwoju mózdzku u różnych rzędów ssaków

Mózdzek ssaków składa się z położonego pośrodkowo robaka, leżących po obu jego stronach półkul i bocznie w stosunku do półkul położonych płatów kłaczkowatych. Robak i płaty kłaczkowate występują u wszystkich kręgowców, natomiast półkule mózdzku jedynie u ssaków (Voogd i Glickstein, 1998). Są obecne już u ssaków jajorodnych, musiały więc powstać na początku ewolucji tej gromady kręgowców, ponad 300 milionów lat temu, jako jedna z kilku najważniejszych zmian anatomicznych jakie są wynikiem tej ewolucji obok wykształcenia włosów, stałocieplności, karmienia mlekiem, modyfikacji łuku zuchwy tak, że powstał ciąg trzech kosteczek słuchowych (u płazów, gadów i ptaków jest tylko jedna) oraz wykształcenia kory nowej mózgu. Najważniejszą funkcją mózdzku jest koordynacja i kontrola ruchów ciała, uczestniczy on jednak również w tworzeniu pamięci motorycznej (umiejętności wykonywania serii skoordynowanych ruchów prowadzących do założonego skutku) (Manto i wsp., 2012).

U ludzi mózdzek zaczyna rozwijać się na wczesnym etapie neurogenezy, podczas pierwszego trymestru ciąży, a jego dojrzewanie trwa do drugiego roku życia (van Essen i wsp., 2020). Ponieważ wyniki badań nad rozwojem ludzkiego mózgu są ograniczone ze względów etycznych i metodologicznych, większość wiedzy na temat molekularnych mechanizmów powstawania mózdzku ssaków pochodzi z eksperymentów przeprowadzanych na modelach zwierzęcych, głównie gryzoniach takich jak szczury i myszy.

Badania Smaers i wsp. (2018) wykazały, że u naczelnych, delfinów oraz fok półkule mózdzku są nieproporcjonalnie duże w stosunku do całej struktury. Postulowano, że te rzędy zwierząt miały wspólnego przodka, charakteryzującego się dużymi rozmiarami półkul mózdzku, lecz badania genetyczne tego nie potwierdzają (Smaers i wsp., 2018). Obecnie przypuszcza się że taka modyfikacja mózdzku powstała w toku ewolucji w związku z rozwojem u tych zwierząt komunikacji za pomocą różnego rodzaju

nawoływań i wokalizacji. Zgodnie z tym, wyniki badań przeprowadzanych na ludziach pokazują, że półkule mózdzku są aktywne w trakcie zadań związanych z werbalną pamięcią operacyjną (Desmond i Fiez, 1998). Poza tym, u waleni i płetwonogich część mózdzku zawierająca grzbietową i brzuszную część płata przykłaczkowego jest proporcjonalnie bardzo duża. Sultan i Glickstein (2007) postawili hipotezę, że struktura ta jest zaangażowana w wyższe funkcje poznawcze, nie związane bezpośrednio z kontrolą ruchów. Jednak bocznie leżący płat kłaczkowaty jest analizatorem informacji z układu równowagi, a dokładna analiza tej informacji jest szczególnie ważna dla kręgowców poruszających się w trzech wymiarach (wodnych i latających), przyczyna proporcjonalnie dużych rozmiarów tej struktury u niektórych rzędów ssaków może być inna, niż postulują autorzy.

Porównując mózdzki 10 gatunków torbaczy z mózdzkami łożyskowców (z wyłączeniem naczelnych) o tej samej masie struktury, wykazano, że liczba neuronów tworzących mózdzek jest stosunkowo wyższa u torbaczy. Autorzy sugerują, że gdy obecnie żyjące torbacze oddzieliły się od łożyskowców, to w toku ewolucji zachowały charakterystykę budowy mózdzku pierwotnych ssaków, większą liczbę i mniejsze rozmiarami neurony, co koreluje z mniejszą złożonością ich drzewek dendrytycznych (Santos i wsp. 2017).

Pomimo wielu podobieństw w ogólnej, komórkowej budowie mózdzku u ssaków, nawet u przedstawicieli jednego rzędu obserwuje się pewne różnice. Podstawowy schemat budowy mózdzku szynszyli i wiewiórek, przedstawicieli rzędu gryzoni, wykazuje pewne modyfikacje (Sultan i Braitenberg, 1993). Zarówno wiewiórki drzewne jak i szynszyle potrafią doskonale poruszać się w środowisku wymagającym bardzo dużej precyzji koordynacji ruchów (szynszyle żyją na stromych rumowiskach skalnych i poruszają się skacząc na tylnych nogach), jednak budowa ich mózdzków różni się znacząco (Sultan i Glickstein, 2007). Może to wynikać z odmiennych strategii ruchowych wykorzystywanych do wspinania się. Szynszyle prowadzą nocny tryb życia, mają niewielki zakres widzenia obuocznego i lepiej wykształcone kończyny tylne. W trakcie wspinaczki bardziej polegają na informacjach niewizualnych pochodzących z układu przedsionkowego i propriocepcji z kończyn i tułowia. Natomiast wiewiórki są zwierzętami aktywnymi w ciągu dnia, z dobrze rozwiniętym układem wzrokowym i kończynami przednimi, co pozwala na wizualną kontrolę przemieszczania się i chwytania. Wiewiórki wspinają się podobnie jak naczelne, które również są aktywne w ciągu dnia i w mózdzkach których też obserwuje się podobne powiększenie płata tylnego

mózdzku (Sultan i Glickstein, 2007). Przypuszcza się że takie analogiczne powiększenie płata tylnego jest związane z analogią funkcji, to jest rozwojem umiejętności wspinania się i używania kończyn przednich.

Mózdzki noworodków u różnych gatunków ssaków są na bardzo różnym etapie rozwoju. Badania Sánchez-Villagra i Sultan (2002) dotyczyły określenia fazy rozwojowej mózdzku po urodzeniu, u 23 gatunków ssaków z których większość była reprezentantami gryzoni. Opisali oni jedynie warstwy kory mózdzku i wykazali, że przedstawiciele badanych gatunków są silnie zróżnicowani pod względem zaawansowania rozwoju tej struktury zaraz po narodzinach. Wśród opisanych gatunków, ryjówka aksamitna (*Sorex araneus*), z rzędu owadożernych (Lipotyphla), rodzi się z najmniej dojrzałym mózdzkiem, natomiast noworodki gatunków, u których oseski po urodzeniu mają otwarte oczy mają bardziej rozwinięte mózdzki. Autorzy badali również mózdzek 6-dniowego *Monodelphis domestica*, i uznali jego mózdzek za niedojrzały.

Wcześniej zbadano rozwój mózdzku innego torbacza, dydelfa wirginijskiego (*Didelphis virginiana*), który również jest opossem, stosując badania histologiczne na skrawkach barwionych metodą Nissla (Laxson i King, 1983). U noworodków tego gatunku mózdzek jest na bardzo wczesnym etapie rozwoju, EGL jest widoczne dopiero w wieku P5, a pierwsze komórki Purkiniego są obecne w P12. U tego gatunku oposa, rozwój mózdzku i jego dojrzewanie są powolne, trwają do 77-go dnia po urodzeniu. Dla porównania, ten sam poziom rozwoju mózdzku szczur osiąga w wieku P25 (Korneliussen, 1968). Należy wziąć pod uwagę, że wyniki te były opublikowane w latach 80-tych XX wieku, kiedy dostępnych było niewiele metod badania rozwoju struktur mózgu.

W kolejnych latach zidentyfikowano markery molekularne, specyficzne dla określonych neuronów mózdzku i ich progenitorów. Badania Ben-Arie i wsp. (1997) wykazały, że gen *math1* jest kluczowy dla tworzenia komórek ziarnistych mózdzku, a u myszy pozbawionych tego genu nie wykształca się EGL. Ponadto, generacja przynajmniej części neuronów tworzących jądra mózdzku (DCN) również jest zależna od *math1* (Wang i wsp., 2005). Morales i Hatten (2006) przedstawili wzory ekspresji szeregu czynników transkrypcyjnych charakterystycznych dla progenitorów neuronów mózdzkowych. Ju i wsp. (2016) wykazali, że podczas powstawania i różnicowania komórek Purkiniego białko Olig2 ulega przejściowej ekspresji w VZ mózdzku. Obecność Olig2 została potwierdzona zarówno w komórkach progenitorowych pochodzących z VZ jak i w młodych neuronach. Badania immunohistochemiczne na skrawkach mózgu

szczura wykazały, że białko CB jest powszechnie obecne w szczurzych komórkach Purkiniego (Garcia-Segura i wsp., 1984). CB, która jest wiarygodnym markerem komórek Purkiniego została użyta do badań komórek Purkiniego wielu gatunków ssaków wyższych, w tym kotów (Sahin i Hockfield, 1990), myszy (Frantz i Tobin, 1994), naczelnych (Fortin i wsp., 1998) i człowieka (Flace i wsp., 2014). Przedstawione w tej rozprawie wyniki badań wykazały, że komórki Purkiniego u oposa *Monodelphis domestica* również wykazują ekspresję CB. Ponadto, eksperymenty z użyciem iniekcji BrdU pozwoliły ustalić, że proliferacja prowadząca do generacji komórek Purkiniego zaczyna się zaraz po urodzeniu. U nowonarodzonych oposów, które otrzymały iniekcję BrdU, podwójne barwienie na CB i BrdU pokazało że wszystkie komórki w zawiązku mózdzku miały kolokalizację dwóch markerów, co wskazywało, że komórki te są neuronami Purkiniego. Proces ich powstawania trwał aż do P5, a więc ponad dwukrotnie dłużej niż u myszy. U myszy, okres powstawania komórek Purkiniego przypada na E10.5 – E.12.5 (Hashimoto i Mikoshiba, 2003). Przedstawione w rozprawie wyniki wskazują też, że generacja komórek DCN zaczyna się u oposa po urodzeniu, w dniu P1. U gryzoni w DCN występują dwa rodzaje komórek: glutaminianergiczne i GABAergiczne (Fink i wsp., 2006; Zhang i Goldman, 1996). Neurony glutaminianergiczne DCN są głównymi komórkami przekazującymi informacje poza mózdzek (Voogd, 2014). W trakcie rozwoju, neurony jąder mózdzku DCN wykazują ekspresję Pax6, Tbr1 oraz Olig2 (Fink i wsp., 2006; Seto i wsp., 2014; Ju i wsp., 2016). Olig2 należy do rodziny czynników transkrypcyjnych bHLH i jest zaangażowany w regulację różnicowania różnych typów komórek. Początkowo stwierdzono, że jest czynnikiem różnicowania się oligodendrocytów (Lu i wsp., 2000; Zhou i wsp., 2000). Późniejsze badania Takebayashi i wsp. (2002) wykazały, że Olig2 wpływa również na rozwój neuronów. Uzyskane wyniki potwierdzają, że u oposa Tbr1 i Olig2 są przejściowo obecne w neuronach DCN. Wzór ekspresji Tbr1 i Olig2 na wczesnych etapach embriogenezy jest bardzo podobny. W dniu P11 wysoki poziom tych białek obserwowano w komórkach DCN. W przeciwieństwie do myszy (Ju i wsp., 2016), u oposa nie wykazano ekspresji Olig2 w komórkach Purkiniego.

