

Ewa Banach

**Rola kinazy syntazy glikogenu - 3β w funkcjonowaniu synaps
pobudzających**

Praca doktorska
wykonana w Pracowni Elektrofizjologii*
Instytutu Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN

Promotor:
dr hab. Joanna Urban-Ciećko

Promotor pomocniczy:
dr Tomasz Jaworski

Warszawa, rok 2022



Podziękowania

„Mądrość jest nieskończona; im bardziej się w nią zagłębiasz, tym bardziej jej potrzebujesz.”

Lew Tolstoj

Powstanie niniejszej pracy nie byłoby możliwe bez osób wspierających mnie na wielu płaszczyznach życia. Był to czas ciężkiej pracy, wielu trudnych chwil i wyzwania, dzięki którym mogłam budować swój charakter i dojrzeć naukowo.

Szczególne podziękowanie i wyrazy uznania składam dr hab. Joannie Urban-Ciećko, za poświęcony mi czas, wiarę w moje możliwości, cenne uwagi i nieocenioną pomoc, która była dużym wsparciem w pisaniu tej pracy.

Dziękuję

dr Tomaszowi Jaworskiemu

za wskazanie kierunku badań oraz za obdarzenie mnie dużym zaufaniem, dając możliwość realizacji własnych pomysłów.

Prof. dr hab. Leszkowi Kaczmarkowi

Za rady merytoryczne i gotowość do dyskusji.

Prof. dr hab. Aleksandrze Szczepankiewicz

Za zaangażowanie w mój rozwój naukowy, pomoc w realizacji i analizie wyników doświadczeń, a także zaangażowanie mnie do wielu interesujących projektów.

Wszystkim koleżankom i kolegom z nieistniejącej już Pracowni Modeli Zwierzęcych oraz Pracowni Neurobiologii i Pracowni Elektrofizjologii, z którymi miałam przyjemność współpracować.

Koleżankom i kolegom z Zakładu Genetyki w Psychiatrii i Pracowni Badań Komórkowych i Molekularnych za czas spędzony razem i wieloletnią współpracę.

Moim Rodzicom, za wychowanie mnie na osobę uparcie dążącą do realizacji wyznaczonych celów i zawsze trzymającą się swoich zasad moralnych.

Rodzeństwu, za wiarę i wsparcie w chwilach, kiedy chciałam się poddać.

Przyjaciółom, za każdy uśmiech i wspólnie spędzone chwile.

**Początkowe etapy pracy zostały wykonane w Pracowni Neurobiologii oraz Pracowni Modeli Zwierzęcych (Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego). Praca wykonana przy współpracy z Zakładem Genetyki w Psychiatrii oraz Pracownią Badań Molekularnych i Komórkowych (Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu).*

Praca finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki Opus UMO-2015/17/B/NZ3/03734, którego kierownikiem jest Tomasz Jaworski oraz UMO-2015/18/E/NZ4/00721, którego kierownikiem jest Joanna Urban-Ciećko.

Spis treści

Abstract	1
Streszczenie	3
1. Wykaz skrótów	5
2. Wprowadzenie	8
2.1. Plastyczność synaptyczna	8
2.1.1. Kolce dendrytyczne.....	10
2.2. Kinaza syntazy glikogenu-3.....	11
2.2.1. Rola GSK-3 β w plastyczności synaptycznej	12
2.2.2. GSK-3 β w zaburzeniach psychicznych	14
2.3. MikroRNA	15
2.3.1. Biogeneza miRNA i mechanizm działania	15
2.3.2. MikroRNA w plastyczności synaptycznej.....	16
2.3.3. Rola miRNA w zaburzeniach psychicznych	17
3. Hipotezy i cele	19
4. Materiały i metody.....	20
4.1. Odczynniki	20
4.2. Komercyjne zestawy odczynników	21
4.3. Roztwory	22
4.4. Plan eksperymentów.....	23
4.5. Zwierzęta	24
4.5.1. Myszy transgeniczne GSK-3 β [S9A].....	24

4.6. Analiza morfologii kolców dendrytycznych	25
4.6.1. Przygotowanie preparatów ze skrawków mózgu	25
4.6.2. Obrazowanie	25
4.7. Rejestracja techniką whole-cell patch-clamp.....	27
4.7.1. Przygotowanie preparatu mózgowego utrzymywanego przyżyciowo.....	28
4.7.2. Rejestracja elektrofizjologiczna z pojedynczych neuronów techniką whole-cell patch-clamp	29
4.7.3. Nagrania miniaturowych prądów postsynaptycznych	29
4.7.4. Nagrania milczących synaps	30
4.8. Sekwencjonowanie nowej generacji.....	32
4.8.1. Izolacja RNA	33
4.8.2. Przygotowanie biblioteki	33
4.8.3. Oczyszczenie biblioteki	37
4.8.4. Przygotowanie znormalizowanych bibliotek do sekwencjonowania.....	38
4.8.5. Połączenie biblioteki z kontrolą PhiX.....	40
4.8.6. Analiza danych z NGS	40
4.9. Analiza ilości wybranych miRNA z wykorzystaniem ilościowego PCR	40
4.9.1. Synteza cDNA wraz ze wstępną amplifikacją.....	40
4.9.2. Analiza przyrostu produktu w czasie rzeczywistym.	44
4.10. Pierwotna hodowla komórek nerwowych hipokampa	45
4.10.1 Przygotowanie szkiełek	45
4.10.2. Transfekcja hodowli pierwotnej inhibitorem miR-221*	46

4.10.3. Ocena aktywności metabolicznej komórek – test MTT	47
4.10.4. Przygotowanie preparatów z hodowli komórkowych i utrwalanie komórek	47
4.10.5. Analiza kształtu kolców dendrytycznych w hodowli pierwotnej.....	48
4.10.6. Analiza mEPSCs w hodowli pierwotnej.....	48
4.11. Analiza statystyczna	49
5. Wyniki	50
5.1. Określenie genotypu myszy transgenicznych GSK-3 β [S9A]	50
5.2. WzmóŜona aktywność GSK-3 β powoduje zmiany w strukturze kolców dendrytycznych u myszy z linii GSK-3 β [S9A]	50
5.3. Analiza własności miniaturowych postsynaptycznych prądów pobudzających	52
5.4. Analiza obecności milczących synaps	55
5.5. Analiza profilu ekspresji mikroRNA metodą sekwencjonowania.....	56
5.5.1. Analiza jakości próbek na poszczególnych etapach przed sekwencjonowaniem ..	56
5.5.2. Wyniki sekwencjonowania nowej generacji	58
5.6. Walidacja wyników sekwencjonowania nowej generacji przy uŜyciu metody ilościowego PCR.....	67
5.6.1. Wybór referencyjnych miRNA	67
5.6.2. Analiza zmian w poziomie ekspresji wybranych miRNA	69
5.7. Analiza roli miR-221* w funkcjonowaniu synaps pobudzających	69
5.7.1. Wybór stęŜenia inhibitora miR-221* do dalszych badań	70
5.7.2. Wpływ hamowania aktywności miR-221* na morfologię kolców dendrytycznych	72

5.7.3. Wpływ hamowania aktywności miR-221* na pobudzające przekaźnictwo synaptyczne.....	73
6. Dyskusja	76
6.1. Wpływ wzmożonej aktywności GSK-3 β na strukturę i funkcję synaps pobudzających komórek ziarnistych zakrętu zębatego hipokampa.	76
6.2. Wpływ wzmożonej aktywności GSK-3 β na poziom ekspresji miRNA w hipokampie	80
6.3. Wpływ miRNA-221* na strukturę i funkcję synaps pobudzających w komórkach piramidalnych hipokampalnej hodowli pierwotnej.	81
7. Podsumowanie wyników i wnioski	84
8. Bibliografia	85
9. Suplement.....	103
9.1. Dorobek naukowy doktorantki	103
9.1.1. Publikacje, w których zawarto wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie	103
9.1.2. Pozostałe publikacje.....	103

Abstract

Glycogen Synthase Kinase-3 β (GSK-3 β) was discovered for its role in the regulation of glycogen metabolism. Activity of this kinase is observed in all tissues and it is involved in regulation of multiple proteins and metabolic pathways. Studies on mouse models showed that GSK-3 β is important during development of central nervous system and in the adult brain. Transgenic mouse model with overexpression of the constitutively active form of GSK-3 β [S9A] in the brain is characterized by behavioral changes such as memory deficits and hyperactivity. In adult mice, structural changes including decreased brain volume and increased thin spines fraction (considered as immature) in granule cells of dentate gyrus (DG) have been observed. These changes reflect abnormalities observed in psychiatric disorders such as schizophrenia or bipolar disorder (BD). Accordingly, increased activity of GSK-3 β has been observed in schizophrenia and BD.

Mechanisms underlying abnormal activity of GSK-3 β in synaptic function are not fully understood. To this end, we analyzed how constitutively active GSK-3 β influences morphology of dendritic spines and excitatory synaptic transmission in granular cells of DG in young (3-week-old) transgenic mice. Microscopic analysis showed that increased activity of GSK-3 β led to elongation of dendritic spines without changes of spine density. Next, using whole-cell path-clamp method, we observed increased inter-event intervals of miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) while the event amplitude was not changed. Lack of changes in total spine density together with lower frequency of excitatory events suggested lower number of functional synapses. Therefore, in the next step, we analyzed the presence of silent synapses. Silent synapses are non-functional excitatory synapses, where N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor is present with lack of functional α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor. We observed an increase of silent synapse fraction in GSK-3 β [S9A] mice. These results suggest that increased activity of GSK-3 β decreases the stability of AMPA receptors in postsynaptic compartment and inhibits synapse maturation.

The second aim of this study was to identify whether the abnormal activity of GSK-3 β can regulate the expression level of microRNAs (miRNAs) in neurons. MiRNAs (small, non-coding RNAs) are key molecules for proper function of CNS. Dysregulation of miRNA expression levels has been reported in neurodegenerative and psychiatric disorders in which

GSK-3 β was also shown to play a role. Additionally, GSK-3 β can regulate the expression level of microRNAs in cancer cells. Such a link has not been reported in neurons. Therefore, we analyzed miRNA expression in GSK-3 β [S9A] mice hippocampus using next generation sequencing (NGS) by Illumina MiniSeq system. Dysregulation of 24 mature and 71 precursor miRNAs in RNA samples was observed. We chose 4 miRNAs for validation by quantitative polymerase chain reaction (PCR). In transgenic mice, miR-221-5p (miR-221*) expression level was significantly downregulated. Next, to define a role of miR-221* in synaptic plasticity we used primary hippocampal cell culture. Neurons were transfected with miR-221* inhibitor, and imaging for dendritic spine analysis and mEPSCs recordings were performed. Changes of dendritic spine shape and density were not observed. We found an increase in the peak amplitude of mEPSCs, without changes of inter-event intervals after the application of miR-221* inhibitor. Our results indicate that the downregulation of miR-221* enhances excitatory synaptic transmission in hippocampal neurons.

Altogether, overactivity of GSK-3 β leads to a reduction of functional synapses in hippocampal granular cells of young mice. Moreover, GSK-3 β can regulate miRNA expression level in neurons. In GSK-3 β [S9A] mice, the expression level of miR-221* is significantly downregulated and the inhibition of miR-221* in primary hippocampal cell culture leads to changes in excitatory synaptic transmission. Altogether, abnormal activity of GSK-3 β might in turn drive aberrant synaptic plasticity.

Streszczenie

Kinaza syntazy glikogenu-3 β (GSK-3 β) została odkryta w badaniach nad regulacją metabolizmu glikogenu. Obecnie wiadomo, że jest kinazą powszechnie występującą w tkankach, zaangażowaną w regulację aktywności wielu białek i szlaków metabolicznych. Dotychczasowe badania wskazują, że GSK-3 β jest ważna zarówno w czasie rozwoju ośrodkowego układu nerwowego, jak i w dojrzałym mózgu. W transgenicznym modelu mysim, u którego w mózgu ulega ekspresji konstytutywnie aktywna forma GSK-3 β [S9A], zaobserwowano zmiany behawioralne, takie jak zaburzenia pamięci i wzmożona aktywność ruchowa. Ponadto, model ten charakteryzują zmiany strukturalne obejmujące zmniejszenie objętości mózgu. W komórkach ziarnistych zakrętu zębatego hipokampa u dorosłych osobników myszy GSK-3 β [S9A] zaobserwowano zwiększenie liczby długich kolców dendrytycznych (uważanych za niedojrzałe). Podobne zmiany obserwuje się w zaburzeniach psychicznych, takich jak schizofrenia czy choroba afektywna dwubiegunowa (CHAD). Co więcej, zaobserwowano wzrost aktywności GSK-3 β zarówno w schizofrenii jak i podczas epizodu maniakalnego w CHAD.

Mechanizmy leżące u podstaw zaburzeń funkcjonowania synaps pod wpływem wzmożonej aktywności GSK-3 β nie zostały dokładnie poznane. W pierwszej części pracy skupiono się na badaniu wpływu konstytutywnej aktywności tego enzymu na morfologię kolców dendrytycznych oraz na pobudzające przekazywanie synaptyczne w komórkach ziarnistych zakrętu zębatego hipokampa u młodych (3 tygodniowych) myszy transgenicznym GSK-3 β [S9A]. Badania mikroskopowe wykazały, że pod wpływem wzmożonej aktywności GSK-3 β kolce stają się wydłużone, a ich gęstość nie ulega zmianie. Wykorzystując technikę rejestracji elektrofizjologicznej z pojedynczych neuronów, wykazano zmiany w pobudzającej transmisji synaptycznej w preparatach mózgowych, polegające na zwiększeniu długości interwałów między zdarzeniami miniatury pobudzających prądów postsynaptycznych (mEPSCs), przy braku zmian w amplitudzie zdarzeń. Wyniki elektrofizjologiczne wskazywały na zmniejszenie liczby funkcjonalnych synaps, pomimo braku zmian w gęstości kolców dendrytycznych. Kolejnym etapem wyjaśnienia tych zmian była analiza „milczących” synaps. „Milczące” synapsy są niefunkcjonalną (lub niedojrzałą) formą synaps pobudzających, posiadają receptory NMDA (kwasu N-metylo-D-asparaginowego), ale nie zawierają receptorów AMPA (kwasu α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowego) lub są one niestabilnie umiejscowione w błonie. Prezentowane w niniejszej pracy wyniki wskazują na

wzrost procentowy populacji „milczących” synaps u myszy GSK-3 β [S9A]. Powyższe obserwacje sugerują, że wzmożona aktywność GSK-3 β zmniejsza stabilność receptorów AMPA w błonie i/lub hamuje dojrzewanie połączeń synaptycznych.

Drugim celem pracy było wskazanie czy zaburzona aktywność GSK-3 β może wpływać na poziom ekspresji mikroRNA (miRNA) w neuronach. Dane literaturowe wskazują, że miRNA należące do krótkich niekodujących białek RNA, są istotne dla prawidłowego funkcjonowania OUN. Choroby neurodegeneracyjne i psychiatryczne, związane z zaburzeniami w aktywności GSK-3 β charakteryzują się zmianami w poziomie ekspresji miRNA. Co więcej, wykazano, że GSK-3 β może regulować poziom ekspresji miRNA w komórkach nowotworowych. W celu sprawdzenia, czy mechanizm taki zachodzi w komórkach nerwowych wykorzystano technikę sekwencjonowania nowej generacji (NGS). Zbadano zmiany w poziomie ekspresji miRNA w hipokampie myszy GSK-3 β [S9A]. Zaobserwowano różnice w poziomie ekspresji 24 dojrzałych oraz 71 prekursorowych miRNA. Wytypowano 4 dojrzałe miRNA o najsilniejszych zmianach w poziomie ekspresji celem walidacji za pomocą ilościowej reakcji łańcuchowa polimerazy. Potwierdzono, że miR-221-5p (miR-221*) ma obniżony poziom ekspresji u transgenicznych myszy GSK-3 β [S9A]. Wpływ miR-221* na strukturę i funkcjonowanie synaps sprawdzono na pierwotnej hodowli komórek nerwowych hipokampa wykonanej z komórek pochodzących od myszy typu dzikiego. Po transfekcji inhibitorem miR-221* hodowle obrazowano w celu wizualizacji kolców dendrytycznych oraz przeprowadzono rejestracje mEPSCs. Nie wykazano zmian w kształcie, ani w gęstości kolców dendrytycznych. Zaobserwowano zwiększoną amplitudę zdarzeń mEPSC, bez zmian w długości interwałów między zdarzeniami. Wyniki wskazują, że zmniejszenie ekspresji miR-221* wzmacnia pobudzające przekazywanie synaptyczne w neuronach hipokampalnych.

Podsumowując, wzrost aktywności GSK-3 β prowadzi do zmniejszenia puli funkcjonalnych synaps w komórkach ziarnistych zakrętu zębatego hipokampa u młodych myszy. Zaobserwowane zmiany w morfologii i funkcjonowaniu synaps pod wpływem wzmożonej aktywności GSK-3 β mogą być podłożem zaburzonej plastyczności synaptycznej. U transgenicznych myszy ze wzmożoną aktywnością GSK-3 β wykazano obniżenie poziomu miR-221*, a zahamowanie aktywności tego miRNA prowadzi do zmian w pobudzającym przekazywaniu synaptycznym.

1. Wykaz skrótów

aCSF	Sztuczny płyn mózgowo-rdzeniowy (ang. <i>artificial cerebrospinal fluid</i>)
AMPA	Kwas α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazoloopropionowy (ang. <i>Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic</i>)
3'-UTR	Rejon 3' nieulegający translacji (ang. <i>3'-untranslated region</i>)
CaMKII	Kinaza białkowa II zależna od Ca^{2+} /kalmoduliny (ang. <i>Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II</i>)
CUMS	Chroniczny umiarkowany stres (ang. <i>chronic unpredictable mild stress</i>)
DIC	Kontrast interferencyjno-różniczkowy (ang. <i>differential interference contrast</i>)
DiI	Barwnik lipofilny 1,1'-Diocetadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate
DIV	Dzień <i>in vitro</i>
DMEM	Pożywka do hodowli komórek (ang. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DNA	Kwas deoksyrybonukleinowy (ang. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
ERK	Kinaza regulowana zewnątrzkomórkowo (ang. <i>extracellular signal-regulated kinases</i>)
FC	Różnica krotności zmiany (ang. <i>Fold change</i>)
FDR	Wskaźnik określający prawdopodobieństwo popełnienia błędu typu I (ang. <i>false discovery ratio</i>)
Receptor GABA _A	Receptor kwasu γ -aminomasłowego (ang. <i>γ-aminobutric acid receptor</i>)
GSK-3	Kinaza syntazy glikogenu -3 (ang. <i>glycogen syntase kinase-3</i>)
HBSS	Zrównoważony roztwór soli Hanka (ang. <i>Hank's Balanced Salt Solution</i>)
HPA	Oś podwzgórze-przysadka-nadnercza (ang. <i>hypothalamic-pituitary-adrenal axis</i>)

LTD	Długotrwałe osłabienie synaptyczne (ang. <i>Long term depression</i>)
LTP	Długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (ang. <i>Long term potentiation</i>)
mEPSC	Miniaturowe pobudzające prądy postsynaptyczne (ang. <i>Miniature excitatory postsynaptic currents</i>)
miRNA	MikroRNA
mRNA	Matrycowe RNA
MTT	Bromek 3-(4,5-dimetylo-tiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazolu (ang. thiazolyl blue tetrazolium bromide)
NBA	Pożywka do hodowli komórek nerwowych (ang. Neurobasal-A medium)
NGS	Sekwencjonowanie nowej generacji (ang. Next generation sequencing)
NMDA	Kwas N-metylo-D-asparaginowy
OUN	Ośrodkowy układ nerwowy
PBS	Zbuforowany roztwór soli fizjologicznej (ang. <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Kinaza białkowa A (ang. <i>Protein kinase A</i>)
PKB	Kinaza białkowa B (ang. <i>Protein kinase B</i>)
PSD	Gęstość postsynaptyczna (ang. <i>Postsynaptic density</i>)
PSD-95	Białko rusztowania w pobudzającej gęstości postsynaptycznej (ang. <i>Postsynaptic density-95</i>)
RIN	Integralność próbki RNA (ang. <i>RNA integrity numer</i>)
RNA	Kwas rybonukleinowy (ang. <i>ribonucleic acid</i>)
SCN	Jądro nadskrzyżowaniowe (ang. suprachiasmatic nucleus)
SEM	Błąd standardowy średniej (ang. <i>standard error of the mean</i>)

SynGAP	GTPaza synaptycznego białka Ras (ang. <i>Synaptic Ras GTPase-activating protein</i>)
<i>Thy-1</i>	Gen antygeny dyferencji tymocytów (ang. <i>Thymocyte differentiation antigen 1</i>)
TPKI	Kinaza białka tau (ang. <i>Tau protein kinase I</i>)
TTX	Tetodotoksyna (ang. <i>Tetrodotoxin</i>)
WT	Zwierzęta bez mutacji genetycznej, typu dzikiego (ang. <i>wild type</i>)

2. Wprowadzenie

2.1. Plastyczność synaptyczna

Plastyczność synaptyczna jest zdolnością układu nerwowego pozwalającą na zmiany strukturalne i funkcjonalne w sieci neuronalnej. Zmiany te pojawiają się już podczas rozwoju, a w dojrzałym układzie nerwowym można je zaobserwować w procesie uczenia się, a także w odpowiedzi na jego uszkodzenia. Plastyczność obejmuje zmiany w części presynaptycznej i postsynaptycznej w wyniku zmieniającej się aktywności neuronalnej w czasie pojawienia się istotnej dla zwierzęcia stymulacji. W przypadku synaps pobudzających zmiany te obejmują mechanizmy uwalniania neurotransmitera z części presynaptycznej oraz zmiany w gęstości postsynaptycznej (PSD), która określa liczbę i charakterystykę receptorów dla glutaminianu, kanałów jonowych, a także elementów cytoszkieletu i cząsteczek sygnałowych (Sumi i Harada, 2020; Whitlock i wsp., 2006). Wyróżniamy dwa rodzaje plastyczności synaptycznej: plastyczność Hebbowską, w przypadku której podstawą reorganizacji połączeń synaptycznych są zmiany wagi tych połączeń (Hebb, 1949) oraz plastyczność homeostatyczną, utrzymującą równowagę między pobudzaniem, a hamowaniem sieci neuronalnej (Burrone i Murthy, 2003; Turrigiano i wsp., 1998).

Odkrycie mechanizmu długotrwałego wzmocnienia (LTP) (Bliss i Lomo, 1973) oraz długotrwałego osłabienia synaptycznego (LTD) (Ito i Kano, 1982), będących modelami plastyczności hebbowskiej zapoczątkowało intensywne badania skupione na molekularnych i funkcjonalnych zmianach w obrębie synapsy. Mechanizm LTP opiera się na kaskadzie sygnału spowodowanej intensywną aktywacją receptora NMDA, która wywołuje napływ Ca^{2+} do wnętrza komórki. Powoduje to aktywację kinazy wapniowej II (CaMKII). Skutkiem tego procesu jest wbudowywanie receptorów AMPA w części postsynaptycznej synapsy. Proces ten może zachodzić dwojako:

- Poprzez przetransportowanie receptorów AMPA z błony pozasynaptycznej do części postsynaptycznej. Ich zakotwiczenie w błonie jest możliwe dzięki wcześniejszej fosforylacji kinazy guanylanowej przez CaMKII.

- Dostarczenie pęcherzyków z zakotwiczonym nowosyntetyzowanym receptorem AMPA, w wyniku działania kaskady sygnałowej CaMKII, SynGAP, ERK (Lisman, 2017)

W przypadku LTD słabsza i długotrwała aktywacja receptora NMDA prowadzi do usuwania receptorów AMPA z części postsynaptycznej (Malinow i Malenka, 2002).

LTP odgrywa istotną rolę w powstawaniu nowych synaps na wczesnym etapie rozwoju. Podczas synaptogenezy, w części postsynaptycznej jako pierwsze zostają wbudowane receptory NMDA, podczas gdy receptory AMPA nie są jeszcze obecne (Kanold i wsp., 2019). Synapsy te nazwano milczącymi synapsami (ang. *silent synapses*) ponieważ nie są w stanie przekazywać sygnału w odpowiedzi na pojawiający się bodziec (Kerchner i Nicoll, 2008). Po okresie synaptogenezy, milczące synapsy charakteryzują się tym, że receptor AMPA nie jest zakotwiczony w błonie lub jest niestabilny. W milczących synapsach, glutaminian nie aktywuje receptora NMDA, ponieważ jest on receptorem jonotropowym, bramkowanym jednocześnie przez ligand i depolaryzację błony komórkowej. W stanie spoczynkowym błony, kanał receptora NMDA jest blokowany przez jon magnezu (Gosek i wsp., 2012). Po przyłączeniu glutaminianu do receptora AMPA następuje depolaryzacja błony komórkowej, co umożliwia usunięcie jonu magnezowego i aktywację receptora NMDA (Kerchner i Nicoll, 2008). Milczące synapsy mogą być strukturalnie zdefiniowane jako synapsy, nie są jednak funkcjonalne, ponieważ nie można wywołać w nich pobudzającego potencjału postsynaptycznego (Atwood i Wojtowicz, 1999). Obecność milczących synaps wykazano w wielu obszarach mózgu i rdzenia kręgowego, na różnych etapach rozwoju (Kerchner i Nicoll, 2008). Stymulacja wywołująca LTP we wczesnym etapie rozwoju pozwala na wbudowywanie receptorów AMPA do części postsynaptycznej w milczących synapsach, co pozwala na zmianę tych synaps na w pełni funkcjonalną formę (Hanse i wsp., 2013). W dorosłym mózgu, eksternalizacja receptorów AMPA do milczących synaps jest możliwa po depolaryzacji błony komórkowej w wyniku pobudzenia sąsiednich synaps w czasie specyficznej stymulacji związanej z wywoływaniem zmian plastycznych (Kossut, 2018; podręcznik dla studentów).

W dorosłym mózgu milczące synapsy mogą pojawiać się w wyniku zmian plastycznych w odpowiedzi na uzależnienia (Hanse i wsp., 2013). Wzrost populacji milczących synaps zaobserwowano zarówno w mysim modelu uzależnienia od kokainy (Koya i wsp., 2012; Lee i wsp., 2013; Singh i wsp., 1996; Wang i wsp., 2021), jak i alkoholu (Beroun i wsp., 2018). Pojawiające się milczące synapsy mogą skutkować zanikaniem synaps, a tym samym

prowadzić do zmian behawioralnych charakteryzujących uzależnienia, takich jak poszukiwanie i potrzeba zażycia kokainy lub alkoholu (Brown i wsp., 2011; Graziane i wsp., 2016; Lee i wsp., 2013; Stefaniuk i wsp., 2017). Populacja milczących synaps wzrasta również w chorobach neurorozwojowych: w zespole łamliwego chromosomu X (Harlow i wsp., 2010) oraz spektrum autyzmu (Ran i wsp., 2013). Natomiast w chorobie Alzheimera za potencjalną przyczynę utraty stabilności receptorów AMPA, uważa się akumulację amyloidu β . Akumulacja amyloidu β wyzwała LTD poprzez wpływ na receptory NMDA. W ten sposób, poprzez wyciszanie synaps (ang. *synaptic silencing*) powstają milczące synapsy, co w konsekwencji prowadzi do degradacji synaps (Hsieh i wsp., 2006; Kessels i wsp., 2013).

2.1.1. Kolce dendrytyczne

Synapsy glutaminergiczne są zlokalizowane na kolcach dendrytycznych – wypustkach na dendrycie, tworzących część presynaptyczną. Kolce dendrytyczne podlegają dynamicznym zmianom, które wpływają na siłę połączeń synaptycznych (Lisman, 2017). Molekularny mechanizm zmian w strukturze kolców dendrytycznych nie jest dokładnie poznany, jednak jest związany z interakcjami między mikrotubulami i filamentami aktynowymi, regulowanymi m.in. aktywnością kinaz (Pedraza i wsp., 2014). Ponadto, w kolcach dendrytycznych zlokalizowane są mitochondria, siateczka śródplazmatyczna i endosomy, które są niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania synaps (Li i wsp., 2004).

Kolce dendrytyczne mogą mieć różne kształty, na podstawie których zostały podzielone na 3 główne grupy (Pchitskaya and Bezprozvanny, 2020):

- **grzybkowate** (ang. *mushrooms*) posiadające wyraźną główkę i krótką szyjkę,
- **długie** (ang. *thin*) charakteryzujące się małą główką lub bez wyraźnej główki, o wydłużonym kształcie,
- **przysadziste** (ang. *stubby*) pozbawione szyjki.

Uważa się, że kolce grzybkowate tworzą w pełni funkcjonalną synapsę, ponieważ główka posiada bogatą gęstość postsynaptyczną. Kolce długie „poszukują” części presynaptycznej, a ich główka mieści niewiele receptorów, w związku z czym nie są zdolne do tworzenia w pełni dojrzałej synapsy (Harris i Stevens, 1989; Yuste i Bonhoeffer, 2004). Kolce przysadziste nie są liczne w dojrzałych neuronach, uważa się, że powstają w wyniku zanikania

kolców grzybkowatych (Pchitskaya i Bezprozvanny, 2020). Wykazano, że morfologia kolców dendrytycznych jest ściśle związana z funkcjonowaniem synaps (Arellano i wsp., 2007). Co więcej, zauważono powiększanie się kolców dendrytycznych i ich główek pod wpływem LTP, podczas gdy LTD powodowało ich kurczenie się bądź zanikanie (Borczyk i wsp., 2019; Bosch i Hayashi, 2012; Kim i wsp., 2013).

2.2. Kinaza syntazy glikogenu-3

Kinaza syntazy glikogenu-3 (GSK-3) jest serynowo-treoninową kinazą białkową, którą odkryto jako kluczową kinazę zaangażowaną w metabolizm glikogenu (Embi i wsp., 1980). GSK-3 występuje w dwóch formach: α i β , kodowanych przez niezależne geny. Izozymy te wykazują 85% podobieństwo ogólnej sekwencji białkowej (Woodgett, 1990), w domenie katalitycznej podobieństwo jest znacznie wyższe, sięga aż 93%. Lokalizacja GSK-3 α w ludzkim genomie to 19q13.2, a masa molekularna 51kDa, natomiast lokalizacja GSK-3 β to 3q13.3, a jej masa molekularna wynosi 47kDa (Shaw i wsp., 1998; Woodgett, 1990). Obie formy występują we wszystkich typach komórek ssaków. Delecja GSK-3 β u myszy jest letalna na etapie rozwoju embrionalnego, w odróżnieniu od delecji GSK-3 α (Kerkela i wsp., 2008a), co wskazuje na istotną rolę formy β w rozwoju embrionalnym. Ishiguro i wsp. (1993) zaobserwowali, że sekwencja aminokwasowa kinazy białka tau I (TPKI) jest identyczna z sekwencją GSK-3 β (Ishiguro i wsp., 1993). Odkrycie to było pierwszym dowodem, że GSK-3 β jest związana z chorobą Alzheimera (Hanger i wsp., 1992).

GSK-3 β jest powszechnie obecna w komórkach, a jej aktywacja zachodzi poprzez fosforylację tyrozyny-216 (Tyr-216) w wyniku autofosforylacji (przez GSK-3 β) lub przez kinazy tyrozynowe (Hughes i wsp., 1993; Kim i Lisman, 1999; Lochhead i wsp., 2006). Inaktywacja GSK-3 β zachodzi poprzez fosforylację seryny w pozycji 9 w N-końcu (S-9) (Ryc. 1) (Sutherland i wsp., 1993). Wykazano, że fosforylacja ta może być regulowana poprzez wiele kinaz: kinazę białkową A (PKA) (Krishnankutty et al., 2017), kinazę białkową B (PKB, nazywaną również serynowo-treoninową kinazą Akt) (Cross i wsp., 1995; Sutherland i wsp., 1993). Fosforylacja S9 powoduje utworzenie się tak zwanego pseudosubstratu, który łącząc się z domeną katalityczną, uniemożliwia przyłączenie się innych substratów. Regulacja aktywności GSK-3 β zachodzi również poprzez szlak sygnałowy Wnt, w którym inaktywacja GSK-3 β (poprzez mechanizm niezależny od fosforylacji S9) pozwala na

stabilizację β -kateniny, będącej koaktywatorem transkrypcji, ułatwiając tym samym ekspresję genów przez czynniki transkrypcyjne (Taelman i wsp., 2010).



Rycina 1. Inaktywacja GSK-3 β przez fosforylacje w pozycji Seryny 9.

Substraty GSK-3 β pełnią liczne funkcje, takie jak inicjacja transkrypcji i translacji. Substratami tej kinazy są też białka specyficzne dla komórek nerwowych (Ali et al., 2001), takie jak neuronalne czynniki wzrostu (Taniuchi i wsp., 1986), zasadowe białka mielinowe (Yang, 1986), mikrotubule (Singh i wsp., 1996) i neurofilamenty (Grimes i Jope, 2001). W bazie Uniprot (Consortium, 2019) wyszczególniono szereg procesów związanych z rozwojem i funkcjonowaniem układu nerwowego, w których GSK-3 β odgrywa istotną rolę, takich jak: rozwój dendrytów i aksonów, rozwój hipokampa, regulacja szlaków sygnałowych neuroprzekaźników oraz wpływ na pobudzające przekaźnictwo synaptyczne, a także regulacja rytmów okołodobowych. W zależności od wieku zmienia się poziom ekspresji GSK-3 β . U młodych szczurów zaobserwowano wysoki poziom ekspresji GSK-3 β , z jednoczesnym wysokim poziomem fosforylacji białka Tau, natomiast u dorosłych osobników aktywność GSK-3 β spada (Takahashi i wsp., 1995).

