

**Anna Krysiak**

Rola czynnika odpowiedzi na surowicę – SRF w procesie  
dojrzewania kolców dendrytycznych

Praca doktorska  
wykonana w Pracowni Neurobiologii  
Centrum Badań Plastyczności Neuronalej  
i Chorób Mózgu BRAINCITY  
Instytutu Biologii Doświadczalnej  
im. M. Nenckiego PAN

**PROMOTOR:**  
**dr hab. Katarzyna Kalita-Bykowska,**  
**profesor Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN**

Warszawa, rok 2022

*Szczególne podziękowania kieruję do mojej promotorki  
dr hab. Katarzyny Kality-Bykowskiej za możliwości rozwoju  
naukowego, zaufanie oraz codzienną wyrozumiałość i cierpliwość.  
Za pomoc w konsekwentnym dążeniu do celu i niepoddaniu się.*

*Serdecznie dziękuję prof. Leszkowi Kaczmarkowi  
za możliwość wykonania pracy doktorskiej w Pracowni Neurobiologii,  
za wsparcie merytoryczne oraz bycie autorytetem.*

*Bardzo dziękuję wszystkim członkom Pracowni Neurobiologii  
i innym pracownikom Instytutu, z którymi miałam przyjemność  
współpracować. Dziękuję Wam za przemiłą atmosferę i życzliwość.*

Badania zaprezentowane w niniejszej pracy doktorskiej zostały zrealizowane dzięki wsparciu Narodowego Centrum Nauki, grant Sonata Bis 2 numer 2012/07/E/NZ3/01814 oraz Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN.



# **Spis treści**

<b>Streszczenie</b> .....	<b>7</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>9</b>
<b>Wykaz najczęściej stosowanych skrótów</b> .....	<b>11</b>
<b>1. Wprowadzenie</b> .....	<b>13</b>
<b>1.1. Synapsa chemiczna</b> .....	<b>13</b>
1.1.1. Plastyczność synaptyczna .....	14
<b>1.2. Kolce dendrytyczne neuronów piramidowych</b> .....	<b>17</b>
1.2.1. Kształt kolców dendrytycznych .....	17
1.2.2. Budowa kolców dendrytycznych.....	18
1.2.3. Receptory jonotropowe glutaminianu .....	21
<b>1.3. Wczesne etapy rozwoju połączeń nerwowych</b> .....	<b>22</b>
1.3.1. Modele zwierzęce w badaniach neurorozwojowych.....	24
1.3.2. Modele <i>in vitro</i> w badaniach neurorozwojowych.....	25
<b>1.4. Proces dojrzewania kolców dendrytycznych</b> .....	<b>26</b>
1.4.1. Zmiany kształtów kolców dendrytycznych .....	26
1.4.2. Rozwojowe zmiany receptorów NMDA i AMPA .....	28
1.4.3. Zmiany w poziomie białek kotwiczących podczas rozwoju mózgu.....	29
<b>1.5. Zaburzenia w rozwoju kolców dendrytycznych</b> .....	<b>30</b>
1.5.1. Kolce dendrytyczne a niepełnosprawność intelektualna.....	31
1.5.2. Kolce dendrytyczne a zaburzenia ze spektrum autyzmu .....	31
1.5.3. Kolce dendrytyczne a schizofrenia .....	32
1.5.4. Kolce dendrytyczne a zaburzenia afektywne dwubiegunowe .....	32
<b>1.6. Czynniki genetyczne w zaburzeniach neurorozwojowych OUN</b> .....	<b>33</b>
<b>1.7. Czynniki odpowiedzi na surowicę – SRF</b> .....	<b>34</b>
1.7.1. Budowa SRF .....	34
1.7.2. Aktywacja SRF.....	35
1.7.3. Regulacja aktywności SRF.....	36
<b>1.8. Ekspresja genów plastyczności neuronalnej regulowana przez SRF</b> .....	<b>40</b>
<b>1.9. Rola szlaku MRTF/SRF w funkcjonowaniu OUN</b> .....	<b>42</b>
1.9.1. MRTF i SRF w kontekście występowania zaburzeń neurorozwojowych.....	44
<b>2. Cele pracy</b> .....	<b>46</b>
<b>3. Materiały i metody</b> .....	<b>47</b>
<b>3.1. Podstawowe odczynniki chemiczne</b> .....	<b>47</b>
<b>3.2. Najczęściej stosowane roztwory</b> .....	<b>47</b>
<b>3.3. Materiały użyte do hodowli bakteryjnych</b> .....	<b>48</b>
<b>3.4. Wektory plazmidowe</b> .....	<b>49</b>
<b>3.5. Zwierzęta</b> .....	<b>50</b>
3.5.1. Materiał zwierzęcy do wyprowadzania pierwotnych hodowli neuronalnych .....	50
3.5.2. Zwierzęta wykorzystane w doświadczeniach.....	50
<b>3.6. Odczynniki stosowane w pierwotnych hodowlach neuronalnych</b> .....	<b>51</b>
<b>3.7. Skład roztworów i pożywek stosowanych w pierwotnych hodowlach neuronalnych</b> .....	<b>52</b>

<b>3.8. Hodowle bakteryjne</b> .....	<b>53</b>
3.8.1. Warunki hodowli bakteryjnych .....	53
3.8.2. Transformacja bakterii kompetentnych metodą szoku cieplnego .....	53
3.8.3. Przechowywanie szczepów bakterii.....	54
<b>3.9. Izolowanie plazmidowego DNA</b> .....	<b>54</b>
<b>3.10. Oznaczanie czystości i stężenia preparatów DNA i RNA</b> .....	<b>54</b>
<b>3.11. Rozdział elektroforetyczny DNA</b> .....	<b>55</b>
<b>3.12. Klonowanie wektorów plazmidowych</b> .....	<b>55</b>
<b>3.13. Doświadczenia z zastosowaniem myszy transgenicznych</b> .....	<b>58</b>
3.13.1. Hodowla myszy transgenicznych szczepu <i>Sr<sup>fl/fl</sup>CaMKCre</i> .....	58
3.13.2. Genotypowanie myszy .....	58
3.13.3. Pobieranie i utrwalanie tkanek .....	60
<b>3.14. Hodowle komórek neuronalnych</b> .....	<b>60</b>
3.14.1. Przygotowanie szkiełek do hodowli hipokampalnych <i>in vitro</i> .....	60
3.14.2. Zakładanie szczurzej hodowli hipokampalnej <i>in vitro</i> .....	61
3.14.3. Zakładanie mysiej hodowli hipokampalnej <i>in vitro</i> .....	62
<b>3.15. Transfekcja neuronów hipokampalnych</b> .....	<b>62</b>
<b>3.16. Transdukcja neuronów hipokampalnych wektorami wirusowymi</b> .....	<b>63</b>
<b>3.17. Pomiar aktywności transkrypcyjnej</b> .....	<b>64</b>
<b>3.18. Sieciowanie molekularne białek powierzchniowych</b> .....	<b>64</b>
<b>3.19. Utrwalanie komórek z pierwotnych hodowli neuronalnych</b> .....	<b>65</b>
<b>3.20. Metody pracy z białkami</b> .....	<b>65</b>
3.20.1. Przygotowanie ekstraktów białkowych z pierwotnych hodowli neuronalnych .....	65
3.20.2. Przygotowanie ekstraktów białkowych z mózgów .....	65
3.20.3. Oznaczenie stężenia białek .....	66
3.20.4. Rozdział elektroforetyczny białek w warunkach denaturujących.....	66
3.20.5. Transfer elektroforetyczny białek .....	67
3.20.6. Technika immunodetekcji Western Blot.....	68
<b>3.21. Rejestrowanie i analiza mEPSCs neuronów hodowanych <i>in vitro</i></b> .....	<b>69</b>
<b>3.22. Izolacja RNA, odwrotna transkrypcja oraz reakcja qRT-PCR</b> .....	<b>70</b>
<b>3.23. Techniki immunocytochemiczne i immunohistochemiczne</b> .....	<b>71</b>
3.23.1. Barwienie immunofluorescencyjne utrwalonych neuronów.....	71
3.23.2. Przeżyciowe znakowanie receptorów powierzchniowych neuronów hodowanych <i>in vitro</i> .....	72
3.23.3. Barwienie immunohistochemiczne z detekcją DAB.....	73
3.23.4. Barwienie histologiczne metoda Nissla.....	73
3.23.5. Znakowanie skrawków hipokampalnych barwnikiem Dil .....	74
<b>3.24. Zbieranie i analiza obrazów mikroskopowych</b> .....	<b>75</b>
3.24.1. Mikroskopia fluorescencyjna .....	75
3.24.2. Mikroskopia świetlna .....	76
<b>3.25. Analizy uzyskanych obrazów mikroskopowych</b> .....	<b>77</b>
3.25.1. Analiza kształtów kolców dendrytycznych .....	77
3.25.2. Analiza intensywności fluorescencji.....	77
<b>3.26. Analiza statystyczna</b> .....	<b>78</b>
<b>4. Wyniki</b> .....	<b>80</b>
<b>4.1. Ocena modelu delekcji <i>SRF</i> na wczesnych etapach rozwoju postnatalnego myszy</b> .....	<b>80</b>

4.2. Wpływ obniżonego poziomu białka SRF na budowę kolców dendrytycznych myszy .....	84
4.3. Specyficzność i efektywność obniżenia poziomu SRF w modelu <i>in vitro</i> .....	86
4.4. Wpływ SRF na budowę kolców dendrytycznych w modelu <i>in vitro</i> .....	88
4.5. Wpływ białka SRF na aktywność neuronalną i procesy plastyczności .....	90
4.6. Ocena poziomu receptorów błonowych AMPA neuronów z obniżonym poziomem SRF: metoda immunocytochemiczna .....	95
4.7. Ocena poziomu receptorów błonowych AMPA neuronów z obniżonym poziomem SRF: metody biochemiczne.....	97
4.8. Ocena poziomu receptorów błonowych AMPA w alternatywnym modelu deplecji SRF .	99
4.9. Zbadanie czy zmiany w poziomie podjednostek receptora AMPA są regulowane przez transkrypcję zależną od SRF .....	101
4.10. Sprawdzenie czy zmiany w kształcie kolców dendrytycznych są regulowane przez aktywność kofaktorów MRTF .....	105
<b>5. Dyskusja.....</b>	<b>108</b>
5.1. Zastosowane metody i techniki badawcze .....	108
5.1.1. Myszy transgeniczne jako model badawczy dojrzewania kolców dendrytycznych w rozwoju ..	108
5.1.2. Dysocjowane hodowle hipokampalne <i>in vitro</i> jako model badawczy dojrzewania kolców dendrytycznych w rozwoju.....	109
5.1.3. Technika interferencji RNA jako metoda obniżenia poziomu badanego białka .....	111
5.1.4. System Cre/loxP jako metoda delekcji badanego genu .....	113
5.2. Ekspresja i aktywność czynnika transkrypcyjnego SRF jest regulowana w rozwoju .....	115
5.3. Obniżony poziom SRF w rozwoju powoduje zaburzenia kształtu, ale nie gęstości kolców dendrytycznych .....	117
5.4. Obniżony poziom SRF zaburza na właściwości elektrofizjologiczne neuronów .....	120
5.5. Wpływ białka SRF na procesy plastyczności homeostatycznej.....	123
5.6. Czynniki transkrypcyjne SRF reguluje poziom podjednostek receptora AMPA .....	124
5.7. Regulacja kształtu kolców dendrytycznych jest zależna od kofaktorów MRTF .....	126
5.8. Obniżony poziom SRF w rozwoju wpływa na zachowania społeczne dorosłych myszy .	127
<b>6. Podsumowanie i wnioski .....</b>	<b>129</b>
<b>7. Bibliografia .....</b>	<b>130</b>
<b>8. Lista publikacji doktorantki .....</b>	<b>164</b>

## Streszczenie

Przekazywanie informacji między neuronami w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) zachodzi przede wszystkim na synapsach. Część postsynaptyczna większości synaps pobudzających zlokalizowana jest na kolcach dendrytycznych, będących niewielkimi wyspecjalizowanymi wypustkami błonowymi komórek nerwowych. Kolce dendrytyczne są strukturami wysoce dynamicznymi, podlegającymi procesom plastyczności strukturalnej i funkcjonalnej. Wykazano, iż zmiany ich kształtu korelują ze stopniem dojrzałości synaps oraz z siłą połączeń neuronalnych.

Dla efektywnego zachodzenia procesów zapamiętywania i uczenia się kluczowe jest prawidłowe działanie synaps. Ponadto, w obrazie klinicznym wielu chorób neurorozwojowych, takich jak zaburzenia ze spektrum autyzmu, zespół łamliwego chromosomu X czy zespół Retta, obserwowane są nieprawidłowości w procesie dojrzewania lub liczbie kolców dendrytycznych. Kształtowanie się i dojrzewanie kolców dendrytycznych jest zjawiskiem bardzo złożonym, a molekularne mechanizmy leżące u podstaw regulacji tych procesów nadal nie są w pełni poznane.

Wyniki najnowszych badań wykazały zależność pomiędzy występowaniem zaburzeń neurorozwojowych u ludzi, a mutacjami punktowymi w obrębie genów, których ekspresja modulowana jest przez czynnik odpowiedzi na surowicę (ang. *Serum Response Factor*, SRF) lub jego kofaktory. SRF jest czynnikiem transkrypcyjnym regulującym procesy fizjologiczne, jak i patologiczne zachodzące w neuronach. Szeroko udokumentowany w literaturze jest udział SRF w takich zjawiskach jak: długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (ang. *Long-Term potentiation*, LTP), długotrwałe osłabienie synaptyczne (ang. *Long-Term depression*, LTD), regulacja ekspresji genów zależnych od aktywności neuronalnej, prawidłowe tworzenie sieci neuronalnych, czy epileptogeneza. Aktywność SRF regulują białka będące jego koaktywatorami m. in. białka podobne do miokardyny, MRTF (ang. *Myocardin-related transcription factors*). Dla tych białek także zaobserwowano związek pomiędzy mutacjami pojedynczych nukleotydów w obrębie ich genów, a występowaniem zaburzeń ze spektrum autyzmu czy schizofrenii.

Dotychczas rola białka SRF i jego koaktywatorów w procesie powstawania i dojrzewania kolców dendrytycznych była nieznana. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy wykazały, iż SRF lub MRTF regulują proces dojrzewania kolców dendrytycznych oraz funkcjonowanie synaps w rozwijających się neuronach. Obniżenie poziomu białka SRF *in vitro*, jak i *in vivo* skutkowało zaburzeniami struktury kolców dendrytycznych i wzrostem liczby kolców niedojrzałych, bez zmian w ogólnej liczbie tych wypustek. Co więcej wykazano, iż obniżenie poziomu MRTF ma analogiczny wpływ na budowę kolców dendrytycznych, jak deplecja SRF. Zaobserwowanym zmianom strukturalnym towarzyszyło obniżenie poziomu białek

podjednostek receptora AMPA: GluA1 i GluA2 oraz zaburzenia neurotransmisji pobudzającej.

Podsumowując, niniejsza praca po raz pierwszy pokazuje znaczący udział czynnika transkrypcyjnego SRF i jego kofaktorów w regulacji procesów dojrzewania i funkcji kolców dendrytycznych. Odkryto, iż SRF jest zaangażowany nie tylko w procesy zachodzące w dorosłym mózgu, lecz także w mechanizmy kluczowe na wczesnych etapach rozwoju postnatalnego.



## Abstract

The transmission of information between neurons in the central nervous system (CNS) occurs mainly at synapses. The postsynaptic part of most excitatory synapses in the brain is located at dendritic spines, which are small membranous protrusions of nerve cells. Dendritic spines are highly dynamic structures, undergoing structural and functional plasticity. Changes in the dendritic spine shape correlate with the degree of maturation of synapses and the strength of neuronal connections.

The proper synapse function is crucial for effective memory and learning. Furthermore, abnormalities in the maturation process or in the number of dendritic spines are frequently observed in the clinical picture of different neurodevelopmental diseases such as autism spectrum disorders, fragile X syndrome or Rett syndrome. Formation and maturation of dendritic spines is a very complex phenomenon, and despite numerous studies, the molecular mechanisms underlying the processes of synapse formation, and development are still not fully understood.

Recent analyses have shown a correlation between the occurrence of certain neurodevelopmental disorders in humans and point mutations within genes whose expression is regulated by Serum Response Factor (SRF) or its cofactors. SRF protein is a transcription factor significantly involved in both physiological and pathological processes occurring in neurons. SRF regulates long-term potentiation (LTP), long-term depression (LTD), neuronal activity-dependent gene expression, neuronal network formation or epileptogenesis. SRF activity is controlled by its coactivators including myocardin-related transcription factors, MRTF. Moreover, there is also a relationship between single nucleotide mutations within *mrtf* genes, and the occurrence of autism spectrum disorders or schizophrenia.

Until now, the role of SRF protein and its coactivators on the process of dendritic spine formation and maturation was unknown. The results presented herein showed that SRF or MRTF regulates dendritic spine maturation and synapse function in developing neurons. Silencing SRF expression *in vitro* and *in vivo* impaired dendritic spine structure and increased the number of immature spines with no apparent changes in their overall density. Moreover, downregulation of MRTF protein had a similar effect on dendritic spine morphology as SRF depletion. Additionally, the observed structural changes were accompanied by decreased levels of AMPA receptor

subunits – GluA1 and GluA2, together with functional changes in the excitatory neurotransmission.

The following work demonstrates, for the first time, the significant involvement of the transcription factor SRF and its cofactors in the regulation of dendritic spine maturation and function. SRF was found to be involved not only in adult brain processes but also in key mechanisms during early postnatal development.

## Wykaz najczęściej stosowanych skrótów

- 4-OHT – (ang. *4-hydroxytamoxifen*) 4-hydroksytamoksyfen
- AAV – (ang. *adeno-associated virus*) wirusy związane z adenowirusami
- AMPA – (ang.  *$\alpha$ -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-isoxazolepropionian*)  
kwas  $\alpha$ -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy
- CaMKII – (ang.  *$Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II*)  
kinaza zależna od jonów wapnia i kalmoduliny typu II
- cKO – (ang. *conditional knock-out*) mysz z warunkową delecją genu
- DIV – (ang. *day in vitro*) dzień hodowli *in vitro*
- EPSP – (ang. *excitatory postsynaptic potential*)  
postsynaptyczny potencjał pobudzający
- GFP – (ang. *green fluorescent protein*) białko zielonej fluorescencji
- IEG – (ang. *immediate early gene*) gen wczesnej odpowiedzi
- LTD – (ang. *long-term depression*) długotrwałe osłabienie synaptyczne
- LTP – (ang. *long-term potentiation*) długotrwałe wzmocnienie synaptyczne
- MAGUK – (ang. *membrane-associated guanylate kinase*)  
kinaza guanylanowa związana z błoną
- mEPSCs – (ang. *miniature excitatory postsynaptic currents*)  
miniaturowe pobudzające prądy postsynaptyczne
- MRTF – (ang. *myocardin-related transcription factors*)  
koaktywatory podobne do miokardyny
- NMDA – (ang. *N-methyl-D-aspartic acid*) kwas N-metylo-D-asparaginowy
- NLS – (ang. *nuclear localization signal*) sygnał lokalizacji jądrowej
- OUN – (ang. *central nervous system, CNS*) ośrodkowy układ nerwowy
- P – (ang. *postnatal day*) dzień życia po urodzeniu
- PBS – (ang. *phosphate-buffered saline*) zbuforowany roztwór soli fizjologicznej
- PFA – (ang. *paraformaldehyde*) paraformaldehyd
- PCR – (ang. *polymerase chain reaction*) reakcja łańcuchowa polimerazy
- PSD – (ang. *postsynaptic density*) zagęszczenie postsynaptyczne
- SEM – (ang. *standard error of measurements*) błąd standardowy średniej
- shRNA – (ang. *short-hairpin RNA*) krótka sekwencja RNA o strukturze szpilki do włosów

SRE – (ang. *serum response element*) sekwencja DNA rozpoznawana przez SRF

SRF – (ang. *serum response factor*) czynnik odpowiedzi na surowicę

qRT-PCR – (ang. *quantitative real-time reverse transcriptase-PCR*)

ilościowa reakcja PCR w czasie rzeczywistym

WT – (ang. *wild type*) myszy o niezmodyfikowanym genotypie

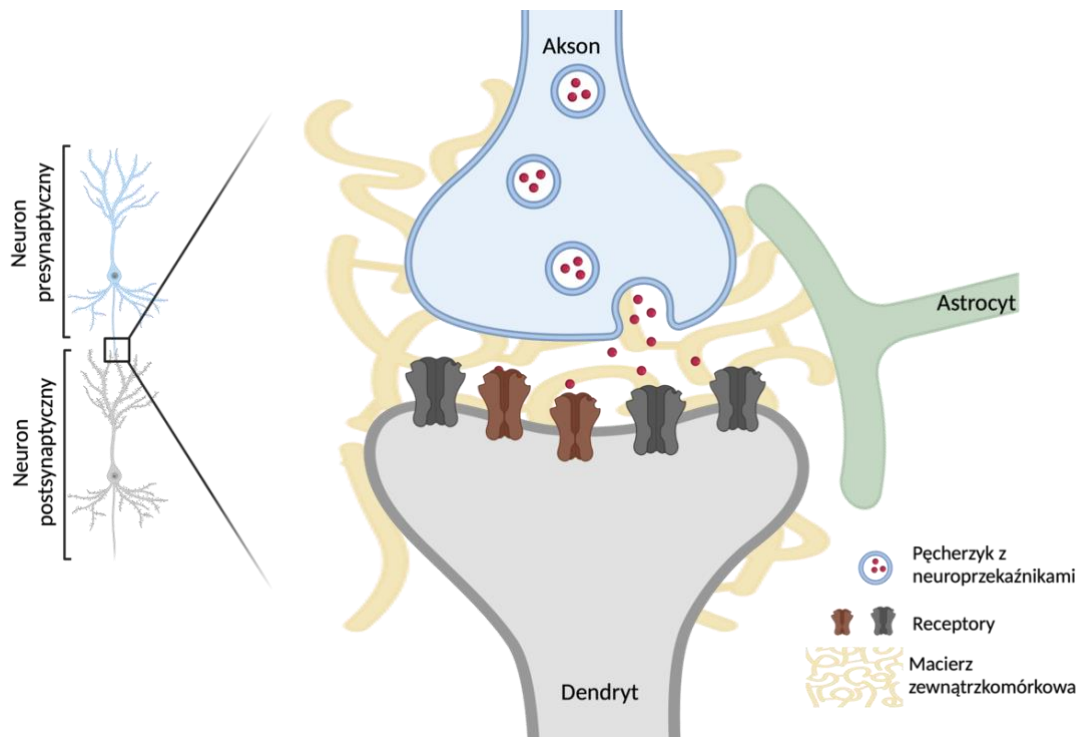
# 1. Wprowadzenie

## 1.1. Synapsa chemiczna

Ludzki mózg jest wyjątkowo złożoną strukturą, której prawidłowe funkcjonowanie zależy od skoordynowanego działania ponad 86 miliardów komórek nerwowych (Azevedo i in., 2009). Rozwój mózgu to skomplikowany i wieloetapowy proces, który rozpoczyna się już w drugim tygodniu po zapłodnieniu i trwa intensywnie przez ponad dwadzieścia lat, aż do okresu wczesnej młodości (Tierney i Nelson, 2009). Jednym z najważniejszych etapów ontogenezy jest utworzenie prawidłowych sieci neuronowych, w których neurony komunikują się ze sobą lub z innymi typami komórek przekazując sygnały poprzez synapsy. Jednym z typów synaps są synapsy chemiczne. Sygnały pobudzające są zazwyczaj przekazywane za pośrednictwem synaps, których część presynaptyczną stanowi zakończenie aksonu jednej komórki, a elementem postsynaptycznym jest kolec dendrytyczny znajdujący się na dendrycie drugiego neuronu. W przypadku synaps chemicznych, zakończenia presynaptyczne zawierają neuroprzekaźniki upakowane w pęcherzyki synaptyczne. Gdy impuls nerwowy dociera do zakończeń aksonu, powoduje depolaryzację błony presynaptycznej w wyniku czego następuje otwarcie kanałów  $Ca^{2+}$  bramkowanych napięciem, co umożliwia napływ jonów  $Ca^{2+}$  do wnętrza komórki presynaptycznej. Zapoczątkowuje to kaskadę zdarzeń, która doprowadza do wyrzutu neuroprzekaźników do przestrzeni synaptycznej, na drodze fuzji pęcherzyków synaptycznych z błoną komórki. W przestrzeni synaptycznej stanowiącej 20-50 nm szczelinę, dyfundujące neurotransmitery są wiązane przez specyficzne receptory lub kanały jonowe znajdujące się na błonie postsynaptycznej. Ich aktywacja może powodować napływ jonów do wnętrza komórki postsynaptycznej, co odpowiada za wygenerowanie postsynaptycznego potencjału pobudzającego (ang. *excitatory postsynaptic potential*, EPSP) lub postsynaptycznego potencjału hamującego (ang. *inhibitory postsynaptic potential*, IPSP). Nadmiar neuroprzekaźników z przestrzeni synaptycznej jest degradowany przez specyficzne enzymy lub usuwany przez wychwyt zwrotny i ponownie pakowany do pęcherzyków w aksonie (Südhof i Malenka, 2008).

Przekazywany sygnał może być modyfikowany nie tylko przez elementy pre- i postsynaptyczne, ale również przez wypustki komórek glejowych – astrocytów, czy komponenty macierzy zewnątrzkomórkowej. Takie ujęcie synapsy jest zgodne

z koncepcją synapsy czwórdzielnej, zwaną inaczej synapsą poczwórną (Song i Dityatev, 2018).



### Rycina 1. Schemat budowy synapsy poczwórnej.

Zgodnie z koncepcją synapsy czterodzielnej w jej skład wchodzi zakończenie aksonu neuronu presynaptycznego i kołec dendrytyczny komórki postsynaptycznej oraz wypustki astrocytów i składniki macierzy zewnątrzkomórkowej. Każdy z tych elementów może wpływać na modulację przekazywanych sygnałów pomiędzy komórkami nerwowymi. (Na podstawie: Dityatev i Rusakov, 2011).

#### 1.1.1. Plastyczność synaptyczna

Jedną z głównych właściwości komórek nerwowych, obok ich pobudliwości, jest zdolność do podlegania zmianom w odpowiedzi na bodźce lub uszkodzenia. Ciąg zmian zachodzących w komórkach nerwowych w wyniku nowych doświadczeń został nazwany plastycznością neuronalną (Konorski, 1948). Donald Hebb zaproponował tezę, iż pamięć przejawia się jako zmiana przepływu sygnałów pomiędzy neuronami (Hebb, 1949). Zgodnie z tą koncepcją do zmiany siły połączeń synaptycznych

konieczne jest powtarzalne pobudzenie neuronu postsynaptycznego przez neuron presynaptyczny, co prowadzi do zmian biochemicznych i anatomicznych zachodzących na synapsie. Założenia te stanowią podstawę zjawiska plastyczności synaptycznej. Współcześnie wyróżniamy dwie składowe plastyczności synaptycznej, które są ze sobą ściśle powiązane: zmiany w strukturze oraz funkcji synaps. Plastyczność strukturalna wyraża się poprzez modyfikacje kształtu, liczby czy wielkości synaps (Holtmaat i Svoboda, 2009; Sala i Segal, 2014). Natomiast zmiana pobudliwości neuronów korelująca z ilością lub prawdopodobieństwem uwolnienia neuroprzekazników z części presynaptycznej oraz zmianami w liczbie receptorów na błonie postsynaptycznej to przejaw plastyczności funkcjonalnej (Kasai i in., 2010; Matsuzaki i in., 2004). Zmiany aktywności neuronalnej pojedynczych synaps lub całych sieci neuronowych mogą zachodzić w skali czasu od milisekund do dni. Procesy te współwystępują ze sobą warunkując adaptacyjne właściwości neuronów niezbędne do rozwoju i prawidłowego funkcjonowania mózgu.

#### 1.1.1.1. Plastyczność hebbowska

Plastyczność hebbowska jest zależna od doświadczenia, a dzięki zmianie siły połączeń synaptycznych jest uważana za podstawowy mechanizm procesów uczenia się i zapamiętywania. Eksperymentalnym modelem tego typu plastyczności jest długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (ang. long term potentiation, LTP) oraz długotrwałe osłabienie synaptyczne (ang. long term depression, LTD). Mechanizmy działania obu tych procesów oparte są o pętle dodatniego sprzężenia zwrotnego. Bliss i Lomo (1970) zaobserwowali, iż intensywna stymulacja elektryczna (o wysokiej częstotliwości) komórki presynaptycznej prowadzi do wzrostu pobudliwości komórki postsynaptycznej, co przejawia się zwiększeniem jej prądów postsynaptycznych i skróceniem czasu ich narastania. Odwrotne zjawisko obserwujemy, gdy stymulacja ma niską częstotliwość – dochodzi wtedy do osłabienia odpowiedzi komórki postsynaptycznej (Lynch i in., 1977).

Procesy te powiązane są ze zmianami w strukturze połączeń neuronalnych, np. LTP może prowadzić do powstawania nowych synaps (Engert i Bonhoeffer, 1999) lub przekształcenia istniejących cienkich kolców w kolce o kształcie grzybkowatym (Kasai

i in., 2010; Matsuzaki i in., 2004), natomiast LTD koreluje z zanikaniem kolców dendrytycznych (Nägerl i in., 2004; Zhou i in., 2004).

#### 1.1.1.2. Plastyczność homeostatyczna

Pomimo iż plastyczność hebbowska stanowi podwaliny bardzo efektywnego i precyzyjnego systemu kodowania i przechowywania informacji, to potencjalnie mogłaby prowadzić do niestabilności sieci neuronowych (Turrigiano i Nelson, 2004). Wzrost siły połączeń synaptycznych na skutek LTP powoduje wzmocnienie pobudliwości neuronu postsynaptycznego i zwiększa prawdopodobieństwo zajścia kolejnych LTP. Taka pętla dodatniego sprzężenia zwrotnego mogłaby prowadzić do hiperaktywności a w konsekwencji śmierci neuronu. Z kolei LTD może doprowadzić do eliminacji synaps, co mogłoby skutkować wyciszeniem aktywności neuronalnej. Takie zdarzenia przyczyniałyby się do zaburzenia równowagi pomiędzy procesami pobudzenia i hamowania w mózgu. Mechanizmem kompensacyjnym, utrzymującym stabilny poziom aktywności sieci neuronalnych pomimo zachodzenia w ich obrębie dynamicznych zmian jest plastyczność homeostatyczna.

Eksperymenty przeprowadzone na szczurzych neuronach korowych hodowanych *in vitro* (Turrigiano i in., 1998) wykazały, iż pobudliwość komórek nerwowych oceniana na podstawie analizy miniaturowych pobudzających prądów postsynaptycznych (ang. *miniature excitatory postsynaptic currents*, mEPSCs) zmienia się na skutek długotrwałej stymulacji farmakologicznej. W neuronach stymulowanych przez 48 godzin bikukuliną (antagonistą receptorów GABA<sub>A</sub>) pomimo początkowego wzrostu aktywności, ostatecznie obserwowano utrzymujący się spadek wartości amplitudy mEPSCs. Przeciwny efekt towarzyszył długotrwałemu działaniu tetrodotoksyny (antagonisty kanałów sodowych bramkowanego napięciem): odnotowywano wzrost wartości amplitudy mEPSCs. Plastyczność homeostatyczna wykorzystuje m. in. proces skalowania synaptycznego (ang. *synaptic scaling*) polegający na wbudowywaniu (w warunkach niskiej aktywności neuronalnej) lub usuwaniu z błony komórki postsynaptycznej (w warunkach wzmożonej aktywności) receptorów dla neuroprzekaźników. Oba te procesy oparte są o działanie ujemnego sprzężenia zwrotnego i odgrywają kluczową rolę podczas rozwoju osobniczego, ze względu na zachodzenie w tym okresie wielu zmian w liczbie i sile połączeń nerwowych (Tien i Kerschensteiner, 2018; Wen i Turrigiano, 2021).



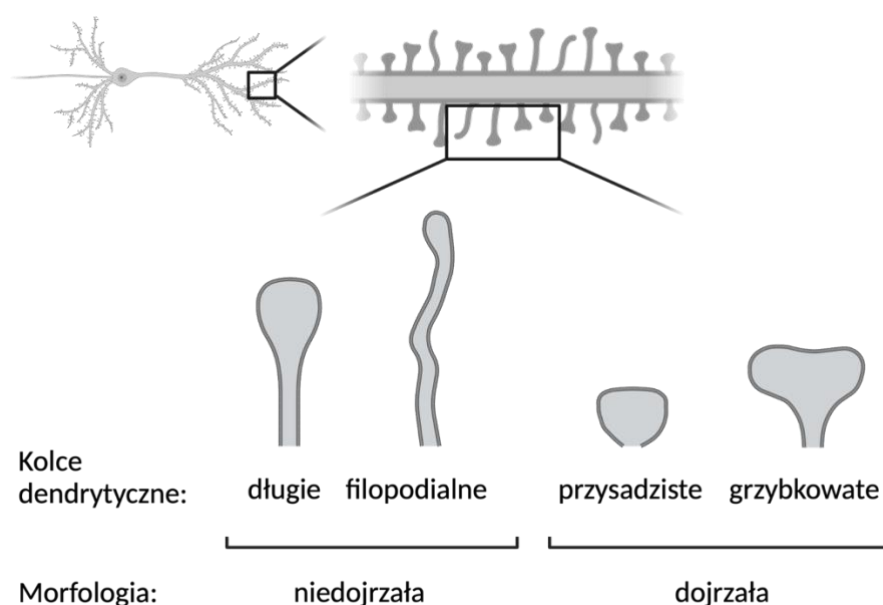
## 1.2. Kolce dendrytyczne neuronów piramidowych

### 1.2.1. Kształt kolców dendrytycznych

Po raz pierwszy wypustki w błonie dendrytów zaobserwował i opisał Ramon y Cajal, dzięki zastosowaniu techniki znakowania srebrem, stworzonej przez Camillo Golgiego. Dojrzały kolec dendrytyczny składa się z główki mierzącej ok. 0,5 – 2,0  $\mu\text{m}$ , połączonej z dendrytem za pomocą wąskiej szyjki (Calabrese i in., 2006). Rozwój technik obrazowania, a w szczególności mikroskopii elektronowej, umożliwił wgląd do ogromnej różnorodności kształtów i rozmiarów kolców dendrytycznych. Objętość główki kolca może wahać się od 0,004  $\mu\text{m}^3$  do 0,6  $\mu\text{m}^3$  i współwystępować z ogromną różnorodnością kształtów. Parametry szyjki zawierają się w przedziale od 0,08  $\mu\text{m}$  do 1,58  $\mu\text{m}$  dla długości i od 0,0038  $\mu\text{m}$  do 0,48  $\mu\text{m}$  dla szerokości (Harris i Stevens, 1989; Tønnesen i Nägerl, 2016).

Jedną z najbardziej charakterystycznych cech kolców dendrytycznych jest ich ogromne zróżnicowanie, zwłaszcza dotyczące kolców dendrytycznych komórek piramidowych (Ghani i in., 2017). Podczas analizy budowy kolców dendrytycznych zazwyczaj wyróżnia się cztery podstawowe kategorie odzwierciedlające stosunek wielkości główki do szyjki kolca, czyli kolce: grzybkowate, długie, przysadziste i filopodialne. Kolce grzybkowate (ang. *mushroom spines*) mają dużą główkę, oddzieloną od dendrytu za pomocą wąskiej, dobrze zarysowanej szyjki. Stanowią dojrzałą postać kolców dendrytycznych (Yoshihara i in., 2009). Uważa się, że te kolce współtworzą najefektywniejsze połączenia synaptyczne i są podstawą pamięci długotrwałej (Hayashi i Majewska, 2005). Podobną budowę posiadają kolce długie (ang. *thin spines*) jednak ich główki są znacznie mniejsze, a szyjki relatywnie dłuższe. Są strukturami podlegającymi dynamicznym zmianom, powiększenie rozmiarów ich główek łączy się z procesami plastyczności. Obserwuje się także kolce przysadziste (ang. *stubby spines*), które jak się wydaje nie posiadają szyjki. Są to kolce obecne zwłaszcza na wczesnych etapach rozwoju postnatalnego lub w znacznie mniejszym stopniu, w dorosłym mózgu, jako efekt zanikania kolców grzybkowatych. Czwartym typem kolców dendrytycznych, charakterystycznym dla rozwijających się neuronów są kolce filopodialne (ang. *filopodial spines*). Stanowią one cienkie, długie wypustki bez widocznie zaznaczonej główki. Kolce filopodialne podlegają szybkim zmianom i są

bardzo plastyczne (Harms i Dunaevsky, 2007). Przypuszcza się, że nie tworzą one funkcjonalnych połączeń nerwowych, na co wskazuje bardzo niewielka liczba pęcherzyków synaptycznych w sąsiadujących z nimi zakończeniach aksonalnych (Berry i Nedivi, 2017). Ponadto, możemy wyróżnić także kolce dendrytyczne o bardzo złożonych czy nieregularnych kształtach, m. in. kolce rozgałęzione czy o główce w kształcie filiżanki (ang. *branched spines*, *cup-shaped spines*; odpowiednio; (Maiti i in., 2015)).



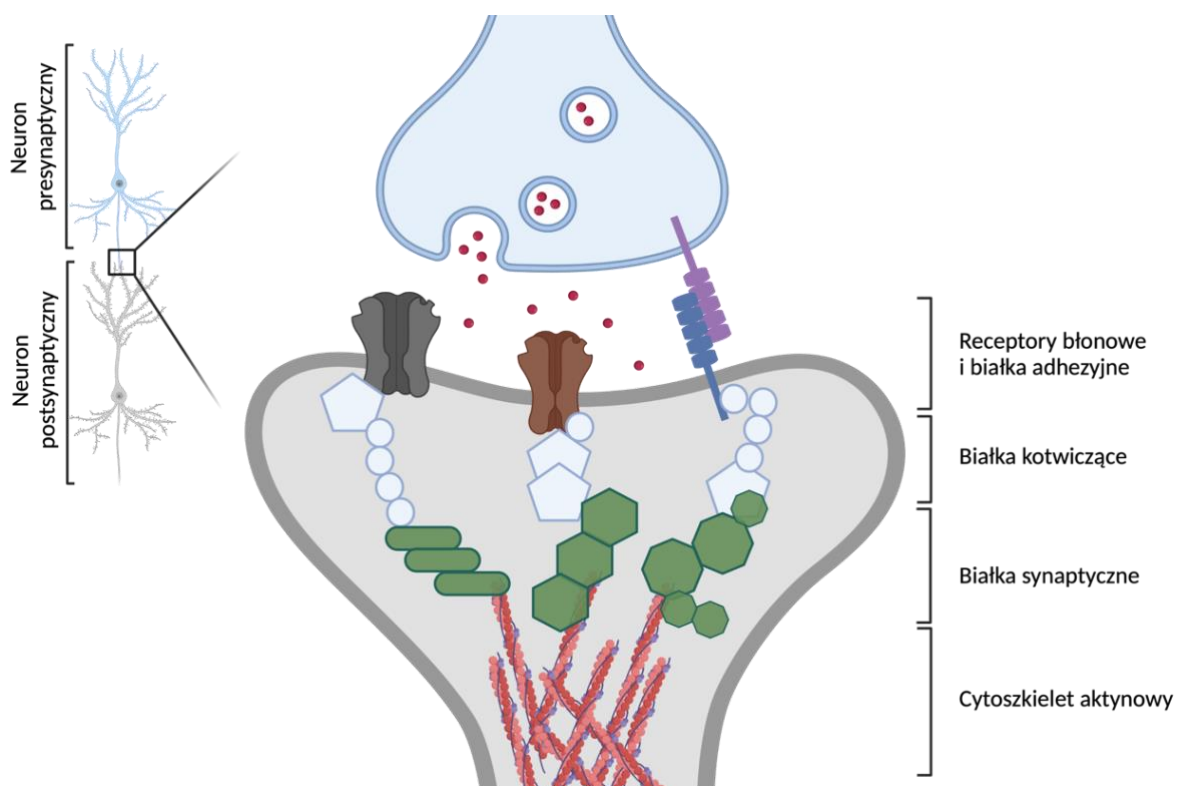
**Rycina 2. Kształty kolców dendrytycznych komórek piramidowych.**

Schematyczny rysunek przedstawiający główne typy kształtów kolców dendrytycznych (od lewej): kolce długie (ang. *long spines*), kolce filopodialne (ang. *filopodial spines*), kolce przysadziste (ang. *stubby spines*) i kolce grzybkowate (ang. *mushroom spines*). (Na podstawie: von Bohlen und Halbach, 2009).

1.2.2. Budowa kolców dendrytycznych

Kolce dendrytyczne komórek piramidowych mimo nieznaczących rozmiarów posiadają skomplikowaną molekularną maszynę niezbędną do prawidłowego funkcjonowania synaps. Tuż pod błoną komórkową kolca dendrytycznego znajduje się ściśle upakowana sieć ponad 2000 białek zwana gęstością postsynaptyczną (ang. *postsynaptic density*, PSD; Bayés i in., 2011). Częsteczki te można przypisać do

jednej z sześciu kategorii: 1) receptory i kanały jonowe związane z błoną, 2) białka kotwiczące i adaptorowe, 3) cząsteczki adhezji komórkowej, 4) białka cytoszkieletu, 5) białka z rodziny białek G oraz ich modulatory, 6) białka sygnałowe takie jak fosfatazy i kinazy (Boeckers, 2006). Analizy z zastosowaniem techniki spektrometrii mas wykazały, iż najliczniejszymi komponentami są kinazy zależne od jonów wapnia kalmoduliny typu II (ang. *Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II*, CaMKII) oraz białka z rodziny MAGUK (ang. *membrane-associated-and guanylate kinase*) m.in. PSD-95, PSD 93, SAP 102 and SAP 97 (Sheng i Kim, 2011).



### Rycina 3. Budowa kolca dendrytycznego.

Schematyczny rysunek przedstawiający neuron pre- i postsynaptyczny. Przybliżenie pokazujące główne elementy kolca dendrytycznego: receptory błonowe, białka adhezyjne oraz białka gęstości postsynaptycznej (PSD). Włókna aktynowe stanowią podstawowy element warunkujący kształt kolca dendrytycznego. (Zmodyfikowano za: Serrano i in., 2022).

Kolce dendrytyczne stanowią główne *loci* dla synaps pobudzających w mózgu. Wyróżniającą cechą synaps pobudzających na neuronach piramidowych jest

występowanie korelacji pomiędzy wielkością gęstości postsynaptycznej, a rozmiarem główki kolca dendrytycznego (Feng i Zhang, 2009). Powierzchnia PSD jest również proporcjonalna do powierzchni strefy aktywnej (ang. *active zone*, AZ) w komórce presynaptycznej, a zatem pośrednio liczby pęcherzyków zawierających neurotransmitery (Schikorski i Stevens, 1999).

Kolejną cechą charakteryzującą kolce dendrytyczne, w odróżnieniu od dendrytów, jest wysoka zawartość włókien aktynowych (ang. *actin filaments*, *F-actin*). Formowanie się kolców dendrytycznych i ich kształt jest w dużej mierze zależny od cytoszkieletu aktynowego (Zito i in., 2004). Wewnątrz kolców dendrytycznych znajdują się dziesiątki białek wiążących aktynę, które odpowiedzialne są m.in. za transport, kotwiczenie białek w błonie komórkowej czy regulację kształtu kolca (Dillon i Goda, 2005). Cytoszkielet jest regulowany przez aktywność białek wiążących aktynę, które modulują poziom jej polimeryzacji i depolimeryzacji. Indukcja LTP prowadzi do krótkotrwałej, przejściowej depolimeryzacji włókien aktynowych (Ouyang i in., 2005), jednak długotrwałe LTP skutkujące powiększeniem się główki kolca dendrytycznego wymaga polimeryzacji F-aktyny (Fukazawa i in., 2003; Lin i in., 2005). Wzrost poziomu jonów wapnia ( $Ca^{2+}$ ) w główce kolca dendrytycznego przyczynia się do przebudowy cytoszkieletu aktynowego, a co za tym idzie zmiany kształtu kolca (Oertner i Matus, 2005). Na skutek wzmożonej aktywności synaptycznej dochodzi do uwolnienia jonów  $Ca^{2+}$  także z siateczki śródplazmatycznej gładkiej (ang. *smooth endoplasmic reticulum*, SER; Spacek i Harris, 1997; Toresson i Grant, 2005), co dodatkowo wzmacnia lokalny wzrost poziomu  $Ca^{2+}$  (Sabatini i in., 2001). W przeciwieństwie do LTP, LTD koreluje z depolaryzacją aktyny oraz wydłużaniem się kolca dendrytycznego lub zmniejszeniem się jego główki (Nägerl i in., 2004; Zhou i in., 2004).

Zdolność kolców dendrytycznych do podlegania zmianom plastycznym jest zależna od procesów syntezy i degradacji białek (Tanaka i in., 2008). Dlatego też proteasomy i polirybosomy są zazwyczaj obserwowane w kolcach dendrytycznych: w stanie bazowego pobudzenia w podstawie kolca, natomiast po indukcji LTP migrują z dendrytu ku główce kolca (Bourne i in., 2007; Ostroff i in., 2002). Z procesami lokalnej syntezy białek i ich wbudowywaniem w błonę synapsy związana jest także obecność siateczki śródplazmatycznej szorstkiej (ang. *rough endoplasmic reticulum*, RER) oraz aparatów Golgiego (Grigston i in., 2005; Horton i Ehlers, 2004). Organelle te są

obrazowane w ok. 10% - 15% dojrzałych kolców dendrytycznych w hipokampie szczura (Spacek i Harris, 1997).

Ponadto, kształt kolców dendrytycznych jest zależny od recyrkulacji endosomów, a blokowanie tego zjawiska skutkuje zanikiem wypustek, a co za tym idzie, spadkiem ich gęstości (Park i in., 2006). Procesy egzo- i endocytozy muszą być utrzymane w odpowiednim balansie w zależności od aktywności neuronalnej, aby umożliwić kolcom dendrytycznym zmiany plastyczne. Dla prawidłowego zachodzenia LTP niezbędne jest, zależne od egzocytozy, wbudowywanie w błonę synaptyczną receptorów AMPA (Kopec i in., 2006), co powoduje lokalne zwiększenie jej pobudliwości (Kim i in., 2007).

### 1.2.3. Receptory jonotropowe glutaminianu

Opisane w niniejszej pracy synapsy chemiczne opierają swoje działanie na neuroprzekaźnikach (neurotransmitterach), a ich specyficzność i wywołany efekt zależy w dużej mierze od receptorów zlokalizowanych na błonie postsynaptycznej. Głównym neuroprzekaźnikiem pobudzającym w mózgu jest kwas glutaminowy (glutaminian), który może wiązać się do jednego z dwóch typów receptorów: receptorów metabotropowych lub receptorów jonotropowych. Receptory metabotropowe (ang. *glutamate metabotropic receptor*, mGluR) zbudowane z siedmiu domen transbłonowych, związane są z wewnątrzkomórkowymi białkami G, które odpowiadają za wtórną transdukcję sygnału (Pin i Acher, 2002). Z kolei receptory jonotropowe, będące kanałami jonowymi, podzielone są trzy główne klasy (Traynelis i in., 2010), których nazwy pochodzą od agonistów je aktywujących:

1) **receptor AMPA** (ang.  *$\alpha$ -amino-3-hydrokso-5-metylo-4-isoxazolepropionian*) – leżący u podstaw bazowej aktywności mózgu. Składa się z czterech hydrofobowych podjednostek GluA1-A4 (zwanymi także GluRA-GluRD), które są przepuszczalne dla jonów sodu ( $\text{Na}^+$ ) i potasu ( $\text{K}^+$ ). Najczęstszym typem receptorów w komórkach hipokampalnych są receptory AMPA zbudowane z podjednostek GluA1 i GluA2 (Sans i in., 2003; Tsuzuki i in., 2001).

2) **receptor kainianu** – którego rola w fizjologii nie jest jeszcze tak dobrze poznana, jest zaangażowany w szybkie przekąźnictwo neuronalne oraz regulację pobudliwości neuronów (Pinheiro i Mülle, 2008; Sachidhanandam i in., 2009). Wyróżniamy pięć podjednostek tego receptora: GluR5-R7 oraz KA1 i KA2. Receptory kainianu są zlokalizowane zarówno w pre- jak i postsynaptycznej błonie komórkowej (Frerking i Nicoll, 2000).

3) **receptor NMDA** (ang. *n-metylo-d-asparaginian*) – tetramer zbudowany z kombinacji siedmiu możliwych podjednostek: GluN1, GluN2A, GluN2B, GluN2C, GluN2D, GluN3A i GluN3B (Hansen i in., 2017). Kiedy neuron znajduje się w stanie potencjału spoczynkowego, przekąźnictwo przez receptory NMDA jest zablokowane. Dopiero depolaryzacja błony komórkowej pozwala na uwolnienie jonów magnezu ( $Mg^{2+}$ ) od receptorów i ich otwarcie dla jonów sodu i potasu oraz w głównej mierze dla jonów wapnia. Kinetyka prądów synaptycznych receptorów NMDA w porównaniu do receptorów AMPA charakteryzuje się wolniejszym narastaniem prądu oraz dłuższym czasem jego utrzymania się (Paoletti i in., 2013).

Dojrzewanie i regulacja siły połączeń synaptycznych polega m.in. na zmianie liczby receptorów na błonie postsynaptycznej. Receptory NMDA są bezpośrednio dokowane w błonie przez białka PSD-95, natomiast receptory AMPA pośrednio z udziałem białek adaptorowych np. stargazyny (Schnell i in., 2002), co ułatwia dyfuzję receptorów AMPA „z” i „na” synapsę (Bats i in., 2007; Opazo i in., 2012). Ponadto dystrybucja tych receptorów na błonie postsynaptycznej jest różna: klastry receptorów NMDA obserwowane są zazwyczaj w centralnej części synapsy, natomiast klastry receptorów AMPA głównie w jej peryferycznych obszarach (Chen i in., 2011).

### 1.3. Wczesne etapy rozwoju połączeń nerwowych

Utworzenie funkcjonalnych sieci neuronowych musi być poprzedzone prawidłowym zajściem szeregu zdarzeń, wśród których możemy wyróżnić: 1) powstanie i migrację komórek nerwowych oraz gleju, 2) dojrzewanie tych komórek, 3) formułowanie się kolców dendrytycznych i synaps oraz ich reorganizacja, 4) zanikanie części synaps. U ludzi pierwsze, niedojrzałe komórki gleju są wykrywane

w czwartym tygodniu ciąży w kresomózgowiu, a komórki nerwowe w siódmym (Eze in., 2021). Komórki te wywodzą się z neuralnych komórek macierzystych (ang. *neural stem cells*, NSCs), których intensywne podziały zachodzą głównie w strefie komorowej oraz przykomorowej (Götz i Huttner, 2005). Procesy powstawania i migracji komórek są ze sobą ściśle powiązane. Neurony powstałe jako pierwsze tworzą głębsze warstwy kory, a później powstające komórki migrują przez nie do kolejno tworzonych warstw zgodnie z gradientem „inside-out”, głównie za sprawą migracji radialnej. Najintensywniejsza neurogeneza i migracja neuronów zachodzi w okresie od 10. do 25. tygodnia ciąży (Buchsbaum i Cappello, 2019; Silbereis i in., 2016). Po osiągnięciu docelowej lokalizacji komórki nerwowe mogą zostać skierowane na jedną z dwóch ścieżek: dalszego różnicowania lub zaniku na drodze apoptozy. Szacuje się, że około 40% - 60% nowopowstałych neuronów podlega apoptozie (Yamaguchi i Miura, 2015). Komórki, które będą się dalej rozwijały wytworzą akson i dendryty (Aizawa i in., 2004; Gibson i Ma, 2011; Lefebvre, 2021). Wypustki na dendrytach pojawiają się z końcem drugiego trymestru ciąży, intensywnie rozwijając się przez cały okres pre- i postnatalny tak, by osiągnąć maksymalną liczbę około 2. – 9. roku życia człowieka, w zależności od regionu mózgowia i typu dendrytu (Petanjek i in., 2011).

Wraz z postępowaniem procesu dojrzewania neurony wytwarzają kolce dendrytyczne tworzące połączenia synaptyczne z innymi komórkami. Na wczesnym etapie, kiedy to organizm nie ma jeszcze sposobności doświadczenia bogactwa otaczającego świata za pomocą zmysłów, to spontaniczna aktywność neuronalna jest podstawowym mechanizmem kształtowania sieci neuronowych (Cang i Feldheim, 2013; Kirkby i in., 2013). W trakcie pierwszych dwóch lat życia gęstość kolców dendrytycznych wzrasta osiągając poziom o około 50% wyższy niż średnio u osób dorosłych (Huttenlocher, 1979; Penzes i in., 2011). Następnie, po okresie intensywnego powstawania synaps, na skutek plastyczności zależnej od doświadczenia zmysłowego dochodzi do reorganizacji i znacznego spadku liczby połączeń nerwowych (Hofer i in., 2009; Holtmaat i Svoboda, 2009). Gęstość kolców dendrytycznych u ludzi stabilizuje się około trzeciej dekady życia (Petanjek i in., 2011).

We wczesnym okresie postnatalnym, rozwijające się i dojrzewające synapsy z dużą łatwością podlegają zmianom plastycznym, są również bardzo wrażliwe na

wszelkie czynniki zaburzające te procesy. Dlatego też ten etap w rozwoju zwykle określać się mianem okresu krytycznego (Knudsen, 2004).

### 1.3.1. Modele zwierzęce w badaniach neurorozwojowych

Dzięki temu, iż generalny schemat rozwoju układu nerwowego ssaków jest zachowany ewolucyjnie pomiędzy różnymi gatunkami, badania przeprowadzone z wykorzystaniem modeli zwierzęcych stanowią wartościowy wkład w zgłębianie wiedzy o mechanizmach kierujących tymi procesami. Mimo, iż sekwencja kluczowych zdarzeń dla rozwoju mózgu ssaków jest tożsama, to procesy te zachodzą w różnych skalach czasowych. Ponieważ w niniejszej pracy przeprowadzono badania z wykorzystaniem mysich modeli *in vivo*, dlatego też omówione zostaną etapy rozwoju ośrodkowego układu nerwowego tych gryzoni. Okres ciąży u myszy trwa 19 – 21 dni. Przyjmuje się, że pierwszemu i drugiemu trymestrowi ciąży u ludzi odpowiada okres rozwoju embrionalnego od poczęcia - E 0 (ang. *embrional*; E) do E 14,5. Natomiast trzeci trymestr ciąży jest analogiczny do okresu od E 15 do dziesiątego dnia życia zwierzęcia - P 10 (ang. *postnatal*; P; Bolon, 2015; Workman i in., 2013). Neurogeneza neuronów korowych zarówno u ludzi jak i u myszy rozpoczyna się już w okresie płodowym (wtedy też zachodzi najintensywniej) i trwa u ludzi do około 2,5 roku życia, natomiast u myszy do P 15 (Babikian i in., 2010). Powstawanie komórek hipokampa u myszy przypada głównie na okres E 14 – E 16. Proces ten trwa także w okresie postnatalnym, lecz poziom jego intensywności jest znacznie niższy niż przed narodzinami (A. S. Hill i in., 2015; Kitamura i Inokuchi, 2014). Wyjątek stanowią neurony ziarniste zakrętu zębatego hipokampa, które powstają dopiero w pierwszych dniach po narodzinach (Benavides-Piccione i in., 2019). Najintensywniejszy rozwój mózgowia i gliogenezy przypada u ludzi na 36. – 40. tydzień ciąży, u gryzoni na okres P 7 – P 10 (Bockhorst i in., 2008; Kriegstein i Alvarez-Buylla, 2009). Ludzki mózg osiąga 90% - 95% masy mózgowia dorosłego człowieka w 2. – 3. roku życia, u myszy około P 20 – P 21, co jest także okresem zachodzenia intensywnej mielinizacji neuronów (Keshavan i in., 2002).