U oposa proces generacji komórek Purkiniego trwa około pięciu dni. Największe nasilenie proliferacji tych komórek ma miejsce w dniu P3, natomiast w ostatnim dniu proliferacji (P5) powstają już tylko nieliczne komórki tego typu. W tym czasie progenitory wywodzące się z VZ przemieszczają się, tworząc drugorzędową strefę rozrodczą – EGL. Pomimo, że pierwsze progenitory tworzące EGL powstają w P5, komórki te nie są aktywne przed P16, jak wykazano w naszych doświadczeniach z

użyciem iniekcji BrdU. Komórki progenitorowe EGL mózdzku oposa dzielą się od dnia P16 do P90, generując ogromną liczbę komórek ziarnistych. Podczas tej fazy rozwoju, wiązki gleju Bergmanna są wyraźnie widoczne jako komórki zawierające białko GFAP. U oposa EGL zanika, gdy zwierzęta są w wieku pięciu miesięcy, natomiast u myszy wszystkie komórki ziarniste mózdzku są tworzone w ciągu pierwszych dwóch tygodni po urodzeniu (Komuro i wsp., 2001; Marzban i wsp., 2014).

5.3. Wpływ neurotrofin na rozwój mózdzku

Neurotrofiny mają istotny wpływ na morfologię neuronów w rozwijającym się mózgu. BDNF, NT-3 i ich receptory TrkB i TrkC, są kluczowe dla rozwoju neuronów mózdzku. U transgenicznych myszy pozbawionych BDNF pojawiają się liczne nieprawidłowości w rozwoju mózdzku, takie jak wzmożona umieralność komórek ziarnistych, krótsze dendryty w komórkach Purkiniego czy nieprawidłowości w tworzeniu warstwowej struktury kory mózdzku i jego fałdowaniu (Schwartz i wsp., 1997). U myszy z mutacją NT-3^{-/-} obserwowano również zaburzenia w rozwoju mózdzku, a mianowicie brak zakrętu VII i wzrost umieralności komórek warstwy ziarnistej (Bates i wsp., 1999).

Badania na hodowlach komórkowych *in vitro* wykazały, że młode komórki ziarniste reagują na BDNF, natomiast dojrzałe komórki reagują na NT-3 (Segal i wsp., 1995). Ponadto, wyniki doświadczeń opisanych w powyższej publikacji wykazały, że BDNF jest niezbędny do wzrostu aksonów komórek ziarnistych mózdzku. Morrison i Mason (1998) badali wpływ neurotrofin na rozwój komórek Purkiniego wykorzystując hodowle komórkowe zawierające komórki ziarniste i komórki Purkiniego. Wykazali oni, że w komórkach Purkiniego wyizolowanych z mózdzku myszy i hodowanych w monokulturze nie rozwinęły się drzewka dendrytyczne. Dodawanie BDNF do pożywki hodowli komórkowej zwiększało przeżywalność tych neuronów, natomiast nie miało wpływu na rozwój ich dendrytów. Prawidłowy rozwój drzewek dendrytycznych komórek Purkiniego był obserwowany jedynie gdy komórki Purkiniego były hodowane razem z komórkami ziarnistymi czyli w środowisku zawierającym BDNF. Zahamowanie ekspresji receptora TrkB w rozwijającym się mózdzku powoduje, że komórki Purkiniego pozostają połączone z wieloma włóknami pnącymi po etapie rozwoju, na którym zachodzi eliminacja nadprogramowych synaps (Bosman i wsp., 2006; Johnson i wsp., 2007). BDNF produkowane przez komórki Purkiniego, działając wstecznie przez receptory

TrkB, ułatwia rozwojową eliminację połączeń synaptycznych z włóknami pnącymi (Choo i wsp., 2017).

Receptory TrkB i TrkC są strukturalnie podobne, jednak każdy z tych receptorów wpływa na inne procesy rozwoju komórek mózdzku. Badania *in vivo* na myszach pokazały, że receptor TrkC reguluje wzrost dendrytów komórek Purkiniego przez aktywację ścieżki sygnalizacyjnej NT-3/TrkC (Joo i wsp., 2014). Ponadto, zaobserwowano, że NT-3 wpływa na rozwój drzewek dendrytycznych neuronów Purkiniego u szczurów z niedoczynnością tarczycy (Neveu i Arenas 1996). Ekspresja mRNA NT-3 ma miejsce w komórkach ziarnistych, ale nie w komórkach Purkiniego, które z kolei wykazują ekspresję receptora TrkC, specyficznego dla NT-3 (Lindholm i wsp., 1993) i otrzymują sygnały wejściowe z aksonów komórek ziarnistych. Tak więc, NT-3 pochodzący z komórek ziarnistych, aksony których tworzą synapsy na komórkach Purkiniego, wpływa na ich rozwój. Taki wpływ komórek ziarnistych na rozwój komórek Purkiniego został stwierdzony w doświadczeniach przeprowadzonych przez Joo i wsp. (2014). Po usunięciu NT-3 z komórek ziarnistych mózdzku myszy, morfologia dendrytów komórek Purkiniego była zaburzona a liczba rozgałęzień mniejsza (Joo i wsp., 2014). Badania na myszach z podwójną mutacją w obrębie genów kodujących TrkB i TrkC, przeprowadzone przez Minichiello i Klein (1996) wykazały, że oba receptory biorą udział we wspieraniu przeżywalności komórek ziarnistych mózdzku. Zarówno myszy *trkB*^{+/-};*trkC*^{-/-} jak i *trkB*^{-/-};*trkC*^{+/-} wykazywały zwiększoną liczbę apoptotycznych komórek ziarnistych. Ponadto, komórki te wymagały aktywacji sygnalizacji przez receptory TrkB i TrkC jeszcze zanim przemieściły się z EGL do IGL. W przeciwieństwie do neuronów ziarnistych, przeżywalność komórek Purkiniego nie jest zaburzona u tych mutantów myszy, natomiast mają one zaburzenia w procesie kształtowania ich drzewka dendrytycznego. Autorzy postulują, że może to być spowodowane wzmożoną umieralnością komórek ziarnistych i w konsekwencji zaburzonymi interakcjami między ich włóknami równoległymi a komórkami Purkiniego.

Wyniki badań przedstawione w niniejszej rozprawie, pokazują odwrotny efekt. W pierwotnych hodowlach neuronalnych wyizolowanych z mózdzków oposów w wieku P3, (dzień, kiedy wstępuje szczyt proliferacji komórek Purkiniego), obniżenie ekspresji TrkC prowadzi do zwiększonej liczby rozgałęzień dendrytycznych w komórkach Purkiniego. Natomiast TrkC nie wpływa na rozwój komórek ziarnistych co sprawdzałam w hodowlach pierwotnych składających się z komórek wyizolowanych z mózdzków oposów w wieku P22. Ponadto, obniżenie ekspresji receptora TrkC w komórkach

Purkiniego oposa powoduje zwiększenie liczby dendrytów I i II-rzędowych *in vitro*. Jest to dość niespodziewany wynik, ponieważ receptory TrkC są zaangażowane w przeżywanie, różnicowanie i rozwój wypustek neuronalnych (Tessarollo i wsp., 1993). Jednak receptory TrkC mają zróżnicowane funkcje i mogą aktywować przeciwstawne ścieżki sygnalizacyjne, które doprowadzają zarówno do wspierania przeżywania jak i do śmierci komórki. Jak pokazano u myszy, rozwój komórek Purkiniego, włączając w to tworzenie, różnicowanie i dojrzewanie przebiega w różnych fazach rozwoju (Hatten i Heintz, 1995). Uzyskane wyniki sugerują, że u oposa, podczas wczesnej fazy rozwoju komórek Purkiniego, która trwa stosunkowo długo w porównaniu do myszy, komórki Purkiniego nie muszą wykształcać rozbudowanych drzewek dendrytycznych, w szczególności pod nieobecność komórek ziarnistych i ich aksonów. Innym wytłumaczeniem uzyskanych wyników może być aktywacja mechanizmu kompensacyjnego, który powodowałby rozbudowanie drzewka dendrytycznego. Użyte do hodowli neurony pierwotne były pozyskiwane z zawiązka mózdzku, który zawiera VZ z różnymi typami komórek progenitorowych. Pomimo, że komórki Purkiniego były hodowane *in vitro*, poza swoim naturalnym środowiskiem, użyta pożywka pozwoliła na zachowanie normalnego wzrostu neuronów. Przy tym, komórki Purkiniego były hodowane razem z innymi typami neuronów, z których większość wykazuje ekspresję NT-3. Niedostateczna ekspresja TrkC może prowadzić do aktywacji receptora p75^{NTR}. Receptor ten reguluje wiele procesów w rozwijającym się mózgu takich jak przeżywanie komórek, rozwój wypustek i (paradoksalnie) apoptozę (Bibel i wsp., 1999; Naska i wsp., 2010; Meier i wsp., 2019). Wykazano, że p75^{NTR} ulega ekspresji na wczesnych etapach rozwoju mózdzku oposa. Najprawdopodobniej, zahamowanie ekspresji receptora TrkC umożliwia przyłączenie się NT-3 do receptora p75^{NTR} i uruchamia ścieżkę sygnalizacyjną związaną z NT-3/ p75^{NTR}. Zatem NT-3, aktywując p75^{NTR}, mógłby regulować rozwój drzewka dendrytycznego komórek Purkiniego.

6. Podsumowanie i wnioski

Obniżenie poziomu białka receptorów TrkB lub TrkC w rozwijającej się korze nowej mózgu oposa *Monodelphis domestica* w siódmym dniu po urodzeniu (P7) wpływa na neurogenezę, w szczególności na:

- zmniejszenie liczby dzielących się komórek progenitorowych podczas tworzenia się głębokich warstw (VI i V) kory nowej mózgu; efekt ten jest niezależny od poziomu apoptozy.
- zatrzymanie migracji nowo powstałych komórek kory nowej w strefie pośredniej i uniemożliwienie im dotarcia do warstwy podpłytkowej

Doświadczenia przeprowadzone na oposach w różnym wieku umożliwiły poznanie poszczególnych etapów rozwoju mózdzku oposa. Generacja neuronów w obrębie tej struktury zaczyna się tuż po urodzeniu.

- W dniach od pierwszego do piątego po urodzeniu (P1-P5) następuje generacja neuronów głębokich jąder mózdzku (DCN) i komórek Purkiniego.
- Począwszy od 11 dnia po urodzeniu (P11) przez dwa tygodnie trwa proces tworzenia kory mózdzku i jej fałdowania. Charakterystyczna organizacja warstw kory mózdzku pojawia się w dniu 19, gdy zaczyna się rozwój komórek ziarnistych trwający do 90 dnia. W wieku P19 pojawia się też istota biała mózdzku, zwana drzewem życia.