2.2.1. Rola GSK-3 β w plastyczności synaptycznej

GSK-3 β fosforyluje wiele białek, związanych m.in. z transkrypcją, metabolizmem, dynamiką cytoszkieletu i błony lipidowej, czy apoptozą. Co więcej, zaobserwowano obecność GSK-3 β w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN), gdzie szczególnie silną ekspresję wykazano w hipokampie (Leroy i Brion, 1999). Aktywność GSK-3 β wykazano w komórkach

nerwowych, w tym w kolcach dendrytycznych w hodowli hipokampalnej (Peineau i wsp., 2007) oraz w synaptoneurosomach i synaptosomach będących izolatami odpowiednio części presynaptycznej i postsynaptycznej (Hooper i wsp., 2007; Peineau i wsp., 2007).

Regulacja aktywności GSK-3 β odgrywa istotną rolę w określeniu kierunku plastyczności zależnej od receptora NMDA regulując mechanizmy LTP i LTD. Podczas LTP aktywacja receptorów NMDA prowadzi do stymulacji szlaku PI3K-Akt, w wyniku czego dochodzi do fosforylacji i w konsekwencji do zahamowania aktywności GSK-3 β . Jednocześnie zahamowanie aktywności GSK-3 β zapobiega indukcji LTD (Hooper i wsp., 2007; Peineau i wsp., 2007). Podczas LTD następuje aktywacja fosfatazy białkowej 1, w wyniku czego dochodzi do aktywacji GSK-3 β na skutek defosforylacji seryny 9. Co ciekawe, potwierdzono osłabienie LTP oraz pozytywny wpływ na LTD w przypadku dwóch modeli transgenicznymy myszy ze zwiększoną ekspresją GSK-3 β (Dewachter i wsp., 2009; Hooper i wsp., 2007).

W celu zbadania fizjologicznej roli GSK-3 β w mózgu powstało wiele modeli mysich (Kaidanovich-Beilin i wsp., 2011). Ponieważ całkowite wyłączenie ekspresji (ang. *knock-out*) GSK-3 β powodowało śmierć embrionów (Hoeflich i wsp., 2000; Kerkela i wsp., 2008b) oraz obniżenie poziomu GSK-3 β przez wyłączenie ekspresji tylko jednego allelu GSK3 β powodowało poważne zaburzenia pamięci u heterozygot +/- mysich (Kimura i wsp., 2008), badacze zdecydowali się na wykorzystanie promotorów uruchamianych pourodzeniowo wyłącznie w neuronach. Jednym z nich jest promotor *thy-1* (Moechars i wsp., 1999, 1996). Mysz transgeniczna linii GSK-3 β [S9A] posiadająca modyfikowany gen *GSK-3 β* pod kontrolą promotora *thy-1* (Spittaels i wsp., 2002, 2000) została wykorzystana w przedstawianej dysertacji. Tutaj mutacja genu polega na zastąpieniu seryny 9 alaniną, co uniemożliwia fosforylację i zapobiega hamowaniu aktywności GSK-3 β (Prickaerts i wsp., 2006; Spittaels i wsp., 2002, 2000). W modelu tym wykazano wzmożoną aktywność ruchową i zaburzenia żywienia u myszy. Objawy te są charakterystyczne dla epizodu maniakalnego w zaburzeniu afektywnym dwubiegunowym, ADHD i schizofrenii u ludzi. Podobne zmiany występują w innych modelach mysich z nadekspresją GSK-3 β , gdzie obserwowano zaburzenia behawioralne, redukcję objętości mózgu, a także zmiany na poziomie funkcjonowania, morfologii i przeżywania neuronów (Hernández i wsp., 2002; Lucas i wsp., 2001; Spittaels i wsp., 2002).

2.2.2. GSK-3 β w zaburzeniach psychicznych

Zmiany w plastyczności synaptycznej są kluczowe dla powstawania wielu zaburzeń psychicznych, takich jak zaburzenia afektywne czy schizofrenia. Zaburzenia afektywne obejmują zmianę afektu w kierunku jego obniżenia (depresji) lub w kierunku jego wzmożenia (hipomania, mania). Dzielimy je na chorobę afektywną jednobiegunową (CHAJ), która dotyczy 17% populacji ogólnej (Craddock i Forty, 2006), oraz chorobę afektywną dwubiegunową (CHAD), dotyczącą 2,8 – 6,5% populacji ogólnej (Bauer i Pfennig, 2005). Według Światowej Organizacji Zdrowia CHAJ charakteryzuje się występowaniem epizodów obniżenia nastroju – depresji (utrzymującym się przez co najmniej dwa tygodnie). CHAD cechuje się okresowo występującymi epizodami depresji i mani/hipomanii. Schizofrenia jest chorobą psychiczną, charakteryzującą się występowaniem objawów pozytywnych, do których należą halucynacje i omamy oraz objawów negatywnych: zaburzenia emocji i zachowania oraz kognitywne zaburzenia pamięci. Wykazano wspólne podłoże genetyczne CHAD oraz schizofrenii (Bramon i Sham, 2001).

Badania na modelach zwierzęcych wymienionych zaburzeń psychicznych jak również na pacjentach wykazały zmiany w aktywności GSK-3 β . Najczęściej wykorzystywanym modelem zwierzęcym epizodu depresyjnego, występującego zarówno w CHAJ jak i CHAD jest model chronicznego umiarkowanego stresu (CUMS). CUMS wywołuje zmiany w osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (HPA), której aktywność jest zaburzona u pacjentów z zaburzeniami afektywnymi. Nieprawidłowości w funkcjonowaniu osi HPA powodują wzmożenie aktywności GSK-3 β (Higuchi i wsp., 2016; Mao i wsp., 2017; Silva i wsp., 2008). Dodatkowo, deficyty kognitywne indukowane przez CUMS były redukowane poprzez podawanie litu i specyficznych inhibitorów GSK-3 β (Higuchi i wsp., 2016; Mao i wsp., 2017; Silva i wsp., 2008), co podkreśla rolę GSK-3 β w reakcji na zaburzenia w funkcjonowaniu osi HPA.

Wykazano, że stabilizatory nastroju wykorzystywane w terapii CHAD spełniają swoją funkcję poprzez regulację aktywności GSK-3 β (Jope i Roh, 2006). Odkrycie roli litu, popularnego leku normotymicznego, jako bezpośredniego inhibitora GSK-3 β było pierwszą przesłanką, dzięki której powiązano zmiany w aktywności GSK-3 β z CHAD (Klein i Melton, 1996). Długotrwałe leczenie litem prowadzi do zwiększenia poziomu fosforylacji GSK-3 β w pozycji Seryny-9 w mysim mózgu, co skutkuje hamowaniem aktywności kinazy (De Sarno i wsp., 2002). Inny lek stabilizujący nastrój – kwas walproinowy

wykorzystywany w terapii CHAD również wpływa hamująco na aktywność GSK-3 β (Chen i wsp., 1999; Kim i wsp., 2005).

Doniesienia literaturowe wskazują, że zmieniona aktywność GSK-3 β może być związana z objawami schizofrenii (Lovestone i wsp., 2007). W korze przedczołowej *post mortem* pacjentów ze zdiagnozowaną schizofrenią zaobserwowano znaczne obniżenie poziomu i aktywności GSK-3 β (Kozlovsky i wsp., 2005), natomiast Ferreria i wsp. wykazali wzrost aktywności GSK-3 β w płytkach krwi (Ferreira i wsp., 2015). Na uwagę zasługuje też związek układów neuroprzekaźników, których zaburzone funkcjonowanie powoduje objawy schizofrenii. Jednym z przykładów są zaburzenia w sygnalizacji dopaminergicznej. Podawanie agonisty receptora dopaminy D1 hamowało aktywność GSK-3 β w korze przedczołowej i hipokampie królików (Gil i wsp., 2003).

2.3. MikroRNA

MikroRNA (miRNA) to krótkie, niekodujące białek sekwencje RNA, pełniące funkcję w potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów. Obecność miRNA wykazano we wszystkich tkankach (Lee i wsp., 2008). Długość sekwencji miRNA mieści się w przedziale 18-25 nukleotydów (nt). Regulacja ekspresji genów za pośrednictwem miRNA zachodzi poprzez wiązanie miRNA z docelowym mRNA, w wyniku czego dochodzi do represji translacji lub mRNA ulega degradacji (Filip, 2007). Geny kodujące miRNA mogą być zlokalizowane zarówno w intronach i eksonach genów kodujących białka jak i w sekwencjach pozagenowych (Kim i Nam, 2006).

2.3.1. Biogeneza miRNA i mechanizm działania

Transkrypcja większości prekursorów miRNA rozpoczyna się dzięki działaniu polimerazy II (rzadziej III), w wyniku której powstaje pri-miRNA o długości kilku tysięcy nt. Cząsteczka pri-miRNA na końcu 5' posiada „czapeczkę” (ang. *cap*) natomiast na końcu 3' „ogon” poliadenylowy (ang. *poly(A) tail*). W obrębie jądra komórkowego działanie enzymu Drosha pozwala na odcięcie czapeczki oraz ogona poliadenylowego w wyniku czego powstaje pre-miRNA. Pre-miRNA są długości około 70 nt i posiadają strukturę szpilki do włosów (ang. *hairpin*). Opuszczenie jądra komórkowego przez pre-miRNA odbywa się dzięki

aktywności Ekspertyny 5. Enzym Dicer obecny w cytoplazmie tnie pre-miRNA do postaci krótkich, 18-24 nt dwuniciowych cząsteczek (dupleksów miRNA), składających się z nici wiodącej i pasażerskiej (oznaczanej gwiazdką: *). Dupleksy rozdzielają się, wchodząc w skład kompleksu RISC zawierający białka Ago. Zarówno nić wiodąca jak i pasażerska może brać udział w regulacji ekspresji genów, jednak najczęściej tę funkcję spełnia nić wiodąca (Budzyński i wsp., 2014; Filip, 2007). W kompleksie RISC to nić miRNA jest odpowiedzialna za rozpoznawanie sekwencji docelowej rejonu nieulegającego translacji 3'-UTR (ang. 3' *untranslated region*) mRNA. W przypadku pełnej komplementarności tych sekwencji, połączenie kompleksu RISC powoduje przecięcie mRNA przez rybonukleazę, prowadząc do degradacji (Pasquinelli i wsp., 2005). W przypadku niepełnej komplementarności (która jest częsta w komórkach zwierzęcych) dochodzi do zahamowania translacji, jednak transkrypt nie ulega zniszczeniu (Yang i wsp., 2005). Cechą charakterystyczną dla miRNA jest ich działanie plejotropowe – jedno miRNA może regulować translacje wielu mRNA (Krek i wsp., 2005). Uważa się, że miRNA mogą regulować poziom mRNA dla nawet 60% ludzkich białek (Friedman i wsp., 2009).

2.3.2. MikroRNA w plastyczności synaptycznej

Wykrycie obecności miRNA w tkance nerwowej zapoczątkowało poszukiwanie ich funkcji w mechanizmach plastyczności synaptycznej (Sempere i wsp., 2004). Wykazano udział miRNA m.in. w neurogenezie, różnicowaniu neuronów oraz jako regulator szlaków neuroprzekazników (Rogaev, 2005; Wang i wsp., 2014). Poziom ekspresji poszczególnych miRNA jest różny zarówno dla odrębnych struktur w mózgu (Olsen i wsp., 2009) jak i dla poszczególnych części neuronu, co sugeruje ich funkcję w modulowaniu aktywności neuronów (Chiuii i wsp., 2014). Co ciekawe, wykazano, że miR-26a kontroluje wzrost aksonów poprzez hamowanie aktywności GSK-3 β (Lucci i wsp., 2020).

Pierwsze badania, pokazujące związek miRNA z zachowaniem zwierząt związane były z cyklem okołodobowym (Cheng i wsp., 2007). Wykazano istotną rolę miR-219 oraz miR-132 w procesie synchronizacji cyklu okołodobowego, poprzez regulację aktywności genów z nim związanych (Kinoshita i wsp., 2020). Główną strukturą w mózgu odpowiedzialną za regulację cyklu okołodobowego jest jądro nadskrzyżowaniowe (SCN) (Hastings i wsp., 2018). Podstawowymi genami, których produkty odpowiedzialne są za regulację zegara biologicznego są geny *Period* (*Per1*, *Per2* i *Per3*), produkt genu *TIM*: białko TIMLESS oraz geny *CLOCK*

(Dmitrzak-Węglarz i Pawlak, 2010). Wiele badań wskazuje, że ekspresja genów związanych z cyklem okołodobowym takich jak geny *Period* są regulowane przez miRNA (Kinoshita i wsp., 2020). Wykazano również, że gen *Clock* może regulować poziom ekspresji wielu miRNA (Wang i wsp., 2018). W SCN poziom ekspresji miR-219 ulega cyklicznym zmianom, a jego nokaut powoduje wydłużenie rytmów behawioralnych (Cheng i wsp., 2007). Należy tutaj podkreślić, że regulacja ekspresji genów zegara biologicznego jest również zależna od aktywności GSK-3 β (Besing i wsp., 2015).

Zmiany w poziomie ekspresji miRNA mogą wywołać zmiany w behawiorze zwierząt (Chiu i wsp., 2014). Ciekawym przykładem jest miR-690, którego zwiększony poziom ekspresji w korze przedczołowej ograniczał reakcję na stres ocenianą na podstawie zmian behawioralnych. Myszy kontrolne, poddawane takim samym czynnikom stresowym miały mniejszą preferencję spożycia sacharozy oraz dłuższy czas bezruchu (Park i wsp., 2021). Wykazano również, że miRNA są istotnym elementem molekularnych mechanizmów uczenia się i pamięci (Konopka i wsp., 2010). Biorą udział w powstawaniu nowych synaps, formowaniu się kolców dendrytycznych i odgrywają rolę w transmisji synaptycznej (Kiltschewskij i Cairns, 2019). Indukcja LTP powoduje zmiany w poziomie ekspresji miRNA w zakręcie zębatym hipokampa (Wibrand i wsp., 2010). Wykazano również, że miRNA mogą regulować translację genów związanych z LTP, w tym podjednostek receptorów AMPA i NMDA oraz czynników transkrypcyjnych (Ryan i wsp., 2015).

2.3.3. Rola miRNA w zaburzeniach psychicznych

Istnieje szereg badań wykazujących różnice w poziomie ekspresji miRNA w zaburzeniach psychicznych (Camkurt i wsp., 2019; Issler i Chen, 2015; Luoni i Riva, 2016; Narahari i wsp., 2017). Materiałem wyjściowym do analiz, oprócz tkanki mózgowej *post mortem* były również krew obwodowa i osocze, jako potencjalne źródło biomarkerów.

Pierwszym dowodem, potwierdzającym istotną rolę potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów przez miRNA w CHAJ były badania nad inhibitorem wychwytu zwrotnego serotoniny – fluoksetyną. Zaobserwowano zwiększenie poziomu ekspresji miR-16 po iniekcji fluoksetyny do jądra szwu (ang. *Raphe nuclei*) myszy (Baudry i wsp., 2010). Ten sam zespół badawczy wykazał, że miR-16 pośredniczy w neurogenezie w hipokampie dorosłych myszy (Launay i wsp., 2011). Analiza poziomu ekspresji miRNA w mózgach *post mortem* pacjentów

CHAJ wykazała obniżenie poziomu ekspresji wielu miRNA (Smalheiser i wsp., 2012). Zaobserwowano przy tym zwiększenie ekspresji miR-139, miR-320 oraz miR-34, dla których potencjalnym targetem są geny dla białek SAT1 i SMOX, których obniżenie poziomu obserwowano u samobójców z diagnozą CHAJ (Lopez i wsp., 2014). Związek CHAD ze zmianą poziomu ekspresji miRNA potwierdzono po raz pierwszy po 16 dniach leczenia solami litu pacjentów, u których zmienił się poziom ekspresji czterech z trzynastu analizowanych miRNA względem kontroli (zdrowego rodzeństwa) (Chen i wsp., 2009). Obniżenie poziomu ekspresji trzech miRNA: miR-499, miR-708 oraz miR-1908 zaobserwowano u pacjentów CHAD w epizodzie depresyjnym względem remisji (poprawy) (Banach i wsp., 2017). W epizodzie manii, wykazano obniżenie ekspresji miR-134 w osoczu. U pacjentów, u których leczenie litem okazało się skuteczne, poziom ekspresji tego miRNA zwiększył się (Rong i wsp., 2011). W materiale pobranym z kory przedczołowej *post mortem* od pacjentów z CHAD i schizofrenią zaobserwowano zwiększoną ekspresję miR-137 względem zdrowej kontroli. Zaprezentowane dane stanowią jedynie część danych literaturowych, wskazujących na związek zmienionej ekspresji miRNA z zaburzeniami psychicznymi takimi jak CHAJ, CHAD i schizofrenia, które są szczegółowo opisane w wielu pracach przeglądowych (Camkurt i wsp., 2017; Geaghan i Cairns, 2015; Issler i Chen, 2015; Narahari i wsp., 2017; Roy i wsp., 2020; Van Den Berg i wsp., 2020).

Zaprezentowane dane literaturowe wskazują zarówno na wpływ aktywności GSK-3 β jak i na zmiany w poziomie ekspresji miRNA w zaburzeniach psychicznych. Przesłanki te były podstawą do szukania związku między zmianami w aktywności GSK-3 β w mózgu oraz jej wpływem na poziom ekspresji miRNA.

3. Hipotezy i cele

Hipotezy badawcze:

1. Wzmoczona aktywność GSK-3 β w komórkach nerwowych hipokampa zaburza strukturę i funkcjonowanie synaps pobudzających.
2. Wzmoczona aktywność GSK-3 β w komórkach nerwowych hipokampa wpływa na ekspresję miRNA.
3. Zmieniona ekspresja miR-221* wpływa na strukturę i funkcję synaps pobudzających w hipokampie.

Dalekosiężnym celem pracy jest wyjaśnienie roli GSK-3 β w plastyczności synaptycznej. Pierwszym celem pracy było zbadanie wpływu zwiększonej aktywności GSK-3 β na strukturę i funkcjonowanie neuronów. Drugim celem pracy było wykazanie, że molekularny mechanizm działania GSK-3 β opiera się m.in. na regulacji ekspresji miRNA w neuronach.

W badaniach wykorzystano szereg metod badawczych: analizy mikroskopowe, elektrofizjologiczne, sekwencjonowania nowej generacji oraz ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy.

Cele szczegółowe:

1. Określenie wpływu wzmoczonej aktywności GSK-3 β na strukturę i funkcję synaps pobudzających komórek ziarnistych w zakręcie zębatym u młodych, transgenicznych myszy ze wzmoczoną aktywnością GSK-3 β poprzez:
 - a) Analizę morfologii kolców dendrytycznych.
 - b) Analizę pobudzającego przekaźnictwa synaptycznego (miniaturowych pobudzających prądów postsynaptycznych).
 - c) Analizę obecności milczących synaps w szlaku drogi przesywającej do komórek ziarnistych.
2. Zbadanie wpływu wzmoczonej aktywności GSK-3 β na ekspresję miRNA w komórkach nerwowych hipokampa.
3. Określenie wpływu obniżonej ekspresji miR-221* na morfologię kolców dendrytycznych i pobudzające przekaźnictwo synaptyczne w pierwotnej hodowli hipokampalnej uzyskanej z myszy typu dzikiego, ponieważ obniżenie ekspresji tego miRNA zaobserwowano u myszy ze wzmoczoną aktywnością GSK-3 β .

4. Materiały i metody

4.1. Odczynniki

Nazwa	Producent
1,2 µm cząstki wolframu	ASI
Agaroza	BioShop Canada Inc.
Arabinozyd cytozyny (AraC)	Sigma-Aldrich
Barwnik błonowy Dil (Nadchloran 1,1'- dioktadecylo-3,3,3',3'- tetrametyloindokarbocyaniny ('DiI'; DiIC18(3)))	Invitrogen
Barwnik interkalujący: <i>Midori Green</i>	Nippon Genetics Europe GmbH
Boraks	Sigma-Aldrich
Bromek 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5-difenylo-2H-tetrazoliowy	Sigma-Aldrich
Buforowana fosforanem sól fizjologiczna (PBS) w tabletkach	Thermo Fisher Scientific
Cysteina	Sigma-Aldrich
Dimetylosulfotlenek DMSO	Sigma-Aldrich
Etanol	POCH S.A.
<i>GlutaMax</i> , 100x	Gibco
Kwas azotowy 65% czda	Pol-aura
Kwas borowy	Pol-aura
Kwas DL-2-amino-5-fosfonopentanowy (APV)	Sigma-Aldrich
Laminina	Roche
Lipofektamina RNAiMAX	Thermo Fisher Scientific
Marker wielkości DNA: Benchtop 100 bp DNA ladder	Promega
Metanol	POCH S.A.
Odczynnik do zamykania preparatów mikroskopowych: <i>Fluoromount-G</i>	SouthernBiotech
Odczynniki do pomiaru ilości i jakości DNA: <i>D1000 ScreenTape, D1000 Reagents</i>	Agilent

Odczynniki do pomiaru ilości i jakości RNA: <i>RNA ScreenTape</i> , <i>RNA ScreenTape Ladder</i> , <i>RNA ScreenTape Sample Buffer</i>	Agilent
Papaina	Worthington Biochemical Corp
Paraformaldehyd	BioChemica Panreac AppliChem
Penicylina-streptomycyna (10,000 U/ml), 100x	Gibco
Pikrotoksyna	Sigma Aldrich
Łódowa surowica bydlęca (FBS)	Gibco
Poli-D-lizyna	Sigma-Aldrich
Pożywka hodowlana: <i>DMEM</i> , <i>high glucose</i> , <i>GlutaMAX™ Supplement</i> , <i>pyruvate</i>	Thermo Fisher Scientific
Pożywka hodowlana: <i>Neurobasal A medium</i> , <i>minus phenol red</i>	Gibco
Roztwór D-(+)-glukozy 45% w H ₂ O, sterylny, do hodowli komórkowych	Sigma-Aldrich
Sacharoza ≥99.5%	Sigma-Aldrich
Suplement B-27 (50x), bez surowicy	Gibco
Środek do usuwania Rnaz z powierzchni: <i>RNaseZap® RNase Decontamination Solution</i>	Thermo Fisher Scientific
Zrównoważony roztwór soli Hanka (HBSS)	Sigma-Aldrich

4.2. Komercyjne zestawy odczynników

Nazwa	Producent
<i>Genomic Mini 250</i> izolacji	A&A Biotechnology
<i>GoTaq® Master Mixes</i>	Promega
<i>MiniSeq High Output Reagent Kit (75-cycles)</i>	Illumina
<i>PhiX Control v3</i>	Illumina
<i>Rneasy Mini Kit</i>	QIAGEN
<i>T4 RNA Ligase 2, Deletion Mutant</i>	Lucigen

TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit

Thermo Fisher Scientific

TaqMan™ Fast Advanced Mastermix

Thermo Fisher Scientific

TruSeq Small RNA Library Prep Kit -Set B (24 rxns) (Set B: indexes 13-24)

Illumina

4.3. Roztwory

Roztwór inkubacyjny

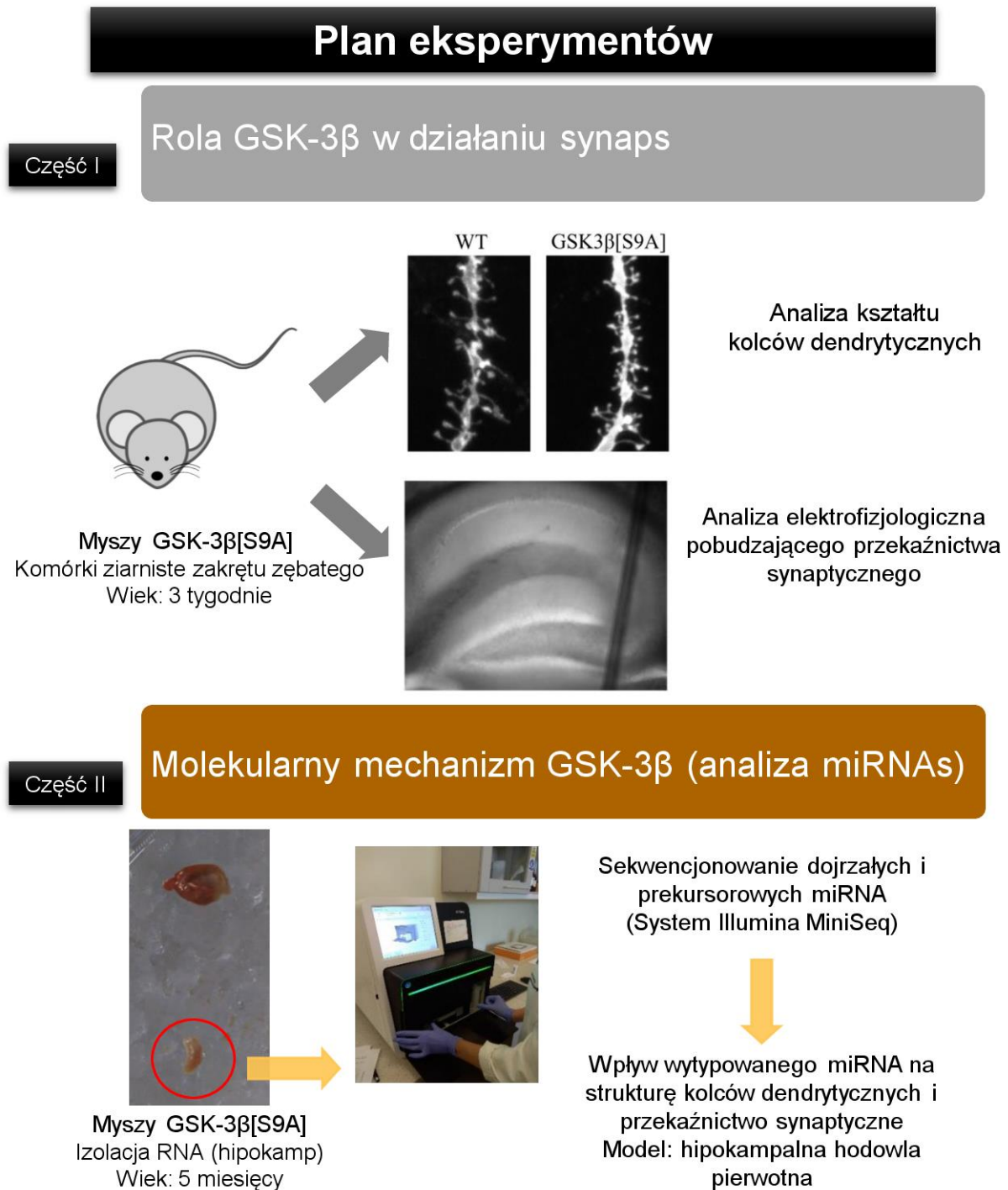
tzw. sztuczny płyn mózgowo-rdzeniowy (aCSF) w mM: NaCl 125; KCl 2,5; NaH₂PO₄ 1,2; CaCl₂ 2,3; MgCl₂ 1,3; NaHCO₃ 25,9; glukoza 20; pH (7,3-7,4) utrzymywano poprzez napowietrzanie karbogenem (mieszanina 95% O₂ – 5% CO₂).

Roztwory elektrodowe (ang. *Internal solution*) w mM

1. Do rejestracji miniaturowych postsynaptycznych prądów pobudzających: Cs-methanesulphonate 125; CsCl 10; EGTA 0,3; HEPES 10; MgATP 2; NaGTP 0,3 [mM], pH = 7,3; osmolarność: 280–290 mOsm (Brown and Haas, 1999; Dietrich et al., 2002).
2. Do badania obecności milczących synaps: Cs-gluconate 130; HEPES 20; TEA-Cl 3; EGTA 0,4; Na₂ATP 4; NaGTP 0,3; QX-314Cl 4 [mM], pH = 7,0–7,1, osmolarność: 290-295 mOsm (Beroun et al., 2018).

4.4. Plan eksperymentów

Opisane w rozdziale metody zostały wykorzystane do przeprowadzenia eksperymentów zgodnie z założonym schematem (Ryc. 2).



Rycina 2. Plan eksperymentów. Etapy realizacji celi szczegółowych pracy.

4.5. Zwierzęta

Wszystkie doświadczenia z wykorzystaniem zwierząt zostały przeprowadzone zgodnie z regulacjami i za zgodą I Lokalnej Komisji Etycznej do spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie. Zwierzęta były trzymane z dostępem do wody i jedzenia *ad libitum* w 12 godzinnym cyklu dnia i nocy.

4.5.1. Myszy transgeniczne GSK-3 β [S9A]

Myszy transgenicznej linii GSK-3 β [S9A] szczepu FVB/N posiadają modyfikowany gen GSK-3 β . Ekspresja tego konstruktu jest regulowana promotorem mysiego genu *thy-1*, specyficznego dla neuronów i rozpoczyna się 7 dnia po urodzeniu (Spittaels i wsp., 2002, 2000). Heterozygotyczne, transgeniczne samice myszy były porównywane do samic myszy z tego samego miotu będących zwierzętami bez mutacji genetycznej, kontrolnymi, typu dzikiego (WT).

Określenie genotypu myszy

DNA izolowano z fragmentów ogonów z wykorzystaniem zestawu do izolacji genomowego DNA (A&A Biotechnology) zgodnie z instrukcją producenta. Tkankę inkubowano w 50 °C/12h z proteinazą K w obecności buforu lizującego LT oraz buforu Tris. Następnie korzystając z kolumnienek ze złożem krzemionkowym dołączonych do zestawu oczyszczano DNA zgodnie z następującymi krokami:

1. Tkankę po nocnej inkubacji z proteinazą K wortexowano i wirowano przez 3 min w 1300x g.
2. Supernatant naniesiono na kolumnienki, wirowano przez 30 s w 1300x g.
3. Na kolumnę dodano 400 μ l buforu płuczącego A1, wirowano przez 30 s w 1300x g.
4. Przesącz z probówki zbierającej wylano, a na kolumnę dodano 350 μ l buforu płuczącego A1, wirowano przez 2 min w 1300x g.
5. Kolumny przeniesiono do nowych, wolnych od DNaz probówek typu eppendorf o objętości 1,5 ml i nałożono na nie 35 μ l H₂O wolnej od rybonukleaz, inkubowano 5 min w temperaturze pokojowej i wirowano przez 30 s w 1300x g.
6. Stężenie i czystość DNA zmierzono z wykorzystaniem spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

Myszy genotypowano wykorzystując metodę reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) z wykorzystaniem starterów – przedni: 5'- CCACCACAGAATCCAAGTCG -3' oraz wsteczny: 5' CTGCCGTCCTTGTCTCTGC 3' oraz gotowej mieszaniny *GoTaq MasterMix* (Promega) w objętości końcowej 25 μ l. Profil temperaturowy reakcji:

1. Denaturacja wstępna: temp. 95°C, 10 min.
2. 30 cykli:
 - Denaturacja: 95°C/6 s;
 - Przyłączanie starterów: 61°C/16 s;
 - Wydłużanie łańcucha: 72°C/30 s.
3. Końcowe wydłużanie: 72°C/7 min.

Produkt reakcji poddano elektroforezie w 1% żelu agarozowym (Ryc. 10 Rozdział 4.1).

4.6. Analiza morfologii kolców dendrytycznych

4.6.1. Przygotowanie preparatów ze skrawków mózgu

Zwierzęta usypiano poprzez dootrzewnową iniekcję morbitalu (200 mg na 1 kg masy ciała), i poddawano perfuzji transkardialnej roztworem soli fizjologicznej, a następnie 1,5% roztworem paraformaldehydu. Mózgi wypreparowywano z czaszki i umieszczono w 1,5% roztworze paraformaldehydu na 20 min, następnie przekładano do lodowatego roztworu soli fizjologicznej. Prawą półkulę krojono w przekroju grzbietowym w zmrożonym roztworze soli fizjologicznej na skrawki grubości 130 μ m, następnie wybarwiano skrawki barwnikiem lipofilnym DiI z wykorzystaniem systemu GeneGun. Skrawki inkubowano przez noc w 4% roztworze paraformaldehydu, następnie przygotowano preparaty mikroskopowe.

