

Streszczenie

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

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

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

Słowa kluczowe: hipokamp / chromatyna / uczenie się i pamięć / zwierzęta transgeniczne / system CRISPR/Cas9 / system Cre/loxP

Abstract

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

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

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

Keywords: hippocampus / chromatin / learning and memory / transgenic animals / CRISPR/Cas9 system / Cre/loxP system