Zmniejszenie aktywności receptora TrkC w komórkach mózdzku hodowanych *in vitro*:

- spowodowało zwiększenie liczby dendrytów w komórkach Purkiniego,
- nie wpłynęło na kształtowanie się wypustek komórek ziarnistych.

Wnioski końcowe

- Na podstawie uzyskanych wyników można wywnioskować, że w czasie powstawania głębokich warstw kory proces migracji neuronów składa się z dwóch faz. Podczas pierwszej z nich, niezależnej od receptorów TrkB i TrkC neurony przemieszczają się i zatrzymują pod warstwą podpłytkową. W drugiej fazie neurony migrują przez warstwę podpłytkową i docierają do swojego miejsca docelowego, a proces ten regulowany jest przez receptory TrkB i TrkC.
- Wyniki badań nad wpływem obniżenia poziomu białka receptora TrkC w komórkach Purkinjego i komórkach ziarnistych mózdzku pokazują, że aktywność receptorów TrkC może różnie wpływać na formowanie się drzewek dendrytycznych różnych typów komórek w obrębie tej samej struktury.

7. Piśmiennictwo

1. Aaku-Saraste, E., Oback, B., Hellwig, A., i Huttner, W. B. (1997). Neuroepithelial cells downregulate their plasma membrane polarity prior to neural tube closure and neurogenesis. *Mech Dev*, 69(1-2), 71-81.
[https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(97\)00156-1](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(97)00156-1)
2. Airaksinen, M. S., Koltzenburg, M., Lewin, G. R., Masu, Y., Helbig, C., Wolf, E., Brem, G., Toyka, K. V., Thoenen, H., i Meyer, M. (1996). Specific subtypes of cutaneous mechanoreceptors require neurotrophin-3 following peripheral target innervation. *Neuron*, 16(2), 287-295.
[https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80047-1](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80047-1)
3. Almaas, E., Kovacs, B., Vicsek, T., Oltvai, Z. N., i Barabasi, A. L. (2004). Global organization of metabolic fluxes in the bacterium *Escherichia coli*. *Nature*, 427(6977), 839-843. <https://doi.org/10.1038/nature02289>
4. Altman, J., i Bayer, S. A. (1985). Embryonic development of the rat cerebellum. II. Translocation and regional distribution of the deep neurons. *J Comp Neurol*, 231(1), 27-41. <https://doi.org/10.1002/cne.902310104>
5. Arevalo, J. C., Conde, B., Hempstead, B. L., Chao, M. V., Martin-Zanca, D., i Perez, P. (2000). TrkA immunoglobulin-like ligand binding domains inhibit spontaneous activation of the receptor. *Mol Cell Biol*, 20(16), 5908-5916.
<https://doi.org/10.1128/MCB.20.16.5908-5916.2000>
6. Arnold, S. J., Huang, G. J., Cheung, A. F., Era, T., Nishikawa, S., Bikoff, E. K., Molnar, Z., Robertson, E. J., i Groszer, M. (2008). The T-box transcription factor Eomes/Tbr2 regulates neurogenesis in the cortical subventricular zone. *Genes Dev*, 22(18), 2479-2484. <https://doi.org/10.1101/gad.475408>
7. Ashwell, K. (2010). *The Neurobiology of Australian Marsupials: Brain Evolution in the Other Mammalian Radiation*. Cambridge University Press.
<https://books.google.pl/books?id=NSydTn-XELwC>
8. Attardo, A., Calegari, F., Haubensak, W., Wilsch-Brauninger, M., i Huttner, W. B. (2008). Live imaging at the onset of cortical neurogenesis reveals differential appearance of the neuronal phenotype in apical versus basal progenitor progeny. *PLoS One*, 3(6), e2388. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002388>
9. Bai, J., Ramos, R. L., Ackman, J. B., Thomas, A. M., Lee, R. V., i LoTurco, J. J. (2003). RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex. *Nat Neurosci*, 6(12), 1277-1283. <https://doi.org/10.1038/nn1153>
10. Barnabe-Heider, F., i Miller, F. D. (2003). Endogenously produced neurotrophins regulate survival and differentiation of cortical progenitors via distinct signaling pathways. *J Neurosci*, 23(12), 5149-5160.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12832539>
11. Bartkowska, K., Aniszewska, A., Turlejski, K., i Djavadian, R. L. (2014). Distribution and function of TrkB receptors in the developing brain of the opossum *Monodelphis domestica*. *Dev Neurobiol*, 74(7), 707-722.
<https://doi.org/10.1002/dneu.22165>
12. Bartkowska, K., Gajerska, M., Turlejski, K., i Djavadian, R. L. (2013). Expression of TrkC receptors in the developing brain of the *Monodelphis* opossum and its effect on the development of cortical cells. *PLoS One*, 8(9), e74346.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074346>
13. Bartkowska, K., Paquin, A., Gauthier, A. S., Kaplan, D. R., i Miller, F. D. (2007). Trk signaling regulates neural precursor cell proliferation and differentiation during cortical development. *Development*, 134(24), 4369-4380.

- <https://doi.org/10.1242/dev.008227>
14. Bartkowska, K., Turlejski, K., i Djavadian, R. L. (2010). Neurotrophins and their receptors in early development of the mammalian nervous system. *Acta neurobiologiae experimentalis*, 70, 454-467.
 15. Bates, B., Rios, M., Trumpp, A., Chen, C., Fan, G., Bishop, J. M., i Jaenisch, R. (1999). Neurotrophin-3 is required for proper cerebellar development. *Nat Neurosci*, 2(2), 115-117. <https://doi.org/10.1038/5669>
 16. Bayer, S. A., Bayer, S. A., i Altman, J. (1991). *Neocortical Development*. Raven Press. <https://books.google.pl/books?id=eQVrAAAAMAAJ>
 17. Beattie, M. S., Harrington, A. W., Lee, R., Kim, J. Y., Boyce, S. L., Longo, F. M., Bresnahan, J. C., Hempstead, B. L., i Yoon, S. O. (2002). ProNGF induces p75-mediated death of oligodendrocytes following spinal cord injury. *Neuron*, 36(3), 375-386. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)01005-x](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)01005-x)
 18. Behar, T. N., Dugich-Djordjevic, M. M., Li, Y. X., Ma, W., Somogyi, R., Wen, X., Brown, E., Scott, C., McKay, R. D., i Barker, J. L. (1997). Neurotrophins stimulate chemotaxis of embryonic cortical neurons. *Eur J Neurosci*, 9(12), 2561-2570. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1997.tb01685.x>
 19. Ben-Arie, N., Bellen, H. J., Armstrong, D. L., McCall, A. E., Gordadze, P. R., Guo, Q., Matzuk, M. M., i Zoghbi, H. Y. (1997). Math1 is essential for genesis of cerebellar granule neurons. *Nature*, 390(6656), 169-172. <https://doi.org/10.1038/36579>
 20. Bernabeu, R. O., i Longo, F. M. (2010). The p75 neurotrophin receptor is expressed by adult mouse dentate progenitor cells and regulates neuronal and non-neuronal cell genesis. *BMC Neurosci*, 11, 136. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-11-136>
 21. Bernd, P. (2008). The role of neurotrophins during early development. *Gene Expr*, 14(4), 241-250. <https://doi.org/10.3727/105221608786883799>
 22. Bi, S., Zheng, X., Wang, X., Cignetti, N. E., Yang, S., i Wible, J. R. (2018). An Early Cretaceous eutherian and the placental-marsupial dichotomy. *Nature*, 558(7710), 390-395. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0210-3>
 23. Bianchi, L. M., Conover, J. C., Fritsch, B., DeChiara, T., Lindsay, R. M., i Yancopoulos, G. D. (1996). Degeneration of vestibular neurons in late embryogenesis of both heterozygous and homozygous BDNF null mutant mice. *Development*, 122(6), 1965-1973. <https://doi.org/10.1242/dev.122.6.1965>
 24. Bibel, M., i Barde, Y. A. (2000). Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev*, 14(23), 2919-2937. <https://doi.org/10.1101/gad.841400>
 25. Bibel, M., Hoppe, E., i Barde, Y. A. (1999). Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *EMBO J*, 18(3), 616-622. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.3.616>
 26. Borghesani, P. R., Peyrin, J. M., Klein, R., Rubin, J., Carter, A. R., Schwartz, P. M., Luster, A., Corfas, G., i Segal, R. A. (2002). BDNF stimulates migration of cerebellar granule cells. *Development*, 129(6), 1435-1442. <https://doi.org/10.1242/dev.129.6.1435>
 27. Borrell, V., Yoshimura, Y., i Callaway, E. M. (2005). Targeted gene delivery to telencephalic inhibitory neurons by directional in utero electroporation. *J Neurosci Methods*, 143(2), 151-158. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2004.09.027>
 28. Bosman, L. W., Hartmann, J., Barski, J. J., Lepier, A., Noll-Hussong, M., Reichardt, L. F., i Konnerth, A. (2006). Requirement of TrkB for synapse

- elimination in developing cerebellar Purkinje cells. *Brain Cell Biol*, 35(1), 87-101. <https://doi.org/10.1007/s11068-006-9002-z>
29. Broccoli, V., Boncinelli, E., i Wurst, W. (1999). The caudal limit of Otx2 expression positions the isthmus organizer. *Nature*, 401(6749), 164-168. <https://doi.org/10.1038/43670>
 30. Brunstrom, J. E., Gray-Swain, M. R., Osborne, P. A., i Pearlman, A. L. (1997). Neuronal heterotopias in the developing cerebral cortex produced by neurotrophin-4. *Neuron*, 18(3), 505-517. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)81250-7](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)81250-7)
 31. Burgin, C. J., Colella, J. P., Kahn, P. L., i Upham, N. S. (2018). How many species of mammals are there? *Journal of Mammalogy*, 99(1), 1-14. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyx147>
 32. Buttermore, E. D., Piochon, C., Wallace, M. L., Philpot, B. D., Hansel, C., i Bhat, M. A. (2012). Pinceau organization in the cerebellum requires distinct functions of neurofascin in Purkinje and basket neurons during postnatal development. *J Neurosci*, 32(14), 4724-4742. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5602-11.2012>
 33. Cabelli, R. J., Hohn, A., i Shatz, C. J. (1995). Inhibition of ocular dominance column formation by infusion of NT-4/5 or BDNF. *Science*, 267(5204), 1662-1666. <https://doi.org/10.1126/science.7886458>
 34. Carroll, P., Lewin, G. R., Koltzenburg, M., Toyka, K. V., i Thoenen, H. (1998). A role for BDNF in mechanosensation. *Nat Neurosci*, 1(1), 42-46. <https://doi.org/10.1038/242>
 35. Carter, A. R., Berry, E. M., i Segal, R. A. (2003). Regional expression of p75NTR contributes to neurotrophin regulation of cerebellar patterning. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 22(1), 1-13. [https://doi.org/10.1016/s1044-7431\(02\)00015-5](https://doi.org/10.1016/s1044-7431(02)00015-5)
 36. Carter, A. R., Chen, C., Schwartz, P. M., i Segal, R. A. (2002). Brain-derived neurotrophic factor modulates cerebellar plasticity and synaptic ultrastructure. *J Neurosci*, 22(4), 1316-1327. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11850459>
 37. Caviness, V. S., Jr. (1982). Neocortical histogenesis in normal and reeler mice: a developmental study based upon [3H]thymidine autoradiography. *Brain Res*, 256(3), 293-302. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(82\)90141-9](https://doi.org/10.1016/0165-3806(82)90141-9)
 38. Chen, K. S., Nishimura, M. C., Armanini, M. P., Crowley, C., Spencer, S. D., i Phillips, H. S. (1997). Disruption of a single allele of the nerve growth factor gene results in atrophy of basal forebrain cholinergic neurons and memory deficits. *J Neurosci*, 17(19), 7288-7296. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9295375>
 39. Cheng, X. S., Li, M. S., Du, J., Jiang, Q. Y., Wang, L., Yan, S. Y., Yu, D. M., i Deng, J. B. (2011). Neuronal apoptosis in the developing cerebellum. *Anat Histol Embryol*, 40(1), 21-27. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.2010.01033.x>
 40. Cheung, A. F., Kondo, S., Abdel-Mannan, O., Chodroff, R. A., Sirey, T. M., Bluy, L. E., Webber, N., DeProto, J., Karlen, S. J., Krubitzer, L., Stolp, H. B., Saunders, N. R., i Molnar, Z. (2010). The subventricular zone is the developmental milestone of a 6-layered neocortex: comparisons in metatherian and eutherian mammals. *Cereb Cortex*, 20(5), 1071-1081. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhp168>
 41. Choo, M., Miyazaki, T., Yamazaki, M., Kawamura, M., Nakazawa, T., Zhang, J., Tanimura, A., Uesaka, N., Watanabe, M., Sakimura, K., i Kano, M. (2017). Retrograde BDNF to TrkB signaling promotes synapse elimination in the developing cerebellum. *Nat Commun*, 8(1), 195. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00260-w>
 42. Cioni, J. M., Telley, L., Saywell, V., Cadilhac, C., Jourdan, C., Huber, A. B.,