4.6.2. Obrazowanie

Preparaty obrazowano przy pomocy mikroskopu konfokalnego LSM800 (Zeiss). Używano obiektywu immersyjnego o powiększeniu 63x z wykorzystaniem światła lasera o długości 561 nm dla barwnika DiI oraz 488 nm dla wyznakowanego fluorescencyjnie FAM inhibitora miR-221* (Metody, 3.10.5). Uzyskano zdjęcia w formacie tiff o rozdzielczości

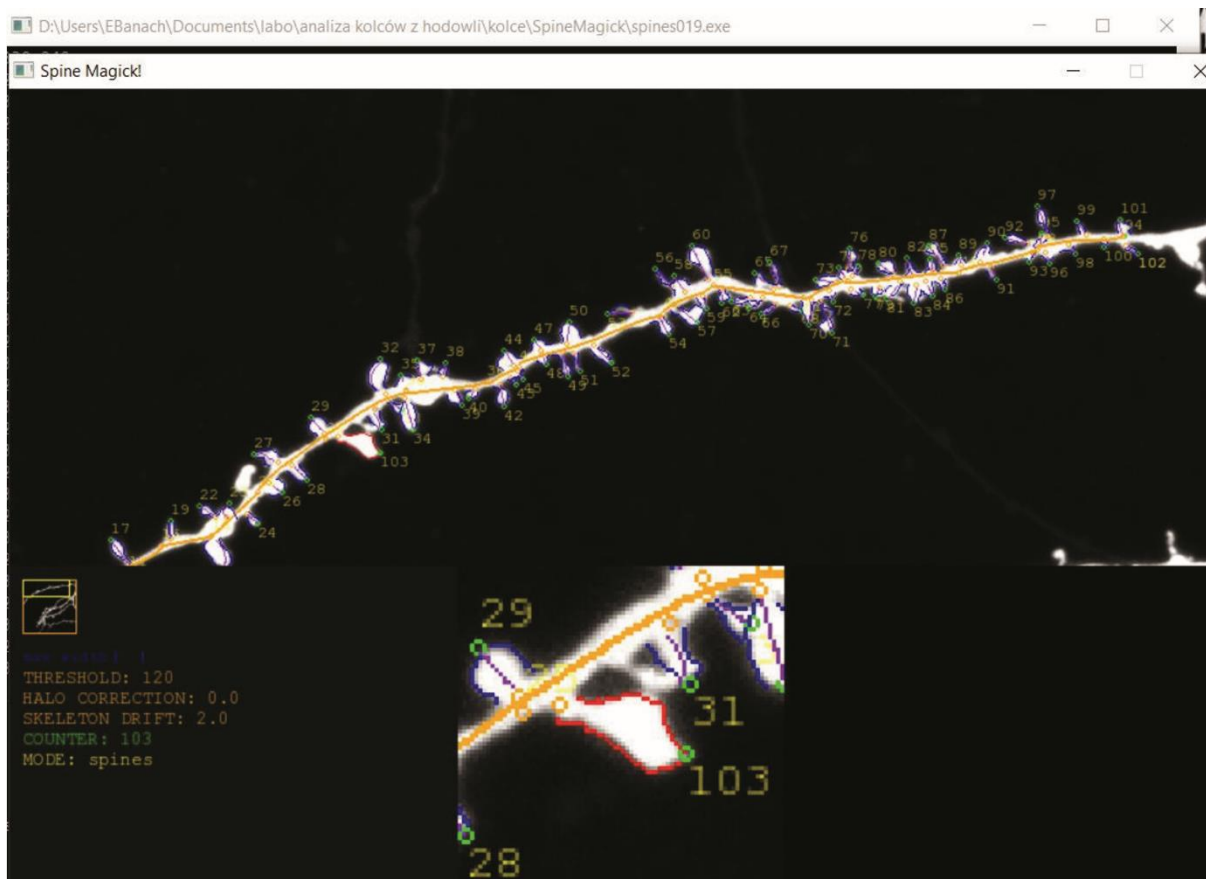
1024x1024 pikseli. Wykonywano serie zdjęć w osi z, oddalonych o 0,6 μm , z końcową rozdzielczością 0,07 μm na piksel.

Parametry kolców zostały zmierzone przy użyciu półautomatycznego skryptu SpineMagic! (Ruszczycki i wsp., 2012). Skrypt ten pozwala na pomiar parametrów takich jak długość, szerokość i powierzchnia, zarówno dla całego kolca jak i dla poszczególnych jego elementów (główka, szyjka; Ryc. 3). Następnie kolce zostały podzielone na trzy kategorie: grzybkowate, długie oraz przysadziste z wykorzystaniem skryptu napisanego w języku Python (Jasińska i wsp., 2016).

W skrawkach analizowany był rozkład procentowy kolców według ich kształtu w komórkach ziarnistych zakrętu zębatego hipokampa między dwoma grupami: myszy transgeniczne z nadekspresją GSK-3 β [S9A] oraz myszy bez mutacji genetycznej (grupa kontrolna - rodzeństwo). Z każdego skrawka wybrano jedną komórkę, aby uniknąć analizowania dendrytów pochodzących z tych samych neuronów. Tabela 1 przedstawia liczbę analizowanych myszy, komórek oraz kolców dendrytycznych.

Tabela 1. Liczba analizowanych osobników, komórek oraz kolców dendrytycznych w doświadczeniu. Grupa kontrolna to zwierzęta bez mutacji genetycznej, uzyskane z tych samych miotów co osobniki transgeniczne. Analizowano od 2-4 komórek w jednym osobniku.

Grupa	Liczba osobników (N)	Liczba komórek	Liczba kolców (n)
Myszy GSK-3 β [S9A]	6	21	1537
Grupa kontrolna	9	34	3165



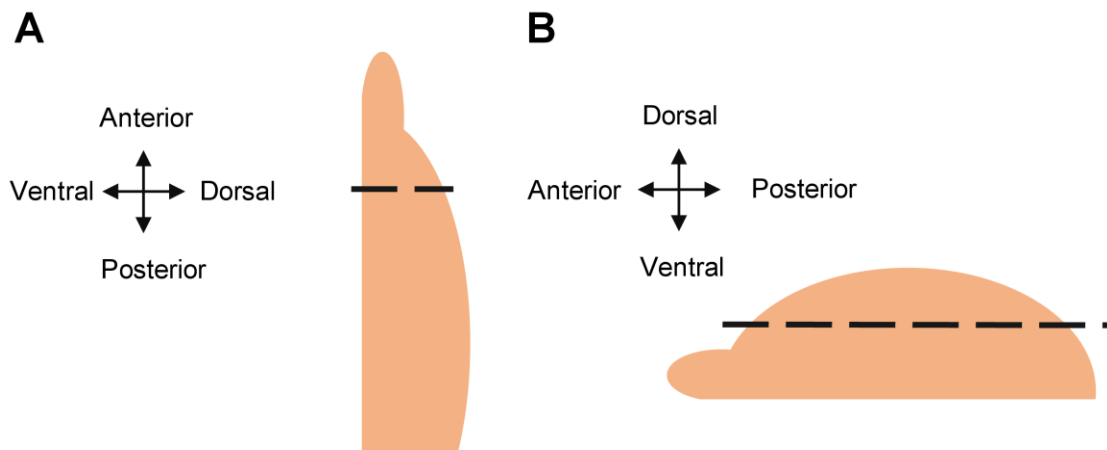
Rycina 3. Zdjęcie prezentuje analizę dendrytu w programie SpineMagic!. Do analiz przygotowano zdjęcia o wartości piksela = $0,07 \mu\text{m}$ **Żółta linia** – dendryt; **niebieska linia** – kontury kolców dendrytycznych; **fioletowa linia** – długość kolców dendrytycznych; **zielone kółko** – główka kolca dendrytycznego; **żółte kółko** – podstawa kolca dendrytycznego.

4.7. Rejestracja techniką whole-cell patch-clamp

W celu analizy zmian funkcjonalnych na poziomie przekaźnictwa synaptycznego zastosowano technikę rejestracji elektrofizjologicznej z pojedynczych neuronów (ang. *whole-cell patch-clamp*) w hodowlach komórkowych lub w preparatach mózgowych utrzymywanych przyżyciowo *in vitro*.

4.7.1. Przygotowanie preparatu mózgowego utrzymywanego przyżyciowo

Do anestezji myszy wykorzystano podany wziewnie izofluran w dawce 2-5% i uśmiercano przez dekapitację po utracie przytomności. Następnie otwierano czaszkę i wyjmowano mózg. Mózg natychmiast cięto na skrawki o grubości 350 μm przy pomocy mikrotomu z wibrującym ostrzem (Leica). Mózg krojono w dwóch płaszczyznach, w celu rejestracji mEPSC przygotowano preparaty w przekroju czołowym (Ryc. 4A) natomiast do badania obecności milczących synaps przygotowano preparaty w przekroju strzałkowym (Ryc. 4B). Tak przygotowane preparaty inkubowano w aCSF w temperaturze 32°C. Do doświadczeń wybierano preparaty z dobrze widocznym zakrętem zębatym.



Rycina 4. Schemat płaszczyzn cięcia mózgu do doświadczeń elektrofizjologicznych. **A.** Płaszczyzna cięcia w przekroju czołowym wykorzystana do rejestracji mEPSC. **B.** Płaszczyzna cięcia w przekroju strzałkowym wykorzystana do rejestracji milczących synaps.

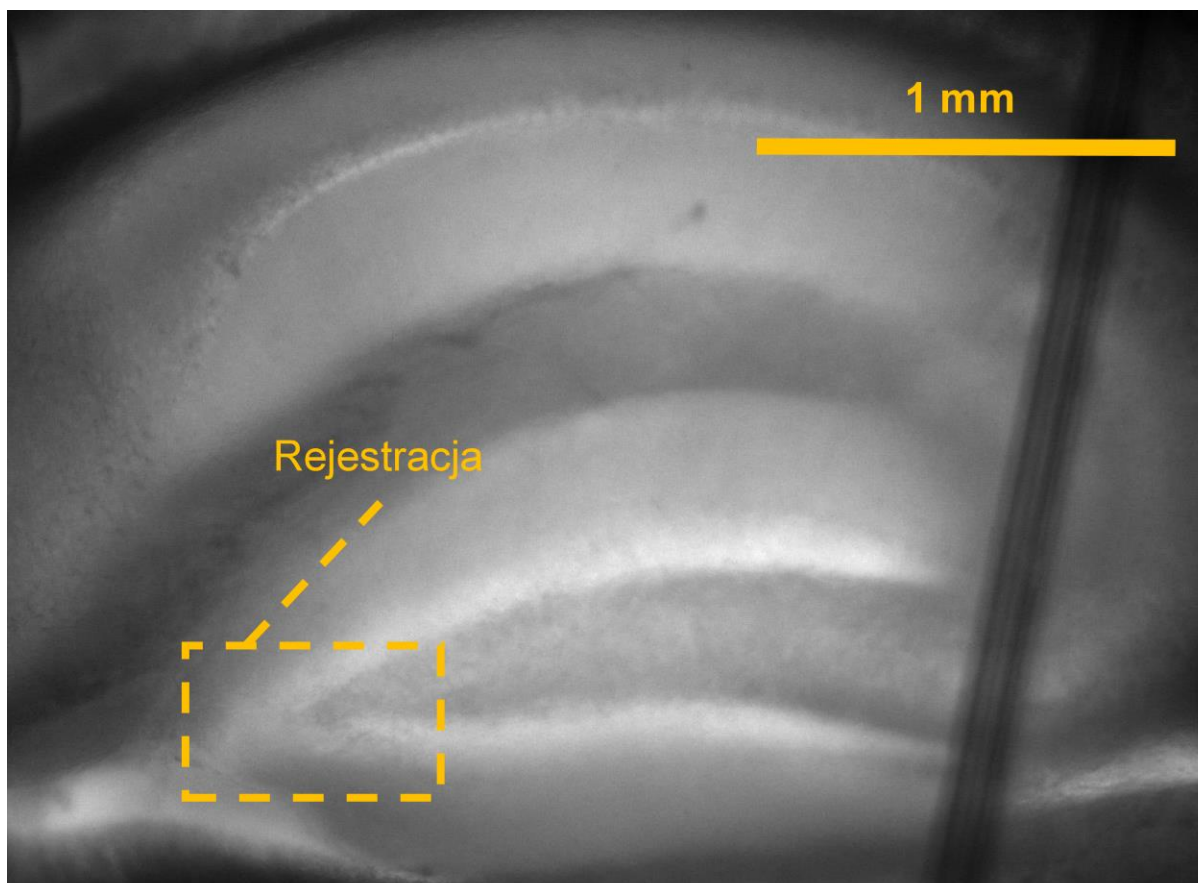
4.7.2. Rejestracja elektrofizjologiczna z pojedynczych neuronów techniką whole-cell patch-clamp

Do rejestracji wykorzystywano szklane elektrody, o oporze 3-5 M Ω wypełnione odpowiednim roztworem elektrodowym. Do analizy mEPSCs użyto roztworu (1) oraz do badań obecności milczących synaps użyto roztworu (2), szczegółowy skład opisano w podrozdziale 3.3. Roztwory. Skład roztworów wybrano na podstawie danych literaturowych (Beroun i wsp., 2018; Brown i Haas, 1999; Dietrich i wsp., 2002). Szklaną elektrodę umieszczano na powierzchni neuronu pod kontrolą wzrokową i doprowadzano do powstania złącza wysokooporowego (ang. *gigaseal*), a następnie błonę neuronu przerywano.

Nagrania zostały przeprowadzone przy użyciu wzmacniacza Axon Multiclamp 700B, sygnał analogowy został przepisany na cyfrowy z wykorzystaniem 1550B Digidata oraz oprogramowania Clampex. Sygnał był filtrowany z częstotliwością 2 kHz i próbkowany z częstotliwością 20 kHz. Do analizy wybierano rejestracje, których opór dostępowy R_{acc} (ang. *access resistance*) był stabilny i wynosił poniżej 20 M Ω . Nagrania analizowano w programie Clampfit.

4.7.3. Nagrania miniaturowych prądów postsynaptycznych

Miniaturowe pobudzające prądy postsynaptyczne (mEPSC) w komórkach ziarnistych zakrętu zębatego nagrywano w trybie stabilizacji napięcia (ang. *voltage-clamp*) utrzymując potencjał błonowy komórki w -70 mV. Rejestracje wykonywano w obecności tetrodotoksyny (TTX, 1 μ M) w celu zablokowania kanałów sodowych i zapobiegnięciu powstawania potencjałów czynnościowych oraz w obecności pikrotoksyny (50 μ M), która blokuje aktywność receptorów GABA_A. Analizowano dwa parametry: amplitudę pojedynczych zdarzeń mEPSC wywołanych spontanicznym uwolnieniem neuroprzekaźnika oraz interwały czasowe między zdarzeniami (Ryc. 5).



Rycina 5. Preparat mózgowy utrzymywany przyżyciowo w przekroju grzbietowym z widocznym zakrętem zębatym. Ramka wskazuje na obszar umieszczania elektrody rejestrującej.

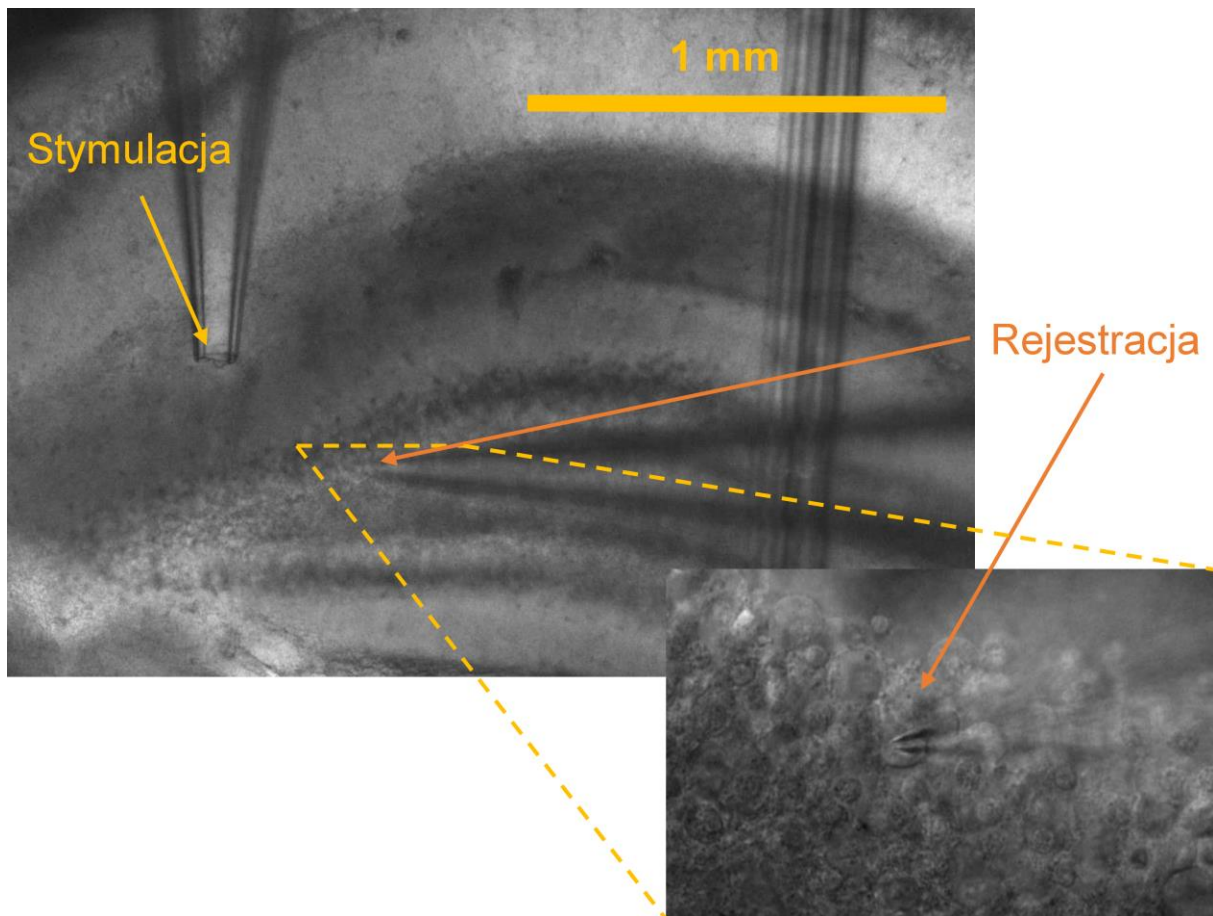
4.7.4. Nagrania milczących synaps

Udział (%) milczących synaps w transmisji synaptycznej między drogą przeszywającą (ang. *perforant pathway*), a komórkami zębatymi nagrywano w trybie voltage-clamp w obecności pikrotoksyny ($50 \mu\text{M}$). Stymulowano włókna presynaptyczne drogi przeszywającej zgodnie ze schematem przedstawionym na rycinie 6, wykorzystując do tego celu szklaną elektrodę wypełnioną aCSF. Zastosowano protokół minimalnej stymulacji, w którym intensywność impulsu elektrycznego (czas trwania 0,2 ms) była dopasowana tak, aby uzyskiwać zarówno odpowiedzi postsynaptyczne jak i brak odpowiedzi. W celu nagrania odpowiedzi receptorów AMPA potencjał błonowy komórki utrzymywano w -60 mV , natomiast dla odpowiedzi NMDA w $+45 \text{ mV}$. Wykonano 20-40 powtórzeń stymulacji w obu potencjałach i dla każdego potencjału wyliczono tzw. wskaźnik niepowodzeń (ang. *failure rates*). Jest to

stosunek liczby stymulacji, która nie wywołała odpowiedzi postsynaptycznej do całkowitej liczby stymulacji. Procent (udział) milczących synaps w puli synaptycznej został obliczony zgodnie ze wzorem:

$$\% \text{ milczących synaps} = 1 - \ln F_{-60\text{mV}} / \ln F_{+45\text{mV}},$$

gdzie $F_{-60\text{mV}}$ oraz $F_{+45\text{mV}}$ są wskaźnikami niepowodzeń (ang. *failure rates*) w odpowiednio -60 mV oraz +45 mV (Beroun i wsp., 2018).



Rycina 6. Schemat umieszczenia elektrod do rejestracji obecności milczących synaps. Zdjęcie przedstawia zakręt zębaty hipokampa w trakcie rejestracji, strzałki wskazują na zakończenia elektrod: stymulującej i rejestrującej. Na przybliżeniu 40x widzimy rejestrowaną komórkę.

4.8. Sekwencjonowanie nowej generacji

Do analizy zmian w poziomie ekspresji miRNA pod wpływem wzmożonej aktywności GSK-3 β u myszy transgenicznych linii GSK-3 β [S9A] wykorzystano metodę sekwencjonowania nowej generacji (NGS) na aparacie MiniSeq (Illumina) polegającą na sekwencjonowaniu przez syntezę (ang. *sequencing by synthesis*) i obejmującą dwa etapy: przygotowanie bibliotek cDNA oraz sekwencjonowanie. Biblioteki przygotowano z użyciem zestawu *TruSeq Small RNA*, w którym materiał wyjściowy (RNA) podlegał ligacji z adapterami 5' i 3', następnie syntezie cDNA oraz dodaniu indeksów, umożliwiających identyfikację próbek za pomocą PCR. Sekwencjonowanie odbyło się przy użyciu nukleotydu znakowanego fluorescencyjnie (Ambardar i wsp., 2016). Rycina 7 prezentuje poszczególne etapy sekwencjonowania.



Rycina 7. Etapy sekwencjonowania miRNA w mysim hipokampie. Sekwencjonowanie przeprowadzone samodzielnie w Zakładzie Genetyki w Psychiatrii oraz Pracowni Badań Molekularnych i Komórkowych pod opieką prof. dr hab. n. med. Aleksandry Szczepankiewicz.

4.8.1. Izolacja RNA

RNA z hipokampów transgenicznych myszy GSK-3 β [S9A] (N=3) oraz rodzeństwa nietransgenicznego, WT (N=3) wyizolowano z wykorzystaniem zestawu *RNeasy®Mini Kit* (QIAGEN) zgodnie z instrukcją producenta. Przed izolacją wszystkie powierzchnie zostały oczyszczone 70% etanolem oraz płynem neutralizującym działanie RNaz: *RNaze Zap* (Sigma-Aldrich). Izolacja obejmowała następujące etapy:

1. Homogenizacja hipokampa w 1 ml buforu lizującego RLT w szklanym homogenizatorze, uzyskany homogenat przelano do probówki o objętości 2 ml typu eppendorf, wirowano przez 3 min przy maksymalnej prędkości.
2. 800 μ l supernatantu przelano do nowej probówki o objętości 2 ml typu eppendorf, i dodano 800 μ l zmrożonego 70% etanolu, zmieszano. Mieszaninę naniesiono na kolumnę *RNeasy Mini spin* umieszczoną w probówce zbierającej o objętości 2 ml; wirowano przez 15 s w 8000x g. Przesącz z probówki zbierającej wylano.
3. Na kolumnę *RNeasy Mini spin* nałożono 700 μ l buforu płuczącego RPE; wirowano przez 15 s w 8000x g. Przesącz z probówki zbierającej wylano.
4. Na kolumnę *RNeasy Mini spin* nałożono 500 μ l buforu płuczącego RW1; wirowano przez 15 s w 8000x g. Przesącz z probówki zbierającej wylano.
5. Na kolumnę *RNeasy Mini spin* nałożono 500 μ l buforu płuczącego RW1; wirowano przez 2 min w 8000x g.
6. Umieszczono kolumnę *RNeasy Mini spin* w nowej probówce o objętości 1,5 ml typu eppendorf i dodano 35 μ l wody wolnej od RNaz bezpośrednio na membranę kolumny. Wirowano przez 1 min w 8000x g.

Stężenie i czystość wyizolowanego RNA oceniono przy użyciu spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Preparaty zamrożono i przesłano w suchym lodzie do Zakładu Genetyki w Psychiatrii w Poznaniu, do dalszej analizy.

4.8.2. Przygotowanie biblioteki

Analiza jakościowa RNA

Przed reakcją sekwencjonowania określono integralność próbek RNA wykorzystując metodę automatycznej elektroforezy żelowej na bioanalyzerze TapeStation 2200 (Agilent).

Technika ta pozwala na ocenę integralności próbki RNA (RIN), przyjmującego wartości od 0 do 10, gdzie 10 oznacza niezdegradowany RNA (Schroeder i wsp., 2006). Wartość parametru RIN dla analizowanych próbek mieściła się w przedziale RIN = 7-9. Do analizy wykorzystano dedykowane odczynniki: *RNA ScreenTape Sample Buffer* (bufor do próbek RNA) oraz *RNA ScreenTape Ladder*, analiza przebiegała zgodnie z następującymi krokami:

1. Zmieszano 5 μ l buforu do próbek RNA z 1 μ l markeru wielkości (*RNA ScreenTape Ladder*).
2. Zmieszano 5 μ l buforu do próbek RNA z 1 μ l próbek RNA.
3. Wortexowano i krótko wirowano.
4. Podgrzano roztwór zawierający marker wielkości oraz próbki w gotowych mieszaninach w 72°C przez 3 min w celu denaturacji, a następnie umieszczono na lodzie na 2 min.
5. Próbkę umieszczono w urządzeniu 2200 TapeStation i przeprowadzono analizę jakościową próbek.

Analiza ilościowa RNA

Stężenie RNA zostało określone z wykorzystaniem fluorymetru Quantus (Promega) z wykorzystaniem barwnika *QuantiFluor dye* zgodnie z instrukcją producenta:

1. Rozcieńczono 400 x barwnik fluorescencyjny *QuantiFluor* w buforze TE (bufor Tris-EDTA, dołączony do zestawu).
2. Rozpipetowano po 200 μ l rozcieńczonego barwnika *QuantiFluor* i dodano po 5 μ l standardów o wysokim (*high*) i niskim (*low*) stężeniu, oraz po 1 μ l próbek; wymieszano przez pipetowanie.
3. Inkubowano przez 5 min w ciemności.
4. Pomiar wykonano stosując protokół „RNA” (protokołem pomiaru specyficzny dla RNA w czytniku).

Do przygotowania biblioteki wykorzystano 1 μ g RNA w 5 μ l H₂O.

Przyłączanie adapterów

Pierwszym krokiem przygotowania biblioteki dla zestawu *TrueSeq Small RNA Library Prep Kit* zgodnie z protokołem producenta było przyłączanie adapterów do sekwencji RNA. Adaptery te są sekwencjami rozpoznawanymi w trakcie klastrowania krótkocząsteczkowych RNA i poddanie ich odwrotnej transkrypcji. Ligacja odbywa się kolejno dla adaptera 3' oraz 5' RNA. Przyłączanie przebiegało zgodnie ze schematem:

1. Do otrzymanego w poprzednim kroku roztworu RNA (1 µg/5 µl H₂O) dodano 1 µl Adaptera 3' RNA (RA3), mieszano przez pipetowanie i inkubowano w 70°C przez 2 min; próbki umieszczono na lodzie.
2. Następnie przygotowano mieszaninę reakcyjną składającą się z 2 µl buforu ligacyjnego, 1 µl inhibitora RNaz oraz 1 µl ligazy RNA T4 (Lucigen), którą dodano do próbek z RNA i RA3 i inkubowano w 28°C przez 1h. Po tym czasie dodano do próbek 1 µl roztworu zatrzymującego reakcję *Stop Solution* i inkubowano w 28°C przez 15 min; przełożono je na lód.
3. 1,1 x N prób [µl] Adaptera 5' RNA (RA5) inkubowano w 70°C przez 2 min, następnie umieszczono na lodzie.
4. Do RA5 dodano 1,1 x N prób [µl] 10 mM ATP, zmieszano.
5. Dodano 1,1 x N prób [µl] Ligazy RNA T4 do mieszaniny RA5 i ATP, zmieszano i dodano po 3 µl do probówek z poszczególnymi próbkami z punktu 2; zmieszano.
6. Inkubowano w 28°C przez 1h; umieszczono na lodzie.

Odwrotna transkrypcja

Próbki RNA po przyłączeniu adapterów 3' oraz 5' poddano reakcji odwrotnej transkrypcji. Przepisaniu na cDNA ulegają wyłącznie cząsteczki RNA z przyłączonymi adapterami na końcach 3' i 5'. Pierwszym krokiem było dodanie do 6 µl bibliotek RNA 1 µl startera odwrotnej transkrypcji *RNA RT Primer* i inkubacja w 70°C przez 2 min. Po tym czasie próbki przełożono na lód i dodano mieszaninę reakcyjnej (Tab. 2). Tak przygotowane próbki inkubowano w 50°C przez 1h, a następnie przełożono je na lód.

Tabela 2. Składniki reakcji odwrotnej transkrypcji wchodzące w skład gotowego zestawu od producenta.

Odczynnik	Objętość [μ l] na 1 reakcję
5x bufor: <i>First Strand Buffer</i>	2
12,5 mM mieszanina dNTP	0,5
100 nM DTT	1
Inhibitor RNaz	1
odwrotna transkryptaza	6,6

Wstępna amplifikacja bibliotek oraz przyłączenie indeksów różnicujących próbki

Przed sekwencjonowaniem otrzymany cDNA poddano amplifikacji w reakcji PCR, by dodać sekwencje indeksów umożliwiającą identyfikację poszczególnych próbek z wykorzystaniem indeksów RPIX. Przygotowano mieszaninę reakcyjną dla każdej próbki osobno składającej się z: wody (8,5 μ l), gotowej mieszaniny PCR: PML(25 μ l), starteru reakcji PCR: RP1 (2 μ l) oraz indeksów znakujących RPIX (2 μ l) i zmieszano z produktem odwrotnej transkrypcji z poprzedniego etapu. Następnie przeprowadzono reakcję w termocyklerze o profilu termicznym:

- denaturacja wstępna: 95°C/30 s,
- amplifikacja w 11 cyklach: 95°C/10 s - 60°C/30 s - 72°C/15 s,
- 72°C/10 min,
- 4°C.

4.8.3. Oczyszczenie biblioteki

Wycinanie bibliotek z żelu

Do przeprowadzenia reakcji sekwencjonowania z maksymalną wydajnością istotnym krokiem jest oczyszczenie bibliotek cDNA z niespecyficznymi fragmentami, powstałymi po amplifikacji np. długich cząsteczek RNA, które nie uległy odwrotnej transkrypcji. W tym celu wykorzystano komercyjny zestaw gotowych żeli agarozowych (Novex) oraz dedykowanego buforu TBE (Novex). Do odpowiednich kieszeni naniesiono próby cDNA oraz markery wielkości *Custom RNA Ladder* (CRL) i *High Resolution Ladder* (HRL). Elektroforezę przeprowadzono w warunkach 145 V przez 60 min. Po skończonej elektroforezie żele wyjęto z kaset i wybarwiono roztworem 10 mg/ml bromku etydyny (Invitrogen) rozcieńczonego 2000x w wodzie. Prążki na żelu wizualizowano korzystając z transluminatora, w celu wycięcia z żelu prążków o długości 145-160 nt, odpowiadających bibliotekom cDNA specyficznym dla dojrzałych miRNA (Ryc. 16, Rozdział 4.5.1).

Oczyszczanie cDNA z żelu przebiegało zgodnie z kolejnymi krokami:

1. Wycięte fragmenty żelu umieszczono w kolumnach do oczyszczania DNA z żelu: *Gel breaker*, a te umieszczono w probówce 2 ml wolnej od DNaz i RNaz i wirowano w 20 000x g przez 2 min w temperaturze pokojowej.
2. Po wirowaniu usunięto probówkę *Gel breaker*, a do osadu w probówce 2 ml pozostałego po wirowaniu dodano 300 µl H₂O i umieszczono w termobloku z wytrząsaniem w temp. 21°C na 2h przy 550 rpm.
3. Następnie próbki przefiltrowano nakładając je na filtr o porach średnicy 5 µm i wirując przy 600x g przez 10 s.
4. Eluowano cDNA poprzez dodanie mieszaniny 2 µl glikogenu, 30 µl 3M NaOAc (octan sodu) oraz 975 µl 100% etanolu. Próbkę wirowano w 20 000 x g przez 20 min w 4°C.
5. Usunięto supernatant i przemyto osad cDNA 500 µl 70% etanolem, następnie wirowano w 20 000x g przez 2 min w 4°C.
6. Usunięto supernatant i suszono osad cDNA w bloku termicznym nagrzanym do 37°C przez 7 min.
7. Zawieszono osad cDNA w 10µl 10 mM roztworze Tris-HCl, pH = 8,5 (Teknova).
8. Po zawieszeniu osadu wytrząsano próbę w bloku termicznym nagrzanym do 21°C przez 10 min przy 300 rpm.

Analiza jakości oczyszczonych bibliotek cDNA

Do oceny specyficzności otrzymanych bibliotek cDNA wykorzystano bioanalyzer TapeStation HSD1000 (Agilent). Analiza pozwala ocenić, czy w oczyszczonej próbce cDNA znajdują się miRNA oraz krótkocząsteczkowe RNA z przyłączonymi adapterami w formie produktów odwrotnej transkrypcji na podstawie ich długości. Ich obecność jest widoczna w postaci prążka na wysokości ok. 145-160 nt (Ryc. 17, Rozdział 4.5.1). Do analizy wykorzystano zestawy odczynników: *High Sensitivity D1000 ScreenTape* oraz *High Sensitivity D1000 Reagents* (w skład którego wchodzi marker wielkości DNA w zakresie 35-1000 nt oraz bufor do rozcieńczeń). Przed pomiarem rozcieńczono marker wielkości oraz próbki cDNA za pomocą buforu *High Sensitivity D1000* (1:1) otrzymując objętość końcową 4 μl , zgodnie z instrukcją producenta. Próbkę przed pomiarem wortexowano i krótko wirowano.

Pomiar ilości oczyszczonych bibliotek cDNA z wykorzystaniem fluorymetru

Do wykonania pomiaru stężenia oczyszczonych bibliotek cDNA wykorzystano fluorymetr Quantus. Pomiaru dokonano zgodnie z instrukcją producenta rozcieńczając barwnik *QuantiFluor 1x TE* (1:400), uzyskując 200 μl objętości końcowej do pomiaru dla jednej próbki. Do rozcieńzonego barwnika dodano odpowiednio 2 μl standardów lub 1 μl analizowanej próbki. Wymieszano przez pipetowanie i inkubowano 5 min w ciemności. Pomiaru dokonano korzystając z parametrów fluorymetru dla dsDNA.

4.8.4. Przygotowanie znormalizowanych bibliotek do sekwencjonowania

Rozcieńczenie i denaturacja bibliotek:

1. Przygotowano świeże rozcieńczenie 0,1 N NaOH
2. Rozcieńczono biblioteki cDNA z wykorzystaniem buforu ETB, uwzględniając masę molową biblioteki, zgodnie z założeniem, że jedna zasada to 660 ng, używając wzoru:

$$x \mu\text{l} = \frac{(5 \mu\text{l})(y \text{ nM})}{10 \text{ nM}} - 5 \mu\text{l},$$

gdzie:

x – objętość buforu ETB,

y – stężenie molowe biblioteki.

Otrzymano biblioteki o stężeniu 10 nM.

3. Zmieszano 5 μ l biblioteki każdej z próbek w nowej probówce 0,2 ml (ang. *Pooling library*).
4. 5 μ l mieszaniny bibliotek rozcieńczono w 45 μ l buforu EBT, worteksowano i wirowano w 280x g przez 1 min. Otrzymano mieszaninę bibliotek o stężeniu 1 nM.
5. Denaturacja: do 5 μ l 1 nM mieszaniny bibliotek dodano 5 μ l 0,1 N NaOH w nowej probówce typu eppendorf (1,5 ml), worteksowano i wirowano w 280x g przez 1 min.
6. Do zdenaturowanej biblioteki dodano 5 μ l 200 mM buforu Tris-HCl, pH= 7,0; worteksowano i wirowano w 280x g przez 1 min.
7. Dodano 985 μ l buforu hybrydyzacyjnego HT1 (element zestawu MiniSeq) do próbki z kroku 6, otrzymując stężenie 5 pM (końcowa objętość 1 ml), worteksowano i wirowano w 280x g przez 1 min.