W powstawaniu dendrytów i kolców dendrytycznych u gryzoni także obserwujemy wspomniane wyżej rozwojowe „opóźnienie”. Pierwsze, niedojrzałe synapsy tworzą się jeszcze w życiu płodowym, ale wzmożone powstawanie kolców dendrytycznych przypada na okres postnatalny (M. Li i in., 2010). Filopodia są obecne

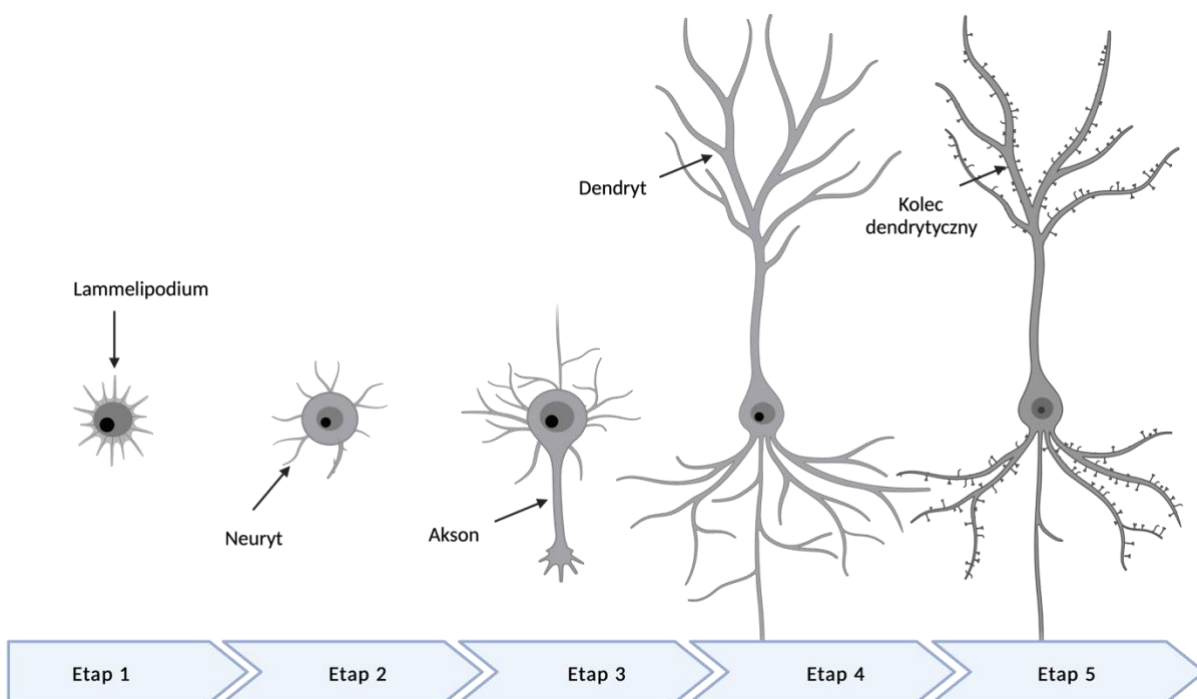


od P1, a około P 7 – P 10 odnotowuje się wzrost liczby kolców dendrytycznych. Około P 15 większość dendrytów pokrytych jest kolcami dendrytycznymi o różnorodnych kształtach: grzybkowatymi, przysadzistymi i długimi (Miller i Peters, 1981). Gęstość kolców dendrytycznych u gryzoni osiąga maksymalny poziom po skończonym pierwszym miesiącu życia, po czym następuje eliminacja części synaps w okresie wczesnej młodości (Koss i in., 2014; Orner i in., 2014).

### 1.3.2. Modele *in vitro* w badaniach neurorozwojowych

Jedynym z najlepiej poznanych i najczęściej wykorzystywanych modeli do badania rozwoju połączeń nerwowych są pierwotne hodowle neuronów. W niniejszej pracy także zastosowano m. in. ten model badawczy, a dokładniej dysocjowane pierwotne hodowle neuronów hipokampalnych. Proces dojrzewania neuronów jest bardzo złożonym zjawiskiem, które jest regulowane przez szereg czynników zarówno wewnątrz – jak i zewnątrzkomórkowych. W rozwoju neuronów hodowanych *in vitro* możemy wyróżnić pięć najważniejszych etapów (Schelski i Bradke, 2017; Yogev i Shen, 2017): 1) wytworzenie lamelipodiów, 2) inicjacja i wzrost neurytów, 3) powstanie aksonu, 4) rozrost dendrytów, 5) stabilizacja drzewa dendrytycznego oraz dojrzewanie kolców dendrytycznych (zobacz rycina 4.). W początkowej fazie rozwoju wokół ciała komórki tworzą się liczne ruchome lamelipodia. Następnie dochodzi do połączenia się niektórych lamelipodiów i utworzenia wypustek zwanych neurytami. Kolejne etapy rozwoju polegają na przełamaniu symetrycznej budowy neuronu i jego polaryzacji. Jeden z neurytów znacznie wydłuża się, a na jego końcu formułuje się stożek wzrostu, odpowiedzialny za rozwój aksonu. Wraz z elongacją aksonu następuje też jego rozgałęzienie. Pozostałe neuryty dadzą początek dendrytom, a komórka osiągnie dwubiegunową budowę. W miarę dojrzewania i stabilizacji drzewa dendrytycznego, pojawiać się będą liczne kolce dendrytyczne, finalnie współtworzące połączenia synaptyczne pomiędzy neuronami.

Etapy te następują częściowo zachodząc na siebie, a ich dokładny rozkład w czasie zależy od wielu czynników m. in.: wieku zwierzęcia, z którego pozyskano komórki do założenia hodowli, gatunku, czy konkretnej struktury mózgowia (van Spronsen i in., 2013).



**Rycina 4. Etapy rozwoju neuronów hipokampalnych *in vitro*.**

Schemat przedstawiający kolejne stadia rozwoju neuronów hodowanych *in vitro*. W początkowej fazie rozwoju wytwarzane są lammelipodia (Etap 1) a następnie pierwsze wypustki zwane neurytami (Etap 2). W kolejnym etapie jedna z wypustek znacznie wydłuża się dając początek aksonowi (Etap 3), a pozostałe przekształcają się w dendryty (Etap 4). Wraz z dojrzewaniem neuronu, na powierzchni dendrytów powstają kolce dendrytyczne (Etap 5), tworzące połączenia nerwowe z aksonami komórek presynaptycznych. (Zmodyfikowano za: van Spronsen i wsp., 2013).

## 1.4. Proces dojrzewania kolców dendrytycznych

### 1.4.1. Zmiany kształtów kolców dendrytycznych

Mimo prowadzonych intensywnych badań nad procesami związanymi z powstawaniem kolców dendrytycznych i synaptogenezą zjawiska te nadal nie są w pełni poznane. Wyniki badań wskazują, że sekwencja zdarzeń prowadząca do powstania kolców dendrytycznych zależy od typu komórki, regionu mózgu czy etapu w rozwoju.

Istnieją obecnie trzy główne hipotezy mówiące o możliwych mechanizmach prowadzących do utworzenia funkcjonalnych połączeń nerwowych. Jedną z nich jest model zaproponowany przez Sotelo (1978), w którym to kolce dendrytyczne mogą powstawać bezpośrednio z drzewa dendrytycznego, niezależnie od zakończeń włókien aksonów, dzięki uwarunkowaniu tego procesu od mechanizmów

wewnątrzkomórkowych. Taki mechanizm rozwoju możemy obserwować w przypadku niektórych wypustek dendrytycznych w komórkach Purkiniego (Cesa i Strata, 2005; O'Brien i Unwin, 2006). Alternatywną strategią może być schemat opisany przez Millera i Petersa (1981), w którym synapsa tworzy się bezpośrednio na dendrycie, a dopiero w kolejnych krokach, na skutek sygnałów płynących z komórki presynaptycznej wytwarzany jest kolec dendrytyczny. Ma on początkowo przysadzisty kształt, który wraz z dojrzewaniem synapsy zmienia się w kolec grzybkowaty lub wydłużony (Wiens i in., 2005). Trzecim modelem, który jest najczęściej podejmowany w kontekście komórek piramidowych hipokampa, będących przedmiotem badań opisanych w niniejszej pracy jest **model filopodialny**.

W pierwszych etapach rozwoju te podlegające dynamicznym zmianom wypustki często występują na błonie drzewa dendrytycznego. W procesie dojrzewania filopodia na skutek interakcji z zakończeniami aksonów przekształcają się w dojrzałe kolce dendrytyczne (Fiala i in., 1998; Ziv i Smith, 1996; Zuo i in., 2005). W tym ujęciu, filopodia są prekursorami kolców dendrytycznych. Co ciekawe, badania przeprowadzone na szczurzych hodowlach organotypowych wykazały, że stymulacja synaptyczna o dużej częstotliwości prowadzi do wzrostu liczby małych struktur przypominających filopodia. Ten proces zależy od transmisji synaptycznej odbywającej się poprzez receptory NMDA, a zastosowanie specyficznego antagonisty tych receptorów skutkuje zahamowaniem tego efektu (Maletic-Savatic i in., 1999).

Model filopodialny łączony jest z koncepcją rozwoju kolców dendrytycznych z tzw. cichych synaps (ang. *silent synapses*). Na błonie postsynaptycznej takich wypustek obecne są jedynie receptory NMDA, które jak już wspomniano, wymagają depolaryzacji by mogły uwolnić blokujące je jony  $Mg^{2+}$  i związać glutaminian. Właściwość ta sprawia, że receptory NMDA są nieaktywne, kiedy neuron znajduje się w stanie potencjału spoczynkowego. Jak pokazują badania, indukcja LTP prowadzi do wbudowywania receptorów AMPA w błonę komórkową, a tym samym dojrzewania synapsy, co jest kluczowym krokiem dla utworzenia prawidłowych sieci neuronowych (Kerchner i Nicoll, 2008; C. Xu i in., 2020). Mianem cichych synaps można określić znaczną większość glutaminergicznych synaps w mózgu w okresie okołoporodowym. Jednak ich liczba spada wraz z postępującym rozwojem osobniczym. Proces ten jest zależny od aktywności neuronalnej (Kanold i in., 2019). U gryzoni obserwujemy znaczną redukcję liczby cichych synaps już w dwa tygodnie od narodzin (Valiullina

i in., 2016). Badania z zastosowaniem paradygmatu deprywacji wzrokowej lub przycinania wibrys podczas trwania okresu krytycznego, pokazują wydłużenie okresu obecności cichych synaps odpowiednio w korze wzrokowej i korze baryłkowej tych zwierząt, co wskazuje na istotność pobudzenia neuronalnego dla zachodzenia tych zmian (Ashby i Isaac, 2011; Funahashi i in., 2013; Han i in., 2017).

#### 1.4.2. Rozwojowe zmiany receptorów NMDA i AMPA

Jak już wspomniano, proporcja receptorów AMPA do NMDA na błonie synaptycznej, a także typy podjednostek, z których zbudowane są te receptory zmienia się w rozwoju. Ma to znaczący wpływ na funkcjonowanie połączeń nerwowych. Odkrycie cichych synaps zintensyfikowało badania nad mechanizmami wbudowywania oraz dystrybucji receptorów AMPA na błonie synaptycznej i związanymi z tym procesami plastyczności (Bredt i Nicoll, 2003; Kerchner i Nicoll, 2008). We wczesnych okresach postnatalnych większość receptorów AMPA nie zawiera podjednostek GluA2, a poziom tych podjednostek receptora jest niski w porównaniu do poziomu podjednostek GluA1 (Pickard i in., 2000). U gryzoni, ok. P 5 – P 7, w błonę cichych synaps zostają wbudowywane głównie podjednostki GluA4 (Zhu i in., 2000). Wraz z rozwojem, wzrasta poziom receptorów AMPA zawierających podjednostkę GluA2, tak że ok. P 14 stanowią one główny typ receptorów AMPA (Henley i Wilkinson, 2016). Po upływie trzech tygodni od narodzin następuje zmiana w budowie receptorów: wzrasta poziom podjednostek GluA3 a spada GluA1, co wpływa na kinetykę prądów postsynaptycznych (Blair i in., 2013).

Również poziom podjednostek receptorów NMDA jest regulowany rozwojowo i zależy od lokalizacji neuronu w mózgu. Badania *in situ* z wykorzystaniem całych mózgów mysich wykazały, że podjednostka NR1 (będąca obligatoryjną składową receptora NMDA) jest wykrywana już podczas rozwoju embrionalnego, a jej poziom wzrasta w okresie postnatalnym (Watanabe i in., 1992). Z kolei podjednostka NR2B, która również jest wyrażana już na wczesnych etapach rozwoju embrionalnego, osiąga maksymalny poziom w okresie okołoporodowym, jednak potem jej ilość gwałtownie spada (Ewald i Cline, 2009). W toku rozwoju postnatalnego dochodzi do ekspresji podjednostki NR2A, a jej znaczący wzrost obserwowany jest pomiędzy P 7 a P 28 (Cull-Candy i in., 2001). Ta rozwojowa zmiana kompozycji podjednostek receptorów

NMDA z NR2B na NR2A wpływa na kinetykę przewodnictwa synaptycznego i uważana jest za przejaw dojrzewania połączeń nerwowych (McKay i in., 2018; Monyer i in., 1994).

W hodowlach neuronalnych podjednostka NR2B jest wykrywana pomiędzy DIV 2 a DIV 15, następnie jej poziom znacznie spada (Bustos i in., 2014). Z drugiej strony podjednostka NR2A nie jest jeszcze obecna w neuronach na etapie DIV 2, natomiast jej poziom stopniowo wzrasta, aż do osiągnięcia maksimum w dojrzałych neuronach.

Równolegle z procesem dojrzewania kolców dendrytycznych zachodzą zmiany nie tylko w kompozycji podjednostek receptorów AMPA i NMDA, ale również w poziomie samych receptorów. Niedługo po narodzinach obserwujemy liczne ciche synapsy, a co za tym idzie, ilość receptorów NMDA jest znacznie wyższa niż receptorów AMPA. W toku dojrzewania połączeń nerwowych wzrasta liczba receptorów AMPA. Zmiany te przekładają się na plastyczność synaps: z wysokiej podatności na zmiany plastyczne we wczesnej młodości (długotrwałe otwarcie kanału wapniowego receptora NMDA) do stanu dojrzałości, w którym takie zmiany jest trudniej wywołać (Kanold i in., 2019; Lohmann i Kessels, 2014).

#### 1.4.3. Zmiany w poziomie białek kotwiczących podczas rozwoju mózgu

Białka kotwiczące należą do jednej z trzech głównych rodzin: MAGUK, Shank lub Homer. Zmiany jakościowe i ilościowe białek PSD następujące wraz z rozwojem neuronów korelują ze zmianami w kompozycji podjednostek receptora NMDA. Na wczesnych etapach rozwoju embrionalnego dominującym białkiem z rodziny MAGUK jest białko SAP 102, które jest obecne zarówno w aksonach jak i w dendrytach. Jego wysoki poziom odnotowuje się w młodych jak i dojrzałych neuronach, jednak wykazano, że jest ono kluczowe dla grupowania i wbudowywania receptorów NMDA na wczesnych etapach rozwoju mózgu (Elias i in., 2008; Sans i in., 2003). Poziom ekspresji jednego z wariantów alternatywnego składania RNA tzw. splicingu dla SAP 102, mającego wysokie powinowactwo do podjednostki NR2B receptora NMDA, znacznie wzrasta w okresie formowania filopodiów na dendrytach (Chen i in., 2011). Następnie, wraz z procesem dojrzewania kolców dendrytycznych zmienia się kompozycja białek w PSD: wzrasta poziom SAP 97 i PSD 93, a finalnie także PSD-95

(Lambert i in., 2017). O ile białko SAP 102 wykazuje wysokie powinowactwo do receptora NR2B, o tyle PSD-95 łączy się preferencyjnie z podjednostką NR2A (Sans i in., 2003). Między innymi dlatego też PSD-95 jest uważane za białko markerowe dla dojrzałych kolców dendrytycznych. Ponadto, wzrost poziomu PSD-95 koreluje z podwyższoną ekspresją innych białek, które w sposób bezpośredni lub pośredni oddziałują z receptorami, m. in.: Shank czy GKAP (Kawashima i in., 1997; Lim i in., 1999). Jak pokazują badania, obecność PSD-95 w nowopowstałych kolcach dendrytycznych zwiększa prawdopodobieństwo ich dalszej stabilizacji (Cane i in., 2014; Gray i in., 2006).

## 1.5. Zaburzenia w rozwoju kolców dendrytycznych

Nieprawidłowości w rozwoju kolców dendrytycznych są często obserwowane u osób cierpiących na choroby neurorozwojowe i neuropsychiatryczne (Martínez-Cerdeño, 2017; Penzes i in., 2011). Polegają one na różnorodnych zmianach kształtu czy gęstości kolców w porównaniu do oczekiwanych na danym etapie rozwoju osobniczego i w określonym rejonie mózgu. Mając na uwadze ścisły związek pomiędzy strukturą a właściwościami funkcjonalnymi, już nawet niewielkie zmiany w gęstości lub kształcie kolców dendrytycznych mogą przełożyć się na zaburzenia występujące zarówno na poziomie komórkowym i jak całych sieci neuronowych. Ponadto, brak równowagi między procesami powstawania i eliminacji kolców dendrytycznych również prowadzi do zaburzeń w przekazywaniu neuronalnym (Stein i Zito, 2019).

Niestety, niewiele jest doniesień mówiących szczegółowo o nieprawidłowościach w kolcach dendrytycznych osób cierpiących na **choroby neurorozwojowe** o nieznanym przyczynie. Dzieje się tak za sprawą bardzo ograniczonego dostępu do tkanek *post-mortem* oraz współwystępowaniem wielu innych czynników mogących wpływać na obserwowane objawy patofizjologiczne. Sprawia to, iż pojedyncze odkrycia są trudne do zgeneralizowania i zbadania podłoża zaburzeń (McCullumsmith i in., 2014). Poniżej opisano wybrane choroby neurorozwojowe o nieznanym dotąd etiologii w kontekście występujących w nich nieprawidłowości w OUN.

### 1.5.1. Kolce dendrytyczne a niepełnosprawność intelektualna

Przyjmuje się, że wynik uzyskany w standardowym teście inteligencji będący poniżej dwóch odchyłeń standardowych od średniej populacyjnej, czyli wynik poniżej 70 punktów, wskazuje na nieprawidłowy rozwój intelektualny danej osoby. Badania *post-mortem* pacjentów z niepełnosprawnościami intelektualnymi wyraźnie dokumentują powiązanie zaburzeń w strukturze kolców dendrytycznych z chorobami neurorozwojowymi (Dierssen i Ramakers, 2006). W badaniach neuronów korowych pacjentów obserwuje się kolce cienkie o wydłużonym kształcie, co wskazuje na ich niedojrzałość. Ponadto gęstość kolców dendrytycznych jest niższa niż u osób neurotypowych. Odnotowuje się również zubożenie złożoności zarówno podstawnych jak i wierzchołkowych dendrytów komórek piramidowych w wielu rejonach mózgu w porównaniu do grup kontrolnych (Kaufmann i Moser, 2000). Prawidłowy rozwój sieci neuronowych warunkowany jest przez odpowiednią ekspresję całego szeregu białek, jest to więc proces systemowy, na co wskazują badania pokazujące coraz to nowe geny, w których mutacje prowadzą do niepełnosprawności intelektualnych (Chelly i Mandel, 2001; Ramakers, 2002).

### 1.5.2. Kolce dendrytyczne a zaburzenia ze spektrum autyzmu

Badania osób ze zdiagnozowanymi zaburzeniami ze spektrum autyzmu (ang. *autism spectrum disorders*, ASD) pokazują większą gęstość kolców dendrytycznych u tych osób w wielu regionach mózgu w porównaniu do populacji ogólnej (Hutsler i Zhang, 2010). Może być to powiązane z zaburzeniem równowagi pomiędzy procesami powstawania i eliminacji kolców dendrytycznych. Co ciekawe, monitorowanie rozwoju mózgu w czasie przy użyciu techniki obrazowania metodą rezonansu magnetycznego wykazało zwiększoną objętość mózgu oraz istoty szarej kory mózgowej u osób z ASD w porównaniu do osób zdrowych, która jest obserwowana już przed ukończeniem drugiego roku życia (Hazlett i in., 2017; Schumann i in., 2010). Jak już wspomniano, w tym okresie dochodzi do intensywnego rozwoju dendrytów i kolców dendrytycznych, co sugeruje, że u osób z ASD proces synaptogenezy zachodzi na zbyt wysokim poziomie lub występują deficyty w efektywności eliminacji kolców dendrytycznych (Tang i in., 2014).

### 1.5.3. Kolce dendrytyczne a schizofrenia

Mimo iż schizofrenia jest zaburzeniem psychiatrycznym diagnozowanym zazwyczaj w okresie wczesnej młodości, w jej przebiegu obserwowane są nieprawidłowości w OUN, których etiologia ma podłoże rozwojowe. Gęstość kolców dendrytycznych osób cierpiących na schizofrenię jest niższa niż u osób zdrowych, dotyczy to m. in. neuronów kory przedczołowej, kory słuchowej czy hipokampa (Garey, 2010; Glausier i Lewis, 2013; Kolomeets i in., 2005; Sweet i in., 2009). W badaniach neuronów trzeciej warstwy kory słuchowej wykazano, iż zanikowi podlegają głównie małe kolce dendrytyczne o obojętności nie większej niż  $0,3 \mu\text{m}^3$  (MacDonald i in., 2017). W kilku obszarach mózgu obserwuje się także zmniejszoną objętość istoty szarej, co najprawdopodobniej jest spowodowane redukcją rozmiarów ciał komórek nerwowych a nie utratą neuronów. Zmniejszenie ciał neuronów koreluje ze zubożeniem innych właściwości komórek nerwowych, takich jak złożoność drzewa dendrytycznego czy liczba zakończeń aksonalnych (Pierri i in., 2001; Sweet i in., 2004). W badaniach przeprowadzonych przez Kristiansen i współpracowników (2006) na tkankach pobranych *post-mortem* od 24 starszych osób ze zdiagnozowaną schizofrenią wykazano zaburzenia poziomu ekspresji niektórych składowych PSD. W przypadku PSD 93 i PSD-95 obserwowano wzrost poziomu transkryptów względem próbek kontrolnych, natomiast spadek ilości tych molekuł na poziomie białek. Co ciekawe, odnotowano wzrost poziomu izoforny białka podjednostki NR1 receptora NMDA, z którymi PSD 93 i PSD-95 bezpośrednio oddziałują stanowiąc dla niego swoiste rusztowanie.

### 1.5.4. Kolce dendrytyczne a zaburzenia afektywne dwubiegunowe

Zaburzenie afektywne dwubiegunowe (ang. *bipolar affective disorder*, BPAD) są kolejną chorobą neurorozwojową, w której przebiegu obserwuje się nieprawidłowości w budowie i liczbie kolców dendrytycznych. Spadek liczby kolców dendrytycznych oraz zmniejszenie długości dendrytów w korze przedczołowej i hipokampie jest nawet znaczniejszy niż w przypadku pacjentów cierpiących na schizofrenię (Konopaske i in., 2014). W neuronach korowych pacjentów z BPAD ekspresja genów podjednostek *NR1* i *NR2B* zachodzi na niższym poziomie niż u osób z grupy kontrolnej (Beneyto i in., 2007). Dane uzyskane z badań *post-mortem* z wykorzystaniem neuronów hipokampa



potwierdziły obniżenie poziomu ekspresji *NR1* jak również wskazały na niższy poziom mRNA *NR2A* oraz ekspresji genu kodującego białko SAP 102 będącego ważnym składnikiem PSD (McCullumsmith i in., 2007). Także poziom podjednostek receptora AMPA ulega zaburzeniu: badania poziomu transkrypcji w prążkowie wykazały spadek ilości mRNA dla genu *Gria1* kodującego podjednostkę GluA1 (Meador-Woodruff i in., 2001). Ponadto, wyniki badań neuroobrazowych osób z BPAD wskazują na zmniejszoną liczbę i gęstość komórek glejowych, zarówno astrocytów, oligodendrocytów jak i mikrogleju w różnych strukturach mózgu (Schroeter i in., 2010).

## 1.6. Czynniki genetyczne w zaburzeniach neurorozwojowych OUN

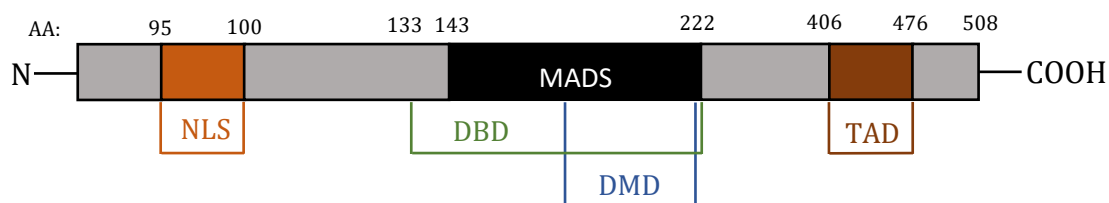
Mimo iż choroby neurorozwojowe są w znacznym stopniu uwarunkowane genetycznie, dokładny mechanizm ich etiologii jest złożony i zazwyczaj nie jest jeszcze w pełni poznany. Nieliczne z chorób neurorozwojowych są wywoływane przez mutacje monogenowe, m. in. w genie *MECP1* w Zespole Retta, *CHD7* w zespole CHARGE, *TCF4* w zespole Pitta-Hopkinsa, czy *FMR1* w zespole łamliwego chromosomu X (Amir i in., 1999; Verkerk i in., 1991; Zentner i in., 2010; Zweier i in., 2007). Poznanie złożonego, wielogenowego podłoża większości zaburzeń OUN stanowi wyzwanie dla współczesnych badaczy. Badania asocjacyjne całego genomu (ang. *genome-wide association studies*; GWAS), badania zmienności liczby kopii DNA (ang. *copy number variations*, CNV), a w szczególności analizy całych eksomów (ang. *whole exome sequencing*, WES) dostarczają coraz to nowych danych wskazujących na udział wielu szlaków sygnałowych i klas białek w nieprawidłowościach w tworzeniu i dojrzewaniu połączeń nerwowych.

## 1.7. Czynniki odpowiedzi na surowicę – SRF

### 1.7.1. Budowa SRF

Czynnik odpowiedzi na surowicę (SRF) został po raz pierwszy opisany jako główny czynnik transkrypcyjny regulujący zależną od surowicy ekspresję genu *c-fos* (Treisman, 1987). Obecnie wiadomo, iż jest to czynnik transkrypcyjny konserwowany ewolucyjnie o znacznie szerszym znaczeniu biologicznym (Miano, 2010; Norman i in., 1988). To 67-kDa białko (u ludzi: 508 aminokwasów, u myszy: 504 aminokwasy) jest stale wyrażane w niemal wszystkich typach komórek, jednak jego szczególnie wysoki poziom odnotowuje się w embrionalnych komórkach macierzystych, komórkach układu odpornościowego, mięśniach oraz neuronach (Miano, 2010). SRF jest kodowany przez pojedynczy gen zlokalizowany w ludzkim genomie na chromosomie 6. (17. u myszy), którego sekwencja kodująca składa się z siedmiu eksonów. Ze względu na zachodzenie alternatywnego składania RNA (tzw. alternatywnego splicingu) występują liczne izoformy SRF, z których najczęstszymi są transkrypt mRNA o pełnej długości (ang. *full-length* SRF, SRF-FL; białko o wielkości 67 kDa), wariant z delecją eksonu 5. (SRF $\Delta$ 5; białko o wielkości 57 kDa), który może działać jako antagonistą SRF-FL (Belaguli i in., 1999; Kemp i Metcalfe, 2000; Uhlén i in., 2015), wariant z delecją eksonu 4. i 5. (SRF $\Delta$ 4,5; 52 kDa) oraz wariant z delecją eksonu 3., 4. i 5. (SRF $\Delta$ 3 – 5; 48 kDa; Modak i Chai, 2010).

W budowie SRF-FL możemy wyróżnić trzy domeny funkcjonalne, warunkujące regulację ekspresji genów: sygnał lokalizacji jądrowej (ang. *nuclear localization signal*, NLS), domenę MADS oraz domenę transaktywacyjną (ang. *transactivation domain*, TAD), jak zaprezentowano na rycinie 5. (Johansen i Prywes, 1995).



#### Rycina 5. Domeny funkcjonalne ludzkiego białka SRF.

Cząsteczka ludzkiego białka SRF ma długość 508 aminokwasów. Znajdujący się na N-końcu białka sygnał lokalizacji jądrowej (NLS) warunkuje konstytutywną lokalizację SRF w jądrze komórkowym. Konserwowany ewolucyjnie region MADS zawiera domenę wiążącą DNA (DBD)

odpowiedzialną za wiązanie do specyficznej sekwencji DNA oraz domenę dimeryzacji (DMD) umożliwiającą formowanie homodimerów. Domena aktywująca transkrypcję (TAD) zlokalizowana jest blisko C-końcowej sekwencji białka. (Na podstawie: Johansen i Prywes, 1995).

Dzięki domenie NLS czynnik transkrypcyjny SRF jest zlokalizowany w jądrze komórkowym. Tu, SRF może wiązać się do palindromicznej sekwencji DNA CC[A/T]<sub>6</sub>GG (zwanej motywem CArG) w promotorach genów (Huet i in., 2005). Badania całych genomów wykazały, iż geny, których ekspresja jest zależna od SRF, często zawierają więcej niż jedną sekwencję CArG w rejonie miejsca inicjacji transkrypcji (Esnault i in., 2014; Sun i in., 2006). SRF należy do rodziny czynników transkrypcyjnych zawierających domenę MADS, której nazwa jest eponimem od czterech białek z tej grupy, które jako pierwsze zostały zidentyfikowane, m. in. od białka SRF (ang. *MCM1*, *Agamous*, *Deficiens*, *SRF*). Region MADS zawiera zarówno domenę wiążącą DNA (ang. *DNA binding domain*, DBD), odpowiedzialną za specyficzne wiązanie SRF do motywu CArG, oraz domenę dimeryzacji (ang. *dimerization domain*, DMD) warunkującą tworzenie homodimerów SRF (Nurrish i Treisman, 1995). Na C-końcowym fragmencie białka SRF zlokalizowana jest domena aktywująca transkrypcję (ang. *transactivation domain*, TAD) wpływająca na tworzenie kompleksu preinicjującego transkrypcję (Meyer zu Reckendorf i in., 2016; H. Zhu i in., 1994).

### 1.7.2. Aktywacja SRF

W warunkach fizjologicznych, poza surowicą krwi, SRF może być aktywowany przez szereg innych czynników takich jak: cytokiny, mitogeny, lipopolisacharyd (LPS), czynnik martwicy nowotworów (ang. *tumor necrosis factor  $\alpha$* , TNF  $\alpha$ ), w końcu antyoksydanty czy światło ultrafioletowe (UV) (Chai i Tarnawski, 2002).

W układzie nerwowym funkcję aktywatora może pełnić także aktywność neuronalna inicjowana za pośrednictwem glutaminianu (Johnson i in., 1997) czy kwasu kainowego (Herdegen i in., 1997). Odbywa się ona na drodze aktywacji receptorów NMDA lub kanałów wapniowych bramkowanych napięciem (ang. *voltage-sensitive calcium channels*). Pobudzenie powoduje napływ jonów Ca<sup>2+</sup> do cytoplazmy neuronu, co skutkuje aktywacją SRF z udziałem zależnej od Ca<sup>2+</sup>

i kalmoduliny kinazy białkowej II ((Miranti i in., 1995) lub na drodze pośredniej poprzez aktywację kofaktorów SRF. Czynniki neurotroficzne pochodzenia mózgowego (ang. *brain derived neurotrophic factor*, BDNF) oraz czynnik wzrostu nerwów (ang. *nerve growth factor*, NGF) także mogą powodować wzrost transkrypcji zależnej od SRF, jak również wzrost poziomu białka SRF (Chang i in., 2004; Kalita i in., 2006; Wickramasinghe i in., 2008).

### 1.7.3. Regulacja aktywności SRF

By reakcja komórki na bodźce była biologicznie odpowiednia, ekspresja genów zależna od SRF musi podlegać ścisłej kontroli. Jako, że SRF jest konstytutywnie wyrażany w różnych tkankach i zlokalizowany w jądrze komórkowym, to jego aktywność nie może być regulowana za pomocą mechanizmu polegającego na zmianie lokalizacji z cytoplazmatycznej na jądrową, jak to ma często miejsce w przypadku innych czynników transkrypcyjnych, np.: STAT1 (McBride i in., 2002) czy NFAT (Okamura i in., 2000).

#### 1.7.3.1. Fosforylacja SRF

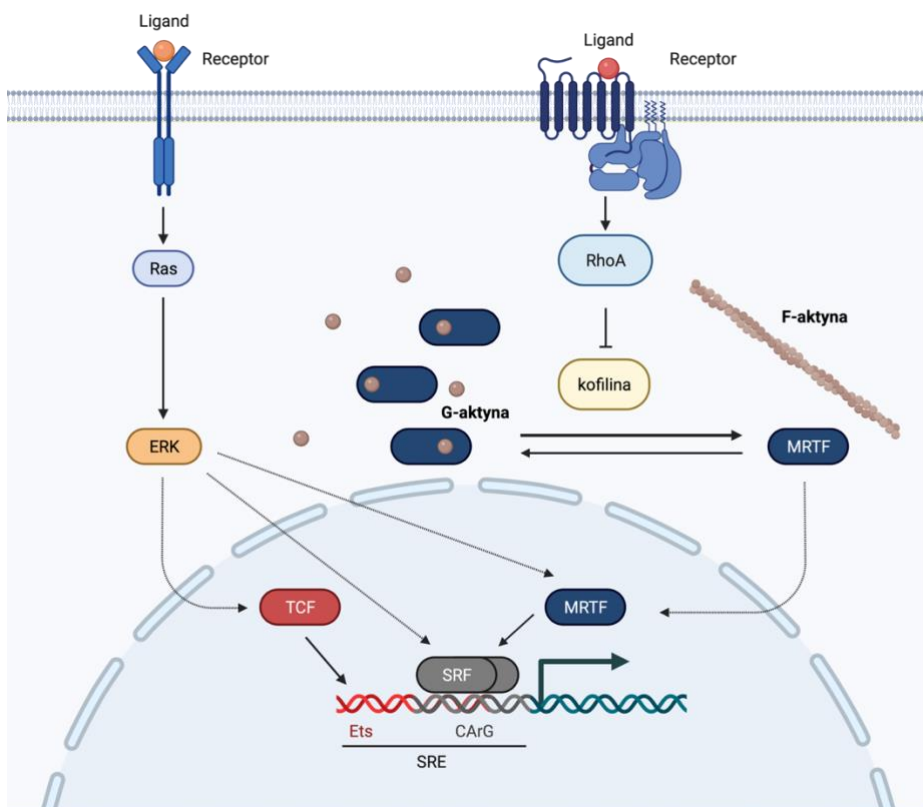
Jednym z mechanizmów regulacji aktywności czynników transkrypcyjnych jest przejściowa fosforylacja lub defosforylacja określonych aminokwasów w łańcuchu przez specyficzne enzymy. Poza wspomnianymi powyżej kinazami, zidentyfikowano także inne, które bezpośrednio oddziałują z SRF m. in.: kinazę II aktywowaną mitogenami (MAPKII; Heidenreich i in., 1999), kinazę syntazy glikogenu (ang. *glycogen synthase kinase GSK3 $\beta$* ; Li i in., 2014), kinazy białkowe serynowo/treoninowe (ang. *serine/threonine-protein kinase*, SGK; Tyan i in., 2008) czy kinazę 3-fosfatydylinozytolu (ang. *phosphatidyl inositol 3-kinase*, PI3K; Chang i in., 2004). Dodatkowo, opisano kilka reszt serynowych, których fosforylacja moduluje efektywność wiązania SRF do nici DNA (Iyer i in., 2006; C. L. Li i in., 2014; Liu i in., 1993) i wpływa na transkrypcję genów. Pomimo licznych modyfikacji potranslacyjnych cząsteczek SRF mechanizm ten nie jest głównym sposobem aktywacji tego czynnika transkrypcyjnego, a co za tym idzie, regulacji ekspresji genów zależnej od SRF (Janknecht i in., 1992; Manak i Prywes, 1993).

### 1.7.3.2. Kofaktory SRF

Liczne badania wskazują, iż główny mechanizm regulacji aktywności SRF opera się na jego oddziaływaniu z kofaktorami (Olson i Nordheim, 2010; Posern i Treisman, 2006) należącymi do jednej z dwóch grup: białek TCF (ang. *ternary complex factors*) oraz **koaktywatorów podobnych do miokardyny** (ang. *myocardin-related transcription factors*, MRTF).

Jak pokazano na rycinie 6., sekwencja regulatorowa SRE (ang. *seum response element*) zidentyfikowana przez Treismana i współpracowników (1986) poza sekwencją CArG zawiera również motyw Ets (ang. *E-twenty-six*). To właśnie do tej zachowanej ewolucyjnie sekwencji wiąże się białko z rodziny TCF (Elk-1, SAP-1 lub Net) tworząc kompleks z dwiema cząsteczkami SRF (Shaw i in., 1989). Geny, których ekspresja jest regulowana na tej ścieżce to głównie geny tzw. odpowiedzi wczesnej (ang. *immediate early gene*, IEG), np.: *c-fos* czy *Egr-1* (Gineitis i Treisman, 2001). Do inicjacji ich ekspresji dochodzi na skutek związania zewnątrzkomórkowego ligandu (np. czynnika wzrostowego) przez receptory błonowe, które następnie przekazują sygnał za pomocą szlaku kinaz aktywowanych mitogenami (ang. *mitogen-activated protein kinases*, MAPK). Fosforylacja TCF powoduje zmiany konformacji umożliwiające wiązanie do DNA i oddziaływanie z homodimerem SRF (Buchwalter i in., 2004).

Ponadto wykazano, iż TCF może wiązać się z DNA bezpośrednio, regulując transkrypcję niezależnie od SRF (Boros i in., 2009; Esnault i in., 2017).



**Rycina 6. Szlaki sygnałowe prowadzące do zależnej od SRF ekspresji genów.**

Czynnik transkrypcyjny SRF jest konstytutywnie zlokalizowany w jądrze komórkowym. Ekspresja genów od niego zależna jest regulowana głównie przez interakcje SRF z koaktywatorami z rodziny TCF lub białkami podobnymi do miokardyny (MRTF). Sygnał może być przekazany za pośrednictwem szlaku kinaz aktywowanych mitogenami lub ścieżką zależną od Rho GTP-az. W zależności, który ze szlaków zostanie aktywowany ten z koaktywatorów będzie oddziaływał z SRF (odpowiednio, TCF lub MRTF) i dojdzie do aktywacji transkrypcji innej grupy genów.

#### 1.7.3.2.1. Kofaktory z rodziny MRTF

Drugą grupę koaktywatorów SRF stanowią białka z rodziny MRTF (Kalita i in., 2012). Rywalizują one z TCF o wiązanie z SRF i jak pokazują badania (przeprowadzone z zastosowaniem technik ChIP-seq i Hi-C) kofaktory z rodziny TCF są swoistymi antagonistami dla ekspresji genów regulowanej przez MRTF (Gualdrini i in., 2016). Ponadto, postuluje się różnice w dynamice oddziaływania tych dwóch rodzin koaktywatorów z SRF. Badania z zastosowaniem techniki ChIP-seq przeprowadzone na fibroblastach (Esnault i in., 2014) wykazały, iż MRTF wiążą się w miejscach

oddziaływania głównie dopiero w skutek stymulacji (geny indukowane), natomiast TCF wiąże się w miejscach, gdzie SRF związany jest konstytutywnie.

Jako iż niniejsza praca koncentruje się na ścieżce aktywacji SRF z udziałem MRTF, mechanizm ten opisano bardziej szczegółowo poniżej.

MRTF należą do rodziny białek wiążących globularną aktynę (G-aktynę) dzięki obecności trzech motywów RPEL (RPXXXEL) w ich cząsteczkach (Mouilleron i in., 2012). Pierwszym zidentyfikowanym białkiem z tej rodziny była miokardyna (Wang i in., 2001). Jej występowanie jest ograniczone do komórek mięśnia sercowego i mięśni gładkich, dlatego też poszukiwano innych białek mogących regulować ekspresję genów zależną od SRF poza mięśniem sercowym. W wyniku tych badań odkryto dwa kolejne białka podobne do miokardyny- czynniki transkrypcyjne: MRTF-A (zwany także: MKL1, BSAC oraz MAL) i MRTF-B (MKL2; Wang i in., 2002). Jak pokazują badania, MRTF-A i MRTF-B są zlokalizowane zarówno w ciele komórki jak i w dendrytach. Obrazowanie subkomórkowej lokalizacji tych białek wskazuje na obecność MRTF w kolcach dendrytycznych, w tym w zagęszczeniu postsynaptycznym (PSD; Kaneda i in., 2018).

#### 1.7.3.2.2. Mechanizm regulacji aktywności MRTF/SRF

Podobnie jak w przypadku SRF, zidentyfikowano także modyfikacje potranslacyjne MRTF wpływające na aktywność tych białek. Jednak jak wynika z badań efekt fosforylacji MRTF nie jest jednoznaczny i zależy od miejsca w cząsteczce, które zostało zmodyfikowane (Panayiotou i in., 2016). Dodatkowo, do ufosforylowania MRTF może dochodzić na drodze zależnej od białek Rho, jak również poprzez aktywację kinaz ERK, łączonych zwyczajowo z regulacją TCF (Kalita i in., 2006; Muehlich i in., 2008).

Główny mechanizm regulacji aktywności MRTF/SRF opiera się na zmianach ilości wolnej G-aktyny, dzięki czemu MRTF stanowią swoiste indykatory poziomu G-aktyny w cytoplazmie komórki (Vartiainen i in., 2007; Wiezlak i in., 2012). Sygnały przekazywane przez receptory transbłonowe, takie jak receptory sprzężone z małymi białkami G czy integryny, powodują aktywację Rho GTP-az: RhoA, Rac1, Cdc42 (Hill i in., 1995; Miralles i in., 2003). Na skutek procesów, w których udział biorą białka

wiążące aktynę, np. kofilina czy profilina, zmienia się stosunek ilości G-aktyny do filamentów (F-) aktyny promując wzrost i stabilizację włókien aktynowych. W stanie podstawowym białka MRTF są związane w cytoplazmie z cząsteczki G-aktyny, co blokuje ich translokacje do jądra komórkowego. Dzieje się tak ponieważ w białkach MRTF sekwencje NLS zlokalizowane są w obrębie motywów RPEL, gdzie na skutek związania G-aktyny dochodzi do zmian konformacji uniemożliwiają import do jądra komórkowego (Hirano i Matsuura, 2011). W wyniku polimeryzacji F-aktyny i spadku ilości wolnej G-aktyny następuje odłączenie się cząsteczek MRTF, co umożliwia oddziaływanie NLS z białkami odpowiedzialnymi za translokację do jądra komórkowego, importyną  $\alpha/\beta$  (Pawłowski i in., 2010). W jądrze komórkowym, MRTF oddziałując z SRF aktywują ekspresję genów związanych z cytoszkieletem aktynowym m. in. *Acta2* i *Tpm1a* (Selvaraj i Prywes, 2004). Okres akumulacji MRTF w jądrze komórkowym zależy głównie od dynamiki eksportu tych molekuł z jądra (Vartiainen i in., 2007). Cząsteczki MRTF zawierają sekwencje eksportu z jądra komórkowego (ang. *nuclear export sequences*, NES), które umożliwiają ich transport do cytoplazmy przez eksportynę 1. W licznych badaniach obserwuje się wolniejszą akumulację MRTF-B w jądrze komórkowym w porównaniu do MRTF-A, jednak przyczyna tych różnic w kinetyce nie jest jeszcze dobrze poznana (Hadden i in., 2017; Hipp i in., 2019).

Kolejnym mechanizmem regulującym aktywność MRTF, którego działanie oparte jest o dynamikę polimeryzacji aktyny jest proces opisany przez grupę prof. Grosse'a (Baarlink i in., 2013). W wyniku stymulacji surowicą w jądrach komórek ssaczych zaobserwowano tworzenie się filamentów aktynowych, które analogicznie do filamentów w cytoplazmie, promują aktywność transkrypcyjną zależną od MRTF/SRF. Współistnienie tych dwóch mechanizmów umożliwia jeszcze precyzyjniejszą kontrolę i regulację ekspresji genów w odpowiedzi na stymulację.

## 1.8. Ekspresja genów plastyczności neuronalnej regulowana przez SRF

Badania wykazują, iż w OUN czynnik transkrypcyjny SRF zaangażowany jest głównie w regulację ekspresji genów należących do jednej z dwóch grup: genów odpowiedzi wczesnej (IEG) lub genów związanych z cytoszkieletem aktynowym (Knöll i Nordheim, 2009; Kuzniewska i in., 2016). W odpowiedzi na bodźce, w komórkach nerwowych dochodzi do silnej i przejściowej indukcji grupy genów, która zazwyczaj



nie wymaga syntezy nowych białek (Bahrami i Drabløs, 2016). Geny odpowiedzi wczesnej odgrywają kluczową rolę w różnorodnych procesach, m. in. wzroście i różnicowaniu komórek, odpowiedzi na stres, onkogenezie, odpowiedzi immunologicznej czy plastyczności neuronalnej (Kaczmarek i Chaudhuri, 1997; Yap i Greenberg, 2018). Wiele spośród IEG to czynniki transkrypcyjne, które w kolejnych etapach aktywują ekspresję genów odpowiedzi późnej. Pierwszym zidentyfikowanym genem z tej grupy, którego ekspresję reguluje SRF, jest protoonkogen i czynnik transkrypcyjny *c-fos* (Greenberg i Ziff, 1984). Produkt tego genu wchodzi w skład kompleksu białkowego AP-1 (ang. *activator protein 1*), który jest kluczowym czynnikiem warunkującym postnatalny rozwój neuronów (Yap i Greenberg, 2018; Zhang i in., 2002).

Inny przykład może stanowić czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego (BDNF), który podobnie jak transformujący czynnik wzrostu  $\beta$  (ang. *transforming growth factor  $\beta$* , TGF  $\beta$ ) jest neurotrofiną, która aktywuje SRF (Ishikawa i in., 2010; Kalita i in., 2006). Ponieważ ekspresja genu *Bdnf* jest bezpośrednio regulowana przez SRF, powstaje w ten sposób swoista pętla autoregulacyjna: w wyniku aktywacji SRF przez BDNF dochodzi do wzrostu poziomu transkrypcji BDNF (Etkin i in., 2006; Kuzniewska i in., 2013). Następnie BDNF może być zaangażowany w procesy plastyczności synaptycznej, modyfikujące strukturę i efektywność połączeń nerwowych (Zagrebelsky i Korte, 2014).

Kolejnym genem odpowiedzi wczesnej, którego ekspresja zależy od SRF jest *Arc* (ang. *activity-regulated cytoskeleton-associated; Arg3.1*). Białko będące jego produktem odgrywa kluczową rolę m. in. w procesie skalowania synaptycznego związanego z plastycznością homeostatyczną. W odpowiedzi na długotrwałe pobudzenie neuronalne receptory AMPA znajdujące się na synapsie ulegają internalizacji. Proces ten jest zależny od *Arc* i może stanowić mechanizm obronny przed rozwojem epilepsji (Nikolaienko i in., 2018; Shepherd i in., 2006).

Ponadto, w neuronach SRF reguluje ekspresję wielu innych IEG, m.in.: *Egr1* (ang. *early growth response gene*), *Egr2*, *Egr3*, *Cyr61* (ang. *cysteine-rich angiogenic inducer 61*) i *FosB* (ang. *FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B*), które odgrywają znaczące role w procesach plastyczności neuronalnej (Esnault i in., 2014; Knöll i Nordheim, 2009; Kuzniewska i in., 2016; Lösing i in., 2017; Parkitna i in., 2010; Rieker i in., 2012). SRF regulując ekspresję m. in. indukowalnych czynników

transkrypcyjnych, które w sposób pośredni lub bezpośredni wpływają na neurony, może modulować cały program transkrypcyjny uruchamiany w odpowiedzi na pobudzenie. Tym samym regulując takie procesy jak tworzenie i dojrzewanie synaps czy zmiany plastyczne, którym podlegają neurony (West i Greenberg, 2011).

Z drugiej strony, już w 1986 Minty i Kedes odkryli, że ekspresja wielu genów związanych z cytoszkieletem aktynowym jest zależna od SRF. Badacze zidentyfikowali w promotorach tych genów sekwencję CC[A/T]<sub>6</sub>GG, nazwaną potem motywem CARG. Cytoszkielekt aktynowy w neuronach jest zbudowany z dwóch izoform aktyny:  $\gamma$ -aktyny i  $\beta$ -aktyny, a ekspresja obydwu tych genów jest bezpośrednio regulowana przez SRF (Miano i in., 2007; Sun i in., 2006). Ponadto, SRF reguluje ekspresję także wielu innych genów kodujących białka związane z aktyną, takich jak:  $\alpha$ -TAT1 (ang.  *$\alpha$ -tubulin acetyltransferase 1*), *Tpm1a* (ang. *tropomyosin 1  $\alpha$* ), *Myl9* (ang. *myosin regulatory light polypeptide 9*), winkulina,  $\beta$ 1-integryna, które wpływają na stabilność filamentów aktynowych, adhezję komórkową czy funkcje białek motorycznych (Fernández-Barrera i in., 2018; Schratt i in., 2002). Jednym z takich białek jest kofilina 1, która odpowiada za transport aktyny do jądra komórkowego, czy oddziałując z włóknami aktynowymi wpływa na ich dynamikę (Bamburg i in., 2021; Ben Zablah i in., 2020). W neuronach z niskim poziomem SRF lub MRTF obserwuje się wzrost ilości ufosforylowanej kofiliny 1, co koreluje ze spadkiem jej aktywności (Beck i in., 2012; Nader i in., 2019; Zimprich i in., 2017) oraz destabilizacją włókien aktynowych. Pokazuje to jak ważna jest aktywność SRF dla utrzymania odpowiedniego poziomu samej aktyny oraz białek z nią związanych, niezbędnych do formowania, stabilizacji i przebudowy kolców dendrytycznych (Basu i Lamprecht, 2018; Penzes i Rafalovich, 2012).

### 1.9. Rola szlaku MRTF/SRF w funkcjonowaniu OUN

W badaniach z zastosowaniem konwencjonalnych modeli zwierzęcych typu *knock-out (KO)* zaobserwowano, iż zwierzęta o genotypie SRF KO umierają na wczesnym etapie rozwoju embrionalnego ze względu na poważne zaburzenia w rozwoju mezodermy (Weinhold i in., 2000) oraz liczne nieprawidłowości w kształtowaniu się ekto- i endodermy (Schratt i in., 2002). Pierwsze oznaki zaburzeń

rozwoju są widoczne ok. siódmego dnia rozwoju prenatalnego (E 7,5): embriony SRF KO są mniejsze niż osobniki z miotu o genotypie prawidłowym (ang. *wild type*, WT) lub heterozygoty, a ok. E 12,5 brak SRF prowadzi do śmierci. Podobnie delecja *Mrtfb*, co wykazano w badaniach z zastosowaniem dwóch różnych szczepów myszy MRTF-B KO (Li i in., 2005; Oh i in., 2005), powoduje poważne wady w rozwoju układu sercowo-naczyniowego i śmierć na etapie płodowym (ok. E 13,5 – E 14,5). Jednak już pojedynczy allel genu *Mrtfa* lub *Mrtfb* jest wystarczający do przywrócenia prawidłowego fenotypu u myszy podwójnie transgenicznych MRTF KO.

Zatem rola białek MRTF i SRF w funkcjonowaniu OUN nie mogłaby zostać lepiej poznana, gdyby nie stworzenie modeli badawczych opartych na technice indykowanej delecji genów (ang. *conditional knock-out*; cKO) ograniczonej tylko do populacji komórek postmitotycznych. Analiza hipokampów myszy cKO SRF, u których delecja *Srf* nastąpiła w późnym okresie prenatalnym wykazała, iż jest on niezbędny do efektywnego tworzenia sieci neuronowych oraz prawidłowej organizacji m.in. włókien mszystych czy zakończeń aksonalnych. Ponadto, myszy SRF cKO, u których delecja genu została zaindukowana jeszcze na etapie rozwoju prenatalnego prezentują objawy neurologiczne takie jak ataksja czy wodogłowie oraz inne zaburzenia fenotypowe: niższą wagę, osłabione pobieranie pokarmu, upośledzoną lokomocję, które prowadzą do śmierci w wieku ok. trzech tygodni (Alberti i in., 2005; Knöll i in., 2006).

Co ciekawe, myszy transgeniczne, u których usunięto *Srf* w dojrzałych neuronach przodomózgowia nie różnią się pod względem wielkości, stanu zdrowia czy anatomii mózgu od myszy WT (Etkin i in., 2006; Ramanan i in., 2005). Jednak neurony piramidowe pola CA1 hipokampa tych myszy charakteryzują się osłabioną siłą długotrwałego pobudzenia synaptycznego (LTP; Ramanan i in., 2005) oraz nieprawidłowościami w indukcji długotrwałego osłabienia synaptycznego (LTD; Etkin i wsp., 2006). Analogiczne zaburzenia w późnej fazie LTD zaobserwowano w komórkach Purkiniego hodowanych *in vitro*, w których obniżono poziom SRF lub MRTF (Smith-Hicks i in., 2010). Ponadto, dorosłe myszy, u których usunięto *Srf* mają zaburzone kształtowanie się pamięci bezpośredniej w odpowiedzi na nowy kontekst, jak również uczenie się asocjacyjne zależne od formacji hipokampa (Etkin i in., 2006). Badania te wskazują na istotną rolę jaką pełni SRF w procesach plastyczności synaptycznej w odpowiedzi na pobudzenie w dojrzałym mózgu.

Delecja *Srf* w neuronach przodomózgowia dorosłych osobników wpływa na intensyfikację procesów epileptogenezy i występowanie drgawek w mysich modelach epilepsji (Kuzniewska i in., 2016; Lösing i in., 2017) oraz zaburza reakcje na krótkotrwały stres (Zimprich i in., 2017).

Z danych literaturowych wynika, iż SRF i jego koaktywatory odgrywają ważną rolę w rozwoju mózgu. Delecja *Mrtf* (Mokalled i in., 2010) lub *Srf* (Alberti i in., 2005) w komórkach przodomózgowia na późnym etapie rozwoju prenatalnego prowadzi do zaburzenia migracji komórek prekursorowych neuronów ze strefy przykomorowej (ang. *subventricular zone*, SVZ) do opuszki węchowej. Jest to związane z nieprawidłowościami w dynamice polimeryzacji cytoszkieletu aktynowego spowodowanymi spadkiem poziomu F-aktyny oraz upośledzeniem funkcji białek związanych z aktyną, m.in. gelzoliny i kofiliny, której ekspresja jest bezpośrednio regulowana przez SRF (Sun i in., 2006).