- Huang, J. Z., Jahannault-Talignani, C., i Ango, F. (2013). SEMA3A signaling controls layer-specific interneuron branching in the cerebellum. *Curr Biol*, 23(10), 850-861. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.04.007>
43. Conover, J. C., Erickson, J. T., Katz, D. M., Bianchi, L. M., Poueymirou, W. T., McClain, J., Pan, L., Helgren, M., Ip, N. Y., Boland, P. i wsp. (1995). Neuronal deficits, not involving motor neurons, in mice lacking BDNF and/or NT4. *Nature*, 375(6528), 235-238. <https://doi.org/10.1038/375235a0>
 44. Crowley, C., Spencer, S. D., Nishimura, M. C., Chen, K. S., Pitts-Meek, S., Armanini, M. P., Ling, L. H., McMahon, S. B., Shelton, D. L., Levinson, A. D. i wsp. (1994). Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell*, 76(6), 1001-1011. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90378-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90378-6)
 45. de Lahunta, A., Glass, E. N., i Kent, M. (2016). Embryonic Development of the Central Nervous System. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 46(2), 193-216. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2015.10.011>
 46. De Luca, A., Cerrato, V., Fuca, E., Parmigiani, E., Buffo, A., i Leto, K. (2016). Sonic hedgehog patterning during cerebellar development. *Cell Mol Life Sci*, 73(2), 291-303. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2065-1>
 47. Dechant, G., i Barde, Y. A. (2002). The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat Neurosci*, 5(11), 1131-1136. <https://doi.org/10.1038/nn1102-1131>
 48. Desmond, J. E., i Fiez, J. A. (1998). Neuroimaging studies of the cerebellum: language, learning and memory. *Trends Cogn Sci*, 2(9), 355-362. [https://doi.org/10.1016/s1364-6613\(98\)01211-x](https://doi.org/10.1016/s1364-6613(98)01211-x)
 49. Dluzen, D. E., Gao, X., Story, G. M., Anderson, L. I., Kucera, J., i Walro, J. M. (2001). Evaluation of nigrostriatal dopaminergic function in adult +/- and +/- BDNF mutant mice. *Exp Neurol*, 170(1), 121-128. <https://doi.org/10.1006/exnr.2001.7698>
 50. Dos Santos, S. E., Porfirio, J., da Cunha, F. B., Manger, P. R., Tavares, W., Pessoa, L., Raghanti, M. A., Sherwood, C. C., i Herculano-Houzel, S. (2017). Cellular Scaling Rules for the Brains of Marsupials: Not as "Primitive" as Expected. *Brain Behav Evol*, 89(1), 48-63. <https://doi.org/10.1159/000452856>
 51. Doughty, M. L., Lohof, A., Campana, A., Delhay-Bouchaud, N., i Mariani, J. (1998). Neurotrophin-3 promotes cerebellar granule cell exit from the EGL. *Eur J Neurosci*, 10(9), 3007-3011. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1998.00333.x>
 52. Eiraku, M., Tohgo, A., Ono, K., Kaneko, M., Fujishima, K., Hirano, T., i Kengaku, M. (2005). DNER acts as a neuron-specific Notch ligand during Bergmann glial development. *Nat Neurosci*, 8(7), 873-880. <https://doi.org/10.1038/nn1492>
 53. ElShamy, W. M., Linnarsson, S., Lee, K. F., Jaenisch, R., i Ernfors, P. (1996). Prenatal and postnatal requirements of NT-3 for sympathetic neuroblast survival and innervation of specific targets. *Development*, 122(2), 491-500. <https://doi.org/10.1242/dev.122.2.491>
 54. Englund, C., Fink, A., Lau, C., Pham, D., Daza, R. A., Bulfone, A., Kowalczyk, T., i Hevner, R. F. (2005). Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *J Neurosci*, 25(1), 247-251. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2899-04.2005>
 55. Erickson, J. T., Conover, J. C., Borday, V., Champagnat, J., Barbacid, M., Yancopoulos, G., i Katz, D. M. (1996). Mice lacking brain-derived neurotrophic

- factor exhibit visceral sensory neuron losses distinct from mice lacking NT4 and display a severe developmental deficit in control of breathing. *J Neurosci*, 16(17), 5361-5371. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8757249>
56. Ernfors, P., Kucera, J., Lee, K. F., Loring, J., i Jaenisch, R. (1995). Studies on the physiological role of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in knockout mice. *Int J Dev Biol*, 39(5), 799-807. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8645564>
 57. Ernfors, P., Lee, K. F., i Jaenisch, R. (1994). Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits. *Nature*, 368(6467), 147-150. <https://doi.org/10.1038/368147a0>
 58. Ernfors, P., Lee, K. F., Kucera, J., i Jaenisch, R. (1994). Lack of neurotrophin-3 leads to deficiencies in the peripheral nervous system and loss of limb proprioceptive afferents. *Cell*, 77(4), 503-512. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90213-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90213-5)
 59. Essen, D. C. V. (2020). A 2020 view of tension-based cortical morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(52), 32868-32879. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.2016830117>
 60. Farinas, I., Jones, K. R., Backus, C., Wang, X. Y., i Reichardt, L. F. (1994). Severe sensory and sympathetic deficits in mice lacking neurotrophin-3. *Nature*, 369(6482), 658-661. <https://doi.org/10.1038/369658a0>
 61. Fernandez, V., Llinares-Benadero, C., i Borrell, V. (2016). Cerebral cortex expansion and folding: what have we learned? *EMBO J*, 35(10), 1021-1044. <https://doi.org/10.15252/embj.201593701>
 62. Fink, A. J., Englund, C., Daza, R. A., Pham, D., Lau, C., Nivison, M., Kowalczyk, T., i Hevner, R. F. (2006). Development of the deep cerebellar nuclei: transcription factors and cell migration from the rhombic lip. *J Neurosci*, 26(11), 3066-3076. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5203-05.2006>
 63. Flace, P., Lorusso, L., Laiso, G., Rizzi, A., Cagiano, R., Nico, B., Ribatti, D., Ambrosi, G., i Benagiano, V. (2014). Calbindin-D28K immunoreactivity in the human cerebellar cortex. *Anat Rec (Hoboken)*, 297(7), 1306-1315. <https://doi.org/10.1002/ar.22921>
 64. Fleming, J., i Chiang, C. (2015). The Purkinje neuron: A central orchestrator of cerebellar neurogenesis. *Neurogenesis (Austin)*, 2(1), e1025940. <https://doi.org/10.1080/23262133.2015.1025940>
 65. Fortin, M., Marchand, R., i Parent, A. (1998). Calcium-binding proteins in primate cerebellum. *Neurosci Res*, 30(2), 155-168. [https://doi.org/10.1016/s0168-0102\(97\)00124-7](https://doi.org/10.1016/s0168-0102(97)00124-7)
 66. Frantz, G. D., i Tobin, A. J. (1994). Cellular distribution of calbindin D28K mRNAs in the adult mouse brain. *J Neurosci Res*, 37(3), 287-302. <https://doi.org/10.1002/jnr.490370302>
 67. Freyer, C., Zeller, U., i Renfree, M. B. (2007). Placental function in two distantly related marsupials. *Placenta*, 28(2-3), 249-257. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2006.03.007>
 68. Friedman, W. J. (2000). Neurotrophins induce death of hippocampal neurons via the p75 receptor. *J Neurosci*, 20(17), 6340-6346. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10964939>
 69. Friedman, W. J., Black, I. B., i Kaplan, D. R. (1998). Distribution of the neurotrophins brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4/5 in the postnatal rat brain: an immunocytochemical study. *Neuroscience*, 84(1), 101-114. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(97\)00526-5](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(97)00526-5)

