

STRESZCZENIE

Neurony są wysoce wyspecjalizowanymi komórkami układu nerwowego, które zbudowane są z trzech odrębnych morfologicznie oraz funkcjonalnie części: ciała komórki, które zawiera jądro komórkowe, długiej wypustki cytoplazmatycznej zwanej aksonem oraz wielu krótszych i rozgałęzionych wypustek - dendrytów. Złożona, drzewiasta struktura dendrytów neuronu umożliwia wytworzenie pomiędzy sąsiadującymi komórkami licznych punktów kontaktowych, zwanych synapsami. Synapsy zlokalizowane na dendrytach umożliwiają odbieranie informacji od sąsiadujących komórek, która następnie przekazywana jest wzdłuż aksonu do kolejnych neuronów lub komórek docelowych. Z tego względu prawidłowa struktura rozgałęzionego drzewa dendrytycznego jest kluczowa dla przekazywania informacji pomiędzy komórkami i utrzymania funkcjonalnych sieci neuronalnych. Nieprawidłowości w architekturze drzewa dendrytycznego są często związane z zaburzeniami neurologicznymi i psychiatrycznymi, takimi jak zespół Downa, padaczka, zaburzeniami ze spektrum autyzmu lub schizofrenii.

Większość mechanizmów zaangażowanych w morfogenezę drzewa dendrytycznego odkryto w badaniach *in vitro* prowadzonych przy użyciu hodowanych neuronów. Głównym ograniczeniem tej metody jest brak zewnętrznych sygnałów pochodzących z otaczającego środowiska w organizmie, które mogą mieć znaczący wpływ na rozwój drzewa dendrytycznego. Z tego powodu ważne jest badanie molekularnych podstaw organizacji dendrytów *in vivo*.

Białko Angiomotyna (Amot) wraz z blisko spokrewnionymi białkami Amot1 i Amot2 stanowią rodzinę białek rusztowania zwaną Angiomotyny, które regulują cytoszkielet aktynowy, adhezję komórkową i odgrywają ważną rolę w regulacji ścieżki sygnałowej Hippo. Funkcja Angiomotyn w ośrodkowym układzie nerwowym pozostaje słabo poznana. Ostatnie badania z wykorzystaniem metody *in vitro* wykazały, że Amot jest zlokalizowany na synapsach w dojrzałych neuronach hipokampalnych, gdzie reguluje organizację maszynerii postsynaptycznej. Dodatkowo, badania prowadzone przez naszą pracownię pokazały, że białko Amot reguluje morfogenezę drzewa dendrytycznego w hodowanych neuronach

hipokampalnych. Funkcja Amot w tym procesie zależy od interakcji z współ-aktywatorem transkrypcji zależnej od ścieżki Hippo, białkiem Yap1.

Głównym celem mojej rozprawy było zbadanie roli białek Amot i Amotl1 w organizacji mózgu i zachowaniu myszy. W celu zbadania roli białka Amot w ośrodkowym układzie nerwowym, wygenerowałam myszy z niedoborem białka Amot specyficznym w neuronach. Mając na uwadze ważną rolę interakcji białka Amot i Yap1 w morfogenezie hodowanych neuronów hipokampalnych, równocześnie prowadziłam badania z wykorzystaniem myszy pozbawionych ekspresji białka Yap1 w neuronach. Wyniki moich doświadczeń wykazały, że oba białka zlokalizowane są na synapsach neuronów piramidalnych hipokampa i komórek Purkiniego w mózdku. Myszy pozbawione białka Amot lub Yap1 w neuronach wykazywały nieprawidłową, zmniejszoną strukturę mózdzka, który charakteryzował się zredukowaniem grubości warstwy molekularnej kory mózdkowej. Warstwa molekularna wypełniona jest drzewami dendrytycznymi komórek Purkiniego. Analiza struktury pojedynczych komórek Purkinje pozbawionych ekspresji białka Amot lub Yap1 w mózgu myszy wykazała liczne nieprawidłowości morfologii drzew dendrytycznych w tych komórkach. Ponadto wykazałam, że myszy pozbawione białka Amot lub Yap1 prezentowały upośledzenie koordynacji ruchowej.

Kolejnym celem mojej pracy było zbadanie funkcji białka Amotl1 w organizacji i funkcji mózgu. W tym celu stworzyłam myszy z nokautem białka Amotl1. Moje eksperymenty histochemiczne i analiza mózgu w oparciu o rezonans magnetyczny (MRI) ujawniły wzrost objętości komór bocznych mózgu i kory mózgowej. Wykazałam, że myszy pozbawione ekspresji Amotl1 nie prezentują upośledzenia koordynacji ruchowej, natomiast charakteryzowały się innymi licznymi zaburzeniami behawioralnymi, takimi jak nadpobudliwość ruchowa, zmniejszony poziom lęku oraz upośledzenie zachowań społecznych. Zaobserwowałam także, że zaburzona ekspresja białka Amotl1 prowadzi do epizodów poruszania się w tył myszy oraz wzrostu częstotliwości kręcenia się wokół własnej osi. Wcześniejsze badania sugerują, że takie zachowania mogą być objawem halucynacji u gryzoni. Analiza spektroskopowa metabolitów mózgu wykazała zwiększony stosunek kwasu N-acetyloaspartyloglutaminowego (NAAG) do asparagianu N-acetylowego (NAA) i wyższy poziom glutaminy (Gln) w mózgu myszy z nokautem białka Amotl1. Zwiększona objętość komór bocznych mózgu, a także nieprawidłowy poziom metabolitów NAAG/NAA i Gln są rozpoznawane jako morfologiczne i molekularne cechy rozwoju schizofrenii zarówno u ludzi, jak i w mysich modelach tej choroby.

ABSTRACT

Neurons are highly specialized cells that consist of three morphologically and functionally distinct compartments: cell body that contains the nucleus, long axonal protrusion extending from the cell body, and multiple shorter projections called dendrites. The complex tree-like structure of dendritic arbors, that comprises thousands of contact points between cells termed synapses, allows for receiving information from other neurons, which can be further transmitted through axons to destination cells. Hence, the proper formation and maintenance of extensively branched dendritic tree and multiple synapses are crucial for assembly of functional neuronal network. Abnormalities in the dendritic tree architecture are often associated with numerous neurological and psychiatric disorders like Down's syndrome, epilepsy, Autism spectrum disorders, or Schizophrenia.

The majority of mechanisms involved in neuronal morphogenesis have been studied on cultured neuronal cells, which provide a relatively simple system to study major cellular processes. However, the main disadvantage of the *in vitro* methods, is the lack of the external cues that come from surrounding environment in living organism. Therefore, it is of great importance to investigate the underpinnings of dendrite organization and to search for novel molecular players involved in neuronal morphogenesis in *in vivo* studies.

The Angiotensin (Amot) protein together with the closely related Angiotensin-like 1 (Amotl1) and Angiotensin-like 2 (Amotl2) constitute a family of the Angiotensin scaffold proteins that regulate the actin cytoskeleton, adhesion, and play role in the Hippo signaling pathway. However, their function in the central nervous system is widely unknown. A recent *in vitro* study has demonstrated that Amot localizes to synaptic compartments in mature hippocampal neurons where it regulates the organization of the postsynaptic machinery. Our laboratory has identified Amot as a novel mediator of dendritic tree morphogenesis in cultured hippocampal neurons and we showed that its function depends on the interaction with the Hippo pathway transcriptional coactivator, Yap1.

The main objective of my research was to investigate the Angiotensins role in the brain organization and mouse behavior. I have focused my studies on two members of the Angiotensin family of proteins, Amot and Amotl1. To investigate the Amot function in the mouse brain I have generated mice with neuron-specific depletion of Amot protein. Additionally, as we have demonstrated that Yap1 interacts with Amot in cultured hippocampal

neurons and plays a critical role in dendritic morphogenesis, I have generated Yap1 neuronal knockout mice. My experiments revealed that both proteins localize to synaptic compartments in the hippocampal pyramidal neurons and cerebellar Purkinje cells *in vivo*. Importantly, Amot or Yap1 depletion led to a similar phenotype of abnormal cerebellar morphology in mice that showed decreased thickness of the molecular layer, but not the granular and Purkinje cell layers. The cerebellar molecular layer is filled with Purkinje cells dendritic trees. Therefore, I analyzed the structure of the individual Amot or Yap1-depleted Purkinje neurons in the brain and I found abnormalities in the development of dendritic tree arbors in these cells. Moreover, I have showed that Amot or Yap1-depleted mice exhibit impairments in locomotor coordination.

The second aim of my thesis was to unravel the potential function of Amotl1 protein in the organization and function of the mouse brain. Firstly, I have generated a novel Amotl1 knockout mouse line. My histochemical experiments and magnetic resonance imaging (MRI; conducted in collaboration with Small Animal Magnetic Resonance Imaging Laboratory, Mossakowski Medical Research Centre, Warsaw, Poland)-based analysis of Amotl1-depleted brains revealed a significant increase in the volume of lateral ventricles and cerebral cortex. Moreover, I have found that Amotl1 mutant mice do not show impairments in motor coordination. Instead, they exhibited hyperactivity, reduced anxiety, and alterations in their social behavior. Strikingly, I observed episodes of backward walking and increased circling behavior in these mice that have been previously described as potential symptoms of hallucinations in rodents. Lastly, the spectroscopic analysis of brain metabolites demonstrated increased ratio of N-Acetylaspartylglutamic acid (NAAG) to N-Acetyl Aspartate (NAA) and higher level of Glutamine (Gln) in the Amotl1 depleted brains. Increased volume of lateral ventricles together with the abnormal NAAG/NAA and Gln levels have been associated with schizophrenia both in humans and mouse models of the disease.