Ponadto, badania *in vitro* neuronów z obniżoną transkrypcją zależną od MRTF/SRF wykazały, iż jest ona niezbędna do prawidłowego wzrostu neurytów i rozbudowy drzewa dendrytycznego (Ishikawa i in., 2010; Stern i in., 2009). Ta rola szlaku MRTF/SRF jest promowana przez aktywinę (ang. *activin*), białko z nadrodziny transformującego czynnika beta (TGF- $\beta$ ), natomiast hamowana przez białko SCAI (ang. *suppressor of cancer cell invasion*) występujące w jądrze komórkowym. Badania *in vitro* neuronów z delecją *Srf* potwierdzają niższą długość aksonów, słabszy wzrost neurytów, zaburzoną dynamikę aktyny w porównaniu do neuronów z prawidłowym poziomem SRF (Knöll i in., 2006) oraz mniejszą złożoność drzewa dendrytycznego takich komórek (Ishikawa i in., 2010; Stern i in., 2009). Jak pokazały badania przeprowadzone przez grupę prof. Barco (del Blanco i in., 2019), SRF jest kluczowym czynnikiem zaangażowanym w różnicowanie i dojrzewanie komórek neuronalnych, zarówno podczas rozwoju osobniczego jak i w dojrzałym mózgu. Jednak rola białek MRTF i SRF w procesie powstawania i dojrzewania kolców dendrytycznych nadal nie jest znana.

#### 1.9.1. MRTF i SRF w kontekście występowania zaburzeń neurorozwojowych

Regulacja ekspresji genów na drodze zależnej od MRTF i SRF odgrywa ważną rolę w rozwoju OUN. Nieprawidłowości w funkcjonowaniu tego szlaku mogą być

przyczyną chorób neurorozwojowych. Analiza licznej kohorty osób cierpiących na schizofrenię wykazała aż siedem SNP w genie kodującym MRTF-A korelujących z występowaniem zaburzeń psychicznych (Luo i in., 2015). Co ciekawe, polimorfizmy te występują w intronach genu *mrtfa* i choć nie wpływają bezpośrednio na sekwencję aminokwasową powstałego białka, to mogą mieć wpływ na regulację transkrypcji genu. Substytucje aminokwasów w łańcuchu MRTF-A są także łączone z występowaniem ASD (Neale i in., 2012).

Dla genu *mrtfb* zidentyfikowano powstające *de novo* mutacje zmiany sensu będące skutkiem substytucji zachodzących w obrębie eksonów, które korelują z występowaniem ASD (Holt i in., 2010; Neale i in., 2012).

Zgodnie z danymi literaturowymi, dotychczas nie zidentyfikowano wariantów pojedynczego nukleotydu w genie SRF łączonych z zaburzeniami w OUN. Mimo to obserwowane są liczne mutacje i polimorfizmy w genach, których ekspresja regulowana jest bezpośrednio przez ten czynnik transkrypcyjny u osób cierpiących na choroby neurorozwojowe. Delecje lub insercje w regionach tych genów, zidentyfikowane w badaniach z zastosowaniem mikromacierzy, są łączone z występowaniem takich zaburzeń jak: ASD, niepełnosprawność intelektualna czy epilepsja (za Kuzniewska i in., 2016). Jest to zgodne z obserwacją, iż SNP w genach wyrażanych już na etapie różnicowania komórek częściej korelują z występowaniem rozmaitych chorób (Chen i Rajewsky, 2006). Ponadto, zaburzenia ekspresji genów, których transkrypcja zależy od SRF, są obserwowane w przebiegu licznych chorób OUN, np. u osób cierpiących na epilepsję odnotowuje się podwyższony poziom m. in.: *Bdnf*, *Zfp36*, *Fos*, *JunB* czy *Cyr61* w neuronach korowych (Beaumont i in., 2012).

Szacunki badaczy wskazują, iż ok. 88% SNP, których obecność koreluje z występowaniem rozmaitych chorób jest zlokalizowanych w niekodujących regionach DNA (Hirschhorn i Daly, 2005). Takie regulatorowe polimorfizmy (rSNP) występują w obrębie lub w pobliżu sekwencji wiązania dla czynników transkrypcyjnych (Knight, 2005). Analogiczne obserwacje poczyniono także dla sekwencji CArG, z którą specyficznie łączy się SRF (Stepanek i in., 2007). Regulatorowe SNP w obrębie CArG korelują z występowaniem zaburzeń układu nerwowego, m. in.: zaburzenia afektywnego dwubiegunowego czy stwardnienia zanikowego bocznego (Benson i in., 2011).

## 2. Cele pracy

Dotychczasowe badania wskazują na kluczową rolę czynnika transkrypcyjnego SRF w prawidłowym funkcjonowaniu OUN. Już podczas rozwoju prenatalnego SRF jest zaangażowany w migrację komórek, formowanie neurytów, organizację włókien mszystych czy zakrętu zębatego hipokampa. SRF bierze także udział w istotnych procesach zachodzących w dorosłym mózgu. Niski poziom SRF w dojrzałym mózgu prowadzi do zaburzeń w strukturze kolców dendrytycznych oraz nieprawidłowości w przekaźnictwie synaptycznym. Dlatego też, istotne jest zbadanie roli, jaką pełni SRF na pograniczu tych etapów rozwoju, czyli we wczesnym okresie rozwoju postnatalnego. W tym właśnie czasie zachodzą procesy szczególnie ważne dla tworzenia prawidłowych połączeń neuronowych, czyli dojrzewanie kolców dendrytycznych. Jest to proces bardzo złożony, którego regulacja nie jest jeszcze w pełni poznana. Zbadanie molekularnego podłoża procesu dojrzewania kolców dendrytycznych jest niezwykle ważne nie tylko w kontekście poznawczym, lecz także w odniesieniu do etiologii chorób neurorozwojowych OUN, w obrazie których obserwowane są zaburzenia w liczbie i stopniu dojrzałości kolców dendrytycznych. W związku z tym, głównym celem niniejszej pracy było **zbadać udział czynnika transkrypcyjnego SRF w regulacji dojrzewania strukturalnego i funkcjonalnego kolców dendrytycznych w rozwijającym się mózgu.**

Na potrzeby realizacji tego celu sformułowano szereg szczegółowych celów badawczych:

- 1) Określenie poziomu białka SRF oraz transkrypcji od niego zależnej w przyjętych modelach badawczych *in vitro* i *in vivo*.
- 2) Zbadanie wpływu czynnika transkrypcyjnego SRF na dojrzewanie połączeń neuronalnych w rozwoju poprzez analizę gęstości i morfologii kolców dendrytycznych.
- 3) Analiza wpływu obniżonego poziomu SRF na spontaniczną aktywność neuronalną.
- 4) Charakterystyka zależnych od SRF zmian w poziomach podjednostek receptora AMPA: GluA1 i GluA2.
- 5) Sprawdzenie udziału szlaku MRTF/SRF w regulacji procesu dojrzewania kolców dendrytycznych w rozwoju.

### 3. Materiały i metody

#### 3.1. Podstawowe odczynniki chemiczne

Odczynniki chemiczne najczęściej stosowane w doświadczeniach opisanych w niniejszej rozprawie zaprezentowano w tabeli 1.

**Tabela 1.** Najczęściej stosowane odczynniki chemiczne.

Odczynnik	Producent, numer katalogowy
Akryloamid: bis akryloamid 29:1	LabEmpire, ACR012
Błękit bromofenolowy	Racl Roch, T116
Dodecylosiarczan (VI) sodu – SDS	LabEmpire, SDS999
Chlorek sodu – NaCl	Chempur, 363-117941206
Chlorek potasu – KCl	Chempur, 363-117397402
Etylowy alkohol 50%	Chempur, 113964803
Etylowy alkohol 75%	Chempur, 113964202
Etylowy alkohol 76,6%	POCh, 396420420
Etylowy alkohol 99,8%	POCh, 396480427
Glicyna	LabEmpire, GLN002
Glicerol	POCh44332013
Izoproanol	Chempur, 363-117515002
Kwas etylenodiaminotetraoctowy – EDTA	LabEmpire, EDT001
Metylowy alkohol	Chempur, 363-116219904
β -merkaptoetanol	Sigma, M6250
Nadtlenosiarczan diamonu – APS	Sigma, A3678
N, N, N', N'-tetrametylo-1,2 diamina – TEMED	Sigma, T9281
Normlna surowica kozia – NDS	Sigma, S30-M
Buforowana fosforanem sól fizjologiczna – PBS	Gibco, 18912-014
Ponceau S	Fluka, 81462
Paraformaldehyd – PFA	Sigma, 158127
Sacharoza	POCh, 772090110
Suberat bissulfosukcynimidylu – BS <sup>3</sup>	Thermo Fisher, 21580
Tris – (hydroksymetylo) – aminometan – Tris	POCh, 853470115
Triton X-100	Sigma, T8787
Tween 20	Sigma, P9416

#### 3.2. Najczęściej stosowane roztwory

Do sporządzania roztworów używano wody oczyszczonej na drodze odwróconej osmozy i ultrafiltracji z zastosowaniem aparatu Mili-RO® Plus (Millipore). W tabeli 2 wymieniono najczęściej stosowane roztwory oraz ich skład.

**Tabela 2.** Najczęściej stosowane roztwory.

Nazwa	Skład
<b>Roztwory stosowane w pracy z białkami i technice Western Blot</b>	
10 x bufor do elektroforezy białek	0,25 M Tris pH 8,4; 2 M glicyna; 10% SDS
10 x TBS	0,5 M Tris-HCl; 1,5 M NaCl; pH 7,5
1 x TBS-T	0,05 M Tris-HCl; 0,15 M NaCl; 0,1% Tween 20
5 x bufor Laemmliego	0,315 M Tris-HCl pH 6,8; 50% glicerol; 10% SDS; 25% $\beta$ -merkaptoetanol; 0,0125% błękit bromofenolowy
1 x bufor do lizy tkanek	50 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% SDS
Bufor do blokowania błon nitrocelulozowych	10% mleko odtłuszczone w 1 X TBS-T
Roztwór czerwieni Ponceau S	0,25% czerwień Ponceau S; 40% metanol; 5% kwas octowy
Bufor do usuwania przeciwciał związanych z błonami nitrocelulozowymi	62,5 mM Tris pH 6,8; 2% SDS, 0,65% $\beta$ -merkaptoetanol
<b>Roztwory stosowane w technice sieciowania molekularnego</b>	
Bufor cytrynianu sodu; 5 mM; pH 5,0	5 mM kwas cytrynowy; 5 mM cytrynian sodu
<b>Roztwory stosowane w badaniach elektrofizjologicznych</b>	
Roztwór elektrodowy, IS	130 mM glukonian cezu; 20 mM HEPES; 3 mM TEA-Cl; 0,4 mM EGTA; 4 mM Na <sub>2</sub> ATP; 0,3 mM NaGTP; 4 mM QX-314Cl; pH 7,0–7,1; osmolarność 290–295 mOsm
Sztuczny płyn mózgowo-rdzeniowy, aCSF	119 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 1,3 mM MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O; 1 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 26 mM NaHCO <sub>3</sub> ; 20 mM D-glukoza; 2,5 mM CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O
<b>Roztwory stosowane w technikach immunocytochemicznych</b>	
Bufor GDB	0,1% surowicza albumina wołowa (BSA); 0,5% Triton X-100; 0,03 M bufor fosforanowy pH 7,4; 0,9 M NaCl

### 3.3. Materiały użyte do hodowli bakteryjnych

#### Szczep bakterii kompetentnych:

*Escherichia coli* (*E. coli*) One Shot TOP 10 (Invitrogen, nr kat. C404010)  
 genotyp: F- *mcrA*  $\Delta$  (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$  *lacX74 recA1 araD139*  
 $\Delta$ (*araleu*)7697 *galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG*

#### Podłoża hodowlane:

1. LB (ang. *Luria-Bertani broth*; Bio-Shop, nr kat. LBL405)



2. LB Agar (Bio-Shop, nr kat. LBL406)

2. Pożywka SOC (ang. super optimal catabolite repression; Sigma-Aldrich, nr kat. 85469)

#### **Antybiotyk:**

Ampicylina w formie soli sodowej (Bio-Shop, nr kat. AMP201)

### 3.4. Wektory plazmidowe

Wektory plazmidowe wykorzystane na potrzeby niniejszej pracy zostały wymienione i scharakteryzowane w tabeli 3.

**Tabela 3.** Zestawienie wektorów plazmidowych wykorzystanych do transfekcji komórek neuronalnych lub stworzonych na potrzeby wyprodukowania wektorów wirusowych.

Nazwa wektora	Charakterystyka i adnotacja
pSuper	Wektor plazmidowy umożliwiający konstytutywną ekspresję shRNA w komórkach ssaczych. Sekwencja shRNA znajduje się pod kontrolą promotora polimerazy III H1-RNA (Oligoengine).
shLuc	Wektor plazmidowy kodujący shRNA specyficznie nakierowany na sekwencję mRNA <i>lucyferazy</i> .
pSynapsynaGFP	Wektor ekspresyjny kodujący gen białka zielonej fluorescencji (GFP) znajdujący się pod kontrolą promotora genu <i>synapsyny</i> .
shMRTF	Wektor pLKO.1 (Addgene, nr kat 27161) z wklonowaną sekwencją shRNA specyficznie nakierowaną na docelowe sekwencje mRNA <i>Mrtf</i> ( <i>MKL1</i> i <i>MKL2</i> ).
shSRF	Wektor pRNAT-H1.1/Shuttle kodujący shRNA specyficznie nakierowany na docelową sekwencję mRNA <i>Srf</i> , niosący gen białka GFP. Otrzymany od B. P. Herringa (Department of Cellular and Integrative Physiology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN; Yin i wsp., 2006).
shCTR	Wektor pRNAT-H1.1/Shuttle zawierający kontrolne shRNA (scramble), niosący gen białka GFP. Otrzymany od B. P. Herringa (Department of Cellular and Integrative Physiology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN; Yin i wsp., 2006).
p5xSRE_Luc	Wektor plazmidowy zawierający gen <i>lucyferazy</i> z <i>Renilla reniformis</i> znajdujący się pod kontrolą podstawowego elementu regulującego ekspresję (TATA box) wraz z 5 powtórzeniami sekwencji SRE z promotora genu <i>c-fos</i> (Stratagene).

Nazwa wektora	Charakterystyka i adnotacja
pEF1 $\alpha$ LacZ	Wektor ekspresyjny kodujący $\beta$ -galaktozydazę ( $\beta$ -Gal) z operonu laktozowego <i>Escherichia coli</i> (Kalita i wsp., 2006).
pAAV_shCTR	Wektor plazmidowy użyty do produkcji wirusów zależnych od adenowirusów. Sklonowany na bazie wektora plazmidowego pAAV-MCS (otrzymanego od prof. W. Konopki, Stratagene). Jako matryca do namnożenia sekwencji shRNA i genu <i>GFP</i> posłużył wektor plazmidowy shSRF.
pAAV_shSRF	Wektor plazmidowy użyty do produkcji wirusów zależnych od adenowirusów. Sklonowany na bazie wektora plazmidowego pAAV-MCS (otrzymanego od prof. W. Konopki, Stratagene). Jako matryca do namnożenia sekwencji shRNA i genu <i>GFP</i> posłużył wektor plazmidowy shCTR.

### 3.5. Zwierzęta

Eksperymenty z udziałem zwierząt opisane w niniejszej rozprawie zostały przeprowadzone z godnie z obowiązującymi regulacjami prawnymi oraz za zgodą I Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie (nr 622/2018, 951/2019 oraz 984/2020). Dołożono wszelkich starań, aby zredukować liczbę zwierząt użytych w doświadczeniach i zminimalizować ich cierpienie.

#### 3.5.1. Materiał zwierzęcy do wyprowadzania pierwotnych hodowli neuronalnych

- 1) Oseski P 0 (ang. *postnatal day*, P) szczurów stada Wistar Crl:Cmd:(WI)WU, Zwierzętarnia Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej, PAN
- 2) Oseski P 0 – 1 myszy stada *Srf<sup>f/f</sup>* (B6.129S6-Srft<sup>m1Rmn</sup>/J; Jackson's Laboratories, nr kat. 006658), Zwierzętarnia Instytutu Biologii Doświadczalnej, PAN

#### 3.5.2. Zwierzęta wykorzystane w doświadczeniach

- 1) Myszy stada C57BL/6JCmd, osobniki w wieku P 0 – 60, Zwierzętarnia Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej, PAN; w celu pozyskania ekstraktów białkowych z tkanki

2) Myszy stada *Srf<sup>f/f</sup>CaMKCreERT2*, osobniki w wieku P 0 – 60, Zwierzętarńia Instytutu Biologii Doświadczalnej, PAN; w celu przeprowadzenia analiz *ex vivo*.

m

### 3.6. Odczynniki stosowane w pierwotnych hodowlach neuronalnych

W tabeli 4. przedstawiono odczynniki stosowane do przygotowania roztworów i pożywek używanych w celu założenia i prowadzenia pierwotnych hodowli neuronalnych.

**Tabela 4.** Odczynniki i pożywki stosowane w pierwotnych hodowlach neuronalnych.

Nazwa	Firma, numer katalogowy
Bufor HEPES	Sigma-Aldrich, H0887
Chlorek magnezu – MgCl <sub>2</sub>	POCh, 6120500110
Chlorek wapnia – CaCl <sub>2</sub>	POCh, 739740161
Cysteina	Sigma-Aldrich, C7352
Czteroboran sodu dziesięciowodny – Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> * 10 H <sub>2</sub> O	POCh, 796080110
D-glukoza (roztwór 45%)	Sigma-Aldrich, G8769
GlutaMax	Thermo Fisher Scientific, 35050061
HEPES (1M)	Thermo Fisher Scientific, 15630080
Inhibitor trypsyny	Sigma-Aldrich, T9253
Kwas borowy	POCh, 531360115
Kwas kynureinowy	Sigma-Aldrich, K3375
Laminina	Roche, 11243217001
Mieszanina antybiotyków: penicyliny i streptomycyny	Thermo Fisher Scientific, 10378016
Papaina	Worthington, LS003126
Pirogronian sodu	Sigma-Aldrich, S8636
Poli-D-lizyna (PDL)	Sigma-Aldrich, A003E
Pożywka DMEM z wysoką zawartością glukozy (ang. <i>dulbecco's Modified eagle medium, high glucose</i> )	Thermo Fisher Scientific, 11995065
Pożywka minimalna MEM (ang. <i>minimum essential medium</i> ) bez L-glutaminy	Thermo Fisher Scientific, 51200-046

Nazwa	Firma, numer katalogowy
Pożywka MEM mieszanki endogennych aminokwasów (ang. <i>MEM non-essential aa</i> ) (100 x)	Thermo Fisher Scientific, M7145
Pożywka Neurobasal – A (1 x) bez glutaminy, bez czerwieni fenolowej	Thermo Fisher Scientific, 12349015
Roztwór soli GBSS (ang. <i>Gey's Balanced Salt Solution</i> )	Sigma-Aldrich, G9779
Siarczan sodu – Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	POCh, 807870111
Siarczan potasu – K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	POCh, 2319155
Suplement B-27 (50 x)	Thermo Fisher Scientific, 17504-044
Surowica końska (ang. horse serum, HS) inaktywowana termicznie	Thermo Fisher Scientific, 26050070
Surowica cielęca płodowa (ang. fetal bovine serum, FBS)	Thermo Fisher Scientific, 10500064
Trypsyna-EDTA (0,25%)	Thermo Fisher Scientific, 25200056
Wodorotlenek sodu – NaOH	POCh, 810942161
Zrównoważony roztwór soli Hank – HBSS (ang. <i>Hank's Balanced salt solution</i> ) (1 x)	Mp Biomedicals, 0918100

### 3.7. Skład roztworów i pożywek stosowanych w pierwotnych hodowlach neuronalnych

Tabela 5. zawiera składy roztworów i pożywek stosowanych do założenia i utrzymania pierwotnych hodowli neuronalnych.

**Tabela 5.** Roztwory i pożywki stosowane w pierwotnych hodowlach neuronalnych.

Nazwa	Skład
Bufor boranowy 0,1 M pH 8,5	0,1 M kwas borowy; 0,1 M czteroboran sodu dziesięciowodny
Medium do izolacji (ang. <i>dissociation media</i> , DM)	82 mM Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 30 mM K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 5,8 mM mgCl <sub>2</sub> ; 2,52 mM CaCl <sub>2</sub> ; 1 mM HEPES, 20 mM glukoza 45%; 0,2 mM NaOH
Pożywka MEM/FBS	MEM; 10% cielęca surowica płodowa (FBS); 1% 100 x MEM mieszanki endogennych aminokwasów; 3,15%-45% glukoza; 1% GlutaMax; 1% pirogronian sodu; 1% mieszanki penicylina i streptomycyna

Nazwa	Skład
Mieszanka DM i Ky/Mg	90 ml DM; 10 ml Ky/Mg
Mieszanka kwasu kynureinowego i MgCl <sub>2</sub> (10 x Ky/Mg)	10 mM kwas kynureinowy; 100 mM MgCl <sub>2</sub> ; 5 mM HEPES
Neurobasal – A/B27 (NB-A/B27)	Neurobasal A; 2% symplement B27; 1% GlutaMax; 1% mieszanka penicylina i streptomycyna
Roztwór papainy	9,7 ml DM i Ky/Mg; 4,5 mg cysteina; 25 µl 1M NaOH; 100 U papaina
Roztwór poli-D-lizyny i lamininy	1 mg/ml PDL; 100 µl laminina; 20 ml bufor boranowy
Roztwór inhibitora trypsyny	100 mg inhibitor trypsyny; 15 µl NaOH; 10 ml DM i Ky/Mg

### 3.8. Hodowle bakteryjne

#### 3.8.1. Warunki hodowli bakteryjnych

Do izolacji kolonii pochodzących od pojedynczych bakterii stosowano sterylne podłoże stałe w postaci LB z dodatkiem 1,5% agaru, wzbogacone antybiotykiem ampicyliną (100 µg/ml). Z zawiesiny bakterii wykonywano posiew redukcyjny, następnie hodowano w 37°C przez noc.

W celu izolacji plazmidowego DNA, bakterie namnażano w płynnym podłożu LB zawierającym ampicylinę (100 µg/ml). Dwa ml pożywki LB zaszczepiano pojedynczą kolonią bakterii, a następnie hodowano wytrząsając z prędkością 225 obr./min w temperaturze 37°C przez 6 godzin. Kolejno, 1 ml hodowli bakteryjnej dodawano do 500 ml pożywki LB i hodowano w warunkach jak wyżej przez 12-24 godziny.

#### 3.8.2. Transformacja bakterii kompetentnych metodą szoku cieplnego

W celu namnożenia plazmidowego DNA (pDNA), bakterie kompetentne transformowano wybranym konstruktem postępując zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta. Do 50 µl zawiesiny bakterii dodawano 100-500 ng oczyszczonego pDNA i pozostawiano przez 30 minut na lodzie (w temperaturze 4°C). Następnie mieszaninę inkubowano przez 30 sekund w temperaturze 42°C, po czym schładzano na lodzie przez 2 minuty. Do tak przygotowanej zawiesiny dodawano 250 µl ciepłego podłoża S.O.C i inkubowano godzinę w temperaturze 37°C z wytrząsaniem. Bakterie

wysiewano na szalki Petriego ze stałym podłożem selekcyjnym, a wzrost kolonii bakterii oceniano po całonocnej inkubacji w temperaturze 37°C.

### 3.8.3. Przechowywanie szczepów bakterii

Z nocnej hodowli bakterii stransformowanych odpowiednim plazmidem (37°C, 225 obr./min) pobierano 2 ml i dodawano do niej sterylnego glicerolu (stężenie końcowe 20%). Tak przygotowane próbki przechowywano w temperaturze -80°C. W celu odnowienia hodowli, pobierano sterylnie część zamrożonych bakterii, zaszczepiano świeże podłoże LB z antybiotykiem i prowadzono hodowlę w temperaturze 37°C z wytrząsaniem 225 obr./min.

### 3.9. Izolowanie plazmidowego DNA

Zakładano całonocne hodowle bakteryjne o objętości od 5 ml do 500 ml zawierające odpowiedni antybiotyk selekcyjny w pożywce. Następnie wykonywano izolacje plazmidowego DNA metodą lizy alkalicznej z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych zestawów: MiniPrep (Qiagen, nr kat. 27106) lub MaxiPrep (Qiagen, nr kat. 12162), zgodnie z zaleceniami producenta. Umożliwiało to uzyskanie DNA plazmidowego charakteryzującego się wysokim stopniem czystości i brakiem endotoksyn.

### 3.10. Oznaczanie czystości i stężenia preparatów DNA i RNA

Stężenie i czystość kwasów nukleinowych oceniano spektrofotometrycznie poprzez pomiar absorbancji przy długości fali  $\lambda$  równej 260 nm i 280 nm stosując w tym celu urządzenie NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). Czystość preparatu DNA szacowano na podstawie stosunku absorbancji przy 260 nm i 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ). Wartości współczynnika mieszczące się w granicach 1,8 – 1,9 uznawano za świadczące o wysokim stopniu czystości badanych prób.

### 3.11. Rozdział elektroforetyczny DNA

Wykonywano elektroforezę w żelach agarozowych o odpowiednim stężeniu agarozy (Sigma, nr kat. 9539), zależnym od wielkości analizowanego fragmentu DNA, z dodatkiem barwnika Midori Green Advance DNA Stain (Abo, nr kat.MG04). Elektroforezę poziomą przeprowadzano w aparacie Mini-Sub Cell GT System (BioRad) w buforze 1 x TBE. Jako marker wielkości stosowano 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen, nr kat. 10787-018). Po przeprowadzeniu rozdziału elektroforetycznego, żełe wizualizowano w aparacie z lampą UV. Zdjęcia żeli analizowano w programie GeneSnap (Syngene).

### 3.12. Klonowanie wektorów plazmidowych

Do wyprodukowania wektorów wirusowych użytych w doświadczeniach opisanych w niniejszej pracy niezbędne było stworzenie odpowiednich wektorów plazmidowych. Jako wektor plazmidowy stanowiący podstawę do namnożenia wektorów wirusowych zastosowano plazmid pAAV-MCS (Stratagene). Elementem służącym do wyciszenia ekspresji *SRF* (w przypadku wariantu shSRF) lub sekwencję kontrolną (w przypadku shCTR) stanowił odpowiedni fragment wektora plazmidowego pRNAT-H1.1/Shuttle, który był stosowany także w innych eksperymentach *in vitro* opisanych w niniejszej pracy, gdzie używano transfekowanych szczurzych neuronów hipokampalnych (Kuzniewska i in., 2013; Yin i wsp., 2006). Poza fragmentem plazmidowego DNA (pDNA) odpowiadającym sekwencji sh wraz sekwencjami niezbędnymi do ich ekspresji, sklonowano także fragment umożliwiający wyrażanie białka zielonej fluorescencji (ang. *green fluorescent protein*, GFP). W tym celu sekwencje shCTR i shSRF znajdujące się na plazmidzie pod promotorem polimerazy III H1 wraz z sekwencją GFP znajdującą się pod kontrolą promotora CMV namnożono za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. *polimerase chain reaction*, PCR). Do amplifikacji nici wiodącej pDNA zastosowano startery zawierające dodatkowo sekwencje wprowadzającą miejsce cicia dla enzymu restrykcyjnego Not I. Sekwencje zastosowanych starterów (syntetyzowanych w firmie Genomed S. A.) zaprezentowano w tabeli 6. Skład mieszaniny reakcyjnej do reakcji PCR

oraz program zgodnie, z którym była prowadzona reakcja zawiera odpowiednio tabela 7. i tabela 8.

**Tabela 6.** Startery do reakcji PCR.

Starter	Sekwencja 5' -> 3'	Typ startera
shCTR	ACTACCGTTGTTATAGGTG	Starter przedni (ang. <i>forward</i> , F)
shSRF	AGAGAATGAGTGCCACTGG	Starter przedni (ang. <i>forward</i> , F)
GFP	CCATCTAATTCAACAAGAATTGGGACAAC	Starter wsteczny (ang. <i>reverse</i> , R)

**Tabela 7.** Skład mieszaniny reakcyjnej PCR.

Składnik	Stężenie końcowe	Objętość
bufor	1 x	5 µl
MgCl <sub>2</sub>	2,6 mM	1,5 µl
startrer F (shCTR lub shSRF)	1 µM	0,5 µl
starter R	1 µM	0,5 µl
dNTP	0,25 µM	1 µl
Polimeraza Taq	0,03 U/ µl	0,1 µl
ddH <sub>2</sub> O		40,8 µl
pDNA		0,5 µl

**Tabela 8.** Cykle reakcji PCR.

Krok	Temperatura (°C)	Czas (sek.)	Uwagi
1.	98	30	
2.	98	10	
3.	56	30	
4.	72	60	
5.	-	-	4 x powtórzenie kroków 2 – 4
6.	98	10	
7.	65	30	
8.	72	60	



Krok	Temperatura (°C)	Czas (sek.)	Uwagi
9.	-	-	29 x powtórzenie kroków 6 - 8
10.	72	10	
11.	4	-	utrzymanie

Produkty otrzymane w wyniku reakcji PCR były identyfikowane za pomocą techniki elektroforezy w 2% żelu agarozowym (zob. procedura 3.11. niniejszej pracy). Następnie fragmenty DNA o długości odpowiadających amplifikowanym fragmentom pDNA wyizolowano z żelu za pomocą GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific, nr kat. K0701) zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta. Wyizolowane DNA zawieszano w 30 µl ddH<sub>2</sub>O i oznaczano ich stężenie oraz czystość zgodnie z procedurą opisaną w paragrafie 3.10. niniejszej pracy. Następnie plazmid pAAV-MCS oraz fragmenty shCTR i shSRF poddano cięciu enzymem restrykcyjnym Not I (Thermo Scientific, nr kat. FD0596) w załączonym buforze 10x FD zgodnie z instrukcją producenta w temperaturze 37°C przez 3 godziny. Kolejno, dezaktywowano enzym restrykcyjny poprzez inkubację mieszaniny w 80°C przez 5 minut. Za pomocą zestawu Sticky-end ligation (Thermo Scientific, nr kat. EL0011) przeprowadzono reakcję ligacji liniowego fragmentu pAAV-MCS z odpowiednim fragmentem shCTR lub shSRF (stosunku molowym 1 : 3) zgodnie z instrukcją dołączoną przez producenta inkubując je przez noc w temperaturze 16°C. Następnego dnia enzym dezaktywowano poprzez 10-minutową inkubację w temp. 65°C. Otrzymane konstrukty zweryfikowano za pomocą cięcia enzymem restrykcyjnym Not I, a następnie kontroli długości otrzymanych fragmentów za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym oraz sekwencjowaniem wykonanym przez firmę Genomed S. A. Zweryfikowanymi konstrukcjami pAAV-shCTR i pAAV-shSRF ztransformowano metodą szoku cieplnego bakterie kompetentne (paragraf 3.8.2. niniejszej pracy), wyizolowano pDNA (paragraf 3.9.), oznaczono stężenie i czystość zawiesin (paragraf 3.10.) a następnie przekazano do produkcji wektorów wirusowych w Pracowni Modeli Zwierzęcych Instytutu Biologii Doświadczalnej, PAN.

### 3.13. Doświadczenia z zastosowaniem myszy transgenicznych

#### 3.13.1. Hodowla myszy transgenicznych szczepu *Srf<sup>f/f</sup>CaMKCre*

Doświadczalny model *in vivo* stanowiły myszy szczepu *Srf<sup>f/f</sup>CaMKCre* będące warunkowymi mutantami (ang. *conditional knock-out*, cKO) o tle genetycznym myszy szczepu C57BL/6 (Nader i in., 2019). Myszy te otrzymano w wyniku krzyżowania dwóch linii myszy transgenicznych: *Srf<sup>f/f</sup>* (nr szczepu 006658; Jackson's Laboratories, USA; Ramanan i wsp., 2005), u których fragment genu *Srf* został otoczony sekwencjami loxP oraz myszy linii CaMKCreER<sup>T2</sup> posiadających gen rekombinazy *Cre* połączony z fragmentem ludzkiego genu receptora estrogenowego, pod kontrolą promotora genu podjednostki *CaMKII $\alpha$*  (nr szczepu: EM:02125; The European Mouse Mutant Archive; Erdmann i wsp., 2007). Do eksperymentów *ex vivo* wykorzystano trzecie pokolenie myszy, gdzie w miotach potomnych otrzymywano jedynie osobniki o genotypach oznaczonych w niniejszej pracy jako: WT (*Srf<sup>f/f</sup>Cre<sup>-/-</sup>*) oraz cKO (*Srf<sup>f/f</sup>Cre<sup>+/-</sup>*). Delecję genu *Srf* indukowano za pomocą dootrzewnowych iniekcji 4-hydroksytamoksyfenu (4-OHT, Sigma, nr kat. H7904; po 0,25 mg) rozpuszczonego w oleju słonecznikowym przez trzy kolejne dni (w dniu 5., 6. i 7. po narodzinach). Procedurze poddawano wszystkie oseski z miotu niezależnie od ich genotypu.

Myszy hodowano w pomieszczeniach o stałym cyklu dobowym (12-godzinna faza jasna / 12-godzinna faza ciemna), stałej temperaturze (23 °C – 24 °C) oraz wilgotności powietrza (35% – 45%). Zwierzęta posiadały swobodny dostęp do wody i karmy dla gryzoni laboratoryjnych (Labofeed B standard) *ad libitum*.

#### 3.13.2. Genotypowanie myszy

Do genotypowania zwierząt używano tkanki pobranej z ogona myszy w dniu 5. lub 6. po narodzinach (P 5 – 6). Genomowe DNA izolowano poprzez całonocną inkubację tkanki w temperaturze 55 °C w buforze do lizy (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% SDS, proteinaza K 1:10), a następnie dezaktywację proteinazy K (10 minut inkubacji w temperaturze 98 °C). Matrycowe DNA dla reakcji PCR uzyskiwano łącząc 3  $\mu$ l lizatu i 120  $\mu$ l buforu TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA). Sekwencje stosowanych starterów zaprezentowano w tabeli 9. (startery syntetyzowano w firmie Genomed S. A.). Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono

w tabeli 10. Reakcje PCR prowadzono w termocyklerze Mastercycler gradient (Eppendorf) według programu opisanego w tabeli 11.

**Tabela 9.** Startery do reakcji PCR.

Starter	Sekwencja 5' -> 3'	Typ startera
F 1	GGTTCTCCGTTTGCCTCAGGA	Starter przedni (ang. <i>forward</i> , F)
F 2	CTGCATGCACGGGACAGCTCT	Starter przedni (ang. <i>forward</i> , F)
R	GCTTGCAGGTACAGGAGGTAGT	Starter wsteczny (ang. <i>reverse</i> , R)

**Tabela 10.** Skład mieszaniny reakcyjnej PCR.

Składnik	Stężenie końcowe	Objętość
bufor 10 x	1x	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	2 mM	1,5 µl
startrer F 1 100 µM	1 µM	0,5 µl
starter R 100 µM	1 µM	0,5 µl
startrer F 2 100 µM	1 µM	0,5 µl
dNTP 2,5 mM	0,2 mM	0,5 µl
Polimeraza Taq	0,03 U/ µl	0,1 µl
ddH <sub>2</sub> O		17,65 µl
DNA		2 µl

**Tabela 11.** Cykle reakcji PCR.

Krok	Temperatura (°C)	Czas (sek.)	Uwagi
1.	98	180	
2.	95	30	
3.	63	30	
4.	72	60	
5.	-	-	35 x powtórzenie kroków 2 – 4
6.	72	600	
7.	4	-	utrzymanie

### 3.13.3. Pobieranie i utrwalanie tkanek

W celu pobrania tkanki i wykonania analiz *ex vivo* myszy znieczulano dootrzewnową iniekcją ketaminy (w dawce 65 mg/kg m. c.), po czym usypiano zastrzykiem z subletalną dawką pentobarbitalu sodu (50 mg/kg m. c.). Po otwarciu jamy płucnej prowadzono standardową perfuzję przezsercową utrwalającą tkanki przy użyciu pompki zapewniającej przepływ roztworów 1ml/min przez lewą komorę serca po uprzednim nacięciu prawego przedsionka. Stosowano zbuforowany, przefiltrowany roztwór 0,9% NaCl w 0,1 M PBS, a następnie 4% roztwór PFA (Sigma-Aldrich, nr kat. 441244) w PBS (pH 7,5) przez 6 minut. Oba roztwory były uprzednio schłodzone do temperatury 4°C. Izolowano mózgi, po czym poddawano je dodatkowemu utrwaleniu inkubując przez 24 godziny w 4% roztworze PFA w PBS w temperaturze 4°C. Następnie, przy użyciu wibratomu (Leica Biosystem, Leica VT 1000S), mózgi krojono w płaszczyźnie czołowej na skrawki o grubości 40 µm. Skrawki zawierające hipokamp były zbierane i przechowywane w 0,05% NaN<sub>3</sub> (POCH, nr kat. 792770426) w PBS w temperaturze 4°C.

W przypadku pozyskiwania tkanek w celu znakowania skrawków hipokampalnych barwnikiem DiI stosowano procedurę transfuzji przezsercowej z pewnymi modyfikacjami. Zwierzęta perfundowano 1,5% roztworem PFA (Sigma-Aldrich, nr kat. 441244) w PBS w temperaturze pokojowej. Następnie wyizolowane mózgi umieszczano w 1,5% roztworze PFA w PBS na okres 20 minut, po czym inkubowano w roztworze PBS schłodzonym do temperatury 4°C przez 30 minut. Kolejno, przy użyciu wibratomu (Leica Biosystem, Leica VT 1000S), mózgi krojono w płaszczyźnie czołowej na skrawki o grubości 130 µm. Skrawki zawierające hipokampy pozostawiano w roztworze PBS w temperaturze pokojowej na okres 1 godziny, po czym poddawano je procedurze biobalistycznego barwienia DiI.

## 3.14. Hodowle komórek neuronalnych

### 3.14.1. Przygotowanie szkiełek do hodowli hipokampalnych *in vitro*

Pierwotne hodowle neuronów hipokampalnych prowadzono na odpowiednio przygotowanych 18 mm szkiełkach nakrywkowych. W tym celu szkiełka umieszczano na 48 godzin w stężonym (68%) kwasie azotowym. Następnie szkiełka płukano

w wodzie dejonizowanej przez 6 godzin, zmieniając pięciokrotnie płyn, a następnie wyprażano przez 3 godziny w temperaturze 180°C. Tak przygotowane szkiełka nakrywkowe umieszczano w dołkach szalek hodowlanych i pokrywano roztworem poli-D-lizyny (50 µg/ml) i lamininy (250 µg/ml) w buforze boranowym. Po całonocnej inkubacji w temperaturze pokojowej mieszaninę odpłukiwano (3 razy po 5 minut w wodzie dejonizowanej). Szalki suszono i przechowywano w jałowych warunkach do momentu użycia.

### 3.14.2. Zakładanie szczurzej hodowli hipokampalnej *in vitro*

Komórki do prowadzenia pierwotnych hodowli neuronów pozyskiwano z nowonarodzonych osesków P 0 szczurów szczepu Wistar. Zwierzęta wprowadzono w stan hipotermii poprzez włożenie do pojemnika z lodem, po czym poddawano je dekapitacji. Wyjmowano mózgi i umieszczano w schłodzony roztworze DM-Ky/Mg. Następnie izolowano hipokampy i przepłukiwano trzykrotnie zimnym roztworem DM-Ky/Mg. Trawiono je poprzez dwukrotną inkubację w ciepłym roztworze papainy (2 razy po 15 minut, 37°C). Reakcję trawienia tkanek hamowano dzięki dodaniu inhibitora trypsyny (10 mg/ml; 3 minuty, 37°C). Komórki przemywano trzykrotnie pożywką MEM/FBS, po czym rozdysocjowywano przy użyciu jednomililitrowej pipety pasterowskiej aż do otrzymania jednorodnej zawiesiny. Kolejny krok stanowiło dwukrotne wirowanie mieszaniny przez 10 minut z prędkością 1000 obr./min w temperaturze pokojowej. Pożywkę z nad supernatantu odbierano, a pozostały osad zawieszano w pożywce MEM/FBS. Przy użyciu komory Bükreka określano liczbę wyizolowanych komórek, następnie zawieszano je w odpowiedniej objętości pożywki MEM/FBS i wysiewano na szkiełka z gęstością 120 tys. komórek/szkiełko. Po upływie 2 godzin wymieniano pożywkę na medium NB-A/B27. W czwartym dniu prowadzenia hodowli komórkowej (ang. *day in vitro*, DIV) w celu zahamowania wzrostu komórek glejowych dodawano 2,5 µM arabinozydu cytozyny (Sigma, nr kat. C1768). Komórki były następnie hodowane w inkubatorze przy kontrolowanych parametrach temperatury (37°C) i poziomu dwutlenku węgla (5%).

### 3.14.3. Zakładanie mysiej hodowli hipokampalnej *in vitro*

Neurony hipokampalne izolowano z nowonarodzonych P 0 – 1 myszy linii transgenicznej *Srf<sup>f/f</sup>* (B6.129S6-*Srf<sup>tm1Rmn</sup>*/J). U tych zwierząt w obrębie promotora oraz eksonu 1 genu *Srf* zostały wprowadzone sekwencje loxP, które w obecności rekombinazy Cre umożliwiają delecję danego fragmentu genu. Oseski były uśmiercane poprzez wstępne schłodzenie, a następnie dekapitację. Ze zwierząt izolowano mózgi, a następnie hipokampy i umieszczano je w schłodzonej pożywce do izolacji HBSS. Kolejne kroki procedury, tj. trawienie enzymatyczne tkanek oraz inaktywacja papainy przebiegały zgodnie z protokołem opisanym w punkcie 3.14.2. Zawiesinę komórkową uzyskiwano poprzez pipetowanie w niewielkiej objętości pożywki zawierającej 10% FCS. Zawiesinę komórkową uzupełniano odpowiednią objętością 10% FCS, tak by 200  $\mu$ l mieszaniny wysiewanej na dołek w płytce 12-dołkowej znajdowało się ok. 120 tys. komórek. Po upływie 2 godzin wymieniano pożywkę na NB-A/B27. W czwartym dniu prowadzenia hodowli komórkowej (DIV 4) w celu zahamowania wzrostu komórek glejowych dodawano 2,5  $\mu$ M arabinozyd cytozyny (Sigma, nr kat. C1768). Komórki przez cały czas trwania eksperymentu były hodowane w inkubatorze w temperaturze 37°C i atmosferze dwutlenku węgla na poziomie 5%.

### 3.15. Transfekcja neuronów hipokampalnych

Szczurze pierwotne hodowle hipokampalne transfekowano w 5. lub 6. dniu hodowli *in vitro* (DIV) metodą lipofekcji przy zastosowaniu odczynnika Lipofectamine 2000 (Invitrogen, nr kat. 11668019) zgodnie z zaleceniami producenta. Transfekcji poddawano neurony hodowane w 12-dołkowych płytkach na szkiełkach o średnicy 18 mm. W niniejszej rozprawie zaprezentowano wyniki eksperymentów, w których zastosowano transfekcje wektorami plazmidowymi należącymi do jednej z dwóch grup: i) pSynapsynaGFP (0,5  $\mu$ g/dołek) w połączeniu z (1  $\mu$ g/dołek): pSUPER lub pTRIP-shLuc lub pLKO-shMKL1/2 (shMRTF) lub ii) (po 0,5  $\mu$ g/dołek) pRNAT-H1.1/Shuttle\_shCTR (shCTR) i pRNAT-H1.1/Shuttle\_shSRF (shSRF). Listę i opis stosownych wektorów plazmidowych zamieszczono w tabeli 3. Mieszaninę sporządzano z 1 – 1,5  $\mu$ g plazmidowego DNA zmieszanego z 50  $\mu$ l podłoża NB-A,

równolegle przygotowując mieszaninę 2  $\mu$ l Lipofectamine 2000 oraz 50  $\mu$ l podłoża NB-A. Obie mieszaniny łączono i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Następnie z dołków hodowlanych odbierano po 750  $\mu$ l podłoża (pożywka kondycjonowana) i zastępowano je 100  $\mu$ l mieszaniny plazmidowego DNA i Lipofectamine 2000. Neurony umieszczano w inkubatorze na okres ok. 1 godziny, po czym roztwór nad komórek zastępowano mieszaniną podłoża kondycjonowanego wzbogaconego o pożywkę NB-A/B27 w stosunku 1 : 1.

W celu pomiaru poziomu aktywności transkrypcji zależnej od SRF świeżo wyizolowane komórki hipokamu szczurów (P 0) poddawano elektroporacji przy zastosowaniu zestawu Amaxa Nucleofector (Lonza, nr kat. VPI-1006) postępując zgodnie z zaleceniami producenta. Wprowadzono wektor plazmidowy niosący gen kodujący  $\beta$ -galaktozydazę ( $\beta$ -Gal) użyty jako wskaźnik poziomu elektroporacji oraz wektor zawierający reporterowy gen lucyferazy znajdujący się pod kontrolą elementu odpowiedzi na surowicę (SRE). Wykorzystane wektory plazmidowe zostały opisane w tabeli 3.

### 3.16. Transdukcja neuronów hipokampalnych wektorami wirusowymi

Pierwotne dysocjowane hodowle hipokamplane założone z osesków myszy stada *Srf<sup>f/f</sup>* infekowano w 5. lub 6. dniu hodowli *in vitro* (DIV) wektorem wirusowym AAV-CaMKII $\alpha$ \_mCherry (AAV-CTR) lub AAV-CaMKII $\alpha$ \_CRE (AAV-CRE). Z kolei, szczurze pierwotne hodowle hipokamplane infekowano w analogicznym czasie (DIV 5 lub DIV6) odpowiednio AAV-shCTR lub AAV-shSRF. Na każdym szkiełku hodowlanym o średnicy 18 mm znajdowało się ok. 120 tysięcy neuronów. Komórki infekowano dodając do pożywki hodowlanej zawiesinę odpowiedniego wektora wirusowego w takiej objętości, by na każdą komórkę hodowaną na szkiełku przypadało odpowiednio 100 cząsteczek wektora wirusowego dla AAV-CTR lub AAV-CRE lub 1000 cząsteczek wektora wirusowego w przypadku AAV-shCTR lub AAV-shSRF. Następnie kontynuowano hodowlę neuronów w inkubatorze w temperaturze 37°C i stężeniem CO<sub>2</sub> wynoszącym 5%, do czasu przeprowadzenia dalszych procedur w DIV 18 – 21.

### 3.17. Pomiar aktywności transkrypcyjnej

Poziom aktywności lucyferazy oraz  $\beta$ -galaktozydazy w szczurzych neuronach hipokamplanych w kolejnych punktach czasowych (DIV 3, DIV 7, DIV 14 i DIV 21) został zbadany z zastosowaniem komercyjnego zestawu (Promega, nr kat. E2000) zgodnie z instrukcją producenta. Wartość luminescencji została zmierzona w czytniku płytek Infinite M200 zaopatrzonym w system do iniekcji (Tecan). Pomiar aktywności  $\beta$ -galaktozydazy wyznaczono w oparciu o poziom hydrolizy substratu X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolylo- $\beta$ -D-galaktopiranozyd). Na skutek tej reakcji z bezbarwnego związku X-gal powstaje m. in. dimer indolowy mający niebieskie zabarwienie. Dzięki temu możliwy jest pomiar kolorymetryczny absorbancji przy długości fali równej 420 nm. Pomiarów takich dokonano w czytniku Sunrise dla płytek 96-dołkowych (Tecan). Poziom aktywności transkrypcyjnej zależnej od SRF wyznaczono jako poziom aktywności lucyferazy w danym dniu hodowli *in vitro* znormalizowany względem aktywności  $\beta$ -galaktozydazy, a następnie odniesiono do wyniku uzyskanego dla neuronów w DIV 3.

### 3.18. Sieciowanie molekularne białek powierzchniowych

W celu oceny poziomu białek znajdujących się na powierzchni neuronów stosowano procedurę sieciowania molekularnego (ang. *crosslinking*) za pomocą BS<sup>3</sup> (ang. *bis(sulfosuccinimidyl)suberate*; Thermo Fisher, nr kat. 21580). Postępowano zgodnie z protokołem opracowanym przez zespół prof. Wolf (Boudreau i in., 2012). Neuronom zainfekowanym odpowiednimi wirusami w dniu 18. – 21. hodowli *in vitro* (DIV 18 – 21) wymieniono podłoże na świeżo przygotowaną pożywkę. Czynność powtarzano jeszcze dwukrotnie. Następnie odbierano medium z nad neuronów, a komórki umieszczano w 2 mM roztworze BS<sup>3</sup> i inkubowano w temperaturze 37 °C z mieszaniem przez 10 minut. Reakcję sieciowania zatrzymywano za pomocą 100 mM roztworu glicyny (inkubacja z mieszaniem trwająca 10 minut, w temperaturze 4°C). Neurony następnie lizowano i poddawano kolejnym krokom standardowej procedury Westren Blot opisanej odpowiednio w paragrafach 3.20.4 - 6. niniejszej pracy.



### 3.19. Utrwalanie komórek z pierwotnych hodowli neuronalnych

Neurony hipokampalne utrwalano w dniu 18. – 21. hodowli *in vitro* (DIV 18 – 21). W tym celu z nad szkiełek nakrywkowych odbierano pożywkę i zastępowano ją ciepłym (37°C) roztworem 4% PFA i 4% sacharozy w 1 x PBS. Inkubację prowadzono przez 7 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie trzykrotnie płukano komórki roztworem PBS. Utrwalone neurony przechowywano w roztworze PBS w temperaturze 4°C do czasu dalszego procedowania.

### 3.20. Metody pracy z białkami

#### 3.20.1. Przygotowanie ekstraktów białkowych z pierwotnych hodowli neuronalnych

Ekstrakty białkowe z neuronów hodowanych *in vitro* pozyskiwano w dniu 18. – 21. hodowli (DIV 18 – 21). W tym celu, płytkę hodowlaną umieszczano na lodzie, a następnie odciągano pożywkę z nad neuronów. Komórki przepłukiwano zimnym roztworem 1 x PBS zawierającym inhibitory proteaz i fosfataz. W kolejnym kroku komórki mechanicznie zeszkrobywano i zawieszano w 80 µl zimnego denaturującego buforu Laemmli'ego z dodatkiem 2-merkaptoetanolu. Zebrane ekstrakty inkubowano w temperaturze 98°C przez 9 minut po czym poddawano kolejnym krokom procedury lub przechowywano w temperaturze – 80°C.

#### 3.20.2. Przygotowanie ekstraktów białkowych z mózgow

Ekstrakty białkowe sporządzono z hipokampów myszy szczepu C57BL/6JCmd pochodzących ze Zwierzętarni Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej, PAN. Na każdy punkt czasowy w rozwoju (P 0, P 7, P 14, P 21, P 30 oraz P 60) przypadały po trzy osobniki. Zwierzęta usypiano metodą wziewną za pomocą izofluranu, po czym, po sprawdzeniu braku wrażliwości na bodźce zewnętrzne, poddawano je dekapitacji. Procedurę izolacji prowadzono na lodzie w temperaturze 4°C. Hipokampy umieszczano w probówkach z buforem lizującym zawierającym 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES pH 7,4, 320 mM sacharozy, 1mM NaF oraz inhibitory, a następnie rozdrabniano przy użyciu szklanego homogenizatora Dounce'a. Gdy tkana była całkowicie rozdrobniona, homogenaty wirowano przez 10 minut z prędkością 6000 x g,

a następnie zebrany supernatant przekładano do nowej probówki i przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.20.3. Oznaczenie stężenia białek

Oznaczenie stężenia białek w homogenatach wykonywano metodą kolorymetryczną przy użyciu zestawu BCA Protein Assay Kit (Pierce, nr kat. 23227), zgodnie z instrukcją załączona przez producenta. Metoda ta stanowi modyfikację metody biuretowej, opierającej się na reakcji redukcji jonów  $\text{Cu}^{2+}$  do  $\text{Cu}^{+}$  w środowisku alkalicznym, w której uczestniczą wiązania peptydowe obecne m. in. w białkach. Kwas bis-cunchoninowy (ang. *bicinchonic acid*, BCA) reaguje z jonami miedziowymi tworząc stabilny kompleks o maksimum absorpcji przy długości fali lambda 562 nm. W celu wyznaczenia liniowej funkcji zależności stężenia białek od wartości absorpcji wyznaczonej za pomocą czytnika spektrofotometrycznego sporządzano krzywą wzorcową będącą rozcieńczeniami BSA w buforze do lizy o znanych stężeniach. Wykonano po trzy rozcieńczenia BSA i każdej z badanych próbek.

### 3.20.4. Rozdział elektroforetyczny białek w warunkach denaturujących

Elektroforezę białek w żelu denaturującym (ang. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) wykonywano przy użyciu systemu Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio Rad, nr kat. 1658000). Stosowano w tym celu żele nieciągłe składające się z ok. 2 centymetrowego fragmentu żelu zagęszczającego (4% akryloamid/bis-akryloamid, 0,125 M Tris-HCl pH 6,8) oraz żelu rozdzielającego (8% – 10% akryloamid/bis-akryloamid, 0,375 M Tris-HCl pH 8,8). Obie warstwy żelu zawierały dodatkowo 0,1% SDS, a ich polimeryzacja była indukowana dodaniem 0,05% nadsiarczanu amonu i katalizatora 0,1% TEMED. Elektroforezę prowadzono w temperaturze pokojowej, w buforze do elektroforezy białek Tris-glicyna (1 x), przy stałym napięciu 90 V dla żelu zagęszczającego oraz 130 V dla żelu rozdzielającego. Na żele nakładano takie same ilości białek. W celu określenia ciężarów cząsteczkowych analizowanych białek stosowano standardy mas cząsteczkowych Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, nr kat. 26619) o zakresie 10 - 250 kDa.

W przypadku próbek pochodzących z eksperymentów z zastosowaniem techniki sieciowania powierzchniowego stosowano żele Any kD™ Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels (BioRad, nr kat. 4569033).

### 3.20.5. Transfer elektroforetyczny białek

W celu wykonania immunodetekcji, po zakończeniu rozdzielania elektroforetycznego, białka z żelu poliakryloamidowego przenoszono za pomocą półsuchego elektrotransferu na membranę PVDF o średnicy porów 0,45 µm (Immobilon-P, Millipore). Stosowano przy tym aparat Fastblot (Biometra) oraz prąd o stałym natężeniu 250 mA (napiecie 100 V) przez okres 25 – 35 minut w zależności od wielkości badanych białek. Transfer odbywał się w zimnym buforze składającym się z: 25 mM Tris, 192 mM glicyna, 20% metanol. Efektywność transferu sprawdzano dwójako: przy użyciu roztworu błękitu Coomassie lub roztworu Ponceau S. W celu uwidocznienia wszystkich białek pozostałych na żelu po zakończeniu elektrotransferu, żel inkubowano przez godzinę w roztworze zawierającym 0,25% Coomassie Brilliant Blue (GE Healthcare, nr kat. RPN2209), 50% etanolu oraz 10% kwasu octowego. Następnie żel odbarwiano w roztworze 7,5% kwasu octowego i 25% metanolu. Natomiast chcąc zweryfikować efektywność transferu membranę barwiono przez minutę w roztworze czerwieni Ponceau S (0,1% Ponceau (w/v) w 5% kwasie octowym; Fluka, nr kat. 81462). Następnie błonę płukano wodą dejonizowaną i trzykrotnie buforem TBS-T.

Elektrotransfer lizatów pochodzących z eksperymentów z zastosowaniem techniki sieciowania powierzchniowego był przeprowadzany przy użyciu dedykowanego programu „1 MINI TGX” (natężenie: 2,6 A; napięcie: 25 V; czas: 7 minut) w aparacie Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (BioRad, nr kat. 1704150EDU).