70. Fukuchi-Shimogori, T., & Grove, E. A. (2001). Neocortex patterning by the secreted signaling molecule FGF8. *Science*, *294*(5544), 1071-1074. <https://doi.org/10.1126/science.1064252>
71. Fukumitsu, H., Furukawa, Y., Tsusaka, M., Kinukawa, H., Nitta, A., Nomoto, H., Mima, T., & Furukawa, S. (1998). Simultaneous expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in Cajal-Retzius, subplate and ventricular progenitor cells during early development stages of the rat cerebral cortex. *Neuroscience*, *84*(1), 115-127. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(97\)00505-8](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(97)00505-8)
72. Fukumitsu, H., Ohtsuka, M., Murai, R., Nakamura, H., Itoh, K., & Furukawa, S. (2006). Brain-derived neurotrophic factor participates in determination of neuronal laminar fate in the developing mouse cerebral cortex. *J Neurosci*, *26*(51), 13218-13230. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4251-06.2006>
73. Gammill, L. S., & Bronner-Fraser, M. (2003). Neural crest specification: migrating into genomics. *Nat Rev Neurosci*, *4*(10), 795-805. <https://doi.org/10.1038/nrn1219>
74. Garcia-Segura, L. M., Baetens, D., Roth, J., Norman, A. W., & Orci, L. (1984). Immunohistochemical mapping of calcium-binding protein immunoreactivity in the rat central nervous system. *Brain Res*, *296*(1), 75-86. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(84\)90512-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(84)90512-2)
75. Gates, M. A., Tai, C. C., & Macklis, J. D. (2000). Neocortical neurons lacking the protein-tyrosine kinase B receptor display abnormal differentiation and process elongation in vitro and in vivo. *Neuroscience*, *98*(3), 437-447. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(00\)00106-8](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00106-8)
76. Ghosh, A., & Greenberg, M. E. (1995). Distinct roles for bFGF and NT-3 in the regulation of cortical neurogenesis. *Neuron*, *15*(1), 89-103. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90067-5](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90067-5)
77. Gillies, K., & Price, D. J. (1993). The fates of cells in the developing cerebral cortex of normal and methylazoxymethanol acetate-lesioned mice. *Eur J Neurosci*, *5*(1), 73-84. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1993.tb00207.x>
78. Goffinet, A. M. (1983). The embryonic development of the inferior olivary complex in normal and reeler (rlORL) mutant mice. *J Comp Neurol*, *219*(1), 10-24. <https://doi.org/10.1002/cne.902190103>
79. Gotz, M., Stoykova, A., & Gruss, P. (1998). Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex. *Neuron*, *21*(5), 1031-1044. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80621-2](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80621-2)
80. Graves, J. A., & Renfree, M. B. (2013). Marsupials in the age of genomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, *14*, 393-420. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-091212-153452>
81. Gurley, L. R., D'Anna, J. A., Barham, S. S., Deaven, L. L., & Tobey, R. A. (1978). Histone phosphorylation and chromatin structure during mitosis in Chinese hamster cells. *Eur J Biochem*, *84*(1), 1-15. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1978.tb12135.x>
82. Hamburger, V., & Levi-Montalcini, R. (1949). Proliferation, differentiation and degeneration in the spinal ganglia of the chick embryo under normal and experimental conditions. *J Exp Zool*, *111*(3), 457-501. <https://doi.org/10.1002/jez.1401110308>
83. Hashimoto, M., & Mikoshiba, K. (2003). Mediolateral compartmentalization of the cerebellum is determined on the "birth date" of Purkinje cells. *J Neurosci*, *23*(36), 11342-11351. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14672998>
84. Hatten, M. E., & Heintz, N. (1995). Mechanisms of neural patterning and specification in the developing cerebellum. *Annu Rev Neurosci*, *18*, 385-408.

- <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.18.030195.002125>
85. Haubensak, W., Attardo, A., Denk, W., i Huttner, W. B. (2004). Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(9), 3196-3201. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308600100>
 86. Hawkes, R. (2019). Cerebellum: Anatomy and Organisation. In *eLS* (pp. 1-8). <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000034.pub4>
 87. Hempstead, B. L., Martin-Zanca, D., Kaplan, D. R., Parada, L. F., i Chao, M. V. (1991). High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature*, 350(6320), 678-683. <https://doi.org/10.1038/350678a0>
 88. Heng, X., Guo, Q., Leung, A. W., i Li, J. Y. (2017). Analogous mechanism regulating formation of neocortical basal radial glia and cerebellar Bergmann glia. *Elife*, 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.23253>
 89. Hickford, D., Frankenberg, S., i Renfree, M. B. (2009). The tammar wallaby, *Macropus eugenii*: a model kangaroo for the study of developmental and reproductive biology. *Cold Spring Harb Protoc*, 2009(12), pdb emo137. <https://doi.org/10.1101/pdb.emo137>
 90. Hinds, J. W., i Ruffett, T. L. (1971). Cell proliferation in the neural tube: an electron microscopic and golgi analysis in the mouse cerebral vesicle. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 115(2), 226-264. <https://doi.org/10.1007/BF00391127>
 91. Hong, G. S., Lee, S. H., Lee, B., Choi, J. H., Oh, S. J., Jang, Y., Hwang, E. M., Kim, H., Jung, J., Kim, I. B., i Oh, U. (2019). ANO1/TMEM16A regulates process maturation in radial glial cells in the developing brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116(25), 12494-12499. <https://doi.org/10.1073/pnas.1901067116>
 92. Horch, H. W., Kruttgen, A., Portbury, S. D., i Katz, L. C. (1999). Destabilization of cortical dendrites and spines by BDNF. *Neuron*, 23(2), 353-364. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80785-0](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80785-0)
 93. Hossain, W. A., D'Sa, C., i Morest, D. K. (2008). Interactive roles of fibroblast growth factor 2 and neurotrophin 3 in the sequence of migration, process outgrowth, and axonal differentiation of mouse cochlear ganglion cells. *J Neurosci Res*, 86(11), 2376-2391. <https://doi.org/10.1002/jnr.21685>
 94. Huang, E. J., i Reichardt, L. F. (2001). Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*, 24, 677-736. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.677>
 95. Ichim, G., Genevois, A. L., Ménard, M., Yu, L. Y., Coelho-Aguiar, J. M., Llambi, F., Jarrosson-Wuilleme, L., Lefebvre, J., Tulasne, D., Dupin, E., Le Douarin, N., Arumäe, U., Tauszig-Delamasure, S., i Mehlen, P. (2013). The dependence receptor TrkC triggers mitochondria-dependent apoptosis upon Cobra-1 recruitment. *Mol Cell*, 51(5), 632-646. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.021>
 96. Ip, N. Y., Ibanez, C. F., Nye, S. H., McClain, J., Jones, P. F., Gies, D. R., Belluscio, L., Le Beau, M. M., Espinosa, R., 3rd, Squinto, S. P. i wsp. (1992). Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(7), 3060-3064. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.7.3060>
 97. Johnson, E. M., Craig, E. T., i Yeh, H. H. (2007). TrkB is necessary for pruning at the climbing fibre-Purkinje cell synapse in the developing murine cerebellum. *J Physiol*, 582(Pt 2), 629-646. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.133561>
 98. Jones, K. R., Fariñas, I., Backus, C., i Reichardt, L. F. (1994). Targeted disruption

- of the BDNF gene perturbs brain and sensory neuron development but not motor neuron development. *Cell*, 76(6), 989-999.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90377-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90377-8)
99. Joo, W., Hippenmeyer, S., i Luo, L. (2014). Neurodevelopment. Dendrite morphogenesis depends on relative levels of NT-3/TrkC signaling. *Science*, 346(6209), 626-629. <https://doi.org/10.1126/science.1258996>
 100. Ju, J., Liu, Q., Zhang, Y., Liu, Y., Jiang, M., Zhang, L., He, X., Peng, C., Zheng, T., Lu, Q. R., i Li, H. (2016). Olig2 regulates Purkinje cell generation in the early developing mouse cerebellum. *Sci Rep*, 6, 30711.
<https://doi.org/10.1038/srep30711>
 101. Ka, M., Condorelli, G., Woodgett, J. R., i Kim, W. Y. (2014). mTOR regulates brain morphogenesis by mediating GSK3 signaling. *Development*, 141(21), 4076-4086. <https://doi.org/10.1242/dev.108282>
 102. Kahn, M. A., Kumar, S., Liebl, D., Chang, R., Parada, L. F., i De Vellis, J. (1999). Mice lacking NT-3, and its receptor TrkC, exhibit profound deficiencies in CNS glial cells. *Glia*, 26(2), 153-165. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10384880>
 103. Kaplan, D. R., Hempstead, B. L., Martin-Zanca, D., Chao, M. V., i Parada, L. F. (1991). The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science*, 252(5005), 554-558.
<https://doi.org/10.1126/science.1850549>
 104. Kernie, S. G., Liebl, D. J., i Parada, L. F. (2000). BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice. *EMBO J*, 19(6), 1290-1300.
<https://doi.org/10.1093/emboj/19.6.1290>
 105. Klein, R., Nanduri, V., Jing, S. A., Lamballe, F., Tapley, P., Bryant, S., Cordon-Cardo, C., Jones, K. R., Reichardt, L. F., i Barbacid, M. (1991). The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell*, 66(2), 395-403.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90628-c](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90628-c)
 106. Komuro, H., Yacubova, E., Yacubova, E., i Rakic, P. (2001). Mode and tempo of tangential cell migration in the cerebellar external granular layer. *J Neurosci*, 21(2), 527-540. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11160432>
 107. Korneliussen, H. K. (1968). On the ontogenetic development of the cerebellum (nuclei, fissures, and cortex) of the rat, with special reference to regional variations in corticogenesis. *J Hirnforsch*, 10(5), 379-412.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4184399>
 108. Korte, M., Carroll, P., Wolf, E., Brem, G., Thoenen, H., i Bonhoeffer, T. (1995). Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(19), 8856-8860.
<https://doi.org/10.1073/pnas.92.19.8856>
 109. Kowalczyk, T., Pontious, A., Englund, C., Daza, R. A. M., Bedogni, F., Hodge, R., Attardo, A., Bell, C., Huttner, W. B., i Hevner, R. F. (2009). Intermediate Neuronal Progenitors (Basal Progenitors) Produce Pyramidal–Projection Neurons for All Layers of Cerebral Cortex. *Cerebral Cortex*, 19(10), 2439-2450.
<https://doi.org/10.1093/cercor/bhn260>
 110. Kurki, P., Vanderlaan, M., Dolbeare, F., Gray, J., & Tan, E. M. (1986). Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during the cell cycle. *Exp Cell Res*, 166(1), 209–219. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(86\)90520-3](https://doi.org/10.1016/0014-4827(86)90520-3)
 111. Kusewitt, D. F., Applegate, L. A., i Ley, R. D. (1991). Ultraviolet radiation-induced skin tumors in a South American opossum (*Monodelphis domestica*). *Vet Pathol*, 28(1), 55-65.