Denaturacja i rozcieńczenie kontroli PhiX

Kontrola *PhiX* (ang. *PhiX Control*) (Illumina) jest to gotowa, komercyjna kontrola jakości na etapie tworzenia klastrów, sekwencjonowania i mapowania, wykorzystywana w sekwencjonowaniu. Biblioteka pochodzi z małego, dobrze scharakteryzowanego genomu bakteriofaga *PhiX*. Przygotowanie kontroli *PhiX* obejmowało następujące kroki:

1. Przygotowano 25 μ l 4 nM rozcieńczenia kontroli *PhiX* w buforze ETB, worteksowano i krótko wirowano.
2. Denaturacja: w nowej probówce 1,5 ml zmieszano 5 μ l 4 nM rozcieńczenia kontroli *PhiX* z 5 μ l 0,1 N NaOH, worteksowano i krótko wirowano. Inkubowano w temperaturze pokojowej 5 min.
3. Dodano 5 μ l 200 mM buforu Tris-HCl, pH= 7,0, otrzymując końcową objętość 15 μ l.
4. Dodano 985 μ l buforu hybrydyzacyjnego HT1 (element zestawu MiniSeq) do próbki z kroku 3, otrzymując stężenie 20 pM (końcowa objętość 1 ml), worteksowano.
5. Rozcieńczono zdenaturowaną kontrolę 20 pM *PhiX* w buforze hybrydyzacyjnym, otrzymując stężenie 1,8 pM w końcowej objętości 500 μ l. Wymieszano przez inwersję i wirowano w 280 x g przez 1 min.

4.8.5. Połączenie biblioteki z kontrolą PhiX

Do mieszaniny bibliotek cDNA dodano 10% objętości kontroli *PhiX*, objętość końcowa 500 μ l. Tak przygotowaną bibliotekę nałożono do dedykowanego zestawu odczynników w formie kasety z odczynnikami do sekwencjonowania – *Reagent cartridge* (Illumina). Kasetę umieszczono w aparacie MiniSeq (Illumina) i rozpoczęto reakcję sekwencjonowania. Po zakończeniu reakcji z aparatu MiniSeq pobrano dane surowe w formacie FastQ oraz raport sekwencjonowania.

4.8.6. Analiza danych z NGS

Analizę danych pochodzących z sekwencjonowania przeprowadzono przy użyciu aplikacji: *Illumina BaseSpace App: Small RNA, Version 1.0.1*. Wykorzystuje ona algorytm Bowtie do mapowania odczytów do sekwencji referencyjnej oraz algorytm DESeq2 do analizy różnic w poziomie ekspresji między badanymi próbkami (Small RNA v1.0 BaseSpace App Guide).

4.9. Analiza ilości wybranych miRNA z wykorzystaniem ilościowego PCR

4.9.1. Synteza cDNA wraz ze wstępną amplifikacją

Syntezę cDNA przeprowadzono z użyciem komercyjnego zestawu *TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit* (LifeTechnologies) zgodnie z instrukcją producenta. Zestaw wykorzystuje poliadenylację końca 3' oraz ligację adaptora do końca 5' w celu wydłużenia obecnych w próbce dojrzałych miRNA na każdym końcu przed odwrotną transkrypcją. Startery wykorzystane w zestawie rozpoznają tę sekwencję na przedłużonych końcach 3' oraz 5' dojrzałych miRNA. W ten sposób wszystkie dojrzałe miRNA w próbce ulegają odwrotnej transkrypcji. Otrzymane cDNA zostało poddane wstępnej amplifikacji i rozcieńczone w stosunku 1:10 przed reakcją qPCR.

Przed reakcją odwrotnej transkrypcji przygotowano próbki RNA w stężeniu 5 ng/ μ l. Poszczególne reakcje przeprowadzono w termocyklerze Mastercycler gradient (Eppendorf).

Etapy reakcji odwrotnej transkrypcji:

1. Poliadenylacja końca 3'

Do mieszaniny reakcyjnej w objętości końcowej 3 μ l dodano 2 μ l rozcieńczonego RNA. Skład mieszaniny przedstawia tabela 3. Reakcje poliadenylacji przeprowadzono w termocyklerze z następującym profilem czasowo/temperaturowym: **poliadenylacja:** 37°C/45 min; **zatrzymanie reakcji** 65°C/10 min. Próbki utrzymywano w temperaturze 4°C do momentu rozpoczęcia kolejnego etapu.

Tabela 3. Składniki reakcji poliadenylacji.

Odczynnik	Objętość [μ l] na 1 reakcję
10x bufor Poly(A)	0,5
ATP	0,5
Enzym: Poly(A)	0,3
Woda wolna od RNaz	1,7
Σ	3

2. Ligacja adaptora na końcu 5'

Przygotowano mieszaninę do ligacji (tab. 4) i dodano po 10 μ l do próbek po reakcji poliadenylacji. Reakcje ligacji przeprowadzono w 16°C/60 min. Próbki trzymane w 4°C do momentu rozpoczęcia kolejnego etapu.

Tabela 4. Składniki reakcji ligacji adaptora.

Odczynnik	Objętość [μl] na 1 próbkę
5x Bufor do ligazy DNA	3
50% PEG 8000	4,5
25x Adaptor	0,6
Ligaza RNA	1,5
Woda wolna od RNaz	0,4
Σ	10

3. Odwrotna transkrypcja

Przygotowano mieszaninę reakcyjną do odwrotnej transkrypcji zgodnie z protokołem producenta i dodano ją do próbek po ligacji adapterów. Tabela 5 przedstawia warunki reakcji odwrotnej transkrypcji na jedną reakcję oraz profil temperaturowy reakcji. Została ona przeprowadzona w objętości końcowej 30 μl w aparacie MasterCycler®ep (Eppendorf).

Tabela 5. Składniki reakcji odwrotnej transkrypcji oraz profil temperaturowy.

Odczynnik	Objętość [μl] na 1 próbkę
5x bufor do odwrotnej transkrypcji	6
Mieszanina dNTP	1,2
20x Uniwersalny starter do odwrotnej transkrypcji	1,5
10x enzym do odwrotnej transkrypcji	3
Woda wolna od RNaz	3,3
Σ	15

Profil temperaturowy

Temperatura [$^{\circ}$C]	Czas [min]
42	15
85	5
4	∞

4. Wstępna amplifikacja

Reakcję wstępnej amplifikacji przeprowadzono w termocyklerze z następującym profilem czasowo/temperaturowym: aktywacja enzymu w $95^{\circ}\text{C}/5$ min, denaturacja w $95^{\circ}\text{C}/3$ s oraz synteza w $60^{\circ}\text{C}/30$ s w 14 cyklach reakcyjnych. Inaktywacja enzymu odbyła się w $99^{\circ}\text{C}/10$ min. Po zakończeniu programu, próbki były przechowywane w -20°C do dalszych analiz. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawia tabela 6.

Tabela 6. Składniki reakcji wstępnej amplifikacji.

Odczynnik	Objętość [μ l] na 1 próbkę
2x miR-Amp Master Mix	25
20x miR-Amp Primer Mix	2,5
Woda wolna od RNaz	17,5
Σ	45

4.9.2. Analiza przyrostu produktu w czasie rzeczywistym.

W reakcji Real-time PCR zastosowano komercyjnie dostępne sondy *TaqMan*TM *Advanced miRNA Assay* (LifeTechnologies):

- miR-221-5p (Sekwencja miRNA: ACCUGGCAUACAAUGUAGAUUUCUGU)
- miR-186-5p (Sekwencja miRNA: CAAAGAAUUCUCCUUUUGGGCU)
- miR-129-1-3p (Sekwencja miRNA: AAGCCCUUACCCCAAAAAGUAU)
- miR-145a-5p (Sekwencja miRNA: GUCCAGUUUCCAGGAAUCCCU)

oraz mieszaninę reakcyjną *TaqMan*TM *Fast Advanced Master Mix* (LifeTechnologies) dedykowaną dla tego typu sond. Mieszaninę reakcyjną przygotowano zgodnie z protokołem producenta i dodano materiał cDNA po wstępnej amplifikacji rozcieńczony w stosunku 1:10.

Reakcję przeprowadzono w 96-dołkowych płytkach w objętości końcowej 20 μ l w 3 powtórzeniach dla każdego analizowanego miRNA w termocyklerze StepOnePlusTM Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Profil czasowo/temperaturowy:

1. Aktywacja polimerazy 20 s/95°C,
2. 40 cykli reakcyjnych:
 - denaturacja 95°C/1 s
 - synteza 60°C/20 s.

Eksperyment znormalizowano względem średniej geometrycznej z dwóch referencyjnych miRNA wytypowanych z analizy NGS spośród 3 kandydujących miRNA:

- let-7d-5p (*Mature miRNA Sequence*: AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU)
- let-7g-5p (*Mature miRNA Sequence*: UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU)
- miR-9-3p (*Mature miRNA Sequence*: AUAAAGCUAGAUAAACCGAAAGU).

Analizę przyrostu produktu oceniano poprzez pomiar intensywności fluorescencji sondy, natomiast do analizy ekspresji wybranych genów użyto metody komparatywnej $2^{-\Delta\Delta CT}$. Wyniki przedstawiono jako różnicę poziomu ekspresji badanego miRNA między próbkami badanymi a próbą referencyjną.

4.10. Pierwotna hodowla komórek nerwowych hipokampa

4.10.1 Przygotowanie szkiełek

Szkiełka nakrywkowe hodowlane o średnicy 18 mm odtłuszczono 72h kąpielą w 65% kwasie azotowym. Następnie płukano je wodą destylowaną 8-krotnie po 15 min i wyprażano w piecu przez 3h w temperaturze 180°C. Przed wysianiem komórek szkiełka umieszczano w płytce 12 dołkowej i pokryto poly-D-lizną w stężeniu 1mg/ml oraz lamininą w stężeniu 2,5g/ml rozpuszczone w buforze BB (kwas borowy i Boraks).

Procedura przygotowania hipokampalnej hodowli pierwotnej została wykonana na podstawie protokołu (Kaech i Banker, 2006). Tkanka została pobrana z mysich osesków WT (szczep FVB) urodzonych w ciągu 24h poprzedzających moment zakładania hodowli (P_0 , *Postnatal day 0*). Wyizolowane mózgi zostały umieszczone w HBSS – *Hank's Balanced Salt Solution* (Gibco) na szalce Petriego i wypreparowano z nich hipokampy. Do wyizolowanych struktur dodano roztwór papainy (10 U) i trawiono w 37°C przez 25 min. Po usunięciu roztworu papainy inkubowano hipokampy w temperaturze pokojowej przez 5 min w roztworze inaktywującym zawierającym inhibitor trypsyny oraz 10% FBS w pożywce DMEM. Kolejnym krokiem było trzykrotne przepłukanie hipokampów pełną pożywką DMEM (10% FBS, 1x antybiotyki: streptomycyna i penicylina). Ostatnim krokiem była mechaniczna dysocjacja komórek nerwowych w objętości 1 ml pełnego DMEM. Komórki zostały policzone przy użyciu automatycznego licznika komórek – Cell Counter model R1 (Olympus) i wysiane na

przygotowane wcześniej płytki. Komórki wysiewane były po $1,9 \times 10^5$ komórek na dołek. Po 1-1,5 h od wysiania pożywka DMEM została usunięta i zmieniona na NBA z dodatkiem suplementu B27. W dniu 3 *in vitro* (DIV3) do hodowli dodano arabinozyd cytozyny (AraC) w stężeniu $5 \mu\text{M}$, będący inhibitorem proliferacji komórek (Moutin i wsp., 2020). Hodowle *in vitro* prowadzono w inkubatorze w temperaturze 37°C z 5% atmosferą CO_2 i 95% wilgotnością.

4.10.2. Transfekcja hodowli pierwotnej inhibitorem miR-221*

Hodowle prowadzono przez 19-20 dni, bez zmiany pożywki. W DIV16-17 dodano inhibitor miR-221* (miR-221-5p) z wyznakowanym fluorescencyjnie barwnikiem FAM488 (tab. 7) w stężeniu 5pM przy użyciu *Lipofectamine RNAiMAX* (Thermofisher) zgodnie z instrukcją producenta. Do dołków kontrolnych, nietransfekowanych inhibitorem, dodano *Lipofectamine RNAiMAX*. Następnie, 48h po transfekcji, przygotowano szkiełka z hodowlami do analizy mikroskopowej (analiza kolców dendrytycznych) lub wykonano rejestracje elektrofizjologiczne (analiza mEPSCs) (Ryc.8).

Tabela 7. Inhibitor wykorzystany do transfekcji hodowli pierwotnej neuronów (QIAGEN).

Grupa produktów	Nazwa	Sekwencja 5'-3'
miRCURY LNA TM miRNA inhibitor	mmu-miR-221-5p	/56-FAM/*ATCTACATTGTATGCCAGG



Rycina 8. Schemat transfekcji hodowli inhibitorem miR-221*.

4.10.3. Ocena aktywności metabolicznej komórek – test MTT

Inhibitor wykorzystany w doświadczeniu zgodnie z instrukcją producenta powinien być podawany w zakresie stężeń od 1-50 nM. Aby sprawdzić, czy dane stężenie inhibitora nie wpływa na żywotność neuronów wykonano test MTT pozwalający ocenić żywotność komórek.

Komórki wysiano w pełnej pożywce DMEM na transparentne płytki 96-dołkowe o płaskim dnie w gęstości 15×10^3 komórek/dołek. Po 1.5h pożywkę zmieniono na *Neurobasal* i utrzymano ją do *DIV16*, w którym komórki były morfologicznie dojrzałymi neuronami. Następnie pożywkę hodowlaną zebrano i dodano nową pożywkę zawierającą inhibitor miR-221* wyznakowany fluorescencyjnie (FAM488) w stężeniach 5/25/50/100 nM. W grupie kontrolnej dodano wyłącznie reagent *Lipofectamine RNAiMAX*. Płytki pozostawiono w inkubatorze przez 48h, po zakończeniu czasu inkubacji do hodowli dodano 20 μ l roztworu MTT (sól tetrazolowa) w stężeniu 5 mg/ml w PBS i ponownie umieszczono w inkubatorze na okres 4h. Następnie medium delikatnie odciągnięto, a powstałe kryształy formazanu rozpuszczono w objętości 150 μ l DMSO/dołek. Płytki przeniesiono na wytrząsarkę orbitalną i pozostawiono na 3 min w ciemności, aż do momentu rozpuszczenia kryształów. Spektrofotometrycznego pomiaru absorbancji dokonano przy użyciu czytnika absorbancji (Sunrise, Tecan) przy długości fali 590 nm z uwzględnieniem fali referencyjnej o długości 620 nm. Aktywność metaboliczna komórek została obliczona jako ΔA ($A_{590} - A_{620}$). Wyniki podano jako aktywność metaboliczną komórek w %, natomiast wartość pomiaru dla grupy kontrolnej przyjęto jako 100%.

4.10.4. Przygotowanie preparatów z hodowli komórkowych i utrwalanie komórek

Do wizualizacji komórek hodowli pierwotnej wykorzystano kryształy barwnika błonowego DiI nakładane bezpośrednio na szkiełka z hodowlami (Cheng i wsp., 2014). Po nałożeniu kryształów barwnika, szkiełka z hodowlami umieszczono wraz z pożywką na 3h w inkubatorze hodowlanym.

Komórki utrwalono mieszaniną paraformaldehydu (4%) i sacharozy (4%) w PBS przez 10 min w temperaturze pokojowej. Roztwór do utrwalania był przechowywany w 20°C, a przed użyciem ogrzewany do 37°C. Szkiełka nakrywkowe z komórkami zostały naniesione na szkiełka podstawowe na kropli Fluoromount-G i pozostawione na 2-3h pod przykryciem

w temperaturze pokojowej do wyschnięcia. Preparaty przechowywane były w ciemności w 4°C do czasu obrazowania.

4.10.5. Analiza kształtu kolców dendrytycznych w hodowli pierwotnej

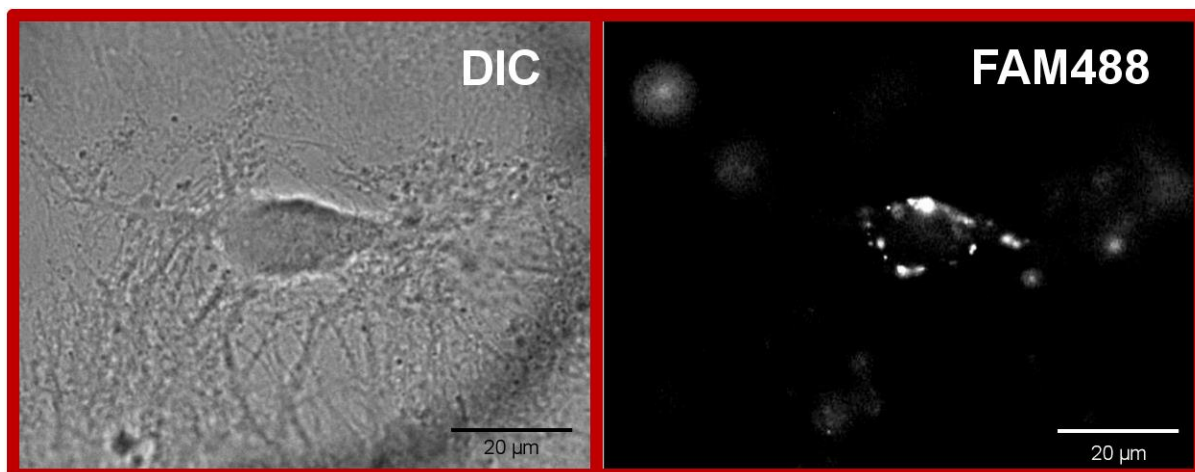
W hodowlach komórkowych, analizowana była gęstość i morfologia kolców dendrytycznych tak, jak opisano to w rozdziale 3.6.2. (Metody). Analiza obejmowała komórki piramidalne z pierwotnej hodowli hipokampalnej. Tabela 8 przedstawia liczbę analizowanych komórek oraz kolców dendrytycznych z 4 niezależnych hodowli.

Tabela 8. Liczba analizowanych komórek oraz kolców dendrytycznych w hodowlach po 48h transfekcji inhibitorem miR-221*.

Grupa	Liczba komórek (N)	Liczba kolców (n)
Inhibicja miR-221*	28	2027
Kontrola	17	1412

4.10.6. Analiza mEPSCs w hodowli pierwotnej

Po 48h od transfekcji przeniesiono szkiełka z komórkami z inkubatora hodowlanego i umieszczono je w komorze rejestracyjnej o stałym przepływie aCSF. Do rejestracji elektrofizjologicznych wybierano komórki posiadające barwnik fluorescencyjny FAM488 (Ryc. 9).



Rycina 9. Zdjęcia przedstawiające komórkę piramidalną *in vitro* 48h po transfekcji inhibitorem miR-221*. Po lewej: obraz w kontraście interferencyjno-różniczkowym (DIC). Po prawej: ta sama komórka obrazowana we fluorescencji 48h po transfekcji inhibitorem miR-221* z widocznym wybarwieniem FAM488. Powiększenie 40 x. DIC – kontrast interferencyjno-różniczkowy.

4.11. Analiza statystyczna

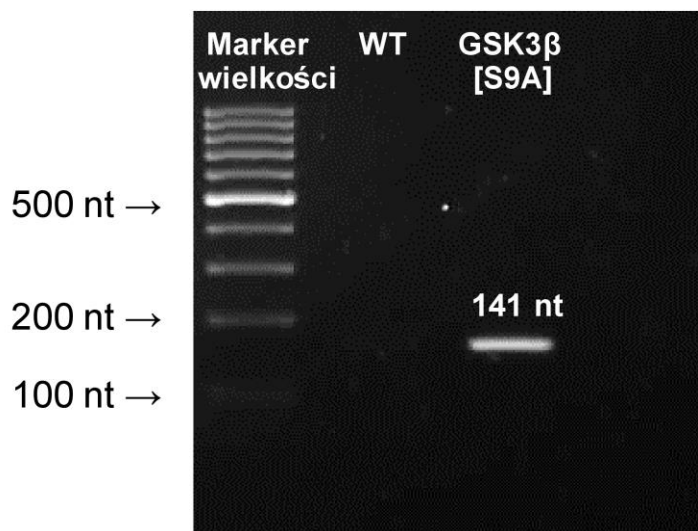
Uzyskane wyniki przedstawiono jako średnią \pm błąd standardowy średniej (SEM). Różnice statystyczne wyników określono przy pomocy dwustronnego testu t-studenta dla danych parametrycznych oraz Manna-Whitney'a dla danych nieparametrycznych oraz testu Kołmogorowa-Smirnowa do analizy różnic w rozkładzie dwóch prób. Rozkład kształtu kolców oceniono za pomocą testu Pearsona (χ^2). W celu określenia aktywności metabolicznej komórek po podaniu różnych stężeń inhibitora miR-221* została wykorzystana jednoczynnikowa ANOVA. Statystyczne zestawienie wyników oraz obliczenia przygotowano w programie *GraphPad Prism* wersja 6.0. Wartość $p < 0,05$ uznano za istotną statystycznie (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Graficzna prezentacja wyników oraz panele poglądowe dokumentacji fotograficznej zostały wykonane w programie *Powerpoint*.

5. Wyniki

5.1. Określenie genotypu myszy transgeniczných GSK-3 β [S9A]

W celu określenia genotypu transgeniczných myszy wykorzystano metodę PCR. Rycina 10 prezentuje wizualizację wyniku genotypowania po elektroforezie na żelu agarozowym. Prążek na wysokości 141 nt wskazuje, że dany osobnik posiada wbudowany modyfikowany gen GSK-3 β pod promotorem.

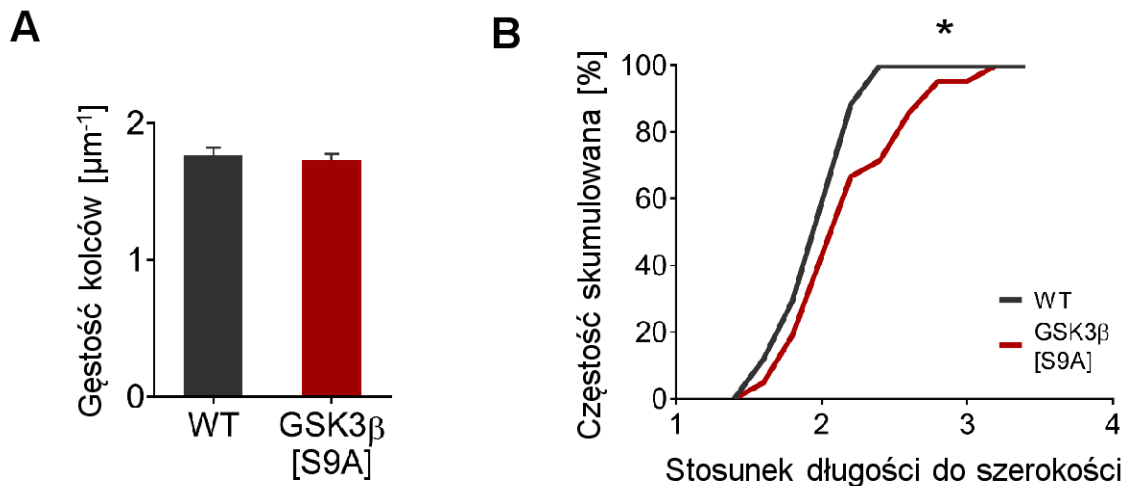


Rycina 10. Przykładowy żel, na którym uwidoczniony jest prążek na wysokości 141 nt u myszy transgeniczných z linii GSK-3 β [S9A] oraz brak prążka u myszy typu dzikiego (WT). Marker wielkości: *benchtop 100 bp DNA ladder* (Promega).

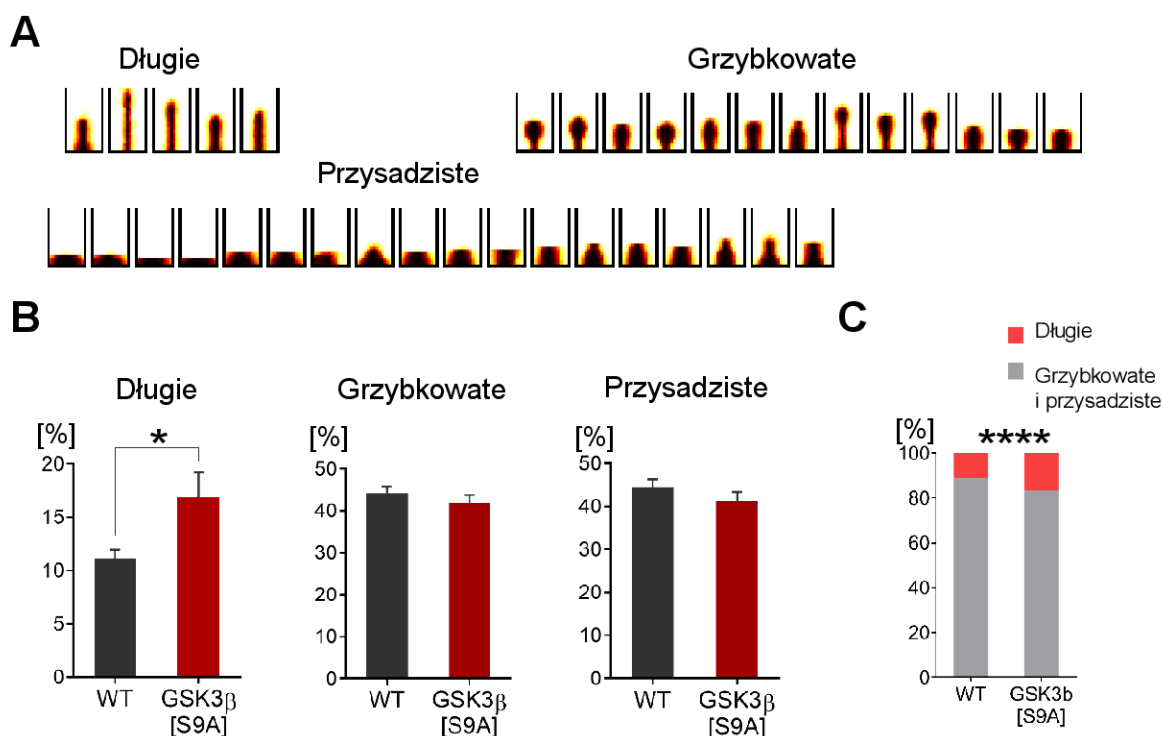
5.2. Wzmożona aktywność GSK-3 β powoduje zmiany w strukturze kolców dendrytycznych u myszy z linii GSK-3 β [S9A]

Pierwszym etapem prowadzonych badań była analiza kształtu kolców dendrytycznych u młodych (3 tygodniowych) osobników z linii GSK-3 β [S9A] oraz WT. W tym celu wykorzystano półautomatyczny skrypt SpineMagic (Ruszczycki i wsp., 2012) (Metody), który pozwolił na wykonanie pomiarów parametrów opisujących kształt kolców dendrytycznych, określenie gęstości występowania kolców na analizowanych dendrytach oraz

przyporządkowanie kolców na podstawie ich kształtu do jednej z trzech kategorii: długie, grzybkowate lub przysadziste (Ryc. 12A). Nie wykazano zmian w gęstości kolców dendrytycznych między grupami (test t-studenta, $p=0,6$; Ryc. 11A). Kolce dendrytyczne u myszy transgeniczných ze wzmożoną aktywnością GSK-3 β , wykazały wzrost wartości parametru określającego stosunek długości do szerokości (test t-studenta z korektą Welcha $p=0,03$; Ryc. 11B). Zaobserwowano procentowy wzrost długich kolców u myszy GSK-3 β [S9A] ($N_{\text{osobników}}=21$, $n_{\text{kolców}}=1537$) względem myszy typu dzikiego ($N_{\text{osobników}}=34$, $n_{\text{kolców}}=3165$) [WT] (test t-studenta z korektą Welcha, $p=0,03$; Ryc. 12B). Dodatkowo rozkład kształtu kolców wykazał wzrost liczby kolców długich u myszy GSK-3 β [S9A] (test Pearsona $X^2=30,41$, $df=1$, $p=0,0001$; Ryc. 12C).



Rycina 11. Analiza kolców dendrytycznych za pomocą półautomatycznego skryptu SpineMagic! (Ruszczycki i wsp. 2012). **A.** Brak różnic w gęstości kolców; ns – nie istotne statystycznie (test t-studenta, n.s., $p>0,5$). **B.** Wzrost stosunku długości do szerokości kolców u myszy ze wzmożoną aktywnością GSK-3 β . Myszy bez mutacji genetycznej (WT, $N_{\text{osobników}}=34$, $n_{\text{kolców}}=3165$), myszy ze wzmożoną aktywnością GSK-3 β (GSK-3 β [S9A], $N_{\text{osobników}}=21$, $n_{\text{kolców}}=1537$) (test t-studenta z korektą Welcha, $*p>0,05$).

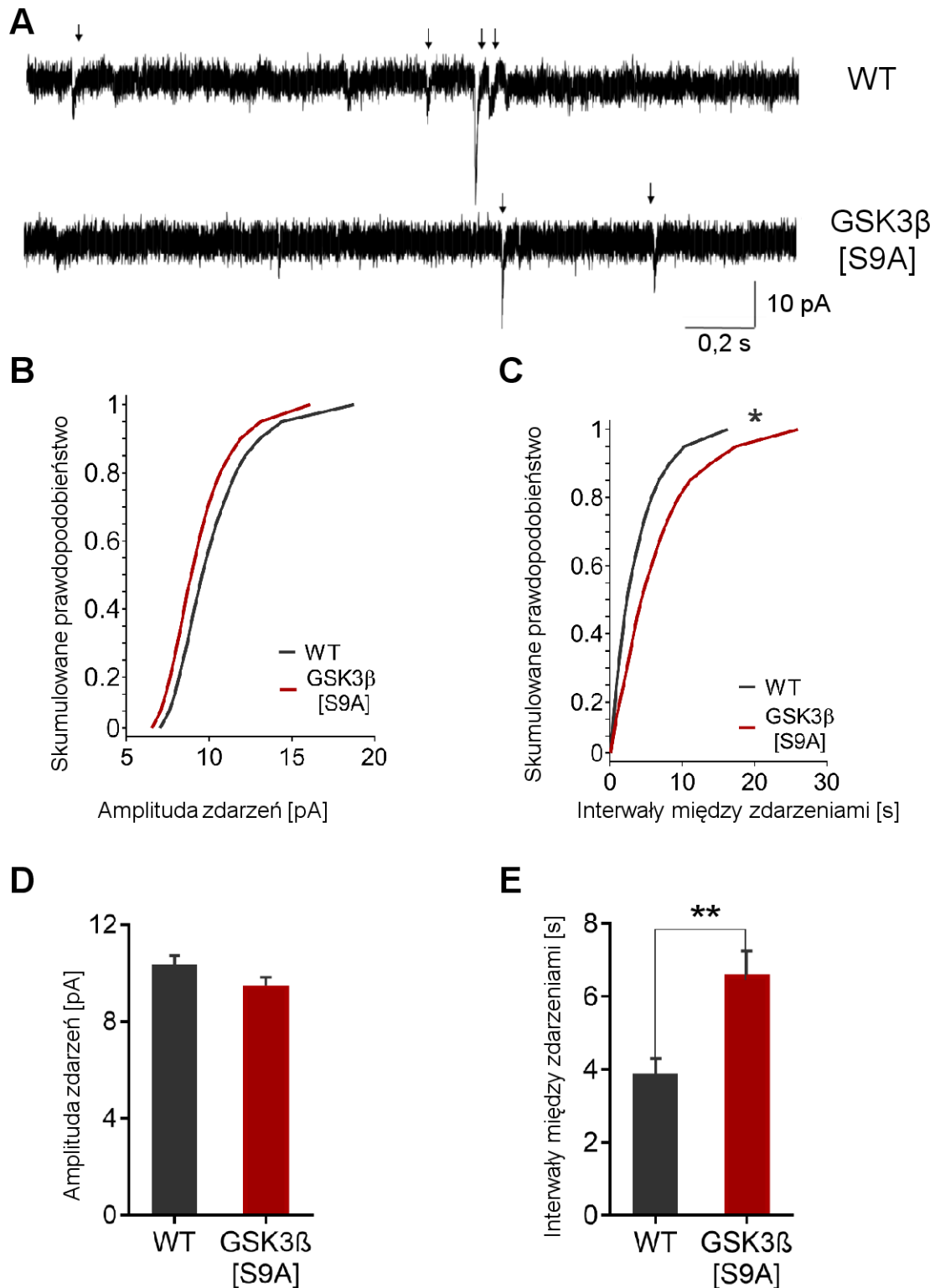


Rycina 12. Podział kolców dendrytycznych na 3 typy: długie, grzybkowate i przysadziste przy pomocy skryptu SpineTools (Jasińska i wsp. 2016). **A.** Kategorie kolców dendrytycznych. **B.** Różnice w procentowym rozkładzie między poszczególnymi typami kolców. Zaobserwowano więcej kolców długich u myszy ze wzmożoną aktywnością GSK-3 β (GSK-3 β [S9A], $N_{\text{osobników}}=21$, $n_{\text{kolców}}=1537$) w stosunku do rodzeństwa bez mutacji genetycznej (WT, $N_{\text{osobników}}=34$, $n_{\text{kolców}}=3165$; test t-studenta z korektą Welcha, $*p>0,05$). Nie zaobserwowano różnic w procentowym rozkładzie kolców grzybkowatych i przysadzistych (test t-studenta, n.s., $p>0,5$) **C.** Analiza rozkładu typów kolców pod względem kształtu pokazała procentowy wzrost procentowy kolców długich względem grzybkowatych i przysadzistych u myszy ze wzmożoną aktywnością GSK-3 β (test Pearsona X^2 , $****p<0,0001$).

5.3. Analiza własności miniaturowych postsynaptycznych prądów pobudzających

Aby zbadać wpływ zwiększonej ekspresji GSK-3 β na funkcjonowanie synaps, porównano pobudzające przekazywanie synaptyczne między myszami WT a GSK-3 β [S9A]. W tym celu zarejestrowano mEPSCs w komórkach ziarnistych zakrętu zębatego hipokampa *in vitro* skupiając się na analizie amplitudy zdarzeń i długości interwałów między zdarzeniami

(Ryc. 13A). Amplituda zdarzeń może wskazywać na zmiany ilości glutaminianu w pęcherzyku synaptycznym, bądź na zmiany liczby receptorów AMPA/NMDA w części postsynaptycznej (O'Brien i wsp., 1998; Turrigiano i wsp., 1998). Natomiast długość interwałów między zdarzeniami (odwrotność częstotliwości) może wskazywać na zmiany w prawdopodobieństwie uwalniania neuroprzekaźnika w części presynaptycznej (Bacci i wsp., 2001; Wierenga i wsp., 2005) bądź na zmiany w liczbie funkcjonalnych synaps (Roszkowski i wsp., 2016). W przeprowadzonych badaniach nie zaobserwowano różnic w rozkładzie amplitudy zdarzeń (test Kołmogorowa-Smirnowa, $p=0,688$; Ryc. 13B), jak również w średniej amplitudzie zdarzeń pomiędzy grupami myszy (test Mann-Whitney'a, $p=0,074$; Ryc. 13D). Zaobserwowano różnicę w rozkładzie długości interwałów między zdarzeniami mEPSCs pomiędzy grupami zwierząt typu dzikiego ($N_{\text{osobniki}}=3$, $n_{\text{komórki}}=10$), a myszami GSK-3 β [S9A] ($N_{\text{osobniki}}=5$, $n_{\text{komórki}}=14$; Kolmogorov-Smirnov, $p=0,019$; Ryc. 13C), z jednoczesnym wzrostem średniej wartości interwałów między zdarzeniami o ponad 2 s (test Manna-Whitney'a, $p=0,007$; Ryc. 13E).

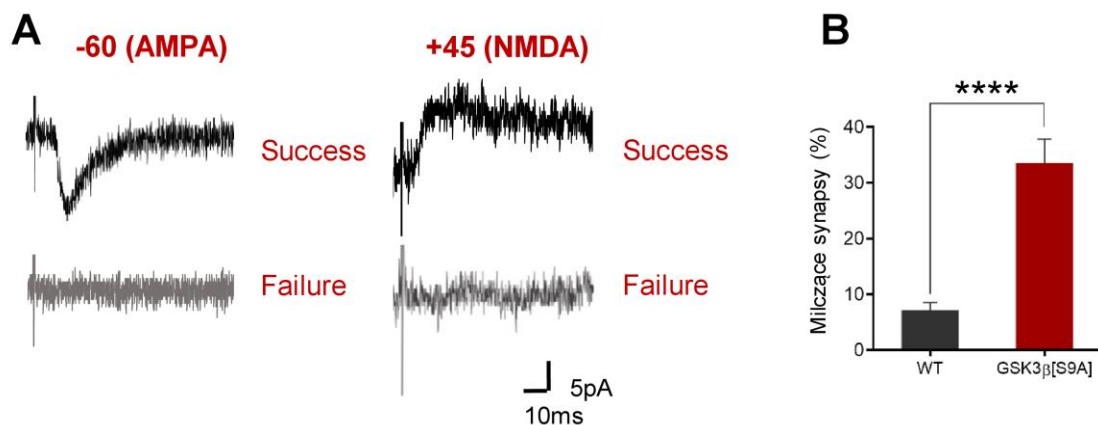


Rycina 13. Analiza mEPSCs w komórkach ziarnistych zakrętu zębatego hipokampa myszy ze wzmożoną aktywnością GSK-3 β (GSK-3 β [S9A], $N_{\text{osobniki}}=5$, $n_{\text{komórki}}=14$) w porównaniu do rodzeństwa bez mutacji genetycznej (WT, $N_{\text{osobniki}}=3$, $n_{\text{komórki}}=10$). **A.** Przykładowe zapisy aktywności spontanicznej neuronów, strzałkami zaznaczono pojedyncze zdarzenia EPSC. Wykres skumulowanego prawdopodobieństwa dla **B.** amplitudy zdarzeń (test Kołmogorowa-

Smirnowa, n.s., $p > 0,05$) i C. interwałów między zdarzeniami (test Kołmogorowa-Smirnowa, $*p < 0,05$). Wykresy słupkowe dla D. średniej amplitudy zdarzeń (test Manna-Whitney'a, n.s., $p > 0,05$) i E. średniej wartości interwałów między zdarzeniami (test Manna-Whitney'a, $**p < 0,01$).

5.4. Analiza obecności milczących synaps

Powyższe wyniki pokazują, że wzmożona aktywność GSK-3 β nie spowodowała zmian w gęstości kolców, jednak wpłynęła na zmianę ich struktury. U myszy transgenicznych zaobserwowano więcej kolców długich, uważanych za niedojrzałą formę tych struktur, a badania elektrofizjologiczne pokazały zmniejszoną częstotliwość mEPSCs. Wyniki te sugerują zmniejszenie się puli funkcjonalnych synaps u myszy ze wzmożoną aktywnością GSK-3 β . Dlatego w następnym kroku zbadano, czy u myszy transgenicznych występuje zwiększona liczba niedojrzałych (niefunkcyjnych) synaps glutaminergicznych – milczących synaps (Ryc. 14A). Milczące synapsy posiadają stabilnie zakotwiczone w części postsynaptycznej receptory NMDA, podczas gdy receptorów AMPA nie ma lub są niestabilne (Beroun i wsp., 2018). U transgenicznych myszy GSK-3 β [S9A] zaobserwowano zwiększoną obecność milczących synaps, około 33% (WT $N_{\text{osobniki}}=9$, $n_{\text{komórki}}=34$; GSK-3 β [S9A] $N_{\text{osobniki}}=6$, $n_{\text{komórki}}=21$; test Manna Whitney'a, $p=0,0000$; Ryc. 14B).



Rycina 14. Zwiększony udział (%) milczących synaps u transgenicznych myszy GSK-3 β [S9A]. A. Przykładowe odpowiedzi (ang. *Success*) lub ich brak (ang. *Failure*) na minimalną stymulację elektryczną w -60 mV oraz +45 mV. Liczba odpowiedzi oraz braku odpowiedzi na minimalną stymulację elektryczną została wykorzystana do obliczenia %

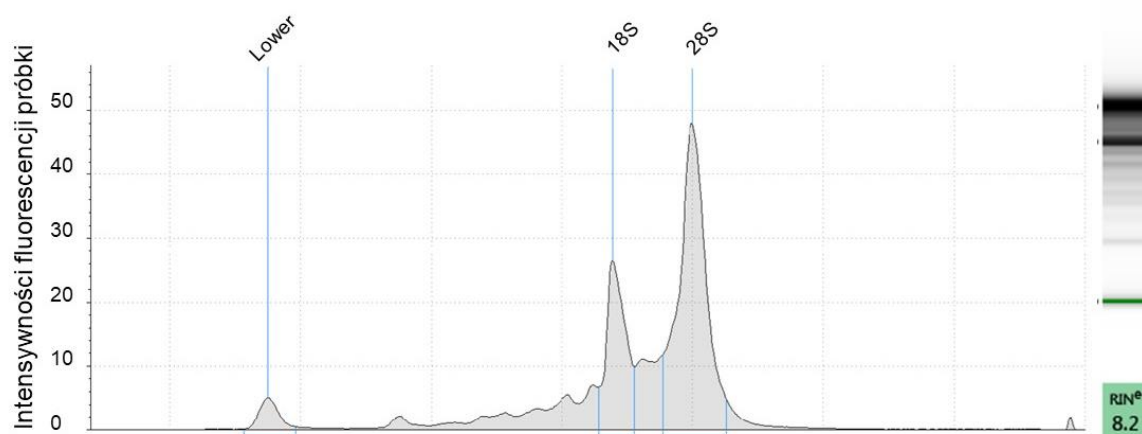
milczących synaps. **B.** U myszy GSK 3 β [S9A] ($N_{\text{osobniki}}=6$, $n_{\text{komórki}}=21$) zaobserwowano znaczący wzrost udziału milczących synaps w porównaniu do rodzeństwa WT ($N_{\text{osobniki}}=9$, $n_{\text{komórki}}=34$; test Manna-Whitney'a, **** $p<0,0001$).

5.5. Analiza profilu ekspresji mikroRNA metodą sekwencjonowania

5.5.1. Analiza jakości próbek na poszczególnych etapach przed sekwencjonowaniem

Ocena integralności RNA

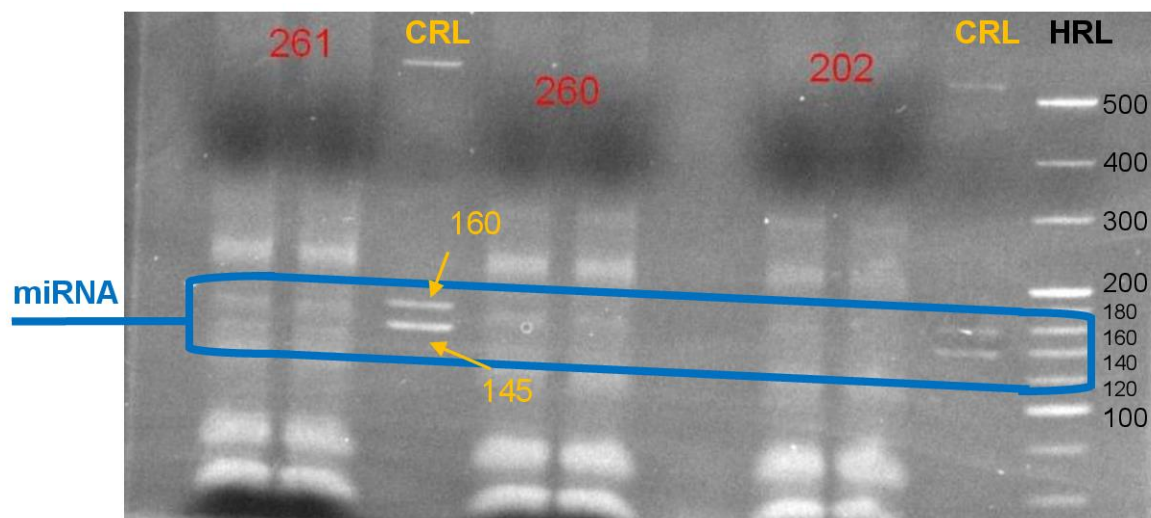
Analiza parametru RIN dla analizowanych próbek RNA wykorzystanych do sekwencjonowania mieściła się w zakresie 7-8,5 co oznacza RNA dobrej jakości (Ryc. 15).



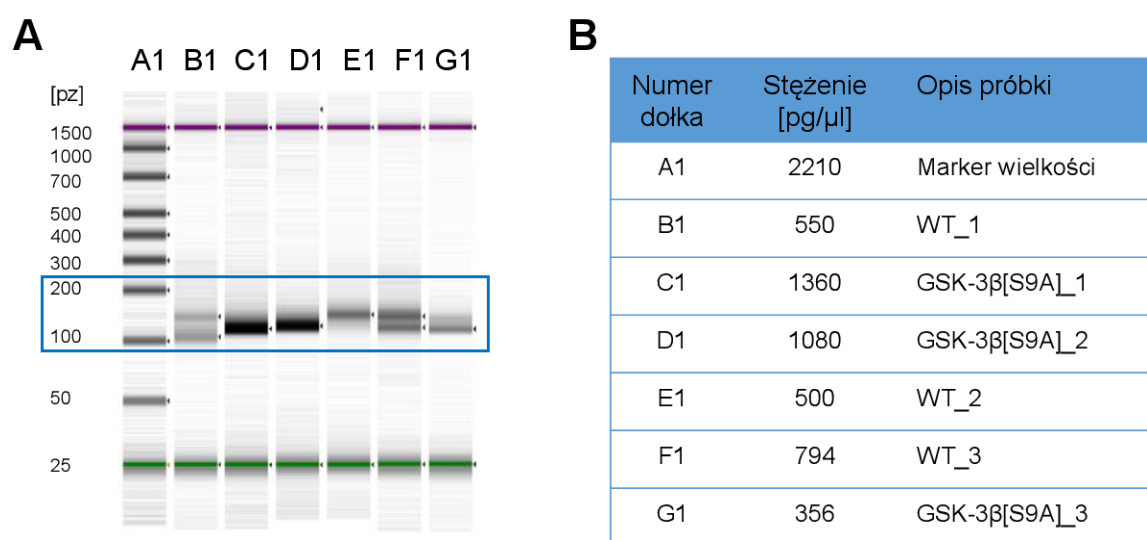
Rycina 15. Raport określający jakość analizowanych próbek RNA z wykorzystaniem TapeStation. 18S – mała podjednostka rybosomalnego RNA; 28S – duża podjednostka rybosomalnego RNA.

Przygotowanie bibliotek cDNA do sekwencjonowania

Przygotowane biblioteki poddano elektroforezie. Wycięto z żelu prążek zawierający cDNA biblioteki odpowiadający dojrzałym miRNA z przyłączonymi adapterami wielkości 145-160 nt (Ryc. 16). Następnie oczyszczone z żelu cDNA poddano automatycznej elektroforezie kapilarnej. Pozwala ona ocenić, czy w próbce przeważa cDNA odpowiedniej długości oraz czy jego ilość jest wystarczająca do reakcji sekwencjonowania (Ryc. 17AB).



Rycina 16. Przykładowe zdjęcie żelu dla analizowanych prób. CRL: (ang. *Custom RNA Ladder*) oraz HRL (ang. *High Resolution Ladder*) – marker wielkości (w nt). Numery odpowiadają bibliotekom małych niekodujących RNA poszczególnych osobników.



Rycina 17. Raport analizy jakości przygotowanych bibliotek cDNA. **A.** Elektroforeza kapilarna analizowanego materiału, prążek na wysokości 100-200 nt prezentuje biblioteki małych niekodujących RNA. **B.** Tabela przedstawia stężenia analizowanych bibliotek.

5.5.2. Wyniki sekwencjonowania nowej generacji

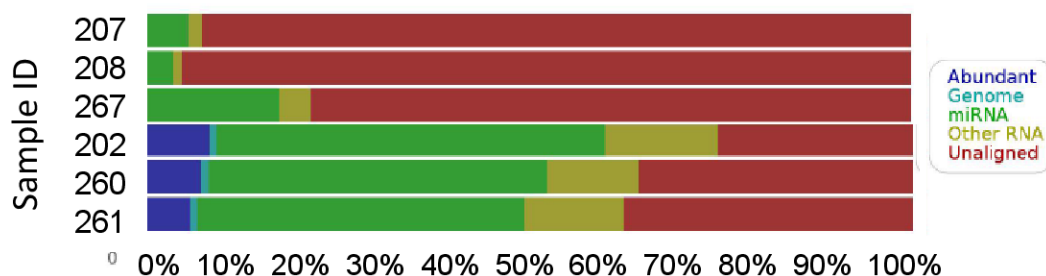
Analizę danych FASTQC przeprowadzono w aplikacji *Illumina BaseSpace App: Small RNA, Version 1.0.1*. Pozwala ona na ocenę jakości analizowanych danych poprzez określenie liczby odczytów. Do analizy statystycznej nie brano pod uwagę miRNA, których liczba odczytów była poniżej 10 odczytów w każdej z próbek (ang. *low-count filter < 10 reads*). Aplikacja umożliwia pobranie raportu opisującego jakość danych sekwencjonowania (Ryc. 18AC), a także wyników analizy DESeq2 określających krotność zmiany w poziomie ekspresji między grupami (FC), które dla dojrzałych miRNA zostały przedstawione w tabeli 9. Dodatkowo dojrzałe miRNA z największą i najsilniejszą różnicą w poziomie ekspresji zostały przedstawione na mapie ciepła (Ryc. 19).

A Small RNA Sequencing Report

Sample Information

Sample ID	Sample Name	Total PF Reads
261	WT5M	2,037,996
260	WT5M	2,973,498
202	WT5M	1,349,592
267	TG35M	2,307,960
208	TG35M	2,093,333
207	TG35M	2,248,179

B Hits by Category



C Summary

	Known	Novel	Total
Total miRNAs	3,563	0	3,563
Tested miRNAs	786	0	786
Differentially Expressed miRNAs	95	0	95

Tested miRNAs are miRNAs that pass the low-count filter and are tested for statistical significance. Novel miRNA discovery is disabled.

Rycina 18. Fragment raportu sekwencjonowania uzyskanego po analizie aplikacją *Illumina BaseSpace App: Small RNA, Version 1.0.1*. **A.** Tabela zawierająca liczbę odczytów dla poszczególnych próbek. **B.** % rozkład odczytów typów RNA z podziałem na kategorie, na zielono zaznaczono % odczytów miRNA. **C.** Tabela podsumowująca sumę wszystkich odczytów miRNA w analizowanych próbkach, liczbę porównywanych miRNA metodą DESeq2 oraz liczbę miRNA o zmienionej ekspresji między próbkami.

Tabela 9. Dojrzałe miRNA z istotną różnicą w poziomie ekspresji między modelem mysim GSK3 β [S9A], rodzeństwem nietransgenicznym (typu dzikiego, WT) rodzeństwem. FC: wskaźnik krotności zmiany; Wartość q określa FDR: wskaźnik określający prawdopodobieństwo popełnienia błędu typu I.

dojrzałe miRNA	FC	p	q
mmu-miR-126a-5p	0,81	0,00	0,00
mmu-miR-128-1-5p	0,71	0,00	0,01
mmu-miR-129-1-3p	-1,41	0,00	0,01
mmu-miR-129-2-3p	-0,95	0,00	0,01
mmu-miR-145a-5p	-1,49	0,00	0,01
mmu-miR-148b-3p	-1,39	0,00	0,02
mmu-miR-16-5p	-0,48	0,00	0,04
mmu-miR-185-3p	1,60	0,00	0,00
mmu-miR-186-5p	-1,50	0,00	0,03
mmu-miR-191-5p	-0,65	0,00	0,01
mmu-miR-221-3p	-0,85	0,00	0,00
mmu-miR-221-5p	-2,16	0,00	0,00
mmu-miR-23a-3p	-0,88	0,00	0,03
mmu-miR-23b-3p	-0,85	0,00	0,03
mmu-miR-26b-5p	0,89	0,00	0,00

mmu-miR-298-5p	-0,79	0,00	0,04
mmu-miR-3102-3p	0,81	0,01	0,05
mmu-miR-323-3p	0,81	0,00	0,03
mmu-miR-34b-3p	1,23	0,00	0,01
mmu-miR-369-3p	1,11	0,00	0,02
mmu-miR-434-5p	-1,15	0,00	0,04
mmu-miR-541-5p	-1,00	0,00	0,00
mmu-miR-9-5p	-0,57	0,00	0,04
mmu-miR-99a-5p	-0,80	0,00	0,02
prekursowe miRNA	FC	p	q
16_TGTAACATCCTTGACTGGAAGCT_mmu-mir-30e	-1,31	0,00	0,00
6_TCTACAGTGCACGTGTCTCC_mmu-mir-139	1,53	0,00	0,00
21_AGCTCGACTCATGGTTTGAACC_mmu-mir-434	-1,44	0,00	0,00
5_TGAGGTAGTAGTTTGTGCTGTTT_mmu-let-7i	-1,07	0,00	0,00
13_AAGGGATTCTGATGTTGGTCACACTC_mmu-mir-541	-1,18	0,00	0,00
11_TGTAACATCCCCGACTGGAAGCT_mmu-mir-30d	-0,84	0,00	0,00

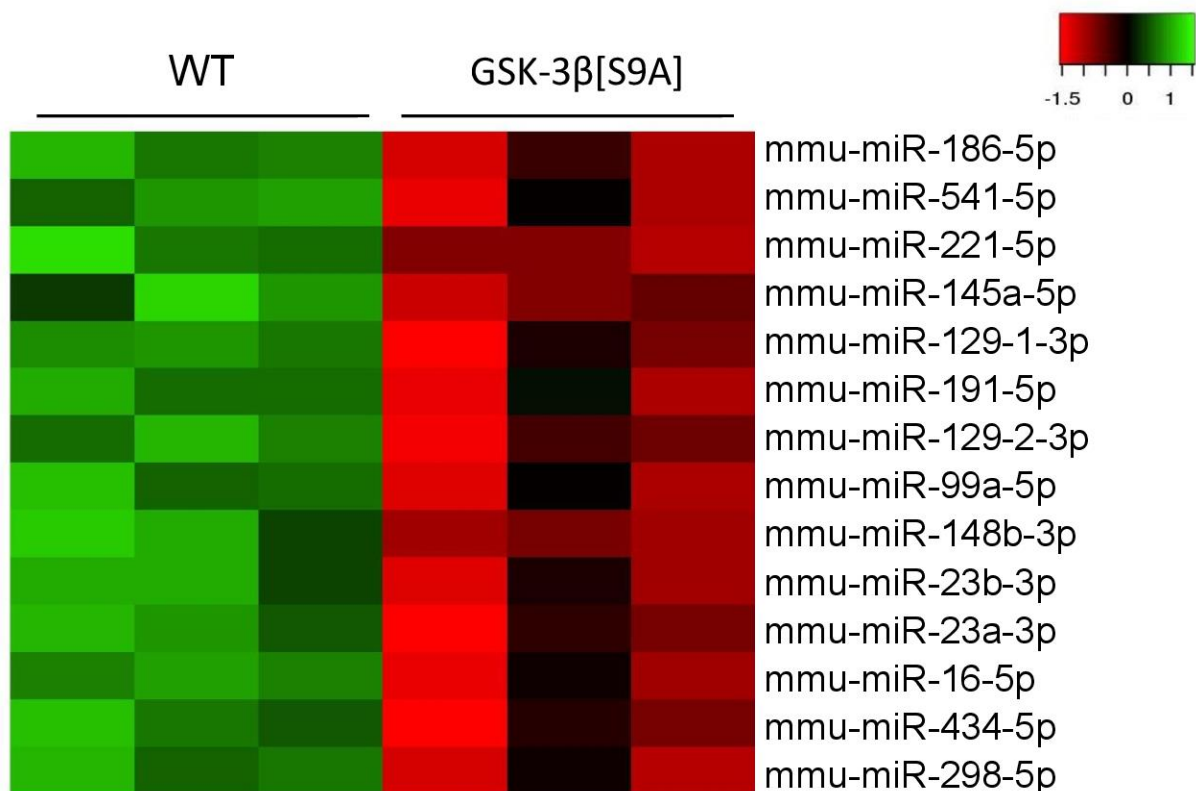
13_AAGGGATTCTGATGTTGGTCACAC_mmu-mir-541	-0,90	0,00	0,00
6_TGAGGTAGTAGGTTGTGTGGTTTT_mmu-let-7b	-0,97	0,00	0,00
11_TGTAAACATCCCCGACTGGAAGC_mmu-mir-30d	-0,82	0,00	0,00
55_GGCTGCAGCGTGATCGCCTG_mmu-mir-666	1,16	0,00	0,00
48_AATAATACATGGTTGATCTT_mmu-mir-369	1,44	0,00	0,00
42_TGTCACTCGGCTCGGCCACT_mmu-mir-668	1,00	0,00	0,00
59_AGCTACATTGTCTGCTGGGTTTCT_mmu-mir-221	-0,89	0,00	0,00
6_CAAAGAATTCTCCTTTTGGGC_mmu-mir-186	-1,43	0,00	0,00
72_CAACTAGACTGTGAGCTTCT_mmu-mir-708	1,23	0,00	0,00
48_AGCTACATCTGGCTACTGGGTCTCT_mmu-mir-222	-1,10	0,00	0,00
5_TGTAAACATCCTCGACTGGA_mmu-mir-30a	-1,06	0,00	0,00
6_CACCCGTAGAACCGACCTTGCGA_mmu-mir-99b	-1,17	0,00	0,00
48_AGCTACATCTGGCTACTGGGTCT_mmu-mir-222	-0,77	0,00	0,01
12_TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTTT_mmu-let-7a-1	-0,73	0,00	0,01

14_TGAGGTAGGAGGTTGTATAGTTT_mmu-let-7e	-0,73	0,00	0,01
21_AGCTCGACTCATGGTTTGAACCA_mmu-mir-434	-1,52	0,00	0,01
45_ATCACATTGCCAGGGATTACCACT_mmu-mir-23b	-1,06	0,00	0,01
6_CAAAGAATTCTCCTTTTGGGCTT_mmu-mir-186	-0,87	0,00	0,01
13_AACATTCAACGCTGTCGGTG_mmu-mir-181a-1	0,86	0,00	0,01
48_AGTATTACATGGCCAATCTCC_mmu-mir-496a	-1,11	0,00	0,01
5_TGTAAACATCCTCGACTGGAAGCT_mmu-mir-30a	-0,77	0,00	0,01
14_CTCACAGCTCTGGTCCTTGG_mmu-mir-673	1,02	0,00	0,01
16_TGTAAACATCCTACACTCTCAGCT_mmu-mir-30c-1	-0,46	0,00	0,01
43_TCACAGTGAACCGGTCTCTTTTT_mmu-mir-128-1	-1,11	0,00	0,01
6_TGAGGTAGTAGGTTGTGTGGTTAT_mmu-let-7b	-0,81	0,00	0,01
13_TGAGGTAGTAGGTTGTATGGTTT_mmu-let-7c-2	-0,57	0,00	0,01
13_AAGGGATTCTGATGTTGGTC_mmu-mir-541	0,85	0,00	0,02
4_TACCCTGTAGAACCGAATTTGT_mmu-mir-10b	-1,32	0,00	0,02
6_AACATTCAACGCTGTCGGTG_mmu-mir-181a-2	0,82	0,00	0,02

15_TCCCTGAGGAGCCCTTTGAGCCTGT_mmu-mir-351	-1,46	0,00	0,02
6_TCTACAGTGCACGTGTCTCCA_mmu-mir-139	0,95	0,00	0,02
45_ATCACATTGCCAGGGATTTCCA_mmu-mir-23a	-1,14	0,00	0,02
13_TTCAAGTAATCCAGGATAGT_mmu-mir-26a-2	1,30	0,00	0,02
49_TATTGCACTTGTCCCGGCCTGT_mmu-mir-92a-1	0,55	0,00	0,02
11_AACATTCATTGCTGTCCGGTG_mmu-mir-181b-1	0,80	0,00	0,02
13_AAGGGATTCTGATGTTGGTCACACTCT_mmu-mir-541	-1,20	0,00	0,02
13_TGTAAACATCCTACACTCTCAGCT_mmu-mir-30c-2	-0,54	0,00	0,02
15_TCCCTGAGGAGCCCTTTGAGCCT_mmu-mir-351	-0,94	0,00	0,02
13_AAGGGATTCTGATGTTGGTCACA_mmu-mir-541	-0,69	0,00	0,02
6_TCCCTGAGACCCTAACTTGTGAAA_mmu-mir-125b-2	-1,08	0,00	0,02
42_ACTGGACTTGGAGTCGGAAGGCT_mmu-mir-378a	-1,34	0,00	0,02
14_TCCCTGAGACCCTAACTTGTGAA_mmu-mir-125b-1	-1,01	0,00	0,02

5_TCTCCCAACCCTTGTACCAG_mmu-mir-150	0,88	0,00	0,02
46_AATCATTCACGGACAACACTTT_mmu-mir-382	1,24	0,00	0,03
55_TCTGGCTGCTATGGCCCCCTCT_mmu-mir-3085	1,02	0,00	0,03
14_TCCCTGAGACCCTAACTTGTGAAA_mmu-mir-125b-1	-1,06	0,00	0,03
54_ACGGGTTAGGCTCTTGGGAGC_mmu-mir-125b-1	-1,37	0,00	0,03
6_TTTGGCAATGGTAGAACTCACACC_mmu-mir-182	-1,05	0,00	0,03
60_CTGGCCCTCTCTGCCCTTCC_mmu-mir-328	0,91	0,00	0,03
60_TCTCACACAGAAATCGCACCCGTCT_mmu-mir-342	-1,26	0,00	0,03
6_TCCCTGAGACCCTAACTTGTGAA_mmu-mir-125b-2	-0,98	0,00	0,03
22_GCTCGACTCATGGTTTGAACC_mmu-mir-434	-0,67	0,00	0,03
3_TCTGGCTCCGTGTCTTCACTCC_mmu-mir-149	0,72	0,00	0,03
17_GTAAACATCCTTGACTGGAAGCT_mmu-mir-30e	-0,94	0,00	0,03
60_GAGAATTGTGGCTGGACATCTG_mmu-mir-219a-2	-1,15	0,00	0,04
59_TTTGAACCATCACTCGACTCC_mmu-mir-434	0,82	0,00	0,04

47_GCCTGCTGGGGTGGAACCTG_mmu-mir-370	0,98	0,00	0,04
15_AACATTCATTGCTGTCGGTGGA_mmu-mir-181b-2	-0,94	0,00	0,04
45_ATCACATTGCCAGGGATTACCAC_mmu-mir-23b	-0,73	0,00	0,04
21_TACCCTGTAGATCCGAATTTGT_mmu-mir-10a	-1,24	0,00	0,04
11_AACATTCATTGCTGTCGGTGGA_mmu-mir-181b-1	-0,97	0,00	0,04
47_AAAAGCTGGGTTGAGAGGGCGAAT_mmu-mir-320	-1,10	0,00	0,04
3_TCTGGCTCCGTGTCTTCACT_mmu-mir-149	0,97	0,01	0,04
41_ATGTCACCTCGGCTCGGCCCACT_mmu-mir-668	0,74	0,01	0,05
24_TTGTGCTTGATCTAACCATG_mmu-mir-218-2	0,81	0,01	0,05



Rycina 19. Mapa cieplna przedstawiająca wybrane, dojrzałe miRNA z największą i najsilniejszą statystycznie różnicą w poziomie ekspresji. Kolor zielony oznacza wzrost poziomu ekspresji, kolor czerwony spadek poziomu ekspresji w myszach transgenicznym w porównaniu z rodzeństwem WT. Każda kolumna przedstawia poziom ekspresji dla jednego osobnika.

5.6. Walidacja wyników sekwencjonowania nowej generacji przy użyciu metody ilościowego PCR

5.6.1. Wybór referencyjnych miRNA

Na podstawie wyników uzyskanych z analizy poziomu ekspresji miRNA metodą sekwencjonowania nowej generacji wytypowano 3 miRNA, charakteryzujące się wysokim poziomem ekspresji w obu grupach (Tab. 10). Wyszukiwanie najbardziej stabilnego zestawu referencyjnych miRNA – kontroli endogennej, niezbędnej do normalizacji wyników qPCR było możliwe dzięki rozszerzeniu do programu Excel, NormFinder (<https://moma.dk/normfinder-software>), które pozwala oszacować całkowitą zmienność ekspresji kandydujących genów

normalizacyjnych oraz zmienność pomiędzy i w obrębie porównywanych grup. Na podstawie wyników analizy programem NormFinder zdecydowano się na wybranie kombinacji dwóch miRNA: mmu-let-7g-5p oraz mmu-let-7d-5p jako kontroli endogennej do analizy relatywnej ekspresji wybranych miRNA (Tab.11).

Tabela 10. Wstępnie wytypowane miRNA jako kontrola endogenna na podstawie wyników sekwencjonowania nowej generacji. Krotność zmiany w poziomie ekspresji miRNA.

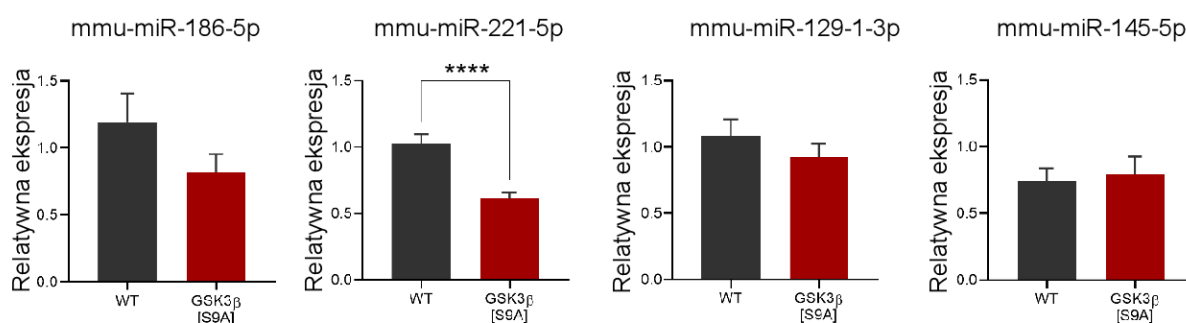
miRNA	krotność zmiany	p	q
mmu-let-7g-5p	-0,3034	0.0567	0.2073
mmu-miR-9-3p	-0,0079	0.9851	0.9892
mmu-let-7d-5p	0,0135	0.9421	0.9705

Tabela 11. Wynik analizy programem NormFinder, określający stabilność genów referencyjnych w analizowanych próbkach ($n_{\text{GSK3-}\beta[\text{S9A}]}=4$ $n_{\text{WT}}=4$) Niższa wartość oznacza stabilniejszą ekspresję względem pozostałych miRNA wytypowanych na kontrolę endogenną.

miRNA	Wartość stabilności	Najlepszy gen	let-7d
let-7d	0,003	Wartość stabilności	0,003
let-7g	0,004		
9-1-3p	0,011	Najlepsza kombinacja dwóch genów	let-7d oraz let-7g
		Wartość stabilności dla kombinacji dwóch genów	0,003

5.6.2. Analiza zmian w poziomie ekspresji wybranych miRNA

Analiza poziomu ekspresji miRNA dla większej liczby osobników wykazała niższą ekspresję miR-221* (miR-221-5p) u myszy GSK-3 β [S9A] (n=13) względem WT (n=12; test Manna-Whitney'a, p=0,0000; Ryc. 20). Do analizy włączono próby RNA, które zostały poddane sekwencjonowaniu nowej generacji. W przypadku pozostałych analizowanych miRNA nie zauważono istotnych zmian w poziomie ekspresji między grupami zwierząt.



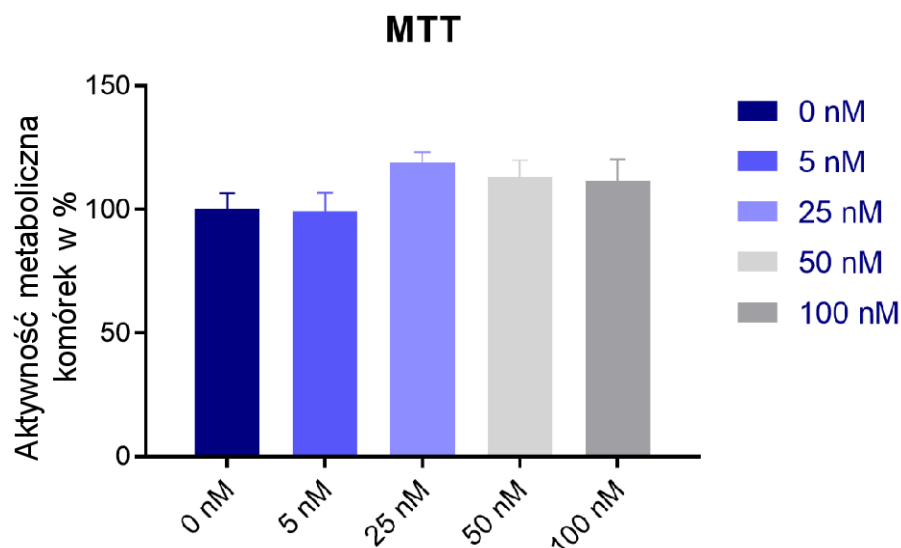
Rycina 20. Analiza poziomu ekspresji wybranych miRNA z wykorzystaniem metody qPCR. Walidacja wyników metodą qPCR potwierdziła obniżenie ekspresji miR-221* u myszy transgeniczných GSK-3 β [S9A] (n=13); WT – kontrola, myszy bez mutacji genetycznej (n=12; test Manna-Whitney'a, ****p<0,0001). Dla pozostałych miRNA nie wykazano różnic w poziomie ekspresji (test t-studenta, n.s., p>0,05).

5.7. Analiza roli miR-221* w funkcjonowaniu synaps pobudzających

Na podstawie wyników qPCR wytypowano miR-221* do dalszych badań, mających na celu określenie wpływu tego miRNA na morfologię i funkcjonowanie synaps pobudzających w mysim hipokampie. W tym celu wybrano wyznakowany fluorescencyjnie inhibitor miR-221*, dzięki któremu możliwe było zahamowanie aktywności miR-221* w hipokampalnej hodowli pierwotnej z dzikich myszy szczepu FVB.

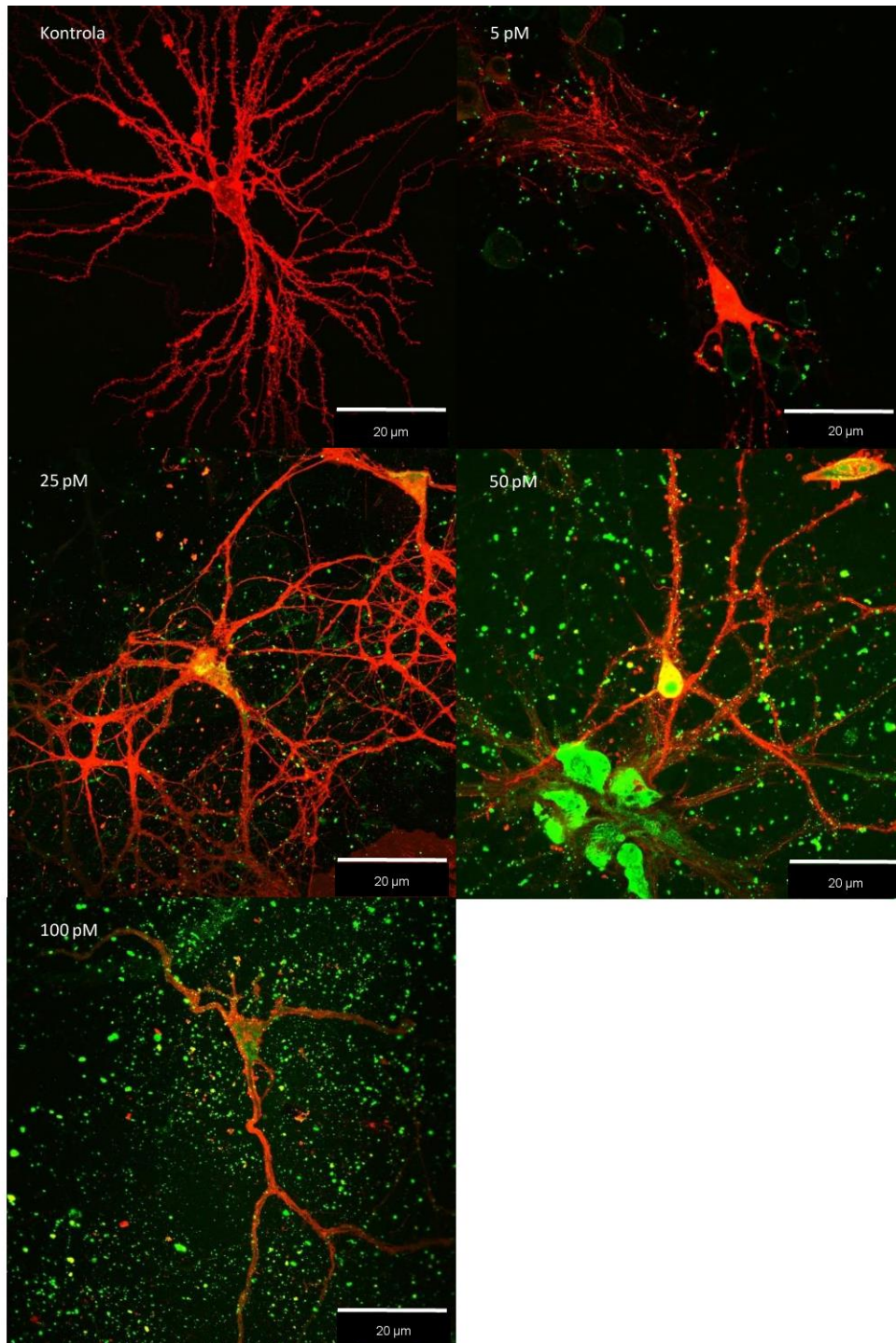
5.7.1. Wybór stężenia inhibitora miR-221* do dalszych badań

Analiza aktywności metabolicznej komórek w hodowli po podaniu różnych stężeń inhibitora miR-221* do transfekcji neuronów umożliwiła wybór optymalnej dawki inhibitora do dalszych badań. Żadne ze stężeń nie wpłynęło na aktywność metaboliczną neuronów (Ryc. 21).



Rycina 21. Ocena aktywności metabolicznej komórek w % z wykorzystaniem testu redukcji soli tetrazolowej (MTT) Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w aktywności metabolicznej komórek pod wpływem różnych stężeń podawanego inhibitora miR-221* (jednoczynnikowa ANOVA, n.s., $p > 0.05$).

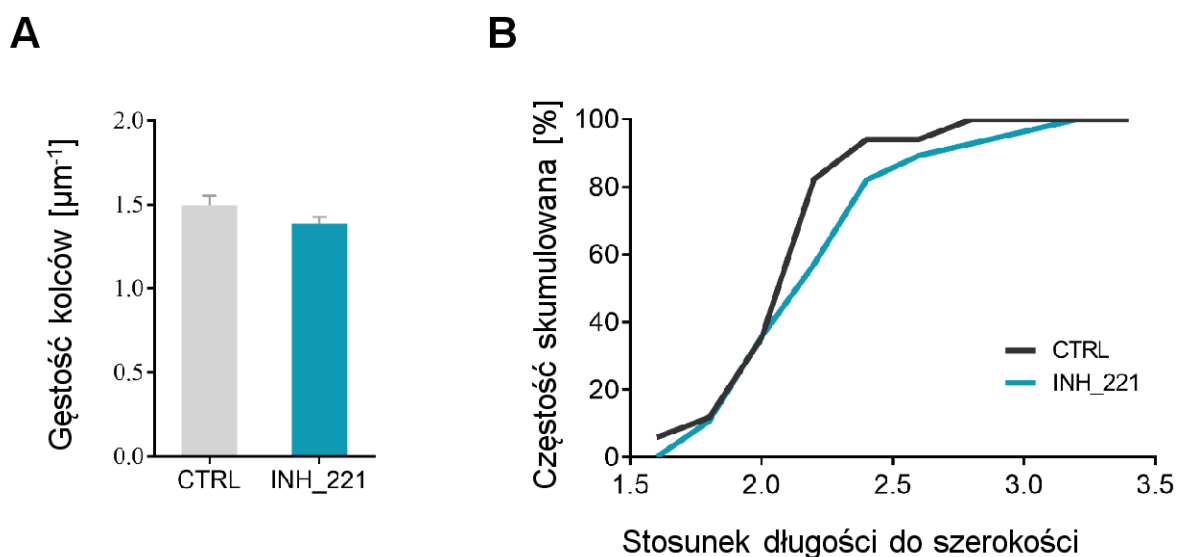
Następnie oceniono mikroskopowo wnikanie inhibitora do komórek. W przypadku każdego z testowanych stężeń: 5, 25, 50 oraz 100 [pM] zaobserwowano sygnał znacznika fluorescencyjnego FAM488 wewnątrz komórek. Jednocześnie wraz ze wzrostem stężenia inhibitora obserwowano silniejszy sygnał poza komórkami. Może to oznaczać, że wzrost stężenia podawanego inhibitora nie wpływał na wnikanie inhibitora do komórek (Ryc. 22). Na podstawie uzyskanych wyników do dalszych eksperymentów wybrano najniższe zalecane przez producenta stężenie, 5pM (Ryc. 22).



Rycina 22. Komórki piramidalne z hipokampalnej hodowli pierwotnej. Komórki wybarwiono barwnikiem lipofilnym DiI (czerwony). Widoczny sygnał znacznika fluorescencyjnego (FAM488) połączonego z inhibitorem miR-221* (zielony), podany w zakresie stężeń 0-100 pM w *DIVI7*. Komórki utrwalono 48h po podaniu inhibitora. Do komórek kontrolnych nie podano inhibitora.

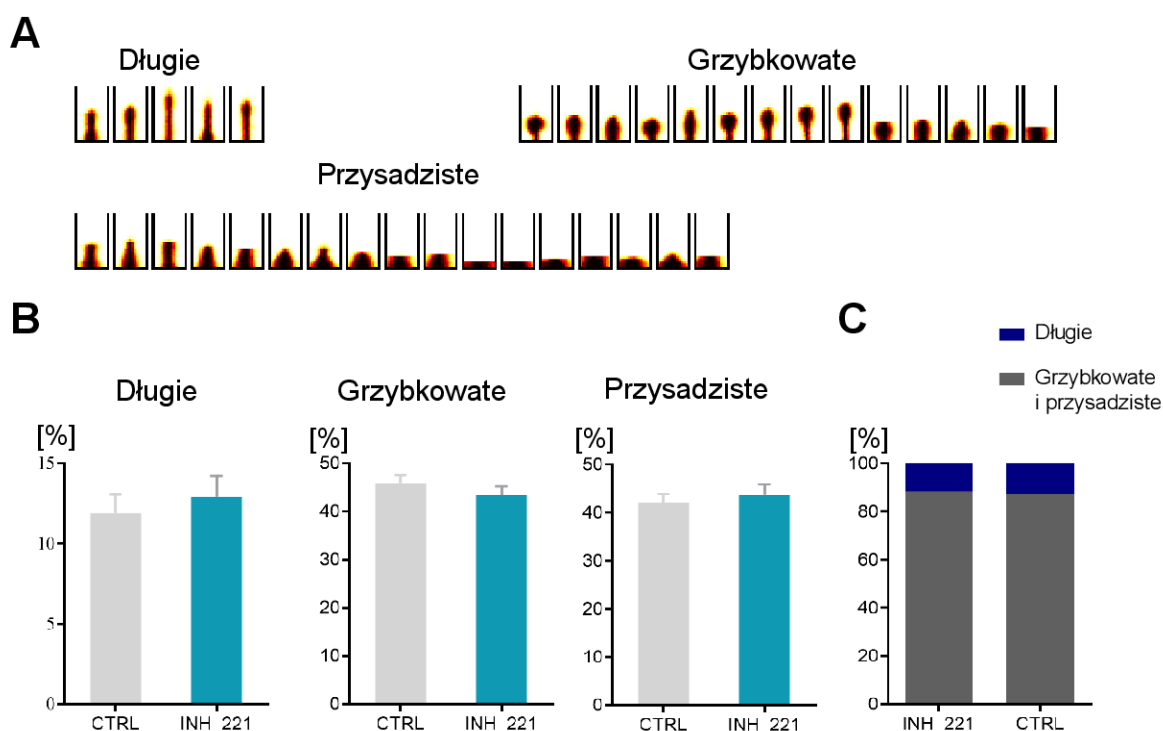
5.7.2. Wpływ hamowania aktywności miR-221* na morfologię kolców dendrytycznych

W celu określenia wpływu hamowania aktywności miR-221* w hipokampalnej hodowli pierwotnej zbadano kształt kolców dendrytycznych 48h po transfekcji inhibitorem miR-221* wyznakowanym fluorescencyjnie barwnikiem FAM488. Doświadczenie przeprowadzono na czterech niezależnych hodowlach. Do analizy kolców dendrytycznych wykorzystano półautomatyczny skrypt SpineMagic! (Ruszczycki i wsp., 2012) (Metody), skupiając się na parametrach, które wcześniej były analizowane w transgenicznym myszom linii GSK-3 β [S9A]. Nie wykazano zmian w gęstości kolców dendrytycznych w hipokampalnej hodowli pierwotnej 48h po transfekcji inhibitorem miR-221* ($n_{\text{kolców}}=2027$), a neuronami kontrolnymi, do których dodano Lipofectamine RNAiMAX (kontrola; $n_{\text{kolców}}=1412$) (t-student, $p=0,11$; Ryc. 23A). Analiza parametru określającego stosunek długości do szerokości nie wykazała istotnych statystycznie różnic między grupami (test Mann Whitney'a, $p=0,22$; Ryc. 23B). Nie zaobserwowano różnic między poszczególnymi typami kolców: długie (test Mann Whitney'a, $p=0,78$), grzybkowate (test Mann Whitney'a, $p=0,35$), przysadziste (test Mann Whitney'a, $p=0,85$) (Ryc. 24AB). Nie wykazano zmiany w rozkładzie kształtu kolców między komórkami kontrolnymi a transfekowanymi inhibitorem miR-221 (test Pearsona, $X^2=0,63$, $df=1$, $p=0,43$; Ryc. 24C).



Rycina 23. Analiza kolców dendrytycznych za pomocą półautomatycznego skryptu SpineMagic! (Ruszczycki i wsp. 2012). **A.** Brak różnic w gęstości kolców (test t-studenta, $p>0,5$). **B.** Brak różnic w parametrze określającym stosunek długości do szerokości kolców.

CTRL – komórki kontrolne ($n_{\text{kolców}}=1412$), INH_221 – komórki 48h po transfekcji inhibitorem miR-221* ($n_{\text{kolców}}=2027$; test Mann Whitney’a, n.s., $p>0,05$).

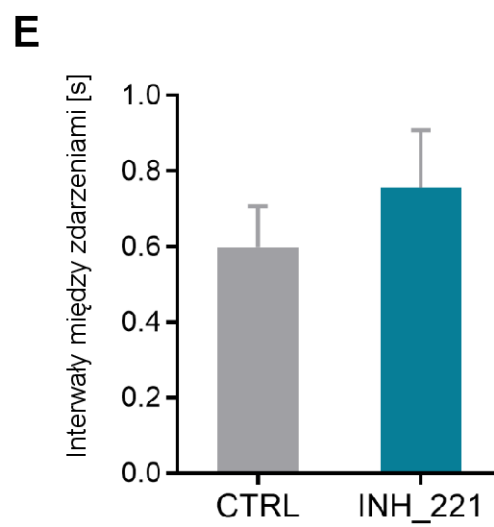
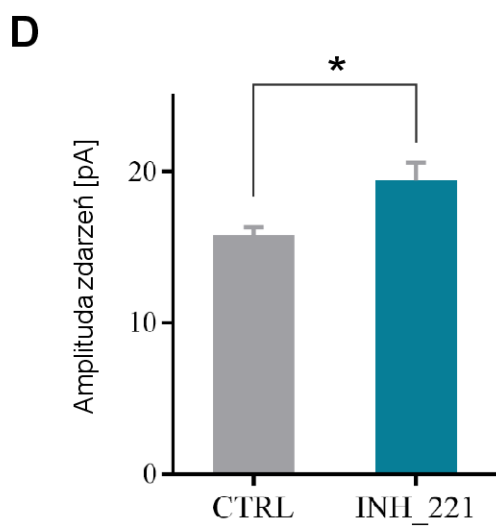
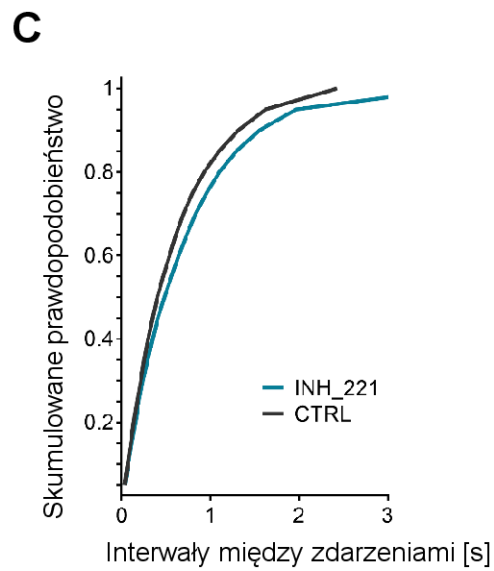
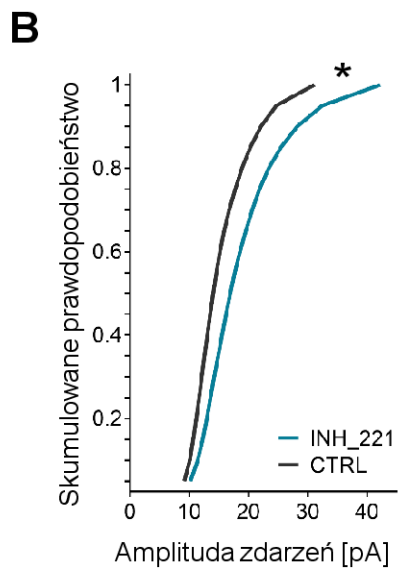
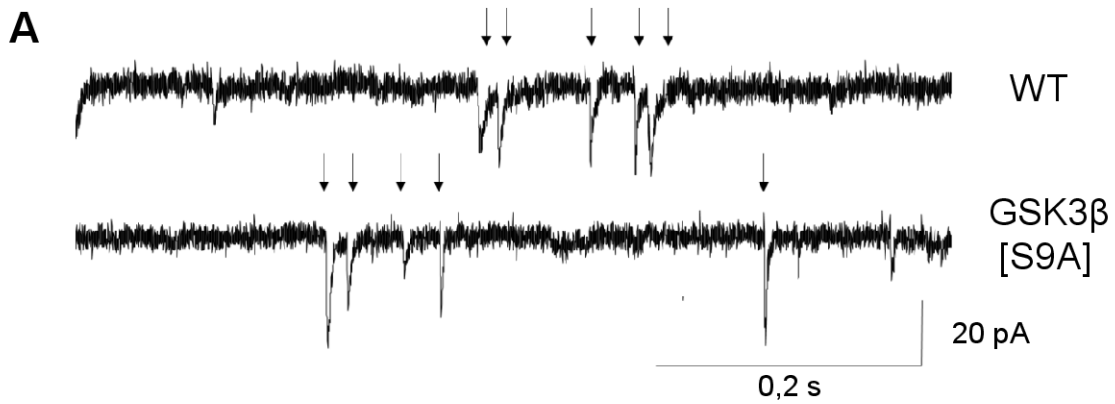


Rycina 24. Podział kolców dendrytycznych na 3 grupy: długie, grzybkowate i przysadziste przy pomocy skryptu SpineTools (Jasińska i wsp. 2016). **A.** Kategorie kolców dendrytycznych **B.** Procentowy rozkład między poszczególnymi typami kolców. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic (test Mann-Whitney’a, n.s., $p>0,05$). **C.** Analiza rozkładu kolców pod względem kształtu nie wykazała zmian między typami kolców dendrytycznych (Pearsona, X^2 , n.s., $p>0,05$). CTRL – komórki kontrolne ($n_{\text{kolców}}=1412$), INH_221 – komórki po transfekcji inhibitorem miR-221* ($n_{\text{kolców}}=2027$).

5.7.3. Wpływ hamowania aktywności miR-221* na pobudzające przekąźnictwo synaptyczne

Aby zbadać wpływ hamowania miR-221* na funkcjonowanie synaps, zbadano mEPSCs (Ryc. 25A) w komórkach piramidowych hodowli kontrolnej (3.11 Metody) oraz po transfekcji inhibitorem. Zaobserwowano różnicę w rozkładzie amplitudy zdarzeń (test Kołmogorowa-Smirnowa, $p=0,01$; Ryc. 25B). Średnia amplituda zdarzeń mEPSCs była większa w wyznakowanych fluorescencyjnie komórkach poddanych transfekcji (test Mann-Whitney’a, $p=0,01$) (Ryc. 25D). Nie zaobserwowano różnic między badanymi grupami w rozkładzie

długości interwałów między zdarzeniami (test Kołmogorowa-Smirnowa, $p=0,06$; Ryc. 25C),
 jak również w ich średniej wartości (test Mann-Whitney'a, $p=0,423$) (Ryc. 25E).



Rycina 25. Analiza mEPSCs w komórkach piramidalnych z hipokampalnej hodowli pierwotnej (INH_221 n=16, CTRL n=14). CTRL – komórki kontrolne, INH_221 – komórki po transfekcji inhibitorem miR-221*. **A.** Przykładowe rejestracje aktywności neuronów, strzałki wskazują na pojedyncze zdarzenia mEPSCs. **B.** Wykres skumulowanego prawdopodobieństwa dla amplitudy zdarzeń (test Kołmogorowa-Smirnowa, $*p < 0,05$) i **C.** interwałów między zdarzeniami (test Kołmogorowa-Smirnowa, n.s., $p > 0,05$). **D.** Wykresy słupkowe dla średniej amplitudy zdarzeń (test Mann-Whitney’a, $*p < 0,05$) i **E.** średniej wartości interwałów między zdarzeniami (test Mann-Whitney’a, n.s., $p > 0,05$).

6. Dyskusja

6.1. Wpływ wzmożonej aktywności GSK-3 β na strukturę i funkcję synaps pobudzających komórek ziarnistych zakrętu zębatego hipokampa

Nadpobudliwość ruchowa myszy transgenicznych GSK-3 β [S9A], wykorzystanych w powyższej pracy była jednym z powodów opisanego jako zwierzęcy model epizodu maniackiego w przebiegu CHAD (Prickaerts i wsp., 2006). Co więcej, u pacjentów z CHAD w czasie epizodu maniackiego wykazano wzrost aktywności GSK-3 β , wyrażony stosunkiem formy aktywnej do nieaktywnej (ufosforylowanej w pozycji S9) (Li i wsp., 2010). Po ośmiu tygodniach podawania pacjentom leków normotymicznych (litu, walproinianu lub atypowych leków antypsychotycznych) i ustąpieniu objawów maniackich zaobserwowano zmniejszenie aktywności GSK-3 β . Pomimo stabilizacji nastroju całkowity poziom GSK-3 β u pacjentów CHAD względem zdrowej kontroli pozostał zwiększony. Obserwacje te wskazują zarówno na silny związek wzmożonej aktywności GSK-3 β z objawami manii jak i zwiększonej ekspresji tej kinazy w CHAD.

Diagnoza pacjentów z CHAD stawiana jest często poniżej 20 r.ż. (Gorostowicz i Siwek, 2018). Występowanie objawów u młodych dorosłych daje możliwość diagnozowania choroby sugeruje, że szereg zmian w funkcjonowaniu układu nerwowego zaczyna się we wczesnych etapach rozwoju. W związku z powyższym zdecydowaliśmy się na analizę morfologiczną kształtu kolców dendrytycznych komórek ziarnistych zakrętu zębatego u młodych myszy linii GSK-3 β [S9A]. Skupiliśmy się na analizie zmian w zakręcie zębatym hipokampa, ze względu na zmiany w jego objętości i funkcjonowaniu zaobserwowane u pacjentów z zaburzeniami osi HPA, takimi jak zaburzenia afektywne (Koch i wsp., 2020). Analiza kształtu kolców wykazała ich znaczne wydłużenie się i wzrost frakcji (udziału procentowego) kolców długich u myszy transgenicznych względem myszy typu dzikiego. Poprzednie badania naszego zespołu na tym samym transgenicznym modelu wykazały wzrost frakcji kolców długich (Kondratiuk i wsp., 2017) w komórkach ziarnistych zakrętu zębatego u zwierząt dorosłych. W tym samym badaniu wykazano wzrost udziału procentowego kolców przysadzistych oraz zmniejszenie gęstości kolców dendrytycznych u nokautów GSK-3 β n-/- . Obserwacje te sugerują, że zarówno zwiększenie, jak i zmniejszenie aktywności GSK-3 β wpływa na strukturalną plastyczność synaptyczną. Wyniki przedstawione w niniejszej

dysertacji wykazały, że zmiany strukturalne zaobserwowane u osobników dorosłych ze zwiększoną aktywnością GSK-3 β występują również u młodych dorosłych (osobników 3 tygodniowych).

Wiele badań pokazało zmiany strukturalne w mózgu pacjentów ze schizofrenią czy z zaburzeniami afektywnymi (DeLisi i wsp., 2006; Karlsgodt i wsp., 2010; Strakowski i wsp., 2005). Niezależnie od grupy wiekowej zaobserwowano zmniejszenie objętości ciała migdałowatego (Blumberg i wsp., 2005). Co ciekawe, zaobserwowano również zmniejszenie prawego hipokampa podczas objętościowego rezonansu magnetycznego bliźniąt monozygotycznych z CHAD względem zdrowego rodzeństwa (Noga i wsp., 2001). Zmniejszenie hipokampa zaobserwowano również u myszy linii GSK-3 β [S9A] (Kondratiuk i wsp., 2013). W materiale *post mortem* uzyskanym od pacjentów ze schizofrenią oraz zaburzeniami afektywnymi wykazano zmniejszenie gęstości kolców dendrytycznych w komórkach piramidalnych podkładki (łac. *Subiculum*) hipokampa (Rosoklija i wsp., 2000). Leki normotymiczne stosowane w zaburzeniach psychicznych mogą wpływać na przebudowę aksonów, a tym samym na powstawanie synaps w rozwijających się komórkach nerwowych poprzez regulację aktywności GSK-3 β (Hall i wsp., 2002).

Bezpośrednią przesłanką do zbadania funkcjonowania synaps były zaobserwowane zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych w zakręcie zębatym hipokampa u myszy GSK-3 β [S9A]. Zmiany te wskazują na wzrost frakcji długich kolców, uważanych za niedojrzałe. Naszym celem było wykazanie, czy takie zmiany morfologii kolców dendrytycznych mogą wywołać zmiany funkcjonalne na poziomie elektrofizjologicznym. Zdecydowaliśmy się zbadać pobudzające przekazywanie synaptyczne rejestrując miniaturową aktywność spontaniczną (mEPSCs), która odzwierciedla spontaniczne uwalnianie pęcherzyka z neurotransmiterem do przestrzeni synaptycznej. Zaobserwowane zwiększenie się interwałów między wydarzeniami sugeruje zmniejszenie liczby synaps w zakręcie zębatym u transgenicznej linii GSK-3 β [S9A] (Bacci i wsp., 2001; Wierenga i wsp., 2005). Jednak analiza kolców synaptycznych nie wskazywała na zmniejszenie się liczby synaps, ponieważ gęstość kolców synaptycznych była porównywalna u myszy transgenicznych i typu dzikiego. Natomiast obserwowano zwiększenie się udziału (%) kolców niedojrzałych, dlatego w kolejnych doświadczeniach zbadano, czy u zwierząt transgenicznych zwiększa się udział procentowy milczących synaps w sieci hipokampalnej. Badania elektrofizjologiczne wykazały, że udział milczących synaps w puli synaptycznej wynosi około 7% u myszy dzikich i wzrasta do ponad 33% u myszy transgenicznych, GSK-3 β [S9A]. Uzyskane wyniki mogą wyjaśniać

fakt, że liczba funkcjonalnych synaps zmniejsza się, pomimo braku różnic w gęstości kolców dendrytycznych. Na tej podstawie wyciągnęliśmy wniosek, że kolce długie u myszy z linii GSK-3 β [S9A] nie tworzą dojrzałej (funkcjonalnej) synapsy. Podsumowując, badania mikroskopowe i elektrofizjologiczne wykazały, że wzmożona aktywność GSK-3 β powoduje zmiany strukturalne i funkcjonalne synaps pobudzających u młodych osobników. Wzmożona aktywność GSK-3 β prowadzi do zwiększenia udziału niedojrzałych lub niefunkcjonalnych synaps pobudzających w całkowitej puli synaptycznej w zakręcie zębatym hipokampa. Obserwacje prezentowane w pracy potwierdzają inne badania sugerujące, że zwiększona aktywność GSK-3 β prowadzi do zmniejszenia liczby funkcjonalnych synaps, natomiast hamowanie jej aktywności wpływa pozytywnie na synaptogenezę (Cuesto i wsp., 2015). W jednym z mysich modeli schizofrenii, wywołanej prenatalnie poprzez podanie octanu metyloazoksymetanolu zaobserwowano deficyty w formowaniu się kolców dendrytycznych i deficyty poznawcze przy jednoczesnym wzroście aktywności GSK-3 β (Xing i wsp., 2016). Zhu i wsp. (2010) wykazali, że wzrost aktywności GSK-3 β zmniejsza uwalnianie glutaminianu do przestrzeni synaptycznej. Uwalnianie neurotransmitera zachodzi poprzez tworzenie kompleksu SNARE (receptor białka przyczepności czynnika wrażliwego na N-etylomaleimid). Wzmożenie aktywności GSK-3 β w szczurzej hipokampalnej hodowli pierwotnej wpłynęło na opóźnienie egzocytozy pęcherzyków z części presynaptycznej. Autorzy sugerują, że negatywna regulacja fuzji pęcherzyków synaptycznych zachodzi prawdopodobnie poprzez zakłócanie tworzenia kompleksu SNARE na drodze regulacji kanałów wapniowych zależnych od napięcia. Zaobserwowano, że wzrost aktywności GSK-3 β prowadzi do fosforylacji kanału Ca²⁺ typu P/Q, zatrzymując napływ Ca²⁺ do komórki, a tym samym hamując tworzenie kompleksu SNARE (Zhu i wsp., 2010).

Analizy prezentowane w pracy Wang i wsp. (2019) skupiły się na wpływie wzrostu aktywności GSK-3 β na część postsynaptyczną, co potwierdza, że kinaza ta wpływa zarówno na część presynaptyczną jak i postsynaptyczną. Wykorzystali oni w swoich badaniach transgeniczny model myszy, posiadający mutację Shank3b^{-/-}. W modelu tym zaobserwowano zwiększenie poziomu fosforylacji GSK-3 β , prowadzące do hamowania jej aktywności w przedniej korze zakrętu obręczy. Hamowanie GSK-3 β spowodowało zmniejszenie fosforylacji substratów GSK 3 β : PSD95 oraz podjednostki receptora AMPA (GluR2), a także wywołało zmiany na poziomie elektrofizjologicznym – zaobserwowano zmniejszenie częstotliwości mEPSCs. Dodatkowo, spadek aktywności GSK-3 β spowodował zmniejszenie gęstości kolców dendrytycznych. Wprowadzenie do analizowanego rejonu mózgu wektora

wirusowego AAV z konstytutywnie aktywnym GSK-3 β przywróciło prawidłową ekspresję podjednostki GluR2, a także zwiększyło gęstość kolców dendrytycznych (Wang i wsp., 2019).

Badania sugerują, że GSK-3 β może wpływać na zwiększenie udziału procentowego milczących synaps (Bradley i wsp., 2012). Zwiększenie liczby (% udziału w puli synaptycznej) milczących synaps w mysim modelu GSK-3 β [S9A] może być związane z wpływem aktywności GSK-3 β na ruch i ekspresję receptorów dla glutaminianu. Jako neuronalny efektor działania GSK-3 β została wskazana kinaza fosfatydyloinozytolu 4 typu II α (PI4KII α) (Amici i wsp., 2020). Początkowo wykazano potencjalną rolę PI4KII α w regulacji powierzchniowej ekspresji receptorów AMPA. Zmniejszenie ekspresji lub fosforylacja PI4KII α wiązała się ze wzrostem ekspresji receptorów AMPA na powierzchni neuronów hipokampa (Robinson i wsp., 2014). Kolejne badania tego zespołu nie potwierdziły wpływu PI4KII α na liczbę AMPA w części postsynaptycznej. Różnica ta mogła być związana ze zmianą metody analizy – w pierwszym badaniu analizowany był poziom receptorów AMPA na całej powierzchni neuronu, natomiast w drugim badaniu skupiono się na zawartości receptorów w części postsynaptycznej. Wykazano redukcję transmisji synaptycznej zależnej od receptorów NMDA u mysich nokautów PI4KII α , tak jak w przypadku farmakologicznego hamowania aktywności GSK-3 β . Ta obserwacja sugeruje, że PI4KII α za pośrednictwem GSK-3 β może prowadzić do stabilizacji w błonie receptorów NMDA (Amici i wsp., 2020). Rui i wsp. (2013) wykazali, że zwiększona aktywność GSK-3 β uzyskana dzięki transfekcji hodowli pierwotnej plazmidami GSK-3 β [S9A] negatywnie reguluje prądy hamujące poprzez zmniejszenie powierzchniowych skupisk receptorów GABA_A. W tym samym badaniu podanie do hodowli neuronalnych konstruktów GSK-3 β z ufosforylowaną seryną w pozycji 9 (pS9-GSK-3 β) spowodowało kurczenie się dendrytów oraz zmniejszenie amplitudy i częstotliwości miniaturowych hamujących prądów postsynaptycznych (Rui i wsp., 2013).

Jak wspomniano wcześniej, wiele badań wskazuje na to, że pozytywny wpływ leków normotymicznych wynika z negatywnej regulacji aktywności GSK-3 β (Li i wsp., 2002; Li i Jope, 2010). Podanie chlorku litu zwierzętom poddanym okołoporodowej hipoksji-ischemii wywołało wzrost ekspresji białek synaptycznych takich jak: synapsyna 1, PSD95, GluR1 oraz białka Tau. Wraz ze zmianą poziomu białek zaobserwowano zwiększenie amplitudy i częstotliwości mEPSCs (Xiong i wsp., 2018). W przypadku nieuszkodzonych neuronów w hodowli pierwotnej, zarówno podanie inhibitorów GSK-3 β jak i nokaut genowy GSK-3 β (poprzez podanie siRNA do hodowli) prowadzi do zmniejszenia amplitudy mEPSCs. Mechanizm tych zmian opierał się na zmniejszeniu liczby receptorów AMPA (Gideons i wsp.,

2017; Wei i wsp., 2010) oraz NMDA (Chen i wsp., 2007; Li i wsp., 2013) w synapsie, poprzez zwiększenie ich internalizacji z błony. W przypadku wczesnej poporodowej ekspozycji na terapeutyczną dawkę chlorku litu zaobserwowano zmniejszenie amplitudy mEPSCs, co może wyjaśniać zaburzenia kognitywne i nieprawidłowe funkcjonowanie OUN u noworodków matek poddanych farmakoterapii litem (Ankolekar i Sikdar, 2015). Propozycja wyjaśnienia mechanizmu zmian została przedstawiona na modelu nokautów genowych GSK-3 β . Wykazano, że zmniejszenie stabilności kolców dendrytycznych i idące za tym zmniejszenie amplitudy i częstotliwości mEPSC może zachodzić na drodze akumulacji β -kateniny, jednego z głównych efektorów w szlaku Wnt (Ochs i wsp., 2015).

Prezentowane odkrycia identyfikują zmiany w poziomie aktywności GSK-3 β jako istotny element w regulacji rozwoju dendrytów, formowaniu się synaps glutaminergicznych oraz w regulacji własności elektrofizjologicznych neuronów w mysim hipokampie.

6.2. Wpływ wzmożonej aktywności GSK-3 β na poziom ekspresji miRNA w hipokampie

Dotychczasowe badania, wskazujące na regulację poziomu ekspresji miRNA poprzez zmienioną aktywność GSK-3 β skupiały się na komórkach nieneuronalnych, głównie na liniach komórkowych. Pokazano w nich, że zarówno miRNA mogą regulować poziom ekspresji GSK 3 β (Kasiappan and Rajarajan, 2017), jak również zmieniona aktywność GSK-3 β wpływa na zmiany w poziomie ekspresji miRNA, czego przykładem jest miRNA let-7, należący do grupy supresorów nowotworowych (Guo et al., 2010). W badaniu przeprowadzonym na linii komórkowej pochodzącej z komórek nowotworowych jajnika, Guo i wsp. (2010) zaobserwowali zmniejszenie poziomu ekspresji miRNA let-7. Następnie wykazali, że dodanie inhibitora GSK-3 β prowadzi do wzrostu poziomu ekspresji tego miRNA.

Rolę GSK-3 β wykazano w regulacji biogenezy miRNA na poziomie regulacji aktywności mikroprocesora. Jednym z modeli, na którym wykazano tę zależność były linie komórkowe (HeLa, HEK293T, COS-1, LNCaP oraz PC3) traktowane specyficznym dla GSK-3 β inhibitorem (CT 99021 = CHIR 99021) lub poddane transfekcji dominującą, nieaktywną formą GSK-3 β , GSK-3 β [K85R]. W obu przypadkach efektem zmniejszania aktywności GSK-3 β było zmniejszenie aktywności enzymu Drosha. Co ciekawe, w tym samym

badaniu zwiększenie aktywności GSK-3 β poprzez transfekcję linii komórkowej HEK293T konstruktem plazmidowym zawierającym konstytutywnie aktywną formę GSK-3 β [S9A] miało odwrotny wpływ, zwiększając jednocześnie ekspresję kilku miRNA (miR-27a, miR-23a, miR-24, miR 141 and miR-182) (Fletcher i wsp., 2016). Enzym Drosha, odpowiedzialny za powstanie pre-miRNA wymaga fosforylacji w pozycjach S300 i S302 celem utrzymania lokalizacji jądrowej. Wykazano, że fosforylacja ta wymaga aktywności GSK-3 β (Tang i wsp., 2011). Podsumowując zahamowanie aktywności GSK-3 β powoduje zmniejszenie aktywności enzymu Drosha, a tym samym obniżenie ekspresji wielu miRNA, natomiast wzrost aktywności GSK-3 β zwiększa aktywność enzymu Drosha i wpływa na akumulację dojrzałego miRNA (Fletcher i wsp., 2016; Ogórek i wsp., 2018).

Niniejsza praca dowodzi roli GSK-3 β w regulacji ekspresji miRNA w neuronach. Dodatkowo wyniki wskazują, że zwiększona aktywność GSK-3 β wpływa na poziom miRNA w komórkach nerwowych. W hipokampie myszy linii GSK-3 β (S9A) zaobserwowano zmiany w poziomie ekspresji 24 dojrzałych miRNA oraz 71 prekursorowych miRNA. Zwiększenie aktywności GSK-3 β w komórkach nerwowych doprowadziło do zmniejszenia ekspresji większości miRNA o zmienionym poziomie ekspresji. Zaobserwowany efekt jest odwrotny w porównaniu do wcześniejszych badań prowadzonych na komórkach nieneuronalnych.

6.3. Wpływ miRNA-221* na strukturę i funkcję synaps pobudzających w komórkach piramidalnych hipokampalnej hodowli pierwotnej

Na podstawie wyników sekwencjonowania nowej generacji wytypowano 4 miRNA: miR-186-5p, miR-221* (miR-221-5p), miR-129-1-3p oraz miR-145-5p o najsilniej obniżonej ekspresji u badanych myszy transgenicznym. Zaobserwowane obniżenie poziomu ekspresji miR-221*, wykazane zarówno metodą NGS jak i metodą qPCR było przesłanką do sprawdzenia wpływu obniżenia tego miRNA na gęstość i strukturę kolców dendrytycznych oraz własności elektrofizjologiczne neuronów. W tym celu wykorzystano jako model doświadczalny mysia hipokampalną hodowlę pierwotną transfekowaną wyznakowanym fluorescencyjnie inhibitorem miR-221*. Gęstość i kształt kolców nie zmieniły się pod wpływem hamowania aktywności miR-221*. Co ciekawe, zaobserwowano wzrost amplitudy mEPSCs przy jednoczesnym braku różnic w interwałach między zdarzeniami. Może to sugerować, że miR-221* zwiększa siłę odpowiedzi postsynaptycznych, ponieważ uważa się, że

za wzrost amplitudy mEPSC odpowiada wzrost liczby receptorów dla glutaminianu (Hu i Li, 2017). Harraz i wsp. (2012) zaobserwowali neuroprotektoryjne działanie miR-223, którego poziom ekspresji wzrastał w odpowiedzi na niedokrwienie mózgu spowodowane uszkodzeniem. W badaniu tym pokazano, że miR-223 bezpośrednio reguluje ekspresję podjednostek receptorów AMPA (GluR2) i NMDA (NR2B) poprzez celowanie w sekwencję 3'UTR. Nokaut miR-223 u myszy wywoływał zwiększenie amplitudy zdarzeń mEPSCs (Harraz i wsp., 2012). Podobny mechanizm zaobserwowano po indukcji LTD, które spowodowało wzrost poziomu miR-137. W wyniku zwiększenia poziomu tego miRNA zmniejszyła się ekspresję podjednostki receptora AMPA (GluA1) w synapsach hipokampalnych. Obniżenie poziomu ekspresji miR-137 miało odwrotny skutek, a dodatkowo było związane ze wzrostem transmisji synaptycznej i przekształceniem milczących synaps w synapsy funkcjonalne (Olde Loohuis i wsp., 2015). Badania te sugerują, że zaobserwowany wzrost amplitudy mEPSC po dodaniu inhibitora miR-221* może być związany z jego rolą w regulacji poziomu podjednostek receptorów AMPA i NMDA w części postsynaptycznej.

Zdecydowana większość dotychczasowych badań skupiała się na miR-221-3p, które jest jednym z najpowszechniejszych miRNA w ludzkim mózgu (Boudreau i wsp., 2014). Rola miR-221-3p została wykazana w takich procesach jak proliferacja (Pandey i wsp., 2015) oraz różnicowanie neuronów (Hamada i wsp., 2012) i komórek Schwanna (Yu i wsp., 2012). Odgrywa ono również rolę w odpowiedzi na stres oksydacyjny (Oh i wsp., 2018). Co więcej, miR-221-3p został zidentyfikowany jako potencjalny biomarker choroby Parkinsona (Ding i wsp., 2016; Ma i wsp., 2016), zespołu łamliwego chromosomu X (Zongaro i wsp., 2013) i CHAJ (Feng i wsp., 2019). Związek miR-221-3p z depresją wynika z jego roli w regulacji szlaku Wnt2/CREB/BDNF (Lian i wsp., 2018). Elementy tego szlaku są również regulowane poprzez aktywność GSK-3 β (Mai i wsp., 2002; Okamoto i wsp., 2010; Xu i wsp., 2017).

Analiza proteomiczna somatycznych komórek macierzystych z ludzkiej krwi pępowinowej wykazała, że miRNA pozwalają na osiągnięcie wyważonej równowagi (ang. *fine-tuning*), na poszczególnych etapach rozwoju (Schira-Heinen i wsp., 2020). Rolę takiego regulatora przypisano głównie miR-221*. Obniżenie poziomu ekspresji tego miRNA było obserwowane z jednoczesnym zwiększeniem poziomu ekspresji wielu białek zaangażowanych w różnicowanie komórek (Schira-Heinen i wsp., 2020). Dodatkowo wykazano, że rodzina miR-221 może również regulować ekspresję innych miRNA (Alshalalfa, 2012). Pomimo tego, że miR-221* jest niezbędne dla migracji, różnicowania i wzrostu komórek (Su i wsp., 2013), nie wykazano wcześniej roli tego miRNA w funkcjonowaniu synaps i ich plastyczności.

Zainteresowanie funkcją miR-221* ograniczone jest głównie do badań skupiających się na mechanizmach i potencjalnej terapii nowotworów. Wykazano, że zaburzony poziom ekspresji miR-221* w linii komórkowej nowotworu prostaty prowadzi do zmian w migracji, różnicowaniu i kształtowaniu się guzów nowotworowych (Kiener i wsp., 2019; Shao i wsp., 2018). Wykazano istotne statystycznie obniżenie poziomu ekspresji miR-221* w nowotworze prostaty w odniesieniu do zdrowej tkanki (Kiener i wsp., 2019). Zwiększony poziom ekspresji miR-221* był skorelowany ze spadkiem migracji i różnicowania komórek *in vitro*, co prowadziło do redukcji procesu nowotworowego (Shao i wsp., 2018). Ponadto wykazano również wpływ miR-221* na regulację odpowiedzi zapalnej (Fang i wsp., 2015; Li i wsp., 2020).

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy sugerują, że miR-221*, którego poziom ekspresji jest istotnie obniżony w hipokampie myszy transgenicznej linii GSK-3 β [S9A] może odgrywać rolę w transmisji synaptycznej. Przedstawione wyniki uzyskane z analizy pierwotnej hodowli komórkowej uzyskanej z hipokampów myszy typu dzikiego są badaniem pilotażowym, wymagającym szerszej analizy i dalszych badań. Równocześnie są przesłanką wskazującą na istotny udział miR-221* w zmianach właściwości elektrofizjologicznych neuronów.

7. Podsumowanie wyników i wnioski

1. W pracy wykazano, że wzmożona aktywność GSK-3 β wpływa na strukturę i funkcję synaps pobudzających w zakręcie zębatym u młodych osobników. Strukturalne zaburzenia obejmowały zmiany morfologii kolców dendrytycznych, gdzie zaobserwowano ich wydłużenie oraz zwiększenie liczby kolców długich (uważanych za niedojrzałe) względem grzybkowatych (uważanych za dojrzałą formę) i przysadzistych (zanikające). Ponadto wykazano, że zmiany strukturalne wiążą się jednocześnie ze zmniejszeniem pobudzającego przekąźnictwa synaptycznego. Osłabienie aktywności synaptycznej może mieć związek ze zwiększeniem się udziału milczących (niedojrzałych, lub нефункциональных) synaps w zakręcie zębatym osobników transgenicznych. Powyższe wyniki sugerują, że wzrost aktywności GSK-3 β zmniejsza stabilność receptorów AMPA w błonie i hamuje dojrzewanie połączeń synaptycznych.
2. Wykazano, że GSK-3 β reguluje poziom ekspresji kilkudziesięciu dojrzałych i niedojrzałych miRNA w hipokampie, obniżając poziom ich ekspresji. Potwierdzono obniżenie poziomu ekspresji miR-221* u myszy z nadekspresją GSK-3 β .
3. Wykazano, że obniżenie poziomu ekspresji miR-221* nie wpływa na strukturę, ale wpływa na funkcjonowanie synaps pobudzających w neuronach hipokampalnych u myszy typu dzikiego. Nie zaobserwowano wpływu hamowania poziomu ekspresji miR-221* na gęstość i kształt kolców dendrytycznych, ale zaobserwowano wzmocnienie pobudzającego przekąźnictwa synaptycznego, prawdopodobnie poprzez mechanizmy postsynaptyczne.

Podsumowując, wzrost aktywności GSK-3 β prowadzi do zmniejszenia puli funkcjonalnych synaps w komórkach ziarnistych zakrętu zębatego hipokampa u młodych myszy. U transgenicznych myszy ze wzmożoną aktywnością GSK-3 β wykazano obniżenie poziomu miR-221*, a zahamowanie aktywności tego miRNA prowadzi do zmian w pobudzającym przekąźnictwie synaptycznym. Zaobserwowane zmiany w morfologii i funkcjonowaniu synaps pod wpływem wzmożonej aktywności GSK-3 β mogą być podłożem zaburzonej plastyczności synaptycznej.

8. Bibliografia

1. Ali, A., Hoeflich, K.P., Woodgett, J.R., 2001. Glycogen synthase kinase-3: properties, functions, and regulation. *Chem. Rev.* 101, 2527–2540.
2. Alshalalfa, M., 2012. MicroRNA Response Elements-Mediated miRNA-miRNA Interactions in Prostate Cancer. *Adv. Bioinforma.*
3. Ambardar, S., Gupta, R., Trakroo, D., Lal, R., Vakhlu, J., 2016. High Throughput Sequencing: An Overview of Sequencing Chemistry. *Indian J. Microbiol.* 56, 394–404.
4. Amici, M., Lee, Y., Pope, R.J.P., Bradley, C.A., Cole, A., Collingridge, G.L., 2020. GSK-3 β regulates the synaptic expression of NMDA receptors via phosphorylation of phosphatidylinositol 4 kinase type II α . *Eur. J. Neurosci.*
5. Ankolekar, S.M., Sikdar, S.K., 2015. Early postnatal exposure to lithium in vitro induces changes in AMPAR mEPSCs and vesicular recycling at hippocampal glutamatergic synapses. *J. Biosci.* 40, 339–354.
6. Arellano, J.I., Benavides-Piccione, R., DeFelipe, J., Yuste, R., 2007. Ultrastructure of Dendritic Spines: Correlation Between Synaptic and Spine Morphologies. *Front. Neurosci.* 1, 131–143.
7. Atwood, H.L., Wojtowicz, J.M., 1999. Silent Synapses in Neural Plasticity: Current Evidence. *Learn. Mem.* 6, 542–571.
8. Bacci, A., Coco, S., Pravettoni, E., Schenk, U., Armano, S., Frassoni, C., Verderio, C., Camilli, P.D., Matteoli, M., 2001. Chronic Blockade of Glutamate Receptors Enhances Presynaptic Release and Downregulates the Interaction between Synaptophysin-Synaptobrevin–Vesicle-Associated Membrane Protein 2. *J. Neurosci.* 21, 6588–6596.
9. Banach, E., Dmitrzak-Weglarczyk, M., Pawlak, J., Kapelski, P., Szczepankiewicz, A., Rajewska-Rager, A., Slopian, A., Skibinska, M., Czerski, P., Hauser, J., 2017. Dysregulation of miR-499, miR-708 and miR-1908 during a depression episode in bipolar disorders. *Neurosci. Lett.* 654, 117–119.
10. Baudry, A., Mouillet-Richard, S., Schneider, B., Launay, J.-M., Kellermann, O., 2010. miR-16 targets the serotonin transporter: a new facet for adaptive responses to antidepressants. *Science* 329, 1537–1541.
11. Bauer, M., Pfennig, A., 2005. Epidemiology of bipolar disorders. *Epilepsia* 46 Suppl 4, 8–13.

12. Beroun, A., Nalberczak-Skóra, M., Harda, Z., Piechota, M., Ziółkowska, M., Cały, A., Pagano, R., Radwanska, K., 2018. Generation of silent synapses in dentate gyrus correlates with development of alcohol addiction. *Neuropsychopharmacology* 43, 1989–1999.
13. Besing, R.C., Paul, J.R., Hablitz, L.M., Rogers, C.O., Johnson, R.L., Young, M.E., Gamble, K.L., 2015. Circadian rhythmicity of active GSK3 isoforms modulates molecular clock gene rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *J. Biol. Rhythms* 30, 155–160.
14. Bliss, T.V., Lomo, T., 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* 232, 331–356.
15. Blumberg, H.P., Fredericks, C., Wang, F., Kalmar, J.H., Spencer, L., Papademetris, X., Pittman, B., Martin, A., Peterson, B.S., Fulbright, R.K., Krystal, J.H., 2005. Preliminary evidence for persistent abnormalities in amygdala volumes in adolescents and young adults with bipolar disorder. *Bipolar Disord.* 7, 570–576.
16. Borczyk, M., Śliwińska, M.A., Cały, A., Bernas, T., Radwanska, K., 2019. Neuronal plasticity affects correlation between the size of dendritic spine and its postsynaptic density. *Sci. Rep.* 9, 1693.
17. Bosch, M., Hayashi, Y., 2012. Structural plasticity of dendritic spines. *Curr. Opin. Neurobiol.* 22, 383–388.
18. Boudreau, R.L., Jiang, P., Gilmore, B.L., Spengler, R.M., Tirabassi, R., Nelson, J.A., Ross, C.A., Xing, Y., Davidson, B.L., 2014. Transcriptome-wide discovery of microRNA binding sites in human brain. *Neuron* 81, 294–305.
19. Bradley, C.A., Peineau, S., Taghibiglou, C., Nicolas, C.S., Whitcomb, D.J., Bortolotto, Z.A., Kaang, B.-K., Cho, K., Wang, Y.T., Collingridge, G.L., 2012. A pivotal role of GSK-3 in synaptic plasticity. *Front. Mol. Neurosci.* 5.
20. Bramon, E., Sham, P.C., 2001. The common genetic liability between schizophrenia and bipolar disorder: A review. *Curr. Psychiatry Rep.* 3, 332–337.
21. Brown, R.E., Haas, H.L., 1999. On the mechanism of histaminergic inhibition of glutamate release in the rat dentate gyrus. *J. Physiol.* 515 (Pt 3), 777–786.
22. Brown, T.E., Lee, B.R., Mu, P., Ferguson, D., Dietz, D., Ohnishi, Y.N., Lin, Y., Suska, A., Ishikawa, M., Huang, Y.H., Shen, H., Kalivas, P.W., Sorg, B.A., Zukin, R.S., Nestler, E.J., Dong, Y., Schlüter, O.M., 2011. A silent synapse-based mechanism for

- cocaine-induced locomotor sensitization. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 8163–8174.
23. Budzyński, M., Grenda, A., Filip, A.A., 2014. MicroRNA molecules as a significant constituent in gene regulation mechanisms related to cancer. *Nowotw. J. Oncol.* 64, 48–60.
24. Burrone, J., Murthy, V.N., 2003. Synaptic gain control and homeostasis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13, 560–567.
25. Camkurt, M.A., Güneş, S., Coşkun, S., Fındıklı, E., 2017. Peripheral Signatures of Psychiatric Disorders: MicroRNAs. *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.* 15, 313–319.
26. Camkurt, M.A., Karababa, İ.F., Erdal, M.E., Kandemir, S.B., Fries, G.R., Bayazıt, H., Ay, M.E., Kandemir, H., Ay, Ö.I., Coşkun, S., Çiçek, E., Selek, S., 2019. MicroRNA dysregulation in manic and euthymic patients with bipolar disorder. *J. Affect. Disord.* 261, 84–90.
27. Chen, G., Huang, L.D., Jiang, Y.M., Manji, H.K., 1999. The mood-stabilizing agent valproate inhibits the activity of glycogen synthase kinase-3. *J. Neurochem.* 72, 1327–1330.
28. Chen, H., Wang, N., Burmeister, M., McInnis, M.G., 2009. MicroRNA expression changes in lymphoblastoid cell lines in response to lithium treatment. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 12, 975–981.
29. Chen, P., Gu, Z., Liu, W., Yan, Z., 2007. Glycogen synthase kinase 3 regulates N-methyl-D-aspartate receptor channel trafficking and function in cortical neurons. *Mol. Pharmacol.* 72, 40–51.
30. Cheng, H.-Y.M., Papp, J.W., Varlamova, O., Dziema, H., Russell, B., Curfman, J.P., Nakazawa, T., Shimizu, K., Okamura, H., Impey, S., others, 2007. microRNA modulation of circadian-clock period and entrainment. *Neuron* 54, 813–829.
31. Chiu, H., Alqadah, A., Chang, C., 2014. The role of microRNAs in regulating neuronal connectivity. *Front. Cell. Neurosci.* 7.
32. Consortium, T.U., 2019. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.* 47, D506–D515.
33. Craddock, N., Forty, L., 2006. Genetics of affective (mood) disorders. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 14, 660–668.
34. Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., Hemmings, B.A., 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785–789.

35. Cuesto, G., Jordán-Álvarez, S., Enriquez-Barreto, L., Ferrús, A., Morales, M., Acebes, Á., 2015. GSK3 β Inhibition Promotes Synaptogenesis in Drosophila and Mammalian Neurons. *PLOS ONE* 10, e0118475.
36. De Sarno, P., Li, X., Jope, R.S., 2002. Regulation of Akt and glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylation by sodium valproate and lithium. *Neuropharmacology* 43, 1158–1164.
37. DeLisi, L.E., Szulc, K.U., Bertisch, H.C., Majcher, M., Brown, K., 2006. Understanding structural brain changes in schizophrenia. *Dialogues Clin. Neurosci.* 8, 71–78.
38. Dewachter, I., Ris, L., Jaworski, T., Seymour, C.M., Kremer, A., Borghgraef, P., De Vijver, H., Godaux, E., Van Leuven, F., 2009. GSK3beta, a centre-staged kinase in neuropsychiatric disorders, modulates long term memory by inhibitory phosphorylation at serine-9. *Neurobiol. Dis.* 35, 193–200.
39. Dietrich, D., Kral, T., Clusmann, H., Friedl, M., Schramm, J., 2002. Presynaptic group II metabotropic glutamate receptors reduce stimulated and spontaneous transmitter release in human dentate gyrus. *Neuropharmacology* 42, 297–305.
40. Ding, H., Huang, Z., Chen, M., Wang, C., Chen, X., Chen, J., Zhang, J., 2016. Identification of a panel of five serum miRNAs as a biomarker for Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 22, 68–73.
41. Dmitrzak-Węglarz, M., Pawlak, J., 2010. Geny centralnego zegara biologicznego w zaburzeniach afektywnych jedno- i dwubiegunowych. *Psychiatria* 7, 151–160.
42. Embi, N., Rylatt, D.B., Cohen, P., 1980. Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur. J. Biochem.* 107, 519–527.
43. Fang, K., Sideri, A., Law, I.K.M., Bakirtzi, K., Polytarchou, C., Iliopoulos, D., Pothoulakis, C., 2015. Identification of a novel substance P (SP)-neurokinin-1 receptor (NK-1R) microRNA-221-5p inflammatory network in human colonic epithelial cells. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 1, 503–515.
44. Feng, J., Wang, M., Li, M., Yang, J., Jia, J., Liu, L., Zhou, J., Zhang, C., Wang, X., 2019. Serum miR-221-3p as a new potential biomarker for depressed mood in perioperative patients. *Brain Res.* 1720, 146296.
45. Ferreira, A.S., Raposo, N.R.B., Sallet, P.C., Van de Bilt, M.T., Machado-Vieira, R., Talib, L.L., Gattaz, W.F., 2015. Lower phosphorylated glycogen synthase kinase-3B levels in platelets of patients with schizophrenia: increment by olanzapine treatment. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 265, 167–170.

46. Filip, A., 2007. MikroRNA: nowe mechanizmy regulacji ekspresji genów. *Postępy Biochem.* 53, 413–419.
47. Fletcher, C.E., Godfrey, J.D., Shibakawa, A., Bushell, M., Bevan, C.L., 2016. A novel role for GSK3 β as a modulator of Drosha microprocessor activity and MicroRNA biogenesis. *Nucleic Acids Res.*
48. Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B., Bartel, D.P., 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19, 92–105.
49. Geaghan, M., Cairns, M.J., 2015. MicroRNA and Posttranscriptional Dysregulation in Psychiatry. *Biol. Psychiatry* 0.
50. Gideons, E.S., Lin, P.-Y., Mahgoub, M., Kavalali, E.T., Monteggia, L.M., 2017. Chronic lithium treatment elicits its antimanic effects via BDNF-TrkB dependent synaptic downscaling. *eLife* 6.
51. Gil, M., Zhen, X., Friedman, E., 2003. Prenatal cocaine exposure alters glycogen synthase kinase-3beta (GSK3beta) pathway in select rabbit brain areas. *Neurosci. Lett.* 349, 143–146.
52. Gorostowicz, A., Siwek, M., 2018. Trudności w diagnostyce choroby afektywnej dwubiegunowej. *Psychiatr. Psychol. Klin.* 18.
53. Gosek, P., Chojnacka, M., Bieńkowski, P., Swiecicki, Ł., 2012. [Antidepressant effect of ketamine, a N-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamate receptor antagonist, in the therapy of treatment-resistant depression]. *Psychiatr. Pol.* 46, 283–294.
54. Graziane, N.M., Sun, S., Wright, W.J., Jang, D., Liu, Z., Huang, Y.H., Nestler, E.J., Wang, Y.T., Schlüter, O.M., Dong, Y., 2016. Opposing mechanisms mediate morphine- and cocaine-induced generation of silent synapses. *Nat. Neurosci.* 19, 915–925.
55. Grimes, C.A., Jope, R.S., 2001. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog. Neurobiol.* 65, 391–426.
56. Guo, A.-Y., Sun, J., Jia, P., Zhao, Z., 2010. A novel microRNA and transcription factor mediated regulatory network in schizophrenia. *BMC Syst. Biol.* 4, 10.
57. Hall, A.C., Brennan, A., Goold, R.G., Cleverley, K., Lucas, F.R., Gordon-Weeks, P.R., Salinas, P.C., 2002. Valproate Regulates GSK-3-Mediated Axonal Remodeling and Synapsin I Clustering in Developing Neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 20, 257–270.
58. Hamada, N., Fujita, Y., Kojima, T., Kitamoto, A., Akao, Y., Nozawa, Y., Ito, M., 2012. MicroRNA expression profiling of NGF-treated PC12 cells revealed a critical role for miR-221 in neuronal differentiation. *Neurochem. Int.* 60, 743–750.

59. Hanger, D.P., Hughes, K., Woodgett, J.R., Brion, J.P., Anderton, B.H., 1992. Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci. Lett.* 147, 58–62.
60. Hanse, E., Seth, H., Riebe, I., 2013. AMPA-silent synapses in brain development and pathology. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 839–850.
61. Harlow, E.G., Till, S.M., Russell, T.A., Wijetunge, L.S., Kind, P., Contractor, A., 2010. Critical Period Plasticity Is Disrupted in the Barrel Cortex of Fmr1 Knockout Mice. *Neuron* 65, 385–398.
62. Harraz, M.M., Eacker, S.M., Wang, X., Dawson, T.M., Dawson, V.L., 2012. MicroRNA-223 is neuroprotective by targeting glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 18962–18967.
63. Harris, K.M., Stevens, J.K., 1989. Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 9, 2982–2997.
64. Hastings, M.H., Maywood, E.S., Brancaccio, M., 2018. Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *Nat. Rev. Neurosci.* 19, 453–469.
65. Hebb, D.O., 1949. *The organization of behavior; a neuropsychological theory*, The organization of behavior; a neuropsychological theory. Wiley, Oxford, England.
66. Hernández, F., Borrell, J., Guaza, C., Avila, J., Lucas, J.J., 2002. Spatial learning deficit in transgenic mice that conditionally over-express GSK-3beta in the brain but do not form tau filaments. *J. Neurochem.* 83, 1529–1533.
67. Higuchi, F., Uchida, S., Yamagata, H., Abe-Higuchi, N., Hobara, T., Hara, K., Kobayashi, A., Shintaku, T., Itoh, Y., Suzuki, T., Watanabe, Y., 2016. Hippocampal MicroRNA-124 Enhances Chronic Stress Resilience in Mice. *J. Neurosci.* 36, 7253–7267.
68. Hoeflich, K.P., Luo, J., Rubie, E.A., Tsao, M.S., Jin, O., Woodgett, J.R., 2000. Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature* 406, 86–90.
69. Hooper, C., Markevich, V., Plattner, F., Killick, R., Schofield, E., Engel, T., Hernandez, F., Anderton, B., Rosenblum, K., Bliss, T., Cooke, S.F., Avila, J., Lucas, J.J., Giese, K.P., Stephenson, J., Lovestone, S., 2007. Glycogen synthase kinase-3 inhibition is integral to long-term potentiation. *Eur. J. Neurosci.* 25, 81–86.

70. Hsieh, H., Boehm, J., Sato, C., Iwatsubo, T., Tomita, T., Sisodia, S., Malinow, R., 2006. AMPA-R Removal Underlies A β -induced Synaptic Depression and Dendritic Spine Loss. *Neuron* 52, 831–843.
71. Hu, Z., Li, Z., 2017. miRNAs in Synapse Development and Synaptic Plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 45, 24–31.
72. Hughes, K., Nikolakaki, E., Plyte, S.E., Totty, N.F., Woodgett, J.R., 1993. Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. *EMBO J.* 12, 803–808.
73. Ishiguro, K., Shiratsuchi, A., Sato, S., Omori, A., Arioka, M., Kobayashi, S., Uchida, T., Imahori, K., 1993. Glycogen synthase kinase 3 beta is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments. *FEBS Lett.* 325, 167–172.
74. Issler, O., Chen, A., 2015. Determining the role of microRNAs in psychiatric disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 201–212.
75. Ito, M., Kano, M., 1982. Long-lasting depression of parallel fiber-Purkinje cell transmission induced by conjunctive stimulation of parallel fibers and climbing fibers in the cerebellar cortex. *Neurosci. Lett.* 33, 253–258.
76. Jasińska, M., Miłek, J., Cymerman, I.A., Łęski, S., Kaczmarek, L., Dziembowska, M., 2016. miR-132 Regulates Dendritic Spine Structure by Direct Targeting of Matrix Metalloproteinase 9 mRNA. *Mol. Neurobiol.* 53, 4701–4712.
77. Jope, R.S., Roh, M.-S., 2006. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in psychiatric diseases and therapeutic interventions. *Curr. Drug Targets* 7, 1421–1434.
78. Kaech, S., Banker, G., 2006. Culturing hippocampal neurons. *Nat. Protoc.* 1, 2406–2415.
79. Kaidanovich-Beilin, O., Lipina, T., Vukobradovic, I., Roder, J., Woodgett, J.R., 2011. Assessment of social interaction behaviors. *J. Vis. Exp. JoVE.*
80. Kanold, P.O., Deng, R., Meng, X., 2019. The Integrative Function of Silent Synapses on Subplate Neurons in Cortical Development and Dysfunction. *Front. Neuroanat.* 13, 41.
81. Karlsgodt, K.H., Sun, D., Cannon, T.D., 2010. Structural and Functional Brain Abnormalities in Schizophrenia. *Curr. Dir. Psychol. Sci.* 19, 226–231.
82. Kasiappan, R., Rajarajan, D., 2017. Role of MicroRNA Regulation in Obesity-Associated Breast Cancer: Nutritional Perspectives. *Adv. Nutr.* 8, 868–888.
83. Kerchner, G.A., Nicoll, R.A., 2008. Silent synapses and the emergence of a postsynaptic mechanism for LTP. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 813–825.

84. Kerkela, R., Kockeritz, L., MacAulay, K., Zhou, J., Doble, B.W., Beahm, C., Greytak, S., Woulfe, K., Trivedi, C.M., Woodgett, J.R., Epstein, J.A., Force, T., Huggins, G.S., 2008a. Deletion of GSK-3 β in mice leads to hypertrophic cardiomyopathy secondary to cardiomyoblast hyperproliferation. *J. Clin. Invest.* 118, 3609–3618.
85. Kerkela, R., Kockeritz, L., Macaulay, K., Zhou, J., Doble, B.W., Beahm, C., Greytak, S., Woulfe, K., Trivedi, C.M., Woodgett, J.R., Epstein, J.A., Force, T., Huggins, G.S., 2008b. Deletion of GSK-3beta in mice leads to hypertrophic cardiomyopathy secondary to cardiomyoblast hyperproliferation. *J. Clin. Invest.* 118, 3609–3618.
86. Kessels, H.W., Nabavi, S., Malinow, R., 2013. Metabotropic NMDA receptor function is required for β -amyloid-induced synaptic depression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 4033–4038.
87. Kiener, M., Chen, L., Krebs, M., Grosjean, J., Klima, I., Kalogirou, C., Riedmiller, H., Kneitz, B., Thalmann, G.N., Snaar-Jagalska, E., Spahn, M., Kruithof-de Julio, M., Zoni, E., 2019. miR-221-5p regulates proliferation and migration in human prostate cancer cells and reduces tumor growth in vivo. *BMC Cancer* 19, 627.
88. Kiltchewskij, D., Cairns, M.J., 2019. Temporospatial guidance of activity-dependent gene expression by microRNA: mechanisms and functional implications for neural plasticity. *Nucleic Acids Res.* 47, 533–545.
89. Kim, A.J., Shi, Y., Austin, R.C., Werstuck, G.H., 2005. Valproate protects cells from ER stress-induced lipid accumulation and apoptosis by inhibiting glycogen synthase kinase-3. *J. Cell Sci.* 118, 89–99.
90. Kim, C.-H., Lisman, J.E., 1999. A Role of Actin Filament in Synaptic Transmission and Long-Term Potentiation. *J. Neurosci.* 19, 4314–4324.
91. Kim, I.H., Racz, B., Wang, H., Burianek, L., Weinberg, R., Yasuda, R., Wetsel, W.C., Soderling, S.H., 2013. Disruption of Arp2/3 results in asymmetric structural plasticity of dendritic spines and progressive synaptic and behavioral abnormalities. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 6081–6092.
92. Kim, V.N., Nam, J.-W., 2006. Genomics of microRNA. *Trends Genet.* 22, 165–173.
93. Kimura, T., Tomooka, M., Yamano, N., Murayama, K., Matoba, S., Umehara, H., Kanai, Y., Nakano, T., 2008. AKT signaling promotes derivation of embryonic germ cells from primordial germ cells. *Dev. Camb. Engl.* 135, 869–879.
94. Kinoshita, C., Okamoto, Y., Aoyama, K., Nakaki, T., 2020. MicroRNA: A Key Player for the Interplay of Circadian Rhythm Abnormalities, Sleep Disorders and Neurodegenerative Diseases. *Clocks Sleep* 2, 282–307.

95. Klein, P.S., Melton, D.A., 1996. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 8455–8459.
96. Koch, S.B.J., Morey, R.A., Roelofs, K., 2020. The role of the dentate gyrus in stress-related disorders. *Mol. Psychiatry* 25, 1361–1363.
97. Kondratiuk, I., Devijver, H., Lechat, B., Van Leuven, F., Kaczmarek, L., Filipkowski, R.K., 2013. Glycogen synthase kinase-3beta affects size of dentate gyrus and species-typical behavioral tasks in transgenic and knockout mice. *Behav. Brain Res.* 248, 46–50.
98. Kondratiuk, I., Łęski, S., Urbańska, M., Biecek, P., Devijver, H., Lechat, B., Van Leuven, F., Kaczmarek, L., Jaworski, T., 2017. GSK-3 β and MMP-9 Cooperate in the Control of Dendritic Spine Morphology. *Mol. Neurobiol.* 54, 200–211.
99. Konopka, W., Kiryk, A., Novak, M., Herwerth, M., Parkitna, J.R., Wawrzyniak, M., Kowarsch, A., Michaluk, P., Dzwonek, J., Arnsperger, T., Wilczynski, G., Merkschlager, M., Theis, F.J., Köhr, G., Kaczmarek, L., Schütz, G., 2010. MicroRNA loss enhances learning and memory in mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 14835–14842.
100. Kossut M., 2018. *Neuroplastyczność*. Medyk Sp. z o.o.; ISBN 978-83-64045-61-5
101. Koya, E., Cruz, F.C., Ator, R., Golden, S.A., Hoffman, A.F., Lupica, C.R., Hope, B.T., 2012. Silent synapses in selectively activated nucleus accumbens neurons following cocaine sensitization. *Nat. Neurosci.* 15, 1556–1562.
102. Kozlovsky, N., Nadri, C., Agam, G., 2005. Low GSK-3beta in schizophrenia as a consequence of neurodevelopmental insult. *Eur. Neuropsychopharmacol. J. Eur. Coll. Neuropsychopharmacol.* 15, 1–11.
103. Krek, A., Grün, D., Poy, M.N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E.J., MacMenamin, P., da Piedade, I., Gunsalus, K.C., Stoffel, M., Rajewsky, N., 2005. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat. Genet.* 37, 495–500.
104. Krishnankutty, A., Kimura, T., Saito, T., Aoyagi, K., Asada, A., Takahashi, S.-I., Ando, K., Ohara-Imaizumi, M., Ishiguro, K., Hisanaga, S.-I., 2017. In vivo regulation of glycogen synthase kinase 3 β activity in neurons and brains. *Sci. Rep.* 7, 8602.
105. Launay, J.M., Mouillet-Richard, S., Baudry, A., Pietri, M., Kellermann, O., 2011. Raphe-mediated signals control the hippocampal response to SRI antidepressants via miR-16. *Transl. Psychiatry* 1, e56.
106. Lee, B.R., Ma, Y.-Y., Huang, Y.H., Wang, X., Otaka, M., Ishikawa, M., Neumann, P.A., Graziane, N.M., Brown, T.E., Suska, A., Guo, C., Lobo, M.K., Sesack, S.R.,

- Wolf, M.E., Nestler, E.J., Shaham, Y., Schlüter, O.M., Dong, Y., 2013. Maturation of silent synapses in amygdala-accumbens projection contributes to incubation of cocaine craving. *Nat. Neurosci.* 16, 1644–1651.
107. Lee, E.J., Baek, M., Gusev, Y., Brackett, D.J., Nuovo, G.J., Schmittgen, T.D., 2008. Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines, and tumors. *RNA N. Y. N* 14, 35–42.
108. Leroy, K., Brion, J.P., 1999. Developmental expression and localization of glycogen synthase kinase-3 β in rat brain. *J. Chem. Neuroanat.* 16, 279–293.
109. Li, G., Zhang, H., Ma, H., Qu, S., Xing, Q., Wang, G., 2020. MiR-221-5p is involved in the regulation of inflammatory responses in acute gouty arthritis by targeting IL-1 β . *Int. J. Rheum. Dis.*
110. Li, X., Bijur, G.N., Jope, R.S., 2002. Glycogen synthase kinase-3 β , mood stabilizers, and neuroprotection. *Bipolar Disord.* 4, 137–144.
111. Li, X., Jope, R.S., 2010. Is Glycogen Synthase Kinase-3 a Central Modulator in Mood Regulation? *Neuropsychopharmacology* 35, 2143–2154.
112. Li, Xiaohong, Liu, M., Cai, Z., Wang, G., Li, Xiaohua, 2010. Regulation of glycogen synthase kinase-3 during bipolar mania treatment. *Bipolar Disord.* 12, 741–752.
113. Li, Y., Wang, H., Xie, K., Wang, C., Yang, Z., Yu, Y., Wang, G., 2013. Inhibition of Glycogen Synthase Kinase-3 β Prevents Remifentanil-Induced Hyperalgesia via Regulating the Expression and Function of Spinal N-Methyl-D-Aspartate Receptors In Vivo and Vitro. *PLoS ONE* 8.
114. Li, Z., Okamoto, K.-I., Hayashi, Y., Sheng, M., 2004. The Importance of Dendritic Mitochondria in the Morphogenesis and Plasticity of Spines and Synapses. *Cell* 119, 873–887.
115. Lian, N., Niu, Q., Lei, Y., Li, X., Li, Y., Song, X., 2018. MiR-221 is involved in depression by regulating Wnt2/CREB/BDNF axis in hippocampal neurons. *Cell Cycle Georget. Tex* 1–11.
116. Lisman, J., 2017. Glutamatergic synapses are structurally and biochemically complex because of multiple plasticity processes: long-term potentiation, long-term depression, short-term potentiation and scaling. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 372.
117. Lochhead, P.A., Kinstrie, R., Sibbet, G., Rawjee, T., Morrice, N., Cleghon, V., 2006. A chaperone-dependent GSK3 β transitional intermediate mediates activation-loop autophosphorylation. *Mol. Cell* 24, 627–633.

118. Lopez, J.P., Fiori, L.M., Gross, J.A., Labonte, B., Yerko, V., Mechawar, N., Turecki, G., 2014. Regulatory role of miRNAs in polyamine gene expression in the prefrontal cortex of depressed suicide completers. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 17, 23–32.
119. Lovestone, S., Killick, R., Di Forti, M., Murray, R., 2007. Schizophrenia as a GSK-3 dysregulation disorder. *Trends Neurosci.* 30, 142–149.
120. Lucas, J.J., Hernández, F., Gómez-Ramos, P., Morán, M.A., Hen, R., Avila, J., 2001. Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *EMBO J.* 20, 27–39.
121. Lucci, C., Mesquita-Ribeiro, R., Rathbone, A., Dajas-Bailador, F., 2020. Spatiotemporal regulation of GSK3 β levels by miRNA-26a controls axon development in cortical neurons. *Dev. Camb. Engl.* 147.
122. Luoni, A., Riva, M.A., 2016. MicroRNAs and psychiatric disorders: From aetiology to treatment. *Pharmacol. Ther.* 167, 13–27.
123. Ma, W., Li, Y., Wang, C., Xu, F., Wang, M., Liu, Y., 2016. Serum miR-221 serves as a biomarker for Parkinson's disease. *Cell Biochem. Funct.* 34, 511–515.
124. Mai, L., Jope, R.S., Li, X., 2002. BDNF-mediated signal transduction is modulated by GSK3beta and mood stabilizing agents. *J. Neurochem.* 82, 75–83.
125. Malinow, R., Malenka, R.C., 2002. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 25, 103–126.
126. Mao, Q., Gong, X., Zhou, C., Tu, Z., Zhao, L., Wang, L., Wang, X., Sun, L., Xia, J., Lian, B., Chen, J., Mu, J., Yang, D., Xie, P., 2017. Up-regulation of SIRT6 in the hippocampus induced rats with depression-like behavior via the block Akt/GSK3 β signaling pathway. *Behav. Brain Res.* 323, 38–46.
127. Moechars, D., Dewachter, I., Lorent, K., Reversé, D., Baekelandt, V., Naidu, A., Teseur, I., Spittaels, K., Haute, C.V.D., Checler, F., Godaux, E., Cordell, B., Leuven, F.V., 1999. Early Phenotypic Changes in Transgenic Mice That Overexpress Different Mutants of Amyloid Precursor Protein in Brain *. *J. Biol. Chem.* 274, 6483–6492.
128. Moechars, D., Lorent, K., De Strooper, B., Dewachter, I., Van Leuven, F., 1996. Expression in brain of amyloid precursor protein mutated in the alpha-secretase site causes disturbed behavior, neuronal degeneration and premature death in transgenic mice. *EMBO J.* 15, 1265–1274.
129. Moutin, E., Hemonnot, A.-L., Seube, V., Linck, N., Rassendren, F., Perroy, J., Compan, V., 2020. Procedures for Culturing and Genetically Manipulating Murine Hippocampal Postnatal Neurons. *Front. Synaptic Neurosci.* 12.

130. Narahari, A., Hussain, M., Sreeram, V., 2017. MicroRNAs as Biomarkers for Psychiatric Conditions: A Review of Current Research. *Innov. Clin. Neurosci.* 14, 53–55.
131. Noga, J.T., Vldar, K., Torrey, E.F., 2001. A volumetric magnetic resonance imaging study of monozygotic twins discordant for bipolar disorder. *Psychiatry Res. Neuroimaging* 106, 25–34.
132. O'Brien, R.J., Kamboj, S., Ehlers, M.D., Rosen, K.R., Fischbach, G.D., Huganir, R.L., 1998. Activity-Dependent Modulation of Synaptic AMPA Receptor Accumulation. *Neuron* 21, 1067–1078.
133. Ochs, S.M., Dorostkar, M.M., Aramuni, G., Schön, C., Filser, S., Pöschl, J., Kremer, A., Van Leuven, F., Ovsepián, S.V., Herms, J., 2015. Loss of neuronal GSK3 β reduces dendritic spine stability and attenuates excitatory synaptic transmission via β -catenin. *Mol. Psychiatry* 20, 482–489.
134. Ogórek, B., Lam, H.C., Khabibullin, D., Liu, H.-J., Nijmeh, J., Triboulet, R., Kwiatkowski, D.J., Gregory, R.I., Henske, E.P., 2018. TSC2 regulates microRNA biogenesis via mTORC1 and GSK3 β . *Hum. Mol. Genet.* 27, 1654–1663.
135. Oh, S.E., Park, H.-J., He, L., Skibiél, C., Junn, E., Mouradian, M.M., 2018. The Parkinson's disease gene product DJ-1 modulates miR-221 to promote neuronal survival against oxidative stress. *Redox Biol.* 19, 62–73.
136. Okamoto, H., Voleti, B., Banasr, M., Sarhan, M., Duric, V., Girgenti, M.J., Dileone, R.J., Newton, S.S., Duman, R.S., 2010. Wnt2 expression and signaling is increased by different classes of antidepressant treatments. *Biol. Psychiatry* 68, 521–527.
137. Olde Loohuis, N.F.M., Ba, W., Stoerchel, P.H., Kos, A., Jager, A., Schrott, G., Martens, G.J.M., van Bokhoven, H., Nadif Kasri, N., Aschrafi, A., 2015. MicroRNA-137 Controls AMPA-Receptor-Mediated Transmission and mGluR-Dependent LTD. *Cell Rep.* 11, 1876–1884.
138. Olsen, L., Klausen, M., Helboe, L., Nielsen, F.C., Werge, T., 2009. MicroRNAs Show Mutually Exclusive Expression Patterns in the Brain of Adult Male Rats. *PLOS ONE* 4, e7225.
139. Pandey, A., Singh, P., Jauhari, A., Singh, T., Khan, F., Pant, A.B., Parmar, D., Yadav, S., 2015. Critical role of the miR-200 family in regulating differentiation and proliferation of neurons. *J. Neurochem.* 133, 640–652.
140. Park, J., Lee, J., Choi, K., Kang, H.J., 2021. Regulation of behavioral response to stress by microRNA-690. *Mol. Brain* 14, 7.

141. Pasquinelli, A.E., Hunter, S., Bracht, J., 2005. MicroRNAs: a developing story. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15, 200–205.
142. Pchitskaya, E., Bezprozvanny, I., 2020. Dendritic Spines Shape Analysis—Classification or Clusterization? Perspective. *Front. Synaptic Neurosci.* 12.
143. Pedraza, N., Ortiz, R., Cornadó, A., Llobet, A., Aldea, M., Gallego, C., 2014. KIS, a Kinase Associated with Microtubule Regulators, Enhances Translation of AMPA Receptors and Stimulates Dendritic Spine Remodeling. *J. Neurosci.* 34, 13988–13997.
144. Peineau, S., Taghibiglou, C., Bradley, C., Wong, T.P., Liu, L., Lu, J., Lo, E., Wu, D., Saule, E., Bouschet, T., Matthews, P., Isaac, J.T.R., Bortolotto, Z.A., Wang, Y.T., Collingridge, G.L., 2007. LTP Inhibits LTD in the Hippocampus via Regulation of GSK3 β . *Neuron* 53, 703–717.
145. Prickaerts, J., Moechars, D., Cryns, K., Lenaerts, I., van Craenendonck, H., Goris, I., Daneels, G., Bouwknecht, J.A., Steckler, T., 2006. Transgenic mice overexpressing glycogen synthase kinase 3beta: a putative model of hyperactivity and mania. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 9022–9029.
146. Ran, I., Gkogkas, C.G., Vasuta, C., Tartas, M., Khoutorsky, A., Laplante, I., Parsyan, A., Nevarko, T., Sonenberg, N., Lacaille, J.-C., 2013. Selective Regulation of GluA Subunit Synthesis and AMPA Receptor-Mediated Synaptic Function and Plasticity by the Translation Repressor 4E-BP2 in Hippocampal Pyramidal Cells. *J. Neurosci.* 33, 1872–1886.
147. Robinson, J.W., Leshchyns'ka, I., Farghaian, H., Hughes, W.E., Sytnyk, V., Neely, G.G., Cole, A.R., 2014. PI4KII α phosphorylation by GSK3 directs vesicular trafficking to lysosomes. *Biochem. J.* 464, 145–156.
148. Rogaev, E.I., 2005. Small RNAs in human brain development and disorders. *Biochem. Mosc.* 70, 1404–1407.
149. Rong, H., Liu, T.B., Yang, K.J., Yang, H.C., Wu, D.H., Liao, C.P., Hong, F., Yang, H.Z., Wan, F., Ye, X.Y., others, 2011. MicroRNA-134 plasma levels before and after treatment for bipolar mania. *J. Psychiatr. Res.* 45, 92–95.
150. Rosoklija, G., Toomayan, G., Ellis, S.P., Keilp, J., Mann, J.J., Latov, N., Hays, A.P., Dwork, A.J., 2000. Structural abnormalities of subicular dendrites in subjects with schizophrenia and mood disorders: preliminary findings. *Arch. Gen. Psychiatry* 57, 349–356.
151. Roszkowska, M., Skupien, A., Wójtowicz, T., Konopka, A., Gorlewicz, A., Kisiel, M., Bekisz, M., Ruszczycki, B., Dolezyczek, H., Rejmak, E., Knapska, E., Mozrzymas,

- J.W., Wlodarczyk, J., Wilczynski, G.M., Dzwonek, J., 2016. CD44: a novel synaptic cell adhesion molecule regulating structural and functional plasticity of dendritic spines. *Mol. Biol. Cell* 27, 4055–4066.
152. Roy, B., Yoshino, Y., Allen, L., Prall, K., Schell, G., Dwivedi, Y., 2020. Exploiting Circulating MicroRNAs as Biomarkers in Psychiatric Disorders. *Mol. Diagn. Ther.* 24, 279–298.
153. Rui, Y., Myers, K.R., Yu, K., Wise, A., De Blas, A.L., Hartzell, H.C., Zheng, J.Q., 2013. Activity-dependent regulation of dendritic growth and maintenance by glycogen synthase kinase 3 β . *Nat. Commun.* 4, 2628.
154. Ruszczycki, B., Szepesi, Z., Wilczynski, G.M., Bijata, M., Kalita, K., Kaczmarek, L., Wlodarczyk, J., 2012. Sampling issues in quantitative analysis of dendritic spines morphology. *BMC Bioinformatics* 13, 213.
155. Ryan, B., Joilin, G., Williams, J.M., 2015. Plasticity-related microRNA and their potential contribution to the maintenance of long-term potentiation. *Front. Mol. Neurosci.* 8.
156. Schira-Heinen, J., Czapla, A., Hendricks, M., Kloetgen, A., Wruck, W., Adjaye, J., Kögler, G., Werner Müller, H., Stühler, K., Trompeter, H.-I., 2020. Functional omics analyses reveal only minor effects of microRNAs on human somatic stem cell differentiation. *Sci. Rep.* 10, 3284.
157. Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M., Ragg, T., 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol. Biol.* 7, 3.
158. Sempere, L.F., Freemantle, S., Pitha-Rowe, I., Moss, E., Dmitrovsky, E., Ambros, V., 2004. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol.* 5, R13.
159. Shao, N., Ma, G., Zhang, J., Zhu, W., 2018. miR-221-5p enhances cell proliferation and metastasis through post-transcriptional regulation of SOCS1 in human prostate cancer. *BMC Urol.* 18, 14.
160. Shaw, P.C., Davies, A.F., Lau, K.F., Garcia-Barcelo, M., Wayne, M.M., Lovestone, S., Miller, C.C., Anderton, B.H., 1998. Isolation and chromosomal mapping of human glycogen synthase kinase-3 alpha and -3 beta encoding genes. *Genome* 41, 720–727.
161. Silva, R., Mesquita, A.R., Bessa, J., Sousa, J.C., Sotiropoulos, I., Leão, P., Almeida, O.F.X., Sousa, N., 2008. Lithium blocks stress-induced changes in depressive-like

- behavior and hippocampal cell fate: the role of glycogen-synthase-kinase-3beta. *Neuroscience* 152, 656–669.
162. Singh, T.J., Wang, J.Z., Novak, M., Kontzekova, E., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 1996. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylates tau at Ser-262 but only partially inhibits its binding to microtubules. *FEBS Lett.* 387, 145–148.
163. Smalheiser, N.R., Lugli, G., Rizavi, H.S., Torvik, V.I., Turecki, G., Dwivedi, Y., 2012. MicroRNA expression is down-regulated and reorganized in prefrontal cortex of depressed suicide subjects. *PloS One* 7, e33201.
164. Spittaels, K., Van den Haute, C., Van Dorpe, J., Geerts, H., Mercken, M., Bruynseels, K., Lasrado, R., Vandezande, K., Laenen, I., Boon, T., Van Lint, J., Vandenneede, J., Moechars, D., Loos, R., Van Leuven, F., 2000. Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylates protein tau and rescues the axonopathy in the central nervous system of human four-repeat tau transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 275, 41340–41349.
165. Spittaels, K., Van den Haute, C., Van Dorpe, J., Terwel, D., Vandezande, K., Lasrado, R., Bruynseels, K., Irizarry, M., Verhoye, M., Van Lint, J., Vandenneede, J.R., Ashton, D., Mercken, M., Loos, R., Hyman, B., Van der Linden, A., Geerts, H., Van Leuven, F., 2002. Neonatal neuronal overexpression of glycogen synthase kinase-3 beta reduces brain size in transgenic mice. *Neuroscience* 113, 797–808.
166. Stefaniuk, M., Beroun, A., Lebitko, T., Markina, O., Leski, S., Meyza, K., Grzywacz, A., Samochowiec, J., Samochowiec, A., Radwanska, K., Kaczmarek, L., 2017. Matrix Metalloproteinase-9 and Synaptic Plasticity in the Central Amygdala in Control of Alcohol-Seeking Behavior. *Biol. Psychiatry* 81, 907–917.
167. Strakowski, S.M., DelBello, M.P., Adler, C.M., 2005. The functional neuroanatomy of bipolar disorder: a review of neuroimaging findings. *Mol. Psychiatry* 10, 105–116.
168. Su, A., He, S., Tian, B., Hu, W., Zhang, Z., 2013. MicroRNA-221 mediates the effects of PDGF-BB on migration, proliferation, and the epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *PloS One* 8, e71309.
169. Sumi, T., Harada, K., 2020. Mechanism underlying hippocampal long-term potentiation and depression based on competition between endocytosis and exocytosis of AMPA receptors. *Sci. Rep.* 10, 14711.
170. Sutherland, C., Leighton, I.A., Cohen, P., 1993. Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem. J.* 296 (Pt 1), 15–19.

171. Taelman, V.F., Dobrowolski, R., Plouhinec, J.-L., Fuentealba, L.C., Vorwald, P.P., Gumper, I., Sabatini, D.D., Robertis, E.M.D., 2010. Wnt Signaling Requires Sequestration of Glycogen Synthase Kinase 3 inside Multivesicular Endosomes. *Cell* 143, 1136–1148.
172. Takahashi, M., Tomizawa, K., Ishiguro, K., Takamatsu, M., Fujita, S.C., Imahori, K., 1995. Involvement of tau protein kinase I in paired helical filament-like phosphorylation of the juvenile tau in rat brain. *J. Neurochem.* 64, 1759–1768.
173. Tang, X., Li, M., Tucker, L., Ramratnam, B., 2011. Glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 β) phosphorylates the RNAase III enzyme Droscha at S300 and S302. *PloS One* 6, e20391.
174. Taniuchi, M., Johnson, E.M., Roach, P.J., Lawrence, J.C., 1986. Phosphorylation of nerve growth factor receptor proteins in sympathetic neurons and PC12 cells. In vitro phosphorylation by the cAMP-independent protein kinase FA/GSK-3. *J. Biol. Chem.* 261, 13342–13349.
175. Turrigiano, G.G., Leslie, K.R., Desai, N.S., Rutherford, L.C., Nelson, S.B., 1998. Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature* 391, 892.
176. van den Berg, M.M.J., Krauskopf, J., Ramaekers, J.G., Kleinjans, J.C.S., Prickaerts, J., Briedé, J.J., 2020. Circulating microRNAs as potential biomarkers for psychiatric and neurodegenerative disorders. *Prog. Neurobiol.* 185, 101732. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2019.101732>
177. Wang, M., Liu, Xinyan, Hou, Y., Zhang, H., Kang, J., Wang, F., Zhao, Y., Chen, J., Liu, Xufeng, Wang, Y., Wu, S., 2019. Decrease of GSK-3 β Activity in the Anterior Cingulate Cortex of Shank3b^{-/-} Mice Contributes to Synaptic and Social Deficiency. *Front. Cell. Neurosci.* 13, 447.
178. Wang, S., Xu, J., Ye, R., Wang, J., Chen, Z., Huang, R., Peng, Q., Cai, Y.X. and X., 2014. Emerging Roles of microRNAs in Neural Stem Cells . *Curr. Stem Cell Res. Ther.* URL <https://www.eurekaselect.com/120399/article> (accessed 9.8.20).
179. Wang, Y., Lv, K., Chen, H., Zhao, M., Ji, G., Zhang, Y., Cao, H., Kan, G., Li, Y., Qu, L., 2018. Functional annotation of extensively and divergently expressed miRNAs in suprachiasmatic nucleus of Clock Δ 19 mutant mice. *Biosci. Rep.* 38, BSR20180233.
180. Wang, Y.Q., Huang, Y.H., Balakrishnan, S., Liu, L., Wang, Y.T., Nestler, E.J., Schlüter, O.M., Dong, Y., 2021. AMPA and NMDA Receptor Trafficking at Cocaine-Generated Synapses. *J. Neurosci.* 41, 1996–2011.

181. Wei, J., Liu, W., Yan, Z., 2010. Regulation of AMPA Receptor Trafficking and Function by Glycogen Synthase Kinase 3. *J. Biol. Chem.* 285, 26369–26376.
182. Whitlock, J.R., Heynen, A.J., Shuler, M.G., Bear, M.F., 2006. Learning Induces Long-Term Potentiation in the Hippocampus. *Science* 313, 1093–1097.
183. Wibrand, K., Panja, D., Tiron, A., Ofte, M.L., Skaftnesmo, K.-O., Lee, C.S., Pena, J.T.G., Tuschl, T., Bramham, C.R., 2010. Differential regulation of mature and precursor microRNA expression by NMDA and metabotropic glutamate receptor activation during LTP in the adult dentate gyrus in vivo. *Eur. J. Neurosci.* 31, 636–645.
184. Wierenga, C.J., Ibata, K., Turrigiano, G.G., 2005. Postsynaptic Expression of Homeostatic Plasticity at Neocortical Synapses. *J. Neurosci.* 25, 2895–2905.
185. Woodgett, J.R., 1990. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J.* 9, 2431–2438.
186. Xing, B., Li, Y.-C., Gao, W.-J., 2016. GSK3 β Hyperactivity during an Early Critical Period Impairs Prefrontal Synaptic Plasticity and Induces Lasting Deficits in Spine Morphology and Working Memory. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 41, 3003–3015.
187. Xiong, T., Qu, Y., Wang, H., Chen, H., Zhu, J., Zhao, F., Zou, R., Zhang, L., Mu, D., 2018. GSK-3 β /mTORC1 Couples Synaptogenesis and Axonal Repair to Reduce Hypoxia Ischemia-Mediated Brain Injury in Neonatal Rats. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 77, 383–394.
188. Xu, L.-Z., Xu, D.-F., Han, Y., Liu, L.-J., Sun, C.-Y., Deng, J.-H., Zhang, R.-X., Yuan, M., Zhang, S.-Z., Li, Z.-M., Xu, Y., Li, J.-S., Xie, S.-H., Li, S.-X., Zhang, H.-Y., Lu, L., 2017. BDNF-GSK-3 β - β -Catenin Pathway in the mPFC Is Involved in Antidepressant-Like Effects of *Morinda officinalis* Oligosaccharides in Rats. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 20, 83–93.
189. Yang, M., Li, Y., Padgett, R.W., 2005. MicroRNAs: Small regulators with a big impact. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16, 387–393.
190. Yang, S.D., 1986. Identification of the ATP.Mg-dependent protein phosphatase activator (FA) as a myelin basic protein kinase in the brain. *J. Biol. Chem.* 261, 11786–11791.
191. Yu, B., Zhou, S., Wang, Y., Qian, T., Ding, G., Ding, F., Gu, X., 2012. miR-221 and miR-222 promote Schwann cell proliferation and migration by targeting LASS2 after sciatic nerve injury. *J. Cell Sci.* 125, 2675–2683.

192. Yuste, R., Bonhoeffer, T., 2004. Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 24–34.
193. Zhu, L.-Q., Liu, D., Hu, J., Cheng, J., Wang, S.-H., Wang, Q., Wang, F., Chen, J.-G., Wang, J.-Z., 2010. GSK-3 β Inhibits Presynaptic Vesicle Exocytosis by Phosphorylating P/Q-Type Calcium Channel and Interrupting SNARE Complex Formation. *J. Neurosci.* 30, 3624–3633.
194. Zongaro, S., Hukema, R., D'Antoni, S., Davidovic, L., Barbry, P., Catania, M.V., Willemsen, R., Mari, B., Bardoni, B., 2013. The 3' UTR of FMR1 mRNA is a target of miR-101, miR-129-5p and miR-221: implications for the molecular pathology of FXTAS at the synapse. *Hum. Mol. Genet.* 22, 1971–1982.

9. Supplement

9.1. Dorobek naukowy doktorantki

9.1.1. Publikacje, w których zawarto wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie

Ewa Banach*, Aleksandra Szczepankiewicz, Leszek Kaczmarek, Tomasz Jaworski, Joanna Urban-Ciećko (2022), “Dysregulation of miRNAs levels in GSK3 β overexpressing mice and the role of miR-221-5p in synaptic function”, *Neuroscience* S0306-4522(22)00147-6; doi: 10.1016/j.neuroscience.2022.03.024.

Ewa Banach*, Tomasz Jaworski, Joanna Urban-Ciećko „Early synaptic deficits in GSK-3 β overexpressing mice” (*Neuroscience letters*, w recenzji).

9.1.2. Pozostałe publikacje

Monika Dmitrzak-Weglarz*, **Ewa Banach**, Karolina Bilaska, Beata Narozna, Aleksandra Szczepankiewicz, Edyta Reszka, Ewa Jablonska, Paweł Kapelski, Maria Skibinska, Joanna Pawlak (2021), „Molecular Regulation of the Melatonin Biosynthesis Pathway in Unipolar and Bipolar Depression”, *Frontiers in Pharmacology* 12:666541; doi: 10.3389/fphar.2021.666541.

Dawid Szczepankiewicz*, Piotr Celichowski, Paweł A Kołodziejcki, Ewa Pruszyńska-Oszmałek, Maciej Sassek, Przemysław Zakowicz, **Ewa Banach**, Wojciech Langwiński, Kosma Sakrajda, Joanna Nowakowska, Magdalena Socha, Ewelina Bukowska-Olech, Joanna Pawlak, Joanna Twarowska-Hauser, Leszek Nogowski, Janusz K Rybakowski, Aleksandra Szczepankiewicz* (2021), „Transcriptome Changes in Three Brain Regions during Chronic Lithium Administration in the Rat Models of Mania and Depression” *International Journal of Molecular Sciences* 22(3):1148; doi: 10.3390/ijms22031148.

Tomasz Jaworski*, **Ewa Banach-Kasper**, Katarzyna Gralec (2019), “GSK-3 β at the Intersection of Neuronal Plasticity and Neurodegeneration”, *Neural Plasticity* 2019:4209475; doi: 10.1155/2019/4209475.

Ewa Banach*, Joanna Pawlak, Pawel Kapelski, Aleksandra Szczepankiewicz, Aleksandra Rajewska-Rager, Maria Skibinska, Piotr Czerski, Joanna Twarowska-Hauser, Monika Dmitrzak-Węglarz (2018), „Clock genes polymorphisms in male bipolar patients with comorbid alcohol abuse”, *Journal of Affective Disorders* 241:142-146; doi: 10.1016/j.jad.2018.07.080.

Ewa Banach*, Aleksandra Szczepankiewicz, Anna Leszczyńska-Rodziewicz, Joanna Pawlak, Monika Dmitrzak-Węglarz, Dorota Zaremba, Joanna Twarowska-Hauser (2017), „Venlafaxine and sertraline does not affect the expression of genes regulating stress response in female MDD patients”, *Psychiatria Polska* 51(6):1029-1038; doi: 10.12740/PP/76329.

Ewa Banach*, Monika Dmitrzak-Węglarz, Joanna Pawlak, Pawel Kapelski, Aleksandra Szczepankiewicz, Aleksandra Rajewska-Rager, Agnieszka Slopian, Maria Skibinska, Piotr Czerski, Joanna Hauser (2017), „Dysregulation of miR-499, miR-708 and miR-1908 during a depression episode in bipolar disorders”, *Neuroscience Letters* (27) 654:117-119; doi: 10.1016/j.neulet.2017.06.019.

*Autor korespondencyjny