### 3.20.6. Technika immunodetekcji Western Blot

**Tabela 11.** Lista i charakterystyka przeciwciał pierwszo- i drugorzędowych zastosowanych w technice Western Blot.

<b>Przeciwciała pierwszorzędowe</b>			
<b>Antygen</b>	<b>Pochodzenie</b>	<b>Rozcieńczenie</b>	<b>Firma, numer katalogowy</b>
SRF (H-300)	królicze	1 : 300	Santa Cruz, sc-13029
GluA1	królicze	1 : 500	Sigma, ABN241
GluA2	mysie	1: 500	Sigma, MAB397
$\alpha$ -tubulina	mysie	1 : 5000	Sigma, T9026
$\beta$ -aktyna	mysie	1 : 5000	Sigma, A1978
CaMKIII $\alpha$	mysie	1 : 1000	Thermo Fisher, MA1-048
<b>Przeciwciała drugorzędowe HRP</b>			
<b>Antygeny IgG</b>	<b>Pochodzenie</b>	<b>Rozcieńczenie</b>	<b>Firma, numer katalogowy</b>
mysie	końskie	1 : 10000	Vector labs, PI-2000
królicze	kozie	1 : 10000	Vector labs, PI-1000

Przed przeprowadzeniem reakcji z przeciwciałami, membranę inkubowano przez co najmniej godzinę w 10% roztworze odtłuszczonego mleka w TBS-T w temperaturze pokojowej w celu wysycenia miejsc niespecyficznego wiązania przeciwciał do membrany. Po etapie blokowania membrany, płukano ją trzykrotnie po 7 minut w roztworze TBS-T. Następnie inkubowano ją w temperaturze 4°C przez noc z przeciwciałem pierwszorzędowym, odpowiednio rozcieńczonym w roztworze blokującym łagodnie mieszając. Lista zastosowanych przeciwciał oraz ich rozcieńczenia zostały zawarte w tabeli 11. Następnego dnia membranę płukano trzykrotnie roztworem TBS-T mieszając przez 10 minut. Kolejnym krokiem była inkubacja z przeciwciałem drugorzędowym (zob. tabela 11.) skoniugowanym z peroksydazą chrzanową (HRP) rozcieńczonym w roztworze blokującym przez 1,5 godziny w temperaturze pokojowej łagodnie mieszając. Następnie membranę trzykrotnie płukano TBS-T przez 10 min w temperaturze pokojowej. W celu wizualizacji wykrytych białek stosowano metodę chemiluminescencyjną- zestaw ECL lub ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Amersham, nr kat.

odpowiednio: RPN2209, RPN2232) oraz klisze radiologiczne (Kodak, nr kat. 525 6433). W celu ponownego użycia membrany w procedurze Western Blot inkubowano ją w roztworze do usuwania przeciwciał związanych z błoną przez 45 minut w temperaturze pokojowej. Dzięki czemu przeciwciała uprzednio przyłączone do białek na membranie zostawały usuwane. Następnie membranę nitrocelulozową płukano trzykrotnie przez 20 minut w roztworze TBS-T i rozpoczynano kolejną procedurę Western Blot opisaną powyżej.

W celu przeprowadzenia analizy otrzymanych wyników, wywołane klisze skanowano i przeprowadzano analizy densytometryczne z zastosowaniem narzędzia GeneTools Software (Syngene). Po krótko, każdy z uzyskanych prążków starannie obrysowywano i odczytywano wyznaczony przez algorytm poziom zaczernienia prążka względem tła. Uzyskaną wartość dzielono przez wartość intensywności dla prążka  $\alpha$ -tubuliny pochodzącej z tej samej próby (białko to zostało użyte jako wewnętrzna kontrola ilości białek naniesionych na żel dla danej próby). Uzyskiwano w ten sposób relatywne wartości poziomu białka dla każdej z próbek, które następnie odnoszono do średnich wartości prób kontrolnych. Ostateczny wynik stanowi krotność zmiany poziomu białka w stosunku do wartości dla prób kontrolnych.

### 3.21. Rejestrowanie i analiza mEPSCs neuronów hodowanych *in vitro*

W celu analizy spontanicznej aktywności elektrofizjologicznej neuronów hipokampalnych hodowanych *in vitro* posłużono się rejestracją farmakologicznie izolowanych miniaturowych pobudzających prądów postsynaptycznych (mEPSCs). Rejestrowano sygnały pochodzące z neuronów piramidowych GFP-pozytywnych będących w 19., 20. lub 21. dniu hodowli *in vitro*. Komórki dnia 5. lub 6. transfekowano z niską efektywnością tak, by z jak największym prawdopodobieństwem neurony presynaptyczne były komórkami nietransfekowanymi (by obserwowane różnice pomiędzy wariantem kontrolnym a tym z obniżonym poziomem SRF wynikały z różnic we właściwościach komórek postsynaptycznych pomiędzy tymi dwoma wariantami). Po ok. 14 dniach od transfekcji szkiełka hodowlane z neuronami były umieszczane w komorze do rejestracji z ciągłym przepływem nasyconego karbogenem roztowu aCSF (ang. *artificial cerebrospinal fluid*, skład zamieszono w tabeli 2) podgrzanego do

temperatury 31 °C. W celu zablokowania generowania potencjałów czynnościowych przez neurony oraz zablokowania neurotransmisji hamującej dodawano do roztworu odpowiednio 0,5 μM TTX (ang. *tetrodotoxin*, Tocris, nr kat. 1078) i 100 μM PTX (ang. *picROTOXIN*, Abcam, nr kat. U 93631), będącej antagonistą receptorów GABA<sub>A</sub>. mEPSCs nagrywano w konfiguracji *whole-cell patch-clamp* przy pomocy szklanych kapilar (szkło borokrzemianowe, o oporze końcowym 4 – 6 MΩ) wypełnionych roztworem elektrodowym (ang. *internal solution*, IS, skład zamieszczono w tabeli 2.). Rejestrację mEPSCs w trybie ustalonego napięcia (ang. *voltage-clamp*) przy potencjale błonowym równym – 60 mV prowadzono przez okres ok. 20 minut dla każdej komórki. Miniaturowe potencjały były automatycznie wykrywane przy użyciu programu MiniAnalysis (Synaptosoft) z progiem detekcji dla amplitudy powyżej 7 pA, a następnie manualnie weryfikowane przez eksperymentatora.

### 3.22. Izolacja RNA, odwrotna transkrypcja oraz reakcja qRT-PCR

Pierwotne hodowle hipokampalne (120 000 komórek / dołek) lizowano w 350 μl buforu RLT (Qiagen, nr kat. 79216), natomiast tkanki z hipokampa myszy homogenizowano w buforze RLT z dodatkiem 2-merkaptoetanolu na lodzie z użyciem homogenizatora nożowego (T8.01 IKA). Całkowite RNA izolowano przy użyciu zestawu RNeasy Mini Kit (Qiagen, nr kat. 74104) zgodnie z zaleceniami producenta. Oznaczenie czystości i stężenia próbek wykonano metodą spektrofotometryczną zgodnie z procedurą opisaną w paragrafie 3.10. niniejszej pracy.

Wyizolowany RNA poddawano reakcji odwrotnej transkrypcji używając w tym celu zestawu SuperScript IV Reverse Transcriptase (Invitrogen, nr kat. 18090050) i postępując zgodnie z protokołem producenta. Kodujące sekwencje DNA (ang. *coding DNA*, cDNA) namnożono z zastosowaniem TaqMan (ThermoFisher; odpowiednio specyficznych względem myszy i szczurów). Ilościowe reakcje PCR w czasie rzeczywistym (ang. *quantitative real-time reverse transcriptase-PCR*, qRT-PCR) zostały przeprowadzone z użyciem TaqMan Master Mix (Applied Biosystems, nr kat. 44456) w aparacie 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Różnice w poziomach ekspresji genów *Srf*, *Gria1* i *Gria2* wyznaczano z zastosowaniem

względnej analizy porównawczej  $\Delta\Delta C_t$ . Otrzymane wartości relatywizowano w odniesieniu do wyniku dla genu referencyjnego *Gapdh*.

### 3.23. Techniki immunocytochemiczne i immunohistochemiczne

**Tabela 12.** Lista i charakterystyka przeciwciał pierwszo- i drugorzędowych zastosowanych w barwieniach immunocytochemicznych i immunohistologicznych.

Antygen	Pochodzenie	Rozcieńczenie	Firma, numer katalogowy
<b>Przeciwciała pierwszorzędowe</b>			
SRF (H-300)	królicze	1:500	Santa Cruz, sc-13029
GluA1	królicze	10 µg/ml	Sigma, ABN241
GluA2	mysie	10 µg/ml	Sigma, MAB397
GFP	mysie	1:500	Sigma, MAB3580
<b>Przeciwciała drugorzędowe</b>			
Alexa Fluor-488	ośle	1:100	Invitrogen, A 21202
Alexa Fluor-546	ośle	1:100	Invitrogen A 10040
Alexa Fluor-555	kozie	1:100	Invitrogen, A 32727
IgG królika (skoniugowane z biotyną)	kozie	1:500	Vector, BA-1000

#### 3.23.1. Barwienie immunofluorescencyjne utrwalonych neuronów

Utrwalone neurony hipokampalne poddawano permabilizacji poprzez 10-minutowe płukanie w roztworze 0,1% Triton X-100 w PBS. Następnie inkubowano w roztworze blokującym zawierającym 5% surowicę ośłą z 0,1% Triton X-100 w PBS przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po tym czasie wymieniano roztwór na odpowiednie rozcieńczenie przeciwciała pierwszorzędowego w roztworze blokującym. Przeprowadzano całkowitą inkubację w temperaturze 4 °C, na kołyszce laboratoryjnej. Kolejno, preparaty płukano trzykrotnie po 7 minut w buforze PBS i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej z odpowiednim przeciwciałem drugorzędowym związanym z fluorochromem rozpuszczonym

w roztworze blokującym. W przypadku wykonywania barwień wykrywających kilka białek, ich detekcję wykonywano sekwencyjnie, etap blokowania wykonując tylko przy pierwszej procedurze. Po zakończeniu procedury barwienia immunofluorescencyjnego, szkiełka płukano wodą dejonizowaną, a następnie umieszczano w kropli płynu zatapiającego Fluoromount-G (SouthernBiotech, nr kat. 0100-01) na powierzchni szkiełka podstawowego. Tak przygotowane preparaty pozostawiono do wyschnięcia w temperaturze pokojowej, a następnie przechowywano je w temperaturze 4 °C bez dostępu światła. Listę i charakterystykę zastosowanych przeciwciał umieszczono w tabeli 12. Tak przygotowane preparaty obrazowano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego lub konfokalnego jak opisano w paragrafie 3.23. niniejszej pracy.

### 3.23.2. Przeżyciowe znakowanie receptorów powierzchniowych neuronów hodowanych *in vitro*

Szczurze neurony hipokampalne w dniu 18. hodowli *in vitro* (DIV 18) poddano przeżyciowemu znakowaniu podjednostek receptora AMPA znajdujących się na powierzchni błon neuronów. W tym celu, do pożywki hodowlanej dodawano przeciwciała skierowane przeciwko zewnątrzkomórkowym domenom podjednostki GluA1 lub GluA2 (10 µg/ml; opis przeciwciał umieszczono w tabeli 12.), a następnie inkubowano w temp. 37 °C przez 15 minut. Niezwiązane przeciwciała odpłukiwano zimnym roztworem MEM (patrz tabela 4.) i poddawano utrwaleniu poprzez 7 minutową inkubację w roztworze 4% PFA i 4% sacharozy w 1 x PB. Odpowiednie przeciwciała drugorzędowe skoniugowane z fluorochromem Alexa Fluor-555 lub Alexa Fluor-546 zawieszono w buforze GDB (skład zamieszczono w tabeli 2.). Tak przygotowane roztwory dodawano do utrwalonych neuronów i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę. Po trzykrotnym opłukaniu komórek 1 x PBS i jednokrotnym wodą dejonizowaną, szkiełka zaklejano w medium ProLong Gold (Invitrogen, nr kat. P10144) i obrazowano z użyciem mikroskopu Leica TCS SP8, zgodnie z opisem zamieszczonym w paragrafie 3.23.1.



### 3.23.3. Barwienie immunohistochemiczne z detekcją DAB

Do barwień immunohistochemicznych zostały wykorzystane 40- $\mu$ m skrawki uzyskane zgodnie z procedurą opisaną w paragrafie 3.13.3 niniejszej pracy.

W celu inaktywacji endogennych peroksydaz skrawki inkubowano w 0,3% roztworze  $H_2O_2$  (Chempur, nr kat. 7722-84-1) i 10% metanolu w PBS przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Następnie tkanki permabilizowano przez 15 minut roztworem 2% Triton X-100 w PBS. Po trzykrotnym wykonaniu 6-minutowego płukania roztworem PBS, skrawki inkubowano w 10% roztworze koziej surowicy (Vector, nr kat. S-1000-20) w PBS przez 1 godzinę. Kolejno, powtarzano etap płukania skrawków (3 x 6 minut w PBS), po czym inkubowano przez noc z roztworem przeciwciała pierwszorzędowego wykrywającego antygeny białka SRF w 2% koziej surowicy w PBS w temperaturze 4°C. Następnie, przeciwciała pierwszorzędowe odpłukiwano PBS (3 x 6 minut, temperatura pokojowa). Skrawki inkubowano przez 2 godziny z biotynylowanym przeciwciałem drugorzędowym wykrywającym IgG królika w 3% roztworze surowicy koziej. Po trzykrotnym płukaniu PBS, skrawki inkubowano przez 1,5 godziny w temperaturze pokojowej w roztworze ABC (VECTASTAIN Elite ABC system; Vector, nr kat. PK-6100) przygotowanym zgodnie z zaleceniami producenta i ponownie płukano PBS (3 x 6 minut, temperatura pokojowa). W kolejnym etapie skrawki barwiono przez 1 minutę roztworem 0,05% DAB (3,3-Diaminobenzidine, SIGMAFAST™ DAB, Sigma, nr kat. D0426), po czym płukano wodą dejonizowaną. Po zakończeniu procedury barwienia, skrawki nakładano na szkiełka podstawowe i pozostawiano do wyschnięcia. Następnie preparaty inkubowano po 5 minut w rosnących stężeniach alkoholu etylowego (odpowiednio: 50%, 70% oraz 99,8%) po czym zanurzano na 3 sekundy w ksylenie. Szkiełka zakrywano przy użyciu medium DePeX (Merck, nr kat. 100579). Tak przygotowane preparaty obrazowano przy użyciu mikroskopii świetlnej.

### 3.23.4. Barwienie histologiczne metoda Nissla

W celu zwizualizowania cytoarchitektury mózgow zastosowano barwienie metodą Nissla pozwalające uwidocznić jądra komórkowe oraz siateczkę śródplazmatyczną szorstką. Wybrane skrawki mózgow nakładano na szkiełka

podstawowe i pozostawiano do wyschnięcia w temperaturze pokojowej. Następnie barwiono je w roztworze zawierającym 1% fioletu krezyłu i 3% kwasu octowego przez 5 minut. Barwnik odpłukiwano przez inkubację w wodzie destylowanej i inkubowano kolejno przez 1 do 2 minut w alkoholu etylowym o rosnącym stężeniu (tutaj: 70%, 96% i 99,8%), po czym zanurzano dwukrotnie w roztworach 99,8% alkoholu etylowego zawierających odpowiednio 1/3 i 2/3 ksylenu. Tak przygotowane preparaty pokrywano medium DePeX (Merck, nr kat. 100579), zamykano szkiełkami nakrywkowymi i przechowywano w temperaturze 4°C do czasu obrazowania przy użyciu mikroskopii świetlnej.

### 3.23.5. Znakowanie skrawków hipokampalnych barwnikiem DiI

Na potrzeby wizualizacji kolców dendrytycznych neuronów hipokampalnych *ex vivo* zastosowano metodę barwienia indokarbocyjaniną (ang. *indocarbocyanine dye*, DiI). Znakowanie dendrytów zostało wykonane przy użyciu mikrocząsteczek wolframowych pokrytych barwnikiem DiI, który dzięki właściwościom lipofilnym wbudowuje się w błony komórkowe. Kompleks ten został wprowadzony do komórek za pomocą działu genowego. Tkanki przygotowano zgodnie z opisem zamieszczonym w paragrafie 3.13.3.

#### 3.23.5.1. Przygotowanie mikrocząsteczek wolframowych pokrytych barwnikiem DiI

Na szkiełku podstawowym pokrytym cienką warstwą mikrocząsteczek wolframowych o średnicy 1,6  $\mu\text{m}$  (Tungsten M-20 1,3  $\mu\text{m}$ ; Bio Rad, nr kat. 1652268) rozprowadzono zawiesinę DiI (ThermoFisher, nr kat. D282) w dichlorometanie (SUPELCO, nr kat. 4-0042). Pozostawiono do wyschnięcia, a następnie zeszkrobano i zawieszono w wodzie dejonizowanej. Kolejno, sonikowano przez około 20 – 30 minut do czasu otrzymania jednorodnej zawiesiny. W tym czasie rurkę do wykonania naboju (Tefzel, Bio Rad) płukano 99,8% alkoholem etylowym i pokrywano poliwinylpirolidonem (PVP; Bio Rad 1652440). Tak przygotowaną rurkę wypełniano zawiesiną mikrocząsteczek wolframowych o średnicy ok. 1,6  $\mu\text{m}$  z DiI, umieszczano

w specjalnej stacji (Bio Rad, nr kat.652420) na 20 minut, a następnie suszono przepuszczając przez nią gazowy azot (przepływ 0,1 LPM AIR przez 30 minut i 0,4 LPM AIR przez 60 minut). Następnie rurkę cięto na ok. 1 centymetrowe fragmenty, stanowiące naboje do działa genowego (Helios Gene Gun, Bio Rad).

#### 3.23.5.2. Wprowadzenie barwnika DiI za pomocą działa genowego

Za pomocą działa genowego podłączonego do źródła helu pod ciśnieniem 80 psi, wprowadzono do komórek mikrocząstki wolframowe pokryte barwnikiem DiI w celu ich wyznakowania. Tak potraktowane skrawki inkubowano przez 3 godziny w roztworze PBS w temperaturze pokojowej bez dostępu światła, po czym dodatkowo utrwalano przez noc w 1,5% roztworze PFA w PBS w temperaturze 4°C. Skrawki rozkładano na szkiełkach podstawowych i zaklejano medium Fluoromont-G z DAPI (Thermo Fisher Scientific, nr kat. 00-4959-52).

Preparatu obrazowano przy zastosowaniu mikroskopii konfokalnej zgodnie z opisem zamieszczonym w paragrafie 3.23.1.

### 3.24. Zbieranie i analiza obrazów mikroskopowych

Zdjęcia zostały wykonane w Pracowni Obrazowania Struktury i Funkcji Tkankowych Instytutu Biologii Doświadczalnej, PAN.

#### 3.24.1. Mikroskopia fluorescencyjna

Obrazowanie kształtu kolców dendrytycznych neuronów wykonano przy użyciu fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego Zeiss LSM 780 i obiektywu 40x z imersją olejową (obiektyw apochromatyczny 40x/1,4). Serie obrazów stanowiące kolejne płaszczyzny konfokalne wzdłuż osi obrazowania (Z) rejestrowano w odstępach wynoszących 0,4  $\mu\text{m}$ , przy rozdzielczości obrazu 1024 piksele x 1024 piksele (wielkość piksela wynosiła 0,07  $\mu\text{m}$  x 0,07  $\mu\text{m}$ ). W przypadku pierwotnych hodowli hipokampalnych *in vivo* fluorochromy wzbudzano laserem arganowym o długości fali równej 488 nm, natomiast dla obrazowania mysich skrawków wybarwionych DiI stosowano wzbudzanie laserem arganowym o długości fali emisji

równej 561 nm. Wykonywano zdjęcia kolców dendrytycznych komórek piramidowych znajdujących się na dendrytach drugo- i trzeciorzędowych. Miało to na celu zminimalizowanie różnic w kształcie i gęstości kolców dendrytycznych mogących wynikać z różnic w rzędowości dendrytów.

W celu zobrazowania receptorów GluA1 i GluA2 znajdujących się na błonie komórkowej neuronów hipokampalnych hodowanych *in vitro* posłużono się mikroskopem konfokalnym Leica TCS SP8 oraz obiektywem 63x z imersją olejową (HC PL APO CS2 63x/1,40). Dla wzbudzenia sygnału pochodzącego z transfekowanych komórek GFP-pozytywnych zastosowano laser argonowy o długości fali równej 488 nm, natomiast sygnał pochodzący od przeciwciał, którymi były wyznakowane receptory GluA1 i GluA2 wzbudzano laserem o długości fali emisji odpowiednio 561 nm oraz 640 nm. Serie obrazów wzdłuż osi obrazowania zbierano w odstępach wynoszących 0,4  $\mu\text{m}$ , przy rozdzielczości 2048 pikseli x 2048 pikseli (wielkość piksela wynosiła 0,07  $\mu\text{m}$  x 0,07  $\mu\text{m}$ ). W celu uniknięcia nakładania się sygnałów pochodzących z różnych fluorochromów (ang. *crosstalk*), precyzyjnie rozgraniczono zakres spektr detektorów oraz zbierano obrazy w trybie sekwencyjnym (opcja: *between stacks*). Parametry te były stałe dla wszystkich obrazowanych preparatów. Wykonywano zdjęcia kolców dendrytycznych komórek piramidowych znajdujących się na dendrytach drugo- i trzeciorzędowych.

### 3.24.2. Mikroskopia świetlna

Preparaty barwione immunohistochemicznie z detekcją przy pomocy DAB oraz barwione metodą Nissla obrazowano w świetle przechodzącym przy użyciu mikroskopu Olympus IX70 zaopatrzonego w kamerę CCD i oprogramowanie Cell B (Olympus). Zdjęcia wykonano z zastosowaniem obiektywu 20x/0,4. Wykonano tzw. *tiling* w celu objęcia całej powierzchni skrawków obrazowaniem o wysokiej rozdzielczości a następnie uzyskane obrazy połączono przy użyciu programu Photoshop (funkcja Automatyzacja  $\rightarrow$  Photomerge).

## 3.25. Analizy uzyskanych obrazów mikroskopowych

### 3.25.1. Analiza kształtów kolców dendrytycznych

Obrazy z mikroskopu konfokalnego uzyskane dla pierwotnych dysocjowanych hodowli neuronalnych oraz skrawków hipokampów myszy były procedowane w postaci maksymalnych projekcji w osi Z przy użyciu programu SpineMagick! (numer patentu WO/2013/021001; Ruszczycki i in., 2012). Jest to metoda pozwalająca na wyznaczenie granic kolców dendrytycznych w sposób półautomatyczny. Program analizował parametry kolców dendrytycznych takie jak: długość kolca, szerokość główki kolca, stosunek długości kolca do szerokości jego główki, na podstawie których algorytm (Jasińska i in., 2016) przyporządkowywał grupy kolców o podobnych wartościach tych parametrów do jednej z czterech kategorii: filopodiów, kolców przysadzistych, kolców długich oraz kolców o kształcie grzybkowatym. Program SpineMagick! posłużył także do wyznaczenia gęstości kolców dendrytycznych.

### 3.25.2. Analiza intensywności fluorescencji

Analizę intensywności fluorescencji wykorzystaną do oceny ilości receptorów powierzchniowych GluA1 lub GluA2 neuronów pierwotnych hodowli hipokampalnych wykonano przy użyciu programu ImageJ. Obrazy kanału zawierającego sygnał pochodzący od GFP został zastosowany do stworzenia serii binarnych masek (Process – Binary – Convert to Mask), które następnie były nakładane na obrazy kanału rejestrującego sygnał pochodzący od fluorochromów znakujących GluA1 lub GluA2 (Process – Image Calculator – Multiply). W ten sposób dla każdego ze zdjęć z kolejnej płaszczyzny konfokalnej wzdłuż osi obrazowania Z tworzono 32-bitowy obraz zawierający sygnał pochodzący jedynie z transfekowanych neuronów GFP-pozytywnych stanowiących przedmiot analizy. Następnie, dla tak uzyskanych obrazów tworzono maksymalną projekcję (Image – Stacks – Z projection – Max Intensity), określono wartość parametru proggu jasności (Threshold - stałą dla wszystkich analizowanych obrazów) oraz stosowano algorytm segmentujący zachodzące na siebie obiekty (Process – Binary – Watershed). Manualnie zaznaczano fragmenty drugo- i trzeciorzędowych dendrytów, które poddawano analizie (Analyze – Analyze Particles). Eksperymentalnie wybierano wartości parametrów,

które były utrzymywane dla wszystkich analizowanych obrazów. Wynik tych operacji był zachowywany w oknie ImageJ „Menager” i nakładany na pozostałe kanały zawierające sygnał fluorescencji od podjednostek receptora GluA1 lub GluA2. Analizowano takie parametry jak powierzchnia, intensywność i liczba. W programie ImageJ dokonywano także pomiarów długości analizowanych fragmentów dendrytów (za pomocą funkcji Segmented line manualnie zaznaczano dendryty, po czym stosowano polecenie Analyze – Measure). Otrzymane wyniki liczbowe dalej analizowano w programie MS Excel 2007. Dla komórek kontrolnych z danego eksperymentu wyznaczano średnie wartości gęstości, a następnie odnoszono do nich wyniki uzyskane dla neuronów z obniżonym poziomem SRF z danego powtórzenia biologicznego. Gęstość GluA1 lub GluA2 wyrażano jako liczbę molekuł przypadającą na fragment dendrytu o długości 100  $\mu\text{m}$ . Analizy statystyczne przeprowadzono zgodnie z opisem zawartym w paragrafie 3.26. niniejszej pracy.

### 3.26. Analiza statystyczna

Wyniki eksperymentów zawartych w niniejszej rozprawie zostały przedstawione w postaci średniej arytmetycznej wszystkich pomiarów zebranych dla danego wariantu doświadczalnego wraz z odchyleniami w postaci błędu standardowego średniej (ang. *standard error of the mean*, SEM). Punkt odniesienia stanowiły wyniki uzyskane dla wariantów kontrolnych w danej procedurze doświadczalnej lub wyniki otrzymane dla określonego punktu czasowego. Do oceny istotności statystycznej różnic pomiędzy dwoma wariantami eksperymentalnymi danych o rozkładzie normalnym zastosowano test parametryczny t-Studenta lub dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA) z testem *post hoc* Newmana-Keulsa. W przypadku porównań trzech grup eksperymentalnych zastosowano test Kruskala-Wallisa dla wartości średnich oraz wyznaczono współczynnik FDR w celu analizy rozkładu częstości. Dla przeanalizowania danych niereprezentujących rozkładu normalnego i równych wariancji użyto testu Kruskala-Wallisa. Rozkład częstości (ang. *frequency distribution*) wyników uzyskanych w doświadczeniach elektrofizjologicznych analizowano za pomocą testu Kolmogorova-Smirnova dla

wartości średnich zastosowano test Manna-Whitneya. W celu porównania efektu długotrwałej stymulacji neuronów w grupach różnicznych wykorzystano test Dunna. Poziomy ekspresji genów zbadane za pomocą reakcji qRT-PCR porównywano za pomocą względnej analizy porównawczej  $\Delta\Delta C_t$ , a następnie istotność zaobserwowanych różnic weryfikowano przy użyciu testu Manna-Whitneya.

Na wykresach zastosowano następujące oznaczenia poziomów istotności różnic między grupami: \* dla  $p < 0,05$ ; \*\* dla  $p < 0,01$ ; \*\*\* dla  $p < 0,001$ . Obliczenia oraz graficzną reprezentację otrzymanych wyników uzyskano za pomocą programu GraphPad Prism 8. Dane dotyczące liczebności grup zostały zawarte w opisach rycin.

## 4. Wyniki

### 4.1. Ocena modelu delekcji *SRF* na wczesnych etapach rozwoju postnatalnego myszy

W celu sprawdzenia poziomu białka SRF i jego ewentualnych zmian we wczesnych etapach rozwoju postnatalnego myszy posłużono się techniką Western Blot. Zbadano homogenaty sporządzone z hipokampów myszy szczepu C57BL/6JCmd znajdujących się na różnych etapach rozwoju (od osesków myszy P 0 do osobników dojrzałych P 60). Metoda ta pozwoliła na wykazanie, iż ilość białka SRF w hipokampie myszy różni się w zależności od wieku zwierzęcia (rycina 7 A). Analizy pokazały, że pełna forma białka SRF (67 kDa) jest na bardzo niskim poziomie w pierwszym okresie po narodzinach, lecz już po upływie siedmiu dni jej ilość znacznie wzrasta i utrzymuje się przez cały analizowany okres. Ponadto, wraz z rozwojem zwierzęcia zmienia się kompozycja poszczególnych izoform SRF. Na wczesnych etapach (P 0 – P 14) odnotowuje się wysoki poziom izoformy SRF $\Delta$ 5 (57 kDa), osiągający wartość najwyższą w P 7. Jak wskazują dane literaturowe ten wariant SRF może wykazywać działanie hamujące względem formy białka SRF o pełnej długości. W okresie pomiędzy P 7 a P 14 dochodzi do zastąpienia izoformy SRF $\Delta$ 3 – 5 (48 kDa) wykrywanej u myszy w wieku pomiędzy P 0 a P 7 na izoformę SRF $\Delta$ 4,5 (52 kDa) wykrywaną u osobników co najmniej dwutygodniowych (> P 14). W analizowanym przedziale wiekowym (P 0 – P 60) kompozycja izoform białka SRF nie ulega dalszym zmianom od momentu osiągnięcia przez zwierzę wieku dorosłego (ok. P 21). Dla każdej próbki został wykonany pomiar całkowitego stężenia białka a następnie naniesiono na żel równe jego ilości. Ponadto, dokonano detekcji  $\beta$  aktyny, która jest uważana za białko metabolizmu podstawowego (ang. *housekeeping protein*) charakteryzujące się wysoką, stałą ekspresją w tkankach i do jej poziomu znormalizowano uzyskane wyniki.

Aby odpowiedzieć na pytanie czy czynnik transkrypcyjny SRF jest zaangażowany w proces dojrzewania kolców dendrytycznych w młodym mózgu należało opracować odpowiedni model badawczy. Dotychczasowe badania z udziałem zwierząt transgenicznych wykorzystywały tradycyjne myszy typu *knock-out* (co skutkowało śmiercią tych zwierząt we wczesnych okresach życia) lub myszy będące nokautami warunkowymi, u których delekcja *Srf* była indukowana dopiero po osiągnięciu przez zwierzę wieku dorosłego. Zwarzywszy, iż dla procesu formowania się i dojrzewania połączeń synaptycznych kluczowy jest etap wczesnego rozwoju



postnatalnego zwierzęcia, należało stworzyć model umożliwiający precyzyjną delecję *Srf* w pierwszym tygodniu życia myszy. W tym celu posłużono się linią myszy *SRF<sup>f/i</sup>CaMKCreERT2* posiadającą transgen rekombinazy *Cre* (dokładna charakterystyka w paragrafie 3.13.1. niniejszej pracy), u których zaindukowano delecję *Srf* poprzez dootrzewnowe iniekcje 4-hydroksytamoksyfenu (4-OHT). Kluczową kwestią był dobór odpowiedniego punktu czasowego: z jednej strony na tyle późnego, by niski poziom SRF możliwie jak najmniej zaburzał procesy poprzedzające formowanie kolców dendrytycznych, a z drugiej strony wczesnego, by aktywność rekombinazy *Cre*, a tym samym wycięcie genu *Srf*, następowało jeszcze przed wzmożonym dojrzewaniem połączeń synaptycznych. Ponieważ u myszy szczepu *SRF<sup>f/i</sup>CaMKCreERT2* gen rekombinazy *Cre* znajduje się pod kontrolą promotora podjednostki *CaMKII $\alpha$*  przeprowadzono analizę zmiany poziomu ekspresji białka *CaMKII $\alpha$*  u myszy w kolejnych dniach rozwoju postnatalnego z użyciem techniki Western blot. Pokazała ona, iż białko to jest wykrywane w mózgu myszy już w pierwszym tygodniu po narodzinach, a jego poziom jest wysoki w kolejnych analizowanych punktach czasowych (rycina 7 A). Wynik ten jest zgodny z danymi literaturowymi (m.in. atlasem rozwoju mózgu myszy Allena; <https://developingmouse.brain-map.org/gene/show/12107>), które wskazywały, że mRNA dla *CaMKII $\alpha$*  jest wykrywane w strukturach hipokampa myszy w dniu czwartym po narodzinach (P 4), a jego poziom rośnie wraz z rozwojem uzyskując ok. P 14 stabilną wartość, porównywalną do tej u zwierzęcia dorosłego. Ponadto, proces formowania kolców dendrytycznych zachodzi intensywnie u gryzoni od dnia 7- 10 po narodzinach tak, że u trzytygodniowych zwierząt większość dendrytów pokrywają wypustki o różnorodnych kształtach (Miller i Peters, 1981). Dlatego też zdecydowano się na zastosowanie schematu eksperymentalnego zakładającego iniekcje 4-hydroksytamoksyfenu (4-OHT) po 0,25 mg przez trzy kolejne dni (P 5, P 6 i P 7), tak by proces ten zaszedł na możliwie wczesnym etapie rozwoju postnatalnego zwierzęcia, przy równocześnie wysokim poziomie ekspresji rekombinazy *Cre*, co warunkowało efektywną delecję *Srf*. Powyższej procedurze poddawano wszystkie myszy z miotu, niezależnie od ich genotypu.

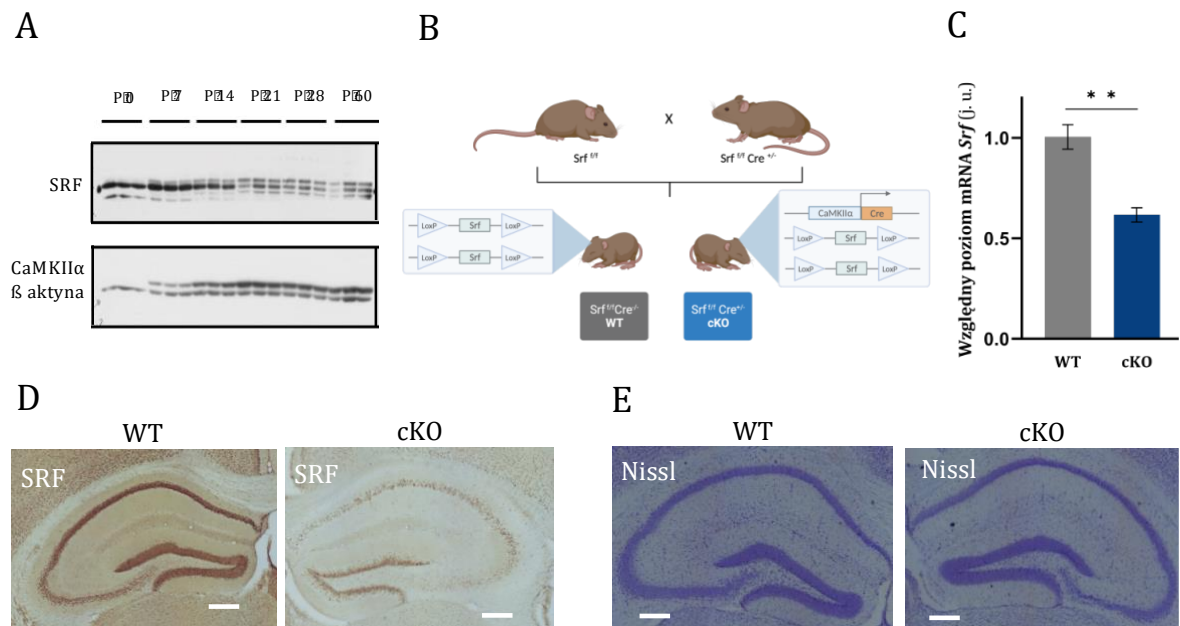
Aby ocenić efektywność obniżenia poziomu SRF walidacji poddano poziom mRNA *Srf* w hipokampach myszy strzykanych 4-OHT. W tym celu, wykonano reakcje qRT-PCR, dla której matryce stanowił RNA wyizolowane z hipokampów myszy WT

i cKO. Porównanie to potwierdziło, iż myszy cKO (n = 6) mają znacząco niższy poziom mRNA SRF w strukturze hipokampa w odniesieniu do poziomu mRNA SRF u myszy WT (n = 4; p = 0,0095; test t-Studenta; rycina 7 C).

Następnie wykonano barwienia immunohistochemiczne z detekcją DAB wykrywające antygeny białka SRF. Jako materiał do analiz posłużyły skrawki mózgów dorosłych myszy (P 60) poddanych uprzednio opisanej procedurze iniekcji 4-OHT. Obrazy skrawków hipokampów ciętych w płaszczyźnie czołowej (rycina 7 D) potwierdziły wysoki poziom SRF u myszy WT (o genotypie *SRF<sup>f/f</sup>Cre<sup>-/-</sup>*), zwłaszcza w obszarze CA1 (łac. *cornu Ammonis*) oraz zakręcie zębatym (ang. *dentate gyrus*) hipokampa. W przypadku zwierząt cKO (o genotypie *SRF<sup>f/f</sup>Cre<sup>+/-</sup>*) odnotowano spadek intensywności sygnału specyficznego dla SRF we wszystkich porównywanych obszarach. co stanowi kolejny dowód na efektywności delekcji genu *Srf* na wczesnych etapach rozwoju postnatalnego myszy szczepu *SRF<sup>f/f</sup>CaMKCreERT2* na skutek aktywacji rekombinazy Cre.

Aby zbadać czy niski poziom SRF ma wpływ na budowę hipokampów myszy szczepu *SRF<sup>f/f</sup>CaMKCreERT2* poddanych iniekcjom 4-OHT wykonano barwienia skrawków mózgów metodą Nissla (rycina 7 E). Nie zaobserwowano znacznych różnic w grubości poszczególnych warstw komórek czy ich organizacji pomiędzy badanymi grupami zwierząt. Pozwoliło to na wyciągnięcie wniosków, iż zaproponowany schemat doświadczalny obniżenia poziomu SRF u młodych mysz nie przyczynia się do widocznych zmian w anatomii hipokampów tych zwierząt.

Zastosowane metody weryfikacji potwierdziły, iż schemat badawczy polegający na podaniu myszom szczepu *SRF<sup>f/f</sup>CaMKCreERT2* po 0,25 mg 4-OHT w trzy kolejne dni począwszy od dnia piątego po narodzinach jest dobrą metodą na znaczące obniżenie poziomu SRF w neuronach przodomózgowia myszy na wczesnym etapie rozwoju postnatalnego. Przeprowadzone testy wykazały specyficzność i efektywność zaproponowanej procedury indukcji delekcji SRF w neuronach, a ponadto wykazały, że nie zaburza ona w znaczny sposób rozwoju i morfologii całego mózgowia



### Rycina 7. Model eksperymentalny delecji *Srf* na wczesnych etapach rozwoju postnatalnego myszy.

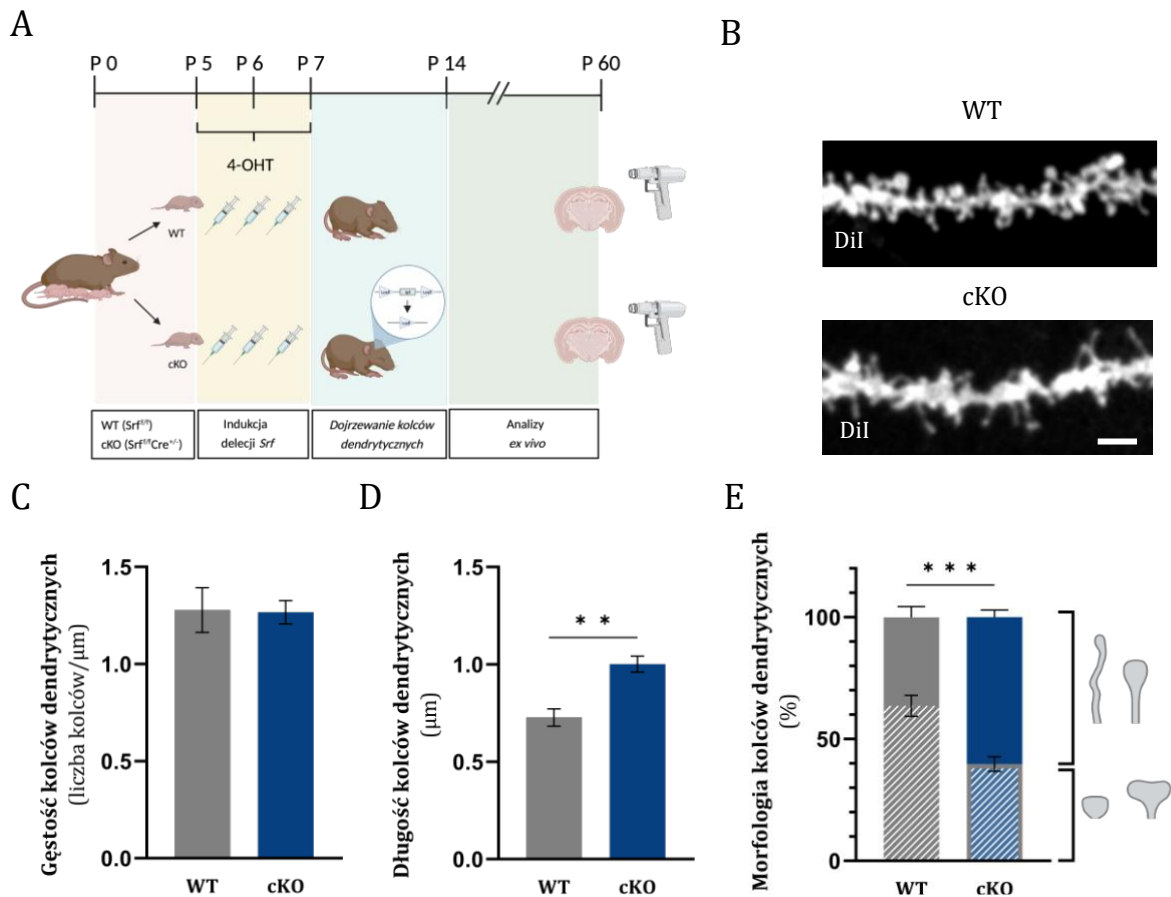
**(A)** Analiza poziomu białek SRF i CaMKIIα w rozwoju postnatalnym u myszy. Analiza Western Blot homogenatów hipokampów (dla P 0 – P 60; n = 3) wykazała, iż poziom białka SRF jest regulowany rozwojowo. W każdym z badanych punktów czasowych wykryto białko SRF, jednak jego ilość i kompozycja izoform zmieniały się wraz z rozwojem osobniczym. Białko CaMKIIα było wykrywane dopiero u tygodniowych osobników (P 7), jego ilość wzrastała do P 14 osiągając poziom charakterystyczny dla dorosłych zwierząt. **(B)** Schemat krzyżowania myszy w celu uzyskania osobników cKO. Myszy, u których fragment genu *Srf* został oflankowany sekwencjami loxP (linia *Srf<sup>fl/fl</sup>*) krzyżowano z osobnikami linii CaMKCreERT2 posiadającymi gen rekombinazy *Cre* znajdujący się pod kontrolą neuronalnego promotora genu *Camk2α*. W miotach potomnych otrzymywano osobniki będące homozygotami względem locus *Srf* i zawierające pojedynczą kopię genu *Cre* (myszy cKO o genotypie *Srf<sup>fl/fl</sup>Cre<sup>ERT2</sup>*) oraz osobniki WT będące również homozygotami pod względem genu *Srf* jednak nie posiadające transgenu *Cre* (genotyp: *Srf<sup>fl/fl</sup>Cre<sup>ERT2</sup>*). **(C)** Porównanie poziomu mRNA *Srf* u dorosłych myszy cKO (n = 6) i myszy WT (n = 4), które na wczesnym etapie rozwoju postnatalnego zostały poddane iniekcjom 4-OHT. Analiza poziomu mRNA wykazała, że zastosowany schemat badawczy pozwala na efektywne obniżenie poziomu transkryptytu *Srf* u myszy cKO w odniesieniu do zwierząt WT. **(D)** Ocena efektywności obniżenia poziomu białka SRF w wyniku iniekcji młodych (P 5 – P 7) myszy 4-OHT. Przykładowe zdjęcia hipokampów myszy WT i cKO poddanych barwieniu immunohistochemicznemu z przeciwciałem wykrywającym antygeny białka SRF. Skala: 400 μm. **(E)** Obrazowanie morfologii hipokampów myszy WT i cKO. Przykładowe zdjęcia hipokampów myszy WT i cKO poddanych barwieniu Nissla w celu uwidocznienia ich morfologii. Przeprowadzone porównanie nie wykazało znaczących różnic w grubości poszczególnych warstw komórek czy ich organizacji pomiędzy badanymi grupami zwierząt. Skala: 400 μm. \*\* p < 0,01; na wykresie (C) przedstawiono wartości średnie ± SEM.

## 4.2. Wpływ obniżonego poziomu białka SRF na budowę kolców dendrytycznych myszy

Ponieważ białko SRF jest obecne w komórkach hipokampa myszy a jego poziom wzrasta w okresie, w którym dochodzi do powstawania i dojrzewania połączeń nerwowych, postanowiono zbadać jego rolę w regulacji kształtu kolców dendrytycznych. W tym celu zastosowano podejście eksperymentalne polegające na ocenie wpływu niskiego poziomu SRF na gęstość oraz strukturę kolców dendrytycznych komórek piramidowych hipokampów myszy. Myszy transgeniczne poddano procedurze indukcji delekcji *Srf* poprzez trzykrotne podanie po 0,25 mg 4-OHT w formie iniekcji dootrzewnowych. Następnie zwierzęta hodowano w standardowych warunkach, aż do momentu osiągnięcia przez nie pełnej dojrzałości (P 60), po czym dekapitowano i pobierano tkani do analizy *ex vivo*. W celu wizualizacji struktury kolców dendrytycznych do komórek hipokampalnych wprowadzono barwnik DiI za pomocą metody balistycznej. Skrawki zawierające odpowiednie struktury hipokampa (obszar CA1 brzuszego hipokampa) obrazowano przy użyciu fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego Zeiss LSM 780. Następnie, zebrane obrazy dendrytów komórek nerwowych analizowano w programie SpineMagick! oraz przy użyciu autorskiego skryptu w języku Python (Jasińska i in., 2016). W eksperymencie wykorzystano myszy WT (n = 4) oraz cKO (n = 7).

Analiza gęstości kolców dendrytycznych, wyrażonej jako liczba kolców dendrytycznych na jeden  $\mu\text{m}$  długości dendrytu, wykazała brak różnic (p = 0,9248; test t-Studenta) między komórkami myszy kontrolnych WT ( $1,28 \pm 0,11$ ) a komórkami myszy cKO ( $1,27 \pm 0,006$ ; rycina 8 C). Następnie sprawdzono, czy niski poziom białka SRF na wczesnych etapach rozwoju postnatalnego wpływa na strukturę kolców dendrytycznych, a dokładnie na ich długość (mierzoną jako odległość między szczytem główki kolca dendrytycznego a podstawą dendrytu). Analiza ta pokazała, że kolce dendrytyczne komórek piramidowych myszy cKO są zdecydowanie dłuższe w porównaniu do kolców dendrytycznych zwierząt kontrolnych (WT:  $0,72 \pm 0,04$ ; cKO:  $1,01 \pm 0,04$ ; p = 0,0021; test t-Studenta; rycina 8 D). Ponieważ, u dorosłych zwierząt znaczna większość kolców dendrytycznych ma kształt grzybkowaty lub przysadzisty, utożsamiane z powstaniem dojrzałych połączeń nerwowych, postanowiono sprawdzić czy niski poziom SRF na etapie formowania kolców dendrytycznych zaburza ich morfologię. W tym celu, pogrupowano kolce dendrytyczne

zgodnie z ich kształtem na dwie główne kategorie: kolce dojrzałe o kształcie grzybkowatym i przysadzistym oraz kolce niedojrzałe o kształcie filopodialnym, wydłużonym. Analiza rozkładu zmiennych wykazała, że w grupie kolców dendrytycznych myszy cKO obserwujemy znaczny, bo aż o 24 punkty procentowe, wzrost częstości kolców o niedojrzałej morfologii w porównaniu do grupy kolców dendrytycznych zwierząt WT ( $\chi^2 = 11,54$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,0007$ ; test  $\chi^2$ ). Zatem myszy z grupy cKO charakteryzowały się zmniejszoną liczbą kolców dendrytycznych o morfologii dojrzałej: kolców grzybkowatych i przysadzistych (rycina 8 E). Wynik ten wskazuje na znaczący wpływ czynnika transkrypcyjnego SRF na proces dojrzewania kolców dendrytycznych, co postanowiono poddać dalszej weryfikacji z wykorzystaniem modeli *in vitro*.



**Rycina 8. Delecja *Srf* na wczesnych etapach rozwoju postnatalnego myszy prowadzi do zaburzenia morfologii kolców dendrytycznych *in vivo*.**

**(A)** Schemat doświadczenia. Ososki myszy WT (genotyp: *Srf<sup>fl/fl</sup>Cre<sup>-/-</sup>*) oraz myszy cKO (genotyp: *Srf<sup>fl/fl</sup>Cre<sup>+/-</sup>*) poddano iniekcjom 4-OHT w trzech kolejnych dniach począwszy od dnia piątego po narodzinach (P 5, P 6, P 7). Po osiągnięciu przez myszy wieku dorosłego (P 60) pobrano tkanki i poddano analizie *ex vivo*. W celu wyznakowania kolców dendrytycznych posłużono się

biobalistyczną metodą wprowadzenia barwnika DiI. **(B)** Przykładowe zdjęcia obrazujące dendryty pola CA1 brzuszego hipokampa wraz z kolcami dendrytycznymi myszy WT i cKO. Skala: 2  $\mu\text{m}$ . **(C)** Morfologia i liczba kolców dendrytycznych na dendrytach drugo- i trzeciorzędowych myszy WT (n= 4) i cKO (n = 7). Analiza wykazała, iż gęstość kolców dendrytycznych nie różni się między zwierzętami cKO a WT. **(D)** jednak kolce dendrytyczne myszy z delecją *Srf* są istotnie dłuższe od kolców dendrytycznych myszy WT. **(E)** Rozkład liczby kolców o morfologii niedojrzałej (długie i filopodialne) w porównaniu do kolców o morfologii dojrzałej (przysadziste i grzybkowate). Myszy cKO mają istotnie więcej kolców dendrytycznych niedojrzałym fenotypie w porównaniu do myszy z grupy kontrolnej WT. Tym samym, u myszy z niskim poziomem SRF (cKO) odnotowano spadek liczby kolców o dojrzałym kształcie. \*\* p < 0,001; \*\*\* p < 0,0001; na wykresach (C, D, E) przedstawiono wartości średnie  $\pm$  SEM.

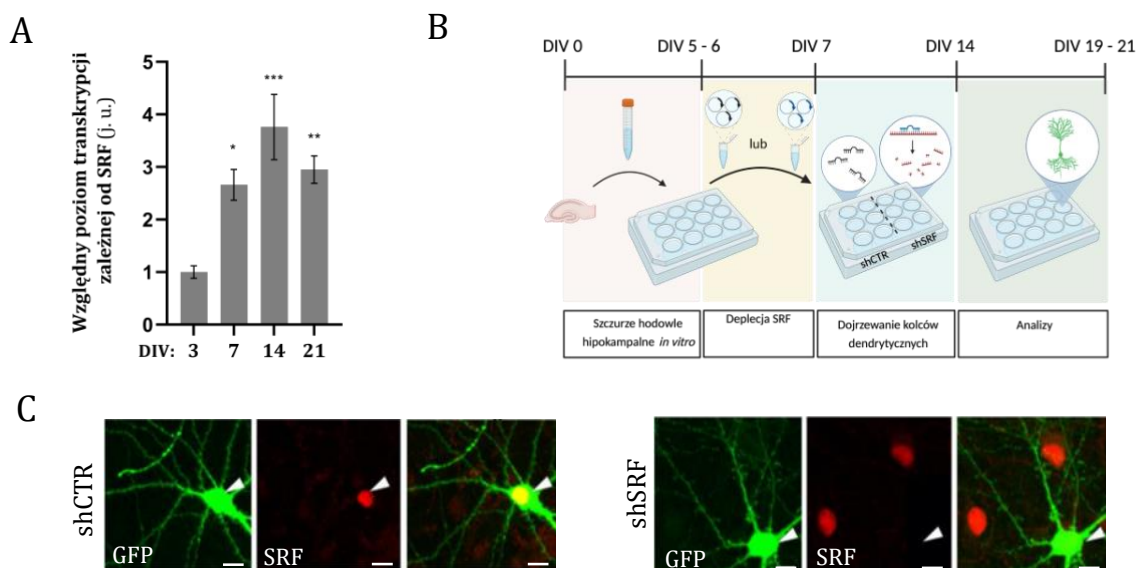
### 4.3. Specyficzność i efektywność obniżenia poziomu SRF w modelu *in vitro*

Jednym z modeli badawczych wykorzystanych na potrzeby niniejszej pracy były pierwotne dysocjowane hodowle hipokampalne. Z osesków szczurów szczepu Wistar w pierwszej dobie po urodzeniu (P 0) izolowano neurony hipokampalne, które następnie hodowano na szkiełkach o średnicy 18 mm. W celu utrzymania homogenności hodowli, w dniu czwartym hodowli (DIV 4) dodawano do komórek 2,5  $\mu\text{M}$  arabinozydu cytozyny, blokującego dalszy rozwój komórek glejowych. Pierwotne hodowle neuronalne są szeroko stosowanym i dobrze opisanym narzędziem do badania rozwoju i plastyczności kolców dendrytycznych (Schelski i Bradke, 2017; Yogev i Shen, 2017).

Ponieważ rozwój komórek nerwowych w pierwotnych hodowlach *in vitro* jest procesem szczegółowo omówionym w literaturze (zobacz paragraf 1.2.3. niniejszej pracy) postanowiono sprawdzić, jak aktywność transkrypcyjna białka SRF zmienia się w czasie tego procesu. Do tego celu wykorzystano neurony hipokampalne hodowane *in vitro*, do których za pomocą elektroporacji wprowadzono wektory plazmidowe p5xSRE\_Luc oraz pEF1 $\alpha$ LacZ. Zastosowane konstrukty pozwoliły na ocenę poziomu transkrypcji zależnej od SRF (dzięki umieszczeniu genu lucyferazy pod promotorem zawierającym pięć powtórzeń sekwencji SRE) wystandaryzowanej względem poziomu aktywności  $\beta$ -galaktozydazy stanowiącej o efektywności elektroporacji. Analizie poddano neurony będące w dniu 3., 7., 14. i 21. hodowli *in vitro*. Jako wartość referencyjną potraktowano średni wynik poziomu transkrypcji zależnej od SRF otrzymany dla neuronów w DIV 3.

Przeprowadzone pomiary wykazały, że transkrypcja zależna od SRF jest wykrywana w każdym z badanych punktów czasowych. Odnotowano znaczące różnice w poziomie aktywności w DIV 7, DIV 14 i DIV 21 (wartości względne, odpowiednio:  $p = 0,0040$ ;  $p < 0,0001$ ;  $p = 0,0011$ , jednoczynnikowa ANOVA; test *post hoc* Sidaka; rycina 9 A) względem poziomu aktywności w DIV 3. Ponadto, wzrost poziomu transkrypcji zależnej od SRF utrzymuje się na wysokim poziomie w pozostałym analizowanym okresie czasu (do DIV 21).

Następnie podjęto się próby weryfikacji wpływu niskiego poziomu SRF na proces dojrzewania kolców dendrytycznych *in vitro*. W tym celu, w dniu piątym lub szóstym hodowli (DIV 5 lub 6), a więc w okresie odpowiadającym inicjacji procesu synaptogenezy *in vitro*, do komórek nerwowych wprowadzano metodą lipofekcji wektory plazmidowe: shCTR lub shSRF. Aby obniżyć poziom SRF zastosowano technikę interferencji RNA w oparciu o wektory plazmidowe kodujące krótkie RNA o strukturze spinki do włosów (ang. *short hairpin RNA*, shRNA). Oba plazmidy poza specyficznym shRNA, wprowadzały do komórek także wyrażany konstytutywnie gen białka zielonej fluorescencji (ang. *green fluorescent protein*, GFP), który umożliwiał identyfikację stransfekowanych neuronów. Efektywność i specyficzność procesu oceniono wykonując barwienie immunocytochemiczne neuronów hodowanych *in vitro* w DIV 21 z wykorzystaniem przeciwciał specyficznych dla antygenów białka SRF (rycina 9 C). W wariancie kontrolnym, wykonane obrazowanie potwierdziło wysoki poziom czynnika transkrypcyjnego SRF w jądrach komórkowych wszystkich analizowanych neuronów, zarówno neuronów stransfekowanych shCTR (wyrażających GFP) oraz neuronów natywnych. W komórkach stransfekowanych shSRF odnotowano znaczny spadek intensywności fluorescencji sygnału specyficznego dla SRF. Nie odnotowano wpływu zastosowanych shRNA na przeżywalność komórek. Obserwacje te pozwoliły potwierdzić specyficzność i efektywność zastosowanego shSRF i były zgodne z danymi literaturowymi (Kuzniewska i in., 2013; Yin i in., 2006).



**Rycina 9. Model eksperymentalny deplecji SRF przy zastosowaniu techniki interferencji RNA *in vitro*.**

**(A)** Analiza poziomu transkrypcji zależnej od SRF w rozwoju neuronów *in vitro*. Do szczurzych neuronów hipokampalnych w P0 wprowadzono wektory plazmidowe p5xSRE\_Luc i pEF1αLacZ pozwalające na ocenę poziomu transkrypcji zależnej od SRF (dzięki umieszczeniu genu lucyferazy pod kontrolą promotora zawierającego pięć powtórzeń sekwencji SRE specyficznym rozpoznawanej przez czynnik transkrypcyjny SRF). Analizowano aktywność transkrypcyjną w: DIV 3 (stanowiącą punkt odniesienia), DIV 7, DIV 14 i DIV 21. Poziom transkrypcji zależnej od SRF wzrasta istotnie od DIV 7 i utrzymuje się w całym analizowanym okresie (do DIV 21). **(B)** Schemat doświadczenia. Hodowle neuronów hipokampalnych pozyskanych z osesków P0 szczurów szczepu Wistar transfekowano w DIV 5 lub DIV 6 wektorem plazmidowym shCTR lub shSRF. Morfologię kolców dendrytycznych badano w dojrzałych neuronach (DIV 19 – 21). **(C)** Przykładowe zdjęcia neuronów hipokampalnych obrazujące obniżenie poziomu SRF w komórkach transfekowanych shSRF w porównaniu do neuronów shCTR. Skala 2 μm. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ ; na wykresie (A) przedstawiono wartości średnie ± SEM. Wyniki (A) uzyskano z trzech niezależnych hodowli neuronalnych.

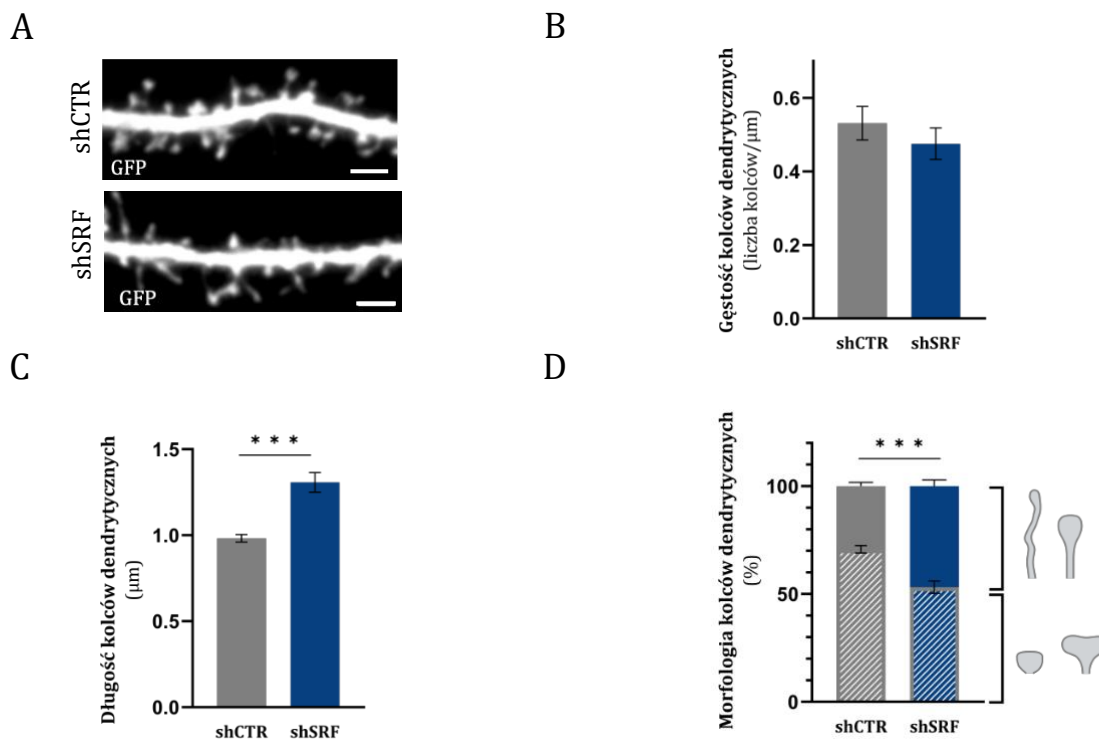
#### 4.4. Wpływ SRF na budowę kolców dendrytycznych w modelu *in vitro*

W celu oceny udziału SRF w regulacji procesu dojrzewania kolców dendrytycznych, neurony stransfekowane w DIV 5 lub DIV 6 shCTR ( $n = 22$ ) lub shSRF ( $n = 18$ ) utrwalono na etapie osiągnięcia przez nie stadium dojrzałego (DIV 19 – 21). Dla uzyskania lepszej jakości obrazu, neurony poddano barwieniu immunocytochemicznemu z przeciwciałem specyficznym dla białka GFP, po czym



zobrazowano przy użyciu mikroskopu konfokalnego Zeiss LSM 780. Analiza uzyskanych zdjęć, wykonana w programie SpineMagick! nie wykazała różnic w gęstości kolców dendrytycznych na drugo- i trzeciorzędowych dendrytach pomiędzy badanymi wariantami ( $p = 0,39$ ; test t-Studenta; rycina 10 B). W następnym kroku zbadano długość kolców dendrytycznych. Jak pokazuje rycina 10 A i C neurony shSRF charakteryzują się istotnie dłuższymi wypustkami ( $1,30 \pm 0,06$ ) niż komórki shCTR ( $0,98 \pm 0,02$ ;  $p < 0,001$ ; test t-Studenta). Następnie, na podstawie przeprowadzonych pomiarów parametrów morfologicznych kolców dendrytycznych, w sposób półautomatyczny przypisano poszczególne kolce do kategorii, po czym pogrupowano jako wypustki o morfologii niedojrzałej i dojrzałej. Podobnie jak w modelu *ex vivo*, zaobserwowano znaczący, bo o ponad 20 punktów procentowych, wzrost częstości występowania kolców o niedojrzałym kształcie w porównaniu do neuronów grupy kontrolnej shCTR ( $\chi^2 = 11,99$ ,  $df = 1$ ;  $p = 0,0005$ ; test  $\chi^2$ ; rycina 10 D).

otrzymane wyniki wspierają hipotezę o znaczącej roli czynnika transkrypcyjnego SRF w regulacji procesu dojrzewania kolców dendrytycznych, co wykazano zarówno w modelu *in vitro* jak i *in vivo*.



**Rycina 10. Deplecja SRF naczesnych etapach rozwoju prowadzi do zaburzeń morfologii kolców dendrytycznych *in vitro*.**

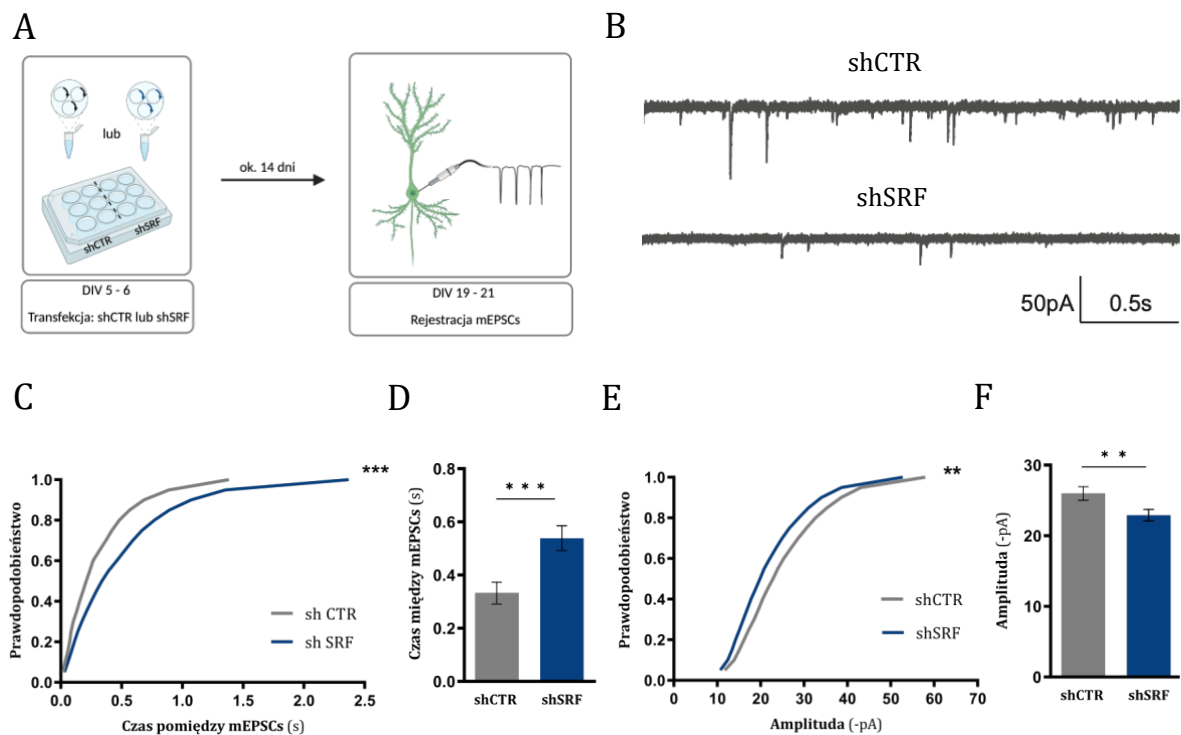
**(A)** Przykładowe zdjęcia przedstawiające kolce dendrytyczne neuronów shCTR i shSRF. Skala 2  $\mu\text{m}$ . **(B)** Nie wykazano różnic w gęstości kolców dendrytycznych na dendrytach drugo- i trzeciorzędowych pomiędzy neuronami shCTR (n = 22) shSRF (n = 18). **(C)** Neurony z obniżonym poziomem SRF (shSRF) mają dłuższe kolce dendrytyczne niż neurony kontrolne shCTR. **(D)** Procentowy udział kolców niedojrzałych (długie i filopodialne) w porównaniu do kolców dojrzałych (przysadziste i grzybkowate). Wśród kolców dendrytycznych neuronów shSRF częściej występują wypustki o niedojrzałej morfologii niż w neuronach shCTR. \*\*\*  $p < 0,0001$ ; na wykresach (B, C, D) przedstawiono wartości średnie  $\pm$  SEM. Wyniki uzyskano z co najmniej trzech niezależnych hodowli neuronalnych.

#### 4.5. Wpływ białka SRF na aktywność neuronalną i procesy plastyczności

Właściwości elektrofizjologiczne komórek nerwowych są ściśle powiązane z procesami plastyczności strukturalnej i funkcjonalnej zachodzącymi na synapsach. W literaturze szeroko dyskutowana jest korelacja pomiędzy kształtem kolców dendrytycznych (czyli pośrednio, stopniem ich dojrzałości) a siłą tworzonych przez nie połączeń nerwowych (zobacz paragraf 1.4.1. niniejszej pracy). Dlatego też, postanowiono sprawdzić czy obserwowane zaburzenia w morfologii kolców dendrytycznych neuronów z obniżonym poziomem SRF wpływają na ich pobudzającą transmisję synaptyczną. W tym celu zbadano miniaturowe pobudzające prądy postsynaptyczne (mEPSCs), które zależą od aktywności receptorów AMPA. Jako model eksperymentalny posłużyły szczurze komórki hipokampalne hodowane *in vitro*. Zastosowano analogiczny schemat doświadczalny jak w przypadku oceny wpływu deplecji SRF na morfologię kolców dendrytycznych, tj. transfekcja w DIV 5 lub DIV 6 wektorem plazmidowym shCTR lub shSRF, analiza badanych parametrów ok. dnia dwudziestego hodowli *in vitro* (DIV 19 – 21). Ponieważ w niniejszych badaniach skoncentrowano się na kolcach dendrytycznych będących postsynaptyczną komponentą połączeń nerwowych, dołożono wszelkich starań, aby komórki presynaptyczne były neuronami natywnymi, o niezaburzonej fizjologii. W tym celu przeprowadzone transfekcje charakteryzowały się niską wydajnością, tak by na ok. 120 000 neuronów hodowanych na szkiełku zaledwie kilka było neuronami stransfekowanymi, GFP-pozytywnymi. Zwiększało to prawdopodobieństwo, że różnice obserwowane pomiędzy wariantami eksperymentalnymi będą wynikały z właściwości komórek badanych, a nie ich presynaptycznych partnerów. Farmakologicznie izolowane miniaturowe potencjały były rejestrowane

w konfiguracji *whole-cell patch-clamp* przy ustalonym potencjale błonowym na poziomie  $-60$  mV. Dla każdej badanej komórki wykonano dwudziestominutowe nagrania, które następnie przeanalizowano w programie MiniAnalysis (Synaptosoft).

Przykładowe zapisy mEPSCs uzyskane w toku eksperymentu dla neuronów shCTR ( $n = 8$ ) i shSRF ( $n = 10$ ) przedstawiono na rycinie 11 B. Analiza częstotliwości występowania mEPSCs, przedstawionej jako długość odcinka czasu pomiędzy kolejnymi miniaturowymi potencjałami, wykazała znaczące zmniejszenie częstotliwości mEPSCs w komórkach z obniżonym poziomem SRF w porównaniu do komórek kontrolnych (rycina 11 C: dane kumulatywne:  $p = 0,0002$ ; test Kolmogorova-Smirnova; rycina 11 D: dane średnie:  $p < 0,0001$ ; test Manna-Whitneya). Ponadto, deplecja SRF wpłynęła także na wartość amplitudy mEPSCs. Komórki shSRF charakteryzują się istotnie statystycznie niższą amplitudą mEPSCs niż komórki shCTR (rycina 11 E: dane kumulatywne:  $p = 0,0080$ ; test Kolmogorova-Smirnova; rycina 11 F: dane średnie:  $p < 0,0026$ ; test Manna-Whitneya). Powyższe dane, wskazują na zaburzenie wybranych właściwości elektrofizjologicznych neuronów piramidowych w stanie podstawowej aktywności jako konsekwencji niskiego poziomu białka SRF.

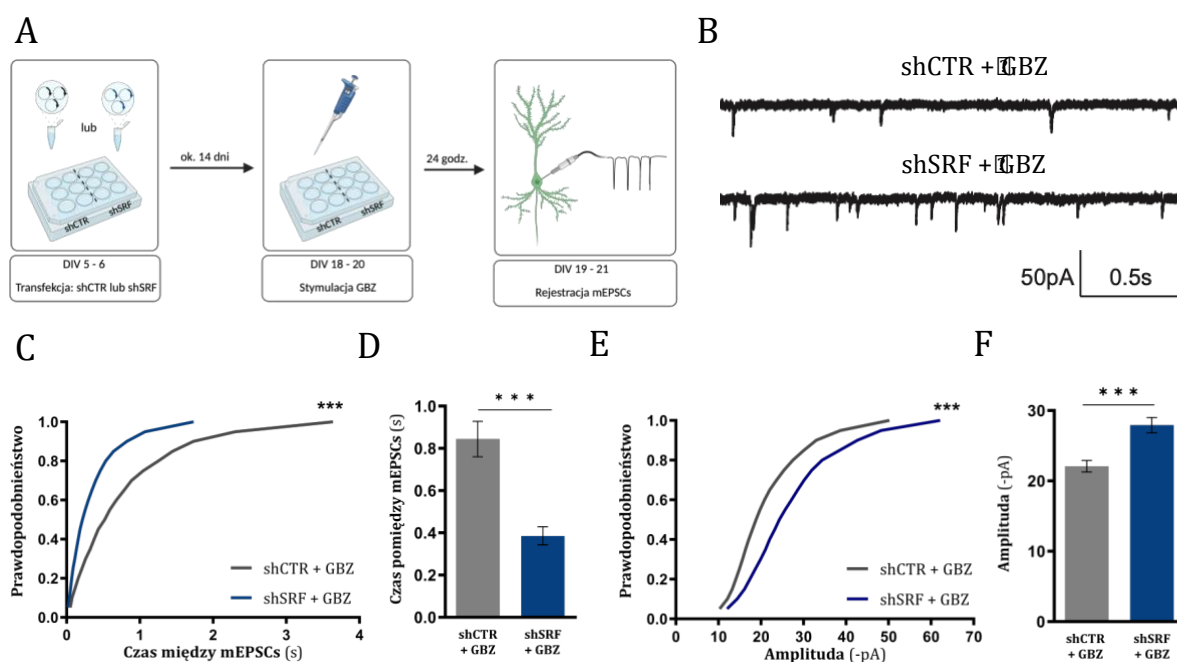


**Rycina 11. Obniżony poziom SRF zmniejsza częstotliwość i amplitudę mEPSCs neuronów hodowanych *in vitro*.**

**(A)** Uproszczony schemat doświadczenia. Szczurze dysocjowane hodowle hipokamplane transfekowano w DIV 5 lub DIV 6 wektorami plazmidowymi shCTR lub shSRF. Rejestracji mEPSCs dokonywano w dojrzałych neuronach (DIV 19 – 21). **(B)** Przykładowe zapisy mEPSCs komórek shCTR i shSRF. **(C, D)** Analiza mEPSCs wykazała, że neurony z deplecją SRF (shSRF: n = 10) charakteryzują się niższą częstotliwością występowania mEPSCs, a zatem odcinek czasu pomiędzy kolejnymi miniaturowymi prądami pobudzającymi jest dłuższy w porównaniu do mEPSCs neuronów shCTR (n = 8). **(E, F)** Ponadto, prądy te cechują się niższą amplitudą w przypadku neuronów shSRF niż w neuronach shCTR. \*\* p < 0,001; \*\*\* p < 0,0001; na wykresach (C, E) przedstawiono wartości kumulatywne lub (D, F) wartości średnie ± SEM. Wyniki uzyskano z co najmniej trzech niezależnych hodowli neuronalnych.

Jedną z najważniejszych właściwości neuronów jest ich zdolność do odpowiadania na zmieniające się bodźce. Aby sprawdzić jak usunięcie SRF na wczesnych etapach rozwoju wpływa na zdolności adaptacyjne neuronów zastosowano model plastyczności homeostatycznej, która jest kluczowa dla prawidłowego rozwoju sieci neuronowych (Tien i Kerschensteiner, 2018; Turrigiano i Nelson, 2004). Jak wykazały liczne badania spontaniczna aktywność neuronalna (mEPSCs) komórek poddanych długotrwałemu pobudzeniu zmniejsza się w porównaniu do warunków kontrolnych, co przejawia się obniżeniem wartości amplitudy i częstotliwości mEPSCs. W niniejszej pracy zastosowano model dwudziestoczwierogodzinnej stymulacji szczurzych neuronów hipokampalnych hodowanych *in vitro* 20 μM gabazyną (GBZ) będącą antagonistą receptorów hamujących GABA<sub>A</sub>. Badanie przeprowadzono w analogiczny sposób jak w przypadku mEPSCs testowanych w warunkach podstawowych (bez stymulacji).

Przykładowe zapisy mEPSCs uzyskane w toku eksperymentu dla neuronów shCTR (n = 9) i shSRF (n = 9) przedstawiono na rycinie 12 B. Przeprowadzone badania wykazały, że w wyniku stymulacji częstotliwość mEPSCs neuronów shSRF jest istotnie wyższa niż komórek shCTR (rycina 12 C: dane kumulatywne: p < 0,0001; test Kolmogorova-Smirnova; rycina 12 D: dane średnie: p < 0,0001; test Manna-Whitneya), co przejawia się krótszymi odcinkami czasu pomiędzy kolejnymi miniaturowymi potencjałami w komórkach shSRF. Deplecja SRF wiąże się także z nieprawidłowymi zmianami w wartościach amplitudy mEPSCs. Amplituda mEPSCs neuronów z niskim poziomem SRF jest wyższa niż komórek kontrolnych shCTR (rycina 12 E: dane kumulatywne: p < 0,0001; test Kolmogorova-Smirnova; rycina 12 F: dane średnie: p < 0,0001; test Manna-Whitneya).

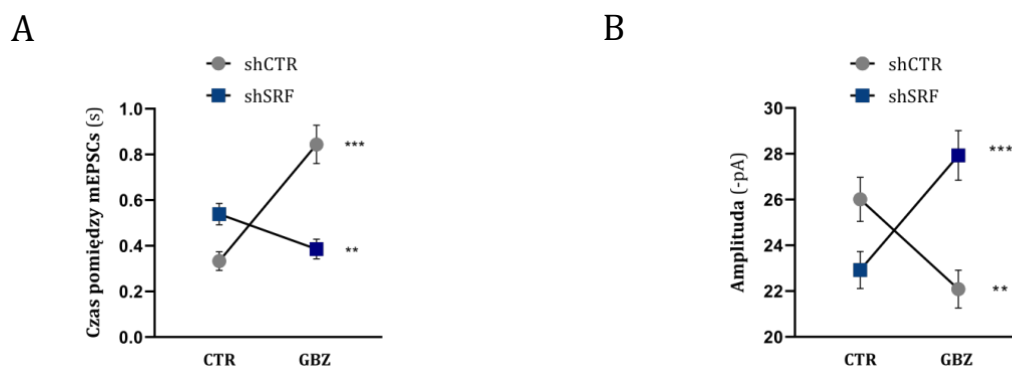


**Rycina 12. Obniżony poziom SRF zaburza mechanizmy plastyczności homeostaticznej w odpowiedzi na długotrwałe pobudzenie wywołane stymulacją GBZ.**

(A) Uproszczony schemat doświadczenia. Szczurze dysocjowane hodowle hipokampalne transfekowano w DIV 5 lub DIV 6 wektorami plazmidowymi shCTR lub shSRF. Dojrzałe neurony poddawano dwudziestoczterogodzinnej stymulacji 20  $\mu$ M gabazyną (GBZ; antagonist receptorów GABA). Rejestracji mEPSCs dokonywano w ok. dwudziestym dniu hodowli in vitro (DIV 19 – 21). (B) Przykładowe rejestry mEPSCs komórek shCTR i shSRF w odpowiedzi na długotrwałe pobudzenie (odpowiednio: shCTR + GBZ, shSRF + GBZ). (C, D) W odpowiedzi na długotrwałe pobudzenie neuronalne czas pomiędzy kolejnymi mEPSCs komórek shSRF +GBZ (n = 9) maleje w porównaniu do mEPSCs neuronów shCTR + GBZ (n = 9). (E, F) Wartość amplitudy mEPSC neuronów z niskim poziomem SRF (shSRF + GBZ) w warunkach długotrwałego pobudzenia wzrasta w porównaniu zarówno do komórek shCTR poddanych stymulacji (shCTR + GBZ). \*\*\* p < 0,0001; na wykresach (C, E) przedstawiono wartości kumulatywne lub (D, F) wartości średnie  $\pm$  SEM. Wyniki uzyskano z trzech niezależnych hodowli neuronalnych.

Interesujące dane uzyskano z analizy zmiany wartości parametrów mEPSCs pod wpływem długotrwałej stymulacji (GBZ) w porównaniu do stanu podstawowej aktywności neuronalnej. Na skutek procesów plastyczności homeostaticznej w komórkach kontrolnych shCTR po stymulacji GBZ zaobserwowano wydłużenie odcinka czasu pomiędzy kolejnymi mEPSCs (rycina 13 A: wartości średnie (s):  $0,33 \pm 0,04$  vs.  $0,84 \pm 0,08$ ; p < 0,0001; test *post hoc* Dunna), czyli spadek częstotliwości mEPSCs oraz spadek amplitudy mEPSC (rycina 13 B: wartości średnie (- pA):  $26,01 \pm 0,96$  vs.  $22,09 \pm 0,83$ ; p = 0,0015; test *post hoc* Dunna). Jednak, takie zmiany nie

występują w neuronach z obniżonym poziomem SRF. W odpowiedzi na długotrwałe pobudzenie parametry mEPSCs neuronów shSRF zmieniają się w kierunku przeciwnym do oczekiwanego: odnotowano skrócenie odcina czasu pomiędzy kolejnymi mEPSCs (rycina 13 A: wartości średnie (s):  $0,54 \pm 0,05$  vs.  $0,39 \pm 0,04$ ;  $p = 0,0042$ ; test *post hoc* Dunna) oraz wzrost amplitudy mEPSCs (rycina 13 B: wartości średnie (-pA):  $22,92 \pm 0,81$  vs.  $27,93 \pm 1,08$ ;  $p < 0,0001$ ; test *post hoc* Dunna).



**Rycina 13. Neurony z obniżonym poziomem SRF mają zmienione właściwości elektrofizjologiczne.**

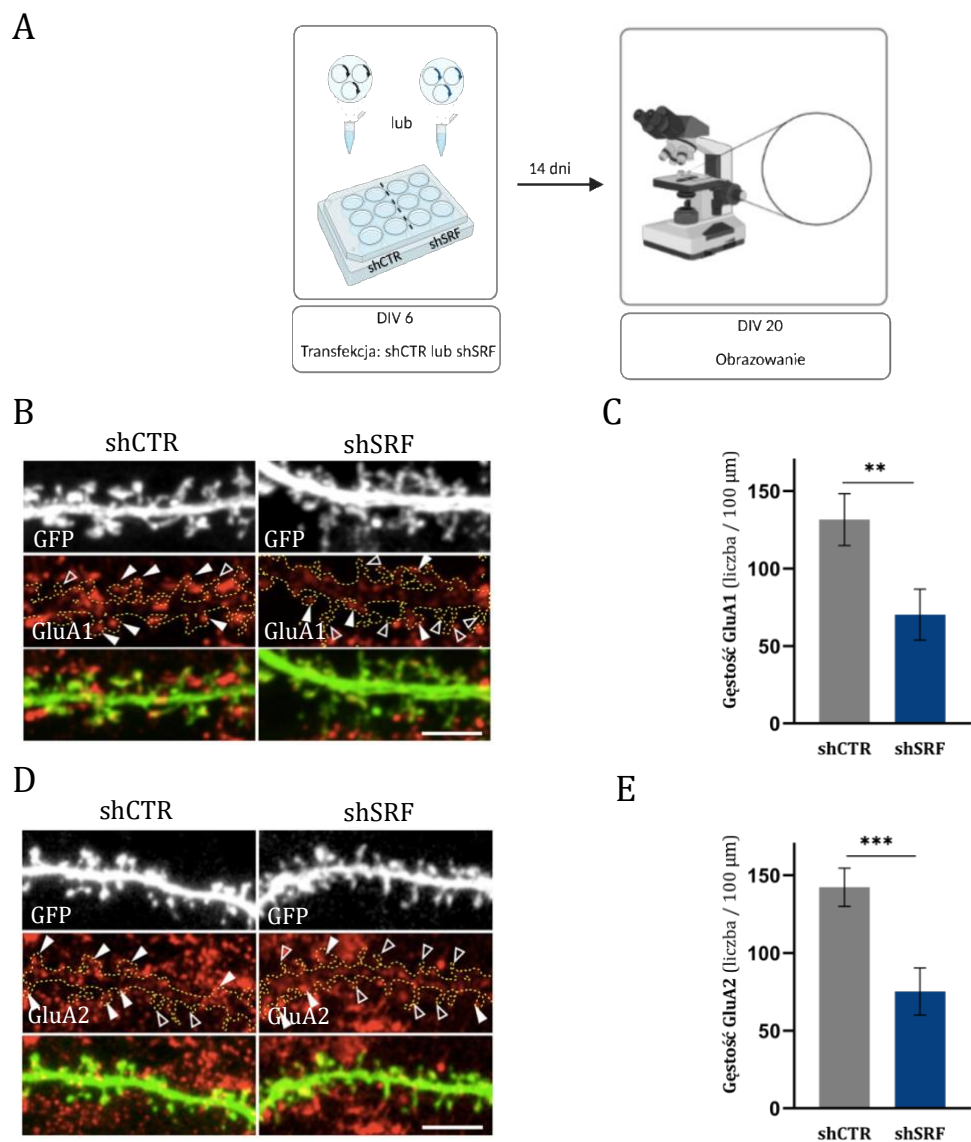
**(A)** Neurony z obniżonym poziomem SRF mają niższą częstotliwość mEPSCs w warunkach spontanicznej aktywności neuronalnej, która pod wpływem długotrwałej stymulacji GBZ (antagonista GABA<sub>A</sub>) rośnie. Jest to efekt odwrotny do tego obserwowanego w neuronach kontrolnych. **(B)** Podobnie analiza amplitudy mEPSCs, wykazała, że w neuronach shCTR w wyniku 24-godzinnej stymulacji GBZ amplituda spada. Natomiast w neuronach z obniżonym poziomem SRF, których amplituda jest niższa niż neuronów kontrolnych, w wyniku długotrwałej stymulacji dochodzi do wzrostu amplitudy mEPSCs. \*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ ; na wykresach (A, B) przedstawiono wartości średnie  $\pm$  SEM.

Podsumowując, niski poziom SRF zaburza spontaniczną aktywność neuronalną nie tylko w stanie podstawowego pobudzenia, lecz również w momencie długotrwałej stymulacji. Otrzymane wyniki sugerują, iż czynnik transkrypcyjny SRF jest zaangażowany w procesy związane z plastycznością homeostaticzną, która odgrywa ważną rolę w utrzymaniu pobudzenia neuronalnego na optymalnym poziomie podczas tworzenia się i dojrzewania sieci neuronalnych.

#### 4.6. Ocena poziomu receptorów błonowych AMPA neuronów z obniżonym poziomem SRF: metoda immunocytochemiczna

Właściwości miniaturowych prądów pobudzających (mEPSCs) zależą zarówno od procesów pre- jak i postsynaptycznych. Zastosowany model badawczy pozwolił na przyjęcie założenia, że obserwowane różnice pomiędzy grupą neuronów shCTR a shSRF są wynikiem odmiennych właściwości komórek postsynaptycznych pomiędzy grupami. W tym kontekście, obserwowane różnice w częstotliwości i amplitudzie mEPSCs mogą być konsekwencją różnicy w gęstości kolców dendrytycznych lub różnej dystrybucji receptorów glutaminianu na powierzchni synapsy. Jak wykazano w niniejszej rozprawie (paragraf 4.4.; rycina 10 B), nie obserwuje się różnic w liczbie kolców dendrytycznych na dendrytach komórek piramidowych pomiędzy neuronami z grupy shCTR i shSRF. Podjęto zatem próbę weryfikacji, czy zaobserwowany spadek częstotliwości i amplitudy mEPSCs w neuronach shSRF w warunkach kontrolnych odpowiadają różnice w poziomie receptorów glutaminianu na powierzchni błon komórkowych.

Jako pierwsze podejście badawcze zastosowano barwienie immunocytochemiczne białek powierzchniowych odpowiednimi przeciwciałami. W tym celu, neurony hipokamplane stransfekowane w DIV 6 shCTR lub shSRF poddano przeżyciowemu (bez naruszenia integralności błon komórkowych) znakowaniu podjednostek receptora AMPA: GluA1 lub GluA2 w DIV 20. Zastosowano przeciwciała pierwszorzędowe specyficznym rozpoznające N-końcowy fragment białek, stanowiący część zewnątrzkomórkową podjednostek tego receptora. Utrwalone i wyznakowane komórki zobrazowano z zastosowaniem mikroskopu konfokalnego Leica TCS SP8, a uzyskane obrazy przeanalizowano w programie ImageJ. Przykładowe zdjęcia analizowanych fragmentów dendrytów neuronów shCTR i shSRF przedstawiono na rycinie 14 B, D. Wyniki przeprowadzonych analiz wskazują, iż niski poziom białka SRF w komórkach współwystępuje ze spadkiem poziomu podjednostek receptora AMPA na powierzchni dendrytów w porównaniu do neuronów shCTR, zarówno w odniesieniu do poziomu podjednostki GluA1 (rycina 14 C; shCTR n = 17; shSRF n = 14; p = 0,0061; test Manna-Whitneya) jak i GluA2 (rycina 14 D; shCTR n = 19; shSRF n = 13; p = 0,0003; test Manna-Whitneya).



**Rycina 14. Obniżenie poziomu SRF za pomocą shSRF prowadzi do spadku poziomu podjednostek GluA1 i GluA2 receptora AMPA na powierzchni błon komórkowych neuronów, co zostało wykazane metodą immunocytochemiczną.**

**(A)** Uproszczony schemat eksperymentu. Szczurze neurony hipokamplane transfekowano w DIV 6 wektorami plazmidowymi shCTR lub shSRF. Po dwóch tygodniach, w dwudziestym dniu hodowli (DIV 20) za pomocą specyficznych przeciwciał wyznakowano podjednostki GluA1 i GluA2 na powierzchni neuronów, a następnie preparaty poddano obrazowaniu. **(B)** Przykładowe obrazy neuronów shCTR i shSRF znakowanych immunocytochemicznie przeciwko białku GluA1 **(D)** lub białku GluA2 znajdującemu się na powierzchni komórek. Na zdjęciach przedstawiających immunofluorescencję dla GluA1 lub GluA2 (kanał czerwony) naniesiono obrys dendrytów wraz z kolcami dendrytycznymi uzyskany na podstawie sygnału fluorescencji GFP. Strzałkami zaznaczono kolce dendrytyczne w zależności od poziomu intensywności fluorescencji dla kanału czerwonego (GluA1 lub GluA2) wysoki: trójkąt wypełniony lub niski: trójkąt bez wypełnienia. Skala 5 μm. **(C)** Analiza gęstości molekuł GluA1 przypadających na fragment dendrytu o długości 100 μm pokazała, iż neurony shSRF (n = 14) charakteryzują się istotnie niższą gęstością GluA1 niż neurony shCTR (n = 17). **(E)** Porównanie



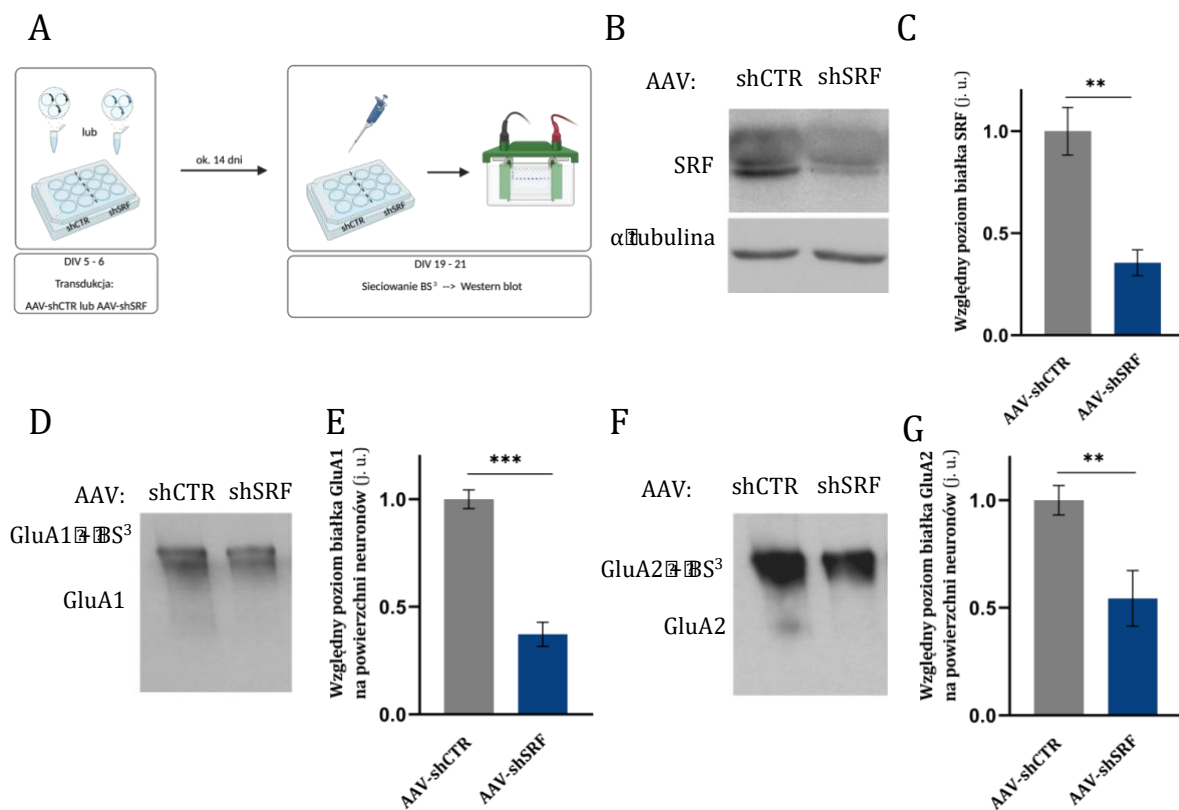
gęstości podjednostek GluA2 na powierzchni dendrytów neuronów shCTR (n = 19) i shSRF (n = 13) wykazało, iż komórki z obniżonym poziomem SRF (shSRF) charakteryzują się niższą gęstością GluA2 na powierzchni błon. \*\* p < 0,001; \*\*\* p < 0,0001; na wykresach (C, E) przedstawiono wartości średnie ± SEM. Wyniki uzyskano z trzech niezależnych hodowli neuronalnych.

#### 4.7. Ocena poziomu receptorów błonowych AMPA neuronów z obniżonym poziomem SRF: metody biochemiczne

W dalszej części badań, w celu dodatkowej weryfikacji otrzymanych wyników wskazujących na obniżenie poziomu podjednostek receptora AMPA na powierzchni neuronów z deplecją SRF, zastosowano dwa modele *in vitro* opierające się na wektorach wirusowych oraz odpowiednich technikach biochemicznych. Pierwszy z użytych modeli badawczych obejmował szczurze hodowle hipokampalne, do których w dniu piątym lub szóstym hodowli (DIV 5 – 6) wprowadzono wektory wirusowe AAV-shCTR lub AAV-shSRF. Wektory te zawierały sekwencje shRNA tożsame z tymi umieszczonymi na wektorach plazmidowych shCTR i shSRF oraz posiadały także wyrażany konstytutywnie gen białka zielonej fluorescencji (GFP). Pozwoliło to na wizualną weryfikację wysokiej efektywności transdukcji neuronów oraz braku wzmożonej śmiertelności zainfekowanych neuronów. W celu potwierdzenia obniżenia poziomu SRF na skutek wprowadzenia AAV-shSRF do komórek, neurony zlizowano, a następnie zastosowano technikę Western blot. Przeprowadzona immunodetekcja białka SRF pokazała, iż neurony AAV-shSRF charakteryzują się istotnie niższym poziomem SRF niż komórki kontrolne AAV-shCTR (rycina 15 B, C; p = 0,0028; test t-Studenta). A zatem, użyte wektory wirusowe AAV-shSRF w sposób efektywny obniżają poziom SRF.

Aby umożliwić detekcję frakcji receptorów znajdujących się na powierzchni neuronów oddzielnie od frakcji wewnątrzkomórkowej posłużono się techniką sieciowania molekularnego za pomocą odczynnika BS<sup>3</sup> (ang. *bis(sulfosuccinimidyl)suberate*). Zainfekowane neurony (w DIV 5 – 6) po osiągnięciu dojrzałości (DIV 19 – 21) inkubowano z odczynnikiem BS<sup>3</sup>, który nie penetruje błon komórkowych, więc nie przenika do cytoplazmy komórek, a zatem łączy się jedynie z białkami na powierzchni neuronów. Dzięki temu, po zlizowaniu komórek

i przeprowadzeniu rozdziału elektroforetycznego białek w warunkach denaturujących możliwe jest rozróżnienie białek pochodzących z frakcji wewnątrzkomórkowej (o typowej dla danego białka masie cząsteczkowej, wyznaczonej na żelu dzięki zastosowaniu znanego standardu mas cząsteczkowych) od białek znajdujących na powierzchni błon komórkowych. Tak przeprowadzona analiza poziomu podjednostek receptora AMPA: GluA1 i GluA2 wykazała, że poziom białek powierzchniowych różni się pomiędzy badanymi wariantami neuronów. Poziom podjednostki GluA1 na powierzchni neuronów (rycina 15 D, E) wyniósł  $0,37 \pm 0,05$  dla AAV-shSRF (wartość względna;  $n = 8$ ) w porównaniu do wariantu AAV-shCTR ( $1,00 \pm 0,04$ ;  $n = 8$ ), co stanowi istotny statystycznie spadek ( $p < 0,0001$ ; test t-Studenta). Podobnie analiza poziomu GluA2 na powierzchni neuronów (Rycina 15 F, G) ujawniła, że neurony AAV-shSRF z deplecją SRF mają istotnie niższy poziom tych podjednostek receptora AMPA na powierzchni (wartość względna:  $0,54 \pm 0,13$ ;  $n = 8$ ) w porównaniu do komórek kontrolnych AAV-shCTR ( $1,00 \pm 0,068$ ;  $n = 8$ ;  $p = 0,0076$ ; test t-Studenta).



**Rycina 15. Obniżenie poziomu SRF za pomocą AAV-shSRF prowadzi do spadku poziomu podjednostek GluA1 i GluA2 receptora AMPA na powierzchni błon komórkowych neuronów, co zostało wykazane metodami biochemicznymi.**

**(A)** Uproszczony schemat eksperymentu. Szczurze neurony hipokampalne transdukowano AAV-shCTR lub AAV-shSRF w dniu piątym lub szóstym (DIV 5 – 6) hodowli *in vitro*. Analizę poziomu białek powierzchniowych przeprowadzono w dojrzałych neuronach (DIV 19 – 21). **(B, C)** Porównanie poziomu SRF dla neuronów AAV-shCTR i AAV-shSRF. Analiza Western blot wykazała, iż komórki AAV-shSRF (n = 4) mają istotnie niższy poziom białka SRF niż komórki AAV-shCTR (n = 4). **(D, E)** Analiza poziomu białka GluA1 na powierzchni neuronów. Za pomocą metody sieciowania molekularnego przy użyciu odczynnika BS<sup>3</sup> oraz techniki Western blot wykazano, iż komórki AAV-shSRF (n = 8) mają istotnie niższy poziom podjednostek GluA1 na powierzchni komórek (GluA1 + BS<sup>3</sup>) niż neurony kontrolne AAV-shCTR (n = 8). **(F, G)** Weryfikacja poziomu białka GluA2 na powierzchni neuronów. Niski poziom SRF w neuronach prowadzi do obniżenia poziomu podjednostki GluA2 (GluA2 + BS<sup>3</sup>) na powierzchni komórek AAV-shSRF (n = 8) w odniesieniu do poziomu obserwowanego na powierzchni neuronów AAV-shCTR (n = 8). \*\* p < 0,001; \*\*\* p < 0,0001; na wykresach (C, E, G) przedstawiono wartości średnie ± SEM. Wyniki uzyskano z co najmniej trzech niezależnych hodowli neuronalnych

#### 4.8. Ocena poziomu receptorów błonowych AMPA w alternatywnym modelu deplecji SRF

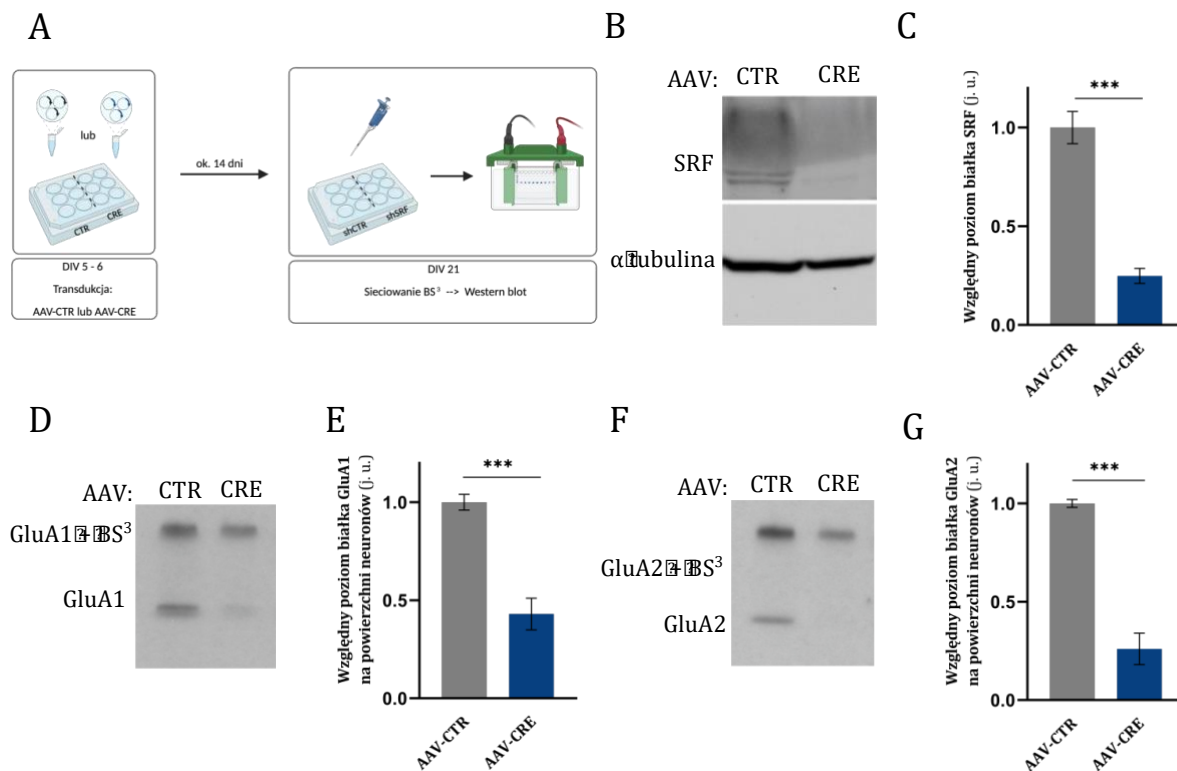
Badania *in vitro* z zastosowaniem szczurzych hodowli hipokampalnych pokazują, iż deplecja SRF wpływa na obniżenie poziomu wybranych podjednostek receptora glutaminianu na powierzchni dendrytów tych komórek oraz zaburza ich właściwości elektrofizjologiczne. Dodatkowo postanowiono upewnić się, czy obserwowane wyniki są niezależne od przyjętego modelu badawczego, w szczególności metody deplecji SRF z zastosowaniem techniki interferencji RNA (shRNA). W tym celu zaprojektowano eksperyment, w którym obniżono poziom SRF w neuronach na drodze delecji *Srf* za pomocą rekombinazy Cre. Założono pierwotne dysocjowane hodowle hipokampalne z osesków P 0 myszy *Srf<sup>f/f</sup>* (B6.129S6-Srf<sup>tm1Rmn</sup>/J), u których fragment promotora oraz eksonu 1 genu *Srf* zostały oflankowane sekwencjami loxP. Następnie w dniu piątym lub szóstym hodowli (DIV 5 – 6) komórki poddawano infekcji wektorami wirusowymi AAV-CTR (wektor kontrolny AAV-CaMKII $\alpha$ \_mCherry) lub AAV-CRE (AAV-CaMKII $\alpha$ \_CRE). W modelu prowadzącym do obniżenia poziomu SRF zastosowano wektor wirusowy, w którym gen rekombinazy Cre znajduje się pod kontrolą promotora dla podjednostki  $\alpha$  kinazy II zależnej od jonów wapnia i kalmoduliny (CaMKII $\alpha$ ). Umożliwia to delecję genu *Srf* w obecności rekombinazy Cre, która specyficznie rozpoznaje sekwencje loxP.

Aby proces delecji mógł zajść efektywnie transdukcja neuronów musi być przeprowadzona w momencie, gdy aktywność transkrypcyjna CaMKII $\alpha$  jest już obserwowana na odpowiednio wysokim poziomie. Jest to zgodne z danymi uzyskanymi w toku prowadzonych badań (analiza poziomu białka CaMKII $\alpha$

w hipokampach myszy w rozwoju osobniczym rycina 7 A), z których wynika, iż w P 0 białko CaMKII $\alpha$  nie jest jeszcze wykrywane, natomiast w P 7 jego poziom znacznie wzrasta, tak by w P 14 osiągnąć wartość zbliżoną do poziomu CaMKII $\alpha$  w dalszych okresach życia. Na podstawie tych danych wyciągnięto wnioski, iż transdukcja w DIV 5 lub DIV 6 będzie wiązała się z dostatecznie wysoką transkrypcją genu rekombinazy Cre zależną od natywnej aktywności promotora CaMKII $\alpha$ , a jednocześnie umożliwi delecję *Srf* zanim zakończy się intensywny okres dojrzewania kolców dendrytycznych. Efektywność obniżenia poziomu SRF zwalidowano za pomocą techniki Western blot (rycina 9B, C).

W celu sprawdzenia poziomu receptorów powierzchniowych w dojrzałych neuronach, ponownie zastosowano technikę sieciowania molekularnego z BS<sup>3</sup> oraz analizę Western Blot uzyskanych lizatów. Ocena poziomu podjednostki GluA1 receptora AMPA (Rycina 9 D, E) wskazała na jego obniżenie na powierzchni komórek AAV-CRE ( $0,43 \pm 0,08$ ; wartość względna;  $n = 5$ ) w odniesieniu do neuronów kontrolnych AAV-CTR ( $1,00 \pm 0,04$ ;  $n = 5$ ; test t-Studenta;  $p = 0,0002$ ). Analogiczny efekt obniżenia poziomu SRF zaobserwowano w kontekście podjednostki GluA2 receptora AMPA: względny poziom GluA2 na powierzchni neuronów AAV-CRE ( $n = 5$ ) wyniósł  $0,26 \pm 0,08$  w odniesieniu do komórek kontrolnych (AAV-CTR:  $n = 5$ ;  $1,00 \pm 0,02$ ;  $p < 0,0001$ ; test t-Studenta).

Podsumowując, niski poziom SRF na etapie rozwoju kolców dendrytycznych prowadzi do obniżenia poziomu receptorów AMPA, zarówno podjednostki GluA1 jak i GluA2, wbudowanych w błonę tych komórek. Jest to efekt obserwowany niezależnie od przyjętego modelu badawczego *in vitro* (pierwotne hodowle hipokampalne szczurze lub mysie, obniżenie poziomu SRF za pomocą techniki interferencji RNA lub delekcji *Srf* za pomocą techniki rekombinacji) czy metody detekcji (metoda immunocytochemiczna lub metody biochemiczne).



**Rycina 16. Delecja *Srf* powoduje spadek poziomu podjednostki GluA1 i GluA2 receptora AMPA na powierzchni neuronów *Srf*<sup>-/-</sup> AAV-CRE.**

**(A)** Uproszczony schemat doświadczenia. Dysocjowane hodowle mysich neuronów hipokampalnych *Srf*<sup>-/-</sup> poddano transdukcji w dniu piątym lub szóstym hodowli (DIV 5 – 6). Komórki zlizowano i poddano analizie ok. dnia dwudziestego hodowli *in vitro* (DIV 19 – 20). **(B, C)** Ocena poziomu białka SRF w neuronach *Srf*<sup>-/-</sup> na skutek transdukcji neuronów wektorami wirusowymi AAV-CTR lub AAV-CRE. Analiza Western blot wykazała znaczący spadek poziomu białka SRF w neuronach AAV-CRE (n = 8) w porównaniu do komórek AAV-CTR (n = 8). **(D, E)** Porównanie poziomów podjednostek receptora AMPA na powierzchni neuronów wykazało, iż neurony *Srf*<sup>-/-</sup> zainfekowane AAV-CRE (n = 8) mają istotnie niższy poziom podjednostki GluA1 w porównaniu do neuronów AAV-CTR (n = 8) **(F, G)** oraz niższy poziom podjednostki GluA2 na powierzchni komórek (AAV-CTR: n = 5; AAV-CRE: n = 5). \*\*\* p < 0,0001; na wykresach (C, E, G) przedstawiono wartości średnie ± SEM. Wyniki uzyskano z co najmniej trzech niezależnych hodowli neuronalnych.

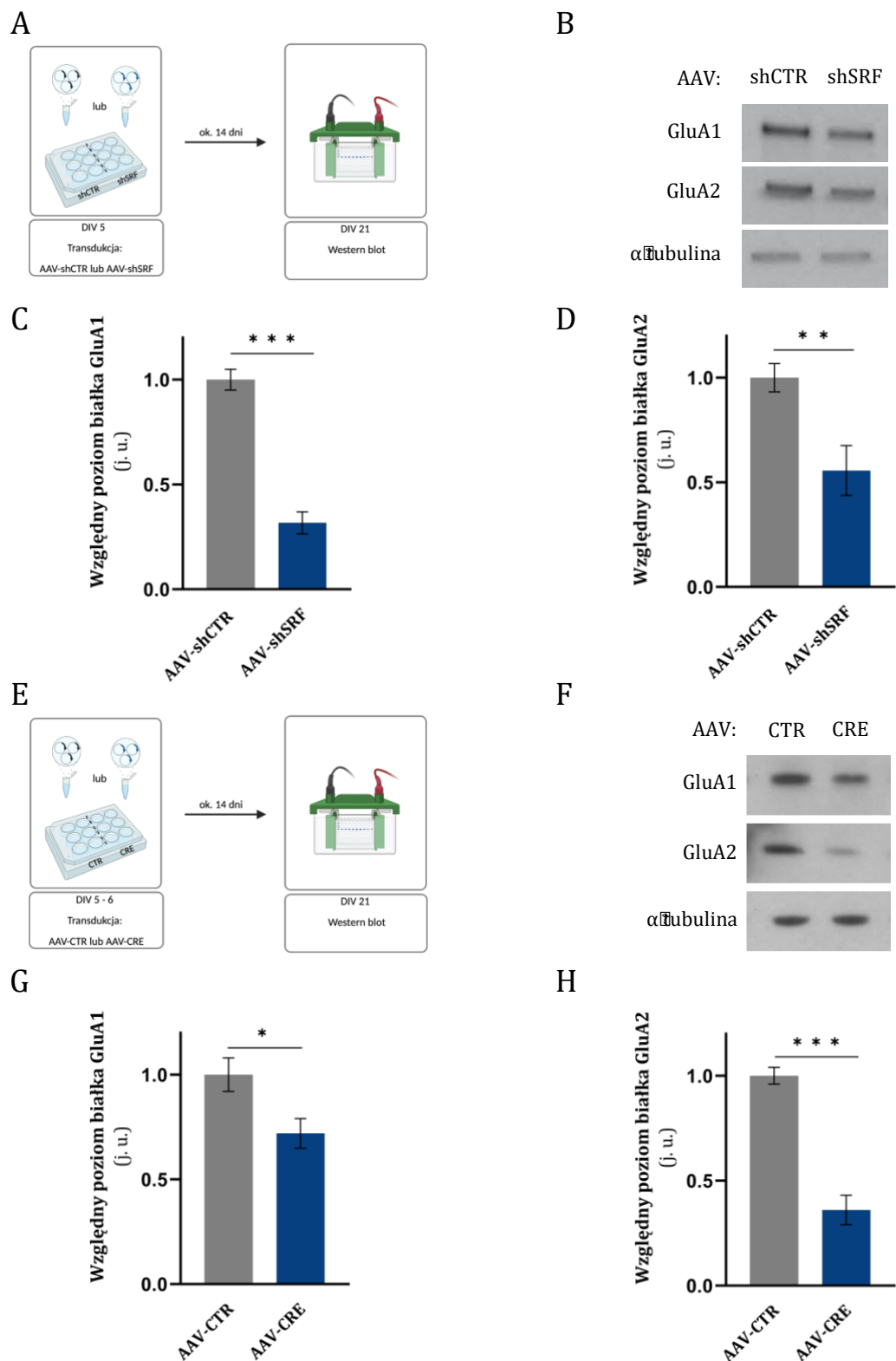
#### 4.9. Zbadanie czy zmiany w poziomie podjednostek receptora AMPA są regulowane przez transkrypcję zależną od SRF

Powyższe wyniki jasno wskazują na zależność pomiędzy poziomem czynnika transkrypcyjnego SRF a ilością wybranych podjednostek receptorów glutaminianu na błonach komórek neuronalnych. Zadano zatem pytanie czy obserwowana korelacja

jest wynikiem zależnej od SRF transkrypcji genów kodujących te podjednostki. W celu weryfikacji tej hipotezy, postanowiono sprawdzić jak deplecja SRF wpływa na ogólny poziom receptorów AMPA w neuronach hipokampalnych *in vitro*. Szczurze neurony infekowano w dniu piątym hodowli (DIV 5) wektorami wirusowymi AAV-shSRF ( $n = 8$ ) lub w wariancie kontrolnym AAV-shCTR ( $n = 8$ ), a następnie lizowano w dniu dwudziestym pierwszym (DIV 21). Otrzymane lizaty poddano procedurze Western blot.

Analiza ta wykazała obniżony ogólny poziom podjednostek GluA1 receptora AMPA w komórkach z deplecją SRF względem poziomu GluA1 w wariancie kontrolnym (AAV-shCTR:  $1,00 \pm 0,05$ ; AAV-shSRF: wartość względna:  $0,32 \pm 0,05$ ;  $p < 0,0001$ ; test t-Studenta). Podobnie, porównanie dla podjednostki GluA2 pokazało, że całkowity jej poziom w komórkach AAV-shSRF jest niższy (wartość względna:  $0,56 \pm 0,12$ ) niż w neuronach AAV-shCTR ( $1,00 \pm 0,07$ ;  $p = 0,0061$ ; test t-Studenta).

Podobnie jak w przypadku analizy poziomu receptorów znajdujących się na powierzchni komórek, postanowiono zweryfikować uzyskane wyniki wykorzystując model badawczy oparty na pierwotnych hodowlach neuronalnych wyprowadzonych z komórek hipokampów myszy *Srf<sup>f/f</sup>*. W tym celu w dniu piątym lub szóstym hodowli *in vitro* (DIV 5- 6) do komórek wprowadzano wektory wirusowe AAV-CTR lub AAV-CRE, a następnie w dniu dwudziestym pierwszym (DIV 21) poddawano neurony lizie. Otrzymany materiał wykorzystywano w technice Western blot. Analiza całkowitego poziomu podjednostki GluA1 wykazała, że jest on obniżony w komórkach z delecją SRF (AAV-CRE: wartość względna:  $0,72 \pm 0,07$ ;  $n = 8$ ) w odniesieniu do komórek kontrolnych (AAV-CTR:  $1,00 \pm 0,08$ ,  $n = 8$ ;  $p = 0,0202$ ; test t-Studenta). Wyniki analizy poziomu podjednostki GluA2 wykazały spadek poziomu tej podjednostki receptora AMPA w neuronach z obniżonym poziomem SRF w porównaniu do komórek AAV-CTR (AAV-CTR:  $1,0 \pm 0,04$ ; AAV-CRE:  $0,36 \pm 0,07$ ,  $n = 5$ ;  $p < 0,0001$ ; test t-Studenta).



**Rycina 17. Obniżony poziom SRF w neuronach prowadzi do spadku całkowitego poziomu białek GluA1 i GluA2.**

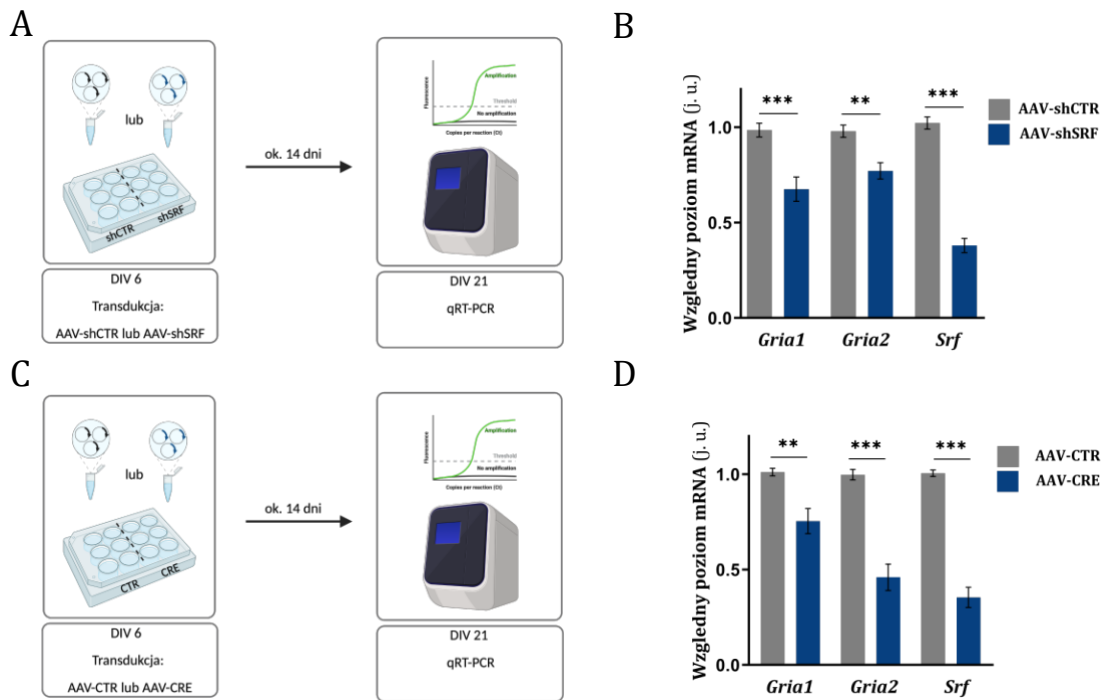
**(A)** Uproszczony schemat doświadczenia. Szczurze pierwotne hodowle hipokampalne infekowano wektorami wirusowymi, odpowiednio: AAV-shCTR lub AAV-shSRF w dniu piątym (DIV 5). W DIV 21 neurony lizowano i poddawano analizie Western blot. **(B, C)** Za pomocą

techniki Western blot wykazano, iż szczurze neurony hipokampalne zainfekowane AAV-shSRF (n = 8) mają niższy całkowity poziom białka podjednostki GluA1(AAV-shCTR: n = 8) **(D)** i podjednostki GluA2 receptora AMPA w porównaniu do neuronów AAV-shCTR (n = 8; AAV-shSRF: n = 8). **(E)** Uproszczony schemat doświadczenia. Pierwotne hodowle hipokampalne uzyskane z myszy *Srf<sup>fl/fl</sup>* infekowano wektorami wirusowymi AAV-CTR lub AAV-CRE w dniu piątym lub szóstym hodowli (DIV 5 - 6). W DIV 21 neurony lizowano i poddawano analizie Western blot. **(F, G)** Porównanie poziomu białek podjednostek receptora AMPA wykazało, iż neurony zainfekowane AAV-CRE (n = 8) mają niższy poziom białka GluA1 w porównaniu do neuronów AAV-CTR (n = 8) **(H)** oraz mają niższy poziom białka GluA2 (AAV-CTR: n = 8; AAV-CRE: n = 8). \* p < 0,05; \*\* p < 0,001; \*\*\* p < 0,0001; na wykresach (C, D, G, H) przedstawiono wartości średnie ± SEM. Wyniki uzyskano z trzech niezależnych hodowli neuronalnych.

Uzyskane wyniki pozwalają na wyciągnięcie wniosków, iż niski poziom SRF w neuronach na etapie rozwoju kolców dendrytycznych *in vitro* wpływa na obniżenie poziomu podjednostki GluA1 i GluA2 receptora AMPA, zarówno w skali całej komórki jak i receptorów wbudowanych w błonę komórkową. Fenomen ten może być regulowany na kilku poziomach, np.: na poziomie transkrypcji, translacji czy degradacji białek. Dlatego też postanowiono sprawdzić czy poziom podjednostek receptora AMPA zależy od aktywności transkrypcyjnej SRF. W tym celu przeprowadzono ilościową reakcję łańcuchową polimerazy (ang. *quantitative polymerase chain reaction*, qRT-PCR) i wyznaczono poziom mRNA dla GluA1 (kodowanego przez gen *Gria1*) i GluA2 (kodowanego przez gen *Gria2*) wykorzystując oba modele *in vitro* opisane powyżej. W szczurzych neuronach AAV-shSRF (n = 4) odnotowano znaczący spadek poziomu mRNA zarówno dla *Gria1* jak i dla *Gria2* (rycina 18 B; p = 0,0286 dla *Gria1* i *Gria2*) w porównaniu do neuronów kontrolnych AAV-shCTR (n = 4). Wykazano także spadek poziomu mRNA *Srf* w wyniku transdukcji neuronów AAV-shSRF (AAV-shCTR vs. AAV-shSRF: 1,00 ± 0,03 vs. 0,38 ± 0,04; p < 0,0001; test Manna-Whitneya).

Podobnie w mysich komórkach infekowanych AAV-CRE (n = 6) spadek poziomu SRF (Rycina 18 D; mRNA *Srf*: AAV-CTR vs. AAV-CRE: 1,00 ± 0,02 vs. 0,385 ± 0,05; p = 0,0002) korelował z obniżeniem ilości mRNA dla *Gria1* (p = 0,0043; test Manna-Whitneya) oraz dla *Gria2* (p = 0,0022; test t-Studenta) w odniesieniu do neuronów transdukowanych AAV-CTR (n = 6).





**Rycina 18. Obniżenie poziomu SRF na wczesnych etapach rozwoju prowadzi do spadku poziomu ekspresji genów *Gria1* i *Gria2* kodujących podjednostki receptora AMPA.**

**(A)** Uproszczony schemat doświadczenia. Szczurze pierwotne hodowle hipokampalne infekowano wektorami wirusowymi AAV-shCTR lub AAV-shSRF w dniu szóstym hodowli (DIV 6). W DIV 21 neurony lizowano i poddawano analizie qRT-PCR. **(B)** Jak wykazała analiza wyników qRT-PCR, deplecja SRF za pomocą AAV-shSRF obniża poziom ekspresji genów kodujących białka podjednostek receptora AMPA: *Gria1* (kodujący GluA1) oraz *Gria2* (kodujący GluA2) w szczurzych neuronach hodowanych *in vitro*. **(C)** Uproszczony schemat doświadczenia. Pierwotne hodowle hipokampalne z myszy *Srf<sup>ff/ff</sup>* infekowano wektorami wirusowymi AAV-CTR lub AAV-CRE w dniu szóstym hodowli (DIV 6). W DIV 21 neurony lizowano i poddawano analizie qRT-PCR. **(D)** Zgodnie z wynikami analizy qRT-PCR, poziom mRNA dla genu *Gria1* i *Gria2* jest niższy w neuronach *Srf<sup>ff/ff</sup>* transdukowanych AAV-CRE w porównaniu do neuronów transdukowanych AAV-CTR. \*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ ; na wykresach (B, D) przedstawiono wartości średnie  $\pm$  SEM. Wyniki uzyskano z trzech niezależnych hodowli neuronalnych.

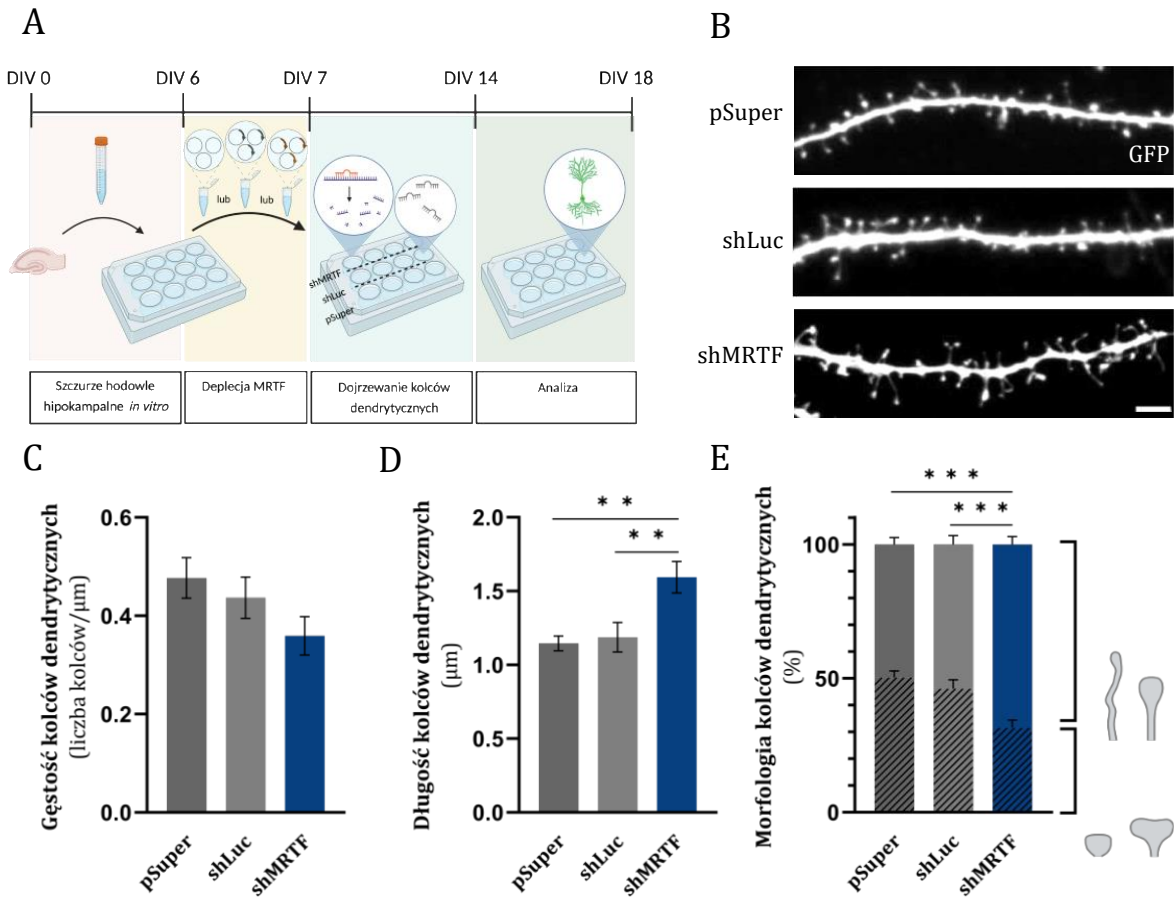
#### 4.10. Sprawdzenie czy zmiany w kształcie kolców dendrytycznych są regulowane przez aktywność kofaktorów MRTF

W kolejnym etapie pracy zadano sobie pytanie czy obserwowany efekt niskiego poziomu SRF na budowę kolców dendrytycznych jest zależny od aktywności jego kofaktorów z rodziny MRTF. Dane literaturowe (zobacz paragraf 1.9.1. niniejszej pracy) wskazują na związek kofaktorów SRF: MRTF-A i MRTF-B z chorobami

neurorozwojowymi. Ponieważ w obrazie licznych chorób neurorozwojowych obserwuje się nieprawidłowości w budowie kolców dendrytycznych, postanowiono sprawdzić jak deplecja MRTF wpłynie na morfologię wypustek dendrytycznych. Zastosowano model *in vitro*, polegający na obniżeniu poziomu badanego białka za pomocą wektora plazmidowego kodującego krótkie RNA o strukturze spinki do włosów (shRNA), w tym wypadku wektora plazmidowego pLKO.1-shMRTF (shMRTF). Jako wektorów kontrolnych użyto plazmidu pSuper lub pTRIP-shLuc (shLuc). Neurony ze wszystkich wariantów eksperymentalnych kotransfekowano plazmidem pSynapsin-GFP niosącym gen białka zielonej fluorescencji (GFP), aby umożliwić identyfikację stransfekowanych komórek i wizualizację ich kolców dendrytycznych. Specyficzność i efektywność zastosowanych konstruktyw została wcześniej zwalidowana (Kalita i wsp., 2006; Kuzniewska i wsp., 2013, Kaneda i wsp., 2018). Szczurze neurony hipokampalne stransfekowano po sześciu dniach od założenia hodowli (DIV 6), czyli w okresie poprzedzającym zachodzenie intensywnej zmiany w strukturze kolców dendrytycznych związanych z ich dojrzewaniem. Komórki utrwalono (DIV 18) i poddano analogicznej analizie, jak w przypadku tej wykonanej dla neuronów shSRF i shCTR.

Pierwszym z badanych parametrów była gęstość kolców dendrytycznych, której analiza wykazała, że liczba kolców dendrytycznych na jeden  $\mu\text{m}$  długości dendrytu w neuronach shMRTF nie różni się od gęstości kolców dendrytycznych wyznaczonej dla komórek stransfekowanych wektorem kontrolnym pSuper lub shLuc (rycina 19 C; pSuper:  $n = 16$ ; shLuc:  $n = 11$ ; shMRTF:  $n = 10$ ;  $H = 3,975$ ;  $p = 0,137$ ; test Kruskala-Wallisa). Następnie sprawdzono wpływ obniżonego poziomu MRTF na długość kolców dendrytycznych (rycina 19 D). Średnia długość wypustek dendrytów w wariancie z shMRTF była istotnie statystycznie większa niż w grupach kontrolnych pSuper i shLuc ( $H = 12,67$ ;  $p = 0,0018$ ; test Kruskala-Wallisa). Nie odnotowano różnic pomiędzy średnimi długościami kolców dendrytycznych neuronów w grupach kontrolnych: pSuper i shLuc (pSuper vs. shLuc  $p > 0,999$ ; pSuper vs. shMRTF  $p = 0,0028$ ; shLuc vs. shMRTF  $p = 0,0098$ ; test *post hoc* Dunna). Analiza kształtów kolców dendrytycznych wykazała, iż w grupie neuronów z deplecją MRTF obserwowano przesunięcie częstości występowania w kierunku kolców dendrytycznych o niedojrzałej morfologii (filopodialnych i długich). Oznacza to, iż neurony shMRTF mają mniej kolców dendrytycznych o morfologii dojrzałej (rycina

19 E;  $p < 0,001$ ;  $q < 0,0001$ ; współczynnik FDR: Benjamini, Krieger, Yekutieli) w porównaniu do komórek pSuper i shLuc. Nie odnotowano różnic w kształcie kolców dendrytycznych neuronów z grup kontrolnych pSuper i shLuc ( $\chi^2 = 0,3205$ ,  $df = 1$ ;  $p = 0,5713$ ; test  $\chi^2$ ).



**Rycina 19. Deplecja MRTF, będących kofaktorami SRF, przyczynia się do zmian w morfologii kolców dendrytycznych.**

**(A)** Schemat doświadczenia. Hodowle neuronów hipokampalnych pozyskanych z osesków P0 szczurów szczepu Wistar transfekowano w dniu szóstym hodowli (DIV 6) jednym z dwóch wektorów kontrolnych: pSuper lub shLuc, albo wektorem plazmidowym shMRTF w celu obniżenia poziomu białek MRTF. Morfologię kolców dendrytycznych badano w osiemnastym dniu hodowli *in vitro* (DIV 18). **(B)** Przykładowe zdjęcia obrazujące kolce dendrytyczne neuronów pSuper, shLuc i shSRF. Skala 2  $\mu\text{m}$ . **(C)** Brak istotnie statystycznych różnic w liczbie kolców dendrytycznych przypadających na 1  $\mu\text{m}$  dendrytu pomiędzy neuronami pSuper ( $n = 16$ ), shLuc ( $n = 11$ ) i shMRTF ( $n = 10$ ). **(D)** Analiza morfologii kolców dendrytycznych wykazała, że neurony shMRTF mają znacznie dłuższe kolce dendrytyczne niż neurony z grup kontrolnych pSuper i shLuc. **(E)** Porównanie liczby kolców dendrytycznych o morfologii niedojrzałej i dojrzałej ukazało, że komórki z niskim poziomem MRTF (shMRTF) mają więcej kolców dendrytycznych filopodialnych i długich niż neurony z grup kontrolnych pSuper i shLuc. \*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ ; na wykresach (C, D, E) przedstawiono wartości średnie  $\pm$  SEM. Wyniki uzyskano z trzech niezależnych hodowli neuronalnych.

## 5. Dyskusja

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań wskazujące, iż czynnik transkrypcyjny SRF jest niezbędny do prawidłowego dojrzewania kolców dendrytycznych w rozwoju. Pokazano, iż poziom białka SRF i jego izoform zmienia się w toku rozwoju postnatalnego mózgu myszy oraz że wzrost transkrypcji genów zależnej od SRF koreluje z okresem intensywnego dojrzewania kolców dendrytycznych *in vitro*. Wyniki badań pokazują, iż obniżenie poziomu białka SRF zaburza proces dojrzewania kolców dendrytycznych zarówno w odniesieniu do ich struktury, jak i funkcji synaps.

Wcześniejsze badania koncentrowały się głównie na scharakteryzowaniu roli SRF w dojrzałym mózgu. Opublikowane wyniki w kontekście rozwoju osobniczego dotyczyły w znacznej mierze okresu prenatalnego i głównie roli SRF w tkankach mięśniowych. Zaprezentowane w niniejszej pracy badania po raz pierwszy dowodzą istotnej funkcji SRF w dojrzewaniu połączeń nerwowych w młodym, rozwijającym się mózgu.

### 5.1. Zastosowane metody i techniki badawcze

#### 5.1.1. Myszy transgeniczne jako model badawczy dojrzewania kolców dendrytycznych w rozwoju

Na powstawanie i dojrzewanie połączeń synaptycznych znaczący wpływ mają czynniki zewnątrzkomórkowe, jak otaczająca macierz czy obecność innych nieneuronalnych komórek i oddziaływania między nimi. Dlatego też cennym źródłem wiedzy na temat procesów dojrzewania kolców dendrytycznych są badania prowadzone w modelach o wyższym stopniu złożoności niż modele *in vitro*. W niniejszej pracy, w celu zbadania jaką rolę pełni białko SRF w procesie dojrzewania kolców dendrytycznych we wczesnych etapach rozwoju postnatalnego posłużono się analizami wykonanymi na myszach szczepu *Srf<sup>f/f</sup>CaMKCreERT2* (Nader i in., 2019). Są to zwierzęta transgeniczne, u których wprowadzono gen rekombinazy Cre połączony z fragmentem ludzkiego genu receptora dla estrogenu oraz posiadające sekwencje loxP otaczające fragment genu *Srf*. Zaletą indukowanych modeli zwierzęcych jest możliwość dokładnego kontrolowania przez eksperymentatora miejsca oraz punktu w czasie, w którym dojdzie do delekcji genu. W systemie wykorzystanym w niniejszej pracy

specyficzność co do *locus* zajścia delecji otrzymano dzięki umieszczeniu genu rekombinazy Cre pod kontrolą typowo neuronalnego promotora genu podjednostki CaMKII $\alpha$  (Erdmann i in., 2007). Translokacja rekombinazy Cre z cytoplazmy do jądra komórkowego, umożliwiającą wycięcie fragmentu nici DNA otoczonej sekwencjami loxP zachodzi na skutek związania przez receptor estrogenu (lub jego analogu, tu 4-hydroksytamoksyfenu; 4-OHT). Dzięki temu możliwa jest dokładna kontrola momentu w rozwoju zwierzęcia, na którym delecja zostanie zaindukowana poprzez podanie 4-OHT.

Ponieważ celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu niskiego poziomu SRF we wczesnym okresie rozwoju osobniczego na dojrzewanie kolców dendrytycznych, należało zaindukować delecję genu *Srf* na etapie poprzedzającym te zmiany rozwojowe. U gryzoni okres intensywnego dojrzewania kolców dendrytycznych rozpoczyna się ok. 7. – 10. dnia życia, tak że u ok. trzytygodniowych osobników obserwuje się kolce dendrytyczne o budowie typowej dla osobników dorosłych (Runge i in., 2020). Dlatego też postanowiono zaindukować delecję *Srf* rozpoczynając podanie 4-OHT od dnia piątego po narodzinach myszy. Jednym z wyzwań związanych z prowadzeniem badań naukowych na zwierzętach będącymi indukowanymi cKO są trudności z efektywnym obniżeniem poziomu badanych białek. Wiąże się to z koniecznością takiego doboru podawanych substancji i ich dawek, aby mogły one pokonać barierę krew-mózg i dotrzeć do badanych tkanek, jednocześnie powodując możliwie mało skutków ubocznych. W badaniach opisanych w niniejszej pracy zdecydowano się na dootrzewnowe iniekcje po 0,25 mg 4-OHT w dniu 5., 6. i 7. po narodzinach myszy. Były to warunki wyznaczone w badaniach pilotażowych, które wiązały się z istotnym obniżeniem poziomu białka SRF, przy akceptowalnej przeżywalności zwierząt. Należy tutaj zaznaczyć, że ocena stopnia deplecji białka w modelu zwierzęcym jest możliwa dopiero po uśmierceniu osobnika, co stanowi wadę tego systemu badawczego.

#### 5.1.2. Dysocjowane hodowle hipokampalne *in vitro* jako model badawczy dojrzewania kolców dendrytycznych w rozwoju

Opisane w niniejszej pracy badania zostały przeprowadzone nie tylko z zastosowaniem modelu *in vivo* lecz także modeli eksperymentalnych *in vitro*, pierwotnych dysocjowanych hodowli komórek hipokampa szczura lub myszy. Oparcie

w dużej mierze części eksperymentalnej pracy na badaniach prowadzonych *in vitro* pozwoliło na znaczne zredukowanie liczby zwierząt wykorzystanych w doświadczeniach oraz ograniczenie ich cierpienia. Ponadto, dysocjowane hodowle neuronalne są dobrze scharakteryzowanym i szeroko stosowanym modelem do badania procesów plastyczności kolców dendrytycznych. Z danych literaturowych wiadomo, iż kolce dendrytyczne komórek piramidowych hodowanych *in vitro* dojrzewają ok 7. – 14. dnia hodowli (Sala i in., 2001; Yogev i Shen, 2017). Obniżenie poziomu białka SRF lub MRTF na wczesnych etapach hodowli *in vitro* pozwoliło na zbadanie wpływu niskiego poziomu tych białek na proces dojrzewania kolców dendrytycznych w rozwoju. Dodatkową zaletą modeli *in vitro* jest ich jednorodność biologiczna. Pierwotne hodowle neuronalne zakładane z komórek hipokampów pozyskanych z osobników szczura lub myszy w dniu pierwszym po narodzinach (P 0) zawierają określone typy komórek. Ponadto, *hodowle in vitro* są modelem doświadczalnym o wysokiej powtarzalności pomiędzy powtórzeniami biologicznymi. Stanowi to znaczącą przewagę nad badaniami prowadzonymi *in vivo*, gdzie obserwuje się często istotne różnice międzyosobnicze. Także warunki hodowli w przypadku neuronów *in vitro* są zdecydowanie bardziej powtarzalne i łatwiejsze do kontrolowania niż w przypadku żywych zwierząt.

Mniejsza złożoność systemu eksperymentalnego może stanowić zarówno jego zaletę jak i wadę. Neurony hodowane *in vitro* nie wytwarzają sieci neuronowych i tak rozbudowanych połączeń międzykomórkowych jak ma to miejsce w mózgach ssaków (Kelava i Lancaster, 2016). Pomimo, iż powstają dobrze funkcjonujące elementy pre- i postsynaptyczne, to schemat synapsy jest uproszczony w porównaniu do tego występującego w żywym organizmie. Ponadto, zahamowanie wzrostu komórek glejowych w hodowlach *in vitro* (poprzez dodanie do pożywki arabinozydu cytozyny) powoduje, że nie odzwierciedlają one ilościowych relacji pomiędzy typami komórek obserwowanych w mózgu. Należy zaznaczyć także, iż dysocjowane hodowle neuronalne *in vitro* są systemem dwuwymiarowym, a nie strukturą trójwymiarową jaką jest mózg, co może wpływać na morfologię i rozwój komórek. Dodatkowo obserwuje się znaczne skrócenie okresu życia neuronów hodowlanych *in vitro* w porównaniu do komórek *in vivo*.

Mimo, iż system hodowli komórek neuronalnych *in vitro* ma swoje wady, jego znaczącą zaletą jest łatwość przeprowadzania eksperymentów na komórkach.

W niniejszej pracy także wykorzystano tę właściwość, co umożliwiło stosunkowo łatwe w przeprowadzeniu manipulacje genetyczne (transfekcje i transformacje neuronów) czy stymulacje komórek (dodanie gabazyny do pożywki w celu wywołania długotrwałego pobudzenia neuronalnego). Wykorzystanie badań z zastosowaniem pierwotnych dysocjowanych hodowli *in vitro* umożliwiło opis zmian zachodzących w neuronach zarówno na poziomie ich struktury (metody mikroskopowe), składu białkowego (metody biochemiczne) jak i funkcji (metody elektrofizjologiczne).

### 5.1.3. Technika interferencji RNA jako metoda obniżenia poziomu badanego białka

W celu obniżenia poziomu syntezy badanych białek posłużono się techniką interferencji RNA. Do komórek nerwowych wprowadzono za pomocą transfekcji lub transdukcji konstrukty kodujące małe interferujące RNA o strukturze szpilki do włosów, co umożliwiło specyficzną degradację odpowiednio mRNA SRF lub MRTF. Efektywność obniżenia poziomu SRF weryfikowano w neuronach transdukowanych wektorami wirusowymi AAV za pomocą techniki Western blot oraz przeprowadzając reakcje qRT-PCR. W przypadku komórek transfekowanych wektorami plazmidowymi podstawę oceny stopnia deplecji badanych białek stanowiły odpowiednie barwienia immunocytochemiczne. Zastosowana metoda pozwala na szybką weryfikację otrzymanego fenotypu komórek, jednak wiąże się z potencjalnymi efektami ubocznymi, wśród których wymienić można np. niespecyficzną odpowiedź interferonową czy efekt mikroRNA, skutkujący obniżeniem syntezy także innych niż badane białka (Bridge i in., 2003). Dlatego też w doświadczeniach opisanych w niniejszej pracy zadbano o uwzględnienie odpowiednich grup kontrolnych.

W modelu szczurzych dysocjowanych hodowli hipokampalnych, w których poziom SRF obniżono za pomocą shRNA (shSRF lub AAV-shSRF) grupę kontrolną stanowiły komórki, do których wprowadzono konstrukty zawierające tzw. „scrambled shRNA” (shCTR lub AAV-shCTR). Dzięki temu w każdym z badanych wariantów dochodziło do aktywacji szlaku RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*), co minimalizowało wpływ niespecyficznego oddziaływania shRNA (W. Xu i in., 2019). W badaniach wykorzystujących metodę interferencji RNA możliwą dodatkową kontrolą są eksperymenty przywracające funkcje (ang. *rescue experiment*). Mogą one polegać na wprowadzeniu do komórek dodatkowego wektora zawierającego cDNA badanego

białka tak zmodyfikowany, by był odporny na działanie shRNA. Jednak w przypadku, gdy badanym białkiem jest czynnik transkrypcyjny regulujący ekspresję wielu genów kluczowych dla prawidłowego funkcjonowania neuronów rozwiązanie to niesie ze sobą możliwość znaczących efektów ubocznych pozostających poza wpływem eksperymentatora. W pracy opublikowanej przez grupę prof. Pu (Guo i in., 2018) badającej rolę SRF w rozwoju kardiomiocytów odnotowano, iż nadekspresja SRF powoduje wzrost poziomu transkrypcji aż 1285 genów. Jednak geny te tylko w 1,7% pokrywają się z genami, których ekspresja jest obniżona w komórkach z delecją SRF. Powyższe dane wskazują, iż poziom SRF i jego aktywność muszą być utrzymane na odpowiednim, optymalnym poziomie co byłoby niezmiernie trudne do uzyskania w transfekowanych czy transdukowanych neuronach. Dodatkowo, konstrukty shCTR i shSRF stworzone w laboratorium prof. Herringa (Yin i in., 2006) są dobrze sprawdzonymi i efektywnymi narzędziami do badania wpływu obniżonego poziomu SRF na komórki. Dlatego też w badaniach opisanych w niniejszej rozprawie jako dodatkową metodę weryfikacji wyników uzyskanych z zastosowaniem shRNA skierowanego przeciwko mRNA SRF zastosowano kolejny model badawczy: pierwotne hodowle neuronów pozyskanych z hipokampów myszy szczepu *Srff/f*, transdukowane wektorem wirusowy zawierającym gen rekombinazy *Cre*.

Także w badaniach poświęconych roli aktywności SRF zależnej od jego kofaktorów z rodziny MRTF opisanych w niniejszej pracy wykorzystano technikę interferencji RNA do obniżenia poziomu białek MRTF-A i MRTF-B. W tym przypadku zdecydowano się zastosować dwa warianty kontrolne. Jednym z nich były komórki hipokampalne transfekowane wektorem plazmidowym kodującym shRNA skierowane przeciwko sekwencji RNA *lucyferazy*, a więc takie w których podobnie do komórek transfekowanych shMRTF dochodziło do aktywacji szlaku RISC. Drugą grupę kontrolną stanowiły neurony transfekowane plazmidem pSuper bez wstawki DNA, który jest często stosowany jako odniesienie w tego typu eksperymentach. Potwierdzeniem, iż oba przyjęte modele stanowiły odpowiednią grupę kontrolną stanowi fakt, iż wyniki analizy morfologii kolców dendrytycznych tych komórek nie wykazały różnic pomiędzy tymi dwoma grupami. Zarówno w odniesieniu do gęstości kolców dendrytycznych, jak ich długości czy ilości wypustek o dojrzałym kształcie.

We wszystkich eksperymentach *in vitro* opisanych w niniejszej pracy każda z badanych grup neuronów była poddawana tym samym procedurom, odpowiednio



transfekcji wektorami plazmidowymi metodą lipofekcji lub transdukcji wektorami wirusowymi AAV. Pozwoliło to na zminimalizowanie wpływu samej metody wprowadzenia wektorów do komórek na obserwowane różnice pomiędzy badanymi wariantami.

#### 5.1.4. System Cre/loxP jako metoda delecji badanego genu

System indukowanej delecji genów oparty na działaniu enzymu rekombinazy Cre rozpoznającej sekwencje loxP jest metodą szeroko stosowaną w badaniach z zakresu biologii molekularnej, zarówno w modelach *in vitro* jak i *in vivo*. W niniejszej pracy posłużono się tą techniką do obniżenia poziomu czynnika transkrypcyjnego SRF w neuronach hodowanych *in vitro*, jak również w modelu zwierzęcym.

W badaniach *in vitro* wykorzystano pierwotne hipokampalne hodowle uzyskane z myszy szczepu *Srff/f*, do których w piątym lub szóstym dniu hodowli (DIV 5 – 6) wprowadzono wektory wirusowe AAV-CaMKII $\alpha$ -CRE (AAV-CRE). W zastosowanej konstrukcji gen rekombinazy Cre znajduje się pod kontrolą natywnego promotora podjednostki CaMKII $\alpha$ . Jako model zwierzęcy do badania roli białka SRF w dojrzewaniu kolców dendrytycznych w rozwoju posłużyły myszy szczepu *Srff/fCaMKCreERT2*, pochodzące z krzyżowania osobników szczepu *Srff/f* z linią CaMKCreERT2 (nr szczepu: EM:02125; The European Mouse Mutant Archive; (Erdmann i wsp., 2007). Myszy szczepu *Srff/fCaMKCreERT2* posiadają gen rekombinazy Cre połączony z domeną wiążącą ligand ludzkiego receptora dla estrogenu, którego ekspresja jest zależna od natywnej aktywności promotora podjednostki CaMKII $\alpha$ . W tym modelu indukcja delecji *Srf* zachodzi na skutek podania 4-OHT. Jednak, podobnie jak w modelu *in vitro*, warunkiem koniecznym do zajścia efektywnej delecji genu *Srf* jest ekspresja rekombinazy Cre na odpowiednio wysokim poziomie, co jest zależne od aktywności promotora, pod kontrolą którego umieszczony jest gen rekombinazy. Z danych literaturowych wiadomo, iż mRNA *CaMKII $\alpha$*  jest praktycznie niewykrywane w hipokampie myszy w okresie prenatalnym, jednak jego poziom szybko wzrasta tak, że już po czterech dniach od narodzin (P 4) odnotowuje się znaczący poziom mRNA *CaMKII $\alpha$*  (Allen brain atlas: <https://developingmouse.brain-map.org/gene/show/12107>). Dodatkowo, analiza rozwojowych zmian endogennej ekspresji *CaMKII $\alpha$*  w mózgu szczura pokazała, iż białko CaMKII $\alpha$  nie jest jeszcze

wykrywane w hipokampach dwudniowych osobników (P 2), lecz jest już obecne w piątym dniu po narodzinach (P 5; Petralia i in., 2005; Roszkowska i in., 2022). Potwierdzają to analizy Western blot przeprowadzone na potrzeby niniejszej pracy, gdzie w hipokampach nowonarodzonych osesków myszy C57BL/6JCmd (P 0) nie wykryto białka CaMKII $\alpha$  lecz było ono obecne już u siedmiodniowych osobników (P 7). W badaniach przeprowadzonych przez Casanova i wsp. (Casanova i in., 2001) wykazano, iż ekspresja indukowalnej rekombinazy Cre znajdującej się pod kontrolą promotora CaMKII $\alpha$ , a zatem analogicznego systemu jak ten zastosowany w niniejszej pracy, jest wykrywana w hipokampach myszy od dnia trzeciego po narodzinach (P 3).

Podsumowując, przytoczone dane wskazują, iż zastosowanie rekombinazy Cre, której poziom zależy od endogennej aktywności promotora podjednostki CaMKII $\alpha$  stanowi odpowiedni model do badania roli SRF we wczesnych etapach rozwoju postnatalnego. Przeprowadzono analizy poziomu SRF w komórkach AAV-CRE (reakcje qRT-PCR oraz analizy Western blot) oraz w hipokampach myszy szczepu *Srff<sup>f</sup>/iCaMKCreERT2* (reakcje qRT-PCR oraz barwienie immunohistochemiczne). Ich wyniki potwierdziły, iż zastosowane modele badawcze pozwalają na indukcję delekcji *Srf* jeszcze przed rozpoczęciem okresu intensywnego dojrzewania synaps w rozwoju, czyli przed DIV 7 dla neuronów hodowanych *in vitro* (Papa i in., 1995; Sala i in., 2001) oraz przed P 10 – 14 w modelach zwierzęcych (Miller i Peters, 1981).

W doświadczeniach *in vitro* z wykorzystaniem pierwotnych hodowli hipokampalnych z myszy szczepu *Srff<sup>f</sup>/f* grupę kontrolną stanowiły neurony tej samej hodowli, do których wprowadzono wektor wirusowy AAV-CaMKII $\alpha$ -mCherry (AAV-CTR) kodujący gen białka reporterowego mCherry umieszczony również pod kontrolą promotora CaMKII $\alpha$ . Mając na uwadze fakt, iż długotrwała ekspresja rekombinazy Cre (tutaj ok. dwutygodniowa) potencjalnie może wiązać się z wystąpieniem niepożądanych efektów ubocznych, można przeprowadzić dodatkową kontrolę negatywną. Doświadczenie to polegałoby na transdukcji mysich neuronów hodowanych *in vitro* (pozyskanych z myszy o genotypie dzikim, tj. myszy szczepu C57BL/6, gdyż takie tło genetyczne mają osobniki *Srff<sup>f</sup>/f*) kontrolnym wektorem wirusowym lub wektorem niosącym gen rekombinazy *Cre* (AAV-CRE). Po około dwóch tygodniach od transdukcji, utrwalone komórki należałoby poddać analizie struktury kolców dendrytycznych oraz poziomu śmierci neuronów. Jednak ze względu, iż opisany model eksperymentalny bazujący na hodowlach neuronalnych z myszy *Srff<sup>f</sup>/f*

stanowił jedynie dodatkową kontrolę dla modelu wykorzystującego szczurze hodowle neuronalne z obniżonym poziomem SRF za pomocą shRNA, a wyniki uzyskane w obydwu tych wariantach są zbieżne, nie podjęto się próby przeprowadzenia dodatkowych eksperymentów.

## 5.2. Ekspresja i aktywność czynnika transkrypcyjnego SRF jest regulowana w rozwoju

Przytoczone w niniejszej rozprawie dane literaturowe dowodzą jak istotnym elementem w prawidłowym funkcjonowaniu OUN jest czynnik transkrypcyjny SRF oraz jego aktywność. Mimo prowadzonych licznych badań nad rolą SRF w procesach związanych z rozwojem mózgu i plastycznością neuronalną istniała luka w aktualnym stanie wiedzy. Prace mające na celu zbadanie roli SRF w rozwoju OUN były prowadzone na myszach transgenicznym, u których delecja *Srf* następowała w okresie prenatalnym i prowadziła do przedwczesnej śmierci zwierząt. W ramach tych badań wykazano znaczący udział SRF w takich procesach jak migracja i różnicowanie komórek nerwowych, rozwój drzewa dendrytycznego czy aksonu (Alberti i in., 2005; Knöll i in., 2006; Stritt i Knöll, 2010). Modele te ze względu na poważne zaburzenia w rozwoju prenatalnym uniemożliwiały zbadanie udziału SRF w procesie dojrzewania kolców dendrytycznych. Drugą grupę stanowiły badania wykorzystujące myszy transgeniczne z systemem Cre/loxP, w których delecja *Srf* była możliwa w neuronach przodomózgowia jedynie u dorosłych osobników. W badaniach przeprowadzonych przez Ramanan i wsp., (2005) wykorzystano myszy, w których gen *Cre* został umieszczony pod kontrolą promotora Synapsyny 1 lub CaMKII $\alpha$ . Umożliwiało to delecję *Srf* w mózgach dorosłych, co najmniej sześciotygodniowych osobników, czyli już po zakończeniu okresu intensywnego dojrzewania kolców dendrytycznych. Ponadto, liczne badania koncentrowały się na znaczeniu czynnika transkrypcyjnego SRF w funkcjonowaniu dojrzałych neuronów (Etkin i in., 2006; Kuzniewska i in., 2016; Nader i in., 2019). Wyniki zaprezentowane w niniejszej pracy po raz pierwszy wskazują na rolę czynnika transkrypcyjnego SRF w procesie dojrzewania połączeń synaptycznych na wczesnych etapach rozwoju postnatalnego. Zastosowanie myszy transgenicznym z delecją *Srf* zależną od Cre, indukowaną na wczesnych etapach rozwoju postnatalnego pozwoliło na uniknięcie dotkliwych zaburzeń spowodowanych

obniżeniem poziomu SRF jeszcze w życiu płodowym oraz na zbadanie jego roli w okresie krytycznym dla dojrzewania kolców dendrytycznych w rozwoju.

W niniejszej pracy potwierdzono doniesienia literaturowe o rozwojowej regulacji poziomu i aktywności SRF. W celu weryfikacji ilości białka SRF w hipokampach posłużono się homogenatami pochodzącymi z myszy szczepu C57BL/6JCmd. Osobniki te znajdowały się na różnych etapach rozwoju postnatalnego: od nowonarodzonych osesków (P 0) do osobników dojrzałych (P 60). Analiza Western Blot wykazała, iż poziom SRF jak również kompozycja jego izoform zmieniają się w toku rozwoju osobniczego zwierzęcia. Do szczególnie interesujących zmian dochodzi na przełomie pierwszego i trzeciego tygodnia życia zwierzęcia (P 7 – P 21), kiedy to wykrywa się białko SRF o pełnej długości (od P 7) a znacznie spada poziom izoformy SRF $\Delta$ 5, która prawdopodobnie ma działanie hamujące względem izoformy będącej białkiem o pełnej długości (Kemp i Metcalfe, 2000; Uhlen i in., 2015). Ponadto, w okresie pomiędzy P 7 a P 14 dochodzi do spadku poziomu izoformy SRF $\Delta$ 3 – 5 a wzrostu ekspresji izoformy SRF $\Delta$ 4,5 (Modak i Chai, 2010). U zwierząt trzytygodniowych obserwujemy wzór ekspresji SRF, który utrzymuje się co najmniej do wieku dojrzałego (P 60). Do tych istotnych zmian w poziomie białka SRF i jego poszczególnych izoform dochodzi w okresie, w którym szczególnie intensywnie dojrzewają kolce dendrytyczne w rozwoju *in vivo* (Miller i Peters, 1981). Ponadto, otrzymane wyniki są zgodne z rezultatami opublikowanymi przez Stringer i in. (2002), w których wykazano wzrost poziomu SRF w skrawkach hipokampa i kory mózgowej szczura w okresie postnatalnym (P 0 – P 21), który następnie utrzymuje się do wieku dorosłego. Należy mieć na uwadze, iż czynnik transkrypcyjny SRF jest wyrażany w mózgu także w innych komórkach niż neurony, astrocytach i oligodendrocytach (Jain i in., 2021; Lu i Ramanan, 2012).

Wyniki badań zaprezentowanych w niniejszej rozprawie pokazują, iż na wczesnych etapach rozwoju zmienia się nie tylko sam poziom białka SRF, lecz również zależna od tego czynnika transkrypcyjnego aktywność transkrypcyjna. W pierwotnych hodowlach hipokampalnych niosących wektory plazmidowe p5xSRE-Luc oraz pEF1 $\alpha$ LacZ porównano poziom transkrypcji zależnej od SRF w kolejnych etapach rozwoju neuronów *in vitro* (tutaj w DIV 3, DIV 7, DIV 14 i DIV 21). Przeprowadzona analiza wykazała, iż aktywność transkrypcyjna zależna od SRF istotnie wzrasta w dniu 7. prowadzonej hodowli *in vitro* (w porównaniu do DIV 3) oraz utrzymuje się na

wysokim poziomie w całym analizowanym przedziale czasu (do DIV 21). Wyniki te wspierają hipotezę o rozwojowej regulacji poziomu SRF i transkrypcji od niego zależnej. Wzrost poziomu SRF i jego aktywności transkrypcyjnej koreluje z etapem rozwoju postnatalnego neuronów, na którym dochodzi do dojrzewania kolców dendrytycznych. W neuronach hodowanych *in vitro* już w tydzień od założenia hodowli na rozgałęzionych dendrytach obserwowane są wypustki o kształcie filopodiów (Sala i wsp., 2001) a w kolejnych czternastu dniach następuje ich dojrzewanie połączone ze zmianą kształtu na grzybkowaty i przysadzisty (Papa i in., 1995).

Podsumowując, ilość białka SRF, kompozycja jego izoform jak również poziom transkrypcji zależnej od SRF zmienia się w toku rozwoju. Zmiany te korelują w czasie z zachodzącym w neuronach procesem dojrzewania kolców dendrytycznych. Sugeruje to, iż czynnik transkrypcyjny SRF może być zaangażowany w regulację procesu dojrzewania synaps w rozwoju osobniczym.

### 5.3. Obniżony poziom SRF w rozwoju powoduje zaburzenia kształtu, ale nie gęstości kolców dendrytycznych

Głównym celem badawczym niniejszej pracy doktorskiej było poznanie wpływu czynnika transkrypcyjnego SRF na proces dojrzewania kolców dendrytycznych w rozwoju, a jedną z właściwości kolców zmieniającą się wraz z zachodzeniem tego procesu jest ich kształt. Zgodnie z koncepcją filopodialną rozwoju kolców dendrytycznych początkowo obserwujemy długie, cienkie wypustki w błonie dendrytu, których kształt wraz z postępującym procesem dojrzewania połączeń neuronalnych zmienia się w przysadzisty lub grzybkowaty (Fiala i in., 1998; Zuo i in., 2005). W celu zbadania wpływu obniżenia poziomu SRF na wczesnych etapach rozwoju na kształt kolców dendrytycznych posłużono się zarówno modelem *in vitro* jak i *in vivo*. Model zwierzęcy stanowiły myszy szczepu *Srf<sup>f/f</sup>CaMKCreERT2*, u których delecja *Srf* została zaindukowana poprzez dootrzewnowe iniekcje 4-hydroksytamoksyfenu w dniu piątym, szóstym i siódmym po narodzinach. W eksperymentach *in vitro* wykorzystano pierwotne hodowle neuronów założone z komórek hipokampów nowonarodzonych (P 0) szczurów szczepu Wistar, transfekowane w dniu piątym lub szóstym hodowli wektorami plazmidowymi kodującymi krótkie, interferujące RNA o strukturze szpilki do włosów (shCTR lub

shSRF). Analizy gęstości i kształtu kolców dendrytycznych przeprowadzono na dojrzałych neuronach (myszy w wieku P 60 oraz neurony w DIV 19 – 21) za pomocą programu SpineMagick! i autorskiego skryptu do klasyfikacji kształtów wypustek. Wyniki przeprowadzonych porównań okazały się być zbieżne w obydwu zastosowanych modelach badawczych. Ponadto, analogiczne wyniki dotyczące niedojrzałej morfologii kolców dendrytycznych neuronów z obniżonym poziomem SRF nasza grupa uzyskała w badaniach przeprowadzonych z zastosowaniem dysocjowanych hodowli z hipokampów myszy *Srf<sup>ff</sup>*, które transfekowano wektorem plazmidowym pAAV-CRE (Roszkowska i in., 2022).

Analizy wykazały, iż obniżony poziom SRF nie zaburza liczby wypustek na dendrytach, czyli nie ma wpływu na gęstość kolców dendrytycznych. Jednak w odniesieniu do budowy kolców dendrytycznych zaobserwowano znaczące różnice między neuronami kontrolnymi, a tymi z obniżonym poziomem SRF. Kolce dendrytyczne neuronów z obniżonym poziomem SRF są istotnie dłuższe od kolców neuronów kontrolnych. Obserwacje te są w zgodzie z koncepcją, iż w procesie rozwoju kolców dendrytycznych możemy wyróżnić dwie zasadnicze fazy: formowanie się kolców oraz ich dojrzewanie i stabilizację. Etapy te regulowane są prawdopodobnie przez różne molekularne mechanizmy oraz w różnym stopniu zależą od aktywności neuronalnej. W tym kontekście, brak różnic w gęstości kolców może sugerować, iż czynnik transkrypcyjny SRF oraz transkrypcja od niego zależna nie pełnią kluczowej roli w procesie formowania kolców dendrytycznych. Oba procesy zdają się mieć za to istotne znaczenie dla dojrzewania i stabilizacji tych wypustek. Jak pokazały wyniki klasyfikacji kolców do grupy o niedojrzałym kształcie (filopodialne i długie) oraz dojrzałym (przysadziste i grzybkowate), obniżenie poziomu SRF skutkuje spadkiem liczby kolców dendrytycznych o dojrzałej strukturze. Obserwujemy zatem zahamowanie procesu dojrzewania kolców dendrytycznych, co przejawia się większym odsetkiem kolców filopodialnych i długich.

Należy mieć na uwadze, że na dojrzewanie kolców dendrytycznych mogą wpływać także inne procesy regulowane przez SRF, np. rozwój zakończeń aksonalnych czy rozrost drzewa dendrytycznego. Mimo, iż w modelu *in vivo* zaindukowano delecję *Srf* dopiero w okresie postnatalnym (w dniu piątym po narodzinach myszy) kiedy to pewne etapy rozwoju mózgu zostały już osiągnięte, to nie można wykluczyć, iż obniżony poziom SRF wpłyną także na inne procesy zachodzące w rozwijającym się

OUN. Rozwój hipokampa zachodzi głównie w dwóch pierwszych tygodniach po narodzinach myszy i jak pokazały badania (Knöll i wsp., 2006) obniżony poziom SRF na tym etapie rozwoju przyczynia się do zaburzenia przebiegu szlaków neuronalnych w tej strukturze. W badaniach Stritt i Knöll (2010) pokazano, iż delecja *Srf* w okresie okołonatalnym powoduje zaburzenia w budowie hipokampa oraz nieprawidłowości w rozwoju drzewa dendrytycznego (m.in. neurony myszy SRF KO mają mniej zakończeń dendrytycznych). W badaniach opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej przeprowadzono barwienia skrawków hipokampów myszy metodą Nissla w celu oceny ich morfologii. Nie odnotowano nieprawidłowości w budowie hipokampów myszy z obniżonym poziomem SRF, ze szczególnym uwzględnieniem warstwy komórek piramidowych pola CA1 hipokampa (Roszkowska i in., 2022).

Ponadto, przeprowadzając analizy kształtów kolców dendrytycznych należy mieć na uwadze, iż w rzeczywistości mamy do czynienia z całym kontinuum możliwych kształtów (Ruszczycki i wsp., 2012), a wszelkie próby ich klasyfikacji czy klasteryzacji są w pewnym stopniu subiektywne, co może przekładać się na otrzymywane wyniki (Pchitskaya i Bezprozvanny, 2020). Dodatkowo, same metody obrazowania użyte do wizualizacji kolców dendrytycznych również mają swoje wady, wynikające z ograniczonej rozdzielczości mikroskopii konfokalnej. Istnieją też przesłanki wskazujące, iż opisywane w literaturze kolce przysadziste mogą być w rzeczywistości kolcami grzybkowatymi o bardzo krótkiej szyjce (Tønnesen i wsp., 2014). Mając na uwadze powyższe argumenty w niniejszej pracy postanowiono sklasyfikować kolce dendrytyczne tylko do dwóch szerszych kategorii: kolców o budowie dojrzałej i niedojrzałej. Dodatkowo program SpineMagick! za pomocą, którego w sposób półautomatyczny zaznaczano kolce na dendrytach bazuje na dwuwymiarowych obrazach neuronów, co może przekładać się na pewne odchylenia w pomiarach w stosunku np. do kolców dendrytycznych zaznaczonych na podstawie trójwymiarowych rekonstrukcji dendrytów (Basu i wsp., 2018).

Wyniki otrzymane w modelu *in vivo* można odnieść do wcześniejszych badań (Nader i wsp., 2019) przeprowadzonych również na myszach szczepu *Srf<sup>f/f</sup>/CaMKCreERT2*, u których zaindukowano delecję *Srf* u osobników dorosłych (osobniki 2-3 miesięczne). W tym modelu także nie zaobserwowano różnic w gęstości kolców dendrytycznych pomiędzy zwierzętami cKO a WT. Analiza kształtów kolców dendrytycznych wykazała spadek częstości kolców o morfologii dojrzałej, jednak nie

był on tak znaczący jak w badaniach opisanych w niniejszej rozprawie. Pokazuje to, iż moment w rozwoju zwierzęcia, na którym dochodzi do obniżenia poziomu SRF ma kluczowe znaczenie dla obserwowanych zmian. W badaniach opisanych w niniejszej pracy doktorskiej zaindukowano delecję *Srf* na wczesnych etapach rozwoju, jeszcze przed okresem intensywnego dojrzewania kolców dendrytycznych, co spowodowało znaczący (bo aż o 24 punkty procentowe) spadek częstości kolców grzybkowatych i przysadzistych. Z drugiej strony delecja *Srf* zaindukowana po okresie intensywnego dojrzewania kolców dendrytycznych, czyli u dorosłych zwierząt prowadzi do obniżenia częstości kolców o morfologii dojrzałej jedynie o 6 punktów procentowych (Nader i in., 2019).

Wpływ SRF na kształt kolców dendrytycznych wydaje się szczególnie interesujący w kontekście pracy opublikowanej przez del Blanco i in. (2019), w której to badano znaczenie białka wiążącego CREB (CBP) na dojrzewanie połączeń synaptycznych. W badaniach tych wykazano, iż obniżony poziom CBP w neuronach hodowanych *in vitro* w trakcie rozwoju prowadzi do zaburzeń w ekspresji genów, w promotorach których znajdują się miejsca wiązania dla SRF. Geny te są zaangażowane w różnicowanie i rozwój neuronów oraz ich plastyczność. Stanowi to kolejną przesłankę do teorii o współdziałaniu SRF i CBP w regulacji genów (Hanna i in., 2009; Nissen i in., 2001; Ramos i in., 2010). Co ciekawe neurony z obniżonym poziomem CBP nie mają zmienionej gęstości kolców dendrytycznych, ale charakteryzują się mniejszą liczbą kolców dendrytycznych o kształcie grzybkowatym w porównaniu do neuronów kontrolnych. Te zaburzenia w morfologii kolców dendrytycznych są znoszone przez nadekspresję SRF (uzyskaną poprzez wprowadzenie do neuronów konstruktu SRF-VP16).

#### 5.4. Obniżony poziom SRF zaburza właściwości elektrofizjologiczne neuronów

Dojrzewanie synaps i procesy plastyczne w nich zachodzące są ściśle powiązane z zmianami we właściwościach elektrofizjologicznych tworzących je neuronów. Ponieważ kolce dendrytyczne stanowią główne *locus* synaps pobudzających w mózgu, postanowiono zbadać jak zaburzenia w ich strukturze, wywołane obniżonym poziomem SRF, wpływają na transmisję pobudzającą w neuronach. W tym celu



przeprowadzono rejestracje miniaturowych prądów pobudzających (mEPSCs) w konfiguracji *whole-cell* metodą *patch-clamp*. W szczurzych neuronach, z obniżonym poziomem SRF za pomocą shSRF, hodowanych *in vitro* odnotowano znaczące różnice w spontanicznej aktywności neuronalnej w porównaniu do komórek kontrolnych. Deplecja SRF w neuronach spowodowała obniżenie częstotliwości mEPSCs, a zatem czas upływający pomiędzy kolejnymi prądami miniaturowymi jest istotnie dłuższy niż w przypadku neuronów o prawidłowym poziomie SRF. Ponadto, komórki shSRF charakteryzują się niższą wartością amplitudy mEPSCs.

Mimo iż na właściwości elektrofizjologiczne neuronów mają wpływ wszystkie składowe synapsy poczwórnej (Ferrer-Ferrer i Dityatev, 2018) to postuluje się, że zaobserwowane w niniejszych badaniach różnice między komórkami odpowiadają komponenty postsynaptyczne. Za postsynaptyczną genezę zmian w parametrach mEPSCs występujących w neuronach z obniżonym poziomem SRF przemawia zastosowana w metodologia. Dzięki przeprowadzeniu transfekcji neuronalnej o niskiej wydajności (jedynie kilka stransfekowanych komórek GFP-pozytywnych na ok. 120 tys. neuronów hodowanych na danym szkiełku) można z dużym prawdopodobieństwem założyć, że oba porównywane układy badawcze różniły się jedynie właściwościami badanych neuronów postsynaptycznych.

Ponieważ nie odnotowano różnic w gęstości kolców dendrytycznych, niższa częstotliwość mEPSCs w neuronach z obniżonym poziomem SRF może być wynikiem mniejszej liczby funkcjonalnych synaps wytworzonych przez te komórki. Jak wskazują otrzymane przez nas wyniki (Roszkowska i wsp., 2022), korelacja pomiędzy białkami markerowymi dla synaps glutaminergicznych (białka Bassoon dla części presynaptycznej i białka PSD-95 dla części postsynaptycznej) jest niższa dla neuronów stransfekowanych shSRF w porównaniu do komórek kontrolnych. Neurony z obniżonym poziomem SRF mają mniej cząsteczek PSD-95 w wypustkach dendrytów niż neurony kontrolne. Przy czym, nie odnotowuje się różnic w ilości cząsteczek Bassoon w neuronach presynaptycznych. Wyniki te sugerują, iż obniżenie poziomu SRF skutkuje spadkiem liczby funkcjonalnych synaps tworzonych przez komórki.

Rejestrowane mEPSCs są zależne od receptorów AMPA, dlatego też zmniejszenie amplitudy tych prądów wydają się być związane z odnotowanym w niniejszej pracy spadkiem poziomu podjednostek receptora AMPA na powierzchni neuronów z obniżonym poziomem SRF. Z kolei, jak pokazują dane literaturowe,

poziom synaptycznych receptorów glutaminianu koreluje ze stopniem dojrzałości synapsy: wielkością zagęszczenia postsynaptycznego (PSD) oraz wielkością i kształtem główki kolca dendrytycznego (Arellano, 2007; Cane i in., 2014; De Roo i in., 2008).

W celu dokładniejszego zbadania etiologii różnic w aktywności neuronów z obniżonym poziomem SRF hodowanych *in vitro* można by przeprowadzić długotrwałe pomiary parametrów elektrofizjologicznych neuronów w toku rozwoju. Pozwoliłoby to na określenie konkretnego momentu w rozwoju, w którym dochodzi do zaburzenia prądów synaptycznych tych neuronów w porównaniu do komórek kontrolnych. W tym celu można wysiać komórki na specjalnie zaprojektowanym systemie wielu elektrod (ang. *multi-electrode array*, MEA), który umożliwia monitorowanie aktywności neuronalnej w różnych punktach czasowych w rozwoju (Negri i in., 2020).

Ciekawe wyniki mogłaby przynieść też analiza kinetyki prądów synaptycznych. Proces dojrzewania kolców dendrytycznych przejawia się nie tylko w zmianie ich kształtu, ale również w szybszej kinetyce prądów EPSCs i mEPSCs. Wraz z rozwojem komórek nerwowych skraca się czas potrzebny do osiągnięcia przez prąd 90% jego wartości maksymalnej (tzw. szybkość narastania, ang. *rise time*), co koreluje z poziomem synchronizacji uwalniania neuroprzekaźników z pęcherzyków do szczeliny synaptycznej. Obserwuje się też spadek średniej stałej czasowej dezaktywacji prądów synaptycznych (ang. *decay*). Stanowi to odzwierciedlenie zmian we właściwościach receptorów w błonie postsynaptycznej, w tym zmian w kompozycji ich podjednostek. To rozwojowe „przyśpieszenie” aktywności neuronalnej jest niezmiernie istotne dla prawidłowego funkcjonowania OUN na późniejszych etapach (Cathala i in., 2005; Wall i in., 2002). Dane literaturowe wskazują jako przyczynę „przyśpieszenia” prądów pobudzających w neuronach zmianę stężenia glutaminianu w przestrzeni synaptycznej (Jonas, 2000), na co wpływ ma także zmiana kształtu i zwiększenie wymiarów główki kolca dendrytycznego w procesie jego dojrzewania w rozwoju.

## 5.5. Wpływ białka SRF na procesy plastyczności homeostatycznej

Na wczesnych etapach rozwoju dochodzi do powstawania licznych połączeń neuronalnych, a procesowi ich dojrzewania towarzyszy wzrost aktywności synaptycznej. Za utrzymanie równowagi w poziomie aktywności całych sieci neuronowych odpowiedzialne są procesy plastyczności homeostatycznej (Tien i Kerschensteiner, 2018; Turrigiano i Nelson, 2004). W wyniku długotrwałego pobudzenia (wywołanego poprzez 24-godziną stymulację neuronów hodowanych *in vitro* gabazyną będącą antagonistą receptorów GABA<sub>A</sub>) dochodzi do zahamowania aktywności synaptycznej. Co jest obserwowane jako spadek częstotliwości i amplitudy mEPSCs. Jak pokazują wyniki niniejszych badań czynnik transkrypcyjny SRF jest zaangażowany w regulację tego procesu, a obniżenie poziomu białka SRF skutkuje zaburzeniem tej formy plastyczności. Na skutek długotrwałego pobudzenia prądu mEPSCs neuronów z obniżonym poziomem SRF stają się częstsze (dochodzi do skrócenia odcinka czasu pomiędzy kolejnymi mEPSCs) oraz odnotowuje się wzrost ich amplitudy. Może być to spowodowane zaburzeniem procesu skalowania synaptycznego, polegającego na usuwaniu receptorów AMPA z powierzchni błony synaptycznej w wyniku długotrwałego pobudzenia. Białkiem kluczowym dla internalizacji receptorów jest białko Arc (Shepherd i wsp., 2006), którego ekspresja jest bezpośrednio regulowana przez czynnik transkrypcyjny SRF (Etkin i wsp., 2006; Kalita i wsp., 2006). Zaburzenia w procesach plastyczności homeostatycznej są powiązane z występowaniem chorób neurorozwojowych czy etiologią epilepsji (Wondolowski i Dickman, 2013; Zieger i Choquet, 2021). Dane literaturowe dokumentują wzmożone występowanie drgawek u myszy SRF KO w odpowiedzi na silne pobudzenie wywołane podaniem kwasu kainowego lub pilokarpiny (Kuzniewska i wsp., 2016; Lösing i wsp., 2017), co wskazuje na nieprawidłowości w plastyczności homeostatycznej u tych zwierząt.

Głównymi receptorami jonotropowymi glutaminianu w mózgu są receptory NMDA i AMPA. Oba te typy receptorów podlegają procesowi skalowania synaptycznego w odpowiedzi na długotrwałe zmiany w poziomie pobudzenia (Turrigiano, 2008; Watt, 2010). W pracy Chen i in. (2014) wykazano, że proces skalowania synaptycznego związanego z długotrwałymi zmianami w poziomie pobudzenia dotyczy głównie receptorów AMPA zawierających podjednostkę GluA2. Stąd, w wyniku zmian plastycznych obniżeniu ulega zarówno poziom podjednostki

GluA1 (będącej obligatoryjną składową receptora AMPA) jak i podjednostki GluA2 na powierzchni synapsy (Kerrisk Campbell i Sheng, 2018; Tan i in., 2015). Postuluje się także, że zaburzenia w procesie skalowania synaptycznego mogą być spowodowane nieprawidłowym poziomem podjednostki GluA2, na co również wskazują wyniki niniejszej pracy. W badaniach przeprowadzonych na myszach pozbawionych genu *Gria2* wykazano wzmocnienie LTP w regionie CA1 hipokampa w porównaniu do EPSCs myszy kontrolnych (Jia i in., 1996).

## 5.6. Czynniki transkrypcyjne SRF reguluje poziom podjednostek receptora AMPA

Proces dojrzewania kolców dendrytycznych w rozwoju koreluje ze wzrostem siły połączeń synaptycznych, zmianą kształtów, w tym powiększeniem się główek kolców, a także wzrostem poziomu receptorów na powierzchni synaps. Liczne badania wskazują na związek poziomu podjednostek GluA1 i GluA2 receptora AMPA na synapsie ze stopniem jej dojrzałości i siłą utworzonych połączeń (Henley i Wilkinson, 2016; Matsuzaki i in., 2001; Tracy i in., 2011). W obu niezależnych modelach *in vivo* wykorzystanych na potrzeby niniejszej pracy wykazano, iż neurony z obniżonym poziomem SRF charakteryzują się niskim poziomem podjednostki GluA1 i GluA2 zarówno w odniesieniu do całkowitego poziomu tych białek, jak i receptorów wbudowanych w błonę komórki. Wyniki te łączą się z wnioskami płynącymi z przeprowadzonej analizy struktury kolców dendrytycznych, z których wynika, iż wypustki neuronów z obniżonym poziomem SRF rzadziej charakteryzują się dojrzałą, grzybkowatą budową niż wypustki komórek kontrolnych. Ponadto, spadek poziomu podjednostek receptora AMPA na powierzchni neuronów (który został wykazany zarówno metodami biochemicznymi jak i immunocytochemicznymi) stanowi wyjaśnienie dla niższej wartości amplitudy mEPSCs tych neuronów.

Należy jednak zaznaczyć, iż mimo niskiego poziomu GluA2 w neuronach z deplecją SRF minimalny poziom tego białka, niezbędny do stabilizacji i utrzymania fenotypu kolców dendrytycznych musi być zachowany w tych komórkach. Przemawia za tym fakt, iż nie obserwuje się zmian w gęstości kolców dendrytycznych na skutek obniżenia poziomu SRF, a pewien odsetek wypustek osiąga morfologię dojrzałych kolców dendrytycznych w toku rozwoju.

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy pozwalają na przyjęcie hipotezy, iż poziom podjednostki GluA1 i GluA2 jest regulowany przez transkrypcję zależną od SRF. W dwóch niezależnych modelach biologicznych wykazano znaczący spadek poziomów mRNA dla genu *Gria1* (kodującego podjednostkę GluA1) i genu *Gria2* (kodującego podjednostkę GluA2) w neuronach z obniżonym poziomem SRF na wczesnych etapach rozwoju. Niedawno ukazały się publikacje pokazujące wiązanie się czynnika transkrypcyjnego SRF do promotorów genów *Gria1* i *Gria2* w komórkach hipokampów myszy i mysich fibroblastach (Esnault i in., 2014; Gualdrini i in., 2016), jednak wyniki zaprezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej po raz pierwszy dokumentują spadek poziomu mRNA tych genów w neuronach z obniżonym poziomem SRF. Mimo to, nie można wykluczyć istnienia niebezpośredniej ścieżki regulacji poziomu ekspresji *Gria1* i *Gria2* przez czynnik transkrypcyjny SRF. Chociażby przez wspomnianą już wcześniej kontrolę ekspresji c-Fos wchodzącego w skład kompleksu AP-1 będącego ważnym czynnikiem w rozwoju postnatalnym neuronów (Pennypacker, 1995; Wu i in., 2007).

Otrzymane wyniki zaprezentowane w niniejszej pracy wspierają dane literaturowe mówiące, iż delecja lub nadekspresja genu *Gria2* kodującego białko GluA2 wpływa na powstawanie i dojrzewanie synaps (Passafaro i in., 2003; Saglietti i in., 2007). Najnowsze doniesienia łączą mutacje czy delecje w genie *Gria2* z występowaniem takich zaburzeń neurorozwojowych jak ASD, epilepsja czy niepełnosprawność intelektualna (Danesi i in., 2019; Hackmann i in., 2013; Salpietro i in., 2019). Jak już wspomniano w niniejszej pracy, w obrazie tych chorób także obserwuje się zaburzenia w procesie dojrzewania kolców dendrytycznych.

Mimo danych literaturowych mówiących o znaczącej roli receptorów AMPA w procesie powstawania połączeń synaptycznych (Medvedev i in., 2008; Passafaro i in., 2003; Saglietti i in., 2007; Tracy i in., 2011) to na dojrzewanie kolców dendrytycznych z pewnością bezpośredni wpływ mają także inne białka. Obniżenie poziomu SRF w młodym mózgu powoduje zaburzenia w ekspresji nie tylko podjednostek receptora AMPA, ale potencjalnie także wielu innych genów zaangażowanych w procesy plastyczności neuronalnej. SRF jako czynnik transkrypcyjny reguluje ekspresję licznych genów odpowiedzi wczesnej (IEG) czy kodujących elementy cytoszkieletu m. in. *c-Fos*, *Egr1*, *Arc*, *Npas4*, *JunB*, *Actb*, czy *Actg1* (Kuzniewska i in., 2016; Ramanan i in., 2005). Białka te biorą udział w regulacji morfologii kolców dendrytycznych w rozwoju

jak również w odpowiedzi na zmiany pobudzenia neuronalnego (Bellot i in., 2014; Murakoshi i Yasuda, 2012; Parkitna i in., 2010; Peebles i in., 2010; Sala i Segal, 2014). Dlatego też zaburzenia budowy kolców dendrytycznych obserwowane w neuronach z obniżonym poziomem SRF są najprawdopodobniej wynikiem dysfunkcji wynikających nie tylko z poziomu podjednostek receptora AMPA.

## 5.7. Regulacja kształtu kolców dendrytycznych jest zależna od kofaktorów MRTF

Transkrypcja genów zależna od MRTF/SRF jest niezbędna do prawidłowego wzrostu neurytów i rozwoju drzewa dendrytycznego (Ishikawa i in., 2010; Stern i in., 2009). Badania pokazują, że szlak ten jest kluczowy także dla ekspresji IEG w odpowiedzi na pobudzenie neuronalne. Sekwencje regulatorowe SARE (ang. *synaptic activity-responsive element*) zawierające miejsca wiązania dla czynników transkrypcyjnych CREB, MEF2 i SRF są niezbędne do wzrostu transkrypcji genu *Arc* w odpowiedzi na stymulację BDNF (Rodríguez-Tornos i in., 2013). Jak wykazały badania przeprowadzone przez prof. Tabuchi (Kikuchi i in., 2019) SRF w tym kompleksie oddziałuje z białkiem MRTF-B (z rodziny kofaktorów MRTF), a nie z kofaktorami z rodziny TCF. W badaniach zaprezentowanych w niniejszej rozprawie udokumentowano wpływ czynnika transkrypcyjnego SRF na dojrzewanie kolców dendrytycznych. Proces ten także zależy od oddziaływania SRF z kofaktorami z rodziny MRTF. Deplecja MRTF w szczurzych neuronach hodowanych *in vitro* prowadzi do zatrzymania kolców dendrytycznych w stadium, na którym ich morfologia jest typowa dla niedojrzałych wypustek. Obniżony poziom MRTF, podobnie jak w przypadku SRF, nie wpływa na gęstość kolców dendrytycznych. Ta część wyników została opublikowana w pracy Kaneda i in. w roku 2018. Otrzymane rezultaty wspierają hipotezę o współdziałania SRF i jego kofaktorów z rodziny MRTF w regulacji procesu dojrzewania kolców dendrytycznych w rozwoju. Ponadto doniesienia literaturowe wskazują na zaangażowanie białek MRTF w proces rozwoju OUN, a mutacje lub substytucje aminokwasów w ich łańcuchach łączone są z występowaniem takich chorób neurorozwojowych jak ASD czy niepełnosprawność intelektualna (Holt i in., 2010; Neale i in., 2012), w obrazie których istotną rolę odgrywają zaburzenia procesu dojrzewania kolców dendrytycznych.

## 5.8. Obniżony poziom SRF w rozwoju wpływa na zachowania społeczne dorosłych myszy

Wyniki badań przedstawione w niniejszej rozprawie zostały zawarte w publikacji Roszkowska i in. (2022), w której to poza molekularnymi komponentami opisano także długofalowy wpływ obniżonego poziomu SRF w rozwoju na zachowanie dorosłych myszy. W celu zbadania zachowań społecznych gryzoni posłużono się narzędziem Eco-HAB®, które pozwala w sposób w pełni zautomatyzowany na monitorowanie behawioru kohorty zwierząt (Puścian i in., 2016). Rezultaty tych eksperymentów wskazują, iż zaburzenia w regulacji ekspresji genów w młodym mózgu, spowodowane delecją jednego z głównych czynników transkrypcyjnych w OUN – SRF, prowadzą do długofalowych konsekwencji w zachowaniach społecznych. Myszy SRF cKO, zarówno samice jak i samce, charakteryzują się zaburzeniami w interakcjach społecznych: mniej chętnie spędzają czas w grupie znanych sobie myszy w porównaniu do osobników WT. Świadczy to o trudnościach w nawiązywaniu i utrzymywaniu kontaktów społecznych, co jest jedną z głównych osi zaburzeń u osób z ASD (Lai i wsp., 2014; Volkmar, 2011). Podobny fenotyp obserwuje się w zachowaniu myszy transgenicznym będącym modelem ASD. Myszy z delecją białka FMRP (*Fmr1* KO) związanego z zespołem łamliwego chromosomu X także prezentują analogiczne zaburzenia w zachowaniach społecznych (Puścian i in., 2016). Ponadto, delecja *Fmr1* powoduje nieprawidłowości w morfologii kolców dendrytycznych: wzrasta ich gęstość a wypustki stają się cieńsze i dłuższe (Pan i in., 2010; Takumi i in., 2020). Zarówno u osób z ASD jak i w modelach zwierzęcych odnotowuje się różnice międzypłciowe w zachowaniach społecznych (Abuaish i in., 2021; Werling i Geschwind, 2013). U myszy SRF cKO także zaobserwowano odmienne zachowanie u samic, które przejawiały silniejsze zainteresowanie zapachem pochodzącym od nieznanego im osobnika niż samce SRF cKO oraz myszy WT (Roszkowska i in., 2022).

Opisane badania wskazują na istotny wpływ SRF i genów przez niego regulowanych na zachowanie zwierząt. Jak pokazano w cytowanej pracy, delecja *Srf* na wczesnych etapach rozwoju postnatalnego wpływa na zaburzenia zachowania obserwowane u dorosłych osobników. Wynik ten stanowi dopełnienie wniosków płynących z badań przeprowadzonych na zwierzętach, u których zaindukowano

delecję *Srf* w dorosłym mózgu (Nader i in., 2019). U myszy tych zaobserwowano zaburzenia w zachowaniach typowych dla gryzoni, takich jak budowanie gniazda czy zakopywanie w ściółce.



## 6. Podsumowanie i wnioski

Wyniki badań zaprezentowane w niniejszej rozprawie wskazują, iż czynnik transkrypcyjny SRF jest ważnym elementem regulującym proces tworzenia połączeń synaptycznych w rozwijającym się mózgu. Przeprowadzone badania po raz pierwszy wykazały istotny udział SRF w dojrzewaniu kolców dendrytycznych na wczesnych etapach postnatalnych, co stanowi istotny wkład w poszerzenie wiedzy na temat procesów neurorozwojowych. Molekularny i behawioralny fenotyp myszy SRF cKO posiada cechy wspólne ze zwierzęcymi modelami chorób neurorozwojowych. Zaburzenia strukturalne i funkcjonalne obserwowane w kolcach dendrytycznych neuronów z obniżonym poziomem SRF wskazują synapsy pobudzające jako istotny element w etiologii chorób neurorozwojowych.

W szczególności w niniejszej pracy wykazano, iż:

- 1) Poziom białka SRF jak również poszczególnych jego izoform oraz poziom transkrypcji zależnej od SRF są regulowane rozwojowo;
- 2) Kolce dendrytyczne neuronów hipokampalnych z obniżonym poziomem SRF charakteryzują się niedojrzałą budową. Obniżony poziom SRF nie wpływa na gęstość kolców dendrytycznych;
- 3) Obniżony poziom SRF zaburza podstawową aktywność neuronalną powodując spadek amplitudy i częstotliwości mEPSCs;
- 4) W neuronach z obniżonym poziomem SRF zaburzony jest proces plastyczności homeostatycznej w odpowiedzi na długotrwałą stymulację;
- 5) Obniżenie poziomu SRF w neuronach skutkuje spadkiem poziomu białek podjednostek GluA1 i GluA2 na powierzchni błon;
- 6) Transkrypcja genów *Gria1* i *Gria2* kodujących odpowiednio podjednostkę GluA1 i GluA2 receptora AMPA jest regulowana przez SRF, co przekłada się na obserwowany poziom tych białek w komórce;
- 7) Obniżony poziom białek MRTF powoduje zaburzenia w morfologii kolców dendrytycznych analogiczne do tych wywołanych obniżeniem poziomu SRF. Wskazuje to na współdziałanie SRF i MRTF w procesie regulacji dojrzewania kolców dendrytycznych w rozwoju.

## 7. Bibliografia

1. Abuaish, S., Al-Otaibi, N. M., Aabed, K., Abujamel, T. S., Alzahrani, S. A., Alotaibi, S. M., Bhat, R. S., Arzoo, S. i El-Ansary, A. (2021). The role of sex-differentiated variations in stress hormones, antioxidants, and neuroimmune responses in relation to social interaction impairment in a rodent model of autism. *Metabolic Brain Disease*, 36(6), 1369–1379. <https://doi.org/10.1007/s11011-021-00732-5>
2. Aizawa, H., Hu, S.-C., Bobb, K., Balakrishnan, K. ince, G., Gurevich, I., Cowan, M. i Ghosh, A. (2004). Dendrite Development Regulated by CREST, a Calcium-Regulated Transcriptional Activator. *Science*, 303(5655), 197–202. <https://doi.org/10.1126/science.1089845>
3. Alberti, S., Krause, S. M., Kretz, O., Philippar, U., Lemberger, T., Casanova, E., Wiebel, F. F., Schwarz, H., Frotscher, M., Schütz, G. i Nordheim, A. (2005). Neuronal migration in the murine rostral migratory stream requires serum response factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(17), 6148–6153. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501191102>
4. Amir, R. E., Van den Veyver, I. B., Wan, M., Tran, C. Q., Francke, U. i Zoghbi, H. Y. (1999). Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nature Genetics*, 23(2), 185–188. <https://doi.org/10.1038/13810>
5. Arellano, J. I. (2007). Ultrastructure of dendritic spines: Correlation between synaptic and spine morphologies. *Frontiers in Neuroscience*, 1(1), 131–143. <https://doi.org/10.3389/neuro.01.1.1.010.2007>
6. Ashby, M. C. i Isaac, J. T. R. (2011). Maturation of a Recurrent Excitatory Neocortical Circuit by Experience-Dependent Unsilencing of Newly Formed Dendritic Spines. *Neuron*, 70(3), 510–521. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.02.057>
7. Azevedo, F. A. C., Carvalho, L. R. B., Grinberg, L. T., Farfel, J. M., Ferretti, R. E. L., Leite, R. E. P., Filho, W. J., Lent, R. i Herculano-Houzel, S. (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 513(5), 532–541. <https://doi.org/10.1002/cne.21974>
8. Baarlink, C., Wang, H. i Grosse, R. (2013). Nuclear Actin Network Assembly by Formins Regulates the SRF Coactivator MAL. *Science*, 340(6134), 864–867. <https://doi.org/10.1126/science.1235038>
9. Babikian, T., Prins, M. L., Cai, Y., Barkhoudarian, G., Hartonian, I., Hovda, D. A. i Giza, C. C. (2010). Molecular and Physiological Responses to Juvenile Traumatic Brain Injury: Focus on Growth and Metabolism. *Developmental Neuroscience*, 32(5–6),

431–441. <https://doi.org/10.1159/000320667>

10. Bahrami, S. i Drabløs, F. (2016). Gene regulation in the immediate-early response process. *Advances in Biological Regulation*, 62, 37–49. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2016.05.001>
11. Bamburg, J. R., Minamide, L. S., Wiggan, O., Tahtamouni, L. H. i Kuhn, T. B. (2021). Cofilin and Actin Dynamics: Multiple Modes of Regulation and Their Impacts in Neuronal Development and Degeneration. *Cells*, 10(10), 2726. <https://doi.org/10.3390/cells10102726>
12. Basu, S. i Lamprecht, R. (2018). The Role of Actin Cytoskeleton in Dendritic Spines in the Maintenance of Long-Term Memory. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00143>
13. Basu, S., Saha, P. K., Roszkowska, M., Magnowska, M., Baczynska, E., Das, N., Plewczynski, D. i Wlodarczyk, J. (2018). Quantitative 3-D morphometric analysis of individual dendritic spines. *Scientific Reports*, 8(1), 3545. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21753-8>
14. Bats, C., Groc, L. i Choquet, D. (2007). The Interaction between Stargazin and PSD-95 Regulates AMPA Receptor Surface Trafficking. *Neuron*, 53(5), 719–734. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.01.030>
15. Bayés, À., van de Lagemaat, L. N., Collins, M. O., Croning, M. D. R., Whittle, I. R., Choudhary, J. S. i Grant, S. G. N. (2011). Characterization of the proteome, diseases and evolution of the human postsynaptic density. *Nature Neuroscience*, 14(1), 19–21. <https://doi.org/10.1038/nn.2719>
16. Beaumont, T. L., Yao, B., Shah, A., Kapatos, G. i Loeb, J. A. (2012). Layer-Specific CREB Target Gene Induction in Human Neocortical Epilepsy. *Journal of Neuroscience*, 32(41), 14389–14401a. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3408-12.2012>
17. Beck, H., Flynn, K., Lindenberg, K. S., Schwarz, H., Bradke, F., Di Giovanni, S. i Knöll, B. (2012). Serum Response Factor (SRF)-cofilin-actin signaling axis modulates mitochondrial dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(38). <https://doi.org/10.1073/pnas.1208141109>
18. Belaguli, N. S., Zhou, W., Trinh, T.-H. T., Majesky, M. W. i Schwartz, R. J. (1999). Dominant Negative Murine Serum Response Factor: Alternative Splicing within the Activation Domain Inhibits Transactivation of Serum Response Factor Binding Targets. *Molecular and Cellular Biology*, 19(7), 4582–4591. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.7.4582>

19. Bellot, A., Guivernau, B., Tajés, M., Bosch-Morató, M., Valls-Comamala, V. i Muñoz, F. J. (2014). The structure and function of actin cytoskeleton in mature glutamatergic dendritic spines. *Brain Research*, 1573, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.05.024>
20. Ben Zablah, Y., Merovitch, N. i Jia, Z. (2020). The Role of ADF/Cofilin in Synaptic Physiology and Alzheimer's Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.594998>
21. Benavides-Piccione, R., Regalado-Reyes, M., Fernaud-Espinosa, I., Kastanauskaite, A., Tapia-González, S., León-Espinosa, G., Rojo, C. insausti, R., Segev, I. i DeFelipe, J. (2019). Differential Structure of Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons in the Human and Mouse. *Cerebral Cortex*. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhz122>
22. Beneyto, M., Kristiansen, L. V., Oni-Orisan, A., McCullumsmith, R. E. i Meador-Woodruff, J. H. (2007). Abnormal Glutamate Receptor Expression in the Medial Temporal Lobe in Schizophrenia and Mood Disorders. *Neuropsychopharmacology*, 32(9), 1888–1902. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301312>
23. Benson, C. C., Zhou, Q., Long, X. i Miano, J. M. (2011). Identifying functional single nucleotide polymorphisms in the human CArGome. *Physiological Genomics*, 43(18), 1038–1048. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00098.2011>
24. Berry, K. P. i Nedivi, E. (2017). Spine Dynamics: Are They All the Same? *Neuron*, 96(1), 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.08.008>
25. Blair, M. G., Nguyen, N. N.-Q., Albani, S. H., L'Etoile, M. M., Andrawis, M. M., Owen, L. M., Oliveira, R. F., Johnson, M. W., Purvis, D. L., Sanders, E. M., Stoneham, E. T., Xu, H. i Dumas, T. C. (2013). Developmental Changes in Structural and Functional Properties of Hippocampal AMPARs Parallels the Emergence of Deliberative Spatial Navigation in Juvenile Rats. *Journal of Neuroscience*, 33(30), 12218–12228. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4827-12.2013>
26. Bliss, T. V. i Lomo, T. (1970). Plasticity in a monosynaptic cortical pathway. *The Journal of physiology*, 207(2), 61.
27. Bockhorst, K. H., Narayana, P. A., Liu, R., Ahobila-Vijjula, P., Ramu, J., Kamel, M., Wosik, J., Bockhorst, T., Hahn, K., Hasan, K. M. i Perez-Polo, J. R. (2008). Early postnatal development of rat brain: In vivo diffusion tensor imaging. *Journal of Neuroscience Research*, 86(7), 1520–1528. <https://doi.org/10.1002/jnr.21607>
28. Boeckers, T. M. (2006). The postsynaptic density. *Cell and Tissue Research*, 326(2), 409–422. <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0274-5>
29. Bolon B. (2015). *Pathology of the Developing Mouse* (B. Bolon, Red.). CRC Press.

<https://doi.org/10.1201/b18160>

30. Boros, J., Donaldson, I. J., O'Donnell, A., Odrowaz, Z. A., Zeef, L., Lupien, M., Meyer, C. A., Liu, X. S., Brown, M. i Sharrocks, A. D. (2009). Elucidation of the ELK1 target gene network reveals a role in the coordinate regulation of core components of the gene regulation machinery. *Genome Research*, 19(11), 1963–1973. <https://doi.org/10.1101/gr.093047.109>
31. Boudreau, A. C., Milovanovic, M., Conrad, K. L., Nelson, C., Ferrario, C. R. i Wolf, M. E. (2012). A Protein Cross-Linking Assay for Measuring Cell Surface Expression of Glutamate Receptor Subunits in the Rodent Brain After In Vivo Treatments. *Current Protocols in Neuroscience*, 59(1). <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0530s59>
32. Bourne, J. N., Sorra, K. E., Hurlburt, J. i Harris, K. M. (2007). Polyribosomes are increased in spines of CA1 dendrites 2 h after the induction of LTP in mature rat hippocampal slices. *Hippocampus*, 17(1), 1–4. <https://doi.org/10.1002/hipo.20238>
33. Brecht, D. S. i Nicoll, R. A. (2003). AMPA Receptor Trafficking at Excitatory Synapses. *Neuron*, 40(2), 361–379. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00640-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00640-8)
34. Bridge, A. J., Pebernard, S., Ducraux, A., Nicoulaz, A.-L. i Iggo, R. (2003). Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nature Genetics*, 34(3), 263–264. <https://doi.org/10.1038/ng1173>
35. Buchsbaum, I. Y. i Cappello, S. (2019). Neuronal migration in the CNS during development and disease: Insights from *in vivo* and *in vitro* models. *Development*, 146(1). <https://doi.org/10.1242/dev.163766>
36. Buchwalter, G., Gross, C. i Wasyluk, B. (2004). Ets ternary complex transcription factors. *Gene*, 324, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2003.09.028>
37. Bustos, F. J., Varela-Nallar, L., Campos, M., Henriquez, B., Phillips, M., Opazo, C., Aguayo, L. G., Montecino, M., Constantine-Paton, M. inestrosa, N. C. i van Zundert, B. (2014). PSD95 Suppresses Dendritic Arbor Development in Mature Hippocampal Neurons by Occluding the Clustering of NR2B-NMDA Receptors. *PLoS ONE*, 9(4), e94037. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094037>
38. Calabrese, B., Wilson, M. S. i Halpain, S. (2006). Development and Regulation of Dendritic Spine Synapses. *Physiology*, 21(1), 38–47. <https://doi.org/10.1152/physiol.00042.2005>
39. Cane, M., Maco, B., Knott, G. i Holtmaat, A. (2014). The Relationship between PSD-95 Clustering and Spine Stability In Vivo. *Journal of Neuroscience*, 34(6), 2075–

2086. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3353-13.2014>

40. Cang, J. i Feldheim, D. A. (2013). Developmental Mechanisms of Topographic Map Formation and Alignment. *Annual Review of Neuroscience*, 36(1), 51–77. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-062012-170341>
41. Casanova, E., Fehsenfeld, S., Mantamadiotis, T., Lemberger, T., Greiner, E., Stewart, A. F. i Schütz, G. (2001). A CamKII $\alpha$  iCre BAC allows brain-specific gene inactivation: CamKII $\alpha$  iCre BAC Allows Brain-Specific Gene Inactivation. *Genesis*, 31(1), 37–42. <https://doi.org/10.1002/gene.1078>
42. Cathala, L., Holderith, N. B., Nusser, Z., DiGregorio, D. A. i Cull-Candy, S. G. (2005). Changes in synaptic structure underlie the developmental speeding of AMPA receptor-mediated EPSCs. *Nature Neuroscience*, 8(10), 1310–1318. <https://doi.org/10.1038/nn1534>
43. Cesa, R. i Strata, P. (2005). *Axonal and synaptic remodeling in the mature cerebellar cortex* (s. 45–56). [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(04\)48005-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(04)48005-4)
44. Chai, J. i Tarnawski, A. S. (2002). Serum response factor: Discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*, 53(2), 147–157.
45. Chang, S. H., Poser, S. i Xia, Z. (2004). A novel role for serum response factor in neuronal survival. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(9), 2277–2285. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4868-03.2004>
46. Chelly, J. i Mandel, J.-L. (2001). Monogenic causes of X-linked mental retardation. *Nature Reviews Genetics*, 2(9), 669–680. <https://doi.org/10.1038/35088558>
47. Chen, B.-S., Thomas, E. V., Sanz-Clemente, A. i Roche, K. W. (2011). NMDA Receptor-Dependent Regulation of Dendritic Spine Morphology by SAP102 Splice Variants. *Journal of Neuroscience*, 31(1), 89–96. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1034-10.2011>
48. Chen, K. i Rajewsky, N. (2006). Natural selection on human microRNA binding sites inferred from SNP data. *Nature Genetics*, 38(12), 1452–1456. <https://doi.org/10.1038/ng1910>
49. Chen, Z., Xiong, C., Pancyr, C., Stockwell, J., Walz, W. i Cayabyab, F. S. (2014). Prolonged Adenosine A1 Receptor Activation in Hypoxia and Pial Vessel Disruption Focal Cortical Ischemia Facilitates Clathrin-Mediated AMPA Receptor Endocytosis and Long-Lasting Synaptic Inhibition in Rat Hippocampal CA3-CA1

- Synapses: Differential Regulation of GluA2 and GluA1 Subunits by p38 MAPK and JNK. *Journal of Neuroscience*, 34(29), 9621–9643. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3991-13.2014>
50. Cull-Candy, S., Brickley, S. i Farrant, M. (2001). NMDA receptor subunits: Diversity, development and disease. *Current Opinion in Neurobiology*, 11(3), 327–335. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00215-4](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00215-4)
51. Danesi, C., Keinänen, K. i Castrén, M. L. (2019). Dysregulated Ca<sup>2+</sup>-Permeable AMPA Receptor Signaling in Neural Progenitors Modeling Fragile X Syndrome. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 11, 2. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2019.00002>
52. De Roo, M., Klausner, P., Mendez, P., Poglia, L. i Muller, D. (2008). Activity-Dependent PSD Formation and Stabilization of Newly Formed Spines in Hippocampal Slice Cultures. *Cerebral Cortex*, 18(1), 151–161. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhm041>
53. del Blanco, B., Guiretti, D., Tomasoni, R., Lopez-Cascales, M. T., Muñoz-Viana, R., Lipinski, M., Scandaglia, M., Coca, Y., Olivares, R., Valor, L. M., Herrera, E. i Barco, A. (2019). CBP and SRF co-regulate dendritic growth and synaptic maturation. *Cell Death i Differentiation*, 26(11), 2208–2222. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0285-x>
54. Dierssen, M. i Ramakers, G. J. A. (2006). Dendritic pathology in mental retardation: From molecular genetics to neurobiology. *Genes, Brain and Behavior*, 5, 48–60. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2006.00224.x>
55. Dillon, C. i Goda, Y. (2005). THE ACTIN CYTOSKELETON: Integrating Form and Function at the Synapse. *Annual Review of Neuroscience*, 28(1), 25–55. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.28.061604.135757>
56. Dityatev, A. i Rusakov, D. A. (2011). Molecular signals of plasticity at the tetrapartite synapse. *Current Opinion in Neurobiology*, 21(2), 353–359. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2010.12.006>
57. Elias, G. M., Elias, L. A. B., Apostolides, P. F., Kriegstein, A. R. i Nicoll, R. A. (2008). Differential trafficking of AMPA and NMDA receptors by SAP102 and PSD-95 underlies synapse development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(52), 20953–20958. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811025106>
58. Engert, F. i Bonhoeffer, T. (1999). Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature*, 399(6731), 66–70. <https://doi.org/10.1038/19978>

59. Erdmann, G., Schütz, G. i Berger, S. (2007). Inducible gene inactivation in neurons of the adult mouse forebrain. *BMC Neuroscience*, 8(1), 63. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-8-63>
60. Esnault, C., Gualdrini, F., Horswell, S., Kelly, G., Stewart, A., East, P., Matthews, N. i Treisman, R. (2017). ERK-Induced Activation of TCF Family of SRF Cofactors Initiates a Chromatin Modification Cascade Associated with Transcription. *Molecular Cell*, 65(6), 1081-1095.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.02.005>
61. Esnault, C., Stewart, A., Gualdrini, F., East, P., Horswell, S., Matthews, N. i Treisman, R. (2014). Rho-actin signaling to the MRTF coactivators dominates the immediate transcriptional response to serum in fibroblasts. *Genes i Development*, 28(9), 943–958. <https://doi.org/10.1101/gad.239327.114>
62. Etkin, A., Alarcón, J. M., Weisberg, S. P., Touzani, K., Huang, Y. Y., Nordheim, A. i Kandel, E. R. (2006). A Role in Learning for SRF: Deletion in the Adult Forebrain Disrupts LTD and the Formation of an Immediate Memory of a Novel Context. *Neuron*, 50(1), 127–143. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.03.013>
63. Ewald RC i Cline HT. (2009). NMDA Receptors and Brain Development. W Van Dongen AM (Red.), *Biology of the NMDA Receptor*. CRC Press/Taylor i Francis.
64. Eze, U. C., Bhaduri, A., Haeussler, M., Nowakowski, T. J. i Kriegstein, A. R. (2021). Single-cell atlas of early human brain development highlights heterogeneity of human neuroepithelial cells and early radial glia. *Nature Neuroscience*, 24(4), 584–594. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00794-1>
65. Feng, W. i Zhang, M. (2009). Organization and dynamics of PDZ-domain-related supramodules in the postsynaptic density. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(2), 87–99. <https://doi.org/10.1038/nrn2540>
66. Fernández-Barrera, J., Bernabé-Rubio, M., Casares-Arias, J., Rangel, L., Fernández-Martín, L., Correas, I. i Alonso, M. A. (2018). The actin-MRTF-SRF transcriptional circuit controls tubulin acetylation via  $\alpha$ -TAT1 gene expression. *The Journal of Cell Biology*, 217(3), 929–944. <https://doi.org/10.1083/jcb.201702157>
67. Ferrer-Ferrer, M. i Dityatev, A. (2018). Shaping Synapses by the Neural Extracellular Matrix. *Frontiers in Neuroanatomy*, 12, 40. <https://doi.org/10.3389/fnana.2018.00040>
68. Fiala, J. C., Feinberg, M., Popov, V. i Harris, K. M. (1998). Synaptogenesis Via Dendritic Filopodia in Developing Hippocampal Area CA1. *The Journal of Neuroscience*, 18(21), 8900–8911. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-21-08900.1998>



69. Frerking, M. i Nicoll, R. A. (2000). Synaptic kainate receptors. *Current Opinion in Neurobiology*, 10(3), 342–351. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00094-5](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00094-5)
70. Fukazawa, Y., Saitoh, Y., Ozawa, F., Ohta, Y., Mizuno, K. i Inokuchi, K. (2003). Hippocampal LTP Is Accompanied by Enhanced F-Actin Content within the Dendritic Spine that Is Essential for Late LTP Maintenance In Vivo. *Neuron*, 38(3), 447–460. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00206-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00206-X)
71. Funahashi, R., Maruyama, T., Yoshimura, Y. i Komatsu, Y. (2013). Silent synapses persist into adulthood in layer 2/3 pyramidal neurons of visual cortex in dark-reared mice. *Journal of Neurophysiology*, 109(8), 2064–2076. <https://doi.org/10.1152/jn.00912.2012>
72. Garey, L. (2010). When cortical development goes wrong: Schizophrenia as a neurodevelopmental disease of microcircuits. *Journal of Anatomy*, 217(4), 324–333. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2010.01231.x>
73. Ghani, M. U., Mesadi, F., Kanık, S. D., Argunşah, A. Ö., Hobbiss, A. F. israely, I., Ünay, D., Taşdizen, T. i Çetin, M. (2017). Dendritic spine classification using shape and appearance features based on two-photon microscopy. *Journal of Neuroscience Methods*, 279, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2016.12.006>
74. Gibson, D. A. i Ma, L. (2011). Developmental regulation of axon branching in the vertebrate nervous system. *Development*, 138(2), 183–195. <https://doi.org/10.1242/dev.046441>
75. Gineitis, D. i Treisman, R. (2001). Differential Usage of Signal Transduction Pathways Defines Two Types of Serum Response Factor Target Gene. *Journal of Biological Chemistry*, 276(27), 24531–24539. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102678200>
76. Glausier, J. R. i Lewis, D. A. (2013). Dendritic spine pathology in schizophrenia. *Neuroscience*, 251, 90–107. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.04.044>
77. Götz, M. i Huttner, W. B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(10), 777–788. <https://doi.org/10.1038/nrm1739>
78. Gray, N. W., Weimer, R. M., Bureau, I. i Svoboda, K. (2006). Rapid Redistribution of Synaptic PSD-95 in the Neocortex In Vivo. *PLoS Biology*, 4(11), e370. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040370>
79. Greenberg, M. E. i Ziff, E. B. (1984). Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature*, 311(5985), 433–438. <https://doi.org/10.1038/311433a0>
80. Grigston, J. C., VanDongen, H. M. A., McNamara II, J. O. i VanDongen, A. M. J. (2005).

Translation of an integral membrane protein in distal dendrites of hippocampal neurons. *European Journal of Neuroscience*, 21(6), 1457–1468. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.03999.x>

81. Gualdrini, F., Esnault, C., Horswell, S., Stewart, A., Matthews, N. i Treisman, R. (2016). SRF Co-factors Control the Balance between Cell Proliferation and Contractility. *Molecular Cell*, 64(6), 1048–1061. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.10.016>
82. Guo, Y., Jardin, B. D., Zhou, P., Sethi, I., Akerberg, B. N., Toepfer, C. N., Ai, Y., Li, Y., Ma, Q., Guatimosim, S., Hu, Y., Varuzhanyan, G., VanDusen, N. J., Zhang, D., Chan, D. C., Yuan, G.-C., Seidman, C. E., Seidman, J. G. i Pu, W. T. (2018). Hierarchical and stage-specific regulation of murine cardiomyocyte maturation by serum response factor. *Nature Communications*, 9(1), 3837. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06347-2>
83. Hackmann, K., Matko, S., Gerlach, E.-M., von der Hagen, M., Klink, B., Schrock, E., Rump, A. i Di Donato, N. (2013). Partial deletion of GLRB and GRIA2 in a patient with intellectual disability. *European Journal of Human Genetics*, 21(1), 112–114. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2012.97>
84. Hadden, W. J., Young, J. L., Holle, A. W., McFetridge, M. L., Kim, D. Y., Wijesinghe, P., Taylor-Weiner, H., Wen, J. H., Lee, A. R., Bieback, K., Vo, B.-N., Sampson, D. D., Kennedy, B. F., Spatz, J. P., Engler, A. J. i Choi, Y. S. (2017). Stem cell migration and mechanotransduction on linear stiffness gradient hydrogels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(22), 5647–5652. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618239114>
85. Han, K.-S., Cooke, S. F. i Xu, W. (2017). Experience-Dependent Equilibration of AMPAR-Mediated Synaptic Transmission during the Critical Period. *Cell Reports*, 18(4), 892–904. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.084>
86. Hanna, M., Liu, H., Amir, J., Sun, Y., Morris, S. W., Siddiqui, M. A. Q., Lau, L. F. i Chaqour, B. (2009). Mechanical Regulation of the Proangiogenic Factor CCN1/CYR61 Gene Requires the Combined Activities of MRTF-A and CREB-binding Protein Histone Acetyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 284(34), 23125–23136. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.019059>
87. Hansen, K. B., Yi, F., Perszyk, R. E., Menniti, F. S. i Traynelis, S. F. (2017). *NMDA Receptors in the Central Nervous System* (s. 1–80). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7321-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7321-7_1)
88. Harms, K. J. i Dunaevsky, A. (2007). Dendritic spine plasticity: Looking beyond development. *Brain Research*, 1184, 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.02.094>

89. Harris, K. i Stevens, J. (1989). Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: Serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *The Journal of Neuroscience*, 9(8), 2982–2997. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.09-08-02982.1989>
90. Hayashi, Y. i Majewska, A. K. (2005). Dendritic Spine Geometry: Functional Implication and Regulation. *Neuron*, 46(4), 529–532. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.05.006>
91. Hazlett, H. C., Gu, H., Munsell, B. C., Kim, S. H., Styner, M., Wolff, J. J., Elison, J. T., Swanson, M. R., Zhu, H., Botteron, K. N., Collins, D. L., Constantino, J. N., Dager, S. R., Estes, A. M., Evans, A. C., Fonov, V. S., Gerig, G., Kostopoulos, P., McKinstry, R. C., ... Piven, J. (2017). Early brain development in infants at high risk for autism spectrum disorder. *Nature*, 542(7641), 348–351. <https://doi.org/10.1038/nature21369>
92. Hebb, D. O. (1949). *The organization of behavior; a neuropsychological theory.* (Wiley, Red.).
93. Heidenreich, O., Neininger, A., Schrott, G., Zinck, R., Cahill, M. A., Engel, K., Kotlyarov, A., Kraft, R., Kostka, S., Gaestel, M. i Nordheim, A. (1999). MAPKAP Kinase 2 Phosphorylates Serum Response Factor in Vitro and in Vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 274(20), 14434–14443. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.20.14434>
94. Henley, J. M. i Wilkinson, K. A. (2016). Synaptic AMPA receptor composition in development, plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(6), 337–350. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.37>
95. Herdegen, T., Blume, A., Buschmann, T., Georgakopoulos, E., Winter, C., Schmid, W., Hsieh, T. F., Zimmermann, M. i Gass, P. (1997). Expression of activating transcription factor-2, serum response factor and cAMP/Ca response element binding protein in the adult rat brain following generalized seizures, nerve fibre lesion and ultraviolet irradiation. *Neuroscience*, 81(1), 199–212. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00170-X](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00170-X)
96. Hill, A. S., Sahay, A. i Hen, R. (2015). Increasing Adult Hippocampal Neurogenesis is Sufficient to Reduce Anxiety and Depression-Like Behaviors. *Neuropsychopharmacology*, 40(10), 2368–2378. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.85>
97. Hill, C. S., Wynne, J. i Treisman, R. (1995). The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hsregulate transcriptional activation by SRF. *Cell*, 81(7), 1159–1170. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(05\)80020-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(05)80020-0)
98. Hipp, L., Beer, J., Kuchler, O., Reisser, M., Sinske, D., Michaelis, J., Gebhardt, J. C. M. i

- Knöll, B. (2019). Single-molecule imaging of the transcription factor SRF reveals prolonged chromatin-binding kinetics upon cell stimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(3), 880–889. <https://doi.org/10.1073/pnas.1812734116>
99. Hirano, H. i Matsuura, Y. (2011). Sensing actin dynamics: Structural basis for G-actin-sensitive nuclear import of MAL. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 414(2), 373–378. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.09.079>
100. Hirschhorn, J. N. i Daly, M. J. (2005). Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nature Reviews Genetics*, 6(2), 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrg1521>
101. Hofer, S. B., Mrcic-Flogel, T. D., Bonhoeffer, T. i Hübener, M. (2009). Experience leaves a lasting structural trace in cortical circuits. *Nature*, 457(7227), 313–317. <https://doi.org/10.1038/nature07487>
102. Holt, R., Barnby, G., Maestrini, E., Bacchelli, E., Brocklebank, D., Sousa, I., Mulder, E. J., Kantojärvi, K., Järvelä, I., Klauck, S. M., Poustka, F., Bailey, A. J. i Monaco, A. P. (2010). Linkage and candidate gene studies of autism spectrum disorders in European populations. *European Journal of Human Genetics*, 18(9), 1013–1019. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2010.69>
103. Holtmaat, A. i Svoboda, K. (2009). Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nature reviews. Neuroscience*, 10(9), 647–658. <https://doi.org/10.1038/nrn2699>
104. Horton, A. C. i Ehlers, M. D. (2004). Secretory trafficking in neuronal dendrites. *Nature Cell Biology*, 6(7), 585–591. <https://doi.org/10.1038/ncb0704-585>
105. Huet, A., Parlakian, A., Arnaud, M.-C., Glandières, J.-M., Valat, P., Fermandjian, S., Paulin, D., Alpert, B. i Zentz, C. (2005). Mechanism of binding of serum response factor to serum response element. *FEBS Journal*, 272(12), 3105–3119. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04724.x>
106. Hutsler, J. J. i Zhang, H. (2010). Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders. *Brain Research*, 1309, 83–94. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.09.120>
107. Huttenlocher, P. H. (1979). Synaptic density in human frontal cortex—Developmental changes and effects of aging. *Brain Research*, 163(2), 195–205. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90349-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90349-4)
108. Ishikawa, M., Nishijima, N., Shiota, J., Sakagami, H., Tsuchida, K., Mizukoshi, M., Fukuchi, M., Tsuda, M. i Tabuchi, A. (2010). Involvement of the Serum Response

Factor Coactivator Megakaryoblastic Leukemia (MKL) in the Activin-regulated Dendritic Complexity of Rat Cortical Neurons\*. *Journal of Biological Chemistry*, 285(43), 32734–32743. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.118745>

109. Iyer, D., Chang, D., Marx, J., Wei, L., Olson, E. N., Parmacek, M. S., Balasubramanyam, A. i Schwartz, R. J. (2006). Serum response factor MADS box serine -162 phosphorylation switches proliferation and myogenic gene programs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(12), 4516–4521. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505338103>
110. Jain, M., Das, S., Lu, P. P. Y., Virmani, G., Soman, S., Thumu, S. C. R., Gutmann, D. H. i Ramanan, N. (2021). SRF Is Required for Maintenance of Astrocytes in Non-Reactive State in the Mammalian Brain. *Eneuro*, 8(1), ENEURO.0447-19.2020. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0447-19.2020>
111. Janknecht, R., Hipskind, R. A., Houthaeve, T., Nordheim, A. i Stunnenberg, H. G. (1992). Identification of multiple SRF N-terminal phosphorylation sites affecting DNA binding properties. *The EMBO journal*, 11(3), 1045–1054.
112. Jasińska, M., Miłek, J., Cymerman, I. A., Łęski, S., Kaczmarek, L. i Dziembowska, M. (2016). MiR-132 Regulates Dendritic Spine Structure by Direct Targeting of Matrix Metalloproteinase 9 mRNA. *Molecular Neurobiology*, 53(7), 4701–4712. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9383-z>
113. Jia, Z., Agopyan, N., Miu, P., Xiong, Z., Henderson, J., Gerlai, R., Taverna, F. A., Velumian, A., MacDonald, J., Carlen, P., Abramow-Newerly, W. i Roder, J. (1996). Enhanced LTP in Mice Deficient in the AMPA Receptor GluR2. *Neuron*, 17(5), 945–956. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80225-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80225-1)
114. Johansen, F.-E. i Prywes, R. (1995). Serum response factor: Transcriptional regulation of genes induced by growth factors and differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1242(1), 1–10. [https://doi.org/10.1016/0304-419X\(94\)00014-S](https://doi.org/10.1016/0304-419X(94)00014-S)
115. Johnson, C. M., Hill, C. S., Chawla, S., Treisman, R. i Bading, H. (1997). Calcium Controls Gene Expression via Three Distinct Pathways That Can Function Independently of the Ras/Mitogen-Activated Protein Kinases (ERKs) Signaling Cascade. *The Journal of Neuroscience*, 17(16), 6189–6202. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-16-06189.1997>
116. Jonas, P. (2000). The Time Course of Signaling at Central Glutamatergic Synapses. *Physiology*, 15(2), 83–89. <https://doi.org/10.1152/physiologyonline.2000.15.2.83>
117. Kaczmarek, L. i Chaudhuri, A. (1997). Sensory regulation of immediate–early

- gene expression in mammalian visual cortex: Implications for functional mapping and neural plasticity. *Brain Research Reviews*, 23(3), 237–256. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(97\)00005-2](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(97)00005-2)
118. Kalita, K., Kharebava, G., Zheng, J.-J. i Hetman, M. (2006). Role of Megakaryoblastic Acute Leukemia-1 in ERK1/2-Dependent Stimulation of Serum Response Factor-Driven Transcription by BDNF or Increased Synaptic Activity. *Journal of Neuroscience*, 26(39), 10020–10032. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2644-06.2006>
119. Kalita, K., Kuzniewska, B. i Kaczmarek, L. (2012). MKLs: Co-factors of serum response factor (SRF) in neuronal responses. *The International Journal of Biochemistry i Cell Biology*, 44(9), 1444–1447. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.05.008>
120. Kaneda, M., Sakagami, H., Hida, Y., Ohtsuka, T., Satou, N. ishibashi, Y., Fukuchi, M., Krysiak, A. ishikawa, M. ihara, D., Kalita, K. i Tabuchi, A. (2018). Synaptic localisation of SRF coactivators, MKL1 and MKL2, and their role in dendritic spine morphology. *Scientific Reports*, 8(1), 727. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18905-7>
121. Kanold, P. O., Deng, R. i Meng, X. (2019). The Integrative Function of Silent Synapses on Subplate Neurons in Cortical Development and Dysfunction. *Frontiers in Neuroanatomy*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnana.2019.00041>
122. Kasai, H., Fukuda, M., Watanabe, S., Hayashi-Takagi, A. i Noguchi, J. (2010). Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends in neurosciences*, 33(3), 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.01.001>
123. Kaufmann, W. E. i Moser, H. W. (2000). Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 10(10), 981–991. <https://doi.org/10.1093/cercor/10.10.981>
124. Kawashima, N., Takamiya, K., Sun, J., Kitabatake, A. i Sobue, K. (1997). Differential expression of isoforms of PSD-95 binding protein (GKAP/SAPAP1) during rat brain development <sup>1</sup>. *FEBS Letters*, 418(3), 301–304. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01399-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01399-9)
125. Kelava, I. i Lancaster, M. A. (2016). Dishing out mini-brains: Current progress and future prospects in brain organoid research. *Developmental Biology*, 420(2), 199–209. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.06.037>
126. Kemp, P. R. i Metcalfe, J. C. (2000). Four isoforms of serum response factor that increase or inhibit smooth-muscle-specific promoter activity. *The Biochemical journal*, 345 Pt 3, 445–451.

127. Kerchner, G. A. i Nicoll, R. A. (2008). Silent synapses and the emergence of a postsynaptic mechanism for LTP. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(11), 813–825. <https://doi.org/10.1038/nrn2501>
128. Kerrisk Campbell, M. i Sheng, M. (2018). USP8 Deubiquitinates SHANK3 to Control Synapse Density and SHANK3 Activity-Dependent Protein Levels. *The Journal of Neuroscience*, 38(23), 5289–5301. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3305-17.2018>
129. Keshavan, M. S., Diwadkar, V. A., DeBellis, M., Dick, E., Kotwal, R., Rosenberg, D. R., Sweeney, J. A., Minshew, N. i Pettegrew, J. W. (2002). Development of the corpus callosum in childhood, adolescence and early adulthood. *Life Sciences*, 70(16), 1909–1922. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(02\)01492-3](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(02)01492-3)
130. Kikuchi, K. ihara, D., Fukuchi, M., Tanabe, H. ishibashi, Y., Tsujii, J., Tsuda, M., Kaneda, M., Sakagami, H., Okuno, H., Bito, H., Yamazaki, Y. ishikawa, M. i Tabuchi, A. (2019). Involvement of SRF coactivator MKL2 in BDNF-mediated activation of the synaptic activity-responsive element in the *Arc* gene. *Journal of Neurochemistry*, 148(2), 204–218. <https://doi.org/10.1111/jnc.14596>
131. Kim, J., Jung, S.-C., Clemens, A. M., Petralia, R. S. i Hoffman, D. A. (2007). Regulation of Dendritic Excitability by Activity-Dependent Trafficking of the A-Type K<sup>+</sup> Channel Subunit Kv4.2 in Hippocampal Neurons. *Neuron*, 54(6), 933–947. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.05.026>
132. Kirkby, L. A., Sack, G. S., Firl, A. i Feller, M. B. (2013). A Role for Correlated Spontaneous Activity in the Assembly of Neural Circuits. *Neuron*, 80(5), 1129–1144. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.030>
133. Kitamura, T. i Inokuchi, K. (2014). Role of adult neurogenesis in hippocampal-cortical memory consolidation. *Molecular Brain*, 7(1), 13. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-7-13>
134. Knight, J. C. (2005). Regulatory polymorphisms underlying complex disease traits. *Journal of Molecular Medicine*, 83(2), 97–109. <https://doi.org/10.1007/s00109-004-0603-7>
135. Knöll, B., Kretz, O., Fiedler, C., Alberti, S., Schütz, G., Frotscher, M. i Nordheim, A. (2006). Serum response factor controls neuronal circuit assembly in the hippocampus. *Nature Neuroscience*, 9(2), 195–204. <https://doi.org/10.1038/nn1627>
136. Knöll, B. i Nordheim, A. (2009). Functional versatility of transcription factors in the nervous system: The SRF paradigm. *Trends in Neurosciences*, 32(8), 432–442. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.05.004>

137. Knudsen, E. I. (2004). Sensitive Periods in the Development of the Brain and Behavior. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 16(8), 1412–1425. <https://doi.org/10.1162/0898929042304796>
138. Kolomeets, N. S., Orlovskaya, D. D., Rachmanova, V. I. i Uranova, N. A. (2005). Ultrastructural alterations in hippocampal mossy fiber synapses in schizophrenia: A postmortem morphometric study. *Synapse*, 57(1), 47–55. <https://doi.org/10.1002/syn.20153>
139. Konopaske, G. T., Lange, N., Coyle, J. T. i Benes, F. M. (2014). Prefrontal Cortical Dendritic Spine Pathology in Schizophrenia and Bipolar Disorder. *JAMA Psychiatry*, 71(12), 1323. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2014.1582>
140. Konorski, J. (1948). *Conditioned reflexes and neuron organization*. Cambridge University Press.
141. Kopec, C. D., Li, B., Wei, W., Boehm, J. i Malinow, R. (2006). Glutamate receptor exocytosis and spine enlargement during chemically induced long-term potentiation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(7), 2000–2009. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3918-05.2006>
142. Koss, W. A., Belden, C. E., Hristov, A. D. i Juraska, J. M. (2014). Dendritic remodeling in the adolescent medial prefrontal cortex and the basolateral amygdala of male and female rats. *Synapse*, 68(2), 61–72. <https://doi.org/10.1002/syn.21716>
143. Kriegstein, A. i Alvarez-Buylla, A. (2009). The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells. *Annual Review of Neuroscience*, 32(1), 149–184. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135600>
144. Kristiansen, L. V., Beneyto, M., Haroutunian, V. i Meador-Woodruff, J. H. (2006). Changes in NMDA receptor subunits and interacting PSD proteins in dorsolateral prefrontal and anterior cingulate cortex indicate abnormal regional expression in schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 11(8), 737–747. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001844>
145. Kuzniewska, B., Nader, K., Dabrowski, M., Kaczmarek, L. i Kalita, K. (2016). Adult Deletion of SRF Increases Epileptogenesis and Decreases Activity-Induced Gene Expression. *Molecular Neurobiology*, 53(3), 1478–1493. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9089-7>
146. Kuzniewska, B., Rejmak, E., Malik, A. R., Jaworski, J., Kaczmarek, L. i Kalita, K. (2013). Brain-Derived Neurotrophic Factor Induces Matrix Metalloproteinase 9 Expression in Neurons via the Serum Response Factor/c-Fos Pathway. *Molecular*



- and Cellular Biology*, 33(11), 2149–2162. <https://doi.org/10.1128/MCB.00008-13>
147. Lai, M.-C., Lombardo, M. V. i Baron-Cohen, S. (2014). Autism. *The Lancet*, 383(9920), 896–910. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61539-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61539-1)
148. Lambert, J. T., Hill, T. C., Park, D. K., Culp, J. H. i Zito, K. (2017). Protracted and asynchronous accumulation of PSD95-family MAGUKs during maturation of nascent dendritic spines. *Developmental Neurobiology*, 77(10), 1161–1174. <https://doi.org/10.1002/dneu.22503>
149. Lefebvre, J. L. (2021). *Molecular mechanisms that mediate dendrite morphogenesis* (s. 233–282). <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2020.12.008>
150. Li, C. L., Sathyamurthy, A., Oldenborg, A., Tank, D. i Ramanan, N. (2014). SRF Phosphorylation by Glycogen Synthase Kinase-3 Promotes Axon Growth in Hippocampal Neurons. *Journal of Neuroscience*, 34(11), 4027–4042. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4677-12.2014>
151. Li, J., Zhu, X., Chen, M., Cheng, L., Zhou, D., Lu, M. M., Du, K., Epstein, J. A. i Parmacek, M. S. (2005). Myocardin-related transcription factor B is required in cardiac neural crest for smooth muscle differentiation and cardiovascular development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(25), 8916–8921. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503741102>
152. Li, M., Cui, Z., Niu, Y., Liu, B., Fan, W., Yu, D. i Deng, J. (2010). Synaptogenesis in the developing mouse visual cortex. *Brain Research Bulletin*, 81(1), 107–113. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2009.08.028>
153. Lim, S., Naisbitt, S., Yoon, J., Hwang, J.-I., Suh, P.-G., Sheng, M. i Kim, E. (1999). Characterization of the Shank Family of Synaptic Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 274(41), 29510–29518. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.41.29510>
154. Lin, B., Kramár, E. A., Bi, X., Brucher, F. A., Gall, C. M. i Lynch, G. (2005). Theta stimulation polymerizes actin in dendritic spines of hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(8), 2062–2069. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4283-04.2005>
155. Liu, S. H., Ma, J. T., Yueh, A. Y., Lees-Miller, S. P., Anderson, C. W. i Ng, S. Y. (1993). The carboxyl-terminal transactivation domain of human serum response factor contains DNA-activated protein kinase phosphorylation sites. *The Journal of biological chemistry*, 268(28), 21147–21154.
156. Lohmann, C. i Kessels, H. W. (2014). The developmental stages of synaptic plasticity. *The Journal of Physiology*, 592(1), 13–31. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.235119>

157. Lösing, P., Nituread, C. E., Harrer, M., Reckendorf, C. M. zu, Schatz, T., Sinske, D., Lerche, H., Maljevic, S. i Knöll, B. (2017). SRF modulates seizure occurrence, activity induced gene transcription and hippocampal circuit reorganization in the mouse pilocarpine epilepsy model. *Molecular Brain*, 10(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s13041-017-0310-2>
158. Lu, P. P. Y. i Ramanan, N. (2012). A Critical Cell-Intrinsic Role for Serum Response Factor in Glial Specification in the CNS. *Journal of Neuroscience*, 32(23), 8012–8023. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5633-11.2012>
159. Luo, X., Huang, L., Oord, E. J. van den, Aberg, K. A., Gan, L., Zhao, Z. i Yao, Y.-G. (2015). Common Variants in the MKL1 Gene Confer Risk of Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 41(3), 715–727. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbu156>
160. Lynch, G. S., Dunwiddie, T. i Gribkoff, V. (1977). Heterosynaptic depression: A postsynaptic correlate of long-term potentiation. *Nature*, 266(5604), 737–739. <https://doi.org/10.1038/266737a0>
161. MacDonald, M. L., Alhassan, J., Newman, J. T., Richard, M., Gu, H., Kelly, R. M., Sampson, A. R., Fish, K. N., Penzes, P., Wills, Z. P., Lewis, D. A. i Sweet, R. A. (2017). Selective Loss of Smaller Spines in Schizophrenia. *American Journal of Psychiatry*, 174(6), 586–594. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2017.16070814>
162. Maiti, P., Manna, J. ilavazhagan, G., Rossignol, J. i Dunbar, G. L. (2015). Molecular regulation of dendritic spine dynamics and their potential impact on synaptic plasticity and neurological diseases. *Neuroscience i Biobehavioral Reviews*, 59, 208–237. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.09.020>
163. Maletic-Savatic, M., Malinow, R. i Svoboda, K. (1999). Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science (New York, N.Y.)*, 283(5409), 1923–1927. <https://doi.org/10.1126/science.283.5409.1923>
164. Manak, J. R. i Prywes, R. (1993). Phosphorylation of serum response factor by casein kinase II: evidence against a role in growth factor regulation of fos expression. *Oncogene*, 8(3), 703–711.
165. Martínez-Cerdeño, V. (2017). Dendrite and spine modifications in autism and related neurodevelopmental disorders in patients and animal models: Dendrite and Spine in Autism. *Developmental Neurobiology*, 77(4), 393–404. <https://doi.org/10.1002/dneu.22417>
166. Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G. C. R., Nemoto, T., Miyashita, Y. iino, M. i Kasai, H. (2001). Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nature Neuroscience*, 4(11), 1086–1092.

<https://doi.org/10.1038/nn736>

167. Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G. C. R. i Kasai, H. (2004). Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature*, 429(6993), 761–766. <https://doi.org/10.1038/nature02617>
168. McBride, K. M., Banninger, G., McDonald, C. i Reich, N. C. (2002). Regulated nuclear import of the STAT1 transcription factor by direct binding of importin-alpha. *The EMBO Journal*, 21(7), 1754–1763. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.7.1754>
169. McCullumsmith, R. E., Hammond, J. H., Shan, D. i Meador-Woodruff, J. H. (2014). Postmortem Brain: An Underutilized Substrate for Studying Severe Mental Illness. *Neuropsychopharmacology*, 39(1), 65–87. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.239>
170. McCullumsmith, R. E., Kristiansen, L. V., Beneyto, M., Scarr, E., Dean, B. i Meador-Woodruff, J. H. (2007). Decreased NR1, NR2A, and SAP102 transcript expression in the hippocampus in bipolar disorder. *Brain Research*, 1127, 108–118. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.09.011>
171. McKay, S., Ryan, T. J., McQueen, J. indersmitten, T., Marwick, K. F. M., Hasel, P., Kopanitsa, M. V., Baxter, P. S., Martel, M.-A., Kind, P. C., Wyllie, D. J. A., O'Dell, T. J., Grant, S. G. N., Hardingham, G. E. i Komiyama, N. H. (2018). The Developmental Shift of NMDA Receptor Composition Proceeds Independently of GluN2 Subunit-Specific GluN2 C-Terminal Sequences. *Cell Reports*, 25(4), 841-851.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.09.089>
172. Meador-Woodruff, J. H., Hogg, A. J. i Smith, R. E. (2001). Striatal ionotropic glutamate receptor expression in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. *Brain Research Bulletin*, 55(5), 631–640. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(01\)00523-8](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(01)00523-8)
173. Meyer zu Reckendorf, C., Anastasiadou, S., Bachhuber, F., Franz-Wachtel, M., Macek, B. i Knöll, B. (2016). Proteomic analysis of SRF associated transcription complexes identified TFII-I as modulator of SRF function in neurons. *European Journal of Cell Biology*, 95(1), 42–56. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2015.11.002>
174. Miano, J. M. (2010). Role of serum response factor in the pathogenesis of disease. *Laboratory Investigation*, 90(9), 1274–1284. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2010.104>
175. Miano, J. M., Long, X. i Fujiwara, K. (2007). Serum response factor: Master regulator of the actin cytoskeleton and contractile apparatus. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 292(1), C70–C81. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00386.2006>

176. Miller, M. i Peters, A. (1981). Maturation of rat visual cortex. II. A combined Golgi-electron microscope study of pyramidal neurons. *The Journal of Comparative Neurology*, 203(4), 555–573. <https://doi.org/10.1002/cne.902030402>
177. Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A.-I. i Treisman, R. (2003). Actin Dynamics Control SRF Activity by Regulation of Its Coactivator MAL. *Cell*, 113(3), 329–342. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00278-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00278-2)
178. Miranti, C. K., Ginty, D. D., Huang, G., Chatila, T. i Greenberg, M. E. (1995). Calcium activates serum response factor-dependent transcription by a Ras- and Elk-1-independent mechanism that involves a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase. *Molecular and Cellular Biology*, 15(7), 3672–3684. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.7.3672>
179. Modak, C. i Chai, J. (2010). Serum response factor: Look into the gut. *World journal of gastroenterology*, 16(18), 2195–2201. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i18.2195>
180. Mokalled, M. H., Johnson, A., Kim, Y., Oh, J. i Olson, E. N. (2010). Myocardin-related transcription factors regulate the Cdk5/Pctaire1 kinase cascade to control neurite outgrowth, neuronal migration and brain development. *Development*, 137(14), 2365–2374. <https://doi.org/10.1242/dev.047605>
181. Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D. J., Sakmann, B. i Seeburg, P. H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*, 12(3), 529–540. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90210-0](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90210-0)
182. Mouilleron, S., Wiezlak, M., O'Reilly, N., Treisman, R. i McDonald, N. Q. (2012). Structures of the Phactr1 RPEL Domain and RPEL Motif Complexes with G-Actin Reveal the Molecular Basis for Actin Binding Cooperativity. *Structure*, 20(11), 1960–1970. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.08.031>
183. Muehlich, S., Wang, R., Lee, S.-M., Lewis, T. C., Dai, C. i Prywes, R. (2008). Serum-Induced Phosphorylation of the Serum Response Factor Coactivator MKL1 by the Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Pathway Inhibits Its Nuclear Localization. *Molecular and Cellular Biology*, 28(20), 6302–6313. <https://doi.org/10.1128/MCB.00427-08>
184. Murakoshi, H. i Yasuda, R. (2012). Postsynaptic signaling during plasticity of dendritic spines. *Trends in Neurosciences*, 35(2), 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.12.002>
185. Nader, K., Krysiak, A., Beroun, A., Pekala, M., Szymanska, M., Kuzniewska, B., Radwanska, K., Kaczmarek, L. i Kalita, K. (2019). Loss of serum response factor in

- mature neurons in the dentate gyrus alters the morphology of dendritic spines and hippocampus-dependent behavioral tasks. *Brain Structure and Function*, 224(8), 2691–2701. <https://doi.org/10.1007/s00429-019-01925-6>
186. Nägerl, U. V., Eberhorn, N., Cambridge, S. B. i Bonhoeffer, T. (2004). Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. *Neuron*, 44(5), 759–767. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.11.016>
187. Neale, B. M., Kou, Y., Liu, L., Ma'ayan, A., Samocha, K. E., Sabo, A., Lin, C.-F., Stevens, C., Wang, L.-S., Makarov, V., Polak, P., Yoon, S., Maguire, J., Crawford, E. L., Campbell, N. G., Geller, E. T., Valladares, O., Schafer, C., Liu, H., ... Daly, M. J. (2012). Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders. *Nature*, 485(7397), 242–245. <https://doi.org/10.1038/nature11011>
188. Negri, J., Menon, V. i Young-Pearse, T. L. (2020). Assessment of Spontaneous Neuronal Activity *In Vitro* Using Multi-Well Multi-Electrode Arrays: Implications for Assay Development. *Eneuro*, 7(1), ENEURO.0080-19.2019. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0080-19.2019>
189. Nikolaienko, O., Patil, S., Eriksen, M. S. i Bramham, C. R. (2018). Arc protein: A flexible hub for synaptic plasticity and cognition. *Seminars in Cell i Developmental Biology*, 77, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.09.006>
190. Nissen, L. J., Gelly, J.-C. i Hipskind, R. A. (2001). Induction-independent Recruitment of CREB-binding Protein to the c-fos Serum Response Element through Interactions between the Bromodomain and Elk-1. *Journal of Biological Chemistry*, 276(7), 5213–5221. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007824200>
191. Norman, C., Runswick, M., Pollock, R. i Treisman, R. (1988). Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element. *Cell*, 55(6), 989–1003. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90244-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90244-9)
192. Nurrish, S. J. i Treisman, R. (1995). DNA binding specificity determinants in MADS-box transcription factors. *Molecular and Cellular Biology*, 15(8), 4076–4085. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.8.4076>
193. O'Brien, J. i Unwin, N. (2006). Organization of spines on the dendrites of Purkinje cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(5), 1575–1580. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507884103>
194. Oertner, T. G. i Matus, A. (2005). Calcium regulation of actin dynamics in dendritic spines. *Cell Calcium*, 37(5), 477–482. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2005.01.016>

195. Oh, J., Richardson, J. A. i Olson, E. N. (2005). Requirement of myocardin-related transcription factor-B for remodeling of branchial arch arteries and smooth muscle differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(42), 15122–15127. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507346102>
196. Okamura, H., Aramburu, J., García-Rodríguez, C., Viola, J. P. B., Raghavan, A., Tahiliani, M., Zhang, X., Qin, J., Hogan, P. G. i Rao, A. (2000). Concerted Dephosphorylation of the Transcription Factor NFAT1 Induces a Conformational Switch that Regulates Transcriptional Activity. *Molecular Cell*, 6(3), 539–550. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00053-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00053-8)
197. Olson, E. N. i Nordheim, A. (2010). Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(5), 353–365. <https://doi.org/10.1038/nrm2890>
198. Opazo, P., Sainlos, M. i Choquet, D. (2012). Regulation of AMPA receptor surface diffusion by PSD-95 slots. *Current Opinion in Neurobiology*, 22(3), 453–460. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.10.010>
199. Orner, D. A., Chen, C.-C., Orner, D. E. i Brumberg, J. C. (2014). Alterations of dendritic protrusions over the first postnatal year of a mouse: An analysis in layer VI of the barrel cortex. *Brain Structure and Function*, 219(5), 1709–1720. <https://doi.org/10.1007/s00429-013-0596-5>
200. Ostroff, L. E., Fiala, J. C., Allwardt, B. i Harris, K. M. (2002). Polyribosomes Redistribute from Dendritic Shafts into Spines with Enlarged Synapses during LTP in Developing Rat Hippocampal Slices. *Neuron*, 35(3), 535–545. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00785-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00785-7)
201. Ouyang, Y., Wong, M., Capani, F., Rensing, N., Lee, C.-S., Liu, Q., Neusch, C., Martone, M. E., Wu, J. Y., Yamada, K., Ellisman, M. H. i Choi, D. W. (2005). Transient decrease in F-actin may be necessary for translocation of proteins into dendritic spines. *European Journal of Neuroscience*, 22(12), 2995–3005. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04521.x>
202. Pan, F., Aldridge, G. M., Greenough, W. T. i Gan, W.-B. (2010). Dendritic spine instability and insensitivity to modulation by sensory experience in a mouse model of fragile X syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(41), 17768–17773. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012496107>
203. Panayiotou, R., Miralles, F., Pawlowski, R., Diring, J., Flynn, H. R., Skehel, M. i Treisman, R. (2016). Phosphorylation acts positively and negatively to regulate MRTF-A subcellular localisation and activity. *eLife*, 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.15460>

204. Paoletti, P., Bellone, C. i Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: Impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *14*(6), 383–400. <https://doi.org/10.1038/nrn3504>
205. Papa, M., Bundman, M., Greenberger, V. i Segal, M. (1995). Morphological analysis of dendritic spine development in primary cultures of hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience*, *15*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-01-00001.1995>
206. Park, M., Salgado, J. M., Ostroff, L., Helton, T. D., Robinson, C. G., Harris, K. M. i Ehlers, M. D. (2006). Plasticity-Induced Growth of Dendritic Spines by Exocytic Trafficking from Recycling Endosomes. *Neuron*, *52*(5), 817–830. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.09.040>
207. Parkitna, J. R., Bilbao, A., Rieker, C., Engblom, D., Piechota, M., Nordheim, A., Spanagel, R. i Schütz, G. (2010). Loss of the serum response factor in the dopamine system leads to hyperactivity. *The FASEB Journal*, *24*(7), 2427–2435. <https://doi.org/10.1096/fj.09-151423>
208. Passafaro, M., Nakagawa, T., Sala, C. i Sheng, M. (2003). Induction of dendritic spines by an extracellular domain of AMPA receptor subunit GluR2. *Nature*, *424*(6949), 677–681. <https://doi.org/10.1038/nature01781>
209. Pawłowski, R., Rajakylä, E. K., Vartiainen, M. K. i Treisman, R. (2010). An actin-regulated importin  $\alpha/\beta$ -dependent extended bipartite NLS directs nuclear import of MRTF-A. *The EMBO Journal*, *29*(20), 3448–3458. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.216>
210. Pchitskaya, E. i Bezprozvanny, I. (2020). Dendritic Spines Shape Analysis—Classification or Clusterization? Perspective. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, *12*, 31. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2020.00031>
211. Peebles, C. L., Yoo, J., Thwin, M. T., Palop, J. J., Noebels, J. L. i Finkbeiner, S. (2010). Arc regulates spine morphology and maintains network stability in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(42), 18173–18178. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006546107>
212. Pennypacker, K. R. (1995). AP-1 transcription factor complexes in CNS disorders and development. *The Journal of the Florida Medical Association*, *82*(8), 551–554.
213. Penzes, P., Cahill, M. E., Jones, K. A., VanLeeuwen, J.-E. i Woolfrey, K. M. (2011). Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nature Neuroscience*, *14*(3), 285–293. <https://doi.org/10.1038/nn.2741>

214. Penzes, P. i Rafalovich, I. (2012). *Regulation of the Actin Cytoskeleton in Dendritic Spines* (s. 81–95). [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0932-8\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0932-8_4)
215. Petanjek, Z., Judaš, M., Šimić, G., Rašin, M. R., Uylings, H. B. M., Rakic, P. i Kostović, I. (2011). Extraordinary neoteny of synaptic spines in the human prefrontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(32), 13281–13286. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105108108>
216. Petralia, R. S., Sans, N., Wang, Y.-X. i Wenthold, R. J. (2005). Ontogeny of postsynaptic density proteins at glutamatergic synapses. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 29(3), 436–452. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2005.03.013>
217. Pickard, L., Noël, J., Henley, J. M., Collingridge, G. L. i Molnar, E. (2000). Developmental Changes in Synaptic AMPA and NMDA Receptor Distribution and AMPA Receptor Subunit Composition in Living Hippocampal Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 20(21), 7922–7931. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-21-07922.2000>
218. Pierri, J. N., Volk, C. L. E., Auh, S., Sampson, A. i Lewis, D. A. (2001). Decreased Somal Size of Deep Layer 3 Pyramidal Neurons in the Prefrontal Cortex of Subjects With Schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*, 58(5), 466. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.58.5.466>
219. Pin, J.-P. i Acher, F. (2002). The Metabotropic Glutamate Receptors: Structure, Activation Mechanism and Pharmacology. *Current Drug Target -CNS i Neurological Disorders*, 1(3), 297–317. <https://doi.org/10.2174/1568007023339328>
220. Pinheiro, P. S. i Mulle, C. (2008). Presynaptic glutamate receptors: Physiological functions and mechanisms of action. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(6), 423–436. <https://doi.org/10.1038/nrn2379>
221. Posern, G. i Treisman, R. (2006). Actin' together: Serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction. *Trends in Cell Biology*, 16(11), 588–596. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.09.008>
222. Puścian, A., Łęski, S., Kasprowicz, G., Winiarski, M., Borowska, J., Nikolaev, T., Boguszewski, P. M., Lipp, H.-P. i Knapska, E. (2016). Eco-HAB as a fully automated and ecologically relevant assessment of social impairments in mouse models of autism. *ELife*, 5, e19532. <https://doi.org/10.7554/eLife.19532>
223. Ramakers, G. J. A. (2002). Rho proteins, mental retardation and the cellular basis of cognition. *Trends in Neurosciences*, 25(4), 191–199. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)02118-4](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)02118-4)
224. Ramanan, N., Shen, Y., Sarsfield, S., Lemberger, T., Schütz, G., Linden, D. J. i Ginty,



- D. D. (2005). SRF mediates activity-induced gene expression and synaptic plasticity but not neuronal viability. *Nature Neuroscience*, 8(6), 759–767. <https://doi.org/10.1038/nn1462>
225. Ramos, Y. F. M., Hestand, M. S., Verlaan, M., Krabbendam, E., Ariyurek, Y., van Galen, M., van Dam, H., van Ommen, G.-J. B., den Dunnen, J. T., Zantema, A. i 't Hoen, P. A. C. (2010). Genome-wide assessment of differential roles for p300 and CBP in transcription regulation. *Nucleic Acids Research*, 38(16), 5396–5408. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq184>
226. Rieker, C., Schober, A., Bilbao, A., Schütz, G. i Parkitna, J. R. (2012). Ablation of serum response factor in dopaminergic neurons exacerbates susceptibility towards MPTP-induced oxidative stress: Ablation of SRF in dopaminergic neurons. *European Journal of Neuroscience*, 35(5), 735–741. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08003.x>
227. Rodríguez-Tornos, F. M., San Aniceto, I., Cubelos, B. i Nieto, M. (2013). Enrichment of Conserved Synaptic Activity-Responsive Element in Neuronal Genes Predicts a Coordinated Response of MEF2, CREB and SRF. *PLoS ONE*, 8(1), e53848. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053848>
228. Roszkowska, M., Krysiak, A., Majchrowicz, L., Nader, K., Beroun, A., Michaluk, P., Pekala, M., Jaworski, J., Kondrakiewicz, L., Puścian, A., Knapska, E., Kaczmarek, L. i Kalita, K. (2022). SRF depletion in early life contributes to social interaction deficits in the adulthood. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 79(5), 278. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04291-5>
229. Runge, K., Cardoso, C. i de Chevigny, A. (2020). Dendritic Spine Plasticity: Function and Mechanisms. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 12, 36. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2020.00036>
230. Ruszczycki, B., Szepesi, Z., Wilczynski, G. M., Bijata, M., Kalita, K., Kaczmarek, L. i Wlodarczyk, J. (2012). Sampling issues in quantitative analysis of dendritic spines morphology. *BMC Bioinformatics*, 13(1), 213. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-213>
231. Sabatini, B. L., Maravall, M. i Svoboda, K. (2001). Ca<sup>2+</sup> signaling in dendritic spines. *Current Opinion in Neurobiology*, 11(3), 349–356. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00218-X](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00218-X)
232. Sachidhanandam, S., Blanchet, C., Jeantet, Y., Cho, Y. H. i Mulle, C. (2009). Kainate Receptors Act as Conditional Amplifiers of Spike Transmission at Hippocampal Mossy Fiber Synapses. *Journal of Neuroscience*, 29(15), 5000–5008. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5807-08.2009>

233. Saglietti, L., Dequidt, C., Kamieniarz, K., Rousset, M.-C., Valnegri, P., Thoumine, O., Beretta, F., Fagni, L., Choquet, D., Sala, C., Sheng, M. i Passafaro, M. (2007). Extracellular Interactions between GluR2 and N-Cadherin in Spine Regulation. *Neuron*, 54(3), 461–477. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.04.012>
234. Sala, C., Piëch, V., Wilson, N. R., Passafaro, M., Liu, G. i Sheng, M. (2001). Regulation of Dendritic Spine Morphology and Synaptic Function by Shank and Homer. *Neuron*, 31(1), 115–130. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00339-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00339-7)
235. Sala, C. i Segal, M. (2014). Dendritic spines: The locus of structural and functional plasticity. *Physiological reviews*, 94(1), 141–188. <https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2013>
236. Salpietro, V., Dixon, C. L., Guo, H., Bello, O. D., Vandrovcova, J., Efthymiou, S., Maroofian, R., Heimer, G., Burglen, L., Valence, S., Torti, E., Hacke, M., Rankin, J., Tariq, H., Colin, E., Procaccio, V., Striano, P., Mankad, K., Lieb, A., ... Houlden, H. (2019). AMPA receptor GluA2 subunit defects are a cause of neurodevelopmental disorders. *Nature Communications*, 10(1), 3094. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10910-w>
237. Sans, N., Vissel, B., Petralia, R. S., Wang, Y.-X., Chang, K., Royle, G. A., Wang, C.-Y., O’Gorman, S., Heinemann, S. F. i Wenthold, R. J. (2003). Aberrant Formation of Glutamate Receptor Complexes in Hippocampal Neurons of Mice Lacking the GluR2 AMPA Receptor Subunit. *The Journal of Neuroscience*, 23(28), 9367–9373. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-28-09367.2003>
238. Schelski, M. i Bradke, F. (2017). Neuronal polarization: From spatiotemporal signaling to cytoskeletal dynamics. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 84, 11–28. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2017.03.008>
239. Schikorski, T. i Stevens, C. F. (1999). Quantitative fine-structural analysis of olfactory cortical synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(7), 4107–4112. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.4107>
240. Schnell, E., Sizemore, M., Karimzadegan, S., Chen, L., Bredt, D. S. i Nicoll, R. A. (2002). Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(21), 13902–13907. <https://doi.org/10.1073/pnas.172511199>
241. Schratt, G., Philippar, U., Berger, J., Schwarz, H., Heidenreich, O. i Nordheim, A. (2002). Serum response factor is crucial for actin cytoskeletal organization and focal adhesion assembly in embryonic stem cells. *Journal of Cell Biology*, 156(4), 737–750. <https://doi.org/10.1083/jcb.200106008>

242. Schroeter, M. L., Abdul-Khaliq, H., Sacher, J., Steiner, J., Blasig, I. E. i Mueller, K. (2010). Mood Disorders Are Glial Disorders: Evidence from *In Vivo* Studies. *Cardiovascular Psychiatry and Neurology*, 2010, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2010/780645>
243. Schumann, C. M., Bloss, C. S., Barnes, C. C., Wideman, G. M., Carper, R. A., Akshoomoff, N., Pierce, K., Hagler, D., Schork, N., Lord, C. i Courchesne, E. (2010). Longitudinal Magnetic Resonance Imaging Study of Cortical Development through Early Childhood in Autism. *Journal of Neuroscience*, 30(12), 4419–4427. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5714-09.2010>
244. Selvaraj, A. i Prywes, R. (2004). Expression profiling of serum inducible genes identifies a subset of SRF target genes that are MKL dependent. *BMC molecular biology*, 5, 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-5-13>
245. Serrano, M. E., Kim, E., Petrinovic, M. M., Turkheimer, F. i Cash, D. (2022). Imaging Synaptic Density: The Next Holy Grail of Neuroscience? *Frontiers in Neuroscience*, 16, 796129. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.796129>
246. Shaw, P. E., Schröter, H. i Nordheim, A. (1989). The ability of a ternary complex to form over the serum response element correlates with serum inducibility of the human c-fos promoter. *Cell*, 56(4), 563–572. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90579-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90579-5)
247. Sheng, M. i Kim, E. (2011). The Postsynaptic Organization of Synapses. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(12), a005678–a005678. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005678>
248. Shepherd, J. D., Rumbaugh, G., Wu, J., Chowdhury, S., Plath, N., Kuhl, D., Huganir, R. L. i Worley, P. F. (2006). Arc/Arg3.1 Mediates Homeostatic Synaptic Scaling of AMPA Receptors. *Neuron*, 52(3), 475–484. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.08.034>
249. Silbereis, J. C., Pochareddy, S., Zhu, Y., Li, M. i Sestan, N. (2016). The Cellular and Molecular Landscapes of the Developing Human Central Nervous System. *Neuron*, 89(2), 248–268. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.12.008>
250. Smith-Hicks, C., Xiao, B., Deng, R., Ji, Y., Zhao, X., Shepherd, J. D., Posern, G., Kuhl, D., Huganir, R. L., Ginty, D. D., Worley, P. F. i Linden, D. J. (2010). SRF binding to SRE 6.9 in the Arc promoter is essential for LTD in cultured Purkinje cells. *Nature Neuroscience*, 13(9), 1082–1089. <https://doi.org/10.1038/nn.2611>
251. Song, I. i Dityatev, A. (2018). Crosstalk between glia, extracellular matrix and neurons. *Brain research bulletin*, 136, 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.03.003>

252. Sotelo, C. (1978). *Purkinje Cell Ontogeny: Formation and Maintenance of Spines* (s. 149–170). [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)61021-3](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)61021-3)
253. Spacek, J. i Harris, K. M. (1997). Three-Dimensional Organization of Smooth Endoplasmic Reticulum in Hippocampal CA1 Dendrites and Dendritic Spines of the Immature and Mature Rat. *The Journal of Neuroscience*, *17*(1), 190–203. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-01-00190.1997>
254. Stein, I. S. i Zito, K. (2019). Dendritic Spine Elimination: Molecular Mechanisms and Implications. *The Neuroscientist*, *25*(1), 27–47. <https://doi.org/10.1177/1073858418769644>
255. Stepanek, J., Vincent, M., Turpin, P.-Y., Paulin, D., Femandjian, S., Alpert, B. i Zentz, C. (2007). C→G base mutations in the CArG box of c-fos serum response element alter its bending flexibility. *FEBS Journal*, *274*(9), 2333–2348. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05768.x>
256. Stern, S., Debre, E., Stritt, C., Berger, J., Posern, G. i Knoll, B. (2009). A Nuclear Actin Function Regulates Neuronal Motility by Serum Response Factor-Dependent Gene Transcription. *Journal of Neuroscience*, *29*(14), 4512–4518. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0333-09.2009>
257. Stringer, J. L., Belaguli, N. S. iyer, D., Schwartz, R. J. i Balasubramanyam, A. (2002). Developmental expression of serum response factor in the rat central nervous system. *Brain Research. Developmental Brain Research*, *138*(1), 81–86. [https://doi.org/10.1016/s0165-3806\(02\)00467-4](https://doi.org/10.1016/s0165-3806(02)00467-4)
258. Stritt, C. i Knöll, B. (2010). Serum Response Factor Regulates Hippocampal Lamination and Dendrite Development and Is Connected with Reelin Signaling. *Molecular and Cellular Biology*, *30*(7), 1828–1837. <https://doi.org/10.1128/MCB.01434-09>
259. Südhof, T. C. i Malenka, R. C. (2008). Understanding Synapses: Past, Present, and Future. *Neuron*, *60*(3), 469–476. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.011>
260. Sun, Q., Chen, G., Streb, J. W., Long, X., Yang, Y., Stoeckert, C. J. i Miano, J. M. (2006). Defining the mammalian CArGome. *Genome Research*, *16*(2), 197–207. <https://doi.org/10.1101/gr.4108706>
261. Sweet, R. A., Bergen, S. E., Sun, Z., Sampson, A. R., Pierri, J. N. i Lewis, D. A. (2004). Pyramidal cell size reduction in schizophrenia: Evidence for involvement of auditory feedforward circuits. *Biological Psychiatry*, *55*(12), 1128–1137. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.03.002>
262. Sweet, R. A., Henteleff, R. A., Zhang, W., Sampson, A. R. i Lewis, D. A. (2009).

- Reduced Dendritic Spine Density in Auditory Cortex of Subjects with Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 34(2), 374–389. <https://doi.org/10.1038/npp.2008.67>
263. Takumi, T., Tamada, K., Hatanaka, F., Nakai, N. i Bolton, P. F. (2020). Behavioral neuroscience of autism. *Neuroscience i Biobehavioral Reviews*, 110, 60–76. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.04.012>
264. Tan, H. L., Queenan, B. N. i Huganir, R. L. (2015). GRIP1 is required for homeostatic regulation of AMPAR trafficking. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(32), 10026–10031. <https://doi.org/10.1073/pnas.1512786112>
265. Tanaka, J., Horiike, Y., Matsuzaki, M., Miyazaki, T., Ellis-Davies, G. C. R. i Kasai, H. (2008). Protein Synthesis and Neurotrophin-Dependent Structural Plasticity of Single Dendritic Spines. *Science*, 319(5870), 1683–1687. <https://doi.org/10.1126/science.1152864>
266. Tang, G., Gudsnuik, K., Kuo, S.-H., Cotrina, M. L., Rosoklija, G., Sosunov, A., Sonders, M. S., Kanter, E., Castagna, C., Yamamoto, A., Yue, Z., Arancio, O., Peterson, B. S., Champagne, F., Dwork, A. J., Goldman, J. i Sulzer, D. (2014). Loss of mTOR-Dependent Macroautophagy Causes Autistic-like Synaptic Pruning Deficits. *Neuron*, 83(5), 1131–1143. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.07.040>
267. Tien, N.-W. i Kerschensteiner, D. (2018). Homeostatic plasticity in neural development. *Neural development*, 13(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s13064-018-0105-x>
268. Tierney, A. L. i Nelson, C. A. (2009). Brain Development and the Role of Experience in the Early Years. *Zero to three*, 30(2), 9–13.
269. Tønnesen, J., Katona, G., Rózsa, B. i Nägerl, U. V. (2014). Spine neck plasticity regulates compartmentalization of synapses. *Nature Neuroscience*, 17(5), 678–685. <https://doi.org/10.1038/nn.3682>
270. Tønnesen, J. i Nägerl, U. V. (2016). Dendritic Spines as Tunable Regulators of Synaptic Signals. *Frontiers in psychiatry*, 7, 101. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2016.00101>
271. Toresson, H. i Grant, S. G. N. (2005). Dynamic distribution of endoplasmic reticulum in hippocampal neuron dendritic spines. *European Journal of Neuroscience*, 22(7), 1793–1798. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04342.x>
272. Tracy, T. E., Yan, J. J. i Chen, L. (2011). Acute knockdown of AMPA receptors reveals a trans-synaptic signal for presynaptic maturation: AMPA receptor

- modulates presynaptic maturation. *The EMBO Journal*, 30(8), 1577–1592. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.59>
273. Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., Hansen, K. B., Yuan, H., Myers, S. J. i Dingledine, R. (2010). Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacological Reviews*, 62(3), 405–496. <https://doi.org/10.1124/pr.109.002451>
274. Treisman, R. (1986). Identification of a protein-binding site that mediates transcriptional response of the c-fos gene to serum factors. *Cell*, 46(4), 567–574. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90882-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90882-2)
275. Treisman, R. (1987). Identification and purification of a polypeptide that binds to the c-fos serum response element. *The EMBO journal*, 6(9), 2711–2717.
276. Tsuzuki, K., Lambolez, B., Rossier, J. i Ozawa, S. (2001). Absolute quantification of AMPA receptor subunit mRNAs in single hippocampal neurons. *Journal of Neurochemistry*, 77(6), 1650–1659. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00388.x>
277. Turrigiano, G. G. (2008). The Self-Tuning Neuron: Synaptic Scaling of Excitatory Synapses. *Cell*, 135(3), 422–435. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.008>
278. Turrigiano, G. G., Leslie, K. R., Desai, N. S., Rutherford, L. C. i Nelson, S. B. (1998). Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature*, 391(6670), 892–896. <https://doi.org/10.1038/36103>
279. Turrigiano, G. G. i Nelson, S. B. (2004). Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(2), 97–107. <https://doi.org/10.1038/nrn1327>
280. Tyan, S.-W., Tsai, M.-C., Lin, C.-L., Ma, Y.-L. i Lee, E. H. Y. (2008). Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 enhances zif268 expression through the mediation of SRF and CREB1 associated with spatial memory formation. *Journal of Neurochemistry*, 105(3), 820–832. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05186.x>
281. Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., Olsson, I., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szigartyo, C. A.-K., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J. O., Hober, S., ... Pontén, F. (2015). Tissue-based map of the human proteome. *Science*, 347(6220). <https://doi.org/10.1126/science.1260419>
282. Valiullina, F., Akhmetshina, D., Nasretdinov, A., Mukhtarov, M., Valeeva, G., Khazipov, R. i Rozov, A. (2016). Developmental Changes in Electrophysiological

Properties and a Transition from Electrical to Chemical Coupling between Excitatory Layer 4 Neurons in the Rat Barrel Cortex. *Frontiers in Neural Circuits*, 10. <https://doi.org/10.3389/fncir.2016.00001>

283. van Spronsen, M., van Battum, E. Y., Kuijpers, M., Vangoor, V. R., Rietman, M. L., Pothof, J., Gummy, L. F., van IJcken, W. F. J., Akhmanova, A., Pasterkamp, R. J. i Hoogenraad, C. C. (2013). Developmental and Activity-Dependent miRNA Expression Profiling in Primary Hippocampal Neuron Cultures. *PLoS ONE*, 8(10), e74907. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074907>
284. Vartiainen, M. K., Guettler, S., Larijani, B. i Treisman, R. (2007). Nuclear Actin Regulates Dynamic Subcellular Localization and Activity of the SRF Cofactor MAL. *Science*, 316(5832), 1749–1752. <https://doi.org/10.1126/science.1141084>
285. Verkerk, A. J. M. H., Pieretti, M., Sutcliffe, J. S., Fu, Y.-H., Kuhl, D. P. A., Pizzuti, A., Reiner, O., Richards, S., Victoria, M. F., Zhang, F., Eussen, B. E., van Ommen, G.-J. B., Blonden, L. A. J., Riggins, G. J., Chastain, J. L., Kunst, C. B., Galjaard, H., Thomas Caskey, C., Nelson, D. L., ... Warren, S. T. (1991). Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell*, 65(5), 905–914. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90397-H](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90397-H)
286. Volkmar, F. R. (2011). Understanding the social brain in autism. *Developmental Psychobiology*, 53(5), 428–434. <https://doi.org/10.1002/dev.20556>
287. von Bohlen und Halbach, O. (2009). Structure and function of dendritic spines within the hippocampus. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 191(6), 518–531. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2009.08.006>
288. Wall, M. J., Robert, A., Howe, J. R. i Usowicz, M. M. (2002). The speeding of EPSC kinetics during maturation of a central synapse: EPSC time-course during cerebellar development. *European Journal of Neuroscience*, 15(5), 785–797. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.01910.x>
289. Wang, D.-Z., Chang, P. S., Wang, Z., Sutherland, L., Richardson, J. A., Small, E., Krieg, P. A. i Olson, E. N. (2001). Activation of Cardiac Gene Expression by Myocardin, a Transcriptional Cofactor for Serum Response Factor. *Cell*, 105(7), 851–862. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00404-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00404-4)
290. Wang, D.-Z., Li, S., Hockemeyer, D., Sutherland, L., Wang, Z., Schratt, G., Richardson, J. A., Nordheim, A. i Olson, E. N. (2002). Potentiation of serum response factor activity by a family of myocardin-related transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(23), 14855–14860. <https://doi.org/10.1073/pnas.222561499>

291. Watanabe, M. inoue, Y., Sakimura, K. i Mishina, M. (1992). Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *NeuroReport*, 3(12), 1138–1140. <https://doi.org/10.1097/00001756-199212000-00027>
292. Watt, A. J. (2010). Homeostatic plasticity and STDP: Keeping a neuron's cool in a fluctuating world. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 2. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2010.00005>
293. Weinhold, B., Schrott, G., Arsenian, S., Berger, J., Kamino, K., Schwarz, H., R  ther, U. i Nordheim, A. (2000). Srf(-/-) ES cells display non-cell-autonomous impairment in mesodermal differentiation. *The EMBO journal*, 19(21), 5835–5844. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.21.5835>
294. Wen, W. i Turrigiano, G. G. (2021). Developmental Regulation of Homeostatic Plasticity in Mouse Primary Visual Cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 41(48), 9891–9905. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1200-21.2021>
295. Werling, D. M. i Geschwind, D. H. (2013). Sex differences in autism spectrum disorders: *Current Opinion in Neurology*, 26(2), 146–153. <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e32835ee548>
296. West, A. E. i Greenberg, M. E. (2011). Neuronal Activity-Regulated Gene Transcription in Synapse Development and Cognitive Function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(6), a005744–a005744. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005744>
297. Wickramasinghe, S. R., Alvania, R. S., Ramanan, N., Wood, J. N., Mandai, K. i Ginty, D. D. (2008). Serum Response Factor Mediates NGF-Dependent Target Innervation by Embryonic DRG Sensory Neurons. *Neuron*, 58(4), 532–545. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.03.006>
298. Wiens, K. M., H. Lin, i Liao, D. (2005). Rac1 Induces the Clustering of AMPA Receptors during Spinogenesis. *Journal of Neuroscience*, 25(46), 10627–10636. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1947-05.2005>
299. Wiezlak, M., Diring, J., Abella, J., Mouilleron, S., Way, M., McDonald, N. Q. i Treisman, R. (2012). G-actin regulates the shuttling and PP1 binding of the RPEL protein Phactr1 to control actomyosin assembly. *Journal of Cell Science*, 125(23), 5860–5872. <https://doi.org/10.1242/jcs.112078>
300. Wondolowski, J. i Dickman, D. (2013). Emerging links between homeostatic synaptic plasticity and neurological disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00223>



301. Workman, A. D., Charvet, C. J., Clancy, B., Darlington, R. B. i Finlay, B. L. (2013). Modeling Transformations of Neurodevelopmental Sequences across Mammalian Species. *Journal of Neuroscience*, 33(17), 7368–7383. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5746-12.2013>
302. Wu, J. I., Lessard, J., Olave, I. A., Qiu, Z., Ghosh, A., Graef, I. A. i Crabtree, G. R. (2007). Regulation of Dendritic Development by Neuron-Specific Chromatin Remodeling Complexes. *Neuron*, 56(1), 94–108. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.08.021>
303. Xu, C., Liu, H.-J., Qi, L., Tao, C.-L., Wang, Y.-J., Shen, Z., Tian, C.-L., Lau, P.-M. i Bi, G.-Q. (2020). Structure and plasticity of silent synapses in developing hippocampal neurons visualized by super-resolution imaging. *Cell Discovery*, 6(1), 8. <https://doi.org/10.1038/s41421-019-0139-1>
304. Xu, W., Jiang, X. i Huang, L. (2019). RNA Interference Technology. W *Comprehensive Biotechnology* (s. 560–575). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00282-2>
305. Yamaguchi, Y. i Miura, M. (2015). Programmed Cell Death in Neurodevelopment. *Developmental Cell*, 32(4), 478–490. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.01.019>
306. Yap, E.-L. i Greenberg, M. E. (2018). Activity-Regulated Transcription: Bridging the Gap between Neural Activity and Behavior. *Neuron*, 100(2), 330–348. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.10.013>
307. Yin, F., Hoggatt, A. M., Zhou, J. i Herring, B. P. (2006). 130-kDa smooth muscle myosin light chain kinase is transcribed from a CArG-dependent, internal promoter within the mouse *mylk* gene. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 290(6), C1599–C1609. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00289.2005>
308. Yorgev, S. i Shen, K. (2017). Establishing Neuronal Polarity with Environmental and Intrinsic Mechanisms. *Neuron*, 96(3), 638–650. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.10.021>
309. Yoshihara, Y., De Roo, M. i Muller, D. (2009). Dendritic spine formation and stabilization. *Current Opinion in Neurobiology*, 19(2), 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2009.05.013>
310. Zagrebelsky, M. i Korte, M. (2014). Form follows function: BDNF and its involvement in sculpting the function and structure of synapses. *Neuropharmacology*, 76, 628–638. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.05.029>

311. Zentner, G. E., Layman, W. S., Martin, D. M. i Scacheri, P. C. (2010). Molecular and phenotypic aspects of *CHD7* mutation in CHARGE syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 152A(3), 674–686. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33323>
312. Zhang, J., Zhang, D., McQuade, J. S., Behbehani, M., Tsien, J. Z. i Xu, M. (2002). C-fos regulates neuronal excitability and survival. *Nature Genetics*, 30(4), 416–420. <https://doi.org/10.1038/ng859>
313. Zhou, Q., Homma, K. J. i Poo, M. (2004). Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron*, 44(5), 749–757. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.11.011>
314. Zhu, H., Joliot, V. i Prywes, R. (1994). Role of transcription factor TFIIF in serum response factor-activated transcription. *The Journal of biological chemistry*, 269(5), 3489–3497.
315. Zhu, J. J., Esteban, J. A., Hayashi, Y. i Malinow, R. (2000). Postnatal synaptic potentiation: Delivery of GluR4-containing AMPA receptors by spontaneous activity. *Nature Neuroscience*, 3(11), 1098–1106. <https://doi.org/10.1038/80614>
316. Zieger, H. L. i Choquet, D. (2021). Nanoscale synapse organization and dysfunction in neurodevelopmental disorders. *Neurobiology of Disease*, 158, 105453. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105453>
317. Zimprich, A., Mroz, G., Meyer zu Reckendorf, C., Anastasiadou, S., Förstner, P., Garrett, L., Hölter, S. M., Becker, L., Rozman, J., Prehn, C., Rathkolb, B., Moreth, K., Wurst, W., Klopstock, T., Klingenspor, M., Adamski, J., Wolf, E., Bekeredjian, R., Fuchs, H., ... Knöll, B. (2017). Serum Response Factor (SRF) Ablation Interferes with Acute Stress-Associated Immediate and Long-Term Coping Mechanisms. *Molecular Neurobiology*, 54(10), 8242–8262. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0300-x>
318. Zito, K., Knott, G., Shepherd, G. M. G., Shenolikar, S. i Svoboda, K. (2004). Induction of Spine Growth and Synapse Formation by Regulation of the Spine Actin Cytoskeleton. *Neuron*, 44(2), 321–334. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.09.022>
319. Ziv, N. E. i Smith, S. J. (1996). Evidence for a Role of Dendritic Filopodia in Synaptogenesis and Spine Formation. *Neuron*, 17(1), 91–102. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80283-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80283-4)
320. Zuo, Y., Lin, A., Chang, P. i Gan, W.-B. (2005). Development of Long-Term Dendritic Spine Stability in Diverse Regions of Cerebral Cortex. *Neuron*, 46(2), 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.04.001>

321. Zweier, C., Peippo, M. M., Hoyer, J., Sousa, S., Bottani, A., Clayton-Smith, J., Reardon, W., Saraiva, J., Cabral, A., Göhring, I., Devriendt, K., de Ravel, T., Bijlsma, E. K., Hennekam, R. C. M., Orrico, A., Cohen, M., Dreweke, A., Reis, A., Nürnberg, P. i Rauch, A. (2007). Haploinsufficiency of TCF4 Causes Syndromal Mental Retardation with Intermittent Hyperventilation (Pitt-Hopkins Syndrome). *The American Journal of Human Genetics*, 80(5), 994–1001. <https://doi.org/10.1086/515583>

## 8. Lista publikacji doktorantki

1. Chwin, N., Bijoch, Ł., Kursa, M., Zglinicki, B., **Krysiak, A.**, Kalita, K., Boguszewski, P., Hamed, A., Kiryk, A., Beroun, A., Konopka, W. (2022). Improved learning in adult mice with *Pten* gene depletion in hippocampal neurons. **manuskrypt w recenzji**
2. Roszkowska, M.\*, **Krysiak, A.\***, Majchrowicz, L., Nader, K., Beroun, A., Michaluk, P., Pekala, M., Jaworski, J., Kondrakiewicz, L., Puścian, A., Knapska, E., Kaczmarek, L., Kalita, K. (2022). SRF depletion in early life contributes to social interaction deficits in the adulthood. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 79(5), 278. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04291-5>; \* **główny autor**
3. Nader, K.\*, **Krysiak, A.\***, Beroun, A., Pekala, M., Szymanska, M., Kuzniewska, B., Radwanska, K., Kaczmarek, L., Kalita, K. (2019). Loss of serum response factor in mature neurons in the dentate gyrus alters the morphology of dendritic spines and hippocampus-dependent behavioral tasks. *Brain structure i function*, 224(8), 2691–2701. <https://doi.org/10.1007/s00429-019-01925-6>; \* **główny autor**
4. Kaneda, M., Sakagami, H., Hida, Y., Ohtsuka, T., Satou, N., ishikashi, Y., Fukuchi, M., **Krysiak, A.** ishikawa, M. ihara, D., Kalita, K. i Tabuchi, A. (2018). Synaptic localisation of SRF coactivators, MKL1 and MKL2, and their role in dendritic spine morphology. *Scientific reports*, 8(1), 727. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18905-7>