- <https://doi.org/10.1177/030098589102800108>
112. Kushwaha, R. S., Vandeberg, J. F., Rodriguez, R., i Vandeberg, J. L. (2004). Cholesterol absorption and hepatic acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase activity play major roles in lipemic response to dietary cholesterol and fat in laboratory opossums. *Metabolism*, 53(6), 817-822. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2003.12.029>
 113. Laxson, L. C., i King, J. S. (1983). The formation and growth of the cortical layers in the cerebellum of the opossum. *Anat Embryol (Berl)*, 167(3), 391-409. <https://doi.org/10.1007/BF00315677>
 114. Lee, K. F., Davies, A. M., i Jaenisch, R. (1994). p75-deficient embryonic dorsal root sensory and neonatal sympathetic neurons display a decreased sensitivity to NGF. *Development*, 120(4), 1027-1033. <https://doi.org/10.1242/dev.120.4.1027>
 115. Lee, K. F., Li, E., Huber, L. J., Landis, S. C., Sharpe, A. H., Chao, M. V., i Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the gene encoding the low affinity NGF receptor p75 leads to deficits in the peripheral sensory nervous system. *Cell*, 69(5), 737-749. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90286-l](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90286-l)
 116. Leto, K., Arancillo, M., Becker, E. B., Buffo, A., Chiang, C., Ding, B., Dobyns, W. B., Dusart, I., Haldipur, P., Hatten, M. E., Hoshino, M., Joyner, A. L., Kano, M., Kilpatrick, D. L., Koibuchi, N., Marino, S., Martinez, S., Millen, K. J., Millner, T. O., . . . Hawkes, R. (2016). Consensus Paper: Cerebellar Development. *Cerebellum*, 15(6), 789-828. <https://doi.org/10.1007/s12311-015-0724-2>
 117. Levers, T. E., Edgar, J. M., i Price, D. J. (2001). The fates of cells generated at the end of neurogenesis in developing mouse cortex. *Journal of Neurobiology*, 48(4), 265-277. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/neu.1056>
 118. Levi-Montalcini, R. (1987). The nerve growth factor 35 years later. *Science*, 237(4819), 1154-1162. <https://doi.org/10.1126/science.3306916>
 119. Levitt, P., Cooper, M. L., i Rakic, P. (1981). Coexistence of neuronal and glial precursor cells in the cerebral ventricular zone of the fetal monkey: an ultrastructural immunoperoxidase analysis. *J Neurosci*, 1(1), 27-39. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7050307>
 120. Ley, R. D. (1997). Ultraviolet Radiation A-induced Precursors of Cutaneous Melanoma in Monodelphis domestical. *Cancer Research*, 57(17), 3682-3684.
 121. Li, J. Y., i Joyner, A. L. (2001). Otx2 and Gbx2 are required for refinement and not induction of mid-hindbrain gene expression. *Development*, 128(24), 4979-4991. <https://doi.org/10.1242/dev.128.24.4979>
 122. Li, K., Leung, A. W., Guo, Q., Yang, W., i Li, J. Y. (2014). Shp2-dependent ERK signaling is essential for induction of Bergmann glia and foliation of the cerebellum. *J Neurosci*, 34(3), 922-931. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3476-13.2014>
 123. Liebl, D. J., Tessarollo, L., Palko, M. E., i Parada, L. F. (1997). Absence of sensory neurons before target innervation in brain-derived neurotrophic factor-, neurotrophin 3-, and TrkC-deficient embryonic mice. *J Neurosci*, 17(23), 9113-9121. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9364058>
 124. Lindholm, D., Castren, E., Tsoulfas, P., Kolbeck, R., Berzaghi Mda, P., Leingartner, A., Heisenberg, C. P., Tessarollo, L., Parada, L. F., i Thoenen, H. (1993). Neurotrophin-3 induced by tri-iodothyronine in cerebellar granule cells promotes Purkinje cell differentiation. *J Cell Biol*, 122(2), 443-450. <https://doi.org/10.1083/jcb.122.2.443>
 125. Linnarsson, S., Bjorklund, A., i Ernfors, P. (1997). Learning deficit in BDNF mutant mice. *Eur J Neurosci*, 9(12), 2581-2587.

- <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1997.tb01687.x>
126. Liu, A., i Niswander, L. A. (2005). Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development. *Nat Rev Neurosci*, 6(12), 945-954. <https://doi.org/10.1038/nrn1805>
 127. Liu, X., Ernfors, P., Wu, H., i Jaenisch, R. (1995). Sensory but not motor neuron deficits in mice lacking NT4 and BDNF. *Nature*, 375(6528), 238-241. <https://doi.org/10.1038/375238a0>
 128. LoTurco, J., Manent, J. B., i Sidiqi, F. (2009). New and improved tools for in utero electroporation studies of developing cerebral cortex. *Cereb Cortex*, 19 Suppl 1, i120-125. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhp033>
 129. Lu, Q. R., Yuk, D., Alberta, J. A., Zhu, Z., Pawlitzky, I., Chan, J., McMahon, A. P., Stiles, C. D., i Rowitch, D. H. (2000). Sonic hedgehog--regulated oligodendrocyte lineage genes encoding bHLH proteins in the mammalian central nervous system. *Neuron*, 25(2), 317-329. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80897-1](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80897-1)
 130. Luo, Z. X., Yuan, C. X., Meng, Q. J., i Ji, Q. (2011). A Jurassic eutherian mammal and divergence of marsupials and placentals. *Nature*, 476(7361), 442-445. <https://doi.org/10.1038/nature10291>
 131. Lyons, W. E., Mamounas, L. A., Ricaurte, G. A., Coppola, V., Reid, S. W., Bora, S. H., Wihler, C., Koliatsos, V. E., i Tessarollo, L. (1999). Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(26), 15239-15244. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.26.15239>
 132. Maisonpierre, P. C., Belluscio, L., Friedman, B., Alderson, R. F., Wiegand, S. J., Furth, M. E., Lindsay, R. M., i Yancopoulos, G. D. (1990). NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron*, 5(4), 501-509. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90089-x](https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90089-x)
 133. Malatesta, P., Hack, M. A., Hartfuss, E., Kettenmann, H., Klinkert, W., Kirchhoff, F., i Gotz, M. (2003). Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron*, 37(5), 751-764. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00116-8](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00116-8)
 134. Manto, M., Bower, J. M., Conforto, A. B., Delgado-García, J. M., da Guarda, S. N., Gerwig, M., Habas, C., Hagura, N., Ivry, R. B., Mariën, P., Molinari, M., Naito, E., Nowak, D. A., Oulad Ben Taib, N., Pelisson, D., Tesche, C. D., Tilikete, C., i Timmann, D. (2012). Consensus paper: roles of the cerebellum in motor control--the diversity of ideas on cerebellar involvement in movement. *Cerebellum*, 11(2), 457-487. <https://doi.org/10.1007/s12311-011-0331-9>
 135. Marzban, H., Del Bigio, M. R., Alizadeh, J., Ghavami, S., Zachariah, R. M., i Rastegar, M. (2014). Cellular commitment in the developing cerebellum. *Front Cell Neurosci*, 8, 450. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00450>
 136. Mastick, G. S., Fan, C. M., Tessier-Lavigne, M., Serbedzija, G. N., McMahon, A. P., i Easter, S. S., Jr. (1996). Early deletion of neuromeres in Wnt-1-/- mutant mice: evaluation by morphological and molecular markers. *J Comp Neurol*, 374(2), 246-258. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19961014\)374:2<246::AID-CNE7>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19961014)374:2<246::AID-CNE7>3.0.CO;2-2)
 137. Matsumoto, N., Shinmyo, Y., Ichikawa, Y., i Kawasaki, H. (2017). Gyrification of the cerebral cortex requires FGF signaling in the mammalian brain. *Elife*, 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.29285>
 138. McAllister, A. K., Katz, L. C., i Lo, D. C. (1997). Opposing roles for endogenous

- BDNF and NT-3 in regulating cortical dendritic growth. *Neuron*, 18(5), 767-778. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80316-5](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80316-5)
139. McAllister, A. K., Lo, D. C., i Katz, L. C. (1995). Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex. *Neuron*, 15(4), 791-803. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90171-x](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90171-x)
 140. McMahan, A. P., i Bradley, A. (1990). The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell*, 62(6), 1073-1085. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90385-r](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90385-r)
 141. Medina, D. L., Sciarretta, C., Calella, A. M., Von Bohlen Und Halbach, O., Unsicker, K., i Minichiello, L. (2004). TrkB regulates neocortex formation through the Shc/PLCgamma-mediated control of neuronal migration. *EMBO J*, 23(19), 3803-3814. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600399>
 142. Meier, S., Alfonsi, F., Kurniawan, N. D., Milne, M. R., Kasherman, M. A., Delogu, A., Piper, M., i Coulson, E. J. (2019). The p75 neurotrophin receptor is required for the survival of neuronal progenitors and normal formation of the basal forebrain, striatum, thalamus and neocortex. *Development*, 146(18). <https://doi.org/10.1242/dev.181933>
 143. Ménard, M., Costechareyre, C., Coelho-Aguiar, J. M., Jarrosson-Wuilleme, L., Rama, N., Blachier, J., Kindbeiter, K., Bozon, M., Cabrera, J. R., Dupin, E., Le Douarin, N., Mehlen, P., i Tauszig-Delamasure, S. (2018). The dependence receptor TrkC regulates the number of sensory neurons during DRG development. *Dev Biol*, 442(2), 249–261. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.07.022>
 144. Mi, S., Lee, X., Shao, Z., Thill, G., Ji, B., Relton, J., Levesque, M., Allaire, N., Perrin, S., Sands, B., Crowell, T., Cate, R. L., McCoy, J. M., i Pepinsky, R. B. (2004). LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat Neurosci*, 7(3), 221-228. <https://doi.org/10.1038/nn1188>
 145. Miale, I. L., i Sidman, R. L. (1961). An autoradiographic analysis of histogenesis in the mouse cerebellum. *Exp Neurol*, 4, 277-296. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(61\)90055-3](https://doi.org/10.1016/0014-4886(61)90055-3)
 146. Mikkelsen, T. S., Wakefield, M. J., Aken, B., Amemiya, C. T., Chang, J. L., Duke, S., Garber, M., Gentles, A. J., Goodstadt, L., Heger, A., Jurka, J., Kamal, M., Mauceli, E., Searle, S. M., Sharpe, T., Baker, M. L., Batzer, M. A., Benos, P. V., Belov, K., . . . Lindblad-Toh, K. (2007). Genome of the marsupial *Monodelphis domestica* reveals innovation in non-coding sequences. *Nature*, 447(7141), 167-177. <https://doi.org/10.1038/nature05805>
 147. Miller, R. D., i Belov, K. (2000). Immunoglobulin genetics of marsupials. *Dev Comp Immunol*, 24(5), 485-490. [https://doi.org/10.1016/s0145-305x\(00\)00011-2](https://doi.org/10.1016/s0145-305x(00)00011-2)
 148. Millet, S., Campbell, K., Epstein, D. J., Losos, K., Harris, E., i Joyner, A. L. (1999). A role for Gbx2 in repression of Otx2 and positioning the mid/hindbrain organizer. *Nature*, 401(6749), 161-164. <https://doi.org/10.1038/43664>
 149. Minichiello, L., i Klein, R. (1996). TrkB and TrkC neurotrophin receptors cooperate in promoting survival of hippocampal and cerebellar granule neurons. *Genes Dev*, 10(22), 2849-2858. <https://doi.org/10.1101/gad.10.22.2849>
 150. Miyata, T., Ono, Y., Okamoto, M., Masaoka, M., Sakakibara, A., Kawaguchi, A., Hashimoto, M., i Ogawa, M. (2010). Migration, early axonogenesis, and Reelin-dependent layer-forming behavior of early/posterior-born Purkinje cells in the developing mouse lateral cerebellum. *Neural Dev*, 5, 23. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-5-23>
 151. Mollgard, K., Balslev, Y., Janas, M. S., Treherne, J. M., Saunders, N. R., i Nichols, J. G. (1994). Development of spinal cord in the isolated CNS of a

