

## Streszczenie

Kinaza syntazy glikogenu-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) została odkryta w badaniach nad regulacją metabolizmu glikogenu. GSK-3 $\beta$  ulega ekspresji w różnych tkankach i jest zaangażowana w regulację aktywności wielu białek i szlaków metabolicznych. U transgenicznych myszy, ze zmutowaną, konstytutywnie aktywną formą GSK-3 $\beta$  w mózgu, następują zmiany takie jak zaburzenia pamięci i nadpobudliwość ruchowa. U dorosłych transgenicznych osobników zaobserwowano zmiany strukturalne, obejmujące zmniejszenie objętości mózgu oraz zwiększenie liczby długich kolców dendrytycznych (uważanych za niedojrzałe) w komórkach ziarnistych zakrętu zębatego hipokampa. Mechanizmy leżące u podstaw zaburzeń funkcjonowania synaps pod wpływem zwiększonej aktywności GSK-3 $\beta$  nie zostały dokładnie poznane.

W pierwszej części pracy skupiono się na badaniu wpływu wzmożonej aktywności tego enzymu na morfologię kolców dendrytycznych oraz na pobudzające przekazywanie synaptyczne w komórkach ziarnistych zakrętu zębatego hipokampa u młodych myszy transgenicznych GSK-3 $\beta$ [S9A]. Badania mikroskopowe wykazały, że wzmożona aktywność GSK-3 $\beta$  prowadzi do zwiększenia udziału kolców długich, ale całkowita gęstość kolców nie ulega zmianie. Wykorzystując technikę rejestracji elektrofizjologicznej z pojedynczych neuronów *in vitro* wykazano zmiany w pobudzającej transmisji synaptycznej, polegające na zwiększeniu długości interwałów między zdarzeniami miniaturowych pobudzających prądów postsynaptycznych (mEPSCs) oraz brak zmian w amplitudzie mEPSCs. Wyniki elektrofizjologiczne wskazywały na zmniejszenie liczby funkcjonalnych synaps, pomimo braku zmian w gęstości kolców dendrytycznych. W kolejnych doświadczeniach wykazano wzrost procentowy niefunkcjonalnych (milczących) synaps w komórkach ziarnistych zakrętu zębatego u myszy GSK-3 $\beta$ [S9A]. Powyższe wyniki sugerują, że wzrost aktywności GSK-3 $\beta$  zmniejsza stabilność receptorów AMPA w błonie lub/i hamuje dojrzewanie połączeń synaptycznych.

Drugim celem pracy było zbadanie czy zaburzona aktywność GSK-3 $\beta$  może wpływać na poziom ekspresji mikroRNA (miRNA) w neuronach. Dane literaturowe wskazują, że miRNA (krótkie niekodujące RNA), są istotne dla prawidłowego funkcjonowania ośrodkowego układu nerwowego. Wcześniejsze badania wykazały, że GSK-3 $\beta$  może

regulować poziom ekspresji miRNA w komórkach nowotworowych. W celu sprawdzenia, czy mechanizm taki zachodzi w komórkach nerwowych, zbadano zmiany w poziomie ekspresji miRNA w hipokampie myszy GSK-3 $\beta$ [S9A] wykorzystując technikę sekwencjonowania nowej generacji. Zaobserwowano różnice w poziomie ekspresji 24 dojrzałych oraz 71 prekursorowych miRNA. Walidacja za pomocą ilościowej reakcji łańcucha polimerazy potwierdziła, że miR-221-5p (miR-221\*) ma obniżony poziom ekspresji u transgenicznych myszy GSK-3 $\beta$ [S9A]. Wpływ miR-221\* na strukturę i funkcjonowanie synaps sprawdzono na pierwotnej hodowli komórek nerwowych hipokampa pochodzącej z myszy typu dzikiego, transfekowanej inhibitorem miR-221\*. Analiza mikroskopowa nie wykazała zmian w kształcie, ani w gęstości kolców dendrytycznych. Zaobserwowano zwiększoną amplitudę mEPSC, bez zmian w długości interwałów między zdarzeniami w rejestracjach elektrofizjologicznych *in vitro*. Uzyskane wyniki wskazują, że zmniejszenie ekspresji miR-221\* wzmacnia pobudzające przekazywanie synaptyczne w neuronach hipokampalnych.

Podsumowując, wzrost aktywności GSK-3 $\beta$  prowadzi do zmniejszenia puli funkcjonalnych synaps w komórkach ziarnistych zakrętu zębatego hipokampa u młodych myszy. Dodatkowo, aktywność GSK-3 $\beta$  może wpływać na poziom miRNA w neuronach. U transgenicznych myszy ze wzmożoną aktywnością GSK-3 $\beta$  wykazano obniżenie poziomu miR-221\*. Zahamowanie aktywności tego miRNA prowadzi do zmian w pobudzającym przekazywaniu synaptycznym. Zaobserwowane zmiany w morfologii i funkcjonowaniu synaps pod wpływem zwiększonej aktywności GSK-3 $\beta$  mogą być podłożem zaburzonej plastyczności synaptycznej.

## Abstract

Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) was discovered for its role in the regulation of glycogen metabolism. GSK-3 $\beta$  is observed in all tissues and it is involved in the regulation of the activity of multiple proteins and metabolic pathways. Studies on mouse models showed that GSK-3 $\beta$  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 $\beta$ [S9A] in the brain is characterized by behavioral changes such as memory deficits and hyperactivity. In adult transgenic 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. Mechanisms underlying abnormal activity of GSK-3 $\beta$  in synaptic function are not fully understood.

Here, we analyzed how constitutively active GSK-3 $\beta$  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 $\beta$  led to elongation of dendritic spines without changes of spine density. Next, using whole-cell patch-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 (or immature) excitatory synapses, where N-methyl-D-aspartate acid (NMDA) receptor is present with lack of functional  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor. We observed an increase in the fraction of silent synapse in GSK-3 $\beta$ [S9A] mice. These results suggest that increased activity of GSK-3 $\beta$  decreases the stability of AMPA receptors in postsynaptic compartment and/or inhibits synapse maturation.

The second aim of this study was to identify whether the abnormal activity of GSK-3 $\beta$  can regulate the expression level of microRNAs (miRNAs) in neurons. MiRNAs (small, non-coding RNAs), are key molecules for proper function of central nervous system. Previous studies showed that GSK-3 $\beta$  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 hippocampus of GSK-3 $\beta$ [S9A] mice 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 wild-type 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 $\beta$  leads to a reduction of functional synapses in hippocampal granular cells of young mice. Moreover, GSK-3 $\beta$  can regulate miRNA expression level in neurons. In GSK-3 $\beta$ [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. Structural and electrophysiological changes observed in GSK-3 $\beta$ [S9A] mice might in turn drive aberrant synaptic plasticity.