- neonatal mammal (the opossum *Monodelphis domestica*) maintained in longterm culture. *J Neurocytol*, 23(3), 151-165. <https://doi.org/10.1007/BF01181557>
152. Molnar, Z., Knott, G. W., Blakemore, C., i Saunders, N. R. (1998). Development of thalamocortical projections in the South American gray short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*). *J Comp Neurol*, 398(4), 491-514. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9717705>
 153. Morales, D., i Hatten, M. E. (2006). Molecular markers of neuronal progenitors in the embryonic cerebellar anlage. *J Neurosci*, 26(47), 12226-12236. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3493-06.2006>
 154. Morrison, M. E., i Mason, C. A. (1998). Granule neuron regulation of Purkinje cell development: striking a balance between neurotrophin and glutamate signaling. *J Neurosci*, 18(10), 3563-3573. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9570788>
 155. Nadarajah, B., Brunstrom, J. E., Grutzendler, J., Wong, R. O., i Pearlman, A. L. (2001). Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nat Neurosci*, 4(2), 143-150. <https://doi.org/10.1038/83967>
 156. Naska, S., Lin, D. C., Miller, F. D., i Kaplan, D. R. (2010). p75NTR is an obligate signaling receptor required for cues that cause sympathetic neuron growth cone collapse. *Mol Cell Neurosci*, 45(2), 108-120. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2010.05.015>
 157. Neveu, I., i Arenas, E. (1996). Neurotrophins promote the survival and development of neurons in the cerebellum of hypothyroid rats in vivo. *J Cell Biol*, 133(3), 631-646. <https://doi.org/10.1083/jcb.133.3.631>
 158. Nicholson D. W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*, 6(11), 1028–1042. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400598>
 159. Nikolettou, V., Lickert, H., Frade, J. M., Rencurel, C., Giallonardo, P., Zhang, L., Bibel, M., i Barde, Y. A. (2010). Neurotrophin receptors TrkA and TrkC cause neuronal death whereas TrkB does not. *Nature*, 467(7311), 59-63. <https://doi.org/10.1038/nature09336>
 160. Noctor, S. C., Flint, A. C., Weissman, T. A., Dammerman, R. S., i Kriegstein, A. R. (2001). Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature*, 409(6821), 714-720. <https://doi.org/10.1038/35055553>
 161. Noctor, S. C., Martínez-Cerdeño, V., Ivic, L., i Kriegstein, A. R. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci*, 7(2), 136–144. <https://doi.org/10.1038/nn1172>
 162. Noctor, S. C., Martinez-Cerdeno, V., i Kriegstein, A. R. (2008). Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis. *J Comp Neurol*, 508(1), 28-44. <https://doi.org/10.1002/cne.21669>
 163. Nykjaer, A., i Willnow, T. E. (2012). Sortilin: a receptor to regulate neuronal viability and function. *Trends Neurosci*, 35(4), 261-270. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.01.003>
 164. Ohtaka-Maruyama, C., Okamoto, M., Endo, K., Oshima, M., Kaneko, N., Yura, K., Okado, H., Miyata, T., i Maeda, N. (2018). Synaptic transmission from subplate neurons controls radial migration of neocortical neurons. *Science*, 360(6386), 313-317. <https://doi.org/10.1126/science.aar2866>
 165. Ortega, J. A., i Alcantara, S. (2010). BDNF/MAPK/ERK-induced BMP7 expression in the developing cerebral cortex induces premature radial glia differentiation and impairs neuronal migration. *Cereb Cortex*, 20(9), 2132-2144. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhp275>

166. Paolino, A., Fenlon, L. R., Kozulin, P., Richards, L. J., i Suarez, R. (2018). Multiple events of gene manipulation via in pouch electroporation in a marsupial model of mammalian forebrain development. *J Neurosci Methods*, 293, 45-52. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2017.09.004>
167. Parthasarathy, S., Srivatsa, S., Weber, A. I., Gräber, N., Britanova, O. V., Borisova, E., Bessa, P., Ambrozkiwicz, M. C., Rosário, M., i Tarabykin, V. (2021). TrkC-T1, the Non-Catalytic Isoform of TrkC, Governs Neocortical Progenitor Fate Specification by Inhibition of MAP Kinase Signaling. *Cerebral Cortex*, 31(12), 5470-5486. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhab172>
168. Patterson, S. L., Abel, T., Deuel, T. A., Martin, K. C., Rose, J. C., i Kandel, E. R. (1996). Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron*, 16(6), 1137-1145. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80140-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80140-3)
169. Paulson, J. R., & Taylor, S. S. (1982). Phosphorylation of histones 1 and 3 and nonhistone high mobility group 14 by an endogenous kinase in HeLa metaphase chromosomes. *J Biol Chem.*, 257(11), 6064–6072.
170. Polleux, F., Whitford, K. L., Dijkhuizen, P. A., Vitalis, T., i Ghosh, A. (2002). Control of cortical interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signaling. *Development*, 129(13), 3147-3160. <https://doi.org/10.1242/dev.129.13.3147>
171. Price, D. J., Aslam, S., Tasker, L., i Gillies, K. (1997). Fates of the earliest generated cells in the developing murine neocortex. *J Comp Neurol*, 377(3), 414-422. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8989655>
172. Puehringer, D., Orel, N., Luningschrör, P., Subramanian, N., Herrmann, T., Chao, M. V., i Sendtner, M. (2013). EGF transactivation of Trk receptors regulates the migration of newborn cortical neurons. *Nat Neurosci*, 16(4), 407-415. <https://doi.org/10.1038/nn.3333>
173. Puzzolo, E., i Mallamaci, A. (2010). Cortico-cerebral histogenesis in the opossum *Monodelphis domestica*: generation of a hexalaminar neocortex in the absence of a basal proliferative compartment. *Neural Dev*, 5, 8. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-5-8>
174. Rakic, P. (1972). Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol*, 145(1), 61-83. <https://doi.org/10.1002/cne.901450105>
175. Reichardt, L. F. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 361(1473), 1545-1564. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1894>
176. Rico, B., Xu, B., i Reichardt, L. F. (2002). TrkB receptor signaling is required for establishment of GABAergic synapses in the cerebellum. *Nat Neurosci*, 5(3), 225-233. <https://doi.org/10.1038/nn808>
177. Rios, M., Fan, G., Fekete, C., Kelly, J., Bates, B., Kuehn, R., Lechan, R. M., i Jaenisch, R. (2001). Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. *Mol Endocrinol*, 15(10), 1748-1757. <https://doi.org/10.1210/mend.15.10.0706>
178. Rodriguez-Tebar, A., Dechant, G., i Barde, Y. A. (1991). Neurotrophins: structural relatedness and receptor interactions. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 331(1261), 255-258. <https://doi.org/10.1098/rstb.1991.0013>
179. Rosch, H., Schweigreiter, R., Bonhoeffer, T., Barde, Y. A., i Korte, M. (2005). The neurotrophin receptor p75NTR modulates long-term depression and regulates the expression of AMPA receptor subunits in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(20), 7362-7367. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502460102>

180. Rose, R. W. (1989). Embryonic growth rates of marsupials with a note on monotremes. *Journal of Zoology*, 218(1), 11-16.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1989.tb02521.x>
181. Sahin, M., i Hockfield, S. (1990). Molecular identification of the Lugaro cell in the cat cerebellar cortex. *J Comp Neurol*, 301(4), 575-584.
<https://doi.org/10.1002/cne.903010407>
182. Sanchez-Villagra, M. R., i Sultan, F. (2002). The cerebellum at birth in therian mammals, with special reference to rodents. *Brain Behav Evol*, 59(3), 101-113.
<https://doi.org/10.1159/000064158>
183. Saunders, N. R., Adam, E., Reader, M., i Mollgard, K. (1989). Monodelphis domestica (grey short-tailed opossum): an accessible model for studies of early neocortical development. *Anat Embryol (Berl)*, 180(3), 227-236.
<https://doi.org/10.1007/BF00315881>
184. Saunders, N. R., Deal, A., Knott, G. W., Varga, Z. M., i Nicholls, J. G. (1995). REPAIR AND RECOVERY FOLLOWING SPINAL CORD INJURY IN A NEONATAL MARSUPIAL (MONODELPHIS DOMESTICA). *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 22(8), 518-526.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.1995.tb02060.x>
185. Schwartz, P. M., Borghesani, P. R., Levy, R. L., Pomeroy, S. L., i Segal, R. A. (1997). Abnormal cerebellar development and foliation in BDNF^{-/-} mice reveals a role for neurotrophins in CNS patterning. *Neuron*, 19(2), 269-281.
[https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80938-1](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80938-1)
186. Segal, R. A., Pomeroy, S. L., i Stiles, C. D. (1995). Axonal growth and fasciculation linked to differential expression of BDNF and NT3 receptors in developing cerebellar granule cells. *J Neurosci*, 15(7 Pt 1), 4970-4981.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7623126>
187. Selwood, L., i Johnson, M. H. (2006). Trophoblast and hypoblast in the monotreme, marsupial and eutherian mammal: evolution and origins. *BioEssays*, 28(2), 128-145. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bies.20360>
188. Sessa, A., Mao, C. A., Hadjantonakis, A. K., Klein, W. H., i Broccoli, V. (2008). Tbr2 directs conversion of radial glia into basal precursors and guides neuronal amplification by indirect neurogenesis in the developing neocortex. *Neuron*, 60(1), 56-69. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.09.028>
189. Seto, Y., Nakatani, T., Masuyama, N., Taya, S., Kumai, M., Minaki, Y., Hamaguchi, A., Inoue, Y. U., Inoue, T., Miyashita, S., Fujiyama, T., Yamada, M., Chapman, H., Campbell, K., Magnuson, M. A., Wright, C. V., Kawaguchi, Y., Ikenaka, K., Takebayashi, H., . . . Hoshino, M. (2014). Temporal identity transition from Purkinje cell progenitors to GABAergic interneuron progenitors in the cerebellum. *Nat Commun*, 5, 3337. <https://doi.org/10.1038/ncomms4337>
190. Silos-Santiago, I., Molliver, D. C., Ozaki, S., Smeyne, R. J., Fagan, A. M., Barbacid, M., i Snider, W. D. (1995). Non-TrkA-expressing small DRG neurons are lost in TrkA deficient mice. *J Neurosci*, 15(9), 5929-5942.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7666178>
191. Simeone, A., Acampora, D., Gulisano, M., Stornaiuolo, A., i Boncinelli, E. (1992). Nested expression domains of four homeobox genes in developing rostral brain. *Nature*, 358(6388), 687-690. <https://doi.org/10.1038/358687a0>
192. Simeone, A., Acampora, D., Mallamaci, A., Stornaiuolo, A., D'Apice, M. R., Nigro, V., i Boncinelli, E. (1993). A vertebrate gene related to orthodenticle contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo. *EMBO J*, 12(7), 2735-2747.

- <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb05935.x>
193. Skok J. (2018). On the presence and absence of suckling order in polytocous mammals. *Behav Processes*, 148, 10–15.
<https://doi.org/10.1016/j.beproc.2017.12.025>
 194. Smaers, J. B., Turner, A. H., Gomez-Robles, A., i Sherwood, C. C. (2018). A cerebellar substrate for cognition evolved multiple times independently in mammals. *Elife*, 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.35696>
 195. Smart, I. H. (1973). Proliferative characteristics of the ependymal layer during the early development of the mouse neocortex: a pilot study based on recording the number, location and plane of cleavage of mitotic figures. *J Anat*, 116(Pt 1), 67-91. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4777782>
 196. Smeyne, R. J., Klein, R., Schnapp, A., Long, L. K., Bryant, S., Lewin, A., Lira, S. A., i Barbacid, M. (1994). Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene. *Nature*, 368(6468), 246-249.
<https://doi.org/10.1038/368246a0>
 197. Smith, K. K. (1994). Development of craniofacial musculature in *Monodelphis domestica* (marsupialia, didelphidae). *Journal of Morphology*, 222(2), 149-173.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jmor.1052220204>
 198. Smith, K. K. (2001). Early development of the neural plate, neural crest and facial region of marsupials. *J Anat*, 199(Pt 1-2), 121-131.
<https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2001.19910121.x>
 199. Smith, K. K. (2006). Craniofacial development in marsupial mammals: Developmental origins of evolutionary change. *Developmental Dynamics*, 235(5), 1181-1193. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/dvdy.20676>
 200. Sudarov, A., i Joyner, A. L. (2007). Cerebellum morphogenesis: the foliation pattern is orchestrated by multi-cellular anchoring centers. *Neural Dev*, 2, 26.
<https://doi.org/10.1186/1749-8104-2-26>
 201. Sultan, F., i Braitenberg, V. (1993). Shapes and sizes of different mammalian cerebella. A study in quantitative comparative neuroanatomy. *J Hirnforsch*, 34(1), 79-92. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8376757>
 202. Sultan, F., i Glickstein, M. (2007). The cerebellum: Comparative and animal studies. *Cerebellum*, 6(3), 168-176. <https://doi.org/10.1080/14734220701332486>
 203. Tabata, T., Sawada, S., Araki, K., Bono, Y., Furuya, S., & Kano, M. (2000). A reliable method for culture of dissociated mouse cerebellar cells enriched for Purkinje neurons. *J Neurosci Methods*, 104(1), 45–53.
[https://doi.org/10.1016/s0165-0270\(00\)00323-x](https://doi.org/10.1016/s0165-0270(00)00323-x)
 204. Takahashi, M., Sato, K., Nomura, T., i Osumi, N. (2002). Manipulating gene expressions by electroporation in the developing brain of mammalian embryos. *Differentiation*, 70(4-5), 155-162.
<https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.2002.700405.x>
 205. Takebayashi, H., Nabeshima, Y., Yoshida, S., Chisaka, O., Ikenaka, K., i Nabeshima, Y. (2002). The basic helix-loop-helix factor olig2 is essential for the development of motoneuron and oligodendrocyte lineages. *Curr Biol*, 12(13), 1157-1163. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(02\)00926-0](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)00926-0)
 206. Tarabykin, V., Stoykova, A., Usman, N., i Gruss, P. (2001). Cortical upper layer neurons derive from the subventricular zone as indicated by Svet1 gene expression. *Development*, 128(11), 1983-1993.
<https://doi.org/10.1242/dev.128.11.1983>
 207. Tauszig-Delamasure, S., Yu, L.-Y., Cabrera, J. R., Bouzas-Rodriguez, J., Mermet-Bouvier, C., Guix, C., Bordeaux, M.-C., Arumäe, U., i Mehlen, P. (2007).

- The TrkC receptor induces apoptosis when the dependence receptor notion meets the neurotrophin paradigm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(33), 13361-13366. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.0701243104>
208. Teng, H. K., Teng, K. K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R. D., Kermani, P., Torkin, R., Chen, Z. Y., Lee, F. S., Kraemer, R. T., Nykjaer, A., i Hempstead, B. L. (2005). ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci*, 25(22), 5455-5463. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5123-04.2005>
 209. Teng, K. K., Felice, S., Kim, T., i Hempstead, B. L. (2010). Understanding proneurotrophin actions: Recent advances and challenges. *Dev Neurobiol*, 70(5), 350-359. <https://doi.org/10.1002/dneu.20768>
 210. Tessarollo, L., Tsoulfas, P., Martin-Zanca, D., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., i Parada, L. F. (1993). trkC, a receptor for neurotrophin-3, is widely expressed in the developing nervous system and in non-neuronal tissues. *Development*, 118(2), 463-475. <https://doi.org/10.1242/dev.118.2.463>
 211. Thomas, K. R., i Capecchi, M. R. (1990). Targeted disruption of the murine int-1 proto-oncogene resulting in severe abnormalities in midbrain and cerebellar development. *Nature*, 346(6287), 847-850. <https://doi.org/10.1038/346847a0>
 212. Vaglia, J. L., i Smith, K. K. (2003). Early differentiation and migration of cranial neural crest in the opossum, *Monodelphis domestica*. *Evol Dev*, 5(2), 121-135. <https://doi.org/10.1046/j.1525-142x.2003.03019.x>
 213. Van Essen D. C. (2020). A 2020 view of tension-based cortical morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117(52), 32868–32879. Advance online publication. <https://doi.org/10.1073/pnas.2016830117>
 214. Vasistha, N. A., Garcia-Moreno, F., Arora, S., Cheung, A. F., Arnold, S. J., Robertson, E. J., i Molnar, Z. (2015). Cortical and Clonal Contribution of Tbr2 Expressing Progenitors in the Developing Mouse Brain. *Cereb Cortex*, 25(10), 3290-3302. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhu125>
 215. Vitalis, T., i Rossier, J. (2011). New insights into cortical interneurons development and classification: contribution of developmental studies. *Dev Neurobiol*, 71(1), 34-44. <https://doi.org/10.1002/dneu.20810>
 216. Voogd, J., i Glickstein, M. (1998). The anatomy of the cerebellum. *Trends Neurosci*, 21(9), 370–375. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(98\)01318-6](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(98)01318-6)
 217. Voogd, J. (2014). What we do not know about cerebellar systems neuroscience. *Front Syst Neurosci*, 8, 227. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2014.00227>
 218. Wang, K. C., Kim, J. A., Sivasankaran, R., Segal, R., i He, Z. (2002). P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature*, 420(6911), 74-78. <https://doi.org/10.1038/nature01176>
 219. Wang, V. Y., Rose, M. F., i Zoghbi, H. Y. (2005). Math1 expression redefines the rhombic lip derivatives and reveals novel lineages within the brainstem and cerebellum. *Neuron*, 48(1), 31-43. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.08.024>
 220. Wang, V. Y., i Zoghbi, H. Y. (2001). Genetic regulation of cerebellar development. *Nat Rev Neurosci*, 2(7), 484-491. <https://doi.org/10.1038/35081558>
 221. Wang, W. Z., Oeschger, F. M., Montiel, J. F., Garcia-Moreno, F., Hoerder-Suabedissen, A., Krubitzer, L., Ek, C. J., Saunders, N. R., Reim, K., Villalon, A., i Molnar, Z. (2011). Comparative aspects of subplate zone studied with gene expression in sauropsids and mammals. *Cereb Cortex*, 21(10), 2187-2203. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhq278>
 222. Wang, X., Tsai, J. W., LaMonica, B., i Kriegstein, A. R. (2011). A new subtype of progenitor cell in the mouse embryonic neocortex. *Nat Neurosci*, 14(5), 555-561.

- <https://doi.org/10.1038/nn.2807>
223. Wassarman, K. M., Lewandoski, M., Campbell, K., Joyner, A. L., Rubenstein, J. L., Martinez, S., i Martin, G. R. (1997). Specification of the anterior hindbrain and establishment of a normal mid/hindbrain organizer is dependent on Gbx2 gene function. *Development*, 124(15), 2923-2934.
<https://doi.org/10.1242/dev.124.15.2923>
224. Watson, F. L., Porcionatto, M. A., Bhattacharyya, A., Stiles, C. D., i Segal, R. A. (1999). TrkA glycosylation regulates receptor localization and activity. *J Neurobiol*, 39(2), 323-336.
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4695\(199905\)39:2<323::aid-neu15>3.0.co;2-4](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4695(199905)39:2<323::aid-neu15>3.0.co;2-4)
225. Wei, Y., Yu, L., Bowen, J., Gorovsky, M. A., i Allis, C. D. (1999). Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell*, 97(1), 99-109.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80718-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80718-7)
226. Wong, S. T., Henley, J. R., Kanning, K. C., Huang, K. H., Bothwell, M., i Poo, M. M. (2002). A p75(NTR) and Nogo receptor complex mediates repulsive signaling by myelin-associated glycoprotein. *Nat Neurosci*, 5(12), 1302-1308.
<https://doi.org/10.1038/nn975>
227. Woo, N. H., Teng, H. K., Siao, C. J., Chiaruttini, C., Pang, P. T., Milner, T. A., Hempstead, B. L., i Lu, B. (2005). Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat Neurosci*, 8(8), 1069-1077.
<https://doi.org/10.1038/nn1510>
228. Woolley, A. G., Tait, K. J., Hurren, B. J., Fisher, L., Sheard, P. W., i Duxson, M. J. (2008). Developmental loss of NT-3 in vivo results in reduced levels of myelin-specific proteins, a reduced extent of myelination and increased apoptosis of Schwann cells. *Glia*, 56(3), 306-317. <https://doi.org/10.1002/glia.20614>
229. Zagrebelsky, M., Holz, A., Dechant, G., Barde, Y. A., Bonhoeffer, T., i Korte, M. (2005). The p75 neurotrophin receptor negatively modulates dendrite complexity and spine density in hippocampal neurons. *J Neurosci*, 25(43), 9989-9999.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2492-05.2005>
230. Zanin, J. P., Abercrombie, E., i Friedman, W. J. (2016). Proneurotrophin-3 promotes cell cycle withdrawal of developing cerebellar granule cell progenitors via the p75 neurotrophin receptor. *Elife*, 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.16654>
231. Zhang, L., i Goldman, J. E. (1996). Developmental fates and migratory pathways of dividing progenitors in the postnatal rat cerebellum. *J Comp Neurol*, 370(4), 536-550.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19960708\)370:4<536::AID-CNE9>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960708)370:4<536::AID-CNE9>3.0.CO;2-5)
232. Zhou, P., Porcionatto, M., Pilapil, M., Chen, Y., Choi, Y., Tolias, K. F., Bikoff, J. B., Hong, E. J., Greenberg, M. E., i Segal, R. A. (2007). Polarized signaling endosomes coordinate BDNF-induced chemotaxis of cerebellar precursors. *Neuron*, 55(1), 53-68. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.05.030>
233. Zhou, Q., Wang, S., i Anderson, D. J. (2000). Identification of a novel family of oligodendrocyte lineage-specific basic helix-loop-helix transcription factors. *Neuron*, 25(2), 331-343. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80898-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80898-3)

8. Finansowanie

1. Grant Narodowego Centrum Nauki OPUS „Molekularne mechanizmy rozwoju komórek Purkiniego mózdzku u oposa. Skonstruowanie transgenicznego oposa” (2015/17/B/NZ4/02410); kierownik projektu: dr hab. Ruzanna Dżawadian.
2. Fundusze statutowe Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN.