

Lena Majchrowicz

**Rola czynnika odpowiedzi na surowicę - SRF
oraz jego koaktywatorów - MKL1 i MKL2
w regulacji rozwoju neuronów**

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

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

PROMOTOR POMOCNICZY:
dr Ewa Liszewska

Warszawa, rok 2024

Składam serdeczne podziękowania:

***dr hab. Katarzynie Kalicie-Bykowskiej, profesor Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN**
za patronat naukowy, ogromne pokłady cierpliwości, nieocenioną pomoc, poświęcony czas,
wsparcie i zaufanie*

***dr Ewie Liszewskiej**
za pomoc w trakcie prowadzonych badań, poświęcony czas i cierpliwość*

***prof. dr hab. Leszkowi Kaczmarkowi**
za możliwość wykonania pracy doktorskiej w Pracowni Neurobiologii i za wsparcie
merytoryczne*

Koleżankom i Kolegom z Instytutu, z którymi miałam przyjemność współpracować

***Przyjaciółom, Rodzinie i Najbliższym** za wyrozumiałość, bezcenne wsparcie i wiarę w moje
możliwości, zwłaszcza w chwilach zwątpienia*

*Dziękuję Wam wszystkim za Waszą nieocenioną pomoc i wsparcie podczas powstawania
niniejszej pracy. Bez Was nie byłoby mi dane osiągnąć tego sukcesu.*

Praca finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych dr hab. Katarzynie Kalicie-Bykowskiej, prof. Instytutu Nenckiego, na podstawie decyzji numer:

- SONATA BIS, UMO- 2012/07/E/NZ3/01814 „Rola białka Serum Response Factor (SRF) w regulacji plastyczności homeostatycznej”
- OPUS, UMO- 2019/33/B/NZ4/01450 „Rola białek MKL w regulacji ekspresji genów, rozwoju synaps i chorób neurorozwojowych”



NARODOWE CENTRUM NAUKI

Spis treści

Streszczenie	6
Abstract	8
Spis skrótów	10
1. Wstęp	15
1.1. Budowa i funkcje neuronów	15
1.2. Budowa, rozwój i funkcje drzewa dendrytycznego	16
1.3. Rozwój budowa i funkcje kolców dendrytycznych	17
1.4. Budowa synaps. Plastyczność funkcjonalna i strukturalna kolców dendrytycznych	20
1.5. Choroby związane z zaburzeniami rozwoju drzewa dendrytycznego i kolców dendrytycznych	22
1.5.1. Zaburzenia ze spektrum autyzmu (ASD, ang. <i>Autism Spectrum Disorder</i>)	22
1.5.2. Zespół łamliwego chromosomu X (FXS, ang. <i>Fragile X Syndrome</i>)	22
1.5.3. Zespół Retta (RS, ang. <i>Rett Syndrome</i>)	23
1.5.4. Schizofrenia	23
1.5.5. Zaburzenia dwubiegunowe (ang. <i>Bipolar Disorder</i>)	23
1.6. Zależna od aktywności neuronalnej ekspresja genów: czynnik transkrypcyjny SRF	24
1.7. Koaktywatory z rodziny MKL: MKL1 i MKL2	26
1.8. Regulacja transkrypcji genów z udziałem koaktywatorów MKL	27
1.9. Potranskrypcyjna regulacji ekspresji genów z udziałem mikroRNA	29
1.10. Rola SRF w neuronach	29
1.11. Rola MKL w neuronach	30
1.12. Zmiany pojedynczych nukleotydów w genach kodujących białka MKL1 i MKL2 u ludzi	31
1.13. Modele używane do badania zaburzeń rozwoju i dojrzewania neuronów	33
1.13.1. Modele oparte na hodowlach pierwotnych neuronów myszy lub szczura	33
1.13.2. Wykorzystanie komórek macierzystych do badania zaburzeń rozwoju i dojrzewania neuronów	33
1.13.3. Metody pozyskiwania ludzkich neuronów	35
1.14. Modelowanie chorób neurologicznych z wykorzystaniem komórek pochodzących z iPSC	37
1.14.1. Zespół łamliwego chromosomu X	37
1.14.2. Autyzm i schizofrenia	37
1.14.3. Zespół Retta	38
2. Cele pracy	39
3. Materiały i metody	40
3.1. Materiały i ich pochodzenie	40
3.1.1. Odczynniki do hodowli komórkowych	40
3.1.2. Materiały do hodowli bakteryjnych	42
3.1.3. Wektory plazmidowe	42
3.1.4. Enzymy restrykcyjne	43
3.1.5. Odczynniki do pracy z białkami - metoda Western blotting	43
3.1.6. Odczynniki do pracy z DNA	44
3.1.7. Odczynniki stosowane do transfekcji komórek	44
3.1.8. Odczynniki do izolowania RNA i ilościowego pomiaru poziomu mRNA i mikroRNA metodą qRT-PCR	44
3.1.9. Odczynniki stosowane do pomiaru bioluminescencji	45
3.1.10. Odczynniki stosowane do wykrywania białek metodami immunofluorescencyjnymi	45
3.1.11. Przeciwciała	45

3.1.12.	Gotowe zestawy stosowane w technikach biologii molekularnej	46
3.1.13.	Zwierzęta doświadczalne	46
3.2.	Metody	47
3.2.1.	Mutagenеза ukierunkowana.....	47
3.2.2.	Konstrukcja wektorów lentiwirusowych kodujących shRNA.....	48
3.2.3.	Produkcja wektorów lentiwirusowych wykorzystanych w doświadczeniach	50
3.2.4.	Pierwotne hodowle neuronów	51
3.2.5.	Transfekcja neuronów w hodowli	53
3.2.6.	Transdukcja neuronów wektorami wirusowymi AAV.....	54
3.2.7.	Wyprowadzanie i hodowla ludzkich komórek iPSC.....	54
3.2.8.	Metoda formowania kul zarodkowych.....	55
3.2.9.	Analiza krótkich tandemowych powtórzeń (STR)	56
3.2.10.	Analiza integracji wirusa z genomem iPSC	56
3.2.11.	Różnicowanie komórek iPSC w neurony	57
3.2.12.	Metody wyciszania genu <i>Srf</i> w neuronach mysich i ludzkich.....	59
3.2.13.	Barwienia immunofluorescencyjne	60
3.2.14.	Pomiar aktywności transkrypcyjnej	60
3.2.15.	Izolacja RNA.....	61
3.2.16.	Odwrotna transkrypcja, ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-qPCR) oraz łańcuchowa reakcja polimerazy z odwrotną transkrypcją (RT-PCR).....	61
3.2.17.	Izolowanie białek i metoda Western blotting	63
3.2.18.	Analiza struktury oraz gęstości kolców dendrytycznych	64
3.2.19.	Analiza kształtu drzewa dendrytycznego	65
3.2.20.	Metody analizy statystycznej i opracowania wyników wykorzystane w pracy	66

4. Wyniki..... 68

4.1.	Charakterystyka dojrzewania mysich neuronów hipokampa w hodowli <i>in vitro</i> : analiza ekspresji wybranych genów synaptycznych.....	68
4.2.	Określenie czasu formowania się kolców dendrytycznych <i>in vitro</i>	69
4.3.	Inaktywacja genu <i>Srf</i> w neuronach mysich o genotypie SRF ^{fl/fl}	71
4.4.	Analiza wpływu delekcji genu <i>Srf</i> na plastyczność strukturalną kolców dendrytycznych	73
4.5.	Analiza ekspresji mikroRNA w mysich hodowlach <i>in vitro</i> z obniżonym poziomem SRF oraz walidacja uzyskanych wyników.....	75
4.6.	Wpływ nadekspresji mikroRNA miR-132-3p na liczbę i kształt kolców dendrytycznych w neuronach z obniżonym poziomem SRF	77
4.7.	Przebudowa drzewa dendrytycznego w odpowiedzi na wyciszenie SRF w hodowli neuronów <i>in vitro</i> ..	79
4.8.	Analiza lokalizacji, aktywności transkrypcyjnej oraz wpływu na budowę drzewa dendrytycznego białek MKL1 i MKL2 oraz ich wariantów	81
4.9.	Analiza pluripotencji wyprowadzonych indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC), ich zdolności do różnicowania w listki zarodkowe	94
4.10.	Analiza krótkich tandemowych powtórzeń (STR).....	96
4.11.	Analiza ekspresji transgenu pochodzącego z wirusa użytego do przeprogramowania oraz endogennych czynników pluripotencji w iPSC.....	97
4.12.	Rola SRF w powstawaniu i dojrzewaniu drzewa dendrytycznego w ludzkich neuronach	99

5. Dyskusja..... 105

5.1	Model badawczy: wyciszenie ekspresji SRF w hodowlach neuronów hipokampa myszy <i>in vitro</i>	105
5.2	Obniżenie poziomu SRF prowadzi do zaburzenia dojrzewania kolców dendrytycznych.....	106

5.3	Nadekspresja miRNA-132 w neuronach pozbawionych SRF nie wpływa na morfologię kolców dendrytycznych	107
5.4	SRF reguluje kształt drzewa dendrytycznego <i>in vitro</i>	108
5.5	Rola SRF w formowaniu i dojrzewaniu drzew dendrytycznych w ludzkich neuronach wyprowadzonych z iPSC... ..	110
5.6	SNP zidentyfikowane w ludzkich genach <i>MKL1</i> i <i>MKL2</i> wpływają na aktywność transkrypcyjną, lokalizację komórkową MKL oraz powodują zmiany w rozwoju drzewa dendrytycznego neuronów szczura	113
PODSUMOWANIE i WNIOSKI.....		116
BIBLIOGRAFIA		117
DOROBEK NAUKOWY DOKTORANTKI.....		142

Streszczenie

Czynnik odpowiedzi na surowicę (SRF, ang. *Serum Response Factor*) jest głównym czynnikiem transkrypcyjnym, który reguluje ekspresję genów w odpowiedzi na pobudzenie neuronalne w dorosłym mózgu. Białko SRF i jego koaktywatory - białka z rodziny MKL (białaczki megakarioblastycznej, ang. *megakaryoblastic leukemia*), są zaangażowane w regulację procesów związanych z wczesnym rozwojem komórek nerwowych. Badania przeprowadzone w ostatnich latach wskazują na związek między występowaniem zmian pojedynczych nukleotydów w genach kodujących koaktywatory MKL1 i MKL2 u ludzi, a zwiększonym ryzykiem wystąpienia chorób neurorozwojowych, takich jak schizofrenia czy zaburzenia ze spektrum autyzmu. Choroby te często wiążą się z nieprawidłowościami w procesie dojrzewania neuronów, jednak wpływ czynnika SRF oraz jego koaktywatorów MKL1 i MKL2 na powstawanie i dojrzewanie drzew dendrytycznych oraz kolców dendrytycznych w neuronach pozostaje wciąż słabo zbadany. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy wykazują, że usunięcie białka SRF na wczesnych etapach rozwoju postnatalnego mysich neuronów *in vitro* prowadzi do zmniejszenia liczby oraz całkowitej długości dendrytów, a także spadku złożoności drzewa dendrytycznego. Ponadto, w neuronach pozbawionych SRF zaobserwowano obniżoną gęstość kolców dendrytycznych oraz zwiększoną liczbę kolców niedojrzałych. Zbadano także wpływ zmiany pojedynczych nukleotydów w genach kodujących MKL1 i MKL2 na funkcję tych białek w neuronach *in vitro*. Przeanalizowano ich subkomórkową lokalizację, zdolność do aktywacji transkrypcji zależnej od SRF oraz wpływ na dojrzewanie drzewa dendrytycznego. Przeprowadzone doświadczenia pokazały, że nadprodukcja białka MKL1 lub MKL2 aktywuje transkrypcję zależną od SRF, indukowaną przez BDNF, oraz powoduje wzrost złożoności drzewa dendrytycznego *in vitro*. Ponadto, zidentyfikowano zmiany pojedynczych nukleotydów w MKL1 lub MKL2, które powodowały zaburzenia funkcji badanych koaktywatorów. W pracy zbadano również wpływ wyciszenia SRF na rozwój ludzkich komórek nerwowych wyprowadzonych z indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC), pochodzących z fibroblastów. Neurony powstające z neuralnych komórek macierzystych, w których wyciszono SRF z użyciem shRNA, wykazywały wzrost liczby dendrytów podstawnych, skutkujący wzrostem liczby rozgałęzień w porównaniu do komórek kontrolnych.

Podsumowując, obniżenie poziomu białka SRF oraz zamiany pojedynczych nukleotydów w domenach funkcjonalnych koaktywatorów MKL1 lub MKL2 prowadzi do

zaburzeń struktury neuronów podczas rozwoju *in vitro*. Podobne zmiany w budowie neuronów są często obserwowane w zwierzęcych modelach chorób neurorozwojowych.

Abstract

Serum Response Factor (SRF) is a key transcription factor that regulates gene expression in the adult brain in response to neuronal stimulation. Recent findings reveal the involvement of SRF and its MKL (*megakaryoblast leukemia*) family coactivators in prenatal neuronal cell development. Despite this knowledge, the role of SRF and MKL proteins in postnatal neuronal development remains poorly understood. Studies indicate a link between single nucleotide changes in genes encoding MKL1 and MKL2 coactivators and an elevated risk of neurodevelopmental diseases like schizophrenia and autism spectrum disorders in humans. These diseases are often associated with abnormalities in the process of neuronal maturation.

However, the influence of SRF and its coactivators MKL1 and MKL2 on the formation and maturation of dendritic trees and dendritic spines in neurons is still poorly studied. The results presented in this thesis show that deletion of the SRF protein during early postnatal development *in vitro* decreases the number and total length of dendrites and reduces dendritic tree complexity. Neurons lacking SRF also exhibit a lower density of dendritic spines and an increased number of immature spines.

Additionally, the study investigated the influence of single nucleotide changes in MKL1 and MKL2 genes, identified in humans, on their protein function in neurons *in vitro*. The subcellular localization of the proteins, their ability to activate SRF-dependent transcription, and their effect on dendritic tree maturation were analyzed. Results demonstrate that overexpression of MKL1 and MKL2 proteins, influenced by BDNF, alters their neuronal localization, activates SRF-dependent transcription, and increases the complexity of the dendritic tree *in vitro*. Moreover, we identified single nucleotide changes occurring in MKL1 or MKL2 that disrupted their function.

The study was extended with the analysis of the development of human neuronal cells obtained by differentiation from induced pluripotent stem cells (iPSCs) derived from fibroblasts. Neurons arising from neural stem cells where SRF was silenced using shRNA exhibited an increase in the number of basal dendrites, resulting in increased branching compared to control cells.

In conclusion, downregulation of the SRF protein and single nucleotide substitutions in the functional domains of MKL1 or MKL2 coactivators contribute to abnormalities in neuronal

structure during development *in vitro*. These morphological changes are often observed in animal models of neurodevelopmental diseases.

Spis skrótów

+Q	domena oddziałująca z SRF i bogata w glutaminę
AAV	(ang. <i>Adeno-Associated Viruses</i>) wirusy związane z adenowirusami
AAV-CaMKIIα-mCherry	adenowirus pod promotorem CaMKII α z reporterem mCherry
Acta	aktyna alfa, gen kodujący białka cytoszkieletu aktynowego
Actb	aktyna beta, gen kodujący białka cytoszkieletu aktynowego
Actc	(ang. <i>Actin Alpha Cardiac Muscle 1</i>) aktyna alfa mięśnia sercowego 1, gen kodujący białka cytoszkieletu aktynowego
Actg	aktyna gamma 1, gen kodujący białka cytoszkieletu aktynowego
ALK4, ALK5 i ALK7	receptory transformującego czynnika wzrostu beta typu I
AMPA	kwasy α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy
AMPA	receptor jonotropowy AMPA
ANOVA	(ang. <i>analysis of variance</i>) metoda statystyczna do analizy wariancji
Arc	(ang. <i>Activity Regulated Cytoskeleton Associated Protein</i>) gen odpowiedzi wczesnej
Ascl1	podstawowy czynnik transkrypcyjny typu helisa-pętla-helisa
ASD	(ang. <i>Autism Spectrum Disorder</i>) zaburzenia ze spektrum autyzmu
AUC	(ang. <i>Area Under Curve</i>) pole powierzchni pod krzywą
B1	domena podstawowa 1 wymagana do importu MKL do jądra
B2	domena podstawowa 2 wymagana do importu MKL do jądra
B27	komercyjnie dostępny składnik pożywki hodowlanej
BAM	koktajl czynników transkrypcyjnych istotnych dla rozwoju neuronów
BCA	metoda pomiaru białka z kwasem bis-cynchoninowym
BDNF	(ang. <i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i>) czynnik neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego
BMP	(ang. <i>Bone Morphogenetic Protein</i>) białka morfogenetyczne kości
Brn2	czynnik transkrypcyjny określający tożsamość neuronową
BSA	(ang. <i>Bovine Serum Albumin</i>) surowicza albumina wołowa
C57BL/6J	szczep myszy laboratoryjnych
CA1	rejon hipokampa
CA4	rejon hipokampa
CamKII	(ang. <i>Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II</i>) kinaza II zależna od jonów wapnia i kalmoduliny
CaMKIIα-CRE/CRE	plazmid kodujący Cre rekombinazę pod kontrolą promotora CaMKII α
CArG/SRE	sekwencja (CC(A/T) ₆ GG) bogata w nukleotydy adeninowe i tymidynowe
CBP	(ang. <i>CREB-binding protein</i>) białko wiążące CREB
cDNA	komplementarny DNA
c-fos	protoonkogen Fos, gen wczesnej odpowiedzi
c-myc	protoonkogen kodujący fosfoproteinę jądrową
CREB	(ang. <i>cAMP Response Element-Binding Protein</i>) białko wiążące element odpowiedzi na cAMP
CRM1	receptor eksportyny 1
CTGF	(ang. <i>Connective Tissue Growth Factor</i>) czynnik wzrostu tkanki łącznej
D	(ang. <i>day</i>) dzień

DAPI	4',6-diamidyno-2-fenylindol
DIV	(ang. <i>days in vitro</i>) dni w hodowli
DIXDC1	domena DIX zawierająca 1
DMD	(ang. <i>dimerization domain</i>) domena dimeryzacji
DMEM	(ang. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>) pożywka hodowlana
DMEM/F12	pożywka hodowlana
DMSO	dimetylosulfonotlenek
DNA	(ang. <i>deoxyribonucleic acid</i>) kwas deoksyrybonukleinowy
DNaza	deoksyrobonukleaza
DPBS	(ang. <i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>) buforowana fosforanem sól fizjologiczna bez soli wapnia i magnezu
DS	(ang. <i>Down syndrome</i>) zespół Downa
dsDNA	(ang. <i>double strain DNA</i>) dwuniciowe DNA
DSMZ	(niem. <i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</i>) Niemiecka Kolekcja Mikroorganizmów i Hodowli Komórkowych
E	(ang. <i>embryonic day</i>) dzień embrionalny
EDTA	(ang. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>) kwas wersenowy
EF1α-STEMCCA	plazmid użyty do produkcji lentiwirusa przeprogramującego dojrzałe komórki w iPSC
EGF	(ang. <i>Epidermal Growth Factor</i>) epidermalny/ naskórkowy czynnik wzrostu
Egr1	(ang. <i>Early Growth Response 1</i>) gen odpowiedzi wczesnej
Elk-1	białko z rodziny TCF, białko zawierające domenę ETS (wirusa ptasiej erytroblastozy E26)
ERK1/2	kinazy serynowo- treoninowe kierowane na prolinę, kinazy białkowe aktywowane mitogenami MAPK
Essential 6	komercyjnie dostępna pożywka hodowlana
Essential 8/ E8	komercyjnie dostępna pożywka hodowlana
FBS	(ang. fetal bovine serum) bydlęca surowica płodowa
FD	(ang. <i>FastDigest</i>) do szybkiego trawienia
FDR	współczynnik fałszywego wykrywania
FMR1	(ang. <i>Fragile X Messenger Ribonukleoprotein 1</i>) rybonukleoproteina łamliwego przekaźnika X 1
FMRP	(ang. <i>Fragile X Mental Retardation Protein</i>) regulator biosyntezy białek
FXS	(ang. <i>Fragile X Syndrome</i>) zespół łamliwego chromosomu X
GDB	bufor wykorzystywany do barwienia immunofluorescencyjnego
GFP	(ang. <i>green fluorescent protein</i>) białko zielonej fluorescencji
GluA1, GluA2	podjednostki receptora AMPA
GlutaMAX	komercyjnie dostępny składnik pożywki hodowlanej
GTG	(ang. <i>G-banding by trypsin with Giemsa</i>) technika wykorzystywana w badaniu cytogenetycznym do barwienia prążków G
GTPazy	enzymy hydrolazowe
GWAS	(ang. <i>Genome-Wide Association Studies</i>) badania asocjacyjne całego genomu
HBSS	(ang. <i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>) zbilansowany roztwór soli Hanks'a
HEK293T	linia ludzkich embrionalnych komórek nerki

HEPES	bufor stosowany do utrzymania fizjologicznego pH podłoża do hodowli komórkowych
Hoechst 33342	barwnik fluorescencyjny kwasu nukleinowego
HS	(ang. <i>Horse Serum</i>) surowica końska
IEG	(ang. <i>immediate early genes</i>) geny odpowiedzi wczesnej
IIMC<i>Bi</i>001-A/ELE10/3.4.	linia komórek macierzystych wyprowadzona z fibroblastów 10-cio letniej kobiety
IIMC<i>Bi</i>002-A/ELE30/3.2.	linia komórek macierzystych wyprowadzona z fibroblastów 30-sto letniej kobiety
iN	(ang. <i>iNeurons</i>) indukowane neurony
iPSC/ komórki iPS	(ang. <i>induced Pluripotent Stem Cells</i>) indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste
<i>junB</i>	gen wczesnej odpowiedzi
<i>KLF4</i>	gen pluripotencji, czynnik podobny do Krüppela 4
LB Broth	pożywka bogata w składniki odżywcze potrzebne do wzrostu i utrzymania czystych kultur rekombinowanego szczepu <i>E. coli</i>
LB Broth with agar	pożywka hodowlana stosowana do hodowli bakterii <i>E. coli</i>
LDN193189/Noggin	inhibitor ścieżki sygnałowej receptora BMP typu I
LPA	(ang. <i>lysophosphatic acid</i>) kwas lizofosfatydowy
LPS	(ang. <i>lipopolisaccharide</i>) lipopolisacharyd
LTD	(ang. <i>Long-Term Depression</i>) długotrwałe osłabienie synaptyczne
LTP	(ang. <i>Long-Term Potentiation</i>) długotrwałe wzmocnienie
LV- pLKO-shCTR	lentiwirus stosowany jako kontrola w procesie wyciszania SRF
LV- pLKO-shSRF	lentiwirus stosowany do wyciszania SRF w NSC
LZ	domena dimeryzacji
MADS	(ang. <i>Agamous, Deficiens, and SRF</i>) region odpowiedzialny za wiązanie białka do DNA
MAP-2	(ang. <i>microtubule-associated protein 2</i>) białko towarzyszące mikrotubulom 2
MECP2	białko wiążące metylo CpG 2
MEF	(ang. <i>Mouse Embryonic Fibroblasts</i>) mysie embrionalne fibroblasty
MEM NEAA	(ang. <i>MEM Non-Essential Amino Acids Solution</i>) mieszanina endogennych aminokwasów
MEM	(ang. <i>Minimum Essential Medium</i>)
mEPSC	(ang. <i>miniature</i>) miniaturowe pobudzające prądy postsynaptyczne
miRBase	baza danych mikro RNA
miRNA/miR	mikroRNA
MKL	(ang. <i>megakaryoblastic leukemia</i>) białaczka megakarioblastyczna
MKL1/MRTF-A/MAL/BSAC	(ang. <i>Megakaryoblastic leukemia 1</i>) białaczka megakarioblastyczna 1
MKL2/MRTF-B/MAL16	(ang. <i>Megakaryoblastic leukemia 2</i>) białaczka megakarioblastyczna 2
mRNA	matrycowe RNA
Myt1l	czynnik transkrypcji mieliny 1
N2	komercyjnie dostępny składnik żywności hodowlanej
N2B27	pożywka do różnicowania komórek macierzystych w neuralne komórki macierzyste
NCBI	(ang. <i>National Center for Biotechnology Information</i>) Narodowe Centrum Informacji Biotechnologicznej

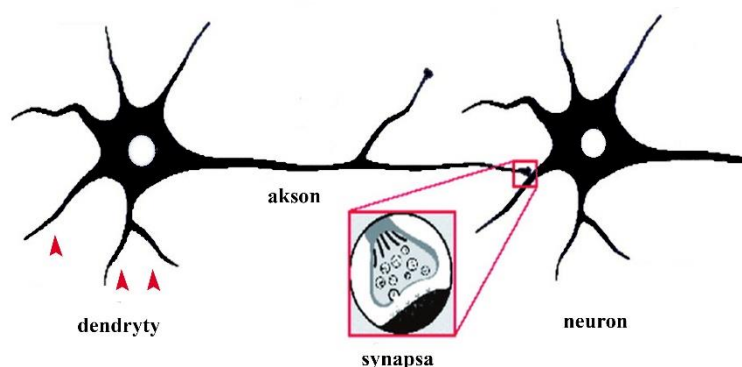
NES	pożywka do hodowli neuralnych komórek macierzystych
Neurobasal-A	pożywka do hodowli komórek neuronowych
NeuroD1	czynnik transkrypcyjny różnicowania neuronów 1
NGF	(ang. <i>Nerve Growth Factor</i>) czynnik wzrostu nerwów
Ngn2	neurogenina 2
NGS	(ang. <i>Normal Goat Serum</i>) surowica kozia
NLS	(ang. <i>Nuclear Localization Signals</i>) sygnał lokalizacji jądrowej
NMDA	kwask N-metylo-D-asparaginowy
NOS1AP	białko adaptera syntazy tlenu azotu 1
Npas4	czynnik transkrypcyjny neuronalnej domeny PAS 4, gen odpowiedzi wczesnej
NSC	(ang. <i>Neural Stem Cells</i>) neuralne komórki macierzyste
OCT4	czynnik transkrypcyjny wiązania oktameru 4
ONPG	(ang. <i>ortho-Nitrophenyl-β-galactoside</i>) orto-nitrofenylo-β-galaktozyd- substrat do wykrywania aktywności β-galaktozydazy
P	(ang. <i>postnatal day</i>) dzień postnatalny
p3xFLAG-MKL1/2	plazmid z nadekspresją MKL1
pAAV-CamKII-Cre	plazmid pod promotorem CaMKII zawierający wstawkę Cre
pAAV-CamKII-GFP	plazmid pod promotorem CaMKII zawierający GFP
PBS	(ang. <i>Phosphate Buffer Saline</i>) zbuforowany fosforanem roztwór soli fizjologicznej
pcDNA3.1	wektor ekspresyjny ssaków
PCR	(ang. <i>Polymerase Chain Reaction</i>) reakcja łańcuchowa polimerazy
PFA	paraformaldehyd
pH	skala kwasowości i zasadowości roztworów
pLKO.1 - TRC cloning vector	wektor do klonowania i ekspresji nowych sekwencji shRNA
pLKO.1 - TRC control	wektor kontrolny do klonowania
pMD2	plazmid do produkcji wektorów lentiwirusowych
pMD2.G	plazmid otoczki lentiwirusowej
pPAX	plazmid pakujący stosowany do produkcji lentiwirusów
PSD	(ang. <i>postsynaptic density</i>) gęstość postsynaptyczna
PSD-95	(ang. <i>postsynaptic density protein 95</i>) białko gęstości postsynaptycznej 95
psPAX2	plazmid pakujący do produkcji wektorów lentiwirusowych
pTRIP-PGK-GFP	plazmid użyty do wprowadzania GFP do ludzkich neuralnych komórek macierzystych
PVDF	polifluorek winylidenu
REF	(ang. <i>Rat Embryonic Fibroblasts</i>) szczurze embrionalne fibroblasty
RIPA	bufor do izolacji białek
RNA	(ang. <i>ribonucleic acid</i>) kwas rybonukleinowy
ROCK	kinaza białkowa zawierającej Rho
ROUT	metoda statystyczna
RPEL	miejsce wiązania G-aktyny
RS	(ang. <i>Rett Syndrome</i>) zespół Retta
RT-qPCR	ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym
S.O.C.	(ang. <i>Super Optimal Catabolite repression</i>) pożywka do hodowli bakterii bogata w składniki odżywcze, zawiera glukozę
SAM	(ang. <i>Sterile Alpha Motif</i>)

SAP	miejsce wiązania DNA i aktywacji genów
SAP-1	białko z rodziny TCF
SAP-2	białko z rodziny TCF
SB431542	inhibitor ścieżki sygnałowej TGFβ
SDS	siarczan dodecyłu sodu
SGCE	gen ε-sarkoglikanu
shCTR	nazwa lentiwirusa kodującego shCTR
shRNA	(ang. <i>short hairpin RNA</i>) krótkie RNA o strukturze spinki do włosów
shSRF	nazwa lentiwirusa kodującego shRNA
SMAD	białka o charakterze represorów lub aktywatorów, które są niezbędne do regulacji genów
SNP	(ang. <i>Single Nucleotide Polimorphism</i>) polimorfizm pojedynczego nukleotydu
SOX2	gen pluripotencji w komórkach iPS, region Y determinujący płeć
SRF	(ang. <i>Serum Response Factor</i>) czynnik odpowiedzi na surowicę
SRF^{flf}	szczep transgenicznymy myszy laboratoryjnych
SRF-MKL	kompleks SRF-MKL
SRM	pożywka do różnicowania komórek macierzystych w neuralne komórki macierzyste
STEMCCA	nazwa lentiwirusa użytego do przeprogramowywania ludzkich fibroblastów
STR	(ang. <i>Short Tandem Repeats</i>) krótkie tandemowe powtórzenia
SIFT	narzędzie oparte na homologii sekwencji, które pozwala przewidzieć, czy podstawienie aminokwasu wpłynie na funkcję białka
TAD	domena aktywacji transkrypcji
TBE	(ang. <i>Tris-Borate-EDTA</i>) bufor stosowany do elektorforezy agarozowej
TBST	bufor stosowany do wykrywania białek metodą Western blotting
TCF	(ang. <i>Ternary Complex Factor</i>) trójskładnikowy czynnik złożony
TEMED	N,N,N',N'- tetrametyloetylenodiamina
TIFF	format zapisu plików
TNFα	(ang. <i>Tumor Necrosis Factor α</i>) czynnik martwicy nowotworów
TPA	estry forbolu
TRIP-GFP	nazwa lentiwirusa użytego do wprowadzania GFP do NSC
U	(ang. <i>unit</i>) jednostka
UV	promieniowanie ultrafioletowe
Y-27632/ dihydrochloride	inhibitor kinazy białkowej zawierającej Rho
z-step	równomierne odstępki w osi Z
βFGF/FGF-2	(ang. <i>Basic Fibroblasts Growth Factor</i>) podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów

1. Wstęp

1.1. Budowa i funkcje neuronów

Przełom XIX i XX wieku przyniósł olbrzymi postęp w zrozumieniu etapów rozwoju i funkcji mózgu. Podstawą do badań nad budową komórek nerwowych było opracowanie metody barwienia neuronów przez włoskiego naukowca Camillo Golgiego (de Castro i in., 2007). Odkrycie to umożliwiło zobrazowanie pojedynczych komórek nerwowych i stało się podwaliną tzw. doktryny neuronowej stanowiącej, iż pojedyncze neurony stanowią strukturalną i funkcjonalną jednostkę organizacyjną ośrodkowego układu nerwowego (Bentivoglio i in., 2019; De Carlos i Borrell, 2007; Ghosh, 2020; Ramón y Cajal, 1933; Torres-Fernández, 2007). Wykorzystując pionierskie badania Golgiego, hiszpański naukowiec Santiago Ramón y Cajal udokumentował zaobserwowane cechy struktury układu nerwowego różnych struktur mózgu. Za powyższe odkrycia badacze zostali wyróżnieni Nagrodą Nobla w 1906 roku (De Carlos i Borrell, 2007; de Castro i in., 2007; Glickstein, 2006).



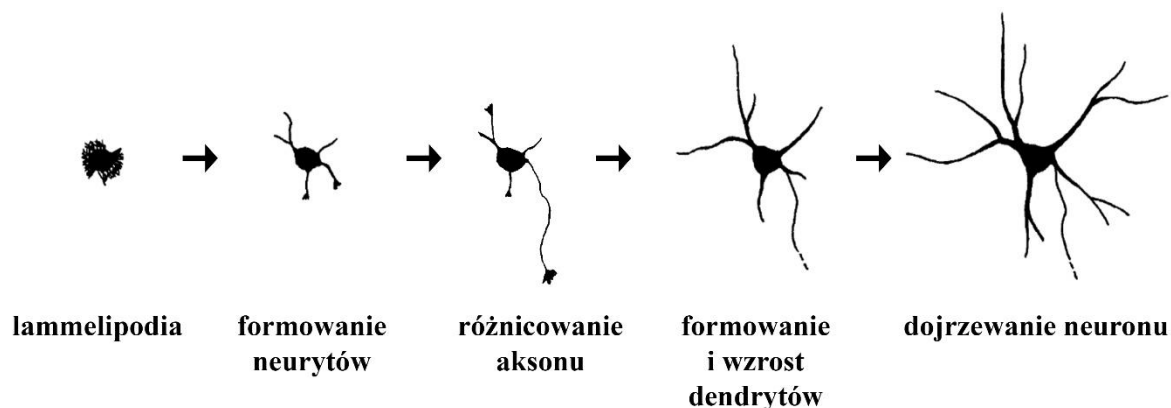
Rycina 1. Schemat budowy neuronu z synapsą chemiczną zaznaczoną w czerwonym kwadracie. Czerwonymi strzałkami zaznaczono dendryty. Rycina zmodyfikowana na podstawie artykułu Huang (A. Huang i in., 2017).

Neurony to elektrycznie pobudliwe komórki, które stanowią podstawową jednostkę strukturalną ośrodkowego układu nerwowego. Cechuje je ogromna różnorodność funkcji oraz kształtów (Peng i in., 2021). Odpowiadają one za odbieranie, przetwarzanie i przekazywanie informacji w odpowiedzi na bodźce (Biga i in., 2019). Neurony zbudowane są z ciała komórki (perikarionu), aksonu i dendrytów (Alberts i in., 2002). W ciele komórki znajduje się jądro komórkowe oraz inne organelle niezbędne do jej funkcjonowania. Z ciała odchodzi wiele rozgałęzionych wypustek zwanych dendrytami oraz jeden akson (Rycina 1). Dendryty odpowiadają za odbieranie, przetwarzanie sygnałów elektrochemicznych z otoczenia. Ich rozgałęzienia tworzą złożoną strukturę zwaną drzewem dendrytycznym. Na powierzchni dendrytów znajdują się błonowe wypustki – tzw. kolce dendrytyczne, na których tworzy się

większość synaps pobudzających w mózgu (Craig i Banker, 1994). Kolce dendrytyczne stanowią miejsce przekazywania sygnału w komórce nerwowej i odpowiadają za komunikację między neuronami. Z ciała neuronu odchodzi pojedyncza wypustka-akson, który odpowiada za przenoszenie sygnałów do innych komórek nerwowych poprzez zakończenia presynaptyczne. W zakończeniach aksonów znajdują się neuroprzekaźniki, których zależne od pobudzenia neuronu uwolnienie do szczeliny synaptycznej odpowiada za konwersję bodźca z impulsu elektrycznego na sygnał chemiczny (DeFelipe, 2015).

1.2. Budowa, rozwój i funkcje drzewa dendrytycznego

Rozgałęzienia dendrytów tworzą struktury zwane drzewami dendrytycznymi. Zapewniają one prawidłową komunikację w układzie nerwowym. Kształt drzewa dendrytycznego jest złożony i zależy od rodzaju komórki nerwowej. Zmiany w rozwoju i morfologii drzewa dendrytycznego leżą u podstaw prawidłowego funkcjonowania mózgu, a ich zaburzenia są przyczyną rozwoju wielu chorób neurologicznych (Kaufmann i Moser, 2000).



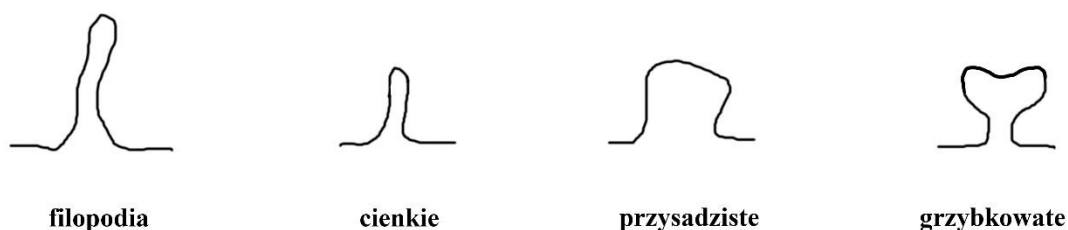
Rycina 2. Schemat rozwoju komórki nerwowej *in vitro* uwzględniający poszczególne etapy formowania się drzewa dendrytycznego. Rycina z pracy Banker (Banker, 2018)

Rozwój komórek nerwowych to złożony i dynamiczny proces obejmujący formowanie i rozgałęzianie się dendrytów, a także powstawanie kolców dendrytycznych (Rycina 2). Wyróżnia się pięć etapów kształtowania komórki nerwowej w hodowli *in vitro*. W pierwszym etapie tego procesu formowane są lammelipodia - bogate w aktynę, cienkie wypustki błony, znajdujące się na przedniej krawędzi komórki. Inicjują one migrację komórek (Ballestrem i in., 2000; Mitchison i Cramer, 1996). Następnie nowo powstałe wypustki łącząc się ze sobą tworzą neuryty (Innocenti, 2018). Jeden z powstałych neurytów ulega znacznemu wydłużeniu, a na jego końcu tworzy się dynamiczna struktura zwana stożkiem wzrostu. Taka wypustka da początek aksonowi. Z pozostałych neurytów formują się rozgałęziające się dendryty, na których

w kolejnych fazach rozwoju pojawiają się synapsy (Banker, 2018; Craig i Banker, 1994). Proces rozgałęziania się dendrytów wymaga zmian w strukturze aktyny i mikrotubul. Podczas destabilizacji filamentów aktynowych i rozciągania się filopodiów (na które oddziałują także mikrotubule) powstają dendryty (Jaworski i in., 2009; Kulkarni i Firestein, 2012a). W końcowym etapie procesu przekształcania neurytów w dendryty, pomiędzy komórkami zaczynają tworzyć się połączenia synaptyczne oraz dochodzi do stabilizacji drzewa dendrytycznego. Tworzenie i dojrzewanie drzewa dendrytycznego to proces długotrwały, któremu towarzyszy pojawianie się i zanikanie rozgałęzień (Banker, 2018; Craig i Banker, 1994). Kształt drzewa dendrytycznego oraz liczba rozgałęzień są bezpośrednio związane z liczbą sygnałów, które odbiera i przetwarza neuron (Kulkarni i Firestein, 2012). Na przykład aktywność receptora dla glutaminianu NMDA (N-metylo-D-asparaginowy) zwiększa tworzenie się rozgałęzień dendrytycznych, a tworzenie synaps aktywnie utrzymuje nowo powstałe rozgałęzienia (Cline, 2001). Architektura drzewa dendrytycznego może mieć istotny wpływ na funkcję neuronów takie jak ich zdolność do odbierania i integrowania sygnałów z innych komórek nerwowych (Cervantes i in., 2019).

1.3. Rozwój budowa i funkcje kolców dendrytycznych

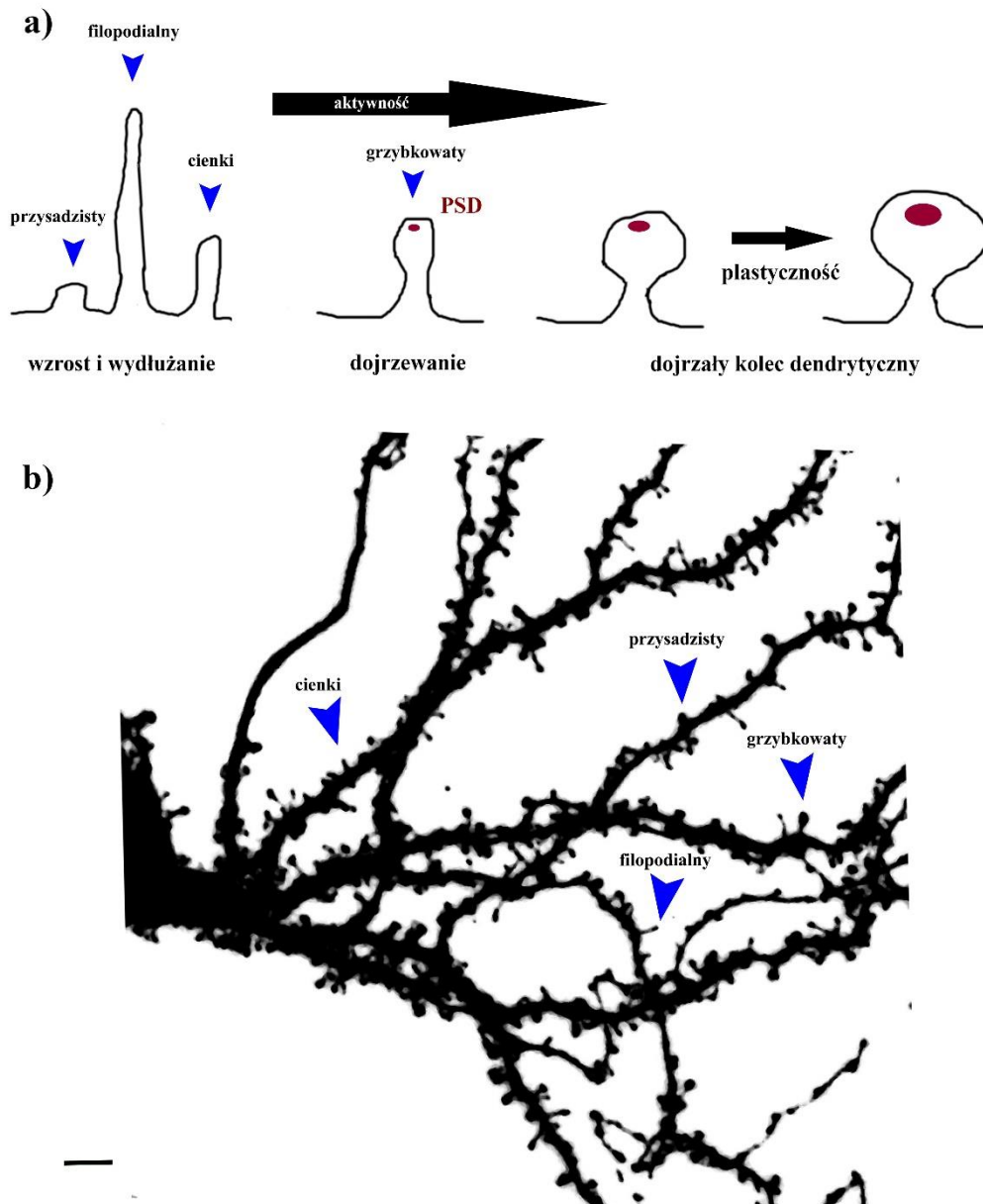
Większość synaps pobudzających w układzie nerwowym zlokalizowana jest na kolcach dendrytycznych. Kolce dendrytyczne to małe, dynamiczne, bogate w aktyne wypustki błonowe zlokalizowane na dendrytach neuronów w gęstości 1-10 kolców na jeden mikrometr długości dendrytu (u myszy) (Tada i Sheng, 2006). Kolce dendrytyczne zbudowane są z gęstych sieci białek cytoszkieletu i transbłonowych oraz licznych receptorów powierzchniowych. W kolcach dendrytycznych znajdują się wyspecjalizowane organelle niezbędne do prawidłowego funkcjonowania synaps takie jak mitochondria, rybosomy i siateczka śródplazmatyczna. Kształt kolców dendrytycznych zależy przede wszystkim od tworzącego je cytoszkieletu aktynowego (Noguchi i in., 2011), którego przebudowa regulowana jest m.in. przez aktywność GTPazy z rodziny białek Rho i Ras (Chidambaram i in., 2019). Aktywność neuronalna wpływa na dynamiczne zmiany kształtu i/lub liczby tych małych błonowych wypustek (Nakahata i Yasuda, 2018; Pchitskaya i Bezprozvanny, 2020). Co więcej uważa się, iż zmiany w budowie kolców dendrytycznych korelują z siłą działania synaps pobudzających, a ich kształt bezpośrednio odzwierciedla funkcję wypustek (Bellot i in., 2014). Wykazano, że zarówno czynniki zewnętrzne, jak i wewnętrzne, odpowiadają za powstawanie nowych kolców (Yuste i Bonhoeffer, 2001).



Rycina 3. Schemat przedstawiający kształty kolców dendrytycznych. Rycina na podstawie pracy Bonilla-Quintana i Rangamani (Bonilla-Quintana i Rangamani, 2022).

Kolce dendrytyczne zgodnie z ich kształtem i rozmiarem można zaklasyfikować do czterech kategorii: (i) filopodia (ang. *filopodia*) oraz kolce (ii) cienkie (ang. *thin spines*), (iii) przysadziste (ang. *stubby spines*) i (iv) grzybkowate (ang. *mushroom spines*) (Hering i Sheng, 2001; Peters i Kaiserman-Abramof, 1970; Runge i in., 2020). Filopodia to postać kolców dendrytycznych obecna w dużej liczbie we wczesnych etapach rozwoju. W mózgu dorosłych osobników stanowią one zaledwie 10 % wypustek (Harris, 1999; Harris i in., 1992). Filopodialne wypustki charakteryzują się obecnością długiej i cienkiej szyjki bez wyraźnie zarysowanej główki oraz brakiem białek przestrzeni postsynaptycznej (PSD, ang. *post synaptic density*) (Berry i Nedivi, 2017). Ten rodzaj kolców dendrytycznych cechuje największa dynamika, ponieważ w ciągu zaledwie 10 minut potrafią pojawić się i zniknąć (Ziv i Smith, 1996). Zgodnie z jedną z teorii uznaje się, że wypustki filopodialne są prekursorami dojrzałych kolców dendrytycznych (Harris, 1999; Ziv i Smith, 1996). Wypustki filopodialne potrafią również zanikać pozostawiając dendryty „gładkimi” (Wang i in., 2007). Następną kategorią kolców dendrytycznych są tzw. kolce cienkie. Posiadają one małą główkę, na której znajduje się niewiele receptorów. Są oddzielone od dendrytu przez cienką szyjkę. Częstotliwość występowania tego rodzaju kolców zmniejsza się wraz z wiekiem i pogorszeniem się funkcji poznawczych (Morrison i Baxter, 2012). Za najbardziej stabilną formą kolców dendrytycznych, uważa się kolce o grzybkowatym kształcie. Odznaczają się one dużą i wyraźnie wyodrębnioną głową oraz krótką szyjką. Kolce o tym kształcie uważa się za dojrzałe i w pełni funkcjonalne (Grutzendler i in., 2002). Główki kolców grzybkowatych zawierają komplet białek PSD oraz receptorów dla glutaminianu, dzięki temu są w stanie tworzyć funkcjonalną synapsę (Bourne i Harris, 2008; Zito i in., 2009). W korze mózgowej oraz hipokampie około 25% kolców ma kształt grzybkowaty (Harris i in., 1992; Peters i Kaiserman-Abramof, 1970). Kolejną grupą kolców dendrytycznych są kolce przysadziste. Charakteryzuje je brak wyróżniającej się szyjki oraz główki (Harris i in., 1992). Pomimo faktu, iż ich obecność została opisana w badaniach z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej uważa się, iż występują one stosunkowo rzadko.

W rzeczywistości kolce przysadziste są kolcami grzybkowatymi o bardzo krótkiej szyjce, którą ciężko zobrazować ze względu na ograniczoną rozdzielczość mikroskopów świetlnych (Tønnesen i in., 2014). Zarówno kolce dendrytyczne przysadziste, grzybkowate, jak i cienkie, są mniej dynamicznymi strukturami niż filopodia i mogą utrzymywać się nawet przez kilka dni (Holtmaat i in., 2005).



Rycina 4. Schemat rozwoju i dojrzewania kolców dendrytycznych. Niebieskimi strzałkami zaznaczono kategorie kształtów kolców dendrytycznych: przysadziste, filopodialne, cienkie i grzybkowate (a). Przykładowe zdjęcie z pierwotnej hodowli neuronów hipokampa wraz z kolcami dendrytycznymi. Skala: 10 μm (b). PSD - gęstość postsynaptyczna (ang. *postsynaptic density*).

1.4. Budowa synaps. Plastyczność funkcjonalna i strukturalna kolców dendrytycznych

Synapsy stanowią centralną oś komunikacji, przetwarzania i przechowywaniu informacji pomiędzy komórkami nerwowymi oraz odgrywają rolę w tworzeniu się pamięci (Bellot i in., 2014; Lynch, 2004; Mayford i in., 2012; Raine, 1999; Südhof i Malenka, 2008). Jednym z rodzajów synaps są synapsy chemiczne, zbudowane z części presynaptycznej i postsynaptycznej, które oddziela szczeliną synaptyczną. Powstają na styku zakończeń presynaptycznych aksonów z zakończeniami dendrytów. Przekazywanie sygnału pomiędzy neuronami polega na uwalnianiu neuroprzekaźników z pęcherzyków synaptycznych do szczeliny synaptycznej, które następnie łączą się z receptorami w części postsynaptycznej. Wyróżnia się dwa główne typy synaps: glutaminergiczne i GABA-ergiczne pełniące przeciwne role: odpowiednio pobudzającą i hamującą. Synapsy pobudzające w mózgu ssaków znajdują się głównie na kolcach dendrytycznych, natomiast hamujące powstają na trzonie dendrytu. Najpowszechniej obecnym neuroprzekaźnikiem jest glutaminian, który działa na receptory jonotropowe AMPA (α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy) i NMDA (kwas N-metylo-D-asparaginowy) znajdujące się na powierzchni kolców dendrytycznych. Na główkach kolców dendrytycznych obecne są również receptory metabotropowe dla glutaminianu (Hanse i in., 2013; Lissin i in., 1998). Glutaminian uwalniany jest z presynaptycznego zakończenia i oddziałuje na postsynaptyczne receptory AMPA i NMDA. Następnie dochodzi do otwarcia kanałów jonowych, napływu jonów Ca^{2+} oraz depolaryzacji neuronu (Sheng i Hoogenraad, 2007). W obrębie kolca dendrytycznego występuje grupa około 200 białek, które tworzą tak zwaną gęstość postsynaptyczną (PSD). Najliczniej występującym białkiem gęstości postsynaptycznej jest białko o gęstości postsynaptycznej-95. PSD-95 to główny regulator dojrzewania synaptycznego (Coley i Gao, 2018). PSD dynamicznie zmienia swoją strukturę i skład w odpowiedzi na aktywność synaptyczną (Sheng i Hoogenraad, 2007). W kolcu, poza zakotwiczonymi w błonie receptorami dla glutaminianu i kanałami jonowymi, znajdują się ponadto kinazy i fosfatazy, elementy cytoszkieletu, białka sterujące procesami egzocytozy i endocytozy oraz cząsteczki sygnałowe odpowiedzialne za przekazywanie sygnału w synapsach (Bell i in., 2016; Gipson i Olive, 2017; Lippman i Dunaevsky, 2005; Pchitskaya i Bezprozvanny, 2020; Sheng i Hoogenraad, 2007). Cechą charakterystyczną dojrzałych synaps pobudzających jest obecność receptorów powierzchniowych AMPA i NMDA oraz białek gęstości postsynaptycznej PSD-95 (Pchitskaya i Bezprozvanny, 2020). Synapsy hamujące (symetryczne) nie mają widocznego PSD (Sheng i Hoogenraad, 2007).

Zależne od aktywności komórki nerwowej dynamiczne zmiany liczby i siły połączeń synaptycznych stanowią podstawę plastyczności synaptycznej (Gipson i Olive, 2017; Mateos-Aparicio i Rodríguez-Moreno, 2019; von Bernhardi i in., 2017). Wyrazem plastyczności synaptycznej są zarówno zmiany funkcjonalne, jak i strukturalne kolców dendrytycznych (Malenka i Bear, 2004). Prawidłowa transmisja synaptyczna zależy od lokalizacji i rozmieszczenia specyficznych białek po obu stronach synapsy. Eksperymentalnym modelem plastyczności synaptycznej jest długotrwałe wzmocnienie (ang. *Long-Term Potentiation* - LTP) i długotrwałe osłabienie synaptyczne (ang. *Long-Term Depression* - LTD) (Bliss i Lomo, 1973). Jednym z rodzajów LTP jest LTP zależne od aktywacji receptorów NMDA. Do jego wywołania niezbędna jest aktywność receptorów NMDA, co powoduje napływ jonów wapnia do wnętrza komórki. Prowadzi to do aktywacji kinazy zależnej od wapnia i kalmoduliny (kinazy wapniowej II, CamKII, ang. *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*), wbudowania receptorów AMPA do części postsynaptycznej oraz wzrostu ilości receptorów AMPA z podjednostką GluR1 (Chater i Goda, 2014; Das i in., 2008). Indukcja LTP powoduje zwiększenie gęstości kolców dendrytycznych i średnicy ich główek (Bourne i Harris, 2008; Ultanir i in., 2007). Zjawisko długotrwałego wzmocnienia synaptycznego jest najczęściej badane w synapsach neuronów piramidowych hipokampa, w regionach CA1 oraz CA3 (P. Das i in., 2008). LTP może trwać kilka godzin, dni, a nawet miesiące (Abraham, 2003; Smolen i in., 2019). Długotrwałe osłabienie synaptyczne powstaje na synapsach między włóknami równoległymi i komórkami Purkiniego kory mózdzku (Hirano, 2013). W przypadku LTD aktywacja receptora NMDA jest słabsza, co powoduje usuwanie receptorów AMPA z części postsynaptycznej synapsy (Malenka i Bear, 2004; Malinow i Malenka, 2002). Osłabienie siły połączeń synaptycznych wywołane przez LTD skutkuje kurczeniem i zanikaniem kolców na dendrytach (Bourne i Harris, 2008; Fiala i in., 2002; Hirano, 2013).

Plastyczność strukturalna jest związana ze zmianą liczby i kształtu kolców dendrytycznych zarówno spontaniczną, jak i w odpowiedzi na stymulację (Holtmaat i in., 2005; Trachtenberg i in., 2002). Plastyczność strukturalna kolców dendrytycznych obserwowana jest także na poziomie molekularnym. Dotyczy ona przebudowy cytoszkieletu aktynowego, zmiany wielkości PSD czy liczby receptorów dla glutaminianu (Borczyk i in., 2019; Bosch i in., 2014; Meyer i in., 2014). Zarówno zmiany strukturalne kolców dendrytycznych, jak i funkcjonalne leżą u podstaw tworzenia śladów pamięci (Kasai i in., 2010; Sala i Segal, 2014).

1.5. Choroby związane z zaburzeniami rozwoju drzewa dendrytycznego i kolców dendrytycznych

Dendryty oraz kolce dendrytyczne są głównymi strukturami neuronalnymi otrzymującymi informacje od innych neuronów, zatem ich liczba i budowa to jedne z kluczowych czynników decydujących o integracji sygnałów docierających do komórki nerwowej (Martínez-Cerdeño, 2017). Nieprawidłowości w budowie neuronów często korelują z występowaniem chorób neurorozwojowych, neuropsychicznych i neurodegeneracyjnych (Herms i Dorostkar, 2016; Penzes i in., 2011; Urbanska i in., 2008). Zmiany w kształcie drzewa dendrytycznego i modyfikacje liczby oraz kształtu kolców dendrytycznych opisano między innymi w korze mózgowej i hipokampie ludzi chorych na schizofrenię (Broadbelt i in., 2002; Garey, 2010), zespół Downa (L. Becker i in., 1991; Elston, 2003), u osób z zespołem łamliwego chromosomu X (Rudelli i in., 1985), zespołem Retta (Armstrong i in., 1998) oraz w zaburzeniach ze spektrum autyzmu (Phillips i Pozzo-Miller, 2015) czy chorobą dwubiegunową (Kulkarni i Firestein, 2012).

1.5.1 Zaburzenia ze spektrum autyzmu (ASD, ang. *Autism Spectrum Disorder*)

ASD jest to zaburzenie neurorozwojowe o nie do końca poznanej etiologii, w którym obserwuje się deficyty w komunikacji, interakcjach społecznych oraz nasilenie zachowań powtarzalnych i obsesyjnych. U osób z diagnozą spektrum autyzmu zaobserwowano zmniejszenie liczby rozgałęzień dendrytów w polach CA1 i CA4 (Raymond i in., 1995) oraz spadek ich liczby w grzbietowo-bocznej korze przedczołowej (Mukaetova-Ladinska i in., 2004). Co ciekawe, zauważono zwiększenie gęstości kolców dendrytycznych w różnych regionach mózgu u pacjentów w porównaniu do populacji ogólnej (Hutsler i Zhang, 2010), co może być związane z zaburzonymi procesami powstawania i eliminacji kolców dendrytycznych podczas rozwoju. Zauważono, że zmiany w gęstości kolców dendrytycznych związane mogą być z występowaniem u pacjentów z ASD różnych chorób psychicznych (schizofrenia, depresja), czy z wiekiem pacjenta (Lu i Hsueh, 2022; Martínez-Cerdeño, 2017).

1.5.2 Zespół łamliwego chromosomu X (FXS, ang. *Fragile X Syndrome*)

Zespół łamliwego chromosomu X to neurorozwojowa choroba genetyczna, w której dochodzi do dynamicznej mutacji w genie *FMRI*, co prowadzi do zahamowania jego ekspresji i braku syntezy białka FMRP. FMRP jest regulatorem biosyntezy białek, w tym także reguluje ich lokalną syntezę w synapsie (Bleuzé i in., 2021; Krichevsky i Kosik, 2001; Okray i in., 2015). Do objawów choroby zaliczyć można niepełnosprawność intelektualną, autyzm

i nadpobudliwość (Saldarriaga i in., 2014). W mózgach osób chorych na FXS zauważono wzrost gęstości kolców dendrytycznych w końcowych odcinkach dendrytów wierzchołkowych i podstawnych, oraz zwiększoną częstotliwość występowania niedojrzałych, długich i cienkich kolców dendrytycznych (Bangash i in., 2011; Hinton i in., 1991; Huttenlocher, 1970; Kulkarni i Firestein, 2012; Penzes i in., 2011; Purpura, 1974; Thomas i in., 2012; Waung i in., 2008).

1.5.3 Zespół Retta (RS, ang. *Rett Syndrome*)

Zespół Retta to choroba genetyczna, w której dochodzi do mutacji genu *MECP2*, który jest regulatorem transkrypcji metylowanego DNA (Jones i in., 1998; Nan i in., 1998; Pejhan i Rastegar, 2021; Shah i Bird, 2017). U chorych obserwuje się między innymi utratę nabytych wcześniej umiejętności, stereotypie ruchowe oraz objawy przypominające autyzm takie jak utrata zainteresowania otoczeniem czy problemy z interakcjami społecznymi. Na poziomie morfologicznym zauważono zmniejszoną długość i liczbę rozgałęzień dendrytów (Armstrong i in., 1995) oraz redukcję gęstości i regionalną utratę kolców dendrytycznych w neuronach kory i hipokampa (Belichenko i in., 1994; Martínez-Cerdeño, 2017). Ponadto, mózgi osób chorych cierpiących na syndrom Retta mają zmniejszoną masę (Jellinger i Seitelberger, 1986).

1.5.4 Schizofrenia

Schizofrenia należy do chorób neurorozwojowych, mimo iż jest to zaburzenie najczęściej diagnozowane w okresie wczesnej młodości (Insel, 2010). U chorych na schizofrenię występują objawy pozytywne między innymi halucynacje i urojenia oraz objawy negatywne takie jak wycofanie społeczne. Na poziomie strukturalnym obserwuje się zmniejszoną objętość kory mózgu, bez utraty neuronów (Harvey i in., 1993; Kulkarni i Firestein, 2012; Suddath i in., 1989; Zipursky i in., 1992). W przebiegu schizofrenii obserwuje się również mniejszą złożoność drzewa dendrytycznego, zredukowaną liczbę dendrytów i synaps (Kolomeets i in., 2005; Kulkarni i Firestein, 2012) oraz spadek gęstości kolców dendrytycznych (Bellot i in., 2014; Garey, 2010; Penzes i in., 2011).

1.5.5 Zaburzenia dwubiegunowe (ang. *Bipolar Disorder*)

Zaburzenia dwubiegunowe także należą do grupy chorób neurorozwojowych, w których obserwuje się nieprawidłowości w budowie neuronów. Choroba ta charakteryzuje się gwałtownymi zmianami nastroju między manią, a depresją. U osób z chorobą dwubiegunową zaobserwować można zmniejszoną liczbę dendrytów oraz gęstość kolców w hipokampie

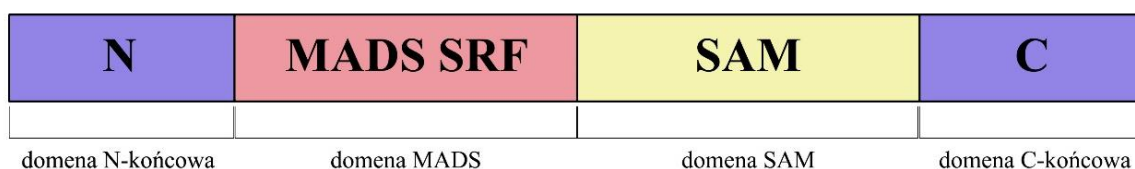
(Kulkarni i Firestein, 2012). Zmiany te mogą być powstrzymane działaniem leków przeciwdepresyjnych (Laifenfeld i in., 2002).

1.6. Zależna od aktywności neuronalnej ekspresja genów: czynnik transkrypcyjny SRF

Jednym z mechanizmów modulujących dojrzewanie neuronów jest, zależna od aktywności neuronalnej, regulacja ekspresji genów. Aktywacja programów transkrypcyjnych obejmuje regulację genów odpowiedzi wczesnej (IEG, ang. *immediate early genes*), które głównie kodują czynniki transkrypcyjne, a następnie poprzez geny docelowe wpływają na rozwój i tworzenie się połączeń neuronalnych (Pumo i in., 2022; Yap i Greenberg, 2018). U podstaw wielu chorób neurorozwojowych leży zaburzona regulacja ekspresji genów. Często jej przyczyną są mutacje prowadzące do utraty funkcji w genach kodujących czynniki transkrypcyjne lub ich koaktywatorach. Zaburzenia w regulacji ekspresji genów spowodowane mogą być również zmianami w elementach regulatorowych genów lub cząsteczkach RNA niekodujących białek (między innymi miRNA). Zatem, identyfikacja czynników transkrypcyjnych, które biorą udział w aktywacji genów plastyczności neuronalnej, jest kluczowa dla lepszego zrozumienia tego procesu. Badania nad regulacją transkrypcji jednego z genów odpowiedzi wczesnej *c-fos*, będącego markerem pobudzenia neuronalnego, doprowadziły do identyfikacji dwóch głównych czynników transkrypcyjnych takich jak CREB - białko wiążące element odpowiedzi na cAMP (ang. *cAMP Response Element-Binding Protein*) i SRF - czynnik odpowiedzi na surowicę (ang. *Serum Response Factor*) (Knöll i Nordheim, 2009; Olson i Nordheim, 2010; Posern i Treisman, 2006). Ponieważ białko CREB jest czynnikiem odgrywającym kluczową rolę w przeżywaniu neuronów, interpretacja wyników dotyczących jego roli w plastyczności neuronalnej jest utrudniona (del Blanco i in., 2019). W przeciwieństwie do dużej liczby badań przeprowadzonych nad białkiem CREB, mało wiadomo o roli SRF i genów od niego zależnych w rozwoju układu nerwowego i procesach plastyczności neuronalnej.

SRF zaangażowany jest w regulację wielu procesów zachodzących w komórce, takich jak wzrost i różnicowanie, a także rozwój mięśni szkieletowych (Li i in., 2005), czy regulacja funkcji neuronów (Miano, 2010). SRF to czynnik transkrypcyjny, który ulega ekspresji we wszystkich tkankach organizmu, m.in. w mózgu, mięśniach, naczyniach krwionośnych (Arsenian i in., 1998; Cooper i in., 2007; Knöll i in., 2006; Miano i in., 2004; Parlakian i in., 2005). Transkrypcja zależna od SRF może być aktywowana przez wiele różnych czynników,

takich jak surowica, czynniki wzrostowe, LPA (ang. *lysophosphatic acid*), LPS (ang. *lipopolisaccharide*), TPA (estry forbolu), cytokiny, TNF α , jak również poprzez podniesienie poziomu wewnątrzkomórkowego wapnia, czy zmiany w dynamice aktyny (Chai i Tarnawski, 2002). SRF wiąże się ze specyficzną sekwencją w DNA - CArG box (CC(A/T)₆GG, SRE), bogatą w nukleotydy adeninowe i tymidynowe (Messenguy i Dubois, 2003; Pařenicová i in., 2003). Elementy SRE (ang. *Serum Response Element*) są obecne zarówno w obszarach promotorowych genów, jak i w tzw. obszarach wzmacniających (ang. *enhancers*) (Li i in., 2013; Miano, 2003). SRF reguluje ekspresję wielu genów m. in genów odpowiedzi wczesnej (IEGs: *c-fos*, *egr1* czy *JunB*), regulatorów wzrostu (*Ctgf*, *Bdnf*, *Ngf*), genów kodujących białka cytoszkieletu aktynowego (*Actb*, *Actc*, *Actg*, *Acta*) oraz genów specyficznych dla komórek mięśniowych i nerwowych (Knöll, 2011; Kuzniewska i in., 2016; Nader i in., 2019).



Rycina 5. Schemat budowy białka SRF z zaznaczonymi domenami funkcjonalnymi. Opracowano na podstawie (Nam i in., 2004).

SRF należy do rodziny białek zawierających domenę MADS (ang. *Agamous*, *Deficiens*, *and SRF*; Rycina 5). Region ten jest odpowiedzialny za wiązanie białka do DNA oraz zawiera domenę dimeryzacji DMD (ang. *dimerization domain*) warunkującą tworzenie dimerów SRF (Chai i Tarnawski, 2002) (Rycina 5). Przed domeną MADS zlokalizowany jest fragment N-końcowy zawierający reszty serynowe, których fosforylacja może zwiększać wiązanie SRF do DNA (Molkentin i in., 1996). Ponadto, w domenie MADS, obecny jest również region lokalizacji jądrowej NLS (ang. *Nuclear Localization Signals*) (Gauthier-Rouvière i in., 1995). Kolejna, za domeną MADS, jest domena SAM (ang. *Sterile Alpha Motif*), która odpowiada za oddziaływanie białko-białko (Schultz i in., 1997). W rejonie C-końcowym białka SRF usytuowana jest domena aktywująca transkrypcję TAD (ang. *transactivation domain*). Gen *Srf* składa się z 7 eksonów (Chai i Tarnawski, 2002; Kemp i Metcalfe, 2000), a samo białko zbudowane jest 508 aminokwasów. W wyniku alternatywnego składania eksonów (ang. *splicing*) mogą powstawać krótsze izoformy białka SRF. Delecje w domenie aktywującej prowadzą do powstawania wariantów hamujących ekspresję genów aktywowanych przez produkt o pełnej długości (Szafron i in., 2009).

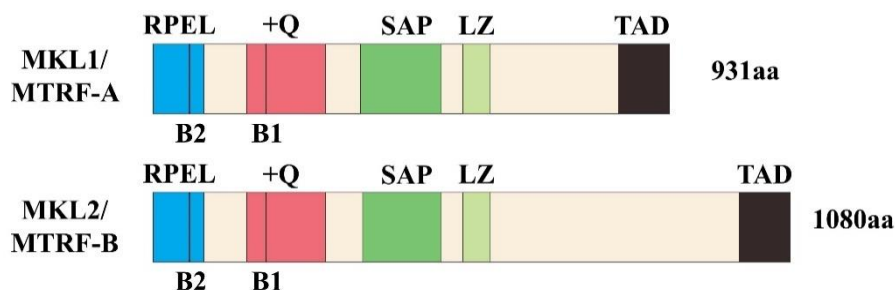
1.7. Koaktywatory z rodziny MKL: MKL1 i MKL2

Istnieją dwa główne mechanizmy aktywacji transkrypcji z udziałem czynnika SRF. Pierwszy opiera się na oddziaływaniu SRF z białkami z rodziny TCF (ang. *Ternary Complex Factor*, białka Elk-1, SAP-1 oraz SAP-2), drugi zaś z białkami z rodziny MKL (MRTF, ang. *Myocardin-Related Transcription Factor*; MKL, ang. *Megakaryoblastic Leukemia*, białka MAL/MKL1/MRTF-A/BSAC, MKL2/MRTF-B/MAL16 oraz miokardyna). Koaktywatory TCF aktywowane są przez kaskadę kinaz białkowych aktywowanych mitogenami po stymulacji surowicą i czynnikami wzrostu (Knöll, 2011). Natomiast aktywacja z udziałem MKL zależy od dynamiki aktyny lub fosforylacji koaktywatorów przez czynniki wzrostu (Ctgf, Bdnf) (Knöll, 2011; Panayiotou i in., 2016; Sidorenko i Vartiainen, 2019).

W mojej dysertacji skupiłam się na mechanizmie aktywacji transkrypcji zależnej od SRF z udziałem białek z rodziny MKL. Istnieją trzy homologiczne białka MKL: miokardyna, MKL1 i MKL2. Podczas gdy miokardyna ulega ekspresji głównie w komórkach mięśnia sercowego i komórkach mięśni gładkich, MKL1 oraz MKL2 występują w wielu organach, między innymi w mózgu i mięśniach szkieletowych (Huang i in., 2008, 2009; Sidorenko i Vartiainen, 2019a).

Ludzkie białko MKL1 składa się z 931 aminokwasów, a MKL2 z 1080 aminokwasów (Cen i in., 2003; Nakagawa i Kuzumaki, 2005; Ramos i in., 2014). Białka te, podobnie jak SRF, mają budowę domenową (Rycina 6). Składają się z domeny bogatej w glutaminę (+Q) niezbędnej do wiązania z czynnikiem transkrypcyjnym SRF, domeny aktywacji transkrypcji (TAD) ważnej dla regulowania aktywności SRF, oraz z wysoce konserwatywnej domeny (SAP) potrzebnej do aktywacji genów docelowych, przebudowy chromatyny i wiązania DNA (Cen i in., 2003, 2004; Sasazuki i in., 2002). Na N-końcu białek MKL znajdują się serie motywów RPEL. Są to miejsca konieczne do wiązania niespolimeryzowanej aktyny. Białka posiadające domenę RPEL mogą modyfikować kształt komórek i odgrywają ważną rolę w regulacji ekspresji genów zależnej od zmian w cytoszkielecie aktynowym (Favot i in., 2005; Miralles i in., 2003). Domena podstawowa 1 (B1) i 2 (B2) są wymagane do importu MKL do jądra. Usunięcie obydwu domen hamuje translokację jądrową białka. Z kolei usunięcie domeny aktywacji transkrypcji (TAD) na C-końcu prowadzi do zahamowania procesu transkrypcji (Miralles i in., 2003), natomiast usunięcie domeny N-końcowej w MKL1 zwiększa jego aktywność transkrypcyjną (Cen i in., 2003). MKL2 i MKL1 wykazują 42 % identyczność sekwencji z N-końcowymi domenami wiążącymi aktynę, domeną leucynową i domenami SAP.

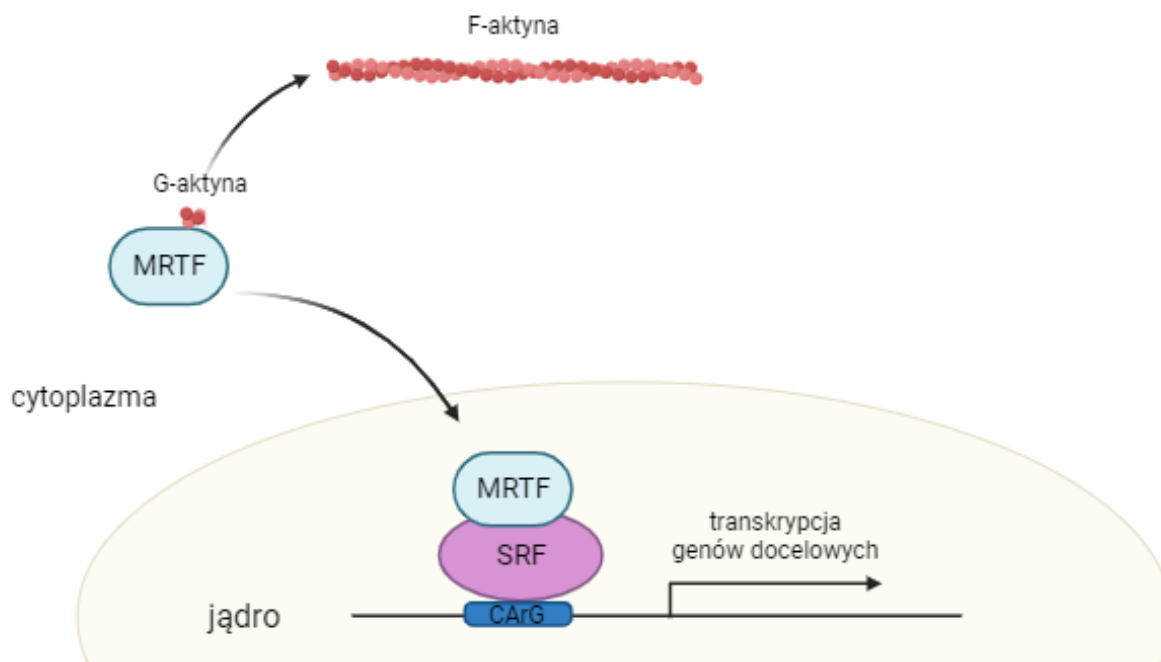
To oznacza, że te dwa białka mają pewne podobieństwo w swoich strukturach i mogą mieć podobne funkcje lub interakcje z tymi samymi białkami. Jednak różnice w sekwencji sugerują również, że mogą różnić się w niektórych aspektach swojej funkcji lub regulacji genowej



Rycina 6. Schemat budowy białek MKL1 i MKL2. RPEL- miejsce wiązania G-aktyny; B1, B2 - domena podstawowa wymagane do importu MKL1/MTRF-A do jądra; +Q - domena oddziałująca z SRF; SAP - miejsce wiązania DNA i aktywacji genów; LZ - domena leucynowa; TAD - domena transaktywacyjna. Opracowano na podstawie (Swärd i in., 2016).

1.8. Regulacja transkrypcji genów z udziałem koaktywatorów MKL

Regulacja transkrypcji z udziałem białek MKL1 i MKL2 zależy od aktywacji ścieżki przekazywania sygnału od receptorów transbłonowych związanych z białkami G, od zależnych od GTPaz białek z rodziny Rho oraz kinaz regulowanych sygnałem zewnątrzkomórkowym (Cen i in., 2004). Białko MKL1 zlokalizowane jest głównie w cytoplazmie, gdzie pozostaje związane z wolną aktyną (G-aktyną) (Olson i Nordheim, 2010). Włączenie G-aktyny do filamentu F-aktyny powoduje uwolnienie MKL i jego translokację z cytoplazmy do jądra komórkowego, dzięki uwolnieniu sekwencji NLS. W jądrze MKL oddziałując z czynnikiem transkrypcyjnym SRF prowadzi do aktywacji ekspresji genów docelowych (Rycina 7) (Kalita i in., 2012; Miralles i in., 2003; Olson i Nordheim, 2010; Posern i Treisman, 2006). Białka MKL nie wiążą się specyficznie z DNA, lecz oddziałują z hydrofobową kieszenią na powierzchni SRF (częścią domeny MADS). Utworzenie na DNA kompleksu MKL1/SRF jest zależne od zagięcia DNA przez SRF (Zaromytidou i in., 2006). Co ciekawe, MKL może także tworzyć kompleksy z jądrową G-aktyną. Wzrost poziomu jądrowej G-aktyny obniża transkrypcję za pośrednictwem MKL i stymuluje eksport białka do cytoplazmy (Olson i Nordheim, 2010b).



Rycina 7. Schemat regulacji transkrypcji genów z udziałem koaktywatorów MKL. Ekspresja genów zależna od czynnika transkrypcyjnego SRF regulowana jest przez oddziaływanie czynnika odpowiedzi na surowicę z koaktywatorami MKL. Translokacja białek MRTF z cytoplazmy do jądra powoduje powstanie kompleksu SRF-MKL1/2, co prowadzi do aktywacji transkrypcji genów docelowych. Opracowano na podstawie (Olson i Nordheim, 2010). Utworzona przy użyciu narzędzia do tworzenia figur BioRender.com.

Kompleks SRF/MKL reguluje ekspresję genów aktyny oraz genów odpowiedzi wczesnej (IEG), takich jak *cFos*, *Egr1*, *Npas4* i *Arc* (Kalita i in., 2012; Kuchler i in., b.d.; Olson i Nordheim, 2010; Posern i Treisman, 2006; Sidorenko i Vartiainen, 2019). Oprócz zmian w polimeryzacji aktyny aktywność MKL1 w neuronach może być regulowana również przez jego fosforylację. Wykazano, że czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego BDNF (ang. *brain derived neurotrophic factor*) indukuje zależną od kinaz ERK1/2 fosforylację MKL1, co prowadzi do aktywacji transkrypcji zależnej od SRF (Kalita i in., 2006, 2012). Co więcej, odpowiedź transkrypcyjna kompleksu SRF/MKL wywołana zmianami w dynamice aktyny może być indukowana nie tylko przez sygnały biochemiczne, ale także mechaniczne. Wykazano, że szlaki polimeryzacji aktyny są regulowane przez małe GTPazy i aktywowane w odpowiedzi na bodźce mechaniczne (Sidorenko i Vartiainen, 2019).

1.9. Potranskrypcyjna regulacji ekspresji genów z udziałem mikroRNA

Regulacja ekspresji genów może zachodzić na etapie potranskrypcyjnym, za pośrednictwem mikroRNA (miRNA). miRNA mogą wiązać się z docelowym mRNA powodując represję translacji lub degradację samego mRNA (Filip, 2007). Udział miRNA w regulacji ekspresji genów wykazano między innymi w procesie neurogenezy, różnicowania neuronów, w mechanizmach plastyczności synaptycznej oraz w regulacji szlaków neuroprzekaźników (Rogaev, 2005; Sempere i in., 2004; Wang i in., 2014). Najczęściej występujące miRNA w mózgu to miR-124, które jest regulatorem neurogenezy. Ekspresja miR-124 wzrasta wraz z rozpoczęciem procesu różnicowania neuronów, a najwyższy poziom uzyskuje w dojrzałych komórkach nerwowych (Krichevsky i in., 2006; Makeyev i in., 2007). Do dobrze poznanych regulatorów wzrostu neurytów należy również miR-132/miR-212, który moduluje kształt drzewa dendrytycznego niedojrzałych neuronów kory i hipokampa (Vo i in., 2005; Wayman i in., 2008). Dane uzyskane z analiz bioinformatycznych pokazują, że ponad 40 miRNA w swoim regionie promotorowym zawiera sekwencje docelowe dla SRF, co sugeruje, że SRF może regulować te miRNA (Zhang i in., 2011). Wykazano, że czynnik odpowiedzi na surowicę reguluje także ekspresję miRNA kluczowych dla przebiegu kardiogenezy i kontroli przerostu mięśnia sercowego: miR-1 i miR-133 (Tritsch i in., 2009).

1.10. Rola SRF w neuronach

Pierwsze zwierzęta pozbawione genu *Srf* otrzymano w 1998 roku (Arsenian i in., 1998). Myszy transgeniczne rozwijały się prawidłowo do dnia E8.5 (E – ang. *embryonic*), po czym umierały na skutek problemów z tworzeniem mezodermy (Arsenian i in., 1998). Dopiero stworzenie nowego modelu zwierząt, z warunkową delecją genu *Srf*, ograniczoną tylko do neuronów, umożliwiło podjęcie badań nad rolą i mechanizmem jego działania w mózgu (Knöll i Nordheim, 2009b). Usunięcie *Srf* w późnym okresie rozwoju prenatalnego skutkuje ciężkimi zaburzeniami neurologicznymi takimi jak ataksja, wodogłowie oraz utrata masy ciała, co prowadzi do śmierci zwierząt około dnia 21 po urodzeniu (Alberti i in., 2005; Knöll i in., 2006). Używając powyższego modelu pokazano, że SRF kontroluje migrację neuronów, wzrost neurytów, oraz tworzenie projekcji włókien mszystych podczas rozwoju mózgu (Knöll i Nordheim, 2009; Scandaglia i in., 2015). Ponadto, wczesna postnatalna inaktywacja *Srf* prowadzi do zaburzeń w długotrwałym wzmocnieniu synaptycznym - LTP (Ramanan i in., 2005) i długotrwałym osłabieniu synaptycznym - LTD (Etkin i in., 2006).

Usunięcie SRF w neuronach przodomózgowia u dorosłych osobników wzmacnia proces epileptogenezy w mysich modelach epilepsji (Kuzniewska i in., 2016; Lösing i in., 2017), zaburza odpowiedź na stres (Zimprich i in., 2017) oraz powoduje zmiany w tworzeniu pamięci bezpośredniej (Etkin i in., 2006; Nader i in., 2019). Ponadto delecja *Srf* w neuronach prowadzi do nadpobudliwości u zwierząt (Parkitna i in., 2010), zaburzeń interakcji społecznych (Roszkowska i in., 2022) oraz zwiększonej śmiertelności w wyniku pourazowego uszkodzenia mózgu (Förstner i Knöll, 2020). Najnowsze badania wykazały również udział SRF w regulacji plastyczności strukturalnej u dorosłych zwierząt, poprzez wpływ na kształt kolców dendrytycznych *in vivo*, ale nie na ich liczbę (Nader i in., 2019). Usunięcie SRF w mysich neuronach hipokampa na wczesnych etapach rozwoju *in vitro* ma wpływ na budowę i funkcję neuronów. Opublikowane przez naszą grupę badania, które są częścią tej dysertacji, pokazują, że brak SRF prowadzi do zwiększenia liczby niedojrzałych kolców dendrytycznych, które są postsynaptyczną częścią synaps pobudzających w mózgu. Ponadto, obserwuje się zmniejszenie liczby funkcjonalnych synaps oraz obniżenie ekspresji podjednostek AMPAR GluA1 i GluA2 (Roszkowska i in., 2022). Poza tym, SRF jest głównym czynnikiem transkrypcyjnym w mózgu odpowiedzialnym za zależną od aktywności neuronalnej ekspresję genów, które odgrywają znaczące role w procesach plastyczności neuronalnej (Esnault i in., 2014; Knöll i Nordheim, 2009; Kuzniewska i in., 2016; Lösing i in., 2017; Parkitna i in., 2010; Roszkowska i in., 2022).

1.11. Rola MKL w neuronach

Białka MKL1 i MKL2 ulegają ekspresji w mózgu, a ich poziom zmienia się w trakcie rozwoju (Tabuchi i Ihara, 2021). Najwyższy poziom białka MKL1 i MKL2 zaobserwowano w hipokampie i korze mózgowej, a MKL2 obecne jest także w prążkowie (Shiota i in., 2006; Tabuchi i Ihara, 2021). Na poziomie komórkowym oba białka zlokalizowane są w ciele komórki i dendrytach, zaś ich obecność potwierdzono również w kolcach dendrytycznych (Kaneda i in., 2018).

Myszy pozbawione ekspresji MKL1 mają defekty w różnicowaniu komórek epitelialnych sutka, ale poza tym nie wykazują widocznych deficytów (Sun i in., 2006). Podczas, gdy myszy pozbawione globalnej ekspresji białka MKL2, podobnie jak myszy pozbawione SRF umierają w okresie prenatalnym ok. E13,5 – E14,5 (Li i in., 2005; Oh i in., 2005). Dopiero stworzenie modelu podwójnego indukowalnego *knock-out* genów *MKL1* i *MKL2* w komórkach GFAP-pozytywnych pozwoliło pokazać, że podobnie jak w przypadku SRF, brak ekspresji aktywatorów powoduje zmniejszoną ekspresję genów docelowych,

zaburzoną migrację neuronów, nieprawidłowy wzrost neurytów, skutkujące śmiertelnością myszy między 16 a 21 dniem rozwoju po urodzeniu (Mokalled i in., 2010). Ponadto zaobserwowano zmniejszony poziom i aktywność aktyny oraz białek z nią związanych: gelsoliny i kofiliny. Co ciekawe, występowanie pojedynczego allelu MKL2 jest wystarczające do wspierania normalnego rozwoju mózgu *in vivo*. Zmiany w kształcie drzewa dendrytycznego, polegające na zmniejszeniu jego złożoności, obserwowano także w neuronach, w których usunięto lub zablokowano funkcję MKL1 lub MKL2 *in vitro* (Ishikawa i in., 2010; Knöll i in., 2006; O'Sullivan i in., 2010; Shiota i in., 2006). Wykazano także, że oba koaktywatory MKL są zaangażowane w dojrzewanie kolców dendrytycznych *in vitro* (Kalita et al., 2012; Kaneda et al., 2018).

1.12. Zmiany pojedynczych nukleotydów w genach kodujących białka MKL1 i MKL2 u ludzi

Zaburzenia w ekspresji genów podczas rozwoju mózgu mogą wpływać na liczbę i budowę synaps oraz siłę transmisji synaptycznej. Zmiany takie są wspólną cechą różnych chorób neurorozwojowych. Badania asocjacyjne całego genomu (GWAS, ang. *Genome-Wide Association Studies*) oraz badania genetyczne pokazują rosnącą liczbę zidentyfikowanych polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP, ang. *Single Nucleotide Polimorphism*) powiązanych z występowaniem chorób takich jak zaburzenia ze spektrum autyzmu (Golovina i in., 2021) i schizofrenia (Li i in., 2017; Ripke i in., 2014). Polimorfizmy pojedynczych nukleotydów, mogą być zlokalizowane we fragmencie kodującym genu, w miejscach wiążących czynnik transkrypcyjny lub w ich pobliżu, wpływając na ekspresję genów poprzez zmianę właściwości wiązania czynników transkrypcyjnych do DNA, tak jak to zostało pokazane w przypadku miejsc wiązania czynnika SRF (Miano i in., 2007).

Analiza wielkoskalowych badań na kohortach osób chorych na schizofrenię zidentyfikowała miejsce na chromosomie 22q13.1 związane z ryzykiem wystąpienia tej choroby. Pokazano, że aż siedem SNP w genie MKL1 miało związek ze zwiększonym ryzykiem pojawienia się zaburzeń psychicznych (Luo i in., 2015). W tym wypadku, zmiany w sekwencji zostały znalezione w intronie, a nie w regionie kodującym genu MKL1/MRTFA (Luo i in., 2015). W rejonie DNA kodującym białko MKL1 wykryto także substytucje, które mogą prowadzić do zmiany lub utraty funkcji białka, które także były związane ze zwiększonym ryzykiem schizofrenii (Neale i in., 2012).

Wykazano ponadto asocjację zmian pojedynczego nukleotydu w genie *MKL2* z zaburzeniami ze spektrum autyzmu (ASD, ang. *Autism Spectrum Disorder*) (Holt i in., 2010) oraz mutację, która spowodowała substytucję aminokwasową u pacjenta z ASD (Neale i in., 2012). Ponadto zmiany w rejonie kodującym białko wykryto u pacjentów ze schizofrenią (McCarthy i in., 2014) oraz w grupie osób z autyzmem (Zhou i in., 2022). Co więcej, mutacja typu zmiany sensu w genie *MKL2* została znaleziona w rodzinie niemowląt z mikrocefalią oraz z niepełnym rozwojem mózgu (Ramos i in., 2014).

Jeśli polimorfizmy zlokalizowane są w ewolucyjnie konserwowanych domenach białek MKL mogą istotnie wpływać na ich funkcje (Asparuhova i in., 2011; Cen i in., 2003; Miralles i in., 2003; Selvaraj i Prywes, 2003). W Tabeli 1 przedstawiono warianty zidentyfikowane w regionie kodującym białka MKL1 i MKL2, które mogą potencjalnie zmieniać funkcję obu koaktywatorów SRF (wynik na podstawie przewidywań z użyciem narzędzia SIFT) (Sim i in., 2012; Vaser i in., 2016). W przedstawionej rozprawie zbadano wpływ polimorfizmu pojedynczych nukleotydów zidentyfikowanych w rejonach kodujących genów *MKL1/2* na ich funkcje oraz wpływ na rozwój neuronów.

SNP w MKL1		choroba	
rs780048257	P2L	schizofrenia	(Purcell i in., 2014; Sebat i in., 2009)
rs769458301	R31H	schizofrenia	(Purcell i in., 2014; Sebat i in., 2009)
rs760762238	P244L	schizofrenia	(Purcell i in., 2014; Sebat i in., 2009)
rs142647978	P344L	schizofrenia	(Purcell i in., 2014; Sebat i in., 2009)
rs201308820	D522N	schizofrenia	(Purcell i in., 2014; Sebat i in., 2009)

SNP w MKL2		choroba	
rs75963814	H288Q	mikrocefalia	(Sebat i in., 2009)
rs372293193	R299W	ASD	(Neale i in., 2012)
rs753178172	Q313L	schizofrenia	(Purcell i in., 2014; Sebat i in., 2009)
rs201311229	C647R	schizofrenia	(Purcell i in., 2014; Sebat i in., 2009)
rs138570159	D1043E	schizofrenia	(Purcell i in., 2014; Sebat i in., 2009)

Tabela 1. Lista SNP związanych z chorobami neurorozwojowymi, zidentyfikowanych w obszarach kodujących ludzkich genów *MKL1* i *MKL2*.

1.13. Modele używane do badania zaburzeń rozwoju i dojrzewania neuronów

1.13.1 Modele oparte na hodowlach pierwotnych neuronów myszy lub szczura

Pierwotne hodowle neuronów z hipokampa lub kory mózgu gryzoni są jednym z modeli szeroko stosowanych we współczesnej neurobiologii. Neurony w hodowli *in vitro* są dobrze scharakteryzowanym układem doświadczalnym. Znany jest dokładnie czas, kiedy kształtują się neurony, powstaje drzewo dendrytyczne i kolce dendrytyczne. Pozwala to na manipulacje genetyczne na konkretnych etapach rozwoju hodowli, co umożliwia dokładne zbadanie wpływu badanego czynnika na rozwój drzewa dendrytycznego lub synaps. Neurony w warunkach *in vitro* osiągają dojrzałość strukturalną i elektrofizjologiczną w ciągu 2-3 tygodni. Mają wyraźnie widoczne aksony, dendryty i kolce dendrytyczne (Papa i in., 1995). Hodowle prowadzone w warunkach *in vitro* są także doskonałym narzędziem do wstępnej analizy wpływu określonych substancji na komórki ze względu na możliwość ścisłego kontrolowania warunków doświadczalnych (Stasiak i Sznitowska, 2010).

1.13.2 Wykorzystanie komórek macierzystych do badania zaburzeń rozwoju i dojrzewania neuronów

Badanie procesu rozwoju czy dojrzewania neuronów jest kluczowe dla pełnego zrozumienia molekularnych podstaw zaburzeń neurologicznych, takich jak zaburzenie ze spektrum autyzmu (Brito i in., 2018; Vitrac i Cloëz-Tayarani, 2018), schizofrenia (Räsänen i in., 2022) czy choroba Alzheimera (Barak i in., 2022). Ze względu na ograniczoną dostępność tkanki ludzkiego mózgu, badania nad chorobami neurodegeneracyjnymi prowadzone są na tkankach już zmienionych chorobowo, reprezentujących zaawansowane, końcowe stadium schorzeń (np. guzy po resekcji) lub tkankach pobranych pośmiertnie (*post mortem*). Utrudnia to zrozumienie złożonej etiologii oraz mechanizmów rozwoju schorzeń, które najczęściej mają swój początek na bardzo wczesnych etapach rozwoju mózgu. Jedną z nowoczesnych technik, pozwalających na badanie mózgu na poziomie molekularnym i komórkowym, jest reprogramowanie komórek somatycznych do indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych - iPSC (komórki iPS ang. *induced Pluripotent Stem Cells*). Zastosowanie komórek iPS otwiera możliwość modelowania zaburzeń neurodegeneracyjnych w warunkach *in vitro*, co umożliwia szczegółowe zbadanie molekularnych i komórkowych mechanizmów prowadzących do powstawania tych schorzeń, jak również identyfikację potencjalnych celów terapeutycznych (Lu i in., 2022; Reubinoff i in., 2001; Zhang i in., 2001). Indukowane

pluripotencjalne komórki macierzyste są niezwykle przydatne w badaniu chorób, które są trudne do zrozumienia jedynie na podstawie obserwacji objawów u pacjentów. W skrócie, proces modelowania chorób z wykorzystaniem komórek macierzystych polega na wprowadzeniu czynników transkrypcyjnych do komórek somatycznych (np. fibroblastów skóry) pozyskanych od pacjentów dotkniętych daną chorobą, a następnie prowadzeniu hodowli w pożywce o ściśle zdefiniowanym składzie. To pozwala uzyskać komórki macierzyste, które mogą być w kolejnym etapie zróżnicowane w określony typ komórek, na przykład neurony lub astrocyty (Barak i in., 2022; Park i in., 2020; Takahashi i Yamanaka, 2006).

W badaniach nad komórkami macierzystymi, które rozpoczęły się na przełomie XX i XXI wieku, kluczową rolę odegrał profesor Yamanaka (Takahashi i Yamanaka, 2006). Jego prace wykazały, że predestynacja zróżnicowanych komórek nie jest ostatecznie ustalona i może być modyfikowana (Fazzari i in., 2021). To odkrycie zaowocowało stworzeniem indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC) - sztucznie wytworzonych komórek o zdolności do różnicowania się w różne typy komórek organizmu. Proces tworzenia iPSC rozpoczyna się od reprogramowania dojrzałych, jądrzastych komórek somatycznych. Ten etap obejmuje wprowadzenie czynników transkrypcyjnych, takich jak Oct3/4, Sox2, c-Myc i Klf4 do komórki. Czynniki te kontrolują ekspresję genów związanych z utrzymaniem pluripotencji oraz podziałami komórkowymi (Park, Zhao i in., 2008; Takahashi i in., 2007). Źródłami komórek somatycznych u ludzi mogą być między innymi fibroblasty skóry, krew obwodowa zawierająca: limfocyty T i B (Seki i in., 2010), hematopoetyczne komórki macierzyste (Loh i in., 2009), komórki szpiku kostnego, jak również keratynocyty izolowane z mieszków włosowych (Maherali i in., 2008), czy komórki nabłonka nerek pozyskane z moczu (Adami i Bottai, 2019; Zhu i in., 2010). Ponadto, linie komórek iPS można uzyskać z mezenchymalnych komórek macierzystych zębów i tkanki tłuszczowej (Sun i in., 2009), komórek wątroby i żołądka (Tricot i in., 2022), melanocytów (Utikal i in., 2009), oraz tkanki zarodkowej i pozazarodkowej (Cai i in., 2010; Scesa i in., 2021). Do wprowadzania genów przeprogramowujących stosowane są różne systemy: adenowirusowe (Zhou i Freed, 2009), lentiwirusowe (Takahashi i in., 2007), retrowirusowe (Steichen i in., 2014), nieintegrujące plazmidy episomalnego DNA (Yu i in., 2009), nieintegrujące wirusy RNA (wirus Sendai) (Fusaki i in., 2009) oraz syntetyczne samoreplikujące się RNA (Kantor i Chiba-Falek, 2021; Scesa i in., 2021; Warren i in., 2010). Do najskuteczniejszych metod przeprogramowania komórek należą metody wykorzystujące samoreplikujące się RNA, następnie te z zastosowaniem wirusa Sendai oraz systemy lentiwirusowe (Scesa i in., 2021; Takahashi

i Yamanaka, 2006b; Yoshioka i in., 2013; Zhu i in., 2010). W procesie przeprogramowania ludzkich komórek somatycznych, jako komórki odżywcze, wspomagające cały proces, mogą być stosowane zarówno mysie (MEF, ang. *Mouse Embryonic Fibroblasts*), jak i szczurze embrionalne fibroblasty (REF, ang. *Rat Embryonic Fibroblasts*) (K. Hu, 2021; Linta i in., 2012). Obecnie wykorzystywanie komórek iPSC daje możliwość modelowania ludzkich chorób neurorozwojowych, zarówno tych spowodowanych jednogennymi mutacjami, jak i tych o bardziej złożonej etiologii. W procesie modelowania konkretnych schorzeń iPSC pacjentów są różnicowane w zmienione chorobowo komórki, w oparciu o obraz kliniczny danego schorzenia. Potwierdzenie specyficznego dla zaburzenia fenotypu komórek uzyskanych z iPSC pacjentów jest kluczowe samego jej modelowania. Powstałe w procesie indukcji, identyczne pod względem genetycznym (izogenne) pluripotencjalnie komórki macierzyste są pożądane ze względu na perspektywę lepszego zrozumienia złożoności chorób oraz ich potencjalnego zastosowania terapeutycznego np. w kontekście przeszczepów, gdzie wiąże się to z niższym ryzykiem odrzutu immunologicznego (Chailangkarn i in., 2012). Poza modelowaniem chorób, komórki macierzyste wykorzystywane mogą być do testowania leków. Niestety zastosowanie iPSC wiąże się również z istnieniem czynników ryzyka, które mogą dotyczyć nieprawidłowego różnicowania i funkcjonowania komórek, występowania u pacjentów reakcji immunologicznych, w odpowiedzi na wprowadzenie komórek iPSC, czy pojawienia się zmian i mutacji genetycznych powstałych w procesie reprogramowania komórek (Blokzijl i in., 2016; Doss i Sachinidis, 2019; Kuijk i in., 2020).

1.13.3 Metody pozyskiwania ludzkich neuronów

Pozyskiwanie ludzkich neuronów może odbywać się z wykorzystaniem pośredniej i bezpośredniej metody konwersji. Metoda bezpośredniego przeprogramowywania opiera się na wprowadzeniu do komórek somatycznych genów kodujących czynniki transkrypcyjne, które determinują powstawanie indukowanych neuronów (iN, ang. *iNeurons*). Do czynników transkrypcyjnych określających tożsamość neuronową należą NeuroD1 czy Ngn2 (Vierbuchen i in., 2010; Zhang i in., 2013). Proces ten jest również kontrolowany za pomocą dodatkowych czynników wzrostu i morfogenetycznych, które są niezbędne do prawidłowego rozwoju komórek nerwowych. Nadekspresja cDNA neurogeniny-2 (Ngn2) lub NeuroD1 prowadzi do szybkiego uzyskania neuronów z embrionalnych komórek macierzystych lub komórek iPSC. Badania pokazują, że w ciągu zaledwie trzech tygodni, iPSC mogą zostać zróżnicowane w pełni funkcjonalne komórki nerwowe (Zhang i in., 2013). Ograniczeniem tej metody jest jej niska

efektywność, heterogeniczność uzyskanych komórek oraz generowanie populacji postmitotycznych iN (Lee-Kubli i Lu, 2015).

Drugą z metod otrzymywania komórek nerwowych jest metoda pośrednia. Opiera się ona na pozyskaniu indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych z komórek somatycznych, a następnie zróżnicowaniu iPSC do neuralnych komórek macierzystych (NSCs), które w następnym etapie są różnicowane do neuronów. Metoda ta bazuje na podwójnej inhibicji białek SMAD i umożliwia wygenerowanie linii NSC z pominięciem etapu formowania kul zarodkowych (Chavali i in., 2020; Galiakberova i Dashinimaev, 2020a). Protokół szybkiego i efektywnego różnicowania iPSC w populację neuralnych komórek macierzystych opiera się na hamowaniu dwóch szlaków sygnałowych za pomocą inhibitorów: białek morfogenetycznych kości – BMP przy pomocy inhibitora sygnalizacji BMP- czynnika LDN193189/Noggin, oraz transformującego czynnika wzrostu β - Lefty/Aktywina/TGF β z zastosowaniem SB431542, który blokuje fosforylację receptorów kinazy serynowo/treoninowej typu I ALK4, ALK5 i ALK7 (Chambers i in., 2009; Chavali i in., 2020). W uzyskanych komórkach wykrywane są białka nestyna i PAX6, które są markerami neuralnych komórek macierzystych. Następnie, NSC mogą zostać zróżnicowane do komórek nerwowych poprzez hodowlę w pożywce różnicującej z dodatkiem czynników wzrostu np. BDNF, GDNF, NT3 (Cortés i in., 2017; G. Li i in., 2021; Pansri i in., 2021) lub wykorzystując warstwę odżywczą szczurzych neuronów (Kang i in., 2017). Wymienione czynniki wzrostu mają zdolność do regulowania różnych procesów komórkowych, takich jak proliferacja, różnicowanie i dojrzewanie komórek nerwowych. Ich dodatek do pożywki hodowlanej pomaga w promowaniu różnicowania komórek NSC w określone linie neuronalne lub glejowe (Cortés i in., 2017; G. Li i in., 2021; Pansri i in., 2021). Ograniczeniem tej metody jest długi czas trwania całej procedury, natomiast do niewątpliwych zalet można zaliczyć wysoką wydajność konwersji (80 %), oraz możliwość kontroli przebiegu procesu przekształcania w neurony na poszczególnych jego etapach (Galiakberova i Dashinimaev, 2020).

Niestety, różnice w technikach hodowli, czy wpływ czynników środowiskowych (zmiany temperatury, stężenie składników odżywczych, pH) mogą prowadzić do różnic w uzyskanych fenotypach komórek. Jednocześnie, brak jednolitych standardów i metodologii utrudnia uzyskiwanie porównywalnych i powtarzalnych wyników badań pomiędzy różnymi laboratoriami.

W niniejszej rozprawie do uzyskania neuronów z iPSC wykorzystano metodę pośrednią, czyli różnicowanie komórek iPS do NSC, a następnie różnicowanie NSC do neuronów.

1.14 Modelowanie chorób neurologicznych z wykorzystaniem komórek pochodzących z iPSC

W celu lepszego zrozumienia mechanizmu choroby stosuje się modele eksperymentalne odtwarzające podłoże genetyczne schorzeń pacjentów i umożliwiające badanie patologii na poziomie komórkowym. Zastosowanie ludzkich komórek iPSC pozwala na badanie wpływu określonych genów na rozwój i funkcjonowanie wielu układów i tkanek, testowanie skuteczności potencjalnych leków i terapii oraz identyfikację biomarkerów chorób (Brooks i in., 2022; Liu i in., 2018). Wykazano, że zastosowanie ludzkich iPSC pochodzących od pacjentów do modelowania schorzeń, dobrze odzwierciedla fenotypy różnych chorób, takich jak choroba Alzheimera (Israel i in., 2012; Xu i in., 2013), stwardnienie zanikowe boczne (Burkhardt i in., 2013; Chen i in., 2014; Dimos i in., 2008; Kiskinis i in., 2014), choroba Huntingtona (Nekrasov i in., 2016; Park, Arora, i in., 2008), choroba Parkinsona (Dettmer i in., 2015; Ryan i in., 2013; Shi i in., 2017), zaburzenia ze spektrum autyzmu (Grunwald i in., 2019; Marchetto i in., 2010), zespół Retta (Marchetto i in., 2010), czy zespół łamliwego chromosomu X (Doers i in., 2014; M. Kaufmann i in., 2015).

1.14.1 Zespół łamliwego chromosomu X

Modele zwierzęce utworzone przez nokaut genu FMR1 nie są w stanie wyjaśnić mechanizmu wyciszania FMR1 ani potencjalnych mechanizmów regulacyjnych, które mogą odgrywać rolę podczas rozwoju neuronów (Brouwer i in., 2007). Specyficzne dla gatunku różnice w molekularnych i neurorozwojowych aspektach FXS powodują konieczność stworzenia ludzkiego modelu FXS. W celu dokładnego odzwierciedlenia fenotypu choroby, mutację ludzką zbadano w kontekście rozwoju neuronów człowieka (Doers i in., 2014). Analizie poddano komórki iPSC pochodzenia fibroblastycznego (Sheridan i in., 2011). Uzyskane przez zespół Doers dane sugerują występowanie zaburzeń w wydłużaniu neurytów w ludzkich neuronach przodomózgowia pochodzących z FXS iPSC (Doers i in., 2014).

1.14.2 Autyzm i schizofrenia

Komórki iPSC do modelowania zaburzeń ze spektrum autyzmu i schizofrenii zostały uzyskane z biopsji skóry. Obniżona ekspresja PSD-95 u osób cierpiących na schizofrenię i ASD jest głównym powodem występowania dysfunkcji synaptycznych (Catts i in., 2015). U pacjentów zaobserwowano również zaburzenia wzrostu neurytów. Modelowanie ASD i schizofrenii pozwoliło na wykrycie specyficznych wzorców sygnałów wapniowych

odróżniających zdrowe osoby od pacjentów ze schizofrenią i autyzmem oraz pacjentów z autyzmem od tych cierpiących na schizofrenię. W związku z powyższym analiza sygnałów wapnia wydaje się być obiecującym markerem do rozróżniania tych chorób (Grunwald i in., 2019).

1.14.3 Zespół Retta

Neurony osób z zespołem Retta uzyskano z iPSC pochodzenia fibroblastycznego. Wyniki przeprowadzonych przez zespół Marchetto badań sugerują, że neurony uzyskane z iPSC osób z zespołem Retta wykazują istotne różnice strukturalne i funkcjonalne w porównaniu z komórkami osób zdrowych. Zmniejszona liczba synaps i kolców dendrytycznych wskazuje na zaburzenia w procesach synaptycznych i komunikacji między neuronami. Obserwowany spadek częstotliwości i amplitudy spontanicznych prądów synaptycznych może wskazywać na defekty w transmisji sygnałów między neuronami. Zmiany te zostały zaobserwowane przed wystąpieniem objawów klinicznych, co sugeruje, że mogą one stanowić potencjalne biomarkery wczesnego rozpoznawania zespołu Retta. Przeprowadzone badania sugerują również, że istnieje nierównowaga w sieciach neuronowych osób z zespołem Retta, co może przyczyniać się do występowania objawów neurologicznych związanych z tą chorobą. Zrozumienie tych zmian i ich wpływu na funkcjonowanie mózgu osób z zespołem Retta może pomóc w opracowaniu nowych terapii i strategii interwencyjnych, które mogą poprawić jakość życia pacjentów (Marchetto i in., 2010).

2. Cele pracy

Celem niniejszej pracy było zbadanie roli czynnika transkrypcyjnego SRF i jego koaktywatorów MKL1 i MKL2 w regulacji rozwoju mysich i szczurzych neuronów w hodowli *in vitro*. Dodatkowo zbadano, jak wyciszenie SRF wpływa na budowę ludzkich neuronów wyprowadzonych z komórek iPS.

Główny cel pracy został osiągnięty poprzez realizację celów szczegółowych:

1. Zbadanie wpływu czynnika transkrypcyjnego SRF na dojrzewanie drzewa dendrytycznego i kolców dendrytycznych w mysich neuronach *in vitro*.
2. Weryfikacja udziału mikroRNA-132 w regulacji kształtu kolców dendrytycznych neuronów pozbawionych SRF.
3. Analiza wpływu zmiany pojedynczych nukleotydów zidentyfikowanych w ludzkich genach kodujących koaktywatory MKL1 i MKL2 na ich funkcję w neuronach.
4. Zbadanie wpływu czynnika transkrypcyjnego SRF na proces kształtowania drzewa dendrytycznego w ludzkich neuronach *in vitro* wyprowadzonych z komórek iPSC.

3. Materiały i metody

3.1. Materiały i ich pochodzenie

3.1.1 Odczynniki do hodowli komórkowych

Spis odczynników do hodowli komercyjnie dostępnych linii komórkowych:

- pożywka DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Gibco, 11995073)
- surowica płodowa bydlęca - FBS - *Fetal Bovine Serum* (Gibco)
- Antybiotyki: Penicylina-Streptopocyna, 100 x (Gibco, 10378016)
- PBS - *Phosphate-Buffered Saline*, buforowana fosforanem sól fizjologiczna, 1 × (Gibco, 10010023)
- 0,25 % trypsyna-EDTA (Sigma, T4674)

Spis odczynników do hodowli i stymulacji pierwotnych komórek nerwowych pochodzenia mysiego oraz szczurzego:

- kwas azotowy 65 % (Chempur, 425296031)
- laminina (Roche, 11243217001)
- poli-D-lizyna (Sigma, A003E)
- kwas boranowy (POCh, 531360115)
- czteroboran sodu - $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (Sigma, 221732)
- chlorek sodu- NaCl (POCh, 794121422)
- cysteina (Sigma, C7352)
- kwas etylenodiaminotetraoctowy - EDTA, 50 mM (Bioshop, EDT001)
- papaina (Worthington Biochemical Corporation, LS003126)
- chlorek wapnia - CaCl_2 , 100 mM (POCh, 739740161)
- albumina (BSA) (Sigma, A9418)
- inhibitor trypsyny (Sigma, T9253)
- pożywka DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Gibco, 11995073)
- HBSS - *Hanks' Balanced Salt Solution* (Sigma, H6648)
- pożywka DMEM+GlutaMAX (Gibco, 10569010)
- surowica płodowa bydlęca - FBS - *Fetal Bovine Serum* (Gibco, 10500064)
- antybiotyki: Penicylina-Streptomocyna, 100 × (Gibco, 10378016)
- pożywka Neurobasal-A Medium (Gibco, 10888022)

- roztwór GlutaMAX, 100 × (Gibco, 35050038)
- B27 Supplement (Gibco, 17504044)
- arabinozyd cytozyny - araC (Sigma, C1768)
- pożywka MEM- *Minimum Essential Medium* (Gibco, 51200046)
- MEM mieszanina endogennych aminokwasów (MEM *Non-Essential Amino Acids Solution*), 100 × (Gibco, M7145)
- D-(+)-Glucose, 45 % roztwór (Sigma, G8769)
- pirogronian sodu (Sigma, S8636)
- wodorowęglan sodu - NaOH, 1 M (POCh, 810942161)
- siarczan sodu - Na₂SO₄, 1 M (POCh, 807870111)
- siarczan potasu - K₂SO₄, 0,5 M (POCh, 2319155)
- chlorek magnezu - MgCl₂, 1 M (POCh, 6120500110)
- HEPES, 1 M (Sigma, H0887)
- rekombinowane białko ludzkie BDNF (czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego) (Alomone Labs, B-250)
- miRCURY LNA miRNA Inhibitor Control A (5 nmol) Negative Control (Qiagen, YI00199006-ADA)
- miRCURY LNA miRNA mmu-miR-132-3p (15 nmol) (UAACAGUCUACAGCCAUGGUCG) Qiagen, YI04102731-AFA)

Spis odczynników do hodowli linii komórkowych pochodzenia ludzkiego:

- Matrigel (Corning, 354277)
- Geltrex (Gibco, A1413202)
- pożywka DMEM/F12 (1:1) (Gibco, 11320033)
- pożywka DMEM (Gibco, 11995073)
- pożywka Neurobasal-A Medium (Gibco, 10888022)
- Y-27632 dihydrochloride, Rho kinase inhibitor (Abcam, ab120129)
- DPBS - *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*, buforowana fosforanem sól fizjologiczna bez soli wapnia i magnezu (Gibco, 14190136)
- roztwór EDTA do dysocjacji komórek Versene 1:5000 (Gibco, 15040066)
- roztwór do dysocjacji komórek Accutase (Sigma, A6964)
- pożywka Essential 8 Medium (Gibco, A1517001)
- pożywka Essential 6 Medium (Gibco, A1516401)

- PVA - alkohol poliwinylowy (Sigma, 341584)
- B27 Supplement, 50 × (Gibco, 17504044)
- N2 Supplement 100 × (Gibco, 17502001)
- podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów βFGF (Alomone Lab, F-170)
- epidermalny/naskórkowy czynnik wzrostu EGF (Alomone Lab, E-100)
- inhibitor receptorów kinaz podobnych do receptorów aktywiny - SB431542 (StemCell Technologies, 72234)
- inhibitor szlaku BMP - LDN193189 (StemCell Technologies, 72147)
- GlutaMAX, 100 × (Gibco, 35050038)
- antybiotyki: Penicylina-Streptopycyna, 100 × (Gibco, 10378016)
- roztwór do mrożenia komórek BAMBANKER (Nippon Genetics, BB01)
- DMSO- dimetylosulfonotlenek (Sigma, 472301)
- L-glutamina (Gibco, 25030024)
- pirogronian sodu (Sigma, S8636)
- laminina (Roche, 11243217001)
- roztwór do dysocjacji komórek: 0,25 % trypsyna (Sigma, T4674)
- β-merkaptoetanol (Gibco, 21985023)
- puromycyna (Invivogen, A1113803)

3.1.2 Materiały do hodowli bakteryjnych

Bakterie chemokompetentne:

Escherichia coli: Stbl3 (Invitrogen, C737303), 5-alpha F'Iq (New England BioLabs, C2992, C3040), XL10-Gold (Agilent, 200518)

Podłoża hodowlane i antybiotyki:

- LB Broth (Sigma, 71753-M)
- LB Broth with agar (Miller) (Sigma, L3147)
- S.O.C. Medium (Invitrogen, 15544034)
- ampicylina, 100 μg/μl (Sigma, A9393)
- kanamycyna, 100 μg/μl (Sigma, K1377)

3.1.3 Wektory plazmidowe

- p3xFLAG-MKL1 (Addgene, 11978)

- p3XFLAG-MKL2 (Addgene, 27175)
- psPAX2 (Addgene, 12260)
- pMD2.G (Addgene, 12259)
- pLKO.1 - TRC cloning vector (Addgene, 10878)
- pLKO.1 - TRC control (Addgene, 10879)
- pTRIP-PGK-GFP (Addgene, 183505)
- pcDNA3.1 (Addgene, 16075)
- pAAV-CamKII-GFP (Addgene, 64545)
- pAAV-CamKII-Cre (Pracownia Neurobiologii, praca doktorska Anny Krysiak)
- EF1 α -STEMCCA (OKSM) (Pracownia Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej, Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie)

3.1.4 Enzymy restrykcyjne

- EcoRI FastDigest (Thermo Scientific, FD0275)
- BshTI FastDigest (AgeI) (Thermo Scientific, FD1464)
- BamHI FastDigest (Thermo Scientific, FD0054)
- PstI FastDigest (Thermo Scientific, FD0614)
- ligaza DNA pochodząca z faga T4 (New England BioLabs, M0202)

3.1.5 Odczynniki do pracy z białkami -metoda Western blotting

- bufor do lizy RIPA (Sigma, R0278)
- bufor do lizy SDS (1 % SDS, 50 mM Tris-HCl)
- 4 × Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad, 1610747)
- B-merkaptioetanol (Gibco, 21985023)
- 10 % nadsiarczan amonu- APS (Sigma, A3678)
- TEMED- N,N,N',N'- Tetrametyloetylenodiamina (Bioshop, TEM001)
- marker białkowy (Protein MW Marker, Ladder, Prestained, 10-170 kD Marker; MyBioSource, MBS657624)
- Any kD Mini-PROTEAN TGX Precast Protein Gels (Bio-Rad, 4569033)
- Trans-Blot Turbo Mini 0.2 μ m PVDF Transfer Packs (Bio-Rad, 1704156)
- bufor do elektroforezy, 10 × (0,25 M Tris-HCl, 1,92 M glicyna, 0,03 M SDS)
- TBST, 1 × (Bioshop, TBS005)
- Amersham ECL Prime Western blotting Detection Reagent (GE Healthcare, RPN2236)

- Amersham ECL Western blotting Detection Reagents (GE Healthcare, RPN2134)
- alkohol metylowy (Chempur, 363-116219904)
- membrana 0,2 µm PVDF (Amersham, 10600021)
- klisze rentgenowskie Hyperfilm (Amersham, 28906844)

3.1.6 Odczynniki do pracy z DNA

- agaroz (BioShop, AGA001)
- bufor TBE, 10 × (Bioshop, TBE444)
- Midori Green Advance DNA Stain (NIPPON Genetics, MG04)
- GeneRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use (Thermo Scientific, SM0333)
- DNA Gel Loading Dye (6 ×) (Thermo Scientific, R0611)

3.1.7 Odczynniki stosowane do transfekcji komórek

- TurboFect Transfection Reagent (Thermo Scientific, R0533)
- Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Thermo Scientific, 11668019)
- Rat Neuron Nucleofector™ Kit (Lonza, VPG-1003)

3.1.8 Odczynniki do izolowania RNA i ilościowego pomiaru poziomu mRNA i mikroRNA metodą qRT-PCR

- RNeasy Mini Kit (Qiagen, 74106)
- RNase-Free DNase Set (Qiagen, 79254)
- miRNeasy Micro Kit (Qiagen, 217084)
- SuperScript IV First-Strand Synthesis System (Invitrogen, 18091050)
- TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems, A28007)
- TaqMan Fast Advanced Master Mix (Thermo Scientific, 4444557)
- Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystem, 4385612)
- płytki do RT-qPCR (Applied Biosystem, N8010560)
- sondy TaqMan Advanced (Thermo Scientific):
 - mmu-miR-125b-5p (#mmu480907_mir)
 - mmu-miR-132-3p (#mmu480919_mir)
 - mmu-miR-139-5p (#mmu480930_mir)
 - mmu-miR-212-3p (#mmu478318_mir)

3.1.9 Odczynniki stosowane do pomiaru bioluminescencji

- zestaw do oceny aktywności lucyferazowej *Luciferase Assay System* (Promega, E1501)
- B-galaktozydaza (Roche, 10105031001)
- 2 × Assay Buffer (1,33 mg/ml ONPG, 200 mM fosforan sodu (pH = 7,3), 2 mM MgCl₂, 100 mM β-merkaptotanol)

3.1.10 Odczynniki stosowane do wykrywania białek metodami immunofluorescencyjnymi

- BSA - surowicza albumina wołowa (Sigma, A8531)
- surowica kozia (NGS- *Normal Goat Serum*; Sigma, NS02L)
- PBS - *Phosphate-Buffered Saline*, buforowana fosforanem sól fizjologiczna 1 x (Gibco, 10010023)
- 2 × GBD bufor (30 mM PBS, 0,2 % żelatyny, 0,6 % Triton-X, 0,9 M NaCl)

3.1.11 Przeciwciała

Przeciwciała pierwszorzędowe stosowane do wykrywania białek metodą Western blotting

przeciwciało	gospodarz	rozcieńczenie	producent
anty-CamKII	mysz	1:1000	Invitrogen, MA1-048
anty-GAPDH	królik	1:2000	Sigma, G9545
anty-GluR1	królik	1:5000	Merck, ABN241
anty-GluR2	mysz	1:1000	Merck, MAB397
anty-β-aktyna	mysz	1:2000	Sigma, A2228
anty-NR1	mysz	1:1000	BD Biosciences, 556308
anty-PSD95	mysz	1:5000	Merck, MAB1598
anty-SRF H300	królik	1:300	Santa Cruz Biotechnology, 13029
anty-SOX2	mysz	1:200	Sigma, MAB4423
anty-OCT4	mysz	1:100	Sigma, MAB4419
anty-NANOG	mysz	1:200	Santa Cruz Biotechnology, sc-293121

Przeciwciała pierwszorzędowe stosowane do wykrywania białek metodami immunofluorescencyjnymi

przeciwciało	gospodarz	rozcieńczenie	producent
anty-Tra1-60	mysz	1:100	Invitrogen, 41-1000
anty-Tra1-81	mysz	1:100	Invitrogen, 41-1100
anty-SOX2	mysz	1:100	Sigma, MAB4423
anty-OCT4	mysz	1:100	Sigma, MAB4419
anty-NANOG	mysz	1:50	Santa Cruz Biotechnology, sc-293121
anty-SSEA4	mysz	1:100	Invitrogen, 41-4000
anty-MAP2	mysz	1:200	Sigma, M1406
anty-GFP	kurczak	1:400	Aves Labs, GFP-1020
anty-SRF H300	królik	1:300	Santa Cruz Biotechnology, 13029

Przeciwciała drugorzędowe wykorzystywane do detekcji białek

przeciwciało	rozcieńczenie	producent
przeciwciała kozie znakowane barwnikiem fluorescencyjnym AlexaFluor: 405, 488, 555, 647	1:500 - 1:1000	Invitrogen: A11041, A11039, A21437, A21428, A21247, A21449, A21235, A21201, A31553, A31556, A32727
przeciwciała sprzężone z peroksydazą chrzanową (HRP)	1:10 000	VECTOR: PI-1000, PI-2000, PI-9500

3.1.12 Gotowe zestawy stosowane w technikach biologii molekularnej

- Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, 23225)
- Plasmid Mini, Midi AX (AiA Biotechnology, 020-250, 895-20)
- QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen, 15165)
- Gelout, Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, D4002)
- DNeasy Blood i Tissue Kit (Qiagen, 69504)
- QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, 200518)
- Human Three Germ Layer 3-Color Immunocytochemistry Kit (RiD Systems, SC022)
- Calcium phosphate transfection kit (Takara, 631312)

3.1.13 Zwierzęta doświadczalne

- szczury szczepu Wistar, oseski do 24 godzin od narodzin (Zwierzętarnia Instytutu Biologii Doświadczalnej)
- myszy szczepu C57BL/6J, oseski do 24 godzin od narodzin (Zwierzętarnia Instytutu Biologii Doświadczalnej)
- myszy szczepu SRF^{flox/flox} (SRF^{f/f}; B6.129S6-Srftm1Rmn/J, #:006658, Jackson's Laboratories), oseski do 24 godzin od narodzin (Zwierzętarnia Instytutu Biologii Doświadczalnej)

Doświadczenia wykonywane na zwierzętach nie wymagały zgody Lokalnej Komisji Etycznej na podstawie obowiązujących przepisów prawa (Ustawa z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych).

3.2. Metody

3.2.1 Mutageneza ukierunkowana

W celu wprowadzenia polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP) do plazmidów kodujących geny *MKL1* i *MKL2* wykorzystano zestaw firmy Agilent- QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit zgodnie z protokołem producenta. Oligonukleotydy zawierające zmienione nukleotydy zostały zaprojektowane zgodnie z zaleceniami producenta z użyciem oprogramowania dostępnego na stronie firmy Agilent. Sekwencje wraz z zaznaczonym polimorfizmem pojedynczego nukleotydu SNP (pokazane jako tekst pogrubiony) są umieszczone w tabeli (Tabela 2). Do przeprowadzenia reakcji użyto 2 µg matrycy (dsDNA) - plazmidu pod promotorem EF1α: p3XFLAG-MKL1 i p3XFLAG-MKL2, 125 ng starterów oraz polimerazę DNA o wysokiej wierności PfuUltra High-Fidelity. Jako kontrolę wykorzystano plazmid pWhitescript znajdujący się w zestawie. Reakcję PCR przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producenta. Powstałe produkty poddano trawieniu enzymem restrykcyjnym DpnI (10 U/µl) w celu usunięcia macierzystego (niezmutowanego) superzwiniętego dsDNA. Następnie przeprowadzono transformację bakterii kompetentnych XL10-Gold.

Chemokompetentne bakterie XL10-Gold rozmrożono na lodzie i dodano 2 µl β-merkaptioetanolu w celu zwiększenia wydajności transformacji poprzez inaktywację powierzchniowych nukleaz. Do komórek dodano 2 µl produktu PCR po trawieniu enzymem DpnI i inkubowano 30 minut na lodzie, po czym przeprowadzono szok cieplny w temperaturze 42°C przez 30 s. Następnie komórki inkubowano na lodzie przez 2 minuty. Po tym czasie do bakterii dodano ogrzaną do 42°C pożywkę do regeneracji komórek. Całość wytrząsano w temperaturze 37°C przy 250 obrotach na minutę przez 1 godzinę. Bakterie wysiewano na szalki Petriego z LB agarą z ampicyliną (0,1 mg/ml). Szalki umieszczono w ciepłarni o temperaturze 37°C i inkubowano przez noc. Z szalek wybrano pojedyncze kolonie, namnożono przez noc w ciepłarni z wytrząsaniem, w temperaturze 37°C, w pożywce LB z dodatkiem ampicyliny (1 mg/ml). Pobrano i zbankowano po 0,5 ml całonocnej zawiesiny bakteryjnej w 50 % roztworze glicerolu. Z pozostałej hodowli wyizolowano plazmidowe DNA używając zestawu firmy AiA Biotechnology- Plasmid Mini, Midi AX, zgodnie z protokołem producenta. W celu uzyskania potwierdzenia wprowadzonych zmian, materiał wysłano do sekwencjonowania. Materiał sekwencjonowano w Genomed (Warszawa). Plazmidy

o pożądaných mutacjach namnożono przy pomocy zestawu firmy Qiagen- Plasmid Maxi Kit. Pomiar stężenia plazmidowego DNA wykonano na Nanodropie 2000 (Thermo Fisher).

gen	mutacja	nazwa	sekwencja Forward/Reverse (5'-3')
MKL1	rs7800482	P2L	GCCGCGAATTTCGATGCTGCCTTTGAAAAGTCCA/ TGGACTTTTCAAAGGC <u>AG</u> CATCGAATTCGCGGC
	57	(C/T)	
	rs7694583	R31H	CTATCTCAAACGGAAGATTCATTCCCGGCCGGAG/ CTCCGGCCGGGAATGAATCTTCCGTTTGAGATAG
	01	(G/A)	
rs7607622	P244L	CCAGTACATCCCCCTGGACCAGAAGCAGG/ CCTGCTTCTGGTCC <u>AG</u> GGGGATGTACTGG	
38	(C/T)		
rs1426479	P344L	GGGAGCCCTGCTGGCCAACCTGG/ CCAGGTTGGCC <u>AG</u> CAGGGCTCCC	
78	(C/T)		
MKL2	rs7596381	H288Q	CCATCCCAAGAATCCAAATGACAAACAACGTAGC AAAAAGTG/ CACTTTTGTGCTACG <u>T</u> TGTTTGTTCATTTGGATTCTTG GGATGG
	4	(C/A)	
	rs3722931	R299W	CAAAAAGTGCAAAGATCCCAAACCATGGGTAAAG AAGTTAAAGTA/ TACTTTAACTTCTTTACCC <u>A</u> TGGTTTGGGATCTTTG CACTTTTGTG
	93	(C/T)	
	rs7531781	Q313L	CAATACATTCCACCAGATCTGAAGGGTGAGAAGA ATGAG/ CTCATTCTTCTCACCC <u>T</u> CAGATCTGGTGGAAATGT ATTG
	72	(A/T)	
	rs1199474	S501F	CCCGTGTGGAAAATGTTTCATTTCCCTCTGCCCA/ TGGGCAGAGGG <u>A</u> AATGAACATTTTCCACACGGG
	915	(C/T)	
rs2013112	C647R	CTCACTCCCTGACCGCTCCAGCTCCAG/ CTGGAGCTGGAGCGGTCAGGGAGTGAG	
29	(T/C)		
rs1385701	D1093	CTAGACCCACAGGAGCTACCGCTGCCATG/ CATGGCAGCGGTAG <u>C</u> TCTGTGGGTCTAG	
59	E (C/G)		

Tabela 2. Sekwencje starterów z wprowadzonymi mutacjami w genach *MKL1* i *MKL2*. Pogubioną czcionką zaznaczono miejsce zamiany na nici matrycowej, a podkreśleniem zmieniony nukleotyd na nici komplementarnej.

3.2.2 Konstrukcja wektorów lentiwirusowych kodujących shRNA

Do skonstruowania plazmidu kodującego sekwencję shRNA dla genu *Srf*: shSRF1 (Yin i in., 2006) i shSRF2 (Medjkane i in., 2009) użyto plazmidu pLKO pod promotorem RNA polimerazy III dla ludzkiego genu U6 snRNA (pLKO.1- TRC cloning vector Addgene, 10878) oraz par oligonukleotydów zamieszczonych w tabeli poniżej (Tabela 3). Użyty plazmid posiada gen oporności na puromycynę, co umożliwia selekcję komórek z wyciszeniem *Srf* po transfekcji. Kontrolę dla eksperymentu (shCTR) stanowił plazmid pLKO- TCR control (Addgene, 10879), który był prezentem od laboratorium Davida Root (Moffat i in., 2006).

nazwa oligonukleotydu	sekwencja Forward/Reverse (5'-3')
shSRF1	CCGGAGAGAATGAGTGCCACTGGCTGCAGCCAGTGGCACTCATT CTCTTTTTTG/ AATTCAAAAAAGAGAATGAGTGCCACTGGCTGCAGCCAGTGGC ACTCATTCTCT
shSRF2	CCGGCTGCAGCCCATGATCACCCTGCAGTGGTGATCATGGGCT GCAGTTTTTG/ AATTCAAAAAGAGAATGATCACCCTGCAGTGGTGATCA TGGGCTGCAG

Tabela 3. Sekwencje oligonukleotydów użyte do skonstruowania plazmidu kodującego shRNA dla genu *Srf*.

Plazmid pLKO.1- TRC cloning vector trawiono enzymem restrykcyjnym BshTI (AgeI) w temperaturze 37°C przez 15 minut. Produkty reakcji analizowano metodą elektroforezy przeprowadzoną w 0,8 % żelu agarozowym w obecności barwnika kwasów nukleinowych Midori Green przy stałym napięciu 120 V przez 35 minut. Detekcję produktów prowadzono w transiluminatorze w świetle UV. Produkt reakcji, widoczny jako pojedynczy prążek na żelu, wycięto, a następnie oczyszczono przy użyciu zestawu do izolacji DNA Gelout, Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research). DNA eluowano w 30 µl ultraczystej wody. Tak wyizolowane plazmidowe DNA trawiono enzymem EcoRI FD przez 15 minut w temperaturze 37°C. Plazmid pLKO.1-TRC o wielkości 8,9 kb, został przecięty przez EcoRI. Następnie przeprowadzono rozdział elektroforetyczny otrzymanego produktu wg powyższego protokołu. Fragment odpowiadający przeciętemu plazmidowi przez enzym EcoRI o wielkości 7 kb wycięto z żelu i wyizolowano DNA. Hybrydyzację oligonukleotydów zawierających sekwencje shSRF1 i shSRF2 przeprowadzono w obecności buforu do hybrydyzacji (0,1 M Tris-HCl, 1 M NaCl, 100 mM EDTA) z wykorzystaniem starterów o stężeniu 100 mM w temperaturze 65°C przez 10 minut. Reakcję ligacji prowadzono dla 100 ng plazmidowego DNA przeciętego enzymami restrykcyjnymi. Do mieszaniny reakcyjnej dodano 3 µl zhybrydyzowanych oligonukleotydów oraz ligazę DNA pochodzącą z faga T4. Ligację przeprowadzono w temperaturze 22°C przez 90 minut. Transformację bakterii wykonano zgodnie z metodyką opisaną w podrozdziale 3.2.1. Do transformacji użyto szczepu 5-alpha F'Iq bakterii kompetentnych *E.coli*. Wybrano pojedyncze kolonie, z których po namnożeniu izolowano plazmidowe DNA, przy użyciu komercyjnie dostępnego zestawu Plasmid Mini Kit. Uzyskane DNA poddano trawieniu enzymami BamHI i PstI w celu identyfikacji klonów z pożądaną wstawką (shRNA). Wyselekcjonowane, pozytywne klony namnażano za pomocą zestawu do izolacji

plazmidowego DNA-Plasmid Maxi Kit. Tak uzyskane plazmidy wykorzystano do produkcji wektorów lentiwirusowych shSRF.

3.2.3 Produkcja wektorów lentiwirusowych wykorzystanych w doświadczeniach

Do produkcji wektorów lentiwirusowych wykorzystano komórki linii HEK293T oraz komercyjnie dostępny zestaw Calcium phosphate transfection kit (Takara), zgodnie z protokołem producenta. Dobę przed transfekcją komórki linii HEK293T wysiano na szalkę Petriego o średnicy 10 cm w gęstości 2×10^6 kom/cm² w DMEM z 10 % FBS i antybiotykami (1 ×). Przed transfekcją komórki przepłukano pożywką bez surowicy i antybiotyków, a następnie pozostawiono w niewzbogacanej pożywce DMEM. W kolejnym etapie przygotowano mieszaniny reakcyjne zawierające odpowiednie ilości plazmidów (15 µg pPAX, 6 µg pMD2 oraz 20 µg plazmidu z konstruktem), wody oraz 2 M CaCl₂ (62,5 µl) we wskazanej kolejności dodawania i objętości końcowej 500 µl. Następnie do probówek typu Falcon o objętości 15 ml wprowadzono po 500 µl 2 × HEPES. Probówkę umieszczono na wortexie, nieustannie mieszając roztwór na niskich obrotach, dodawano małymi kroplami wcześniej przygotowaną mieszaninę plazmidów. Mieszaninę inkubowano w ciemności przez 20 minut po czym wprowadzono kroplami do szalki zawierającej komórki. Komórki inkubowano przez 5-6 godzin w inkubatorze w temperaturze 37°C w 5 % atmosferze dwutlenku węgla oraz 95 % wilgotności. Następnie zmieniono pożywkę na DMEM wzbogacone 10 % FBS oraz 1 raz stężonymi antybiotykami (penicylina/ streptomycyna). Komórki hodowano przez kolejne 2 dni, po czym pożywkę z nad komórek zebrano i przefiltrowano (0,45 µm). Uzyskane w ten sposób wirusy przechowywano w -80°C lub bezpośrednio użyto do dalszych doświadczeń. Wirusy STEMCCA (użyte do przeprogramowywania fibroblastów) oraz TRIP-GFP zawierający białko zielonej fluorescencji GFP wyprodukowano w Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w zespole prof. Jaworskiego.

nazwa wirusa	plazmidy użyte do produkcji lentiwirusów	zastosowanie wirusów
STEMCCA	pPAX, pMD2, EF1α-STEMCCA	lentiwirus użyty do przeprogramowania ludzkich fibroblastów
TRIP-GFP	pPAX, pMD2, pTRIP-PGK-GFP	lentiwirus użyty do wprowadzania GFP do ludzkich neuralnych komórek macierzystych
shCTR	pPAX, pMD2, pLKO.1-TRC control	lentiwirus kodujący shCTR
shSRF	pPAX, pMD2, shSRF	lentiwirus kodujący shSRF

Tabela 4. Wykaz plazmidów zastosowanych do produkcji lentiwirusów.

3.2.4 Pierwotne hodowle neuronów

Do hodowli pierwotnych neuronów używano szklane szkiełka o średnicy 18 mm. Szkiełka odfuszczano przez umieszczenie ich na 24 - 48 godzin w stężonym kwasie azotowym. Po tym czasie przeprowadzono 8 - krotne płukanie w wodzie destylowanej, każde po 15 minut. Tak przygotowane szkiełka wyprażano w piecu termicznym w temperaturze 180°C przez 3 godziny. Po wystygnięciu szkiełka umieszczano pod komorą laminarną i sterylizowano promieniami UV. Przed rozpoczęciem hodowli szkiełka umieszczano w 12-dółkowych płytkach i pokrywano przez naniesienie bezpośrednio na szkiełko 250 µl kropli przygotowanego uprzednio roztworu lamininy (10 µg/ml) i poli-D-lizyny (0,1 µg/ml) w buforze boranowym (0,1 M kwas boranowy; 0,075 M NaCl; 0,025 M czteroboran sodu). Szalki ze szkiełkami pozostawiano w temperaturze pokojowej pod komorą laminarną. Po upływie 24 godzin płytki ze szkiełkami płukano 3 razy sterylną wodą (milliQ), po czym pozostawiano do całkowitego wyschnięcia.

- Roztwory stosowane do hodowli neuronów mysich:

Roztwór do trawienia enzymatycznego tkanki

	na 10ml	stężenie końcowe
0,74 M cysteina	22 µl (4,5 mg/50 µl)	
100 mM CaCl₂	0,1 ml	10 mM
50 mM EDTA	0,1 ml	5mM
DMEM	10 ml	
papaina	200-250 U	

Roztwór inhibitora

	na 10 ml
albumina	25 mg
inhibitor trypsyny	25 mg
10 % FBS w DMEM	10 ml

- Roztwory stosowane do hodowli neuronów szczurzych:

Roztwór do dysocjacji (DM)

	na 250 ml	stężenie końcowe
1 M Na₂SO₄	20,45 ml	81,8 mM
0,5 M K₂SO₄	15 ml	30 mM
1 M MgCl₂	1,45 ml	5,8 mM
100 mM CaCl₂	0,63 ml	0,25 mM
1 M HEPES	0,25 ml	1 mM
2,5 M glukoza	2 ml	20 mM
0,5 % czerwień fenolowa	0,5 ml	0,001 %
0,1 M NaOH	0,5 ml (pH = 7,4)	
H₂O	209,22 ml	

Roztwór do trawienia enzymatycznego tkanki

cysteina	4,5 mg/50 µl
DM-Ky/Mg	9,7 ml
1M NaOH	25 µl (doprowadzić roztwór do pH= 7,4)
papaina	100 U

Roztwór inhibitora

	na 10 ml
albumina	25 mg
inhibitor trypsyny	25 mg
10 % FBS w MEM	10 ml

W celu uzyskania hodowli pierwotnych neuronów, oseski P0 (*postnatal day 0*) myszy lub szczura hibernowano na lodzie, a następnie dekapitowano. Z mózgu izolowano hipokamp lub korę mózgową. Tkanekę trawiono enzymatycznie w roztworze papainy przez 30 minut. Działanie enzymu hamowano przy pomocy roztworu inhibitora trypsyny, albuminy (BSA) oraz 10 % surowicy płodowej bydłowej (FBS) w pożywce DMEM (dla hodowli mysich neuronów) lub MEM (dla hodowli szczurzych neuronów) przez 5 minut. Wyizolowane struktury mózgu płukano 3 razy DMEM/MEM z 10 % zawartością FBS i 0,1 × stężonymi antybiotykami (dodatkowo pożywkę do hodowli szczurzych suplementowano: 1 × MEM mieszaniną endogennych aminokwasów, 1 × GlutaMAX, 1 × pirogronian sodu, 0,8 × 45 % glukoza). Po

ostatnim płukaniu odebrano pożywkę i zdysocjowano tkanki końcówką o objętości 1 ml. W celu usunięcia sedymentujących resztek tkankowych, przenoszono nadsącz komórkowy (dla mysich hodowli) lub supernatant (dla szczurzych hodowli) do nowej probówki typu Falcon o objętości 15 ml. Gęstość komórek obliczano przy użyciu komory Bürkera lub automatycznego licznika komórek model R1 firmy Olympus (Automated Cell Counter Olympus R1). Zawiesinę komórkową rozcieńczano do odpowiedniej gęstości i nanoszono na przygotowane wcześniej płytki hodowlane. Hodowle neuronów wysiewano w gęstości $1,2 \times 10^5$ kom/ml przez naniesienie 250 μ l kropli roztworu DMEM/MEM z 10 % zawartością FBS i $0,1 \times$ stężonymi antybiotykami bezpośrednio na szkiełko umieszczone w płytce hodowlanej 12-dołkowej. Po przyklejeniu się komórek do podłoża pożywkę zmieniano na Neurobasal A z B27 (stężonym $1 \times$), GlutaMAX ($1 \times$) i antybiotykami ($0,2 \times$). Po 48 - 72 godzinach od założenia hodowli dodawano 5 μ M AraC (arabinozyd cytozyny- w celu ograniczenia namnażania się fibroblastów i komórek glejowych w hodowlach neuronalnych). Neurony hodowano w inkubatorze w temperaturze 37°C, 5 % stężeniu CO₂ i 95 % wilgotności przez około 21 dni.

3.2.5 Transfekcja neuronów w hodowli

Mysie hodowle hipokampalne transfekowano plazmidowym DNA w dniu 5-7 *in vitro* (DIV 5-7 - *day in vitro*) przy użyciu odczynnika Lipofectaminy 2000. Rozcieńczenia plazmidowego DNA i Lipofectaminy 2000, o odpowiednich stężeniach, przygotowano w pożywce hodowlanej Neurobasal A suplementowanej GlutaMAX (1:100). Mieszaniny inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Z płytki hodowlanej znad neuronów odebrano pożywkę i umieszczano na czas transfekcji w 37°C. Pożywkę zastąpiono pożywką Neurobasal A z GlutaMAX. Transfekcję przeprowadzono przez dodanie mieszaniny DNA i lipofectaminy w proporcji 1:10 do każdego dołka płytki hodowlanej. Po 45 minutach inkubacji w temperaturze 37°C (5 % stężeniu CO₂ i 95 % wilgotności), pożywkę z lipofektaminą usuwano i zastępowano zachowaną wcześniej pożywką. Neurony hodowano w inkubatorze w podanych wyżej warunkach.

Nukleofekcję DNA do neuronów P0 przeprowadzono z użyciem zestawu Rat Neuron Nucleofector™ Kit (Lonza). Do probówki typu Eppendorf o objętości 1,5 ml dodano po 0,5 μ g DNA konstruktów plazmidowych wariantów dla MKL1 lub MKL2. Następnie wyizolowane szczurze pierwotne neurony korowe rozdzielono po 4×10^6 komórek do nowych probówek typu Eppendorf. Komórki zwirowano przez 2 minuty przy 80 g. Nadsącz usunięto. Przygotowano mieszaninę do nukleofekcji w proporcji 9:2 (Nucleofector Solution: Supplement

1), po 100 μ l/elektroporacja. Osad komórkowy rozbito przez pipetowanie 100 μ l mieszaniny do nukleofekcji. Całość przeniesiono do probówek z odmierzoną wcześniej DNA, wymieszano i wprowadzono do kuwety z zestawu firmy Lonza. Elektroporację przeprowadzono z użyciem programu do transfekcji szczurzych neuronów hipokampa (O-003). Zawartość kuwety pobrano przy pomocy dostarczonej przez producenta pipety pasterowskiej z cienką, mocno zwężoną końcówką i wprowadzono do nowej probówki. Dodano 0,5 ml ogrzanej wcześniej pożywki hodowlanej Neurobasal A z B27 (stężonym 1 \times), GlutaMAX (1 \times) i antybiotykami (0,2 \times). Komórki wysiewano po $0,5 \times 10^6$ kom/dołek na płytce 24-dołkowej. Inkubowano 2 godziny w inkubatorze w temperaturze 37°C, 5% CO₂, 95 % wilgotność. Po tym czasie pożywkę hodowlaną (NB-A) wymieniono na świeżą. Hodowlę prowadzono przez kolejne 5 dni, a następnie użyto do dalszych eksperymentów.

3.2.6 Transdukcja neuronów wektorami wirusowymi AAV

Wirusy wyprodukowane zostały w Pracowni Modeli Zwierzęcych Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN. Transdukcję z użyciem cząsteczek wirusa przeprowadzano stosując wirusy związane z adenowirusami (AAV) o mianie 10⁶, rozcieńczone do ilości 100 m.o.i (cząsteczek wektora wirusowego) na komórkę. Transdukcję prowadzono w 5-7 dniu po założeniu hodowli, w pożywce Neurobasal A. Do płytki hodowlanej dodano zawiesinę odpowiedniego wektora wirusowego AAV-CaMKII α -mCherry (CTR) lub AAV - CaMKII α -CRE (CRE). Hodowlę neuronów prowadzono w inkubatorze w temperaturze 37°C i 5 % stężeniu CO₂ do dnia 21.

3.2.7 Wyprowadzanie i hodowla ludzkich komórek iPS

Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste użyte do badań wyprowadzono w Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie w zespole prof. Jaworskiego. Biopsje skóry właściwej, z których wyizolowano fibroblasty, pobrano od zdrowych kobiet w wieku 10 i 30 lat (IIMC*Bi*001-A/ELE10/3.4. i IIMC*Bi*002-A/ELE30/3.2., odpowiednio) w Instytucie „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”, w Klinice Neurologii i Epidemiologii. Uzyskane fibroblasty przeprogramowano przy użyciu wektora lentiwirusowego STEMCCA dostarczającego OCT4, KLF4, SOX2 i C-MYC.

Komórki iPS wysiewano w pożywce Essential 8 na płytce 6-dołkowe pokryte macierzą zewnątrzkomórkową (Matrigel) w obecności 10 μ M inhibitora kinazy białkowej związanej z Rho (ROCK), blokującego apoptozę zdysocjowanych komórek oraz zwiększającego ich przeżywalność. Po 24 godzinach komórki hodowano w pożywce bez dodatku inhibitora ROCK.

Pożywkę zmieniano co 24 godziny do osiągnięcia 70-80 % konfluencji, jednocześnie kontrolując czy formowane na płytce kolonie nie łączą się ze sobą. Komórki hodowano w inkubatorze w temperaturze 37°C, 5 % CO₂ i 95 % wilgotności. Komórki iPS pasażowano co 3-4 dni w stosunku 1:6 – 1:8, przy pomocy nieenzymatycznego odczynnika do dysocjacji komórek roztworu EDTA - Versene. Komórki bankowano przy użyciu pożywki do mrożenia Bambanker (Lyphotec) z dodatkiem inhibitora ROCK, a rozmrażano przez szybkie ogrzanie w łaźni wodnej, a następnie zwirowanie komórek (400g, 5 minut), odciążenie pożywki krioprotekcyjnej i wysianie w pożywkę hodowlanej Essential 8 z ROCK inhibitorem.

Hodowle komórek iPS regularnie testowano na obecność mykoplazmy za pomocą metody PCR. Znad 48 godzinnej hodowli komórek iPS pobrano pożywkę. Inkubowano w temperaturze 95°C przez 5 minut, a następnie wirowano przy prędkości 16 000g, 5 minut. Nadsącz przeniesiono do nowych probówek typu eppendorf. Do reakcji PCR użyto 2 µl pożywki znad komórek oraz specyficznych starterów do wykrywania mykoplazmy. Uzyskany w pierwszej reakcji PCR produkt rozcieńczono 10 × i użyto jako matrycę do przeprowadzenia drugiej reakcji PCR.

nazwa startera	sekwencja Forward/Reverse (5'-3')
Mycoplasma testing PCR1	ACACCATGGGAGGTGGTAAT/ CTTCATCGACTTTCAGACCCA
Mycoplasma testing PCR2	GGGAGCAAACAGGATTAGAT/ TGCACCATCTGTCCTCTGTT

Tabela 5. Sekwencje starterów wykorzystanych w reakcji PCR sprawdzającej obecność mykoplazmy w komórkach.

3.2.8 Metoda formowania kul zarodkowych

Formowanie kul zarodkowych przeprowadzono zgodnie z protokołem Lin i Chen (2014). Ludzkie komórki iPS wysiewano w gęstości 6×10^3 komórek/dolek na okrągłodenną płytkę 96-dolekową w pożywkę Essential 6 z inhibitorem ROCK oraz w obecności alkoholu poliwinylowego (PVA), aby zapobiec adhezji komórek do ścianek płytki. Naczynie hodowlane zwirowano przy prędkości 100g przez 3 minuty, a następnie umieszczono w inkubatorze w temperaturze 37°C, 5 % zawartości CO₂ i 95 % wilgotności. Po 24 godzinach pożywkę zmieniono na Essential 6. Pożywkę zmieniano co 2-3 dni przez kolejne 11 dni. Następnie część sferycznych kolonii utrwalono przez 10 minut 4 % PFA z 4 % sacharozą w roztworze PBS, po czym przepłukano 3 razy roztworem PBS. Z pozostałej reszty kul zarodkowych wyizolowano RNA, które przechowywano do dalszych doświadczeń.

3.2.9 Analiza krótkich tandemowych powtórzeń (STR)

W celu potwierdzenia zgodności profilu wykorzystywanych do badań komórek iPS z fibroblastami, z których pochodzą przeprowadzono analizę krótkich tandemowych powtórzeń. Badania przeprowadzono w Małopolskim Centrum Biotechnologii w grupie prof. Wojciecha Branickiego. Genomowe DNA wyizolowane z fibroblastów oraz komórek iPS za pomocą komercyjnie dostępnego zestawu DNeasy Blood i Tissue Kit (Qiagen) poddano amplifikacji markerów mikrosatelitarnych (STR) z zastosowaniem zestawu GenePrint® 10 System (Promega). Rozdział elektroforetyczny przeprowadzono w aparacie 3500 Genetic Analyzer firmy Life Technologies. Wyniki genotypowania analizowano z zastosowaniem programu GeneMapper v 5.0 (Life Technologies) oraz bazy danych DSMZ. Zbadano 10 loci: D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, vWA, TH01, Amelogenin, TPOX, CSF1PO, D21S11.

3.2.10 Analiza integracji wirusa z genomem iPSC

W celu sprawdzenia ekspresji transgenu wirusowego, który został zastosowany do przeprogramowania komórek iPS, oraz analizy, czy zachodzi ekspresja endogennych czynników pluripotencji, przeprowadzono izolację RNA z ustabilizowanych linii komórek iPS przy wykorzystaniu komercyjnego zestawu RNeasy Mini Kit. Następnie przepisano je na cDNA (SuperScript IV First-Strand Synthesis System) zgodnie z zalecaniami producenta. Kontrolę pozytywną stanowiły fibroblasty 48 godzin po transdukcji lentiwirusem do przeprogramowywania STEMCCA oraz plazmid EF1 α -STEMCCA użyty do produkcji wirusa STEMCCA. Negatywną kontrolą były fibroblasty nietransdukowane wirusem. Przeprowadzono amplifikację cDNA metodą PCR stosując specyficzne startery zaprojektowane do sekwencji występujących w analizowanych wirusie. Do analizy czynników pluripotencji wykorzystano startery do sekwencji 3'UTR genów OCT4 i SOX2, a także genów REX1 i DNMT3B, które nie były częścią kasety przeprogramującej wirusa. Elektroforezę otrzymanych produktów przeprowadzono w 2 % żelu agarozowym w obecności barwnika kwasów nukleinowych Midori Green przy stałym napięciu 120V i czasie 35 minut. Detekcję produktów prowadzono w świetle UV.

nazwa startera	sekwencja Forward/Reverse (5'-3')
STEMCCA cMYC FR/ STEMCCA WPRE REV	GGA ACTCTTGTGCGTAAGTCGATAG/ GGAGGCGGCCCAAAGGGAGATCCG
OCT4_3'UTR	AGTTTGTGCCAGGGTTTTTTG/ ACTTCACCTTCCCTCCAACC
SOX2_3'UTR	GGGAAATGGGAGGGGTGCAAAGAGAG/ TTGCGTGAGTGTGGATGGGATTGGTG
REX1	CAGATCCTAACAGCTCGCAGAAT/ GCGTACGCAAATTAAGTCCAGA
DNMT3B	TGCTGCTCACAGGGCCCGATACTTC/ TCCTTTCGAGCTCAGTGCACCACAAAAC
GAPDH	GTGAAGGTCGGAGTCAACG/ GGTGGAATCATATTGGAACATG

Tabela 6. Sekwencje starterów użyte do analizy ekspresji transgenu wirusowego oraz czynników pluripotencji w komórkach iPS.

3.2.11 Różnicowanie komórek iPS w neurony

Różnicowanie komórek iPS do neuralnych komórek macierzystych (NSC) przeprowadzono z użyciem metody podwójnego hamowania białek SMAD (ang. *dual SMAD inhibition*). Ludzkie komórki iPS hodowano na płytkach 6-dółkowych do momentu uzyskania 70-80 % konfluencji, a następnie pasażowano roztworem akutazy i wysiewano w gęstości 2×10^5 kom/cm² na płytkę 12-dółkową opłaszczoną macierzą zewnątrzkomórkową (Matrigel) w pożywce Essential 8 z ROCK inhibitorem. Po 24 godzinach i osiągnięciu 90-95 % konfluencji komórki różnicowano wg schematu zamieszczonego poniżej. Skład zastosowanych pożywek hodowlanych przedstawiono w tabelach poniżej.

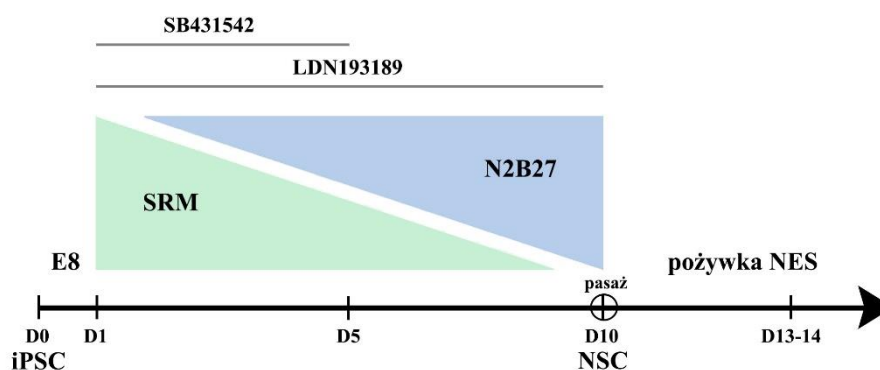


Fig.8. Schemat różnicowania komórek iPS do neuralnych komórek macierzystych metodą podwójnego hamowania SMAD. E8- pożywka Essential 8; SRM, N2B27 - pożywka do różnicowania komórek; NES- pożywka do hodowli neuralnych komórek macierzystych; SB431542, LDN193189 - inhibitory ścieżek sygnałowych TGFβ i BMP; D0, D1, D5, D10, D13-14 - poszczególne dni procesu różnicowania.

SRM

	na 50 ml
DMEM/F12	38 ml
KnockOut Serum Replacement	10 ml
100 × GlutaMAX	0,5 ml
100 × NNEA	0,5 ml
100 × antybiotyki: Pen/Strep	0,5 ml
200 mM pirogronian sodu	0,5 ml
55 mM β-merkaptoetanol	90 μl

N2B27

	na 50 ml
DMEM/F12	23,75 ml
Neurobasal	23,75 ml
100 × GlutaMAX	0,5 ml
100 × antybiotyki: Pen/Strep	0,5 ml
N2 Supplement	0,5 ml
B27 Supplement bez wit.A	1 ml

NES

	na 50 ml
DMEM/F12	48 ml
100 × GlutaMAX	0,5 ml
100 × antybiotyki: Pen/Strep	0,5 ml
N2 Supplement	0,5 ml
B27 Supplement	0,5 ml
100 ng/μl EGF	10 μl
100 ng/μl βFGF	10 μl

Przygotowane na 12-dołkowej płytce hodowlanej, konfluentne komórki iPS, różnicowano przez 10 dni. Pierwszego dnia pożywkę hodowlaną Essential 8 zmieniono na pożywkę SRM (100 %). Następnie przez 2 dni do komórek dodawano codziennie mieszaninę pożywek 75 % SRM i 25 % N2B27. Dnia 4 i 5 różnicującym komórkom zmieniano pożywkę na 50 % SRM i 50 % N2B27. Kolejne 2 doby dodawano 25 % SRM i 75 % N2B27, a 8 i 9 dnia hodowli zmieniono pożywkę na 100 % N2B27. Pożywki lub ich mieszaniny suplementowano inhibitorem szlaku BMP (200 nM LDN193189) przez cały czas różnicowania. Inhibitor szlaku TGFβ (10 μM SB431542) dodawano do hodowli przez pierwsze 5 dni. 10 dnia hodowlę pasażowano roztworem EDTA-Versene w stosunku 1:2 i wysiewano na płytki opłaszczony macierzą zewnątrzkomórkową w pożywce hodowlanej NES z dodatkiem inhibitora ROCK. Po 24 godzinach komórki hodowano w pożywce bez dodatku inhibitora ROCK. Uzyskane neuralne komórki macierzyste pasażowano w stosunku 1:3 - 1:4 co 3-4 dni przy użyciu akutazy.

NSC po trzecim pasażu różnicowano w neurony. Hodowlę prowadzono w inkubatorze w temperaturze 37°C, 5 % CO₂, 95 % wilgotności.

NSC różnicowano do neuronów na warstwie odżywczej szczurzych, pierwotnych neuronów. W celu rozróżnienia neuronów ludzkich od szczurzych, NSC transdukowano wirusem TRIP-PGK-GFP. GFP pozytywne, ludzkie komórki NSC odklejało od podłoża akutazą i wysiewano w pożywkę do hodowli neuronów w gęstości 2×10^3 kom/cm² na szkiełka z siedmiodniowymi szczurzymi hodowlami neuronalnymi. Hodowlę prowadzono przez trzy tygodnie w atmosferze 37°C, 5 % CO₂, 95 % wilgotności. Po tym czasie komórki utrwalono roztworem 4 % PFA w PBS przez 10 minut.

3.2.12 Metody wyciszania genu *Srf* w neuronach mysich i ludzkich

W celu wyciszenia SRF *in vitro* użyto mysie neurony hipokampa uzyskane z myszy transgenicznymi, u których gen *Srf* otoczony jest miejscami loxP (SRF^{fl}; B6.129S6-Srftm1Rmn/J). W 5 dniu hodowli neurony transfekowano plazmidem kodującym Cre rekombinazę pod kontrolą promotora CaMKII α , lub plazmidem kontrolnym kodującym GFP (wariant CRE: CaMKII-Cre (0,025 μ g) i CaMKII-GFP (0,1 μ g) oraz wariant kontrolny: CaMKII-GFP (0,125 μ g)). W wariacie doświadczeń, w których stosowano nadprodukcję miRNA, dodatkowo do komórek wprowadzano mikroRNA-132 (Qiagen, YI04102731-AFA) oraz kontrolę negatywną dla miR-132 (mimic negative, (Qiagen, YI00199006-ADA) w stężeniu 5 pM. Kontrola negatywna w >70 % nie wykazywała homologii z jakąkolwiek sekwencją, w jakimkolwiek organizmie, zgodnie z bazami danych NCBI i miRBase. Do transfekcji użyto Lipofectaminę 2000 (Thermo Scientific, 11668019), zgodnie z zaleceniami producenta. Po osiągnięciu przez neurony dojrzałości, w 21 dniu hodowli, komórki utrwalono. W przypadku badań biochemicznych, 5 dnia hodowli, neurony były transdukowane wirusami AAV- CaMKII-Cre i AAV-CaMKII-mCherry. W dniu 21 hodowli z komórek izolowano RNA do dalszych analiz.

W hodowlach NES wyciszenie SRF przeprowadzono z użyciem shRNA wprowadzonego do komórek za pomocą wektorów lentiwirusowych (opisane w rozdziale 3.2.3). Komórki inkubowano z wirusem LV- pLKO-shCTR lub LV- pLKO-shSRF (o mianie $\geq 1 \times 10^6$) przez 2 godziny, a następnie zmieniono na świeżą pożywkę NES. Drugiego dnia po transdukcji przeprowadzono 24-godziną selekcję antybiotykową komórek przy zastosowaniu puromycyny (1 μ g/ml).

nazwa	zastosowanie
pCaMKII-GFP	kontrola
pCaMKII-Cre+ pCaMKII-GFP	wyciszenie SRF w neuronach z myszy SRF ^{f/f}
LV- pLKO-shCTR	kontrola
LV- pLKO-shSRF	wyciszenie SRF w neuralnych komórkach macierzystych

Tabela 7. Plazmidy stosowane do wyciszania genu *Srf* oraz ich zastosowanie.

3.2.13 Barwienia immunofluorescencyjne

W celu wykrycia białek metodą immunofluorescencyjną komórki utrwalano przez 10 minut w roztworze 4 % paraformaldehydu (PFA) z 4 % sacharozą w PBS w temperaturze 37°C. Następnie komórki płukano trzy razy roztworem PBS. Permeabilizację błon komórkowych przeprowadzono z użyciem od 0,1 % do 0,3 % Tritonu X-100 w PBS przez 10 min w zależności od użytego przeciwciała. W celu zablokowania niespecyficznego wiązania przeciwciał, neurony inkubowano przez godzinę w 10 % roztworze surowicy końskiej (HS) w PBS lub przez 30 minut w 5 % roztworze BSA w przypadku komórek iPSC. Komórki inkubowano z przeciwciałami pierwszorzędowymi i drugorzędowymi rozcieńczonymi w 5 % roztworze HS lub 3 % roztworze BSA. W przypadku ludzkich neuronów inkubację z przeciwciałami pierwszo i drugorzędowymi prowadzono w roztworze 1 × GDB (30 mM PBS, 0,6 % Triton X-100, 0,2 % żelatyna, 0,9 M NaCl). Jądra komórkowe barwiono DAPI lub Hoechst 33342. Preparaty obrazowano w mikroskopie konfokalnym Leica SP8 lub w mikroskopie fluorescencyjnym Leica AF7000. Pomiar intensywności fluorescencji komórek wykonano w programie Fiji.

3.2.14 Pomiar aktywności transkrypcyjnej

Wpływ wariantów MKL1 lub MKL2 na aktywność fragmentu promotora zawierającego miejsca wiązania dla czynnika transkrypcyjnego SRF określono badając pomiar aktywności lucyferazy i β -galaktozydazy. Do pomiarów wykorzystano komercyjnie dostępne zestawy firmy Promega: Luciferase Assay System, 5 x Reporter Lysis Buffer, zgodnie z zaleceniami producenta, oraz przygotowany wcześniej bufor dla enzymu β -galaktozydazy - 2 × Assay Buffer (1,33 mg/ml ONPG, 200 mM fosforan sodu (pH = 7,3), 2 mM MgCl₂, 100 mM β -merkaptioetanol). Szczurze neurony korowe poddano nukleofekcji plazmidem zawierającym gen β -galaktozydazy pod kontrolą promotora EF1 α (warunkujący ekspresję na stałym poziomie, w celu określenia wydajności procesu transfekcji) oraz plazmidem reporterowym, w którym gen lucyferazy jest pod kontrolą promotora zawierającego miejsca wiązania SRF (5 × SRE) oraz plazmidami zawierającymi warianty MKL1 lub MKL2. Piątego

dnia po elektroporacji neurony stymulowano rekombinowanym czynnikiem neurotroficznym pochodzenia mózgowego (BDNF) 10 ng/ml w 0,1 % roztworze albuminy bydlęcej (BSA) w PBS przez 6 godzin. Komórki kontrolne traktowano 0,1 % roztworem BSA w PBS. Aktywność lucyferazy i β -galaktozydazy oznaczono za pomocą pomiaru luminescencji. Metodą kolorymetryczną zmierzono aktywność β -galaktozydazy. Pomiaru absorbancji dokonano w czytniku mikroplątek Sunrise firmy Tecan, przy długości fali 420 nm, w stosunku lizatu do buforu 1:1. Luminescencję zmierzono przy użyciu czytnika Infinite M200 (Tecan), dodając przed pomiarem do lizatów komórkowych substrat dla lucyferazy w stosunku 1:5. Pomiaru dokonywano przez 2000 ms/dołek. Aktywność transkrypcyjną promotora obliczono jako stosunek luminescencji do absorbancji. Wyniki znormalizowano względem komórek niestymulowanych BDNF.

3.2.15 Izolacja RNA

Do izolacji całkowitego RNA zastosowano zestaw firmy Qiagen: RNeasy Mini Kit. W celu usunięcia genomowego DNA preparaty trawiono DNazą. Procedurę izolacji przeprowadzono zgodnie z protokołem producenta, z drobnymi modyfikacjami. Do lizy hodowli neuronów użyto połowę zalecanej objętości buforu RLT (175 μ l/ 3,8 cm²). Do izolacji całkowitego RNA z zachowanym miRNA użyto komercyjnie dostępnego zestawu firmy Qiagen: miRNeasy Micro Kit. RNA izolowano przez ekstrakcję roztworem fenolu i tiocyjanianu guanidyny zgodnie z zaleceniami producenta. Stężenie RNA mierzono spektrofotometrycznie. Próbę ślepą stanowiła woda wolna od RNaz.

3.2.16 Odwrotna transkrypcja, ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-qPCR) oraz łańcuchowa reakcja polimerazy z odwrotną transkrypcją (RT-PCR)

Wyizolowane RNA poddano reakcji odwrotnej transkrypcji używając zestawu Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit lub SuperScript IV First-Strand Synthesis System zgodnie z zaleceniami producenta. Do badania poziomu miRNA wykorzystano komercyjnie dostępne sondy miRNA TaqMan, umożliwiające kwantyfikację dojrzałych form miRNA oraz TaqMan Fast Advanced Master Mix. Referencyjne miRNA zostały wybrane na podstawie wyników analizy mikromacierzy miRNA pochodzącego z hodowli pierwotnej neuronów hipokampa z wyciszoną ekspresją *Srf* wykonanych w Pracowni Neurobiologii. Profilowanie miRNA zostało wykonane przez firmę EXIQON na macierzy miRCURY™ LNA. Próbkę znakowano przy użyciu zestawu miRCURY LNA™ microRNA Hi-Power Labeling Kit, Hy3™/Hy5™

i hybrydyzowano z wykorzystaniem zestawu miRCURY LNA™ microRNA Array (7th Gen). Wyniki RT-qPCR, przedstawiające ilościową analizę poziomu miRNA, normalizowano względem miRNA referencyjnych (mikroRNA-125 oraz mikroRNA-139). W przypadku ilościowego badania poziomu mRNA w komórkach używano fluorochromu Fast SYBR Green Master Mix oraz starterów rozpoznających badane geny (Tabela 8). Reakcję RT-qPCR przeprowadzono z użyciem StepOne Real-Time PCR System. Wyniki normalizowano względem genu referencyjnego, endogennej kontroli GAPDH. Zmiany w poziomie mRNA i miRNA obliczano przy zastosowaniu metody relatywnej (komparatywnej) $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Wyniki przedstawiono jako różnicę zmiany poziomu ekspresji miRNA docelowych w stosunku do miRNA referencyjnych.

Reakcję RT-PCR przeprowadzano używając polimerazy DNA (GoTaq G2) oraz specyficznych starterów (Tabela 9), z użyciem termocyklera (Mastercycler 5332 firmy Eppendorf). Otrzymane produkty syntezy analizowano w 2 % żelu agarozowym w obecności barwnika kwasów nukleinowych Midori Green przy stałym napięciu 120V i czasie 35 minut. Detekcję produktów prowadzono w transiluminatorze w świetle UV.

nazwa startera	sekwencja Forward/Reverse (5'-3')
NANOG	CCAACATCCTGAACCTCAGC/ TTCGTCACACCATTTGCTATT
OCT4	GGAGGAAGCTGACAACAATGAAA/ GGCCTGCACGAGGGTTT
SOX2	TGGCGAACCATCTCTGTGGT/ CCAACGGTGTCAACCTGCAT
GAPDH	GTGGACCTGACCTGCCGTCT/ GGAGGAGTGGGTGTCGCTGT

Tabela 8. Lista starterów mRNA użytych w reakcji RT-qPCR z wykorzystaniem barwnika SYBR Green.

	nazwa startera	sekwencja Forward/Reverse (5'-3')
ektoderma	SOX1	TGTAATCACTTTAACGAATGAGTGG/ AGTTTAATGAGAACCGAATTCAGC
	MAP2	CAGGTGGCGGACGTGTGAAAATTGAGAGTG/ CACGCTGGATCTGCCTGGGGACTGTG
mezoderma	Brachyury	GCCCTCTCCCTCCCCTCCACGCACAG/ CGGCGCCGTTGCTCACAGACCACAGG
	HAND1	TGCCTGAGAAAGAGAACCAG/ ATGGCAGGATGAACAAACAC
endoderma	SOX17	CGCTTTCATGGTGTGGGCTAAGGACG/ TAGTTGGGGTGGTCCTGCATGTGCTG
	FOXA2	TGGGAGCGGTGAAGATGGAAGGGCAC/ TCATGCCAGCGCCACGTACGACGAC
	GAPDH	GTGAAGGTCGGAGTCAACG/ GGTGGAATCATATTGGAACATG

Tabela 9. Sekwencje starterów użyte w metodzie RT-PCR.

3.2.17 Izolowanie białek i metoda Western blotting

Pierwotne hodowle neuronów lizowano buforem zawierającym 1 % SDS z inhibitorami proteaz oraz fosfataz. Lizaty komórkowe inkubowano przez 30 min na lodzie. Następnie wirowano 15 000g przez 15 min w celu usunięcia pozostałości komórkowych. Próbkę przechowywano w temperaturze -80°C do dalszych analiz.

Komórki iPS, przed izolacją białek, przepasażowano w stosunku 1:8 na płytkę 6-dółkową pokrytą macierzą zewnątrzkomórkową (Matrigel) i hodowano do 70 - 80 % konfluencji. Materiał zbierano przy użyciu nieenzymatyczny odczynnik do dysocjacji komórek (Versene), wirowano z prędkością 400g przez 5 min w 4°C. Osad komórkowy przepłukano 2 razy zimnym roztworem DPBS. Do lizy użyto zimnego buforu RIPA z inhibitorami proteaz oraz fosfataz. Stężenie białka oznaczano metodą BCA stosując komercyjnie dostępny zestaw firmy Thermo Scientific- Pierce BCA Protein Assay Kit zgodnie z zaleceniami producenta. Próbkę przechowywano w temperaturze -80°C do dalszych analiz.

W celu elektroforetycznego rozdziału białek w warunkach denaturujących metodą Laemmli (SDS-PAGE) przygotowano próbki zawierające jednakową ilość białka (20 µg). Białka denaturowano w obecności buforu 4 × Laemmli Sample Buffer przez 5 min w temperaturze 98°C. Białka rozdzielano w żelu poliakrylamidowym nieciąglym lub w komercyjnie dostępnym żelu firmy Bio-Rad: Any kD Mini-PROTEAN TGX Precast Protein Gels. Elektroforezę prowadzono w buforze Tris-glicyna- SDS przy napięciu 90 V przez 20 min dla żelu zagęszczającego oraz 120 V dla żelu rozdzielającego (8-12 %). Po elektroforezie białka przeniesiono na membranę PVDF aktywowaną metanolem przy zastosowaniu półsuchego

elektrotransferu. Transfer prowadzono w buforze do transferu (25 mM Tris, 192 mM glicyna, 0,05 % SDS, 20 % metanol), przy natężeniu 5 mA/cm² żelu przez 45 minut. Dla zestawu Bio-Rad, rozdzielone białka przeniesiono na gotową do użycia membranę Trans-Blot Turbo Mini 0,2 μm PVDF Transfer Packs (Bio-Rad), kompatybilną z urządzeniem do szybkiego półsuchego transferu Trans Blot Turbo Transfer System (BioRad). Zastosowano program Mix Weight (7 min; 2,5 A). Po zakończeniu transferu, membranę zawierającą białka umieszczano w 10 % roztworze odtłuszczonego mleka w buforze TBST (1×) lub 5 % roztworze BSA w TBST (dla komórek iPS). Błonę PVDF blokowano przez godzinę w temperaturze pokojowej, aby zapobiec niespecyficzej adsorpcji przeciwciał. W kolejnym kroku zablokowaną membranę PVDF inkubowano w temperaturze 4°C przez noc w 5 % roztworze odtłuszczonego mleka lub BSA w TBST z wybranym przeciwciałem pierwszorzędowym o odpowiednim stężeniu. Następnego dnia membranę przepłukano 4 razy po 5 minut w roztworze TBS-T i umieszczano w roztworze przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z peroksydazą chrzanową na 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po tym czasie, błonę PVDF płukano 4 razy po 5 min w roztworze TBS-T. Detekcję białek przeprowadzono przy użyciu zestawu ECL lub ECL Prime (Amersham) na kliszy rentgenowskiej. Czas ekspozycji był uzależniony od rodzaju zastosowanego substratu dla peroksydazy chrzanowej i identyfikowanego białka. Wyniki analizowano densytometrycznie i normalizowano względem poziomu białka GAPDH (hodowle pierwotne) lub β-aktyny (komórki iPS) i przedstawiono jako różnicę poziomu syntezy badanych białek między próbami badanymi, a próbą kontrolną.

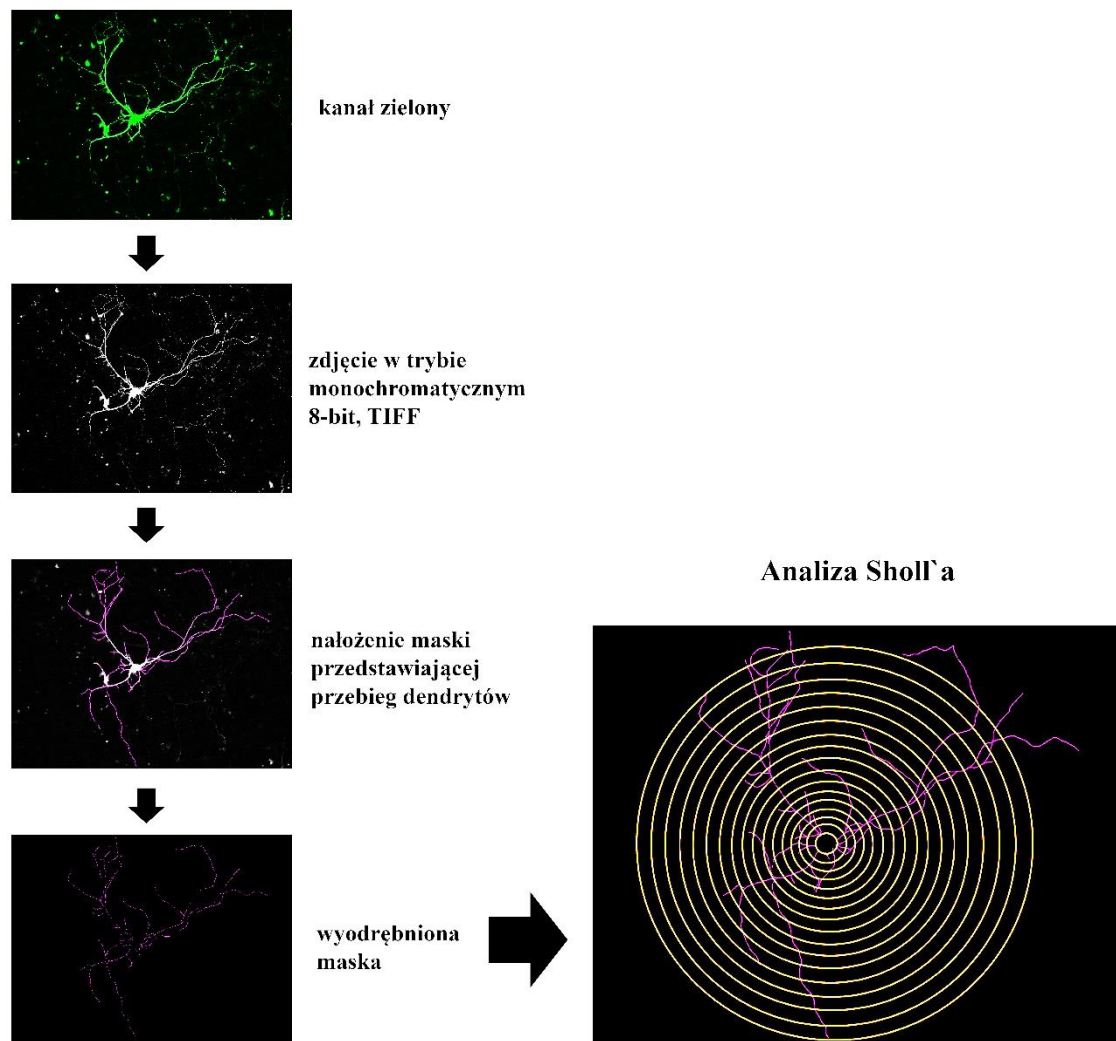
3.2.18 Analiza struktury oraz gęstości kolców dendrytycznych

Do określenia morfologii i gęstości kolców dendrytycznych hodowle pierwotne neuronów hipokampa wyizolowane z myszy SRF^{ff} oraz ze szczurów Wistar wysiewano w gęstości $1,2 \times 10^5$ kom/cm² kom/cm². W celu identyfikacji pojedynczych komórek wprowadzano za pomocą transfekcji lub transdukcji wirusowej konstrukty kodujące białko zielonej fluorescencji (GFP). Utrwalone neurony obrazowano przy pomocy mikroskopu konfokalnego Leica SP8. Obrazy stanowiły średnią arytmetyczną z sumy wartości pikseli dla 4 skanów każdej linii zdjęcia, którą używano jako miarę ogólnego nasycenia kolorów i jasności obrazu. Wielkość piksela wynosiła 70 nm, a zdjęcia zbierano w równomiernych odstępach, co 0,29 μm (*z-step*). Do analizy morfologii kolców dendrytycznych wykorzystano obrazy w formacie *tiff*. GFP pozytywne neurony, wybierane były losowo, po 3-5 komórki o piramidalnym kształcie z każdego szkiełka ($N_{WT} = 5$, $N_{KO} = 7$). Analizie poddano maksymalnie 100 kolców dendrytycznych, znajdujących się na dendrytach II-rzędowych, dla każdego neuronu. Budowa

oraz gęstość określana była za pomocą półautomatycznego programu SpineMagick! (Ruszczycki i in., 2012) oraz skryptu napisanego w programie Python (Jasińska i in., 2016). Kolce dendrytyczne dzielono na 4 grupy: filopodialne, długie, przysadziste oraz grzybkowate. Skrypt uwzględniał następujące parametry: długość, stosunek wielkości do szerokości szyjki, stosunek długości do szerokości szyjki, powierzchnię oraz gęstość (liczba/10 μm). Uzyskane wyniki skorygowano ręcznie w oparciu o wizualne porównanie uśrednionego kształtu kolców. Eksperyment powtórzono dla trzech niezależnych hodowli komórkowych.

3.2.19 Analiza kształtu drzewa dendrytycznego

W analizie drzewa dendrytycznego neuronów uwzględniono trzy parametry: liczbę zakończeń dendrytycznych, sumę długości wszystkich dendrytów analizowanego drzewa oraz analizę Sholla, czyli ilość przecięć dendrytów z współcentrycznymi okręgami o zwiększających się średnicach, a mających swój początek w środku ciała analizowanej komórki (Sholl, 1953). Do analiz zastosowano skrypty: NeuronJ (Meijering i in., 2004) i Sholl Analysis (opracowany w pracowni prof. Jaworskiego). Nakładka NeuronJ pozwala na półautomatyczne określanie przebiegu dendrytów oraz wyodrębnienie maski. Tak przygotowane obrazy poddawane były automatycznej analizie długości zaznaczonych dendrytów, a następnie analizie Sholla. Maksymalna analizowana odległość od ciała komórki wynosiła 500 μm . Średnice kolejnych współcentrycznych okręgów zwiększały się co 10 μm . Na zamieszczonym poniżej schemacie przedstawiono sposób przeprowadzania analizy (Rycina 9). Utrwalone neurony z ekspresją GFP mysie lub ludzkie obrazowano w mikroskopie fluorescencyjnym Leica AF7000 przy użyciu oprogramowania Las AF.



Rycina 9. Schemat obróbki zdjęć wykonany w celu przeprowadzenia analizy drzewa dendrytycznego.

3.2.20 Metody analizy statystycznej i opracowania wyników wykorzystane w pracy

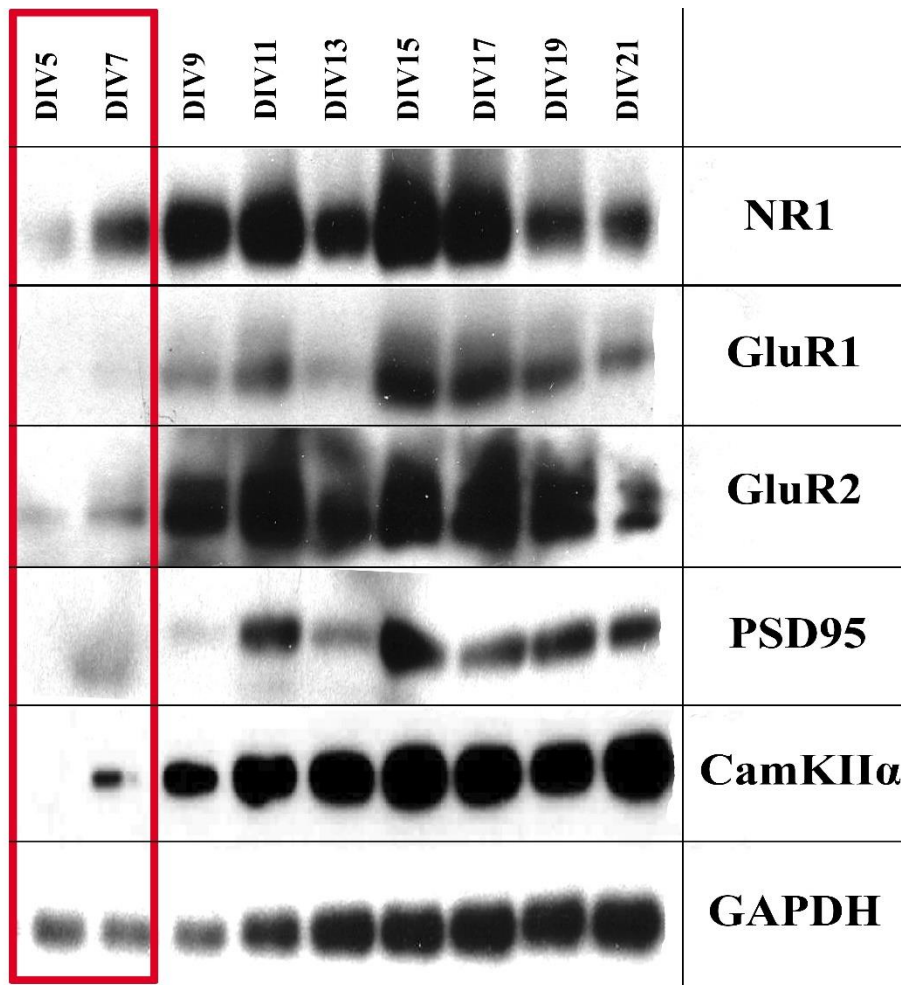
Przedstawione w rozprawie wyniki uzyskano z co najmniej trzech niezależnych powtórzeń biologicznych eksperymentów i przedstawiono jako średnią \pm odchylenie standardowe średniej (SEM). Dla wszystkich wyników sprawdzono normalność rozkładu z zastosowaniem testów: Anderson-Darling, D'Agostino i Pearson, Shapiro-Wilk oraz Kolmogorov-Smirnov. Na ich podstawie wybrano odpowiednią metodę analizy wyników. W celu identyfikacji wartości odstających wykorzystano metodę ROUT, która pozwala identyfikować więcej niż jedną wartość odstającą bazując na współczynniku fałszywego wykrywania (FDR). Dla danych z więcej niż 2 grup zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) z post testem Dunnett'a i 95 % przedziałem ufności. W przypadku analizy wyników dla dwóch grup i braku

rozkładu normalnego zastosowano test Mann'a-Whitney'a. Gdy dane miały rozkład normalny dwie grupy porównywano za pomocą *t*-testu. Analizę Sholla dla danych z więcej niż 2 grup wykonano za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji Two-way ANOVA z korektą Bonferroniego. Pole powierzchni pod krzywą obliczono za pomocą analizy AUC. Pomiary densytometryczne wykonano w programie GelQuantNET. Analizę statystyczną wyników przygotowano w programie GraphPad Prism ver. 8.0.2. Wartość *p* uznano za istotną statystycznie dla $p < 0,05$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Do graficznej prezentacji wyników w postaci paneli wykorzystano program Adobe Photoshop ver. CC. Przedstawione zdjęcia nie zostały poddane modyfikacjom.

4 Wyniki

4.1 Charakterystyka dojrzewania mysich neuronów hipokampa w hodowli in vitro: analiza poziomu wybranych białek synaptycznych

W ramach przedstawionej pracy skoncentrowano się na zbadaniu wpływu SRF, na proces dojrzewania neuronów *in vitro*. Pierwszym krokiem w przeprowadzonych badaniach było ustalenie tempa dojrzewania mysich neuronów w hodowli. W tym celu, począwszy od dnia pierwszego po wysianiu DIV1 (ang. *day in vitro*), aż do DIV23, co dwa dni komórki lizowano, a następnie izolowano białka. Zebrany materiał został poddany analizie przy użyciu techniki Western blottingu, przy zastosowaniu specyficznych przeciwciał, które pozwoliły na identyfikację białek GluA1 i GluA2- podjednostek receptorów AMPA, NR1, podjednostki receptora NMDA, oraz innych białek charakterystycznych dla dojrzałych neuronów. Wyniki badań pokazują, że między piątym a siódmym dniem hodowli, pojawia się ekspresja kinazy CaMKII α , a po jedenastym dniu hodowli stwierdzono obecność białka PSD-95. Receptory dla glutaminianu zaczynają pojawiają się w hodowli od dnia 7 (Rycina 10). Jako kontrolę ilości naniesionych próbek zastosowano endogenne białko GAPDH (dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego), które ulega ekspresji na wysokim poziomie w neuronach. Uzyskane wyniki pozwoliły poznać kinetykę dojrzewania neuronów w hodowli i pomogły określić odpowiedni moment na przeprowadzenie modyfikacji genetycznych komórek.

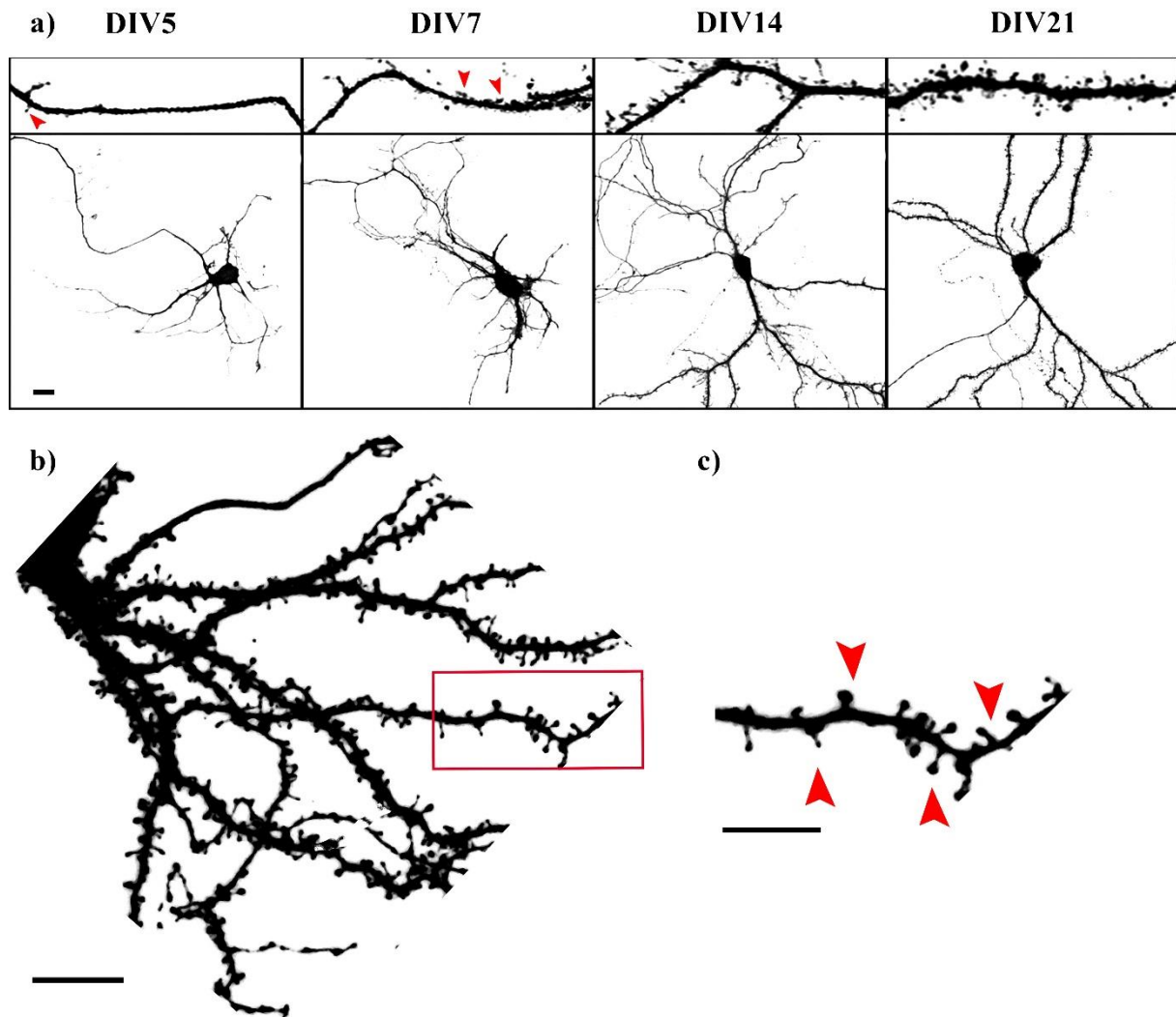


Rycina 10. Poziom ekspresji białek neuronalnych w hodowlach pierwotnych neuronów hipokampa myszy *in vitro*. Analiza Western blotting wykazała wzrost poziomu białek charakterystycznych dla dojrzałych neuronów w kolejnych dniach hodowli. Kontrolę poziomu białka w badanych próbkach przeprowadzono przy użyciu przeciwciała rozpoznającego GAPDH.

4.2 Określenie czasu formowania się kolców dendrytycznych *in vitro*

W celu zbadania dynamiki dojrzewania kolców dendrytycznych *in vitro*, neurony hipokampa w pierwszym dniu hodowli *in vitro*, zostały poddane nukleofekcji. Do neuronów wprowadzono plazmid kodujący białko zielonej fluorescencji (GFP) pod kontrolą promotora CMV, co umożliwiło wizualizację komórek. Następnie, w różnych punktach czasowych (DIV5, DIV7, DIV14, DIV21) komórki utrwalano. W celu wzmocnienia sygnału pochodzącego z białka fluorescencyjnego, neurony dodatkowo barwiono immunofluorescencyjnie z wykorzystaniem przeciwciała specyficznego dla GFP. Przykładowe obrazy zebrane za pomocą mikroskopu konfokalnego zostały zaprezentowane na Rycinie 11. Wykazano, że proces formowania kolców dendrytycznych rozpoczyna się w 7 dniu hodowli. W kolejnych

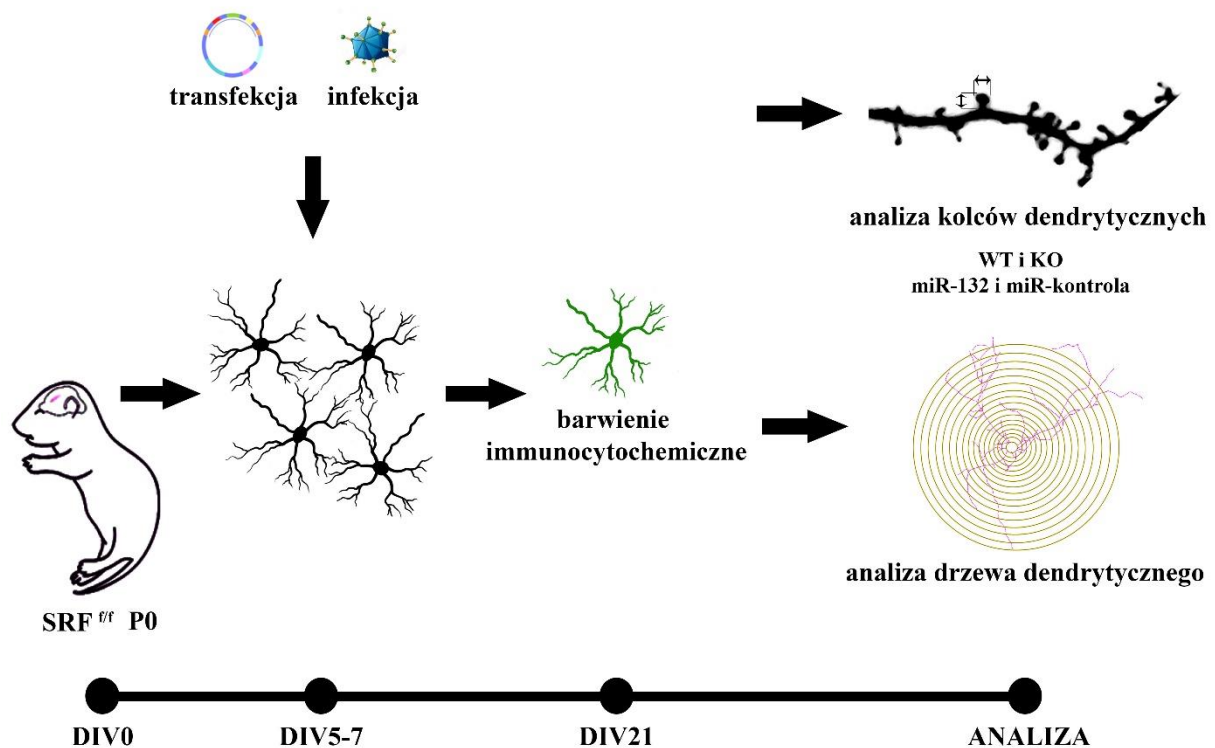
dniach obserwuje się ich dojrzewanie, a w dniu 21 pojawiają się głównie kolce o kształcie grzybkowatym (Rycina 11). Badania te umożliwiły określenie odpowiedniego przedziału czasowego, w którym można przeprowadzić manipulacje genetyczne, w celu zbadania wpływu białka SRF na proces powstawania i dojrzewania kolców dendrytycznych.



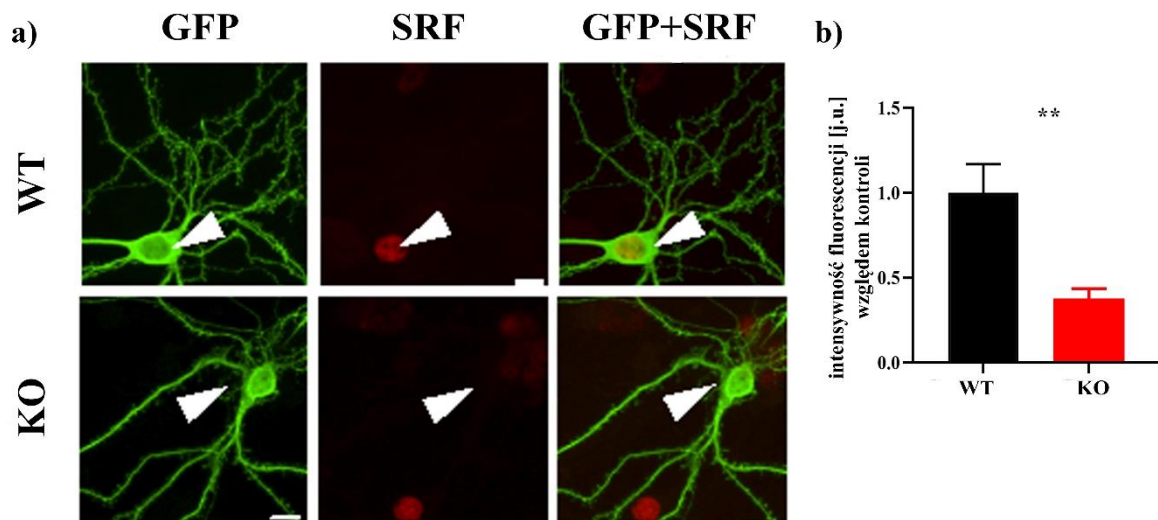
Rycina 11. Proces kształtowania drzewa dendrytycznego oraz formowania i dojrzewania kolców dendrytycznych w mysim modelu hodowli neuronów hipokampa *in vitro*. (a) Przykładowe zdjęcia mikroskopowe neuronów hipokampa utrwalonych w różnych punktach czasowych, przedstawiające proces rozwoju drzewa dendrytycznego oraz tworzenie kolców dendrytycznych. Skala: 10 μ m. (b) Zdjęcie mikroskopowe mysiego, dojrzałego neuronu hipokampa (DIV21). Czerwoną ramką zaznaczono powiększony fragment dendrytu. Skala: 5 μ m (c) Czerwonymi strzałkami oznaczono kolce dendrytyczne na dendrycie w 21 dniu hodowli. Skala: 5 μ m

4.3 Inaktywacja genu *SRF* w neuronach mysich o genotypie *SRF^{ff}*.

Poznanie dynamiki rozwoju mysich neuronów w hodowli umożliwiło wyznaczenie czasu rozpoczęcia doświadczeń mających na celu wyciszenie ekspresji SRF, aby zbadać jego wpływ na dojrzewanie neuronów. Do doświadczeń użyto komórki wyizolowane z hipokampów osesków myszy transgeniczných *Srf* (*SRF^{ff}*, P0), w których dochodzi do delecji genu *Srf* w obecności rekombinazy Cre. W dniu 5-7 hodowli *in vitro* neurony zostały poddane transfekcji, z użyciem lipofektaminy, plazmidami zawierającymi gen *Cre* rekombinazy pod promotorem CaMKII α i CMV-GFP (grupa doświadczalna) lub pustym plazmidem i CMV-GFP (grupa kontrolna). Schemat przeprowadzanego doświadczenia został przedstawiony na Rycinie 12. Poziom wyciszenia białka SRF w dojrzałych neuronach (DIV21) oceniano na podstawie barwienia immunofluorescencyjnego z użyciem specyficznych przeciwciał rozpoznających białko SRF oraz GFP, w celu identyfikacji komórek transfekowanych. W neuronach transfekowanych plazmidem zawierającym Cre rekombinazę wykazano istotne statystycznie zmniejszenie poziomu ekspresji białka SRF w jądrze komórkowym w porównaniu do komórek kontrolnych (Rycina 13).



Rycina 12. Schemat doświadczeń przeprowadzonych w celu oceny wpływu obniżenia poziomu białka SRF na dojrzewanie neuronów. Hodowle neuronów hipokamp (DIV0) wyprowadzono z mysich osesków P0. W celu wyciszenia SRF neurony transfekowano Cre rekombinazą lub plazmidem kontrolnym. Dojrzałe komórki (DIV21) zostały poddane immunofluorescencyjnemu barwieniu przeciwciałami skierowanymi przeciwko endogennemu białku SRF i wprowadzonemu na plazmidzie GFP. Następnie przeprowadzono analizę budowy kolców dendrytycznych oraz drzewek dendrytycznych w neuronach hipokampa kontrolnych oraz z obniżonym poziomem białka SRF

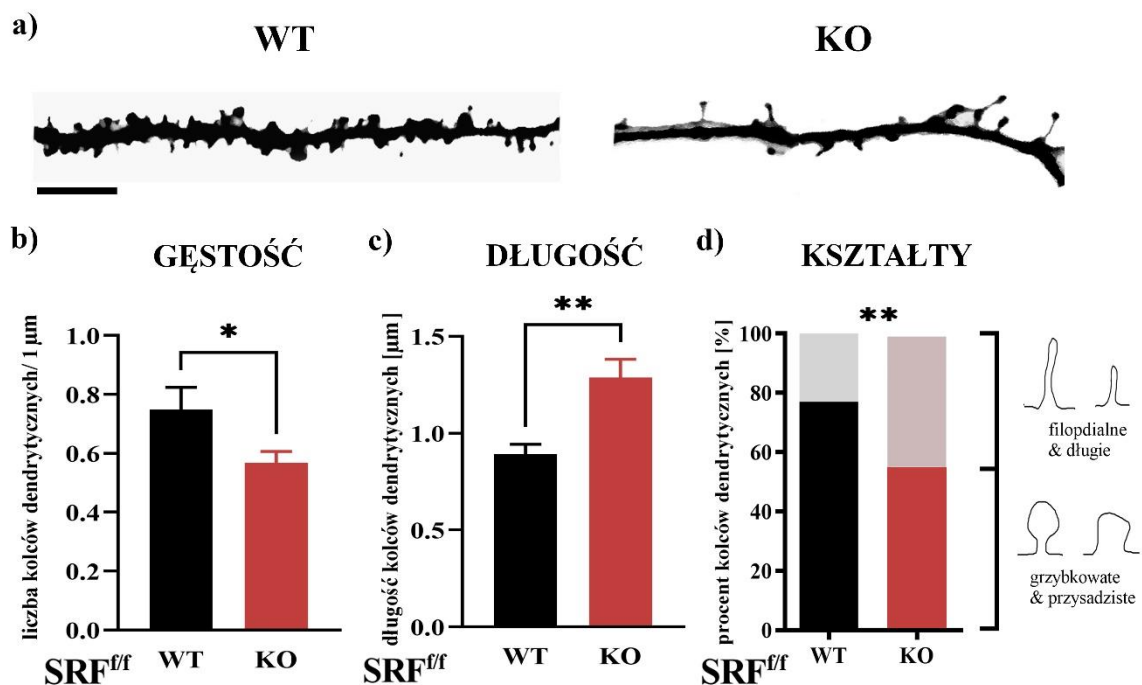


Rycina 13. Wyciszenie ekspresji genu *Srf* w neuronach hipokampa myszy w hodowli pierwotnej transfekowanej Cre rekombinazą *in vitro*. (a) Przykładowe zdjęcia mysich neuronów hipokampa transfekowanych plazmidem kontrolnym lub plazmidem kodującym Cre rekombinazę. Neurony zostały wybarwione przeciwciałem wykrywającym endogenne białko SRF (kolor czerwony). Białe strzałki wskazują stransfekowane komórki. Skala: 10 μ m (b) Analiza poziomu ekspresji białka SRF w hodowli neuronów z hipokampa myszy $Srf^{f/f}$ transfekowanych Cre rekombinazą lub plazmidem kontrolnym. Wykres przedstawia średnią intensywność fluorescencji wybarwionego immunofluorescencyjnie białka SRF w komórkach kontrolnych lub w komórkach stransfekowanych plazmidem kodującym Cre rekombinazę. Różnice statystyczne obliczono za pomocą testu t-studenta. Dane przedstawiono jako średnie \pm SEM. n = 10 komórek/ grupa, ** p < 0,01.

4.4 Analiza wpływu delecji genu *Srf* na plastyczność strukturalną kolców dendrytycznych

Stworzenie modelu wyciszenia genu *Srf* w neuronach wyizolowanych z myszy o genotypie $Srf^{f/f}$ pozwoliło na zbadanie jego udziału w dojrzewaniu neuronów *in vitro*. W pierwszym etapie doświadczenia analizowano wpływ obniżenia poziomu SRF na budowę kolców dendrytycznych. W celu weryfikacji roli SRF w regulacji procesu dojrzewania kolców dendrytycznych, neurony DIV5-7 transfekowano plazmidem kontrolnym lub kodującym rekombinazę Cre. Oba warianty eksperymentalne transfekowano także plazmidem GFP, co umożliwiło wizualizację pojedynczych neuronów oraz dokładną analizę ich kształtu. W 21 dniu hodowli neurony utrwalono i poddano barwieniu immunofluorescencyjnemu z przeciwciałem specyficznym dla białka GFP, dla uzyskania lepszej jakości obrazu. Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego analizowano z użyciem programu SpineMagick!. Dla każdego neuronu zaznaczono ok. 200 kolców dendrytycznych. Wyniki przeprowadzonych analiz pokazały

istotny statystycznie spadek gęstości kolców dendrytycznych w neuronach pozbawionych SRF w porównaniu z grupą kontrolną (Rycina 14). Ponadto, zaobserwowano wzrost całkowitej długości kolców dendrytycznych. W kolejnym etapie sprawdzono, czy brak ekspresji SRF wpływa na kształt kolców dendrytycznych, który jest powiązany ich dojrzałością. W tym celu, kolce dendrytyczne zostały podzielone na dwie grupy: kolce dojrzałe o kształcie grzybkowatym lub przysadzistym, oraz kolce niedojrzałe o kształcie filopodialnym lub wydłużonym (Jasińska i in., 2016). Przeprowadzona analiza wykazała procentowy wzrost częstości występowania kolców o niedojrzałej strukturze w neuronach z obniżonym poziomem SRF w porównaniu do komórek kontrolnych. Podsumowując, neurony pozbawione SRF charakteryzowały się zmniejszoną gęstością kolców dendrytycznych i procentowym spadkiem udziału kolców dojrzałych, tj. grzybkowatych i przysadzistych.

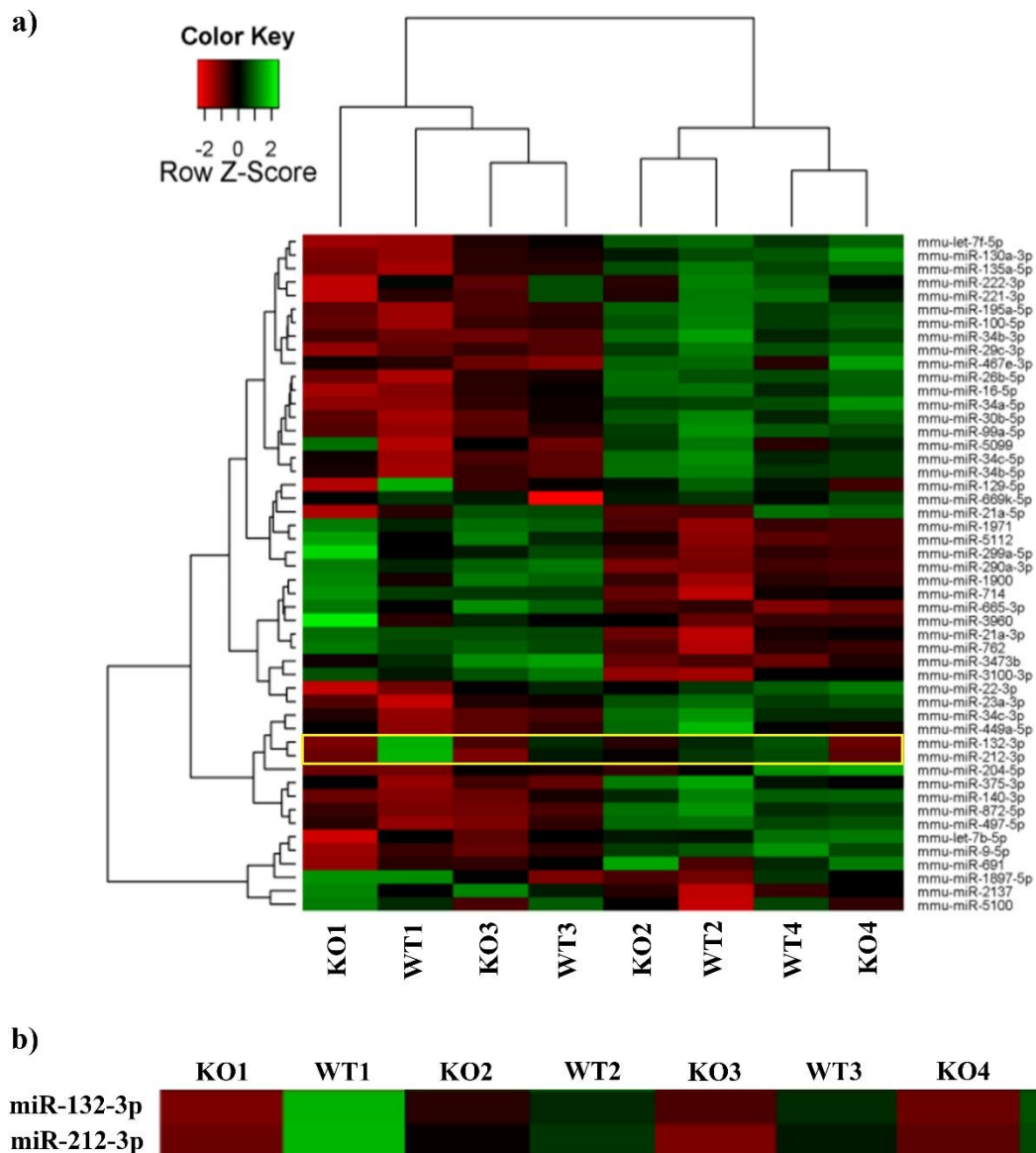


Rycina 14. Analiza budowy kolców dendrytycznych neuronów w hodowli pierwotnej hipokampa myszy z wyciszonym białkiem SRF. (a) Przykładowe zdjęcia mysich neuronów hipokampa transferowanych plazmidem kontrolnym lub plazmidem kodującym Cre rekombinazę. Skala: 5 μm (b) Wykres przedstawia średnią gęstość kolców dendrytycznych wyrażoną jako liczba kolców na 1 μm długości dendrytu. Różnice statystyczne obliczono za pomocą testu t-studenta. Dane przedstawiono jako średnie ± SEM. $n_{WT} = 8$ komórek, $n_{KO} = 11$ komórek, * $p < 0,05$. (c) Wykres przedstawia różnice w całkowitej długości kolców dendrytycznych. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą t-testu. Dane przedstawiono jako średnie ± SEM. ** $p < 0,01$. (d) Wykres przedstawia procentowy udział kolców o kształcie filopodialnym i długim, oraz o kształcie grzybkowatym i przysadzistym w neuronach z obniżonym poziomem SRF. Różnice statystyczne obliczono za pomocą testu chi kwadrat (χ^2) przeliczając liczbę kolców o konkretnym kształcie/neuron na procentowy ich udział na dendrytach. Dane przedstawiono jako średnie ± SEM. $n_{WT} = 8$ komórek, $n_{KO} = 11$ komórek, ** $p < 0,01$.

4.5 Analiza ekspresji mikroRNA w mysich hodowlach *in vitro* z obniżonym poziomem SRF oraz walidacja uzyskanych wyników

Białko SRF jest czynnikiem transkrypcyjnym, regulującym ekspresję wielu genów związanych z plastycznością, w związku z tym postanawiano zbadać które miRNA są regulowane przez SRF w rozwoju neuronów *in vitro*. Analizę z użyciem mikromacierzy (EXIQON) przeprowadzono w Laboratorium Neurobiologii (dane dr hab. Katarzyna Kalita). Porównywano poziom ekspresji miRNA w hodowlach neuronów otrzymanych z hipokampa myszy SRF^{ff} transdukowanych wirusem AAV kontrolnym i wirusem AAV z Cre rekombinazą (Rycina 15). Opublikowane dane naszego zespołu wykazały, że konstrukty AAV-shSRF i AAV-Cre skutecznie zmniejszają poziom SRF w neuronach *in vitro* (Roszkowska i in., 2022).

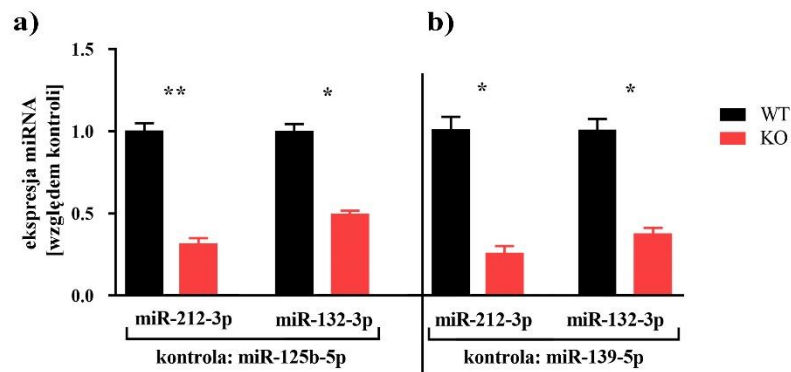
Zmiany poziomu ekspresji prezentowane są na zamieszczonej mapie ciepła, gdzie porównywany jest poziom miRNA w neuronach z czterech niezależnych hodowli. Na podstawie otrzymanych wyników, do dalszej analizy wybrano miR-132-3p oraz miR-212-3p, których poziom ulegał obniżeniu, po wyciszeniu SRF, we wszystkich czterech biologicznych powtórzeniach doświadczenia.



Rycina 15. Analiza poziomu ekspresji mikroRNA w neuronach hipokampa w hodowli pierwotnej z obniżonym poziomem białka SRF *in vitro*. Neurony hipokampa z myszy $SRF^{f/f}$ w piątym dniu hodowli, infekowano wirusem zawierającym Cre rekombinazę (KO) lub wirusem kontrolnym mCherry (WT). RNA izolowano 21 dnia hodowli. Uzyskany materiał został poddany analizie mikromacierzy (EXIQON). **(a)** Panel przedstawia profil ekspresji miRNA w neuronach z obniżonym poziomem SRF *in vitro*. Poszczególne kolumny odpowiadają wynikom uzyskanym dla powtórzeń biologicznych (WT-kontrolne neurony, KO, neurony z wyciszonym poziomem SRF). Poszczególne rzędy odpowiadają badanym miRNA. Kolory reprezentują znormalizowane wartości ekspresji. Zmiana w kierunku koloru czerwonego oznaczają spadek ekspresji, natomiast w kierunku koloru zielonego - wzrost ekspresji. **(b)** Powiększony fragment mapy cieplnej pokazuje poziom ekspresji wybranych miRNA: miR-132-3p i miR-212-3p.

Aby potwierdzić wyniki uzyskane z użyciem mikromacierzy, ekspresja wybranych miRNA została zbadana przy użyciu techniki qRT-PCR (Rycina 16). Poziom miRNA

porównywano w próbkach, które zostały użyte do przesiewowej analizy ekspresji miRNA w hodowlach *in vitro*. Otrzymane wyniki potwierdzają istotnie statystyczny spadek ekspresji badanych miRNA w hodowlach z obniżonym poziomem SRF w porównaniu do neuronów kontrolnych. Kontrolą w tych doświadczeniach były miR-139-5p oraz miR-125b-5p, których ekspresja nie uległa zmianie po wyciszeniu SRF.

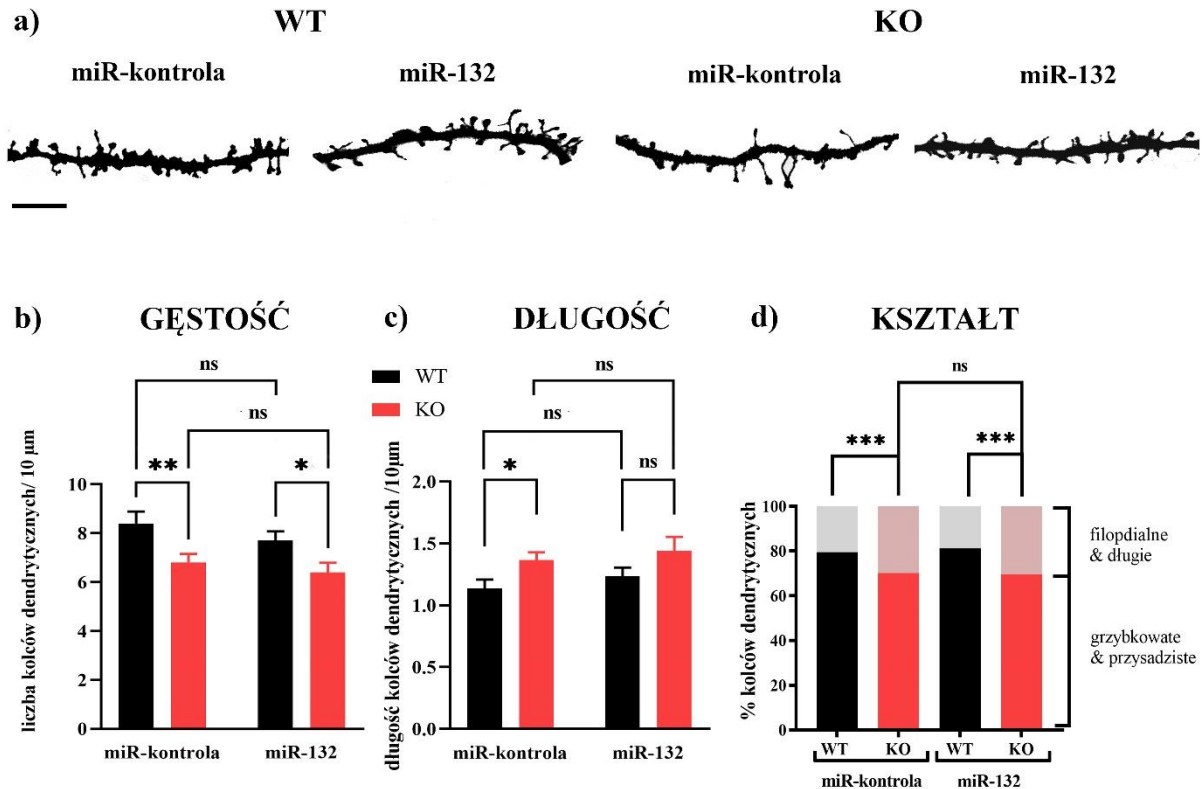


Rycina 16. Analiza ekspresji miR-125-3p i miR-212-3p w neuronach hipokampa *in vitro*. (a, b) Wykresy przedstawiają zmiany w poziomie ekspresji miR-132-3p i miR-212-3p w neuronach kontrolnych oraz neuronach z delecją białka SRF, wykonane na podstawie ilościowej analizy RT-PCR (qRT-PCR). Uzyskane wyniki znormalizowano względem kontroli: miR-125b-5p (a) miR-139-5p (b). Różnice statystyczne w poziomach ekspresji miR-125-3p i miR-212-3p potwierdzono za pomocą nieparametrycznego testu Mann'a-Whitney'a. Dane przedstawiono jako średnie \pm SEM, n = 4 powtórzenia eksperymentu, * p < 0,05, ** p < 0,01.

4.6 Wpływ nadekspresji mikroRNA miR-132-3p na liczbę i kształt kolców dendrytycznych w neuronach z obniżonym poziomem SRF

miR-132 wpływa na wzrost gęstości kolców dendrytycznych (Jasińska i in., 2016; Luikart i in., 2011). Postanowiono zatem zbadać, czy jego nadprodukcja może przywrócić fenotyp w neuronach pozbawionych SRF. W tym celu wykorzystano komercyjnie dostępne, chemicznie syntetyzowane cząstki RNA - miRNA 132 mimic, które naśladowały miR-132-3p. W piątym dniu hodowli, neurony pochodzące od myszy SRF^{ff}, zostały poddane transfekcji plazmidem kontrolnym lub Cre rekombinazą razem z miRNA (5 pM) mimic-132 lub (5 pM) kontrolny mimic (miR-kontrola). We wszystkich wariantach eksperymentu komórki zostały dodatkowo transfekowane plazmidem z GFP. W 21 dniu hodowli, komórki utrwalono, poddano barwieniu immunofluorescencyjnemu przy użyciu przeciwciała rozpoznającego GFP, a następnie obrazowano przy użyciu mikroskopu konfokalnego. Analizie poddano 17-26 zdjęć dla każdej badanej grupy. Na każdym zdjęciu zaznaczono do 200 kolców dendrytycznych przy

użyciu programu SpineMagick! Analizowano gęstość i kształt kolców (Rozdział 4.4). W doświadczeniu zastosowano kontrolę negatywną – miRNA-kontrola, dla każdego badanego wariantu eksperymentalnego (WT i KO).



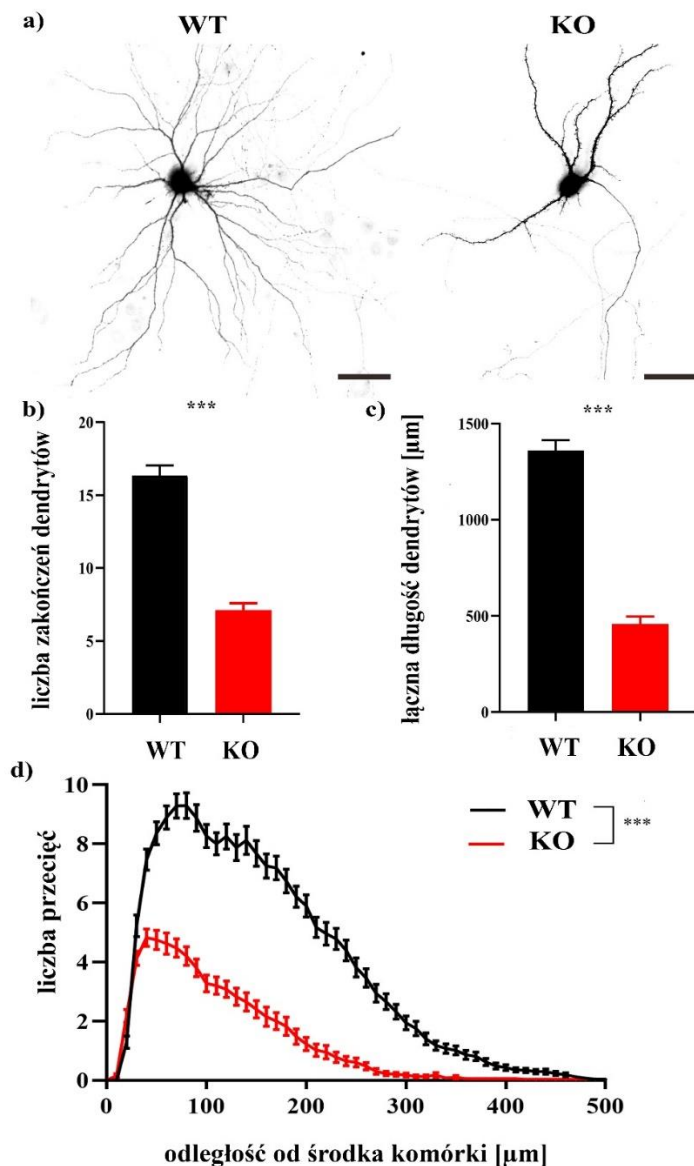
Rycina 17. Wpływ miRNA miR-132-3p na liczbę i kształt kolców dendrytycznych *in vitro* w neuronach kontrolnych i z obniżonym poziomem SRF. (a) Przykładowe zdjęcia pokazujące fragmenty dendrytów pochodzących z neuronów hipokampa transferowanych plazmidem kontrolnym i miR-kontrolnym (miR-kontrola) lub plazmidem kodującym Cre rekombinazę i miR-132 (miR-132). Skala: 5 μm **(b, c)** Wykresy przedstawiają zmiany w średniej gęstości i długości kolców dendrytycznych dla wszystkich grup badanych. Różnice statystyczne dla gęstości kolców dendrytycznych obliczono za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji Two-way ANOVA (test post-hoc Fishera). Dane przedstawiono jako średnie \pm SEM, miR-kontrola: $n_{\text{WT}} = 26$ komórek, $n_{\text{KO}} = 18$ komórek, miR-132: $n_{\text{WT}} = 21$ komórek, $n_{\text{KO}} = 17$ komórek, * $p < 0,05$. **(d)** Wykres przedstawia procentowy udział kolców o kształcie filopodialnym i długim oraz grzybkowatym i przysadzistym w neuronach kontrolnych lub z obniżonym poziomem SRF przy nadekspresji miR-132-3p. Różnice statystyczne obliczono za pomocą testu chi kwadrat (χ^2) przeliczając liczbę kolców o konkretnym kształcie/neuron na procentowy ich udział na dendrytach, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Nadprodukcja miR-132 (mimic-132) w neuronach kontrolnych oraz w komórkach z obniżonym poziomem SRF nie wpłynęła na gęstość kolców dendrytycznych (Rycina 17 a i b). Nie zaobserwowano również istotnych statystycznie różnic w długości kolców dendrytycznych w neuronach pozbawionych SRF, zarówno w przypadku nadekspresji miRNA-kontrolnego, jak i miR-132 (Rycina 17 c). Nie wykazano także istotnych zmian w procentowym

udziale kolców o poszczególnych kształtach między grupą komórek pozbawionych SRF, a tych w których obniżono poziom SRF i wprowadzono miR-132 (Rycina 17 d). Otrzymane wyniki nie potwierdziły hipotezy o udziale miR-132 w regulacji rozwoju i budowy kolców dendrytycznych w neuronach z wyciszonym poziomem SRF w komórkach. Nie wykazano także wpływu nadekspresji miR-132 na badane parametry w komórkach kontrolnych.

4.7 Przebudowa drzewa dendrytycznego w odpowiedzi na wyciszenie SRF w hodowli neuronów in vitro

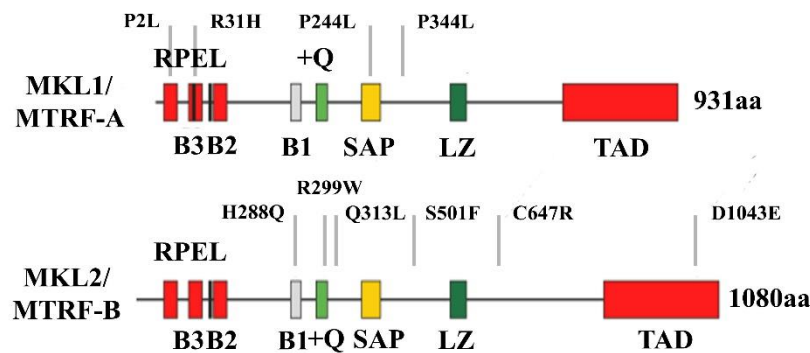
W następnym etapie badań sprawdzono, czy obniżenie poziomu SRF wpływa na proces dojrzewania drzewa dendrytycznego *in vitro*. Neurony z myszy SRF^{F/f} poddano transfekcji w 5 dniu hodowli *in vitro*, stosując plazmid kontrolny lub plazmid kodujący Cre rekombinazę. W obu przypadkach wprowadzono także plazmid kodujący białko GFP. W 21 dniu hodowli neurony utrwalono, a następnie barwiono immunofluorescencyjnie przy użyciu przeciwciała specyficznego dla GFP. Zdjęcia neuronów zbierano za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego (Leica), a następnie analizowano kształt drzewa dendrytycznego komórek. Przykładowe obrazy neuronów z grupy kontrolnej i neuronów ze zmniejszonym poziomem SRF zostały przedstawione na Rycinie 18 a. W celu oceny wpływu deplecji SRF na budowę drzewa dendrytycznego, analizowano następujące parametry: liczba zakończeń dendrytycznych oraz łączna długość dendrytów. Dodatkowo przeprowadzono analizę Sholla, która dostarcza informacji na temat złożoności i ekspansywności drzewa dendrytycznego. Różnice w budowie drzewa dendrytycznego w badanych grupach przedstawiono w postaci wykresów porównujących liczbę przecięć okręgu o zwiększającej się średnicy w odległości 0 - 500 μm od ciała komórki. Wyniki przeprowadzanych doświadczeń pokazują, że obniżenie poziomu SRF w trakcie rozwoju neuronów spowodowało istotne zmiany w budowie drzewa dendrytycznego. Analiza kształtu wykazała znaczący spadek liczby zakończeń dendrytycznych oraz całkowitej długości dendrytów w neuronach z wyciszonym SRF (Rycina 18 b i c). Przeprowadzona analiza Sholla wykazała, że obniżenie poziomu SRF podczas rozwoju postnatalnego neuronów *in vitro* skutkuje znaczącym zmniejszeniem liczby dendrytów przecinających współcentryczne okręgi znajdujące się w różnych odległościach od ciała neuronu (Rycina 18 d). Podsumowując, drzewa dendrytyczne utworzone przez komórki z delecją SRF charakteryzuje mniejsza złożoność w porównaniu do komórek kontrolnych.



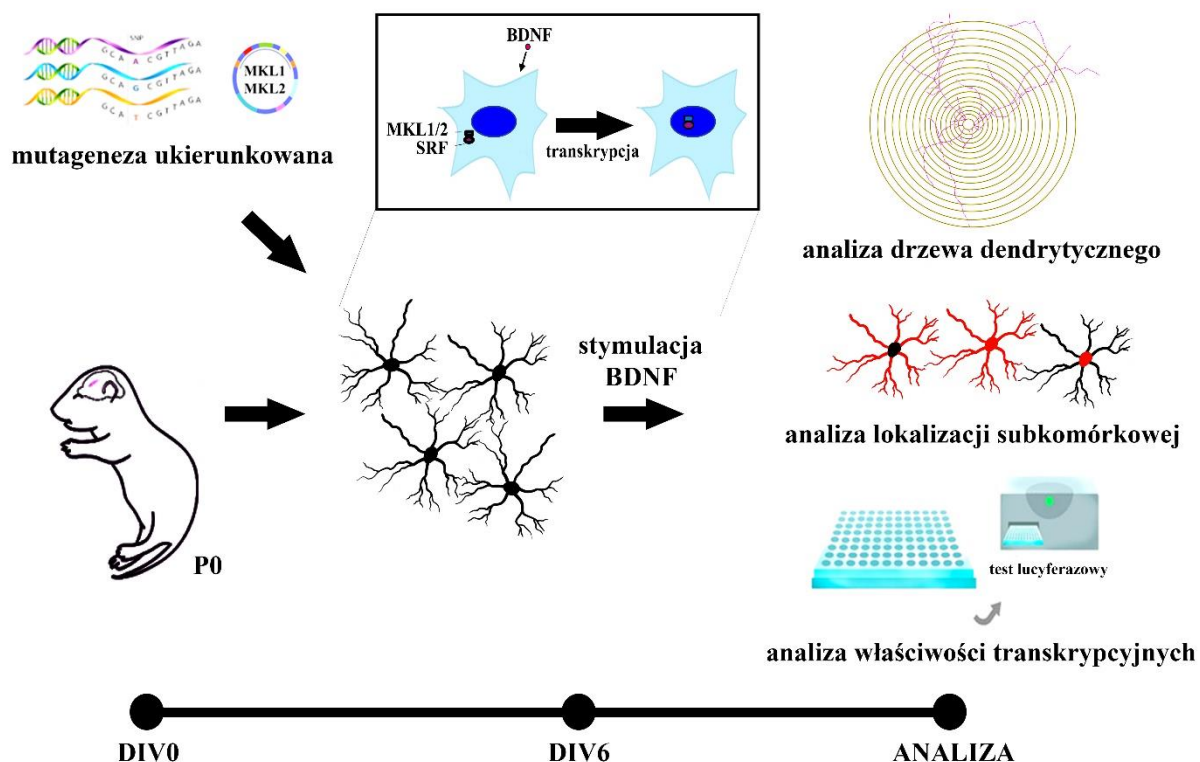
Rycina 18. Wpływ czynnika transkrypcyjnego SRF na dojrzewanie drzewa dendrytycznego neuronów hipokampa w hodowli *in vitro*. (a) Przykładowe zdjęcia, mysich neuronów hipokampa z białkiem GFP z grupy kontrolnej (WT) i z wyciszoną ekspresją SRF (KO) Skala: 100 μm (b) Analiza kształtu drzewa dendrytycznego. Wykres przedstawia liczbę zakończeń dendrytów w neuronach kontrolnych oraz w neuronach z obniżonym poziomem białka SRF. Różnice statystyczne obliczono za pomocą nieparametrycznego testu Mann'a-Whitney'a. Dane przedstawiono jako średnie \pm SEM. $n_{\text{WT}} = 75$ komórek, $n_{\text{KO}} = 40$ komórek, *** $p < 0,001$. (c) Wykres przedstawia łączną długość dendrytów w neuronach kontrolnych oraz w neuronach z obniżonym poziomem białka SRF. Różnice statystyczne obliczono za pomocą nieparametrycznego testu Mann'a-Whitney'a. Dane przedstawiono jako średnie \pm SEM. $n_{\text{WT}} = 75$ komórek, $n_{\text{KO}} = 40$ komórek, *** $p < 0,001$. (d) Wykres z analizą Sholla, który przedstawia różnice w budowie drzewa dendrytycznego w neuronach z obniżonym poziomem białka SRF. Liczba przecięć okręgu o zwiększającej się średnicy w odległości 0 - 500 μm od ciała komórki różniła się istotnie statystycznie pomiędzy badanymi grupami. Różnice statystyczne obliczono za pomocą wielokrotnego t- testu. Dane przedstawiono jako średnie \pm SEM. $n_{\text{WT}} = 75$ komórek, $n_{\text{KO}} = 40$ komórek, * $p < 0,05$ dla odległości 400 - 420 μm , ** $p < 0,01$ dla odległości 390 μm , *** $p < 0,001$ dla odległości 40 - 380 μm od ciała komórki.

4.8 Analiza lokalizacji, aktywności transkrypcyjnej oraz wpływu na budowę drzewa dendrytycznego białek MKL1 i MKL2 oraz ich wariantów

Wpływ polimorfizmów pojedynczych nukleotydów zidentyfikowanych w genach *MKL1* i *MKL2* nie był do tej pory badany w kontekście regulacji rozwoju i funkcji neuronów. Aby zrozumieć ten problem, do plazmidów kodujących ludzkie cDNA genów MKL1-Flag i MKL2-Flag wprowadzono mutacje punktowe za pomocą metody ukierunkowanej mutagenyzy. Poprawne wprowadzenie zmian pojedynczych nukleotydów potwierdzono sekwencjonowaniem metodą Sangera. Na Rycinie 19 przedstawiono lokalizację SNP w analizowanych koaktywatorach.



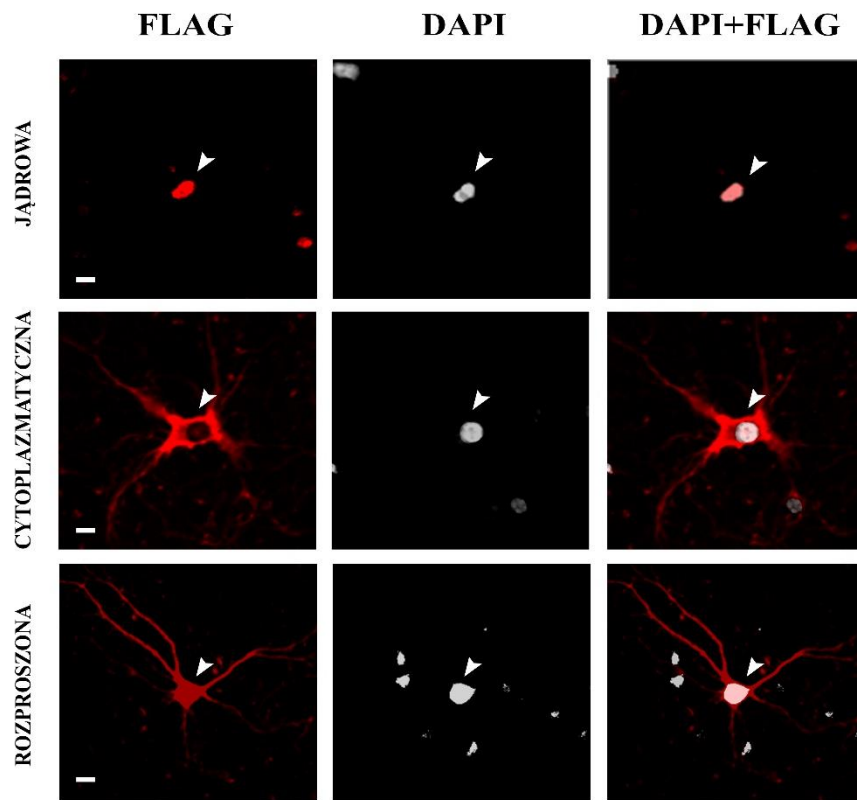
Rycina 19. Schemat lokalizacji badanych SNP w koaktywatorach MKL1 i MKL2. Szarymi znacznikami oznaczono miejsca mutacji. RPEL- miejsce wiązania G-aktyny; B1, B2, B3- domena podstawowa wymagana do importu MKL1/MRTFA do jądra; +Q- domena oddziałująca z SRF; SAP- miejsce wiązania DNA i aktywacji genów; LZ- domena leucynowa; TAD- domena transaktywacyjna. Rycina przygotowana na podstawie pracy Miralles (2003) (Miralles i in., 2003).



Rycina 20. Schemat przebiegu doświadczeń mający na celu ocenę wpływu nadekspresji plazmidów kodujących ludzkie białka MKL1 i MKL2 oraz warianty z wprowadzonymi zamianami w pojedynczych nukleotydach na rozwój neuronów. Eksperymenty przeprowadzono w hodowlach pierwotnych neuronów kory szczura *in vitro*. Wyizolowane neurony w dniu hodowli (DIV0) poddano elektroporacji z wykorzystaniem urządzenia AMAXA, co pozwoliło na wprowadzenie plazmidów kodujących niezmięcone cDNA MKL1 lub MKL2 (MKL1-WT i MKL2-WT odpowiednio), lub warianty z polimorfizmami pojedynczych nukleotydów. Analizowano subkomórkową lokalizację konstruktyw, ich właściwości transkrypcyjne oraz wpływ na rozwój drzewek dendrytycznych. W przypadku badania lokalizacji białek i aktywacji transkrypcji neurony stymulowano BDNF w DIV6 przez 2 godziny.

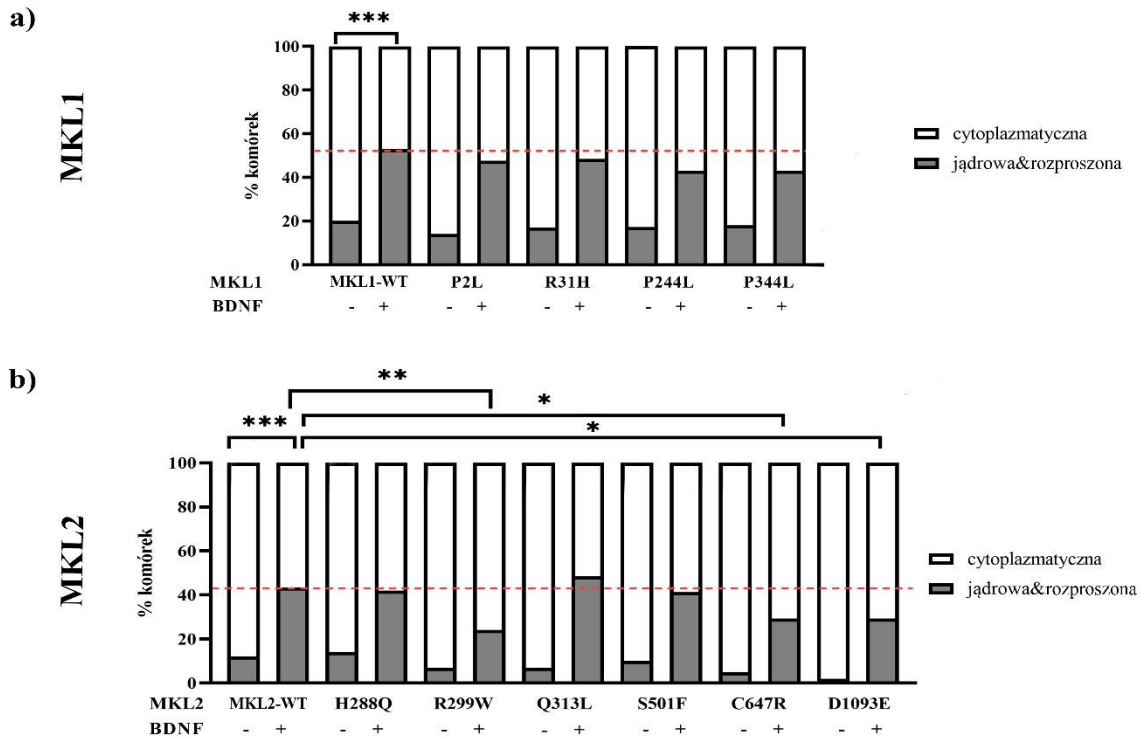
Rycina 20 przedstawia schemat przeprowadzonych doświadczeń. W celu oceny wpływu polimorfizmów pojedynczych nukleotydów na właściwości białek MKL1 i MKL2, w pierwszym etapie, porównywano subkomórkową lokalizację produktów białkowych konstruktyw MKL1- i MKL2-Flag niezmięzionych oraz z wprowadzonymi modyfikacjami. Do świeżo wyizolowanych neuronów z kory szczura wprowadzono plazmidy MKL1 lub MKL2, lub ich zmodyfikowane warianty wraz z plazmidem kodującym GFP. Następnie neurony stymulowano w 6 dniu hodowli czynnikiem BDNF (10 ng/ml) przez dwie godziny. Po utrwaleniu komórki wybarwiono metodą immunofluorescencyjną z zastosowaniem przeciwciał rozpoznających Flag i GFP. Obrazy zbierano pod mikroskopem fluorescencyjnym. Subkomórkową lokalizację białek MKL1 lub MKL2 analizowano sprawdzając lokalizację

wybarwionego białka Flag, które odzwierciedla rozmieszczenie koaktywatorów w komórce (Rycina 21). Liczono procent komórek z lokalizacją jądrową i rozproszoną oraz cytoplazmatyczną w warunkach kontrolnych i po stymulacji BDNF.



Rycina 21. Analiza subkomórkowej lokalizacji konstruktu MKL1-Flag w szczurzych neuronach kory *in vitro*. Przykładowe zdjęcia pokazujące subkomórkową lokalizację konstruktów MKL1 ze znacznikiem Flag w neuronach. Przedstawiono trzy typy lokalizacji subkomórkowej: jądrową, cytoplazmatyczną i rozproszoną. Jądra wyznakowano barwnikiem fluorescencyjnym DAPI (kolor biały), białko Flag wybarwiono na czerwono. Skala: 10 μ m

Większość stansfekowanych komórek wykazała cytoplazmatyczną lokalizację koaktywatorów MKL1 i MKL2. Stymulacja BDNF powodowała wzrost liczby komórek z rozproszoną i jądrową lokalizacją białek MKL1 i MKL2 w neuronach kory *in vitro* (Rycina 22). W przypadku MKL1 nie wykazano wpływu analizowanych modyfikacji w sekwencji na zmiany lokalizacji białka w porównaniu do konstruktów kontrolnych (Rycina 22 a). W MKL2 modyfikacje R299W, C647R i D1093E spowodowały istotnie statystyczny spadek liczby komórek z lokalizacją jądrową lub rozproszoną w odpowiedzi na stymulację BDNF (Rycina 22 b).

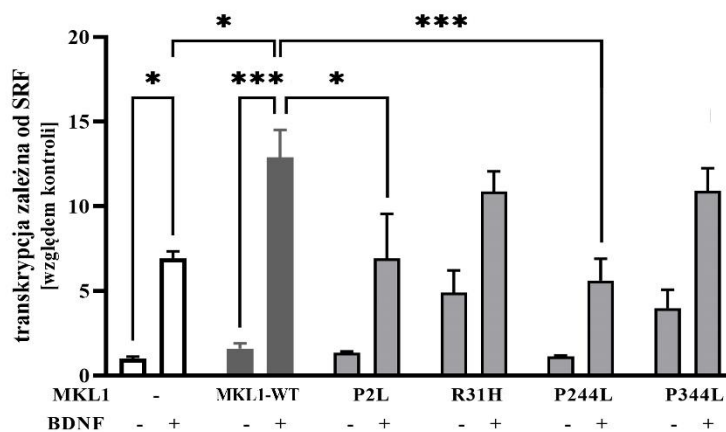


Rycina 22. Wpływ zamiany pojedynczych nukleotydów na subkomórkową lokalizację białek MKL1 i MKL2 w neuronach *in vitro*. Na wykresach przedstawiono procentowy udział neuronów z cytoplazmatyczną i rozproszoną/jądrową lokalizacją białek MKL1 (a) i MKL2 (b), oraz wariantów analizowanych koaktywatorów z modyfikacjami, w warunkach kontrolnych oraz po stymulacji BDNF. Test zgodności Chi-kwadrat (χ^2). Dane przedstawiono jako wartości procentowe. n = 3 eksperymenty, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

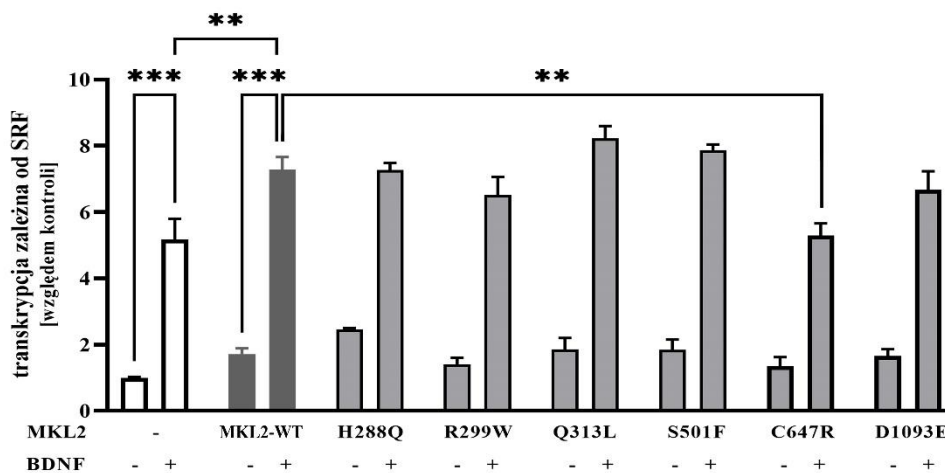
W kolejnym etapie doświadczenia oceniano zdolność wariantów MKL1 i MKL2 do aktywacji transkrypcji. W tym celu wykorzystano plazmid zawierający pięciokrotnie powtórzoną sekwencję SRE (5 × SRE), która reguluje transkrypcję genu lucyferazy. Aktywność lucyferazy odzwierciedla aktywację promotora. Do analiz użyto neurony kory szczura hodowlane *in vitro*. Neurony korowe (DIV0) transfekowano metodą elektroporacji odpowiednim plazmidem reporterowym 5 × SRE oraz plazmidem kodującym MKL1-WT lub MKL2-WT lub konstrukcjami z wprowadzonymi mutacjami. Równocześnie do komórek wprowadzono plazmid EF1αLacZ (zawierający gen β -galaktozydazy) w celu określenia wydajności transfekcji. Porównywano zdolność aktywacji transkrypcji przez białka MKL1 i MKL2 oraz ich warianty z wprowadzonymi polimorfizmami w stanie podstawowym i w odpowiedzi na stymulację BDNF przez 6 godzin w DIV5. Wyniki porównywano z niemodyfikowanymi konstrukcjami kontrolnymi. Aktywację transkrypcji oznaczano jako stosunek aktywności lucyferazy do β -galaktozydazy. Stymulacja BDNF spowodowała zależną od SRF aktywację transkrypcji. Dodatkowo efekt ten został wzmocniony przez nadekspresję konstruktów MKL1-Flag (Rycina 23 a) lub MKL2-Flag (Rycina 23 b). W przypadku MKL1

zauważono zmniejszenie aktywności transkrypcyjnej konstruktu MKL1 z zamienioną proliną na leucynę w pozycji 2 (MKL1-P2L) oraz w pozycji 244 (MKL1-P244L) w porównaniu do MKL1-WT (Rycina 23 a). W przypadku MKL2 spadek aktywności transkrypcyjnej obserwowano jedynie w przypadku wariantu MKL2-C647R, z zamienioną cysteiną na argininę w pozycji 647. Zmiany te były istotne statystycznie jedynie w obecności BDNF (Rycina 23 b).

a)



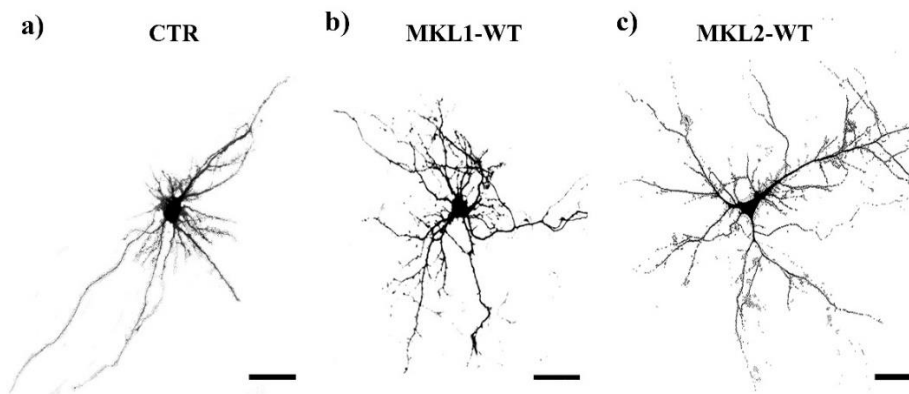
b)



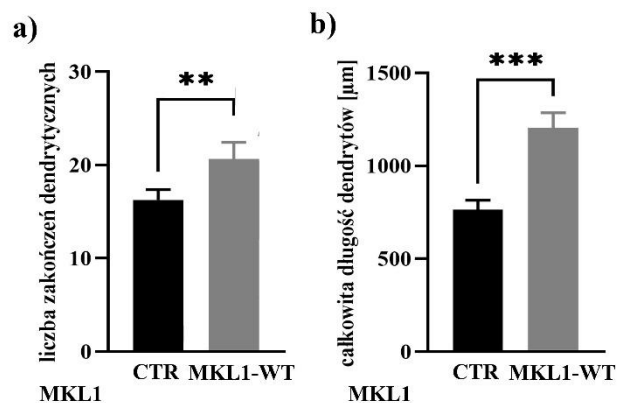
Rycina 23. Wpływ zamiany pojedynczych nukleotydów na właściwości transkrypcyjne koaktywatorów MKL1 (a) i MKL2 (b). Analiza poziomu transkrypcji zależnej od SRE przy użyciu plazmidu reporterowego p5xSRE-Luc (gen lucyferazy pod kontrolą promotora zawierającego pięć powtórzeń sekwencji SRE specyficznie rozpoznawanej przez czynnik transkrypcyjny SRF). Jednoczynnikowa analiza wariacji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Dane przedstawiono jako średnie \pm SEM. n = 3 eksperymenty; * p < 0,05, ** p < 0,01; *** p < 0,001.

W dalszej części pracy zbadano wpływ poszczególnych SNP w MKL1 i MKL2 na złożoność i ekspansywność drzewka dendrytycznego. Do analiz wykorzystano zdjęcia szczyrzych neuronów hipokampa, do których w DIV0 wprowadzono plazmidy kodujące cDNA MKL1 lub MKL2 (MKL1-WT i MKL2-WT) lub warianty z wprowadzonymi polimorfizmami

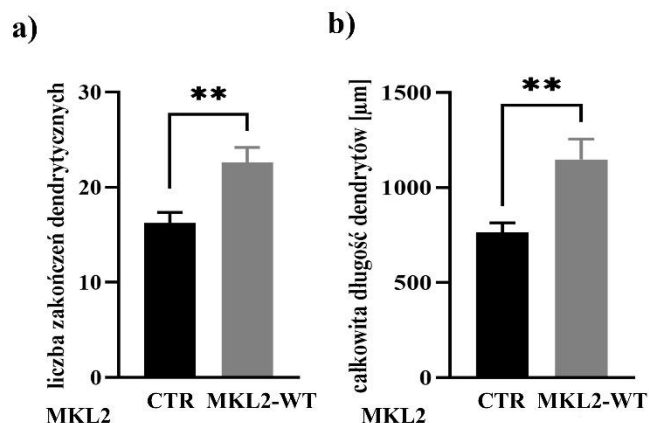
pojedynczych nukleotydów razem z plazmidem kodującym GFP. Komórki utrwalano i wybarwiono przeciwciałem wykrywającym białko GFP. Obrazy zbierano z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego (Leica), a następnie analizowano kształt drzew dendrytycznych w sposób analogiczny do opisanego w rozdziale dotyczącym SRF (Rozdział 4.7). Badano liczbę zakończeń dendrytów oraz łączną ich długość. Dodatkowo przeprowadzono analizę Sholla. W doświadczeniach z nadekspresją MKL1-WT i MKL2-WT kontrolę stanowiły komórki transfekowane jedynie plazmidem kodującym GFP (CTR). Natomiast, warianty z wprowadzonymi polimorfizmami pojedynczych nukleotydów były porównywane do neuronów z nadekspresją konstruktów MKL1-WT lub MKL2-WT, odpowiednio. Uzyskane wyniki zostały przedstawione na Rycinach 24 - 30.



Rycina 24. Wpływ nadekspresji konstruktów MKL1 i MKL2 na kształt drzewa dendrytycznego szczurzych neuronów kory *in vitro*. Przykładowe zdjęcia neuronów kontrolnych (a) oraz z nadekspresją MKL1-Flag (b) i MKL2-Flag (c). Skala: 50 µm



Rycina 25. Wpływ nadekspresji MKL1 na kształt drzewa dendrytycznego szczurzych neuronów kory *in vitro*. Wykresy przedstawiają wpływ nadekspresji konstruktów MKL1-Flag na liczbę zakończeń dendrytycznych (a) oraz na całkowitą długość dendrytów drzewa dendrytycznego *in vitro* (b). Różnice statystyczne w liczbie zakończeń dendrytycznych w neuronach MKL1-WT oraz komórkach kontrolnych obliczono za pomocą nieparametrycznego testu Mann'a-Whitney'a. Zmiany w całkowitej długości dendrytów oceniono za pomocą t-testu. Dane przedstawiono jako średnie ± SEM, n = 20 komórek. ** p < 0,01, *** p < 0,001.

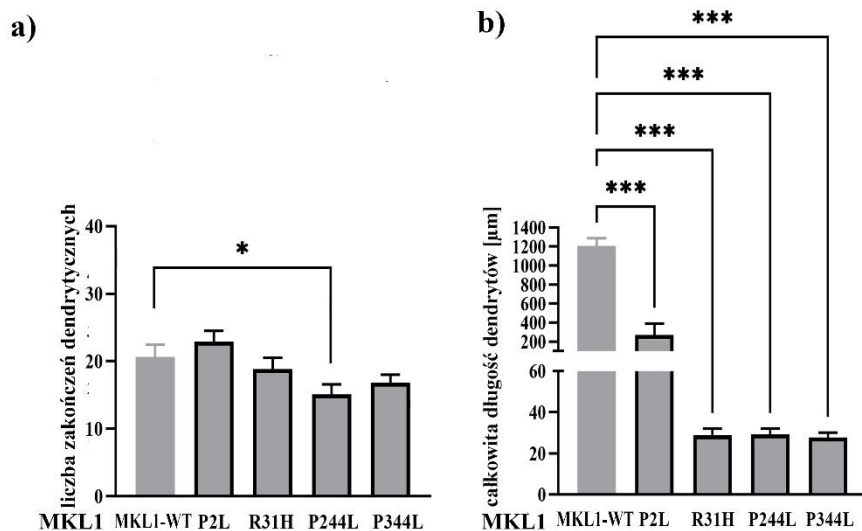


Rycina 26. Wpływ nadekspresji MKL2 na kształt drzewa dendrytycznego szczurzych neuronów kory *in vitro*. Wykresy przedstawiają wpływ nadekspresji konstruktów MKL2-Flag na liczbę zakończeń dendrytycznych (a) oraz na całkowitą długość dendrytów *in vitro* (b). Różnice statystyczne w liczbie zakończeń dendrytycznych w neuronach MKL2-WT oraz komórkach kontrolnych obliczono za pomocą testu nieparametrycznego Mann`a-Whitney`a. Zmiany w całkowitej długości dendrytów oceniono za pomocą t-testu. Dane przedstawiono jako średnie \pm SEM, n = 20 komórek, ** p < 0,01.

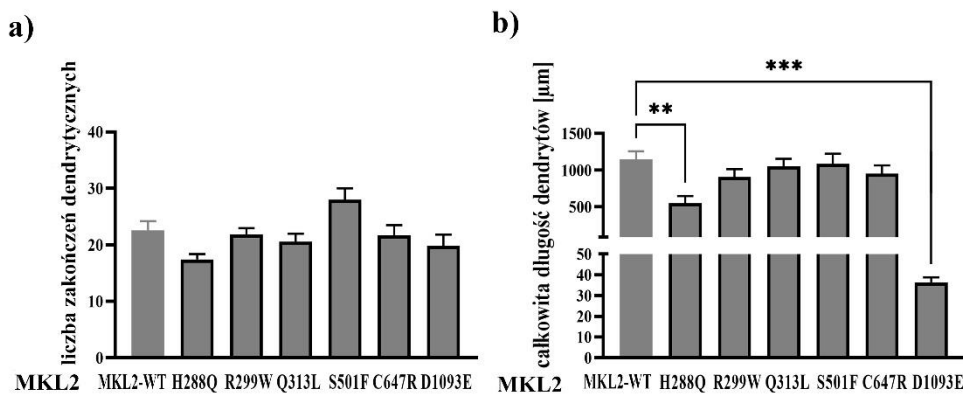
Zaobserwowano wzrost liczby zakończeń dendrytycznych oraz całkowitej długości dendrytów w neuronach z nadekspresją MKL1-WT lub MKL2-WT w porównaniu do neuronów kontrolnych (Rycina 25 i Rycina 26). Wszystkie analizowane zmiany pojedynczych nukleotydów wprowadzone do konstruktów MKL1 spowodowały spadek całkowitej długości dendrytów w porównaniu do nadekspresji niezmienionego konstruktów. Ponadto, zamiana proliny w leucynę w pozycji 244 (P244L) spowodowała zmniejszenie liczby zakończeń dendrytycznych w komórkach w porównaniu do MKL1-WT (Rycina 27). W przypadku nadekspresji wariantów MKL2 w neuronach, nie zaobserwowano ich wpływu na liczbę zakończeń dendrytycznych. Zamiana histydyny na glutaminę w pozycji 288 (H288Q) oraz kwasu asparaginowego na kwas glutaminowy w pozycji 1043 (D1043E) spowodowała istotnie statystyczny spadek całkowitej długości dendrytów w porównaniu do komórek z nadekspresją MKL2 (Rycina 28).

Kształt drzewa dendrytycznego i pole powierzchni przez nie zajmowane zostały ocenione przy użyciu analizy Sholla dla wszystkich badanych grup. Uzyskane wyniki wskazują na istotne statystycznie zmiany powierzchni zajmowanej przez drzewa dendrytyczne utworzone przez neurony z nadprodukcją białek MKL1 lub MKL2 (Rycina 29 i 30, Tabela 11). Wszystkie powyżej przedstawione dane uzyskane z analiz polimorfizmów pojedynczych nukleotydów w konstruktach MKL1 i MKL2 zaprezentowano w Tabeli 10. Nadprodukcja wariantów odpowiadających polimorfizmom w genach *MKL1* i *MKL2* w neuronach

spowodowała niewielkie, lecz istotne statystycznie, zmiany w powierzchni zajmowanej przez drzewo dendrytyczne oraz w liczbie przecięć dendrytów mierzonych w różnych odległościach od ciała komórki, utworzonych przez współcentryczne okręgi (Rycina 29 i 30). Co ciekawe zauważono zarówno wzrost jak i spadek powierzchni zajmowanej przez drzewa dendrytyczne powstające wyniku nadprodukcji wariantów białek w neuronach w porównaniu do MKL1-WT i MKL2-WT. Dane uzyskane z analizy Sholla oraz zbiorczą analizę statystyczną zamieszczono w Tabeli 11.

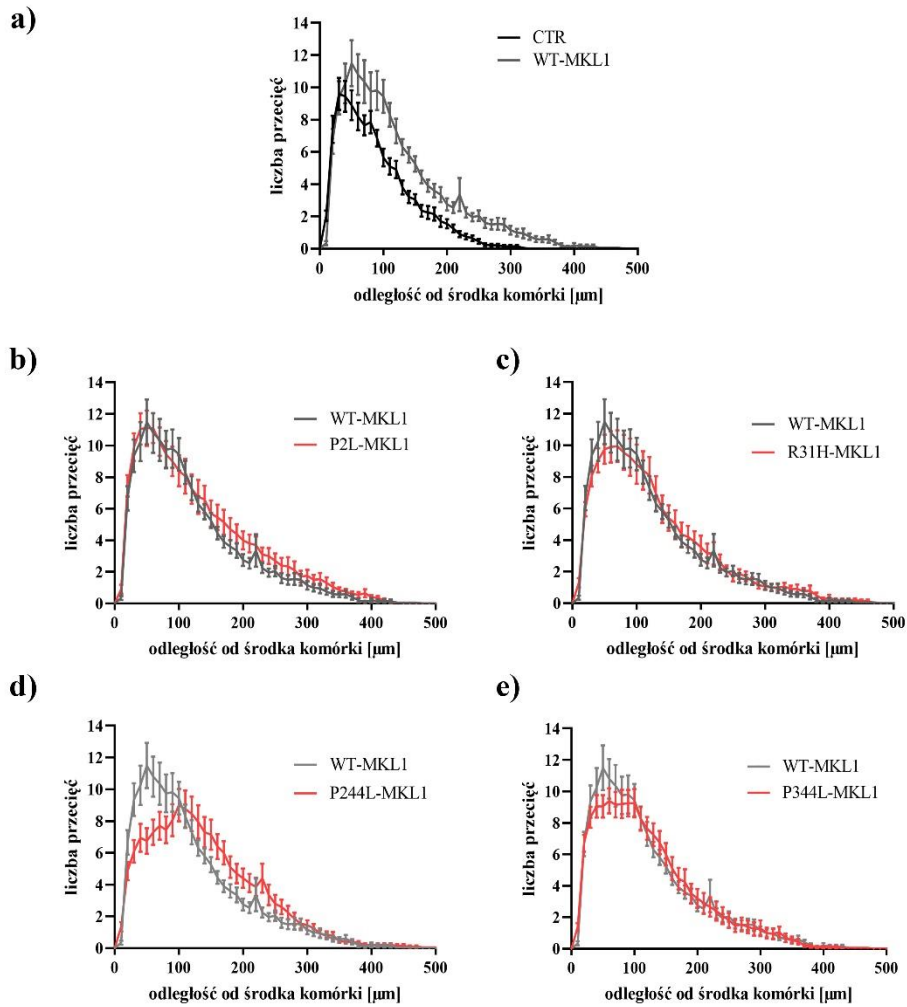


Rycina 27. Wpływ zamiany pojedynczych nukleotydów w konstrukcjach MKL1 na kształt drzewa dendrytycznego szczurzych neuronów kory *in vitro*. Wykresy przedstawiają zmiany w liczbie zakończeń dendrytycznych (a) oraz całkowitej długości dendrytów (b) dla wszystkich analizowanych konstrukcji MKL1. (a) Różnice w liczbie zakończeń dendrytycznych dla konstrukcji MKL1 obliczono za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Dane przedstawiono jako średnie ± SEM, n = 20 komórek. * p < 0,05. Zmiany w całkowitej długości dendrytów oceniono za pomocą nieparametrycznego testu Mann'a-Whitney'a dla konstrukcji MKL1. Dane przedstawiono jako średnie ± SEM, n = 20 komórek. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.



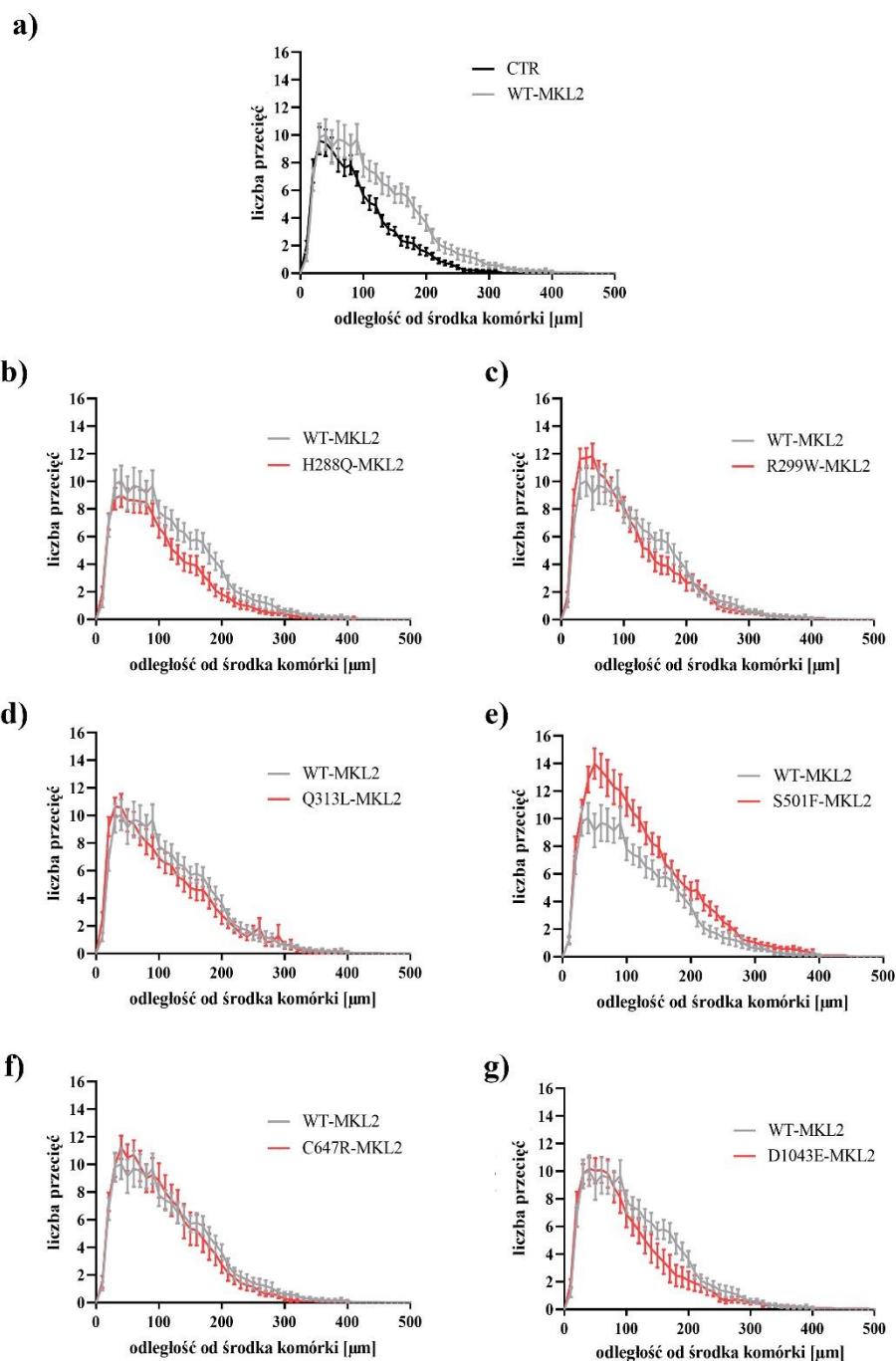
Rycina 28. Wpływ zamiany pojedynczych nukleotydów w konstrukcjach MKL2 na kształt drzewa dendrytycznego w szczurzych neuronach kory *in vitro*. Wykresy przedstawiają zmiany w liczbie zakończeń dendrytycznych (a) oraz całkowitej długości dendrytów (b) dla wszystkich analizowanych konstrukcji MKL2. (a) Różnice w liczbie zakończeń dendrytycznych dla konstrukcji MKL2 obliczono za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z post-hoc testem Dunnett'a. Dane przedstawiono jako średnie ± SEM, n = 20 komórek. (b) Zmiany w całkowitej długości dendrytów oceniono za pomocą nieparametrycznego testu Mann'a-Whitney'a dla konstrukcji MKL2. Dane przedstawiono jako średnie ± SEM, n = 20 komórek. ** p < 0,01, *** p < 0,001.

SNP w MKL1



Rycina 29. Analiza Sholla kształtu drzewa dendrytycznego neuronów kory z nadekspresją konstruktów MKL1. Wykresy przedstawiają różnice w budowie drzewa dendrytycznego w neuronach dla MKL1-WT oraz wariantów z wprowadzonymi polimorfizmami pojedynczych nukleotydów. Różnice statystyczne obliczono za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji Two-way ANOVA z korektą Bonferroniego. Dane przedstawiono jako średnie \pm SEM, $n = 20$ komórek. Istotności statystyczne przedstawiono w Tabeli 11.

SNP w MKL2



Rycina 30. Analiza Sholla kształtu drzewa dendrytycznego neuronów kory z nadekspresją konstruktów MKL2. Wykresy przedstawiają różnice w budowie drzewa dendrytycznego w neuronach dla MKL2-WT oraz wariantów z wprowadzonymi polimorfizmami pojedynczych nukleotydów. Różnice statystyczne obliczono za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji Two-way ANOVA z korektą Bonferroniego. Dane przedstawiono jako średnie \pm SEM, $n = 20$ komórek. Istotności statystyczne przedstawiono w Tabeli 11.

gen	konstrukt	lokalizacja po stymulacji BDNF	aktywność transkrypcyjna po stymulacji BDNF	liczba dendrytów	długość dendrytów
MKL1	MKL1-WT	***, ↑ j&r	***, ↑	** , ↑	***, ↑
	P2L	ns	* , ↓	ns	***, ↓
	R31H	ns	ns	ns	***, ↓
	P244L	ns	***, ↓	* , ↓	***, ↓
	P344L	ns	ns	ns	***, ↓
MKL2	MKL2-WT	***, ↑ j&r	***, ↑	** , ↑	** , ↑
	H288Q	ns	ns	ns	** , ↓
	R299W	** , ↓ j&r	ns	ns	ns
	Q313L	ns	ns	ns	ns
	S501F	ns	ns	ns	ns
	C647R	* , ↓ j&r	** , ↓	ns	ns
	D1043E	* , ↓ j&r	ns	ns	***, ↓

Tabela 10. Tabela przedstawiająca zebrane wyniki analiz lokalizacji, aktywności transkrypcyjnej koaktywatorów MKL oraz budowy neuronów z nadekspresją konstruktów MKL1 i MKL2 oraz z konstruktów z wprowadzonymi mutacjami odpowiadającymi polimorfizmom pojedynczego nukleotydu w ludzkich genach *MKL1* i *MKL2*. Różnice istotne statystycznie zaznaczone są w porównaniu do konstruktów kontrolnego CTR, MKL1-WT lub MKL2-WT. ↑- wzrost, ↓- spadek, j&r- lokalizacje jądrowe i rozproszone.

gen	konstrukt	analiza Sholl`a	pole powierzchni zajmowanej przez drzewo dendrytyczne (μm^2)
MKL1	MKL1-WT	* dla 10, 80, 170, 190, 250 μm ** dla 120, 150- 160 μm *** dla 50- 70, 90- 110, 130- 140, 220 μm	1647, \uparrow
	P2L	ns	1832, \uparrow
	R31H	* dla 50 μm	1658
	P244L	* dla 20, 90, 130, 150, 200- 210 μm ** dla 80, 160- 170, 230 μm *** dla 30- 70 μm	1670
	P344L	*** dla 50 μm	1617
MKL2	MKL2-WT	* dla 60 μm ** dla 70, 100, 200 μm *** dla 90, 110- 190 μm	1576, \uparrow
	H288Q	* dla 150 μm ** dla 90, 120- 140, 160, 180- 200 μm *** dla 170 μm	1233, \downarrow
	R299W	* dla 40, 150, 170 μm ** dla 20- 30, 160 μm *** dla 50 μm	1536
	Q313L	** dla 90 μm *** dla 20 μm	1469, \downarrow
	S501F	* dla 140, 220- 230 μm ** dla 90, 150, 210 μm *** dla 40- 80, 100- 130 μm	2139, \uparrow
	C647R	ns	1534
	D1043E	* dla 90, 150, 190- 200 μm ** dla 140, 180 μm *** dla 160- 170 μm	1348, \downarrow
	CTR		1088

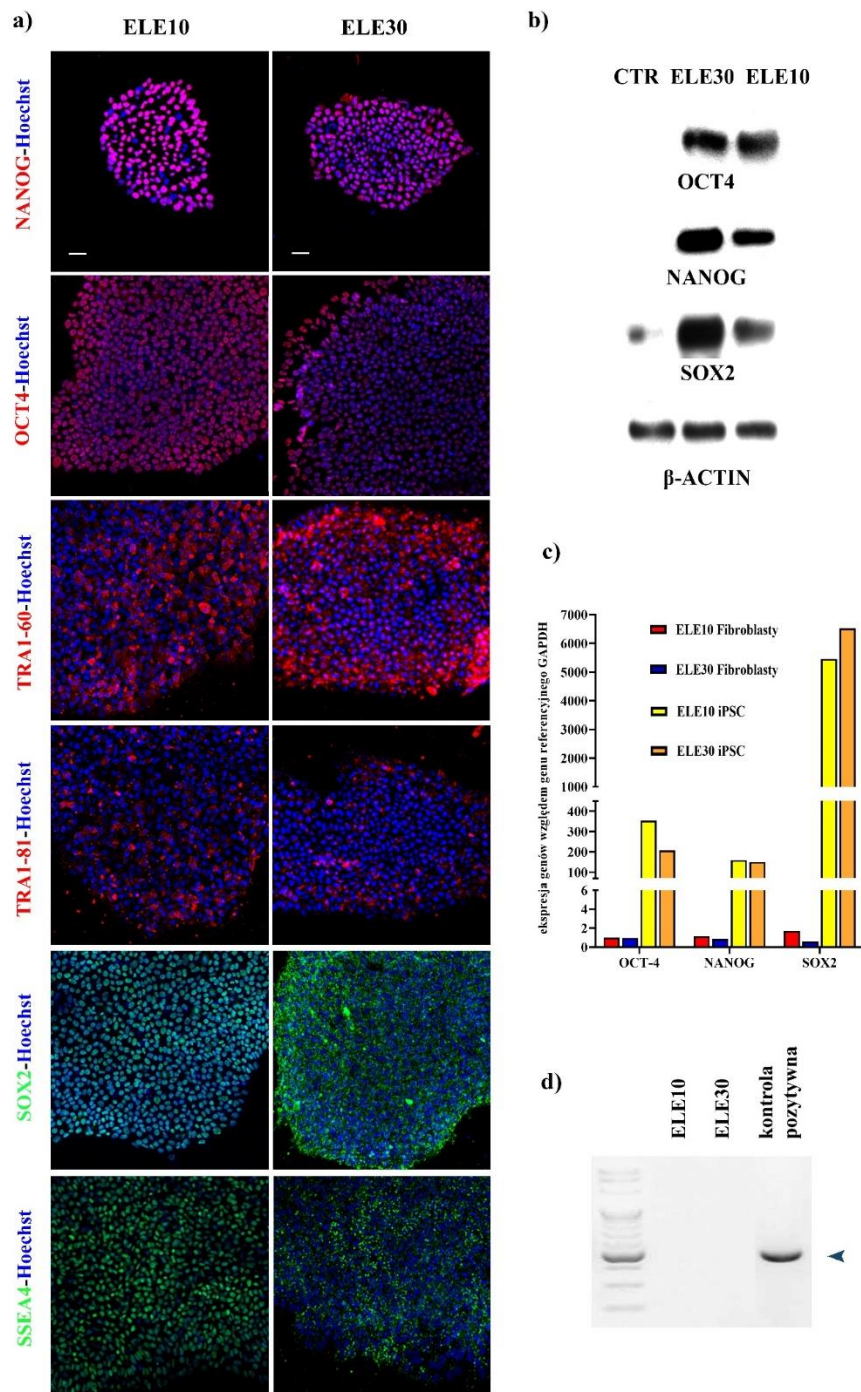
Tabela 11. Tabela przedstawia zbiorczą statystykę dotyczącą analizy Sholl`a. Różnice istotne statystycznie zaznaczone są w porównaniu do konstruktów kontrolnych CTR w przypadku MKL1-WT i MKL2-WT, lub MKL1-WT lub MKL2-WT w przypadku analizowanych wariantów. \uparrow - wzrost, \downarrow - spadek

4.9 Analiza pluripotencji wyprowadzonych indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC), ich zdolności do różnicowania w listki zarodkowe

Komórki macierzyste stanowią doskonałą alternatywę dla ludzkich neuronów do modelowania chorób neurorozwojowych czy neurodegeneracyjnych. Trudności związane z uzyskaniem tkanki mózgowej zmienionej na skutek choroby, a także konieczność pozyskiwania jej głównie po śmierci sprawiają, że obecnie iPSC są obiecującym narzędziem do badania zmian na poziomie molekularnym i komórkowym w różnych schorzeniach (Moradi i in., 2019; Zhao i Bhattacharyya, 2018).

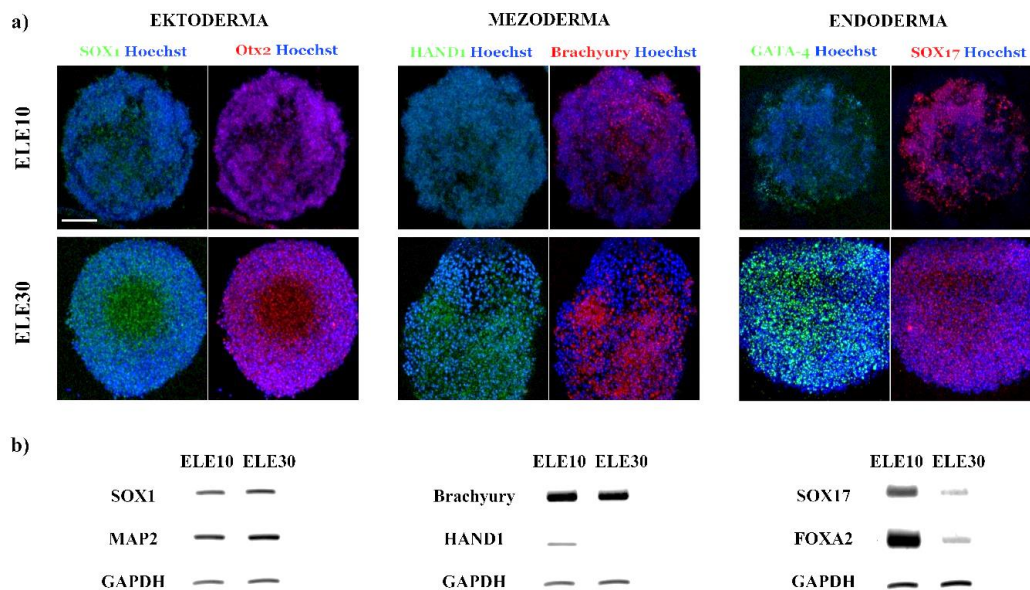
W związku z powyższym, do badań dotyczących roli SRF w dojrzewaniu ludzkich neuronów zastosowano model wykorzystujący indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste. Linie iPSC uzyskano przez przeprogramowanie ludzkich komórek skóry, fibroblastów, za pomocą czynników: OCT4, KLF4, SOX2 i C-MYC. Procedurę przeprowadzono w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej, w laboratorium kierowanym przez prof. Jacka Jaworskiego, a uzyskane komórki zostały udostępnione w celu przeprowadzenia badań, które stanowią część niniejszej rozprawy.

W pierwszym etapie badań z użyciem ludzkich linii iPSC sprawdzono obecność genów pluripotencji oraz zbadano zdolność komórek do różnicowania w trzy listki zarodkowe. Eksperymenty przeprowadzono na 2 liniach komórkowych: ELE10 i ELE30. Analizowano markery pluripotencji, takie jak NANOG, OCT-4, TRA1-60, TRA1-81, SOX2, SSE4. Przeprowadzone barwienia immunofluorescencyjne wykazały obecność wszystkich badanych białek Nanog, Oct-4, Tra1-60, Tra1-81, Sox2, SSEA4 w analizowanych liniach komórkowych (Rycina 31 a). Poziom mRNA Oct4, Sox2 i Nanog dodatkowo potwierdzono używając techniki qRT-PCR oraz Western blotting (Rycina 31 b, c). W obu liniach iPSC (ELE10 i ELE30) wykryto znacznie podwyższony poziom mRNA dla genów pluripotencji w porównaniu do komórek fibroblastów, z których zostały one wyprowadzone. Sprawdzone również obecność mykoplazmy w liniach iPSC: ELE10 i ELE30. Za pomocą PCR połączonego z elektroforezą agarozową wykazano, że badane linie są wolne do mykoplazmy.



Rycina 31. Analiza ekspresji markerów pluripotencji w ludzkich liniach indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych: ELE10 i ELE30 wyprowadzonych z fibroblastów *in vitro*. (a) Przykładowe zdjęcia komórek iPSC barwionych na obecność markerów pluripotencji: NANOG, OCT-4, TRA1-60, TRA1-81 (kolor czerwony), SOX2, SSEA4 (kolor zielony). Jądra komórkowe wyznakowano barwnikiem fluorescencyjnym Hoechst33342 (kolor niebieski). Skala: 100 μ m. (b) Analiza Western blotting przedstawia obecność białek pluripotencji w iPSCs. β -aktynę zastosowano jako kontrolę poziomu białka nałożonego na żel. Kontrolę negatywną (CTR) stanowiła linia komórkowa ludzkich embrionalnych komórek nerki HEK293T. (c) Analiza poziomu ekspresji genów OCT4, NANOG i SOX2 w liniach iPSC metodą qRT-PCR, normalizowana względem genu referencyjnego GAPDH. n = 3 powtórzenia

W kolejnym etapie oceniono zdolność komórek iPSC do różnicowania w trzy listki zarodkowe. W kulach zarodkowych utworzonych z komórek iPSC linii ELE10 i ELE30 zidentyfikowano metodą barwienia immunofluorescencyjnego (Rycina 32 a) oraz RT-PCR (Rycina 32 b) obecność markerów ektodermy, takich jak SOX1, Otx2, MAP2, markerów mezodermy, w tym HAND1, Brachyury, oraz markerów endodermy, takich jak GATA-4, SOX17, FOXA2 (Rycina 32). Podsumowując, uzyskane wyniki pokazują, że wyprowadzone komórki są pluripotencjalne, czyli mają zdolność do różnicowania w dowolny typ komórek somatycznych, poza komórkami trofoblastu.



Rycina 32. Analiza zdolności komórek iPS do różnicowania w trzy listki zarodkowe. (a) Markery ektodermy: Sox1, Otx2; mezodermy: HAND1, Brachyury oraz endodermy: GATA-4, SOX17 (kolor zielony i czerwony, odpowiednio) wykryte w kulach zarodkowych utworzonych z iPSC: ELE10 i ELE30. Jądra komórkowe wyznakowano Hoechst33342 (kolor niebieski). Skala: 100µm. **(b)** Ekspresja mRNA markerów warstw zarodkowych w kulach zarodkowych iPSC: ektodermy (SOX2, MAP2), mezodermy (Brachyury, HAND1) i endodermy (SOX17, FOXA2) analizowana metodą RT-PCR. GAPDH zastosowano jako kontrolę endogenną.

4.10 Analiza krótkich tandemowych powtórzeń (STR)

Badanie krótkich tandemowych powtórzeń (STR, ang. *Short Tandem Repeat*) wykorzystywane jest w celu określenia pokrewieństwa lub pochodzenia danej osoby. Ponieważ powtórzenia są dziedziczone, można porównywać je pomiędzy ludźmi. W badaniach nad komórkami macierzystymi, analizie STR poddaje się DNA wyizolowane z fibroblastów oraz z komórek iPSC. Uzyskane wyniki służą identyfikacji zgodność genetycznej uzyskanych od pacjentów linii iPSC.

DNA izolowano bezpośrednio z fibroblastów oraz z linii komórkowych iPSC: ELE10 i ELE30. DNA poddano analizie STR w 10 loci, którą wykonano w Małopolskim Centrum Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Badanie przeprowadzono zgodnie z rekomendacjami Międzynarodowego Komitetu ds. Uwierzytelniania Linii Komórkowych (ICLAC- International Cell Line Authentication Committee). Uzyskane wyniki wykazały 100% zgodność profili DNA (badana linia komórkowa iPSC – fibroblasty). W Tabeli 12 przedstawiono wyniki z analizy STR.

Fibroblasty ELE30

Marker	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	vWA	TH01	Amelogenin	TPOX	CSF1PO	D21S11
Allele	11,13	12,15	8,10	11,11	16,16	6,6	X,X	8,8	11,11	30, 32,2

iPSC ELE30

Marker	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	vWA	TH01	Amelogenin	TPOX	CSF1PO	D21S11
Allele	11,13	12,15	8,10	11,11	16,16	6,6	X,X	8,8	11,11	30, 32,2

Fibroblasty ELE10

Marker	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	vWA	TH01	Amelogenin	TPOX	CSF1PO	D21S11
Allele	10,12	10,11	8,9	11,12	14,16	9,9	X,X	8,8	9,13	29, 30

iPSC ELE10

Marker	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	vWA	TH01	Amelogenin	TPOX	CSF1PO	D21S11
Allele	10,12	10,11	8,9	11,12	14,16	9,9	X,X	8,8	9,13	29, 30

Tabela 12. Analiza krótkich tandemowych powtórzeń (STR). Wyniki analizy loci: D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, vWA, TH01, Amelogenin, TPOX, CSF1PO, D21S11 z DNA wyizolowanego z fibroblastów oraz iPSC linii ELE30 i ELE10.

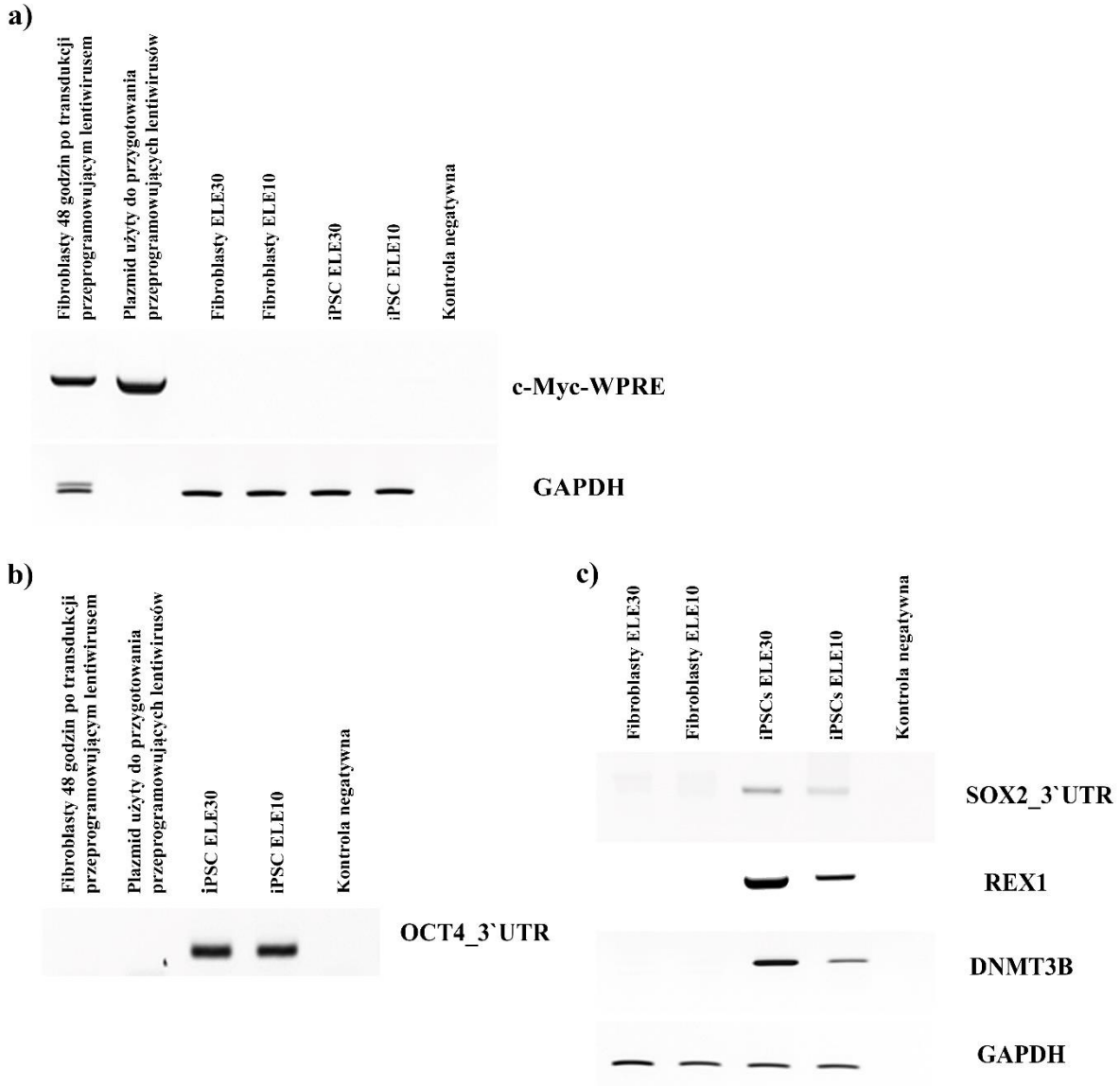
4.11 Analiza ekspresji transgenu pochodzącego z wirusa użytego do przeprogramowania oraz endogennych czynników pluripotencji w iPSC

W procesie transdukcji, wirus wstrzykuje swoje RNA do komórki gospodarza, które jest następnie przenoszone do jądra komórkowego. W jądrze RNA wirusa ulega odwrotnej transkrypcji na komplementarny DNA (cDNA). cDNA wirusa może następnie zintegrować się z genomem gospodarza. W procesie różnicowania, ważne jest, żeby ekspresja genów pluripotencji była wyciszana (wylączana lub hamowana) przez szlaki regulacyjne komórek docelowych. Wyciszenie transgenów lentiwirusowych jest niezbędnym wymogiem do

wykazania, że komórki zostały w pełni przeprogramowane i są niezależne od ekspresji egzogennych genów.

Analiza ekspresji transgenu pochodzącego z wirusa przeprogramującego została przeprowadzona za pomocą reakcji RT-PCR. W reakcji wykorzystano startery zaprojektowane do sekwencji zawartych w wirusie: sekwencji kodującej gen *cMYC* (CDS - ang. *coding DNA sequence*) oraz sekwencji regulatorowej WPRE (fragment *cMYC*-WPRE). W obu liniach: ELE10 i ELE30 nie zaobserwowano ekspresji kasety przeprogramującej, co wskazuje na jej wyciszenie w komórce (Rycina 33 a).

Kaseta przeprogramująca wirusa zawierała jedynie sekwencje kodujące genów OCT4 i SOX2. Sprawdzenie ekspresji tych genów używając starterów do sekwencji CDS nie pozwoliłoby na jednoznaczne określenie, czy są one pochodzenia wirusowego czy endogennego. W związku z tym do analizy poziomu ekspresji endogennych genów OCT4, SOX2 zastosowano reakcję RT-PCR przy użyciu starterów zaprojektowanych dla regionu 3'UTR tych genów. Wykazano, że w obu badanych liniach ELE10 i ELE30 zachodzi ekspresja endogennych czynników pluripotencji OCT4 (Rycina 33 b) i SOX2 (Rycina 33 c). Dodatkowo, w iPSC potwierdzono obecność markerów pluripotencji - REX1 i DNMT3B, które nie były zawarte w użytej kasecie przeprogramującej (Rycina 33 c). Uzyskane wyniki potwierdzają skuteczność zastosowanej metody przeprogramowania fibroblastów do komórek iPSC.

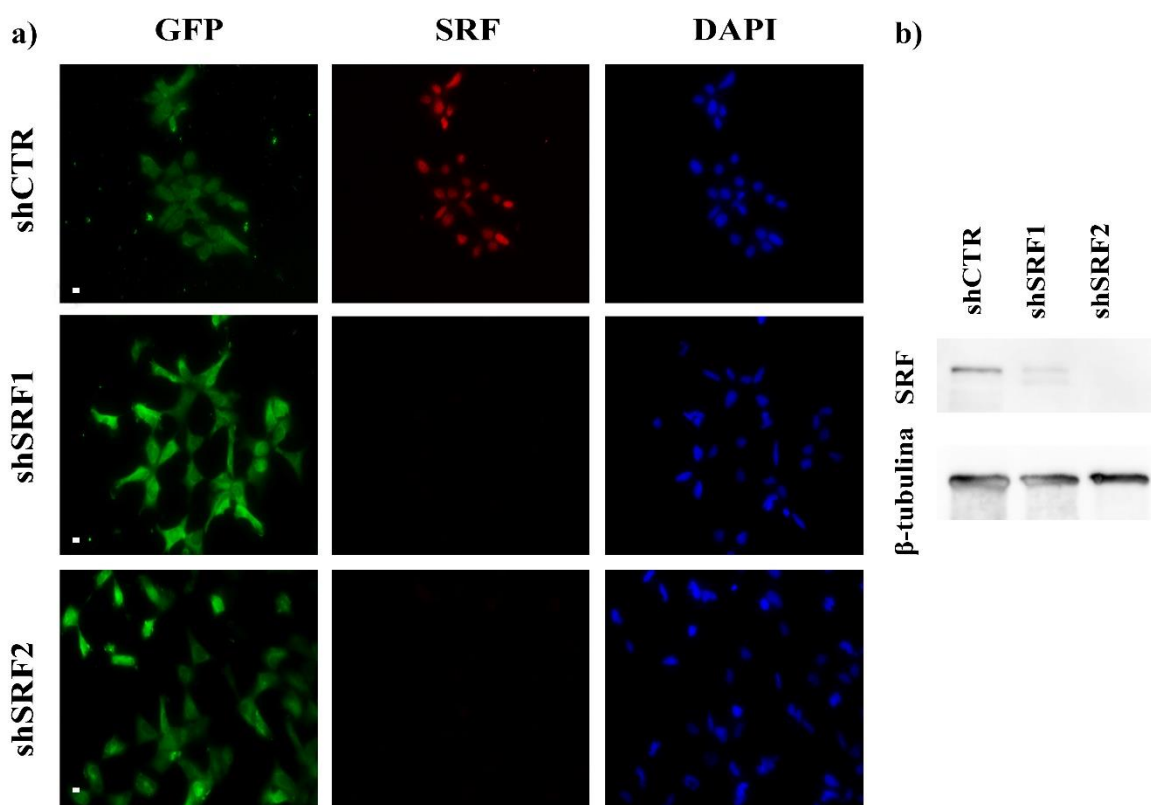


Rycina 33. Analiza ekspresji transgenu wirusowego użytego do przeprogramowania oraz czynników pluripotencji w komórkach iPS (a) Analiza ekspresji transgenu lentiwirusowego cMyc – WPRE w komórkach ELE10 i ELE30 metodą RT-PCR. (b) Analiza ekspresji endogennego czynnika OCT4 w fibroblastach 48 godzin po transdukcji wirusowej, plazmidzie użytym do przeprogramowania komórek oraz komórkach iPS ELE10 i ELE30. (c) Analiza poziomu ekspresji SOX2, REX1, DNMT3B w fibroblastach i komórkach iPS metodą RT-PCR.

4.12 Rola SRF w powstawaniu i dojrzewaniu drzewa dendrytycznego w ludzkich neuronach

Ludzkie neurony możemy otrzymać różnicując indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste do neuralnych komórek macierzystych (NSC), a następnie do neuronów. Scharakteryzowane komórki iPS różnicowano przez 10 dni do NSC (Podrozdział 3.2.11). Następnie, transdukowano je, przygotowanymi wcześniej (Podrozdział 3.2.3), wektorami

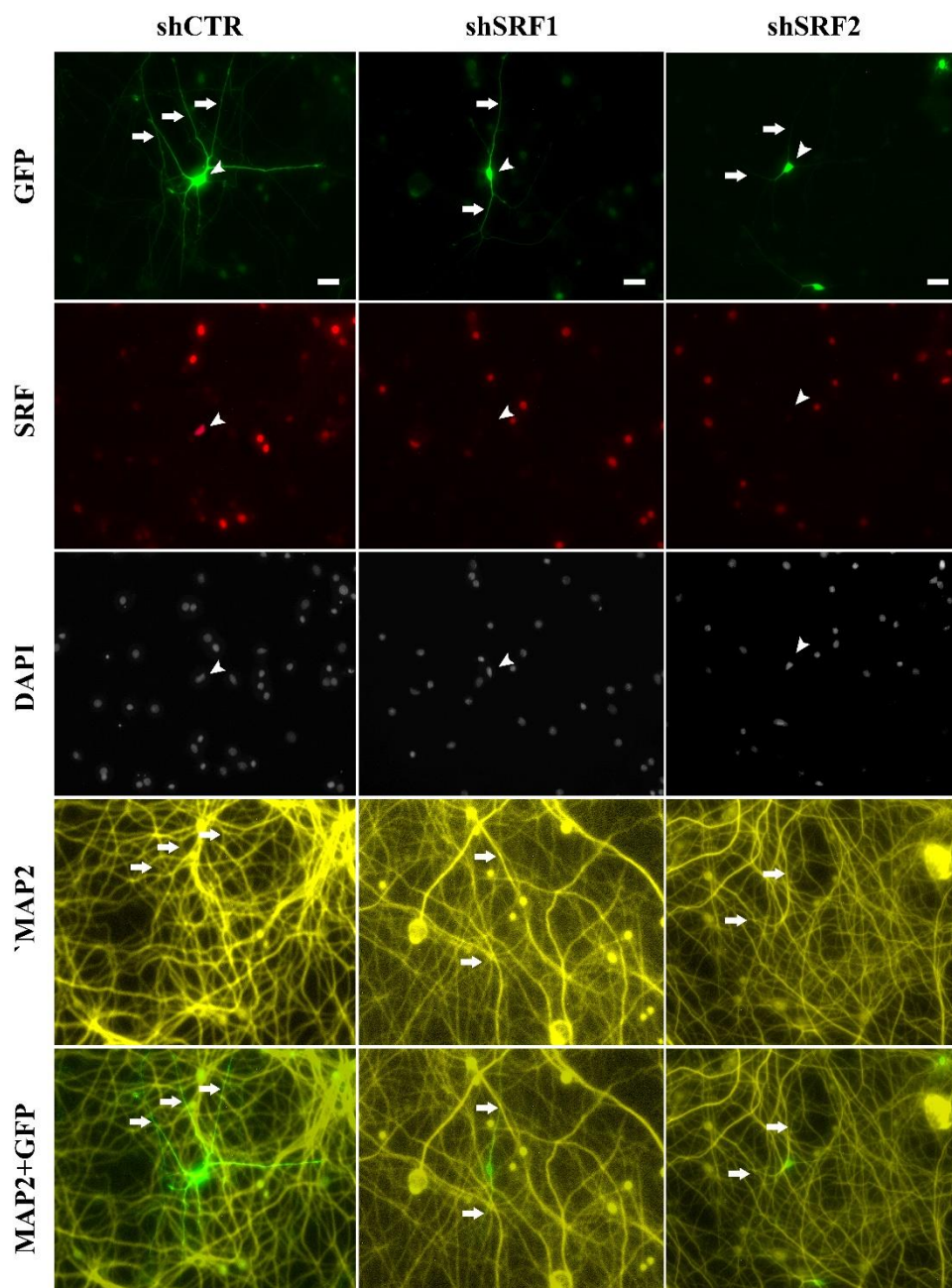
lentiwirusowymi z shRNA dla genu *Srf* (shSRF1 lub shSRF2) oraz wektorem kontrolnym shCTR. Zastosowanie wektorów wirusowych z genem oporności na puromycynę umożliwiło selekcję klonów zawierających shRNA dla SRF lub shRNA kontrolne. Do tak uzyskanych komórek wprowadzono dodatkowo białko zielonej fluorescencji (GFP) przy użyciu wektora lentiwirusowego. Wprowadzenie GFP do komórek pozwoliło na odróżnienie komórek ludzkich od szczurzych podczas kolejnych etapów doświadczenia. Po 4 dniach od transdukcji cząsteczkami LV-shCTR i shSRF1 lub shSRF2 komórki lizowano lub utrwalano. Poziom białka SRF w NSC sprawdzano z użyciem specyficznych przeciwciał. Zaobserwowano spadek poziomu SRF w komórkach z shSRF1 i shSRF2 barwionych immunofluorescencyjnie. Ponadto, analiza Western blotting potwierdziła obniżenie poziomu białka SRF w NSC (Rycina 34).



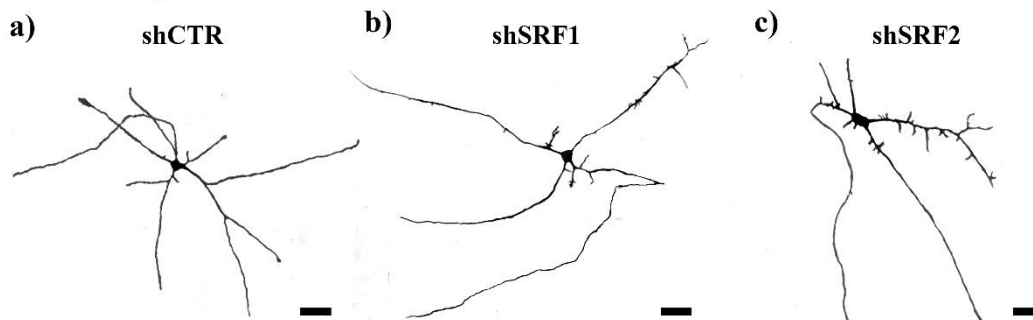
Rycina 34. Analiza poziomu białka SRF w ludzkich neuralnych komórkach macierzystych po wyciszeniu genu przy użyciu shRNA. (a) Przykładowe zdjęcia ludzkich neuralnych komórek macierzystych barwionych na obecność białka SRF (kolor czerwony) i GFP (kolor zielony). Jądra wyznakowano barwnikiem fluorescencyjnym DAPI (kolor niebieski). Skala: 10 μ m **(b)** Analiza Western blotting przedstawia poziom białka SRF w NSC transdukowanych kontrolnym shRNA i shRNA dla SRF. β -tubulinę zastosowano jako kontrolę poziomu białka nałożonego na żel.

Po potwierdzeniu wyciszenia SRF w neuralnych komórkach macierzystych, różnicowano je do neuronów. W tym celu, NSC wysiano na warstwę odżywczą szczurzych

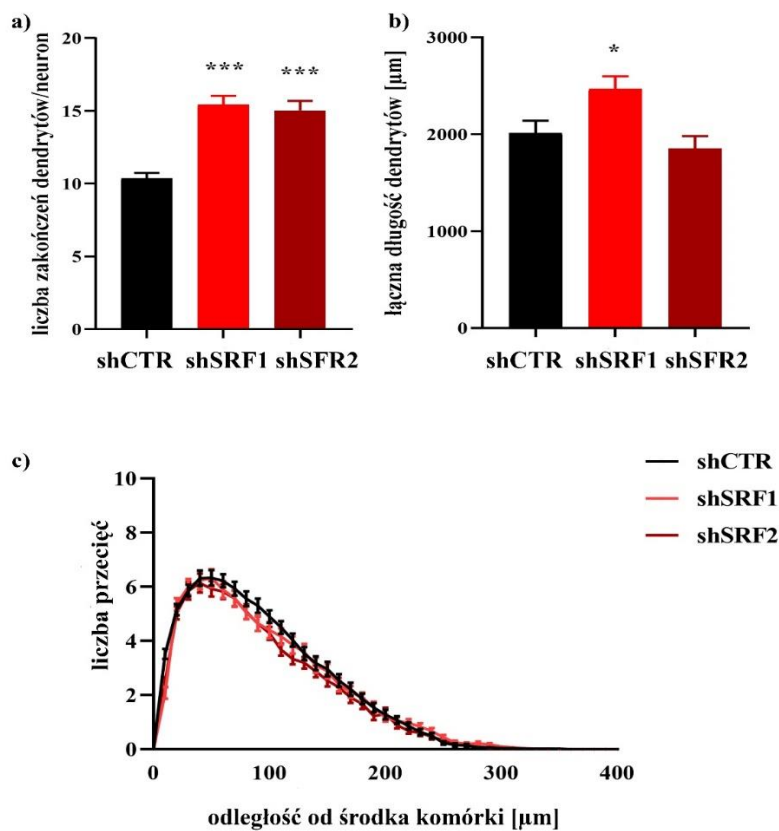
neuronów (DIV7) i hodowano przez kolejne 21 dni. Wprowadzenie do NSC białka GFP umożliwiło identyfikację ludzkich neuronów, dojrzewających razem ze szczurzymi komórkami nerwowymi. Po 21 dniach hodowle utrwalano, a następnie barwiono immunofluorescencyjnie z użyciem specyficznych przeciwciał rozpoznających SRF, MAP2 i GFP (Rycina 35). Obrazy zbierano z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego (Leica). Kolokalizacja barwienia MAP2 z komórkami GFP pozytywnymi wskazuje, że badane komórki są neuronami. Następnie analizowano wpływ wyciszenia SRF na kształt ludzkich neuronów. Wyniki pomiarów parametrów drzewa dendrytycznego, liczba zakończeń dendrytów, łączna długość dendrytów oraz analiza Sholla, przedstawiono na Rycinach 36 i 37.



Rycina 35. Ludzkie neurony otrzymane w wyniku różnicowania neuralnych komórek macierzystych. Przykładowe zdjęcia ludzkich neuronów z shRNA CTR i shRNA dla SRF barwionych immunofluorescencyjnie na obecność białka GFP (kolor zielony), SRF (kolor czerwony) i MAP2 (kolor żółty) po 21 dniach współhodowli ze szczurzymi neuronami. Jądra wyznakowano barwnikiem fluorescencyjnym DAPI (kolor biały). Grotem strzałki oznaczono jądro komórkowe. Strzałkami zaznaczono dendryty neuronów. Skala 50 μm



Rycina 36. Wpływ wyciszenia SRF na kształt drzewa dendrytycznego ludzkich neuronów *in vitro*. Przykładowe zdjęcia neuronów kontrolnych (a) oraz z shSRF1 (b) i shSRF2 (c) utrwalonych po 21 dniach. Skala 50 μm



Rycina 37. Wpływ czynnika transkrypcyjnego SRF na dojrzewanie drzewa dendrytycznego ludzkich neuronów *in vitro*. (a) Analiza kształtu drzewa dendrytycznego neuronów kontrolnych oraz neuronów z obniżoną ekspresją SRF. Wykres przedstawia liczbę zakończeń dendrytów w neuronach badanych grup eksperymentalnych. Różnice statystyczne obliczono za pomocą testu t-studenta. Dane przedstawiono jako średnie \pm SEM. $n_{\text{shCTR}} = 62$ komórek, $n_{\text{shSRF1}} = 61$ komórek, $n_{\text{shSRF2}} = 56$ komórek, *** $p < 0,001$ (b) Wykres przedstawiający łączną długość dendrytów w neuronach kontrolnych oraz w neuronach z obniżonym poziomem białka SRF. Test t-studenta. Dane przedstawiono jako średnie \pm SEM. $n_{\text{shCTR}} = 62$ komórek, $n_{\text{shSRF1}} = 61$ komórek, $n_{\text{shSRF2}} = 56$ komórek, * $p < 0,05$. (c) Wykres przedstawia analizę Sholla obrazującą różnice w budowie drzewa dendrytycznego w neuronach z obniżonym poziomem białka SRF. Różnice statystyczne obliczono za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji Two-way ANOVA z korektą Bonferroni. Dane przedstawiono jako średnie \pm SEM. $n_{\text{shCTR}} = 62$ komórek, $n_{\text{shSRF1}} = 61$ komórek, $n_{\text{shSRF2}} = 56$ komórek. Wyniki pochodzą z trzech niezależnych eksperymentów.

Wyniki przeprowadzanych doświadczeń pokazują, że obniżenie poziomu SRF w trakcie rozwoju ludzkich neuronów spowodowało zwiększenie liczby dendrytów podstawnych w neuronach (Rycina 36) prowadząc do wzrostu całkowitej długości dendrytów w przypadku shSRF1 oraz liczby ich rozgałęzień po wyciszeniu SRF w przypadku obu zastosowanych shRNA (Rycina 37). Dokładniejszą charakterystykę kształtu drzewa przeprowadzono używając analizy Sholla. Istotny statystycznie spadek liczby przecięć dendrytów w odległości 110 μm od ciała komórki przez współcentryczne okręgi otrzymano dla shSRF2 ($p < 0,05$). Przeprowadzono także analizę pola powierzchni zajmowanego przez drzewa dendrytyczne. Dla shCTR pole wynosiło 867,2 μm^2 , dla shSRF1 832,7 μm^2 , natomiast dla shSRF2 784,1 μm^2 (analiza pola pod krzywą (AUC)). Uzyskane wyniki wskazują, że SRF może odgrywać istotną rolę w regulacji rozwoju i wzrostu dendrytów, a obniżenie jego poziomu prowadzi do powstawania dodatkowych krótkich odgałęzień, przy jednoczesnym spadku pola powierzchni zajmowanej przez drzewa dendrytyczne.

5 Dyskusja

Głównym celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu czynnika transkrypcyjnego SRF oraz jego koaktywatorów: białek białaczki MKL1 i MKL2 na proces dojrzewania neuronów *in vitro*.

Otrzymane wyniki wykazały, że SRF jest niezbędny dla prawidłowego dojrzewania drzew dendrytycznych w mysich neuronach *in vitro* oraz w neuronach pochodzących z ludzkich komórek iPS. Ponadto, pokazano udział SRF w dojrzewaniu kolców dendrytycznych w mysich neuronach *in vitro*. W pracy zidentyfikowano także polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (SNP) występujące w genach kodujących koaktywatory MKL1 i MKL2 u ludzi, które wpływają na ich właściwości transkrypcyjne i budowę drzew dendrytycznych.

Uzyskane wyniki wskazują, że SRF i jego koaktywatory odgrywają istotną rolę w procesie dojrzewania neuronów, także tych pochodzących od ludzi.

5.1 Model badawczy: wyciszenie ekspresji SRF w hodowlach neuronów hipokampa myszy in vitro

Pierwotne hodowle neuronów *in vitro* stanowią model badawczy, dostarczający informacji o budowie i funkcji komórek w układzie nerwowym, oraz pozwalają na monitorowanie rozwoju neuronów w czasie (Amin i Paśca, 2018; Gordon i Geschwind, 2020).

W niniejszej pracy, w celu zbadania jak czynnik transkrypcyjny SRF wpływa na dojrzewanie neuronów, wykorzystano neurony hipokampa pozyskane ze zwierząt transgenicznym szczepu $SRF^{f/f}$, hodowane w warunkach *in vitro*. Uzyskane w ten sposób hodowle charakteryzowały się dużą homogennością oraz umożliwiały stosunkowo łatwe i efektywne przeprowadzenie manipulacji genetycznych. W neuronach pochodzących od myszy $SRF^{f/f}$ delekcja genu otoczonego sekwencjami loxP jest zależna od aktywności Cre rekombinazy. Efekt wyciszenia SRF uzyskano przez wprowadzenie do komórek genu rekombinazy Cre pod kontrolą promotora podjednostki kinazy $CaMKII\alpha$. Ponieważ celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu SRF na rozwój i dojrzewanie neuronów, usunięcie SRF przeprowadzono pomiędzy 5 a 7 dniem hodowli. Czas ten został wybrany na podstawie danych literaturowych (Babikian i in., 2010) oraz wyników uzyskanych z analizy ekspresji białek w rozwoju mysich neuronów. W mysich komórkach Purkiniego drzewo dendrytyczne zaczyna się kształtować pomiędzy dniem 7 a 30 po narodzinach (Sadler i Berry, 1984). $CaMKII\alpha$ zaczyna ulegać ekspresji w okresie postnatalnym, a jej wysoki poziom wykrywany jest przede

wszystkim w hipokampie (Nicole i Pacary, 2020; Wang i in., 2013). Po zbadaniu poziomu białka CaMKII α w hodowli pierwotnej neuronów hipokampa wyizolowanych z osesków myszy C57BL/6J w okresie pomiędzy 1 a 23 dniem rozwoju *in vitro* uzyskaliśmy wyniki zgodne z przedstawionymi w literaturze. W badaniach przeprowadzonych przez Dragatsis i Zeitlin (Dragatsis i Zeitlin, 2000), najwyższy poziom rekombinazy Cre pod kontrolą promotora CaMKII α wykryto w tkankach mózgu mysich osesków w piątym dniu od narodzin.

Na podstawie uzyskanych wyników uznaliśmy, że opisany model hodowli neuronów hipokampa z myszy SRF^{ff} z nadprodukcją rekombinazy Cre może zostać zastosowany do badania wpływu czynnika SRF na postnatalny rozwój neuronów.

5.2 Obniżenie poziomu SRF prowadzi do zaburzenia dojrzewania kolców dendrytycznych

Jednym z celów pracy było zbadanie wpływu SRF na proces dojrzewania kolców dendrytycznych. U gryzoni kolce dendrytyczne zaczynają powstawać już w pierwszych dniach po narodzeniu, a dojrzałość osiągają po 21 dniu hodowli w warunkach *in vitro* (Cullen i in., 2010; Moutaux i in., 2018; Raba i in., 2016; Schachtele i in., 2011). Okres najintensywniejszego ich dojrzewania przypada na czas pomiędzy jej 9 a 16 dniem (Schachtele i in., 2011). Modyfikacje wielkości i kształtu kolców dendrytycznych leżą u podstaw plastyczności strukturalnej (Borczyk i in., 2019), a różnice w wymiarach główki i szyjki tych wypustek wpływają na ich ruchliwość i stabilność (Nimchinsky i in., 2002). Co ciekawe, zmiany gęstości (Kulkarni i Firestein, 2012) i kształtu kolców dendrytycznych zaobserwowano w wielu zaburzeniach neuropsychiatrycznych (Penzes i in., 2011; Phillips i Pozzo-Miller, 2015).

W celu zbadania wpływu SRF na proces dojrzewania kolców dendrytycznych, delecję SRF przeprowadzono na wczesnym etapie rozwoju w hodowli *in vitro*. Analizy gęstości i kształtu kolców dendrytycznych przeprowadzono na dojrzałych 21 dniowych neuronach. W naszym modelu doświadczalnym zaobserwowano zmniejszenie gęstości kolców dendrytycznych w neuronach z obniżonym poziomem SRF. Ponadto, wyciszenie SRF spowodowało wzrost średniej długości kolców dendrytycznych oraz zwiększenie liczby niedojrzałych kolców o kształcie filopodialnym i długim. Jednocześnie usunięcie SRF w neuronach prowadziło do spadku liczby dojrzałych kolców dendrytycznych o kształcie grzybkowatym. Otrzymane wyniki z hodowli mysich neuronów hipokampa z wyciszonym SRF są zbieżne z rezultatami uzyskanymi przez nasz zespół w szczurzych hodowlach pierwotnych (Roszkowska, Krysiak i in., 2022) w których obniżenie poziomu białka SRF uzyskano za

pomocą krótkich sekwencji RNA o strukturze spinki do włosów - shRNA (Roszkowska, Krysiak i in., 2022). Podobnie, wyciszenie SRF u dorosłych myszy prowadziło do wzrostu liczby kolców dendrytycznych o kształcie długim i filopodialnym, przy jednoczesnym spadku ilości przysadzistych i grzybkowatych kolców dendrytycznych w zakręcie zębatym hipokampa *ex vivo* (Nader i in., 2019). Wpływ SRF na zmniejszenie liczby kolców dendrytycznych w mysim modelu zaobserwowano również w badaniach przeprowadzonych przez Stritt i Knöll (2010). Powyższe dane oraz badania przeprowadzone w naszym zespole dowodzą, że SRF odgrywa ważną rolę w regulacji powstawania i dojrzewania kolców dendrytycznych (Roszkowska i in., 2022). SRF odpowiada również za utrzymanie ich dojrzałego fenotypu przez cały okres życia (Nader i in., 2019). Co więcej, postnatalna delecja SRF w neuronach przodomózgowia zwiększa odsetek niedojrzałych (filopodialnych) kolców dendrytycznych, co koreluje ze zmianami w zachowaniach społecznych u myszy (Roszkowska i in., 2022). Obniżenie poziomu SRF prowadzi do spadku poziomu receptorów AMPA oraz częstotliwości miniaturowych pobudzających prądów postsynaptycznych (mEPSC) w neuronach *in vitro*, co może świadczyć o zmniejszeniu ilości funkcjonalnych synaps w neuronach (Roszkowska i in., 2022). Nasze dane wskazują, że SRF reguluje zarówno plastyczność strukturalną, jak i funkcjonalną (Roszkowska i in., 2022). U ludzi mutacje i delecje w genach kodujących podjednostki receptora AMPA są związane z występowaniem chorób takich jak ASD (Salpietro i in., 2019) czy upośledzenie umysłowe (Hackmann i in., 2013).

5.3 Nadekspresja miRNA-132 w neuronach pozbawionych SRF nie wpływa na morfologię koców dendrytycznych

SRF może wpływać na proces formowania i dojrzewania kolców dendrytycznych poprzez regulację ekspresji mRNA i miRNA, które są niezbędne do prawidłowego rozwoju i funkcjonowania mózgu (Davis i in., 2008; Stark i in., 2008). Liczne dane literaturowe pokazują, że miRNA regulują rozwój neuronów i procesy plastyczne (Edbauer i in., 2010; Hu i Li, 2017; Muddashetty i in., 2011; Siegel i in., 2011), a także lokalną translację wielu dendrytycznych mRNA (Z. Hu i in., 2015).

Przeprowadzone w Laboratorium Neurobiologii Instytutu Nenckiego, w grupie dr hab. Katarzyny Kality, globalne profilowanie ekspresji miRNA w neuronach mysich z wyciszoną ekspresją SRF, doprowadziło do identyfikacji miR-132-3p i miR-212-3p, jako potencjalnych cząsteczek od niego zależnych. miR-132 jest regulatorem plastyczności synaptycznej (Jasińska i in., 2016), a jego ekspresja jest regulowana przez czynniki transkrypcyjne, takie jak CREB

(Vo i in., 2005) czy MeCP2 (Klein i in., 2007). miR-132 wpływa na budowę dendrytów neuronów i formowanie synaps poprzez regulację poziomu białek takich jak kalbindyna, czy p250GAP (Vo i in., 2005). Co więcej, niedobór miR-132 wpływa na formowanie niedojrzałych kolców dendrytycznych (Mellios i in., 2011a). Wyciszenie miR-212/132 w mysich neuronach hipokampa prowadzi do zmniejszenia gęstości kolców dendrytycznych oraz długości dendrytów, a także hamuje dojrzewanie kolców dendrytycznych (Magill i in., 2010; Mellios i in., 2011). Usunięcie SRF w neuronach ma podobny wpływ na kształt kolców dendrytycznych, jak brak ekspresji miR-132. Co więcej, nadekspresja miR-132 prowadzi do zwiększenia liczby i długości kolców dendrytycznych w modelach zwierzęcych (Mellios i in., 2011). W związku z powyższym, w niniejszej pracy postanowiliśmy sprawdzić czy nadprodukcja miR-132-3p w komórkach pozbawionych SRF może przywrócić fenotyp obserwowany w komórkach dzikich.

W tym celu sprawdzono, czy zwiększenie poziomu ekspresji miR-132-3p, w neuronach pozbawionych SRF, spowoduje wzrost gęstości kolców dendrytycznych oraz wpłynie na ich dojrzewanie. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń sugerują, że nadprodukcja miR-132-3p nie ma bezpośredniego wpływu na dojrzewanie kolców dendrytycznych w mysich neuronach hipokampa z obniżonym poziomem SRF. Nadekspresja miR-132 nie wpłynęła na zmianę gęstości kolców dendrytycznych ani na ich kształt.

SRF, jako czynnik transkrypcyjny reguluje ekspresję wielu genów (del Blanco i in., 2019; Knöll i Nordheim, 2009; Miano, 2010; Roszkowska i in., 2022). Delecja SRF w neuronach powoduje m.in. zmniejszenie poziomu mRNA Gria1 i Gria2, przez co może on regulować dojrzewanie kolców dendrytycznych (Roszkowska i in., 2022). Dlatego też wprowadzenie do komórek jednego z genów którego poziom zależy od SRF, w tym wypadku miRNA -132, może być nie wystarczające, by przywrócić natywną strukturę kolców dendrytycznych.

5.4 SRF reguluje kształt drzewa dendrytycznego in vitro

Kształt drzewa dendrytycznego ma bezpośredni wpływ na integrację synaptyczną i pobudliwość neuronów, czy generowanie potencjału czynnościowego (Kubota i in., 2011; Mainen i Sejnowski, 1996; Schaefer i in., 2003). Co więcej, rozgałęzienia dendrytów tworzą drzewa dendrytyczne, będące dynamicznymi strukturami, odgrywającymi ważną rolę w plastyczności strukturalnej i funkcjonalnej mózgu (Cline, 2001; Dailey i Smith, 1996; Niell i in., 2004). Zmiany w budowie dendrytów, czy zmniejszenie liczby ich rozgałęzień są

powiązane z zaburzeniami neurologicznymi i neurorozwojowymi, takimi jak zespół Downa, zespół Retta, FXS, czy opóźnienie rozwojowe (Kaufmann i Moser, 2000; Pfeiffer i Huber, 2007).

W niniejszej dysertacji zbadano wpływ SRF na rozwój drzew dendrytycznych w neuronach hipokampa *in vitro*. Wyciszenie SRF w mysich neuronach spowodowało skrócenie długości dendrytów oraz zmniejszenie ich liczby. Ponadto, zaobserwowano zmniejszenie całkowitej powierzchni zajmowanej przez drzewo dendrytyczne. Uzyskane dane potwierdzają udział SRF w regulacji dojrzewania drzew dendrytycznych *in vitro*.

Wyniki uzyskane w niniejszej rozprawie doktorskiej są spójne z badaniami przeprowadzonymi przez Strill i Knöll (2010), które wskazują na rolę SRF w regulacji rozwoju hipokampa. Badacze udowodnili, iż SRF moduluje liczbę rozgałęzień dendrytów, a jego brak redukuje złożoność drzew dendrytycznych (zmniejszona długość i liczba rozgałęzień dendrytów). Udział SRF w regulacji długości i rozgałęziania neurytów został także potwierdzony w warunkach *in vitro* (Stritt i Knöll, 2010). Badania przeprowadzone przez zespół Angela Barco pokazują, że zmiana aktywności SRF wpływa na kształt neuronów i ich przeżywalność, zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* (Scandaglia i in., 2015). Ekspresja aktywnej formy SRF powodowała zwiększenie długości dendrytów neuronów oraz ich rozgałęzień. Dodatkowo na myszach z delecją genu SRF wykazywały zaburzenia w laminacji hipokampa i kory mózgowej (Stritt i Knöll, 2010), co może mieć wpływ na prawidłowe funkcjonowanie tych struktur. Stwierdzono także defekty w rozwoju twarzoczaszki związane z deficytami migracji komórek grzebienia nerwowego przy wyciszeniu SRF (Vasudevan i Soriano, 2014). Wyniki tych badań sugerują, że czynnik odpowiedzi na surowicę odgrywa istotną rolę w rozwoju i funkcjonowaniu neuronów oraz tworzeniu obwodów neuronalnych w mózgu (Scandaglia i in., 2015). Co więcej, SRF odgrywa także ważną rolę podczas wczesnego rozwoju embrionalnego neuronów *in vivo* oraz *in vitro* (Ramanan i in., 2005; Schrott i in., 2004). Wykazano, że całkowita delecja SRF u myszy *in vivo* prowadzi do śmieci zwierząt na etapie embrionalnym spowodowanej defektem w tworzeniu mezodermy (Arsenian i in., 1998). Co ciekawe, również koaktywatory SRF, białka MKL, pobudzają wzrost neurytów (Knöll i in., 2006), jak również mogą stymulować wzrost liczby rozgałęzień dendrytów w neuronach mysich poprzez regulację dynamiki aktyny (Stern i in., 2013).

Obok SRF, kompleks transkrypcyjny CREB z białkiem CBP (białko wiążące CREB), odgrywają istotną rolę w regulacji ekspresji genów związanych z dojrzewaniem neuronów. Wykazano, że współdziałanie CBP z SRF wpływa na wiele aspektów dojrzewania komórek

nerwowych, takich jak tworzenie dendrytów, tworzenie synaps oraz zależna od aktywności przebudowa połączeń synaptycznych. Procesy te są kluczowe dla formowania i modulowania struktury neuronalnej podczas rozwoju (del Blanco i in., 2019).

5.5 Rola SRF w formowaniu i dojrzewaniu drzew dendrytycznych w ludzkich neuronach wyprowadzonych z iPSC

Trudności w pozyskiwaniu ludzkich komórek nerwowych oraz słabe zrozumienie mechanizmów zaburzeń neurorozwojowych skłoniły naukowców do intensywnych badań nad wykorzystaniem komórek macierzystych. Jednym z obiecujących podejść jest stosowanie indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC), które są wyprowadzane z komórek somatycznych pacjenta i mogą być różnicowane w neurony lub inne typy komórek, co zapewnia nieograniczone źródło materiału do badań. To podejście eliminuje również potencjalne dylematy etyczne związane z wykorzystaniem ludzkich embrionalnych komórek macierzystych do celów badawczych (Vadodaria i in., 2020; Zhao, 2023). Zastosowanie komórek iPSC pozwala na zrozumienie podstawowych mechanizmów powstawania oraz modelowania różnych chorób neurologicznych. Dzięki temu możliwe stało się badanie zmian funkcji i struktury neuronów, czy identyfikacja czynników, które przyczyniają się do rozwoju chorób (Ardhanareeswaran i in., 2017; Israel i in., 2012; Shi i in., 2017). Dostępne dane jednoznacznie wskazują na efektywne wykorzystanie protokołu różnicowania indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC) w kierunku neuralnych komórek macierzystych, a następnie do neuronów (Das i in., 2015; Galiakberova i Dashinimaev, 2020). Użyty przez nas model badawczy był zastosowany z sukcesem przez innych badaczy i umożliwił przeprowadzenie analizy złożoności drzew dendrytycznych w modelach chorób neurologicznych takich jak ASD, FXS, schizofrenia, zespół Retta, padaczka, niedobór hydroksylazy tyrozynowej (Doers i in., 2014; Grunwald i in., 2019; Marchetto i in., 2010; Negraes i in., 2021; Tristán-Noguero i in., 2023). Zmiany w kształcie drzewa dendrytycznego w komórkach MAP2-pozytywnych pochodzących z iPSC analizowane była także przez Mehta i współautorów (Mehta i in., 2018) w celu zrozumienia różnic między neuronami pochodzącymi od pacjentów zdrowych, a neuronami pacjentów dotkniętych chorobami neurologicznymi (Mehta i in., 2018). Zaobserwowano, że neurony pacjentów dotkniętych chorobą Huntingtona miały krótsze neuryty w porównaniu do grupy kontrolnej (Mehta i in., 2018).

Długi czas trwania procedury różnicowania komórek iPS do neuronów skłonił naukowców do opracowania metody transróżnicowania fibroblastów do indukowanych neuronów (iN) przy nadekspresji czynników transkrypcyjnych takich jak Ngn2, NeuroD, Brn2, Ascl1 i Myt1l (Pang i in., 2011; Pfisterer i in., 2011; Qiang i in., 2011; Y. Zhang i in., 2013). Jednak ta metoda jest mało wydajna i generuje niewielką liczbę iN. Ponadto, zdolność tworzenia synaps, przez wytworzone iN jest również ograniczona. W procesie rozwoju mózgu synapsy są tworzone i stabilizowane w odpowiedzi na bodźce środowiskowe i sygnały biochemiczne. Obecne metody wytwarzania iN nie są w stanie w pełni odwzorować tego złożonego procesu.

SRF jest czynnikiem transkrypcyjnym (Leung i Miyamoto, 1989) regulującym ekspresję wielu genów przez wiązanie się z sekwencją CArG (Stepanek i in., 2007), leżącą w pobliżu miejsca startu transkrypcji docelowego genu (Q. Sun i in., 2006). Mutacje w sekwencji CArG lub jej sąsiedztwie powodują zmianę ekspresji genów i przyczyniają się do rozwoju chorób u ludzi, takich jak choroba afektywna dwubiegunowa, stwardnienie zanikowe boczne czy choroba Alzheimera (Benson i in., 2011). Ponieważ brak jest danych dotyczących wpływu czynnika SRF na rozwój ludzkich neuronów, aby zrozumieć ten problem w dalszej części pracy postanowiliśmy wykorzystać metodę różnicowania ludzkich komórek iPS do komórek nerwowych. W tym celu wykorzystano indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste pochodzące z fibroblastów ludzkich, które poddano procesowi różnicowania kierunku neuralnych. Procedura różnicowania została przeprowadzona za pomocą metody podwójnego hamowania białek SMAD.

Wyciszenie ekspresji SRF przeprowadzono w neuralnych komórkach macierzystych z zastosowaniem techniki interferencji RNA używając konstruktywów shSRF i shCTR o potwierdzonej skuteczności (Moore i in., 2010; Weng i in., 2017). Do wprowadzenia shRNA zastosowano wektory lentiwirusowe z kasetą oporności na puromycynę, które wbudowują się do genomu, co umożliwia przeprowadzenie selekcji klonów pozytywnych. Następnie neuralne komórki macierzyste z obniżonym poziomem SRF różnicowano do dojrzałych neuronów z wykorzystaniem warstwy odżywczej szczurzych neuronów hipokampalnych. Neurony ludzkie, z wyciszonym SRF, charakteryzowały się wzrostem liczby bardzo krótkich zakończeń dendrytycznych. Ponadto, w przypadku jednego z użytych wariantów shRNA zaobserwowano wzrost całkowitej długości dendrytów. Uzyskany wynik jest jednak sprzeczny z danymi otrzymanymi w mysich neuronach *in vitro*, gdzie doszło do spadku łącznej długości dendrytów. Co ciekawe neurony pochodzące z komórek iPSC wykazywały niewielkie różnice

w ekspansywności drzew dendrytycznych po obniżeniu poziomu SRF. Trend tej zmiany jest zgodny z wynikami, które uzyskaliśmy w mysich neuronach. Różnica w kształcie drzewa dendrytycznego po wyciszeniu SRF może wynikać z różnic gatunkowych. Specyficzne dla gatunku tempo rozwoju komórek występuje między innymi podczas dojrzewania neuronów pochodzących z indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (Barry i in., 2019). Czas potrzebny na dojrzewanie neuronów u myszy jest około dziesięć razy krótszy niż u człowieka (Caviness i in., 1995). Natomiast różnice w tempie wczesnej embriogenezy są dwu-, trzykrotnie mniejsze w przypadku człowieka w porównaniu z myszą. Liczne badania wykazały, że ludzkie indukowane neurony osiągają dojrzałość po około 6-8 tygodniach hodowli *in vitro* (Nieweg i in., 2015; Shi i in., 2012; Sun i in., 2016). Po tym czasie, neurony wykazują cechy typowe dla dojrzałych komórek nerwowych, takie jak formowanie synaps (Sun i in., 2016), wydzielanie neuroprzekaźników i rozwój dendrytów oraz aksonów (Nieweg i in., 2015). Prawdopodobną przyczyną różnic we wpływie SRF na kształt drzewa dendrytycznego wynika z braku osiągnięcia dojrzałości przez ludzkie neurony spowodowanego różnicą długości cyklu rozwojowego w mysich, jak i ludzkich komórkach.

Zmiany w kształcie drzewa dendrytycznego obserwowane w ludzkich neuronach wyprowadzonych z iPSC po wyciszeniu SRF przypominają zmiany obserwowane *post mortem* w mózgach pacjentów z Zespołem Downa (Becker i in., 1986; Takashima i in., 1981). W obu badaniach stwierdzono wzrost liczby rozgałęzień dendrytów ograniczony tylko do grupy niemowląt, co sugeruje, że jest to cecha charakterystyczna dla tego okresu rozwoju (Becker i in., 1986; Takashima i in., 1981). Ponadto, u dzieci z zespołem Downa w wieku poniżej czwartego miesiąca życia zaobserwowano zwiększoną liczbę dendrytów podstawnych w porównaniu do grupy kontrolnej (Takashima i in., 1981). Podobnych obserwacji dokonał zespół Beckera, gdzie dzieci z zespołem Downa miały bardziej rozbudowane drzewo dendrytyczne niż zdrowe niemowlaki. Wydaje się, że wzrost liczby rozgałęzień dendrytów w okresie niemowlęcym może być próbą kompensacji mózgu w odpowiedzi na zmniejszoną liczbę kolców dendrytycznych, które mogą wynikać z obecności dodatkowego chromosomu u osób z zespołem Downa.

Badania nad neuronami pochodzącymi z komórek iPS stanowią stosunkowo nową dziedzinę, a obecna literatura naukowa dostarcza niewielu informacji dotyczących procesu kształtowania się kolców dendrytycznych na otrzymanych neuronach (Wilson i Newell-Litwa, 2018). Obecnie kilku grupom badawczym udało się zaobserwować wypustki kształtem zbliżone do kolców dendrytycznych w hodowlach długoterminowych (80- 100 dniowych)

(Gouder i in., 2019; Kirwan i in., 2015) lub w organoidach (13-sto miesięcznych) (Quadrato i in., 2017). Jednakże, jedynie w nielicznych badaniach udało się potwierdzić funkcjonalność powstałych kolców dendrytycznych (Lin i in., 2023). W przeprowadzonych badaniach przedstawionych w rozprawie hodowle neuronów prowadzono przez 21 dni. W związku z powyższym nie analizowano formowania się kolców dendrytycznych ze względu na zbyt krótki czas trwania hodowli.

5.6 SNP zidentyfikowane w ludzkich genach MKL1 i MKL2 wpływają na aktywność transkrypcyjną, lokalizację komórkową białek MKL oraz powodują zmiany w rozwoju drzewa dendrytycznego neuronów szczura

Rozwój metod sekwencjonowania genomu doprowadził do zidentyfikowania zmian pojedynczych nukleotydów w nowych genach potencjalnie związanych z etiologią chorób neurorozwojowych. W ostatnich latach pokazano, że występowanie polimorfizmów pojedynczych nukleotydów w genach *MKL1* lub *MKL2* może być związany ze zwiększoną predyspozycją do pojawienia się chorób, takich jak schizofrenia, lub zaburzenia ze spektrum autyzmu (Eising i in., 2019; Holt i in., 2010; Z. Li i in., 2017; Luo i in., 2015; D. Wang i in., 2016). W związku z powyższym, w niniejszej pracy postanowiliśmy sprawdzić czy zidentyfikowane u ludzi polimorfizmy mogą wpływać na funkcję koaktywatorów w neuronach *in vitro*. Przeprowadziliśmy analizę wpływu wybranych polimorfizmów, które występują w sekwencji kodującej genu, powodując powstawanie białka z mutacjami typu „missense”, które mogą zmieniać jego funkcje (przewidywania według programu SIFT (Vaser i in., 2016). Zbadany został również wpływ mutacji na lokalizację białek MKL1 i MKL2 w komórce, regulację transkrypcji oraz na kształt drzew dendrytycznego. W niniejszej pracy, do stymulacji neuronów używaliśmy BDNF, który aktywuje ścieżkę angażującą koaktywaory MKL1/2 w regulację transkrypcji zależnej od SRF (Kalita i in., 2006; Kuźniewska i in., 2013). Ponadto, BDNF jest znany jako czynnik troficzny regulujący dojrzewanie neuronów i plastyczność synaptyczną (Castrén i Antila, 2017; Tyler i in., 2002).

Pokazaliśmy, że stymulacja czynnikiem wzrostu BDNF powoduje zwiększenie liczby neuronów wykazujących jądrową/rozporoszoną lokalizację konstruktów MKL1 i MKL2. Żaden z badanych polimorfizmów w obszarze kodującym MKL1 nie wpłynął na zmiany w rozmieszczeniu białka w komórce w porównaniu do wariantu niezmienionego. W przypadku

MKL2 polimorfizmy znajdujące się w domenach R299W- za domeną oddziaływania z SRF (+Q), C647R - pomiędzy domeną leucynową (LZ) a transaktywacyjną (TAD), D1043E w domenie transaktywacyjnej –TAD, istotnie statystycznie zmniejszały liczbę komórek z lokalizacją jądrową i rozproszoną. Można zatem przypuszczać, że mutacje te mogą zmieniać właściwości transkrypcyjne koaktywatora MKL2. Należy przypomnieć, że translokacja koaktywatorów MKL1/2 do jądra jest ważnym regulatorem aktywności transkrypcyjnej czynnika SRF (Kaneda i in., 2018; Miralles i in., 2003).

Oprócz zmian w lokalizacji wariantów konstruktów MKL1 i MKL2 pokazaliśmy, że ich nadprodukcja dodatkowo wzmacnia zależną od SRF transkrypcję w obecności BDNF. Wyniki te są w zgodzie z wcześniej opublikowanymi danymi (Kalita i in., 2006), gdzie nadekspresja MKL1 zwiększała transkrypcję zależną od SRF. Ponadto pokazaliśmy, że dwa SNP w MKL1 (P2L i P244L) i jeden SNP w MKL2 (C647R) istotnie obniżały zdolności białek do aktywacji transkrypcji zależnej od SRF. Co więcej, zmniejszona aktywność transkrypcyjna jednego z badanych wariantów MKL2 (C647R) powiązana była także ze spadkiem lokalizacji jądrowej/rozproszonej po stymulacji BDNF. Zidentyfikowane zmiany pojedynczych nukleotydów, wpływające na zależną od SRF transkrypcję, występowały w rejonach: odpowiedzialnych za regulację lokalizacji białka MKL1- motyw RPEL (P2L), w domenie SAP MKL1 odpowiedzialnej za wiązanie DNA (P244L) oraz pomiędzy domeną dimeryzacji i aktywacji transkrypcji (TAD) w MKL2 (C647R). Powyższe wyniki wskazują na to, że SNP w koaktywatorach SRF mogą wpływać na ich zdolność do regulacji transkrypcji poprzez zmianę lokalizacji subkomórkowej. Zmiany w rejonach odpowiedzialnych za umiejscowienie białka w komórce i jego wiązanie z DNA mogą przyczyniać się do interakcji z innymi czynnikami regulującymi transkrypcję, co z kolei może prowadzić do zmiany ekspresji genów zależnych od SRF. Polimorfizmy w poszczególnych domenach koaktywatorów mogą wpływać na efektywność transkrypcji genów zależnej od SRF i w ten sposób modulować procesy od nich zależne.

U myszy pozbawionych MKL1 i MKL2 w okresie prenatalnym zaobserwowano nieprawidłowy wzrost neurytów (Mokalled i in., 2010). Podobne zmiany w strukturze neuronów pokazano w neuronach pozbawionych MKL1 lub MKL2 *in vitro* (Ishikawa i in., 2010; Knöll i in., 2006; O'Sullivan i in., 2010; Shiota i in., 2006). W świetle tych wyników postanowiono sprawdzić, jak wprowadzenie SNP do konstruktów MKL1 lub MKL2 wpływa na rozwój drzew dendrytycznych neuronów. Liczbę dendrytów i ich długość oraz kształt formowanych przez nie drzew dendrytycznych analizowano w hodowli szczurzych

pierwotnych neuronów korowych. Z wykorzystaniem metody elektroporacji, do komórek wprowadzano konstrukty MKL1, MKL2 lub ich badane warianty. Nadprodukcja MKL1 lub MKL2 powodowała wzrost powierzchni zajmowanej przez drzewa dendrytyczne i jednoczesne wydłużenie dendrytów oraz zwiększenie ich liczby w neuronach. Uzyskane wyniki mogą wskazywać na istotny udział MKL1 i MKL2 w regulacji powstawania drzewa dendrytycznego. Ponadto, w toku badań zidentyfikowano polimorfizmy pojedynczych nukleotydów, które wpływają na parametry kształtu drzewa dendrytycznego. W przypadku wariantu MKL1 (P244L- konwersja proliny do leucyny w pozycji aminokwasowej 244) zaobserwowaliśmy spadek liczby zakończeń dendrytycznych oraz całkowitej długości dendrytów. Co ciekawe, wszystkie analizowane warianty powodowały skrócenie dendrytów. Ponadto, w dwóch wariantach MKL2 (H288Q- konwersja histydyny na glutaminę w pozycji 288 oraz D1043E- kwasu asparaginowego na kwas glutaminowy w pozycji 1043) SNP zmieniły liczby zakończeń dendrytycznych, lecz wpłynęły na całkowitą ich długość. Analiza kształtu drzewa dendrytycznego w MKL1: R31H, P244L, P344L wykazała, że liczbę dendrytów w odległości do 100 μm od ciała komórki była niższa niż w komórkach kontrolnych. Przeciwny skutek zaobserwowano dla MKL2 R299W przy formowaniu się drzewa dendrytycznego w odległości do 100 μm od ciała komórki, które charakteryzowało się wzrostem ekspansywności. Natomiast neurony z nadprodukcją MKL1, MKL1 i MKL2 S501F wykazywały większą liczbę dendrytów w większości odległości mierzonych od ciała neuronu. Z kolei liczba dendrytów w neuronach z wprowadzonym wariantem MKL2 H288W, była niższa niż ta obserwowana w komórkach kontrolnych. Nasze dane wskazują, że SNP w MKL1 lub MKL2 mogą wpływać na budowę drzewa dendrytycznego.

Przedstawione wyniki badań wskazują, że punktowe zmiany pojedynczych nukleotydów zidentyfikowane w genach *MKL1* i *MKL2*, powiązane z występowaniem zaburzeń neurorozwojowych u ludzi, mają wpływ na kształt komórek nerwowych. Aby w pełni zrozumieć związek pomiędzy zidentyfikowanymi SNP-ami w genach *MKL1* i *MKL2*, a występowaniem zaburzeń neurorozwojowych, konieczne są dalsze badania, z wykorzystaniem modelu zwierząt transgeniczných. Przedstawione wyniki sugerują możliwy wpływ SNP-ów na strukturę neuronów, jednak dla dokładniejszego zrozumienia ich rzeczywistego wpływu na funkcjonowanie komórek nerwowych, niezbędne są bardziej szczegółowe badania. Stworzenie zwierząt transgeniczných, które posiadają wprowadzone zmiany genetyczne odpowiadające danym SNP-om, może dostarczyć dodatkowych istotnych informacji zarówno na poziomie komórkowym, jak i całego organizmu.

PODSUMOWANIE i WNIOSKI

Wyniki niniejszej pracy doktorskiej dotyczącej wpływu czynnika transkrypcyjnego SRF oraz jego koaktywatorów: białek białaczki MKL1 i MKL2 na proces dojrzewania neuronów *in vitro* wskazują, iż:

- SRF jest regulatorem dojrzewania kolców dendrytycznych w postnatalnych mysich neuronach hipokama, a jego wyciszenie powoduje zwiększenie liczby niedojrzałych kolców dendrytycznych, o kształcie długim i filopodialnym.
- SRF wpływa na rozwój i utrzymanie prawidłowej morfologii i złożoności drzew dendrytycznych u myszy, utrata SRF skutkuje mniejszą liczbą i długością dendrytów, a także zmniejszoną złożonością drzew dendrytycznych.
- Wyciszenie SRF w ludzkich neuronach pochodzących od iPSC powoduje wzrost liczby krótkich zakończeń dendrytycznych odchodzących od dendrytów podstawnych.
- Nadprodukcja białek MKL1 lub MKL2 indukuje transkrypcję zależną od SRF w odpowiedzi na stymulację BDNF.
- Nadprodukcja białek MKL1 lub MKL2 powoduje wzrost długości i liczby rozgałęzień dendrytów.
- Polimorfizmy pojedynczych nukleotydów występujące w genach *MKL1* i *MKL2* wpływają na właściwości transkrypcyjne koaktywatorów i na kształt drzewa dendrytycznego.

W przeprowadzonych badaniach wykazano udział czynnika transkrypcyjnego SRF w regulacji gęstości i dojrzewania kolców dendrytycznych oraz formowania drzew dendrytycznych. Dodatkowo, udowodniono wpływ polimorfizmów pojedynczych nukleotydów w koaktywatorach MKL1 i MKL2 na zmiany budowy drzew dendrytycznych. Uzyskane w pracy wyniki stanowią istotny wkład w poszerzenie wiedzy na temat regulacji rozwoju drzew i kolców dendrytycznych, także w ludzkich neuronach, a zaburzenia tych procesów mogą leżeć u podstaw rozwoju chorób neurorozwojowych.

BIBLIOGRAFIA

1. Abraham, W. C. (2003). How long will long-term potentiation last? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 358(1432), 735–744. <https://doi.org/10.1098/rstb.2002.1222>
2. Adami, R., & Bottai, D. (2019). Spinal Muscular Atrophy Modeling and Treatment Advances by Induced Pluripotent Stem Cells Studies. *Stem Cell Reviews and Reports*, 15(6), 795–813. <https://doi.org/10.1007/s12015-019-09910-6>
3. Alberti, S., Krause, S. M., Kretz, O., Philippar, U., Lemberger, T., Casanova, E., Wiebel, F. F., Schwarz, H., Frotscher, M., Schütz, G., & Nordheim, A. (2005). Neuronal migration in the murine rostral migratory stream requires serum response factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(17), 6148–6153. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501191102>
4. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). Neural Development. *Molecular Biology of the Cell*. 4th Edition. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26814/>
5. Amin, N. D., & Paşca, S. P. (2018). Building Models of Brain Disorders with Three-Dimensional Organoids. *Neuron*, 100(2), 389–405. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.10.007>
6. Ardhanareeswaran, K., Mariani, J., Coppola, G., Abyzov, A., & Vaccarino, F. M. (2017). Human induced pluripotent stem cells for modelling neurodevelopmental disorders. *Nature Reviews Neurology*, 13(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2017.45>
7. Armstrong, D. D., Dunn, K., & Antalffy, B. (1998). Decreased dendritic branching in frontal, motor and limbic cortex in Rett syndrome compared with trisomy 21. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 57(11), 1013–1017. <https://doi.org/10.1097/00005072-199811000-00003>
8. Armstrong, D., Dunn, J. K., Antalffy, B., & Trivedi, R. (1995). Selective dendritic alterations in the cortex of Rett syndrome. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 54(2), 195–201. <https://doi.org/10.1097/00005072-199503000-00006>
9. Arsenian, S., Weinhold, B., Oelgeschläger, M., Rütger, U., & Nordheim, A. (1998). Serum response factor is essential for mesoderm formation during mouse embryogenesis. *The EMBO Journal*, 17(21), 6289–6299. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.21.6289>
10. Asparuhova, M. B., Ferralli, J., Chiquet, M., & Chiquet-Ehrismann, R. (2011). The transcriptional regulator megakaryoblastic leukemia-1 mediates serum response factor-independent activation of tenascin-C transcription by mechanical stress. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25(10), 3477–3488. <https://doi.org/10.1096/fj.11-187310>
11. Babikian, T., Prins, M. L., Cai, Y., Barkhoudarian, G., Hartonian, I., Hovda, D. A., & Giza, C. C. (2010). Molecular and Physiological Responses to Juvenile Traumatic Brain Injury: Focus on Growth and Metabolism. *Developmental Neuroscience*, 32(5–6), 431–441. <https://doi.org/10.1159/000320667>
12. Ballestrem, C., Wehrle-Haller, B., Hinz, B., & Imhof, B. A. (2000). Actin-dependent Lamellipodia Formation and Microtubule-dependent Tail Retraction Control-directed Cell Migration. *Molecular Biology of the Cell*, 11(9), 2999–3012.
13. Bangash, M. A., Park, J. M., Melnikova, T., Wang, D., Jeon, S. K., Lee, D., Syeda, S., Kim, J., Kouser, M., Schwartz, J., Cui, Y., Zhao, X., Speed, H. E., Kee, S. E., Tu, J. C., Hu, J.-H., Petralia, R. S., Linden, D. J., Powell, C. M., ... Worley, P. F. (2011). Enhanced polyubiquitination of Shank3 and NMDA receptor in a mouse model of autism. *Cell*, 145(5), 758–772. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.052>

14. Banker, G. (2018). The Development of Neuronal Polarity: A Retrospective View. *Journal of Neuroscience*, 38(8), 1867–1873. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1372-16.2018>
15. Barak, M., Fedorova, V., Pospisilova, V., Raska, J., Vochyanova, S., Sedmik, J., Hribkova, H., Klimova, H., Vanova, T., & Bohaciakova, D. (2022). Human iPSC-Derived Neural Models for Studying Alzheimer’s Disease: From Neural Stem Cells to Cerebral Organoids. *Stem Cell Reviews and Reports*, 18(2), 792–820. <https://doi.org/10.1007/s12015-021-10254-3>
16. Bardy, C., van den Hurk, M., Eames, T., Marchand, C., Hernandez, R. V., Kellogg, M., Gorris, M., Galet, B., Palomares, V., Brown, J., Bang, A. G., Mertens, J., Böhnke, L., Boyer, L., Simon, S., & Gage, F. H. (2015). Neuronal medium that supports basic synaptic functions and activity of human neurons in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(20), E2725–E2734. <https://doi.org/10.1073/pnas.1504393112>
17. Barry, C., Schmitz, M. T., Argus, C., Bolin, J. M., Probasco, M. D., Leng, N., Duffin, B. M., Steill, J., Swanson, S., McIntosh, B. E., Stewart, R., Kendziorski, C., Thomson, J. A., & Bacher, R. (2019). Automated minute scale RNA-seq of pluripotent stem cell differentiation reveals early divergence of human and mouse gene expression kinetics. *PLoS Computational Biology*, 15(12), e1007543. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007543>
18. Becker, L. E., Armstrong, D. L., & Chan, F. (1986). Dendritic atrophy in children with Down’s syndrome. *Annals of Neurology*, 20(4), 520–526. <https://doi.org/10.1002/ana.410200413>
19. Becker, L., Mito, T., Takashima, S., & Onodera, K. (1991). Growth and development of the brain in Down syndrome. *Progress in Clinical and Biological Research*, 373, 133–152.
20. Belichenko, P. V., Oldfors, A., Hagberg, B., & Dahlström, A. (1994). Rett syndrome: 3-D confocal microscopy of cortical pyramidal dendrites and afferents. *Neuroreport*, 5(12), 1509–1513.
21. Bell, R. L., Hauser, S. R., McClintick, J., Rahman, S., Edenberg, H. J., Szumlinski, K. K., & McBride, W. J. (2016). Chapter Two - Ethanol-Associated Changes in Glutamate Reward Neurocircuitry: A Minireview of Clinical and Preclinical Genetic Findings. W S. Rahman (Red.), *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (T. 137, s. 41–85). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.10.018>
22. Bellot, A., Guivernau, B., Tajés, M., Bosch-Morató, M., Valls-Comamala, V., & Muñoz, F. J. (2014). The structure and function of actin cytoskeleton in mature glutamatergic dendritic spines. *Brain Research*, 1573, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.05.024>
23. Benson, C. C., Zhou, Q., Long, X., & Miano, J. M. (2011). Identifying functional single nucleotide polymorphisms in the human CArGome. *Physiological Genomics*, 43(18), 1038–1048. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00098.2011>
24. Bentivoglio, M., Cotrufo, T., Ferrari, S., Tesoriero, C., Mariotto, S., Bertini, G., Berzero, A., & Mazzarello, P. (2019). The Original Histological Slides of Camillo Golgi and His Discoveries on Neuronal Structure. *Frontiers in Neuroanatomy*, 13, 3. <https://doi.org/10.3389/fnana.2019.00003>
25. Berry, K. P., & Nedivi, E. (2017). Spine Dynamics: Are They All the Same? *Neuron*, 96(1), 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.08.008>
26. Biga, L. M., Dawson, S., Harwell, A., Hopkins, R., Kaufmann, J., LeMaster, M., Matern, P., Morrison-Graham, K., Quick, D., & Runyeon, J. (2019). 12.2 Nervous Tissue. <https://open.oregonstate.edu/aandp/chapter/12-2-nervous-tissue/>
27. Bleuzé, L., Triaca, V., & Borreca, A. (2021). FMRP-Driven Neuropathology in Autistic Spectrum Disorder and Alzheimer’s disease: A Losing Game. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2021.699613>

28. 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. *The Journal of Physiology*, 232(2), 331–356. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1973.sp010273>
29. Blokzijl, F., de Ligt, J., Jager, M., Sasselli, V., Roerink, S., Sasaki, N., Huch, M., Boymans, S., Kuijk, E., Prins, P., Nijman, I. J., Martincorena, I., Mokry, M., Wiegerinck, C. L., Middendorp, S., Sato, T., Schwank, G., Nieuwenhuis, E. E. S., Verstegen, M. M. A., ... van Boxtel, R. (2016). Tissue-specific mutation accumulation in human adult stem cells during life. *Nature*, 538(7624), 260–264. <https://doi.org/10.1038/nature19768>
30. Bonilla-Quintana, M., & Rangamani, P. (2022). Can biophysical models of dendritic spines be used to explore synaptic changes associated with addiction? *Physical Biology*, 19(4), 041001. <https://doi.org/10.1088/1478-3975/ac6cbe>
31. Borczyk, M., Śliwińska, M. A., Caly, A., Bernas, T., & Radwanska, K. (2019). Neuronal plasticity affects correlation between the size of dendritic spine and its postsynaptic density. *Scientific Reports*, 9(1), 1693. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38412-7>
32. Bosch, M., Castro, J., Saneyoshi, T., Matsuno, H., Sur, M., & Hayashi, Y. (2014). Structural and Molecular Remodeling of Dendritic Spine Substructures during Long-Term Potentiation. *Neuron*, 82(2), 444–459. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.03.021>
33. Bourne, J. N., & Harris, K. M. (2008). Balancing Structure and Function at Hippocampal Dendritic Spines. *Annual Review of Neuroscience*, 31(1), 47–67. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.060407.125646>
34. Brito, A., Russo, F. B., Muotri, A. R., & Beltrão-Braga, P. C. B. (2018). Autism spectrum disorders and disease modeling using stem cells. *Cell and Tissue Research*, 371(1), 153–160. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2685-x>
35. Broadbelt, K., Byne, W., & Jones, L. B. (2002). Evidence for a decrease in basilar dendrites of pyramidal cells in schizophrenic medial prefrontal cortex. *Schizophrenia Research*, 58(1), 75–81. [https://doi.org/10.1016/s0920-9964\(02\)00201-3](https://doi.org/10.1016/s0920-9964(02)00201-3)
36. Brooks, I. R., Garrone, C. M., Kerins, C., Kiar, C. S., Syntaka, S., Xu, J. Z., Spagnoli, F. M., & Watt, F. M. (2022). Functional genomics and the future of iPSCs in disease modeling. *Stem Cell Reports*, 17(5), 1033–1047. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2022.03.019>
37. Brouwer, J., Mientjes, E., Bakker, C., Nieuwenhuizen, I., Severijnen, L., Van der Linde, H., Nelson, D., Oostra, B., & Willemsen, R. (2007). Elevated Fmr1 mRNA levels and reduced protein expression in a mouse model with an unmethylated Fragile X full mutation. *Experimental cell research*, 313(2), 244–253. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.10.002>
38. Burkhardt, M. F., Martinez, F. J., Wright, S., Ramos, C., Volfson, D., Mason, M., Garnes, J., Dang, V., Lievers, J., Shoukat-Mumtaz, U., Martinez, R., Gai, H., Blake, R., Vaisberg, E., Grskovic, M., Johnson, C., Irion, S., Bright, J., Cooper, B., ... Javaherian, A. (2013). A cellular model for sporadic ALS using patient-derived induced pluripotent stem cells. *Molecular and cellular neurosciences*, 56, 355–364. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2013.07.007>
39. Cai, J., Li, W., Su, H., Qin, D., Yang, J., Zhu, F., Xu, J., He, W., Guo, X., Labuda, K., Peterbauer, A., Wolbank, S., Zhong, M., Li, Z., Wu, W., So, K.-F., Redl, H., Zeng, L., Esteban, M. A., & Pei, D. (2010). Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells from Umbilical Cord Matrix and Amniotic Membrane Mesenchymal Cells *. *Journal of Biological Chemistry*, 285(15), 11227–11234. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.086389>
40. Carter, J. L., Halmai, J. A. N. M., & Fink, K. D. (2020). The iNs and Outs of Direct Reprogramming to Induced Neurons. *Frontiers in Genome Editing*, 2, 7. <https://doi.org/10.3389/fgeed.2020.00007>
41. Castrén, E., & Antila, H. (2017). Neuronal plasticity and neurotrophic factors in drug responses. *Molecular Psychiatry*, 22(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.61>

42. Catts, V. S., Derminio, D. S., Hahn, C.-G., & Weickert, C. S. (2015). Postsynaptic density levels of the NMDA receptor NR1 subunit and PSD-95 protein in prefrontal cortex from people with schizophrenia. *Npj Schizophrenia*, *1*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/npjischz.2015.37>
43. Caviness, V. S., Takahashi, T., & Nowakowski, R. S. (1995). Numbers, time and neocortical neuronogenesis: A general developmental and evolutionary model. *Trends in Neurosciences*, *18*(9), 379–383. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(95\)93933-O](https://doi.org/10.1016/0166-2236(95)93933-O)
44. Cen, B., Selvaraj, A., Burgess, R. C., Hitzler, J. K., Ma, Z., Morris, S. W., & Prywes, R. (2003). Megakaryoblastic Leukemia 1, a Potent Transcriptional Coactivator for Serum Response Factor (SRF), Is Required for Serum Induction of SRF Target Genes. *Molecular and Cellular Biology*, *23*(18), 6597–6608. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.18.6597-6608.2003>
45. Cen, B., Selvaraj, A., & Prywes, R. (2004). Myocardin/MKL family of SRF coactivators: Key regulators of immediate early and muscle specific gene expression. *Journal of Cellular Biochemistry*, *93*(1), 74–82. <https://doi.org/10.1002/jcb.20199>
46. Cervantes, E. P., Comin, C. H., Junior, R. M. C., & Costa, L. da F. (2019). Morphological Neuron Classification Based on Dendritic Tree Hierarchy. *Neuroinformatics*, *17*(1), 147–161. <https://doi.org/10.1007/s12021-018-9388-7>
47. Chai, J., & Tarnawski, A. S. (2002). Serum response factor: Discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, *53*(2), 147–157.
48. Chailangkarn, T., Acab, A., & Muotri, A. R. (2012). Modeling neurodevelopmental disorders using human neurons. *Current opinion in neurobiology*, *22*(5), 785–790. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2012.04.004>
49. Chambers, S. M., Fasano, C. A., Papapetrou, E. P., Tomishima, M., Sadelain, M., & Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nature biotechnology*, *27*(3), 275–280. <https://doi.org/10.1038/nbt.1529>
50. Chater, T. E., & Goda, Y. (2014). The role of AMPA receptors in postsynaptic mechanisms of synaptic plasticity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2014.00401>
51. Chavali, V. R. M., Haider, N., Rathi, S., Vratsha, V., Alapati, T., He, J., Gill, K., Nikonov, R., Duong, T. T., McDougald, D. S., Nikonov, S., O'Brien, J., & Mills, J. A. (2020). Dual SMAD inhibition and Wnt inhibition enable efficient and reproducible differentiations of induced pluripotent stem cells into retinal ganglion cells. *Scientific Reports*, *10*(1), 11828. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68811-8>
52. Chen, H., Qian, K., Du, Z., Cao, J., Petersen, A., Liu, H., Blackbourn, L. W., Huang, C.-L., Errigo, A., Yin, Y., Lu, J., Ayala, M., & Zhang, S.-C. (2014). Modeling ALS with iPSCs Reveals that Mutant SOD1 Misregulates Neurofilament Balance in Motor Neurons. *Cell stem cell*, *14*(6), 796–809. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.02.004>
53. Chidambaram, S. B., Rathipriya, A. G., Bolla, S. R., Bhat, A., Ray, B., Mahalakshmi, A. M., Manivasagam, T., Thenmozhi, A. J., Essa, M. M., Guillemin, G. J., Chandra, R., & Sakharkar, M. K. (2019). Dendritic spines: Revisiting the physiological role. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *92*, 161–193. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2019.01.005>
54. Cline, H. T. (2001). Dendritic arbor development and synaptogenesis. *Current Opinion in Neurobiology*, *11*(1), 118–126. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00182-3](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00182-3)
55. Coley, A. A., & Gao, W.-J. (2018). PSD95: A synaptic protein implicated in schizophrenia or autism? *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, *82*, 187–194. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.11.016>

56. Cooper, S. J., Trinklein, N. D., Nguyen, L., & Myers, R. M. (2007). Serum response factor binding sites differ in three human cell types. *Genome Research*, *17*(2), 136–144. <https://doi.org/10.1101/gr.5875007>
57. Cortés, D., Carballo-Molina, O. A., Castellanos-Montiel, M. J., & Velasco, I. (2017). The Non-Survival Effects of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor on Neural Cells. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *10*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2017.00258>
58. Craig, A. M., & Banker, G. (1994). Neuronal Polarity. *Annual Review of Neuroscience*, *17*(1), 267–310. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.17.030194.001411>
59. Cullen, D. K., Gilroy, M., Irons, H. R., & LaPlaca, M. C. (2010). Synapse-to-neuron ratio is inversely related to neuronal density in mature neuronal cultures. *Brain research*, *1359*, 44–55. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.08.058>
60. Dailey, M. E., & Smith, S. J. (1996). The Dynamics of Dendritic Structure in Developing Hippocampal Slices. *The Journal of Neuroscience*, *16*(9), 2983–2994. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-09-02983.1996>
61. Das, D. K., Tapias, V., D’Aiuto, L., Chowdari, K. V., Francis, L., Zhi, Y., Ghosh, A., Surti, U., Tischfield, J., Sheldon, M., Moore, J. C., Fish, K., & Nimgaonkar, V. L. (2015). Genetic and Morphological Features of Human iPSC-Derived Neurons with Chromosome 15q11.2 (BP1-BP2) Deletions. *Complex Psychiatry*, *1*(2), 116–123. <https://doi.org/10.1159/000430916>
62. Das, P., Lilly, S. M., Zerda, R., Gunning, W. T., Alvarez, F. J., & Tietz, E. I. (2008). Increased AMPA receptor GluR1 subunit incorporation in rat hippocampal CA1 synapses during benzodiazepine withdrawal. *The Journal of comparative neurology*, *511*(6), 832–846. <https://doi.org/10.1002/cne.21866>
63. Davis, T. H., Cuellar, T. L., Koch, S. M., Barker, A. J., Harfe, B. D., McManus, M. T., & Ullian, E. M. (2008). Conditional loss of Dicer disrupts cellular and tissue morphogenesis in the cortex and hippocampus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *28*(17), 4322–4330. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4815-07.2008>
64. De Carlos, J. A., & Borrell, J. (2007). A historical reflection of the contributions of Cajal and Golgi to the foundations of neuroscience. *Brain Research Reviews*, *55*(1), 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.03.010>
65. de Castro, F., López-Mascaraque, L., & De Carlos, J. A. (2007). Cajal: Lessons on brain development. *Brain Research Reviews*, *55*(2), 481–489. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.01.011>
66. DeFelipe, J. (2015). The dendritic spine story: An intriguing process of discovery. *Frontiers in Neuroanatomy*, *9*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnana.2015.00014>
67. del Blanco, B., Guiretti, D., Tomasoni, R., Lopez-Cascales, M. T., Muñoz-Viana, R., Lipinski, M., Scandaglia, M., Coca, Y., Olivares, R., Valor, L. M., Herrera, E., & Barco, A. (2019). CBP and SRF co-regulate dendritic growth and synaptic maturation. *Cell Death & Differentiation*, *26*(11), Article 11. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0285-x>
68. Dettmer, U., Newman, A. J., Soldner, F., Luth, E. S., Kim, N. C., von Saucken, V. E., Sanderson, J. B., Jaenisch, R., Bartels, T., & Selkoe, D. (2015). Parkinson-causing α -synuclein missense mutations shift native tetramers to monomers as a mechanism for disease initiation. *Nature Communications*, *6*, 7314. <https://doi.org/10.1038/ncomms8314>
69. Dimos, J. T., Rodolfa, K. T., Niakan, K. K., Weisenthal, L. M., Mitumoto, H., Chung, W., Croft, G. F., Saphier, G., Leibel, R., Golland, R., Wichterle, H., Henderson, C. E., & Eggan, K. (2008). Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be

- differentiated into motor neurons. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5893), 1218–1221. <https://doi.org/10.1126/science.1158799>
70. Doers, M. E., Musser, M. T., Nichol, R., Berndt, E. R., Baker, M., Gomez, T. M., Zhang, S.-C., Abbeduto, L., & Bhattacharyya, A. (2014). iPSC-Derived Forebrain Neurons from FXS Individuals Show Defects in Initial Neurite Outgrowth. *Stem Cells and Development*, 23(15), 1777–1787. <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0030>
 71. Doss, M. X., & Sachinidis, A. (2019). Current Challenges of iPSC-Based Disease Modeling and Therapeutic Implications. *Cells*, 8(5), 403. <https://doi.org/10.3390/cells8050403>
 72. Dragatsis, I., & Zeitlin, S. (2000). CaMKII α -cre transgene expression and recombination patterns in the mouse brain. *Genesis*, 26(2), 133–135. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1526-968X\(200002\)26:2<133:AID-GENE10>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1526-968X(200002)26:2<133:AID-GENE10>3.0.CO;2-V)
 73. Edbauer, D., Neilson, J. R., Foster, K. A., Wang, C.-F., Seeburg, D. P., Batterton, M. N., Tada, T., Dolan, B. M., Sharp, P. A., & Sheng, M. (2010). Regulation of Synaptic Structure and Function by FMRP-Associated MicroRNAs miR-125b and miR-132. *Neuron*, 65(3), 373–384. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.01.005>
 74. Eising, E., Carrion-Castillo, A., Vino, A., Strand, E. A., Jakielski, K. J., Scerri, T. S., Hildebrand, M. S., Webster, R., Ma, A., Mazoyer, B., Francks, C., Bahlo, M., Scheffer, I. E., Morgan, A. T., Shriberg, L. D., & Fisher, S. E. (2019). A set of regulatory genes co-expressed in embryonic human brain is implicated in disrupted speech development. *Molecular Psychiatry*, 24(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0020-x>
 75. Elston, G. N. (2003). Cortex, cognition and the cell: New insights into the pyramidal neuron and prefrontal function. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 13(11), 1124–1138. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhg093>
 76. Esnault, C., Stewart, A., Gualdrini, F., East, P., Horswell, S., Matthews, N., & Treisman, R. (2014). Rho-actin signaling to the MRTF coactivators dominates the immediate transcriptional response to serum in fibroblasts. *Genes & Development*, 28(9), 943–958. <https://doi.org/10.1101/gad.239327.114>
 77. Etkin, A., Alarcón, J. M., Weisberg, S. P., Touzani, K., Huang, Y. Y., Nordheim, A., & Kandel, E. R. (2006). A Role in Learning for SRF: Deletion in the Adult Forebrain Disrupts LTD and the Formation of an Immediate Memory of a Novel Context. *Neuron*, 50(1), 127–143. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.03.013>
 78. Favot, L., Gillingwater, M., Scott, C., & Kemp, P. R. (2005). Overexpression of a family of RPEL proteins modifies cell shape. *FEBS Letters*, 579(1), 100–104. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.11.054>
 79. Fiala, J. C., Allwardt, B., & Harris, K. M. (2002). Dendritic spines do not split during hippocampal LTP or maturation. *Nature Neuroscience*, 5(4), 297–298. <https://doi.org/10.1038/nn830>
 80. Filip, A. (2007). MiRNA--new mechanisms of gene expression control. *Postepy biochemii*, 53, 413–419.
 81. Förstner, P., & Knöll, B. (2020). Interference of neuronal activity-mediated gene expression through serum response factor deletion enhances mortality and hyperactivity after traumatic brain injury. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 34(3), 3855–3873. <https://doi.org/10.1096/fj.201902257RR>
 82. Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., & Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 85(8), 348–362. <https://doi.org/10.2183/pjab.85.348>

83. Galiakberova, A. A., & Dashinimaev, E. B. (2020). Neural Stem Cells and Methods for Their Generation From Induced Pluripotent Stem Cells in vitro. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 815. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00815>
84. Garey, L. (2010). When cortical development goes wrong: Schizophrenia as a neurodevelopmental disease of microcircuits. *Journal of Anatomy*, 217(4), 324–333. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2010.01231.x>
85. Gauthier-Rouvière, C., Vandromme, M., Lautredou, N., Cai, Q. Q., Girard, F., Fernandez, A., & Lamb, N. (1995). The serum response factor nuclear localization signal: General implications for cyclic AMP-dependent protein kinase activity in control of nuclear translocation. *Molecular and Cellular Biology*, 15(1), 433–444.
86. Ghosh, S. K. (2020). Camillo Golgi (1843 –1926): Scientist extraordinaire and pioneer figure of modern neurology. *Anatomy & Cell Biology*, 53(4), 385–392. <https://doi.org/10.5115/acb.20.196>
87. Gipson, C. D., & Olive, M. F. (2017). Structural and functional plasticity of dendritic spines—Root or result of behavior?: Dendritic spine plasticity and behavior. *Genes, Brain and Behavior*, 16(1), 101–117. <https://doi.org/10.1111/gbb.12324>
88. Glickstein, M. (2006). Golgi and Cajal: The neuron doctrine and the 100th anniversary of the 1906 Nobel Prize. *Current Biology*, 16(5), R147–R151. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.02.053>
89. Golovina, E., Fadason, T., Lints, T. J., Walker, C., Vickers, M. H., & O’Sullivan, J. M. (2021). Understanding the impact of SNPs associated with autism spectrum disorder on biological pathways in the human fetal and adult cortex. *Scientific Reports*, 11(1), 15867. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95447-z>
90. Gordon, A., & Geschwind, D. H. (2020). Human in vitro models for understanding mechanisms of autism spectrum disorder. *Molecular Autism*, 11(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s13229-020-00332-7>
91. Grunwald, L.-M., Stock, R., Haag, K., Buckenmaier, S., Eberle, M.-C., Wildgruber, D., Storchak, H., Kriebel, M., Weißgraeber, S., Mathew, L., Singh, Y., Loos, M., Li, K. W., Kraushaar, U., Fallgatter, A. J., & Volkmer, H. (2019). Comparative characterization of human induced pluripotent stem cells (hiPSC) derived from patients with schizophrenia and autism. *Translational Psychiatry*, 9, 179. <https://doi.org/10.1038/s41398-019-0517-3>
92. Grutzendler, J., Kasthuri, N., & Gan, W.-B. (2002). Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. *Nature*, 420(6917), 812–816. <https://doi.org/10.1038/nature01276>
93. Gunhanlar, N., Shpak, G., van der Kroeg, M., Gouty-Colomer, L. A., Munshi, S. T., Lendemeijer, B., Ghazvini, M., Dupont, C., Hoogendijk, W. J. G., Gribnau, J., de Vrij, F. M. S., & Kushner, S. A. (2018). A simplified protocol for differentiation of electrophysiologically mature neuronal networks from human induced pluripotent stem cells. *Molecular Psychiatry*, 23(5), 1336–1344. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.56>
94. Hackmann, K., Matko, S., Gerlach, E.-M., von der Hagen, M., Klink, B., Schrock, E., Rump, A., & Di Donato, N. (2013). Partial deletion of GLRB and GRIA2 in a patient with intellectual disability. *European Journal of Human Genetics*, 21(1), 112–114. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2012.97>
95. Hanse, E., Seth, H., & Riebe, I. (2013). AMPA-silent synapses in brain development and pathology. *Nature Reviews. Neuroscience*, 14(12), 839–850. <https://doi.org/10.1038/nrn3642>
96. Harris, K. M. (1999). Structure, development, and plasticity of dendritic spines. *Current Opinion in Neurobiology*, 9(3), 343–348. [https://doi.org/10.1016/s0959-4388\(99\)80050-6](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(99)80050-6)
97. Harris, K. M., Jensen, F. E., & Tsao, B. (1992). Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: Implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *The*

- Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 12(7), 2685–2705.
98. Harvey, I., Ron, M. A., Du Boulay, G., Wicks, D., Lewis, S. W., & Murray, R. M. (1993). Reduction of cortical volume in schizophrenia on magnetic resonance imaging. *Psychological Medicine*, 23(3), 591–604. <https://doi.org/10.1017/s003329170002537x>
 99. Hering, H., & Sheng, M. (2001). Dendritic spines: Structure, dynamics and regulation. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(12), Article 12. <https://doi.org/10.1038/35104061>
 100. Herms, J., & Dorostkar, M. M. (2016). Dendritic Spine Pathology in Neurodegenerative Diseases. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 11(1), 221–250. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012615-044216>
 101. Hinton, V. J., Brown, W. T., Wisniewski, K., & Rudelli, R. D. (1991). Analysis of neocortex in three males with the fragile X syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, 41(3), 289–294. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320410306>
 102. Hirano, T. (2013). Long-term depression and other synaptic plasticity in the cerebellum. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 89(5), 183–195. <https://doi.org/10.2183/pjab.89.183>
 103. Holt, R., Barnby, G., Maestrini, E., Bacchelli, E., Brocklebank, D., Sousa, I., Mulder, E. J., Kantojärvi, K., Järvelä, I., Klauck, S. M., Poustka, F., Bailey, A. J., & Monaco, A. P. (2010). Linkage and candidate gene studies of autism spectrum disorders in European populations. *European Journal of Human Genetics*, 18(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2010.69>
 104. Holtmaat, A. J. G. D., Trachtenberg, J. T., Wilbrecht, L., Shepherd, G. M., Zhang, X., Knott, G. W., & Svoboda, K. (2005). Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo. *Neuron*, 45(2), 279–291. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.01.003>
 105. Hu, B.-Y., Weick, J. P., Yu, J., Ma, L.-X., Zhang, X.-Q., Thomson, J. A., & Zhang, S.-C. (2010). Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(9), 4335–4340. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910012107>
 106. Hu, K. (Red.). (2021). *Nuclear Reprogramming: Methods and Protocols* (T. 2239). Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1084-8>
 107. Hu, Z., & Li, Z. (2017). miRNAs in Synapse Development and Synaptic Plasticity. *Current opinion in neurobiology*, 45, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.02.014>
 108. Hu, Z., Zhao, J., Hu, T., Luo, Y., Zhu, J., & Li, Z. (2015). miR-501-3p mediates the activity-dependent regulation of the expression of AMPA receptor subunit GluA1. *The Journal of Cell Biology*, 208(7), 949–959. <https://doi.org/10.1083/jcb.201404092>
 109. Huang, A., Zhang, X., Li, R., Chi, Y., Huang, A., Zhang, X., Li, R., & Chi, Y. (2017). Memristor Neural Network Design. W *Memristor and Memristive Neural Networks*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69929>
 110. Huang, J., Cheng, L., Li, J., Chen, M., Zhou, D., Lu, M. M., Proweller, A., Epstein, J. A., & Parmacek, M. S. (2008). Myocardin regulates expression of contractile genes in smooth muscle cells and is required for closure of the ductus arteriosus in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(2), 515–525. <https://doi.org/10.1172/JCI33304>
 111. Huang, J., Min Lu, M., Cheng, L., Yuan, L.-J., Zhu, X., Stout, A. L., Chen, M., Li, J., & Parmacek, M. S. (2009). Myocardin is required for cardiomyocyte survival and maintenance of heart function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(44), 18734–18739. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910749106>

112. Hutsler, J. J., & Zhang, H. (2010). Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders. *Brain Research*, *1309*, 83–94. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.09.120>
113. Huttenlocher, P. R. (1970). Dendritic development and mental defect. *Neurology*, *20*(4), 381.
114. Innocenti, M. (2018). New insights into the formation and the function of lamellipodia and ruffles in mesenchymal cell migration. *Cell Adhesion & Migration*, *12*(5), 401–416. <https://doi.org/10.1080/19336918.2018.1448352>
115. Insel, T. R. (2010). Rethinking schizophrenia. *Nature*, *468*(7321), Article 7321. <https://doi.org/10.1038/nature09552>
116. Ishikawa, M., Nishijima, N., Shiota, J., Sakagami, H., Tsuchida, K., Mizukoshi, M., Fukuchi, M., Tsuda, M., & Tabuchi, A. (2010). Involvement of the serum response factor coactivator megakaryoblastic leukemia (MKL) in the activin-regulated dendritic complexity of rat cortical neurons. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(43), 32734–32743. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.118745>
117. Israel, M. A., Yuan, S. H., Bardy, C., Reyna, S. M., Mu, Y., Herrera, C., Hefferan, M. P., Van Gorp, S., Nazor, K. L., Boscolo, F. S., Carson, C. T., Laurent, L. C., Marsala, M., Gage, F. H., Remes, A. M., Koo, E. H., & Goldstein, L. S. B. (2012). Probing sporadic and familial Alzheimer’s disease using induced pluripotent stem cells. *Nature*, *482*(7384), 216–220. <https://doi.org/10.1038/nature10821>
118. Jasińska, M., Milek, 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. *Molecular Neurobiology*, *53*, 4701–4712. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9383-z>
119. Jaworski, J., Kapitein, L. C., Gouveia, S. M., Dortland, B. R., Wulf, P. S., Grigoriev, I., Camera, P., Spangler, S. A., Di Stefano, P., Demmers, J., Krugers, H., Defilippi, P., Akhmanova, A., & Hoogenraad, C. C. (2009). Dynamic Microtubules Regulate Dendritic Spine Morphology and Synaptic Plasticity. *Neuron*, *61*(1), 85–100. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.11.013>
120. Jellinger, K., & Seitelberger, F. (1986). Neuropathology of Rett syndrome. *American Journal of Medical Genetics. Supplement*, *1*, 259–288. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320250528>
121. Jones, P. L., Veenstra, G. J. C., Wade, P. A., Vermaak, D., Kass, S. U., Landsberger, N., Strouboulis, J., & Wolffe, A. P. (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature Genetics*, *19*(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/561>
122. Kalita, K., Kharebava, G., Zheng, J.-J., & Hetman, M. (2006). Role of Megakaryoblastic Acute Leukemia-1 in ERK1/2-Dependent Stimulation of Serum Response Factor-Driven Transcription by BDNF or Increased Synaptic Activity. *The Journal of Neuroscience*, *26*(39), 10020–10032. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2644-06.2006>
123. Kalita, K., Kuzniewska, B., & Kaczmarek, L. (2012). MKLs: Co-factors of serum response factor (SRF) in neuronal responses. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *44*(9), 1444–1447. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.05.008>
124. Kaneda, M., Sakagami, H., Hida, Y., Ohtsuka, T., Satou, N., Ishibashi, Y., Fukuchi, M., Krysiak, A., Ishikawa, M., Ihara, D., Kalita, K., & Tabuchi, A. (2018). Synaptic localisation of SRF coactivators, MKL1 and MKL2, and their role in dendritic spine morphology. *Scientific Reports*, *8*. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18905-7>
125. Kang, S., Chen, X., Gong, S., Yu, P., Yau, S., Su, Z., Zhou, L., Yu, J., Pan, G., & Shi, L. (2017). Characteristic analyses of a neural differentiation model from iPSC-derived

- neuron according to morphology, physiology, and global gene expression pattern. *Scientific Reports*, 7(1), 12233. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12452-x>
126. Kantor, B., & Chiba-Falek, O. (2021). Chapter 4 - Lentiviral vectors as the delivery vehicles for transduction into iPSCs: Shortcomings and benefits. W. A. Birbrair (Red.), *Methods in iPSC Technology* (T. 9, s. 79–100). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85766-6.00005-X>
 127. Kasai, H., Fukuda, M., Watanabe, S., Hayashi-Takagi, A., & Noguchi, J. (2010). Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends in Neurosciences*, 33(3), 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.01.001>
 128. Kaufmann, M., Schuffenhauer, A., Fruh, I., Klein, J., Thiemeyer, A., Rigo, P., Gomez-Mancilla, B., Heidinger-Millot, V., Bouwmeester, T., Schopfer, U., Mueller, M., Fodor, B. D., & Cobos-Correa, A. (2015). High-Throughput Screening Using iPSC-Derived Neuronal Progenitors to Identify Compounds Counteracting Epigenetic Gene Silencing in Fragile X Syndrome. *Journal of Biomolecular Screening*, 20(9), 1101–1111. <https://doi.org/10.1177/1087057115588287>
 129. Kaufmann, W. E., & Moser, H. W. (2000). *Dendritic Anomalies in Disorders Associated with Mental Retardation*. 11.
 130. Kemp, P. R., & Metcalfe, J. C. (2000). Four isoforms of serum response factor that increase or inhibit smooth-muscle-specific promoter activity. *Biochemical Journal*, 345(Pt 3), 445–451.
 131. Kiskinis, E., Sandoe, J., Williams, L. A., Boulting, G. L., Moccia, R., Wainger, B. J., Han, S., Peng, T., Thams, S., Mikkilineni, S., Mellin, C., Merkle, F. T., Davis-Dusenbery, B. N., Ziller, M., Oakley, D., Ichida, J., Dicostanza, S., Atwater, N., Maeder, M. L., ... Eggan, K. (2014). Pathways Disrupted in Human ALS Motor Neurons Identified Through Genetic Correction of Mutant SOD1. *Cell stem cell*, 14(6), 781–795. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.03.004>
 132. Klein, M. E., Liroy, D. T., Ma, L., Impey, S., Mandel, G., & Goodman, R. H. (2007). Homeostatic regulation of MeCP2 expression by a CREB-induced microRNA. *Nature Neuroscience*, 10(12), 1513–1514. <https://doi.org/10.1038/nn2010>
 133. Knöll, B. (2011). Serum Response Factor Mediated Gene Activity in Physiological and Pathological Processes of Neuronal Motility. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 4. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2011.00049>
 134. Knöll, B., Kretz, O., Fiedler, C., Alberti, S., Schütz, G., Frotscher, M., & Nordheim, A. (2006). Serum response factor controls neuronal circuit assembly in the hippocampus. *Nature Neuroscience*, 9(2), 195–204. <https://doi.org/10.1038/nn1627>
 135. Knöll, B., & Nordheim, A. (2009). Functional versatility of transcription factors in the nervous system: The SRF paradigm. *Trends in Neurosciences*, 32(8), 432–442. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.05.004>
 136. Kolomeets, N. S., Orlovskaya, D. D., Rachmanova, V. I., & Uranova, N. A. (2005). Ultrastructural alterations in hippocampal mossy fiber synapses in schizophrenia: A postmortem morphometric study. *Synapse (New York, N.Y.)*, 57(1), 47–55. <https://doi.org/10.1002/syn.20153>
 137. Krichevsky, A. M., & Kosik, K. S. (2001). Neuronal RNA Granules. *Neuron*, 32(4), 683–696. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00508-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00508-6)
 138. Krichevsky, A. M., Sonntag, K.-C., Isacson, O., & Kosik, K. S. (2006). Specific MicroRNAs Modulate Embryonic Stem Cell-Derived Neurogenesis. *Stem Cells*, 24(4), 857–864. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0441>
 139. Kubota, Y., Karube, F., Nomura, M., Gullledge, A. T., Mochizuki, A., Schertel, A., & Kawaguchi, Y. (2011). Conserved properties of dendritic trees in four cortical interneuron subtypes. *Scientific Reports*, 1(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/srep00089>

140. Kuchler, O., Gerlach, J., Vomhof, T., Hettich, J., Steinmetz, J., Gebhardt, J. C. M., Michaelis, J., & Knöll, B. (2022). Single-molecule tracking (SMT) and localization of SRF and MRTF transcription factors during neuronal stimulation and differentiation. *Open Biology*, *12*(5), 210383. <https://doi.org/10.1098/rsob.210383>
141. Kuijk, E., Jager, M., van der Roest, B., Locati, M. D., Van Hoeck, A., Korzelius, J., Janssen, R., Besselink, N., Boymans, S., van Boxtel, R., & Cuppen, E. (2020). The mutational impact of culturing human pluripotent and adult stem cells. *Nature Communications*, *11*, 2493. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16323-4>
142. Kulkarni, V. A., & Firestein, B. L. (2012). The dendritic tree and brain disorders. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *50*(1), 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2012.03.005>
143. Kuzniewska, B., Nader, K., Dabrowski, M., Kaczmarek, L., & Kalita, K. (2016). Adult Deletion of SRF Increases Epileptogenesis and Decreases Activity-Induced Gene Expression. *Molecular Neurobiology*, *53*(3), 1478–1493. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9089-7>
144. Kuźniewska, B., Rejmak, E., Malik, A. R., Jaworski, J., Kaczmarek, L., & Kalita, K. (2013). Brain-Derived Neurotrophic Factor Induces Matrix Metalloproteinase 9 Expression in Neurons via the Serum Response Factor/c-Fos Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, *33*(11), 2149–2162. <https://doi.org/10.1128/MCB.00008-13>
145. Laifenfeld, D., Klein, E., & Ben-Shachar, D. (2002). Norepinephrine alters the expression of genes involved in neuronal sprouting and differentiation: Relevance for major depression and antidepressant mechanisms. *Journal of Neurochemistry*, *83*(5), 1054–1064. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.01215.x>
146. Lee-Kubli, C. A., & Lu, P. (2015). Induced pluripotent stem cell-derived neural stem cell therapies for spinal cord injury. *Neural Regeneration Research*, *10*(1), 10–16. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.150638>
147. Leung, S., & Miyamoto, N. G. (1989). Point mutational analysis of the human c-fos serum response factor binding site. *Nucleic Acids Research*, *17*(3), 1177–1195. <https://doi.org/10.1093/nar/17.3.1177>
148. Li, G., Zhang, B., Sun, J., Shi, L., Huang, M., Huang, L., Lin, Z., Lin, Q., Lai, B., Ma, Y., Jiang, B., Ding, Y., Zhang, H., Li, M., Zhu, P., Wang, Y., Zeng, X., & Zeng, Y. (2021). An NT-3-releasing bioscaffold supports the formation of TrkC-modified neural stem cell-derived neural network tissue with efficacy in repairing spinal cord injury. *Bioactive Materials*, *6*(11), 3766–3781. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.03.036>
149. Li, Q., Guo, J., Lin, X., Yang, X., Ma, Y., Fan, G.-C., & Chang, J. (2013). An Intragenic SRF-Dependent Regulatory Motif Directs Cardiac-Specific microRNA-1-1/133a-2 Expression. *PLOS ONE*, *8*(9), e75470. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075470>
150. Li, S., Czubryt, M. P., McAnally, J., Bassel-Duby, R., Richardson, J. A., Wiebel, F. F., Nordheim, A., & Olson, E. N. (2005). Requirement for serum response factor for skeletal muscle growth and maturation revealed by tissue-specific gene deletion in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(4), 1082–1087. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409103102>
151. Li, Z., Chen, J., Yu, H., He, L., Xu, Y., Zhang, D., Yi, Q., Li, C., Li, X., Shen, J., Song, Z., Ji, W., Wang, M., Zhou, J., Chen, B., Liu, Y., Wang, J., Wang, P., Yang, P., ... Shi, Y. (2017). Genome-wide association analysis identifies 30 new susceptibility loci for schizophrenia. *Nature Genetics*, *49*(11), 1576–1583. <https://doi.org/10.1038/ng.3973>
152. Linta, L., Stockmann, M., Kleinhans, K. N., Böckers, A., Storch, A., Zaehres, H., Lin, Q., Barbi, G., Böckers, T. M., Kleger, A., & Liebau, S. (2012). Rat Embryonic Fibroblasts Improve Reprogramming of Human Keratinocytes into Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells and Development*, *21*(6), 965–976. <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0026>

153. Lippman, J., & Dunaevsky, A. (2005). Dendritic spine morphogenesis and plasticity. *Journal of Neurobiology*, *64*(1), 47–57. <https://doi.org/10.1002/neu.20149>
154. Lissin, D. V., Gomperts, S. N., Carroll, R. C., Christine, C. W., Kalman, D., Kitamura, M., Hardy, S., Nicoll, R. A., Malenka, R. C., & von Zastrow, M. (1998). Activity differentially regulates the surface expression of synaptic AMPA and NMDA glutamate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(12), 7097–7102. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.7097>
155. Liu, C., Oikonomopoulos, A., Sayed, N., & Wu, J. C. (2018). Modeling human diseases with induced pluripotent stem cells: From 2D to 3D and beyond. *Development (Cambridge, England)*, *145*(5), dev156166. <https://doi.org/10.1242/dev.156166>
156. Loh, Y.-H., Agarwal, S., Park, I.-H., Urbach, A., Huo, H., Heffner, G. C., Kim, K., Miller, J. D., Ng, K., & Daley, G. Q. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood*, *113*(22), 5476–5479. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-204800>
157. Lösing, P., Niturad, C. E., Harrer, M., Reckendorf, C. M. Z., Schatz, T., Sinske, D., Lerche, H., Maljevic, S., & Knöll, B. (2017). SRF modulates seizure occurrence, activity induced gene transcription and hippocampal circuit reorganization in the mouse pilocarpine epilepsy model. *Molecular Brain*, *10*(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s13041-017-0310-2>
158. Lu, M.-H., & Hsueh, Y.-P. (2022). Protein synthesis as a modifiable target for autism-related dendritic spine pathophysiology. *The FEBS Journal*, *289*(8), 2282–2300. <https://doi.org/10.1111/febs.15733>
159. Lu, X., Yang, J., & Xiang, Y. (2022). Modeling human neurodevelopmental diseases with brain organoids. *Cell Regeneration*, *11*, 1. <https://doi.org/10.1186/s13619-021-00103-6>
160. Luikart, B. W., Bensen, A. L., Washburn, E. K., Perederiy, J. V., Su, K. G., Li, Y., Kerner, S. G., Parada, L. F., & Westbrook, G. L. (2011). miR-132 Mediates the Integration of Newborn Neurons into the Adult Dentate Gyrus. *PLoS ONE*, *6*(5), e19077. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019077>
161. Luo, X., Huang, L., van den Oord, E. J., Aberg, K. A., Gan, L., Zhao, Z., & Yao, Y.-G. (2015). Common Variants in the MKL1 Gene Confer Risk of Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, *41*(3), 715–727. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbu156>
162. Lynch, M. A. (2004). Long-Term Potentiation and Memory. *Physiological Reviews*, *84*(1), 87–136. <https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2003>
163. Magill, S. T., Cambronne, X. A., Luikart, B. W., Li, D. T., Leighton, B. H., Westbrook, G. L., Mandel, G., & Goodman, R. H. (2010). microRNA-132 regulates dendritic growth and arborization of newborn neurons in the adult hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(47), 20382–20387. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015691107>
164. Maherali, N., Ahfeldt, T., Rigamonti, A., Utikal, J., Cowan, C., & Hochedlinger, K. (2008). A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, *3*(3), 340–345. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.08.003>
165. Mainen, Z. F., & Sejnowski, T. J. (1996). Influence of dendritic structure on firing pattern in model neocortical neurons. *Nature*, *382*(6589), Article 6589. <https://doi.org/10.1038/382363a0>
166. Makeyev, E. V., Zhang, J., Carrasco, M. A., & Maniatis, T. (2007). The MicroRNA miR-124 Promotes Neuronal Differentiation by Triggering Brain-Specific Alternative Pre-mRNA Splicing. *Molecular Cell*, *27*(3), 435–448. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.07.015>

167. Malenka, R. C., & Bear, M. F. (2004). LTP and LTD: An embarrassment of riches. *Neuron*, *44*(1), 5–21. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.09.012>
168. Malinow, R., & Malenka, R. C. (2002). AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annual Review of Neuroscience*, *25*, 103–126. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.25.112701.142758>
169. Marchetto, M. C. N., Carromeu, C., Acab, A., Yu, D., Yeo, G. W., Mu, Y., Chen, G., Gage, F. H., & Muotri, A. R. (2010). A Model for Neural Development and Treatment of Rett Syndrome Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell*, *143*(4), 527–539. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.016>
170. Martínez-Cerdeño, V. (2017). Dendrite and spine modifications in autism and related neurodevelopmental disorders in patients and animal models: Dendrite and Spine in Autism. *Developmental Neurobiology*, *77*(4), 393–404. <https://doi.org/10.1002/dneu.22417>
171. Mateos-Aparicio, P., & Rodríguez-Moreno, A. (2019). The Impact of Studying Brain Plasticity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *13*, 66. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00066>
172. Mayford, M., Siegelbaum, S. A., & Kandel, E. R. (2012). Synapses and Memory Storage. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*(6), a005751. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005751>
173. McCarthy, S. E., Gillis, J., Kramer, M., Lihm, J., Yoon, S., Berstein, Y., Mistry, M., Pavlidis, P., Solomon, R., Ghiban, E., Antoniou, E., Kelleher, E., O'Brien, C., Donohoe, G., Gill, M., Morris, D. W., McCombie, W. Richard., & Corvin, A. (2014). De novo Mutations in Schizophrenia Implicate Chromatin Remodeling and Support a Genetic Overlap with Autism and Intellectual Disability. *Molecular psychiatry*, *19*(6), 652–658. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.29>
174. Medjkane, S., Perez-Sanchez, C., Gaggioli, C., Treisman, E. S., & Treisman, R. (2009). Myocardin-related transcription factors and SRF are required for cytoskeletal dynamics and experimental metastasis. *Nature Cell Biology*, *11*(3), 257–284.
175. Mehta, S. R., Tom, C. M., Wang, Y., Bresee, C., Rushton, D., Mathkar, P. P., Tang, J., & Mattis, V. B. (2018). Human Huntington's Disease iPSC-Derived Cortical Neurons Display Altered Transcriptomics, Morphology, and Maturation. *Cell Reports*, *25*(4), 1081–1096.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.09.076>
176. Mellios, N., Sugihara, H., Castro, J., Banerjee, A., Le, C., Kumar, A., Crawford, B., Strathmann, J., Tropea, D., Levine, S. S., Edbauer, D., & Sur, M. (2011a). miR-132, an experience-dependent microRNA, is essential for visual cortex plasticity. *Nature Neuroscience*, *14*(10), 1240–1242. <https://doi.org/10.1038/nn.2909>
177. Mellios, N., Sugihara, H., Castro, J., Banerjee, A., Le, C., Kumar, A., Crawford, B., Strathmann, J., Tropea, D., Levine, S. S., Edbauer, D., & Sur, M. (2011b). miR-132, an experience-dependent microRNA, is essential for visual cortex plasticity. *Nature neuroscience*, *14*(10), 1240–1242. <https://doi.org/10.1038/nn.2909>
178. Messenguy, F., & Dubois, E. (2003). Role of MADS box proteins and their cofactors in combinatorial control of gene expression and cell development. *Gene*, *316*, 1–21. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(03\)00747-9](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(03)00747-9)
179. Meyer, D., Bonhoeffer, T., & Scheuss, V. (2014). Balance and Stability of Synaptic Structures during Synaptic Plasticity. *Neuron*, *82*(2), 430–443. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.031>
180. Miano, J. M. (2003). Serum response factor: Toggling between disparate programs of gene expression. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *35*(6), 577–593. [https://doi.org/10.1016/S0022-2828\(03\)00110-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2828(03)00110-X)

181. Miano, J. M. (2010). Role of serum response factor in the pathogenesis of disease. *Laboratory Investigation*, 90(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2010.104>
182. Miano, J. M., Long, X., & Fujiwara, K. (2007). Serum response factor: Master regulator of the actin cytoskeleton and contractile apparatus. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 292(1), C70-81. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00386.2006>
183. Miano, J. M., Ramanan, N., Georger, M. A., de Mesy Bentley, K. L., Emerson, R. L., Balza, R. O., Xiao, Q., Weiler, H., Ginty, D. D., & Misra, R. P. (2004). Restricted inactivation of serum response factor to the cardiovascular system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(49), 17132–17137. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406041101>
184. Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A.-I., & Treisman, R. (2003). Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell*, 113(3), 329–342. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00278-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00278-2)
185. Mitchison, T. J., & Cramer, L. P. (1996). Actin-Based Cell Motility and Cell Locomotion. *Cell*, 84(3), 371–379. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81281-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81281-7)
186. Moffat, J., Grueneberg, D. A., Yang, X., Kim, S. Y., Kloepfer, A. M., Hinkle, G., Piqani, B., Eisenhaure, T. M., Luo, B., Grenier, J. K., Carpenter, A. E., Foo, S. Y., Stewart, S. A., Stockwell, B. R., Hacohen, N., Hahn, W. C., Lander, E. S., Sabatini, D. M., & Root, D. E. (2006). A Lentiviral RNAi Library for Human and Mouse Genes Applied to an Arrayed Viral High-Content Screen. *Cell*, 124(6), 1283–1298. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.040>
187. Mokalled, M. H., Johnson, A., Kim, Y., Oh, J., & Olson, E. N. (2010). Myocardin-related transcription factors regulate the Cdk5/Pctaire1 kinase cascade to control neurite outgrowth, neuronal migration and brain development. *Development (Cambridge, England)*, 137(14), 2365–2374. <https://doi.org/10.1242/dev.047605>
188. Molkenstin, J. D., Li, L., & Olson, E. N. (1996). Phosphorylation of the MADS-Box Transcription Factor MEF2C Enhances Its DNA Binding Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 271(29), 17199–17204. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.29.17199>
189. Moore, C. B., Guthrie, E. H., Huang, M. T.-H., & Taxman, D. J. (2010). Short Hairpin RNA (shRNA): Design, Delivery, and Assessment of Gene Knockdown. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 629, 141–158. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-657-3_10
190. Moradi, S., Mahdizadeh, H., Šarić, T., Kim, J., Harati, J., Shahsavarani, H., Greber, B., & Moore, J. B. (2019). Research and therapy with induced pluripotent stem cells (iPSCs): Social, legal, and ethical considerations. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1), 341. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1455-y>
191. Morrison, J. H., & Baxter, M. G. (2012). The Aging Cortical Synapse: Hallmarks and Implications for Cognitive Decline. *Nature reviews. Neuroscience*, 13(4), 240–250. <https://doi.org/10.1038/nrn3200>
192. Moutaux, E., Christaller, W., Scaramuzzino, C., Genoux, A., Charlot, B., Cazorla, M., & Saudou, F. (2018). Neuronal network maturation differently affects secretory vesicles and mitochondria transport in axons. *Scientific Reports*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31759-x>
193. Muddashetty, R. S., Nalavadi, V. C., Gross, C., Yao, X., Xing, L., Laur, O., Warren, S. T., & Bassell, G. J. (2011). Reversible Inhibition of PSD-95 mRNA Translation by miR-125a, FMRP Phosphorylation, and mGluR Signaling. *Molecular Cell*, 42(5), 673–688. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.05.006>
194. Mukaetova-Ladinska, E. B., Arnold, H., Jaros, E., Perry, R., & Perry, E. (2004). Depletion of MAP2 expression and laminar cytoarchitectonic changes in dorsolateral

- prefrontal cortex in adult autistic individuals. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 30(6), 615–623. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2004.00574.x>
195. Nader, K., Krysiak, A., Beroun, A., Pekala, M., Szymanska, M., Kuzniewska, B., Radwanska, K., Kaczmarek, L., & Kalita, K. (2019). Loss of serum response factor in mature neurons in the dentate gyrus alters the morphology of dendritic spines and hippocampus-dependent behavioral tasks. *Brain Structure & Function*, 224(8), 2691–2701. <https://doi.org/10.1007/s00429-019-01925-6>
 196. Nakagawa, K., & Kuzumaki, N. (2005). Transcriptional activity of megakaryoblastic leukemia 1 (MKL1) is repressed by SUMO modification. *Genes to Cells*, 10(8), 835–850. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2005.00880.x>
 197. Nakahata, Y., & Yasuda, R. (2018). Plasticity of Spine Structure: Local Signaling, Translation and Cytoskeletal Reorganization. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 10. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnsyn.2018.00029>
 198. Nam, J., Kim, J., Lee, S., An, G., Ma, H., & Nei, M. (2004). Type I MADS-box genes have experienced faster birth-and-death evolution than type II MADS-box genes in angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(7), 1910–1915. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308430100>
 199. Nan, X., Ng, H.-H., Johnson, C. A., Laherty, C. D., Turner, B. M., Eisenman, R. N., & Bird, A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, 393(6683), Article 6683. <https://doi.org/10.1038/30764>
 200. Neale, B. M., Kou, Y., Liu, L., Ma'ayan, A., Samocha, K. E., Sabo, A., Lin, C.-F., Stevens, C., Wang, L.-S., Makarov, V., Polak, P., Yoon, S., Maguire, J., Crawford, E. L., Campbell, N. G., Geller, E. T., Valladares, O., Shafer, C., Liu, H., ... Daly, M. J. (2012). Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders. *Nature*, 485(7397), 242–245. <https://doi.org/10.1038/nature11011>
 201. Negraes, P. D., Trujillo, C. A., Yu, N.-K., Wu, W., Yao, H., Liang, N., Lautz, J. D., Kwok, E., McClatchy, D., Diedrich, J., de Bartolome, S. M., Truong, J., Szeto, R., Tran, T., Herai, R. H., Smith, S. E. P., Haddad, G. G., Yates, J. R., & Muotri, A. R. (2021). Altered network and rescue of human neurons derived from individuals with early-onset genetic epilepsy. *Molecular Psychiatry*, 26(11), Article 11. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01104-2>
 202. Nekrasov, E. D., Vigont, V. A., Klyushnikov, S. A., Lebedeva, O. S., Vassina, E. M., Bogomazova, A. N., Chestkov, I. V., Semashko, T. A., Kiseleva, E., Sulдина, L. A., Bobrovsky, P. A., Zimina, O. A., Ryazantseva, M. A., Skopin, A. Yu., Illarioshkin, S. N., Kaznacheyeva, E. V., Lagarkova, M. A., & Kiselev, S. L. (2016). Manifestation of Huntington's disease pathology in human induced pluripotent stem cell-derived neurons. *Molecular Neurodegeneration*, 11, 27. <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0092-5>
 203. Nicole, O., & Pacary, E. (2020). CaMKII β in Neuronal Development and Plasticity: An Emerging Candidate in Brain Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 7272. <https://doi.org/10.3390/ijms21197272>
 204. Niell, C. M., Meyer, M. P., & Smith, S. J. (2004). In vivo imaging of synapse formation on a growing dendritic arbor. *Nature Neuroscience*, 7(3), 254–260. <https://doi.org/10.1038/nn1191>
 205. Nieweg, K., Andreyeva, A., van Stegen, B., Tanriöver, G., & Gottmann, K. (2015). Alzheimer's disease-related amyloid- β induces synaptotoxicity in human iPS cell-derived neurons. *Cell Death & Disease*, 6(4), e1709. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.72>
 206. Nimchinsky, E. A., Sabatini, B. L., & Svoboda, K. (2002). Structure and function of dendritic spines. *Annual Review of Physiology*, 64, 313–353. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.081501.160008>

207. Noguchi, J., Nagaoka, A., Watanabe, S., Ellis-Davies, G. C. R., Kitamura, K., Kano, M., Matsuzaki, M., & Kasai, H. (2011). In vivo two-photon uncaging of glutamate revealing the structure–function relationships of dendritic spines in the neocortex of adult mice. *The Journal of Physiology*, 589(Pt 10), 2447–2457. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.207100>
208. Oh, J., Richardson, J. A., & Olson, E. N. (2005). Requirement of myocardin-related transcription factor-B for remodeling of branchial arch arteries and smooth muscle differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(42), 15122–15127. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507346102>
209. Okray, Z., de Esch, C. E., Van Esch, H., Devriendt, K., Claeys, A., Yan, J., Verbeeck, J., Froyen, G., Willemsen, R., de Vrij, F. M., & Hassan, B. A. (2015). A novel fragile X syndrome mutation reveals a conserved role for the carboxy-terminus in FMRP localization and function. *EMBO Molecular Medicine*, 7(4), 423–437. <https://doi.org/10.15252/emmm.201404576>
210. Olson, E. N., & Nordheim, A. (2010). Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(5), 353–365. <https://doi.org/10.1038/nrm2890>
211. O’Sullivan, N. C., Pickering, M., Di Giacomo, D., Loscher, J. S., & Murphy, K. J. (2010). Mkl Transcription Cofactors Regulate Structural Plasticity in Hippocampal Neurons. *Cerebral Cortex*, 20(8), 1915–1925. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhp262>
212. Panayiotou, R., Miralles, F., Pawlowski, R., Diring, J., Flynn, H. R., Skehel, M., & Treisman, R. (2016). Phosphorylation acts positively and negatively to regulate MRTF-A subcellular localisation and activity. *eLife*, 5, e15460. <https://doi.org/10.7554/eLife.15460>
213. Pang, Z. P., Yang, N., Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Fuentes, D. R., Yang, T. Q., Citri, A., Sebastiano, V., Marro, S., Südhof, T. C., & Wernig, M. (2011). Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature*, 476(7359), 220–223. <https://doi.org/10.1038/nature10202>
214. Pansri, P., Phanthong, P., Suthprasertporn, N., Kitiyanant, Y., Tubsuwan, A., Dinnyes, A., Kobolak, J., & Kitiyanant, N. (2021). Brain-derived neurotrophic factor increases cell number of neural progenitor cells derived from human induced pluripotent stem cells. *PeerJ*, 9, e11388. <https://doi.org/10.7717/peerj.11388>
215. Papa, M., Bundman, M., Greenberger, V., & Segal, M. (1995). Morphological analysis of dendritic spine development in primary cultures of hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience*, 15(1), 1–11. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-01-00001.1995>
216. Pařenicová, L., de Folter, S., Kieffer, M., Horner, D. S., Favalli, C., Busscher, J., Cook, H. E., Ingram, R. M., Kater, M. M., Davies, B., Angenent, G. C., & Colombo, L. (2003). Molecular and Phylogenetic Analyses of the Complete MADS-Box Transcription Factor Family in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 15(7), 1538–1551. <https://doi.org/10.1105/tpc.011544>
217. Park, I.-H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M. W., Cowan, C., Hochedlinger, K., & Daley, G. Q. (2008). Disease-specific induced pluripotent stem (iPS) cells. *Cell*, 134(5), 877–886. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.041>
218. Park, T. I.-H., Schweder, P., Lee, K., Dieriks, B. V., Jung, Y., Smyth, L., Rustenhoven, J., Mee, E., Heppner, P., Turner, C., Curtis, M. A., Faull, R. L. M., Montgomery, J. M., & Dragunow, M. (2020). Isolation and culture of functional adult human neurons from neurosurgical brain specimens. *Brain Communications*, 2(2), fcaa171. <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcaa171>
219. Parkitna, J. R., Bilbao, A., Rieker, C., Engblom, D., Piechota, M., Nordheim, A., Spanagel, R., & Schütz, G. (2010). Loss of the serum response factor in the dopamine

- system leads to hyperactivity. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(7), 2427–2435. <https://doi.org/10.1096/fj.09-151423>
220. Parlakian, A., Charvet, C., Escoubet, B., Mericskay, M., Molkentin, J. D., Gary-Bobo, G., De Windt, L. J., Ludosky, M.-A., Paulin, D., Daegelen, D., Tuil, D., & Li, Z. (2005). Temporally controlled onset of dilated cardiomyopathy through disruption of the SRF gene in adult heart. *Circulation*, 112(19), 2930–2939. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.533778>
221. Pchitskaya, E., & Bezprozvanny, I. (2020). Dendritic Spines Shape Analysis—Classification or Clusterization? Perspective. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 12. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnsyn.2020.00031>
222. Pejhan, S., & Rastegar, M. (2021). Role of DNA Methyl-CpG-Binding Protein MeCP2 in Rett Syndrome Pathobiology and Mechanism of Disease. *Biomolecules*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/biom11010075>
223. Peng, H., Xie, P., Liu, L., Kuang, X., Wang, Y., Qu, L., Gong, H., Jiang, S., Li, A., Ruan, Z., Ding, L., Yao, Z., Chen, C., Chen, M., Daigle, T. L., Dalley, R., Ding, Z., Duan, Y., Feiner, A., ... Zeng, H. (2021). Morphological diversity of single neurons in molecularly defined cell types. *Nature*, 598(7879), 174–181. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03941-1>
224. Penzes, P., Cahill, M. E., Jones, K. A., VanLeeuwen, J.-E., & Woolfrey, K. M. (2011). Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nature Neuroscience*, 14(3), 285–293. <https://doi.org/10.1038/nn.2741>
225. Peters, A., & Kaiserman-Abramof, I. R. (1970). The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *American Journal of Anatomy*, 127(4), 321–355. <https://doi.org/10.1002/aja.1001270402>
226. Pfeiffer, B. E., & Huber, K. M. (2007). Fragile X Mental Retardation Protein Induces Synapse Loss through Acute Postsynaptic Translational Regulation. *Journal of Neuroscience*, 27(12), 3120–3130. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0054-07.2007>
227. Pfisterer, U., Wood, J., Nihlberg, K., Hallgren, O., Bjermer, L., Westergren-Thorsson, G., Lindvall, O., & Parmar, M. (2011). Efficient induction of functional neurons from adult human fibroblasts. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 10(19), 3311–3316. <https://doi.org/10.4161/cc.10.19.17584>
228. Phillips, M., & Pozzo-Miller, L. (2015). Dendritic spine dysgenesis in Autism Related Disorders. *Neuroscience letters*, 601, 30–40. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.01.011>
229. Posern, G., & Treisman, R. (2006). Actin' together: Serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction. *Trends in Cell Biology*, 16(11), 588–596. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.09.008>
230. Pumo, G. M., Kitazawa, T., & Rijli, F. M. (2022). Epigenetic and Transcriptional Regulation of Spontaneous and Sensory Activity Dependent Programs During Neuronal Circuit Development. *Frontiers in Neural Circuits*, 16. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncir.2022.911023>
231. Purcell, S. M., Moran, J. L., Fromer, M., Ruderfer, D., Solovieff, N., Roussos, P., O'Dushlaine, C., Chambert, K., Bergen, S. E., Kähler, A., Duncan, L., Stahl, E., Genovese, G., Fernández, E., Collins, M. O., Komiyama, N. H., Choudhary, J. S., Magnusson, P. K. E., Banks, E., ... Sklar, P. (2014). A polygenic burden of rare disruptive mutations in schizophrenia. *Nature*, 506(7487), 185–190. <https://doi.org/10.1038/nature12975>
232. Purpura, D. P. (1974). Dendritic spine „dysgenesis” and mental retardation. *Science (New York, N.Y.)*, 186(4169), 1126–1128. <https://doi.org/10.1126/science.186.4169.1126>
233. Qiang, L., Fujita, R., Yamashita, T., Angulo, S., Rhinn, H., Rhee, D., Doege, C., Chau, L., Vanti, W. B., Moreno, H., & Abeliovich, A. (2011). Directed conversion of Alzheimer's

- disease patient skin fibroblasts into functional neurons. *Cell*, 146(3), 359–371. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.007>
234. Raba, M., Palgi, J., Lehtivaara, M., & Arumäe, U. (2016). Microarray Analysis Reveals Increased Transcriptional Repression and Reduced Metabolic Activity but Not Major Changes in the Core Apoptotic Machinery during Maturation of Sympathetic Neurons. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2016.00066>
235. Raine, C. S. (1999). Characteristics of the Neuron. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th edition. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28209/>
236. Ramanan, N., Shen, Y., Sarsfield, S., Lemberger, T., Schütz, G., Linden, D. J., & Ginty, D. D. (2005). SRF mediates activity-induced gene expression and synaptic plasticity but not neuronal viability. *Nature Neuroscience*, 8(6), Article 6. <https://doi.org/10.1038/nn1462>
237. Ramos, E., Bien-Willner, G., Li, J., Hughes, A., Giacalone, J., Chasnoff, S., Kulkarni, S., Parmacek, M., Cole, F., & Druley, T. (2014). Genetic variation in MKL2 and decreased downstream PCTAIRE1 expression in extreme, fatal primary human microcephaly. *Clinical Genetics*, 85(5), 423–432. <https://doi.org/10.1111/cge.12197>
238. Ramón y Cajal, S. (1933). *Nêuronismo o reticularismo? : Las pruebas objetivas de la unidad anatómica de la células nerviosas*. <https://wellcomecollection.org/works/tdvc8qtg/items?canvas=9>
239. Räsänen, N., Tiihonen, J., Koskuvi, M., Lehtonen, Š., & Koistinaho, J. (2022). The iPSC perspective on schizophrenia. *Trends in Neurosciences*, 45(1), 8–26. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2021.11.002>
240. Raymond, G. V., Bauman, M. L., & Kemper, T. L. (1995). Hippocampus in autism: A Golgi analysis. *Acta Neuropathologica*, 91(1), 117–119. <https://doi.org/10.1007/s004010050401>
241. Reubinoff, B. E., Itsykson, P., Turetsky, T., Pera, M. F., Reinhartz, E., Itzik, A., & Ben-Hur, T. (2001). Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 19(12), 1134–1140. <https://doi.org/10.1038/nbt1201-1134>
242. Ripke, S., Neale, B. M., Corvin, A., Walters, J. T., Farh, K.-H., Holmans, P. A., Lee, P., Bulik-Sullivan, B., Collier, D. A., Huang, H., Pers, T. H., Agartz, I., Agerbo, E., Albus, M., Alexander, M., Amin, F., Bacanu, S. A., Begemann, M., Belliveau, R. A., ... O'Donovan, M. C. (2014). Biological Insights From 108 Schizophrenia-Associated Genetic Loci. *Nature*, 511(7510), 421–427. <https://doi.org/10.1038/nature13595>
243. Rogaeve, E. I. (2005). Small RNAs in human brain development and disorders. *Biochemistry. Biokhimiia*, 70(12), 1404–1407. <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0276-z>
244. Roszkowska, M., Krysiak, A., Majchrowicz, L., Nader, K., Beroun, A., Michaluk, P., Pekala, M., Jaworski, J., Kondrakiewicz, L., Puścian, A., Knapska, E., Kaczmarek, L., & Kalita, K. (2022). SRF depletion in early life contributes to social interaction deficits in the adulthood. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 79(5), 278. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04291-5>
245. Rudelli, R. D., Brown, W. T., Wisniewski, K., Jenkins, E. C., Laure-Kamionowska, M., Connell, F., & Wisniewski, H. M. (1985). Adult fragile X syndrome: Clinico-neuropathologic findings. *Acta Neuropathologica*, 67(3–4), 289–295. <https://doi.org/10.1007/BF00687814>
246. Runge, K., Cardoso, C., & de Chevigny, A. (2020). Dendritic Spine Plasticity: Function and Mechanisms. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 12. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnsyn.2020.00036>

247. 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*(1), 213. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-213>
248. Ryan, S. D., Dolatabadi, N., Chan, S. F., Zhang, X., Akhtar, M. W., Parker, J., Soldner, F., Sunico, C. R., Nagar, S., Talantova, M., Lee, B., Lopez, K., Nutter, A., Shan, B., Molokanova, E., Zhang, Y., Han, X., Nakamura, T., Masliah, E., ... Lipton, S. A. (2013). Isogenic Human iPSC Parkinson's Model Shows Nitrosative Stress-Induced Dysfunction in MEF2-PGC1 α Transcription. *Cell*, *155*(6), 1351–1364. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.009>
249. Sadler, M., & Berry, M. (1984). Remodelling during development of the Purkinje cell dendritic tree in the mouse. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, *221*(1224), 349–367. <https://doi.org/10.1098/rspb.1984.0037>
250. Sala, C., & Segal, M. (2014). Dendritic spines: The locus of structural and functional plasticity. *Physiological Reviews*, *94*(1), 141–188. <https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2013>
251. Saldarriaga, W., Tassone, F., González-Teshima, L. Y., Forero-Forero, J. V., Ayala-Zapata, S., & Hagerman, R. (2014). Fragile X Syndrome. *Colombia Médica : CM*, *45*(4), 190–198.
252. Salpietro, V., Dixon, C. L., Guo, H., Bello, O. D., Vandrovцова, J., Efthymiou, S., Maroofian, R., Heimer, G., Burglen, L., Valence, S., Torti, E., Hacke, M., Rankin, J., Tariq, H., Colin, E., Procaccio, V., Striano, P., Mankad, K., Lieb, A., ... Houlden, H. (2019). AMPA receptor GluA2 subunit defects are a cause of neurodevelopmental disorders. *Nature Communications*, *10*, 3094. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10910-w>
253. Sasazuki, T., Sawada, T., Sakon, S., Kitamura, T., Kishi, T., Okazaki, T., Katano, M., Tanaka, M., Watanabe, M., Yagita, H., Okumura, K., & Nakano, H. (2002). Identification of a Novel Transcriptional Activator, BSAC, by a Functional Cloning to Inhibit Tumor Necrosis Factor-induced Cell Death *. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(32), 28853–28860. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203190200>
254. Scandaglia, M., Benito, E., Morenilla-Palao, C., Fiorenza, A., del Blanco, B., Coca, Y., Herrera, E., & Barco, A. (2015). Fine-tuned SRF activity controls asymmetrical neuronal outgrowth: Implications for cortical migration, neural tissue lamination and circuit assembly. *Scientific Reports*, *5*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/srep17470>
255. Scesa, G., Adami, R., & Bottai, D. (2021). iPSC Preparation and Epigenetic Memory: Does the Tissue Origin Matter? *Cells*, *10*(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/cells10061470>
256. Schachtele, S. J., Losh, J., Dailey, M. E., & Green, S. H. (2011). Spine Formation and Maturation in the Developing Rat Auditory Cortex. *The Journal of comparative neurology*, *519*(16), 3327–3345. <https://doi.org/10.1002/cne.22728>
257. Schaefer, A. T., Larkum, M. E., Sakmann, B., & Roth, A. (2003). Coincidence detection in pyramidal neurons is tuned by their dendritic branching pattern. *Journal of Neurophysiology*, *89*(6), 3143–3154. <https://doi.org/10.1152/jn.00046.2003>
258. Schrott, G., Philippar, U., Hockemeyer, D., Schwarz, H., Alberti, S., & Nordheim, A. (2004). SRF regulates Bcl-2 expression and promotes cell survival during murine embryonic development. *The EMBO Journal*, *23*(8), 1834–1844. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600188>
259. Schultz, J., Bork, P., Ponting, C. P., & Hofmann, K. (1997). SAM as a protein interaction domain involved in developmental regulation. *Protein Science*, *6*(1), 249–253. <https://doi.org/10.1002/pro.5560060128>

260. Sebat, J., Levy, D. L., & McCarthy, S. E. (2009). Rare structural variants in schizophrenia: One disorder, multiple mutations; one mutation, multiple disorders. *Trends in Genetics*, 25(12), 528–535. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2009.10.004>
261. Seki, T., Yuasa, S., Oda, M., Egashira, T., Yae, K., Kusumoto, D., Nakata, H., Tohyama, S., Hashimoto, H., Kodaira, M., Okada, Y., Seimiya, H., Fusaki, N., Hasegawa, M., & Fukuda, K. (2010). Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell*, 7(1), 11–14. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.06.003>
262. Selvaraj, A., & Prywes, R. (2003). Megakaryoblastic leukemia-1/2, a transcriptional co-activator of serum response factor, is required for skeletal myogenic differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(43), 41977–41987. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305679200>
263. 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 Biology*, 5(3), R13. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-3-r13>
264. Shah, R. R., & Bird, A. P. (2017). MeCP2 mutations: Progress towards understanding and treating Rett syndrome. *Genome Medicine*, 9(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0411-7>
265. Sheng, M., & Hoogenraad, C. C. (2007). The Postsynaptic Architecture of Excitatory Synapses: A More Quantitative View. *Annual Review of Biochemistry*, 76(1), 823–847. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.060805.160029>
266. Sheridan, S. D., Theriault, K. M., Reis, S. A., Zhou, F., Madison, J. M., Daheron, L., Loring, J. F., & Haggarty, S. J. (2011). Epigenetic Characterization of the FMR1 Gene and Aberrant Neurodevelopment in Human Induced Pluripotent Stem Cell Models of Fragile X Syndrome. *PLoS ONE*, 6(10), e26203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026203>
267. Shi, Y., Inoue, H., Wu, J. C., & Yamanaka, S. (2017). Induced pluripotent stem cell technology: A decade of progress. *Nature reviews. Drug discovery*, 16(2), 115–130. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.245>
268. Shi, Y., Kirwan, P., Smith, J., Robinson, H. P. C., & Livesey, F. J. (2012). Human cerebral cortex development from pluripotent stem cells to functional excitatory synapses. *Nature neuroscience*, 15(3), 10.1038/nn.3041. <https://doi.org/10.1038/nn.3041>
269. Shiota, J., Ishikawa, M., Sakagami, H., Tsuda, M., Baraban, J. M., & Tabuchi, A. (2006). Developmental expression of the SRF co-activator MAL in brain: Role in regulating dendritic morphology. *Journal of Neurochemistry*, 98(6), 1778–1788. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03992.x>
270. Sidorenko, E., & Vartiainen, M. K. (2019). Nucleoskeletal regulation of transcription: Actin on MRTF. *Experimental Biology and Medicine*, 244(15), 1372–1381. <https://doi.org/10.1177/1535370219854669>
271. Siegel, G., Saba, R., & Schratt, G. (2011). microRNAs in neurons: Manifold regulatory roles at the synapse. *Current Opinion in Genetics & Development*, 21(4), 491–497. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2011.04.008>
272. Sim, N.-L., Kumar, P., Hu, J., Henikoff, S., Schneider, G., & Ng, P. C. (2012). SIFT web server: Predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Research*, 40(Web Server issue), W452–W457. <https://doi.org/10.1093/nar/gks539>
273. Smolen, P., Baxter, D. A., & Byrne, J. H. (2019). How can memories last for days, years, or a lifetime? Proposed mechanisms for maintaining synaptic potentiation and memory. *Learning & Memory*, 26(5), 133–150. <https://doi.org/10.1101/lm.049395.119>
274. Stark, K. L., Xu, B., Bagchi, A., Lai, W.-S., Liu, H., Hsu, R., Wan, X., Pavlidis, P., Mills, A. A., Karayiorgou, M., & Gogos, J. A. (2008). Altered brain microRNA biogenesis

- contributes to phenotypic deficits in a 22q11-deletion mouse model. *Nature Genetics*, 40(6), 751–760. <https://doi.org/10.1038/ng.138>
275. Stasiak, P., & Sznitowska, M. (2010). *Zastosowanie hodowli komórkowych w badaniach biofarmaceutycznych*.
276. Steichen, C., Luce, E., Maluenda, J., Tosca, L., Moreno-Gimeno, I., Desterke, C., Dianat, N., Goulinet-Mainot, S., Awan-Toor, S., Burks, D., Marie, J., Weber, A., Tachdjian, G., Melki, J., & Dubart-Kupperschmitt, A. (2014). Messenger RNA- Versus Retrovirus-Based Induced Pluripotent Stem Cell Reprogramming Strategies: Analysis of Genomic Integrity. *Stem Cells Translational Medicine*, 3(6), 686–691. <https://doi.org/10.5966/sctm.2013-0158>
277. Stepanek, J., Vincent, M., Turpin, P.-Y., Paulin, D., Femandjian, S., Alpert, B., & Zentz, C. (2007). C→G base mutations in the CArG box of c-fos serum response element alter its bending flexibility. Consequences for core-SRF recognition. *FEBS Journal*, 274(9), 2333. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05768.x>
278. Stern, S., Haverkamp, S., Sinske, D., Tedeschi, A., Naumann, U., Giovanni, S. D., Kochanek, S., Nordheim, A., & Knöll, B. (2013). The Transcription Factor Serum Response Factor Stimulates Axon Regeneration through Cytoplasmic Localization and Cofilin Interaction. *Journal of Neuroscience*, 33(48), 18836–18848. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3029-13.2013>
279. Stritt, C., & Knöll, B. (2010). Serum Response Factor Regulates Hippocampal Lamination and Dendrite Development and Is Connected with Reelin Signaling. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/MCB.01434-09>
280. Suddath, R. L., Casanova, M. F., Goldberg, T. E., Daniel, D. G., Kelsoe, J. R., & Weinberger, D. R. (1989). Temporal lobe pathology in schizophrenia: A quantitative magnetic resonance imaging study. *The American Journal of Psychiatry*, 146(4), 464–472. <https://doi.org/10.1176/ajp.146.4.464>
281. Südhof, T. C., & Malenka, R. C. (2008). Understanding Synapses: Past, Present, and Future. *Neuron*, 60(3), 469–476. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.011>
282. Sun, A. X., Yuan, Q., Tan, S., Xiao, Y., Wang, D., Khoo, A. T. T., Sani, L., Tran, H.-D., Kim, P., Chiew, Y. S., Lee, K. J., Yen, Y.-C., Ng, H. H., Lim, B., & Je, H. S. (2016). Direct Induction and Functional Maturation of Forebrain GABAergic Neurons from Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Reports*, 16(7), 1942–1953. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.035>
283. Sun, N., Panetta, N. J., Gupta, D. M., Wilson, K. D., Lee, A., Jia, F., Hu, S., Cherry, A. M., Robbins, R. C., Longaker, M. T., & Wu, J. C. (2009). Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(37), 15720–15725. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908450106>
284. Sun, Q., Chen, G., Streb, J. W., Long, X., Yang, Y., Stoeckert, C. J., & Miano, J. M. (2006). Defining the mammalian CArGome. *Genome Research*, 16(2), 197–207. <https://doi.org/10.1101/gr.4108706>
285. Sun, Y., Boyd, K., Xu, W., Ma, J., Jackson, C. W., Fu, A., Shillingford, J. M., Robinson, G. W., Hennighausen, L., Hitzler, J. K., Ma, Z., & Morris, S. W. (2006). Acute Myeloid Leukemia-Associated Mkl1 (Mrtf-a) Is a Key Regulator of Mammary Gland Function. *Molecular and Cellular Biology*, 26(15), 5809–5826. <https://doi.org/10.1128/MCB.00024-06>
286. Swärd, K., Stenkula, K. G., Rippe, C., Alajbegovic, A., Gomez, M. F., & Albinsson, S. (2016). Emerging roles of the myocardin family of proteins in lipid and glucose metabolism. *The Journal of Physiology*, 594(17), 4741–4752. <https://doi.org/10.1113/JP271913>

287. Szafron, Ł., Jagielski, T., & Dzikowska, A. (2009). Białka z rodziny MADS - kombinatoryczne regulatory transkrypcji u grzybów, zwierząt i roślin. *Postepy Biochemii*, 55(1), 54–65.
288. Tabuchi, A., & Ihara, D. (2021). Regulation of Dendritic Synaptic Morphology and Transcription by the SRF Cofactor MKL/MRTF. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 14. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnmol.2021.767842>
289. Tada, T., & Sheng, M. (2006). Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. *Current Opinion in Neurobiology*, 16(1), 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.12.001>
290. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131(5), 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
291. Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
292. Takashima, S., Becker, L. E., Armstrong, D. L., & Chan, F. (1981). Abnormal neuronal development in the visual cortex of the human fetus and infant with down's syndrome. A quantitative and qualitative golgi study. *Brain Research*, 225(1), 1–21. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(81\)90314-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(81)90314-0)
293. Thomas, A. M., Bui, N., Perkins, J. R., Yuva-Paylor, L. A., & Paylor, R. (2012). Group I metabotropic glutamate receptor antagonists alter select behaviors in a mouse model for fragile X syndrome. *Psychopharmacology*, 219(1), 47–58. <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2375-4>
294. Tønnesen, J., Katona, G., Rózsa, B., & Nägerl, U. V. (2014). Spine neck plasticity regulates compartmentalization of synapses. *Nature Neuroscience*, 17(5), 678–685. <https://doi.org/10.1038/nn.3682>
295. Torres-Fernández, O. (2007). [The Golgi silver impregnation method: Commemorating the centennial of the Nobel Prize in medicine (1906) shared by Camillo Golgi and Santiago Ramón y Cajal]. *Biomédica : revista del Instituto Nacional de Salud*, 26, 498–508.
296. Trachtenberg, J. T., Chen, B. E., Knott, G. W., Feng, G., Sanes, J. R., Welker, E., & Svoboda, K. (2002). Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature*, 420(6917), 788–794. <https://doi.org/10.1038/nature01273>
297. Tricot, T., Verfaillie, C. M., & Kumar, M. (2022). Current Status and Challenges of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Liver Models in Drug Discovery. *Cells*, 11(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/cells11030442>
298. Tristán-Noguero, A., Fernández-Carasa, I., Calatayud, C., Bermejo-Casadesús, C., Pons-Espinal, M., Colini Baldeschi, A., Campa, L., Artigas, F., Bortolozzi, A., Domingo-Jiménez, R., Ibáñez, S., Pineda, M., Artuch, R., Raya, Á., García-Cazorla, À., & Consiglio, A. (2023). iPSC-based modeling of THD recapitulates disease phenotypes and reveals neuronal malformation. *EMBO Molecular Medicine*, 15(3), e15847. <https://doi.org/10.15252/emmm.202215847>
299. Tritch, E., Carpentier, W., Li, Z., & Mericskay, M. (2009). L006 Role of serum response factor (SRF) on microRNA expression in the cardiovascular system. *Archives of Cardiovascular Diseases*, 102, S119–S120. [https://doi.org/10.1016/S1875-2136\(09\)72421-0](https://doi.org/10.1016/S1875-2136(09)72421-0)
300. Tyler, W. J., Perrett, S. P., & Pozzo-Miller, L. D. (2002). The Role of Neurotrophins in Neurotransmitter Release. *The Neuroscientist*, 8(6), 524–531. <https://doi.org/10.1177/1073858402238511>

301. Ultanir, S. K., Kim, J.-E., Hall, B. J., Deerinck, T., Ellisman, M., & Ghosh, A. (2007). Regulation of spine morphology and spine density by NMDA receptor signaling in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(49), 19553–19558. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704031104>
302. Urbanska, M., Blazejczyk, M., & Jaworski, J. (b.d.). *Molecular basis of dendritic arborization*. 25.
303. Utikal, J., Maherali, N., Kulalert, W., & Hochedlinger, K. (2009). Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. *Journal of Cell Science*, *122*(19), 3502–3510. <https://doi.org/10.1242/jcs.054783>
304. Vaser, R., Adusumalli, S., Leng, S. N., Sikic, M., & Ng, P. C. (2016). SIFT missense predictions for genomes. *Nature Protocols*, *11*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.123>
305. Vasudevan, H. N., & Soriano, P. (2014). SRF Regulates Craniofacial Development through Selective Recruitment of MRTF Cofactors by PDGF Signaling. *Developmental Cell*, *31*(3), 332–344. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.10.005>
306. Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z. P., Kokubu, Y., Südhof, T. C., & Wernig, M. (2010). Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*, *463*(7284), Article 7284. <https://doi.org/10.1038/nature08797>
307. Vitrac, A., & Cloëz-Tayarani, I. (2018). Induced pluripotent stem cells as a tool to study brain circuits in autism-related disorders. *Stem Cell Research & Therapy*, *9*(1), 226. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0966-2>
308. Vo, N., Klein, M. E., Varlamova, O., Keller, D. M., Yamamoto, T., Goodman, R. H., & Impey, S. (2005). A cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(45), 16426–16431. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508448102>
309. von Bernhardi, R., Bernhardi, L. E., & Eugenín, J. (2017). What Is Neural Plasticity? W R. von Bernhardi, J. Eugenín, & K. J. Muller (Red.), *The Plastic Brain* (T. 1015, s. 1–15). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-62817-2_1
310. Wang, D., Cheng, Z., Zhao, X., Li, Z., Wang, J., Dong, A., Zhou, Z., & Zhang, F. (2016). Association between MKL1 rs6001946 and schizophrenia in a Han Chinese population. *Neuroscience Letters*, *631*, 36–39. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.08.008>
311. Wang, S., Xu, J., Ye, R., Wang, J., Chen, Z., Huang, R., Peng, Q., Xu, Y., & Cai, X. (2014). Emerging roles of microRNAs in neural stem cells. *Current Stem Cell Research & Therapy*, *9*(3), 234–243. <https://doi.org/10.2174/1574888x09666140213201846>
312. Wang, X., Yang, Y., & Zhou, Q. (2007). Independent expression of synaptic and morphological plasticity associated with long-term depression. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *27*(45), 12419–12429. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2015-07.2007>
313. Wang, X., Zhang, C., Szábo, G., & Sun, Q.-Q. (2013). Distribution of CaMKII α expression in the brain in vivo, studied by CaMKII α -GFP mice. *Brain research*, *1518*, 9–25. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.04.042>
314. Warren, L., Manos, P. D., Ahfeldt, T., Loh, Y.-H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P., Smith, Z. D., Meissner, A., Daley, G. Q., Brack, A. S., Collins, J. J., Cowan, C., Schlaeger, T. M., & Rossi, D. J. (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells using synthetic modified mRNA. *Cell stem cell*, *7*(5), 618–630. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.08.012>
315. Waung, M. W., Pfeiffer, B. E., Nosyreva, E. D., Ronesi, J. A., & Huber, K. M. (2008). Rapid translation of Arc/Arg3.1 selectively mediates mGluR-dependent LTD through persistent increases in AMPAR endocytosis rate. *Neuron*, *59*(1), 84–97. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.05.014>

316. Wayman, G. A., Davare, M., Ando, H., Fortin, D., Varlamova, O., Cheng, H.-Y. M., Marks, D., Obrietan, K., Soderling, T. R., Goodman, R. H., & Impey, S. (2008). An activity-regulated microRNA controls dendritic plasticity by down-regulating p250GAP. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(26), 9093–9098. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803072105>
317. Weng, Y., Shi, Y., Xia, X., Zhou, W., Wang, H., & Wang, C. (2017). A multi-shRNA vector enhances the silencing efficiency of exogenous and endogenous genes in human cells. *Oncology Letters*, *13*(3), 1553–1562. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.5672>
318. Wilson, E. S., & Newell-Litwa, K. (2018). Stem cell models of human synapse development and degeneration. *Molecular Biology of the Cell*, *29*(24), 2913–2921. <https://doi.org/10.1091/mbc.E18-04-0222>
319. Wu, H., Xu, J., Pang, Z. P., Ge, W., Kim, K. J., Bianchi, B., Chen, C., Südhof, T. C., & Sun, Y. E. (2007). Integrative genomic and functional analyses reveal neuronal subtype differentiation bias in human embryonic stem cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(34), 13821–13826. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706199104>
320. Xu, X., Lei, Y., Luo, J., Wang, J., Zhang, S., Yang, X.-J., Sun, M., Nuwaysir, E., Fan, G., Zhao, J., Lei, L., & Zhong, Z. (2013). Prevention of β -amyloid induced toxicity in human iPS cell-derived neurons by inhibition of Cyclin-dependent kinases and associated cell cycle events. *Stem Cell Research*, *10*(2), 213–227. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2012.11.005>
321. Yap, E.-L., & Greenberg, M. E. (2018). Activity-regulated transcription: Bridging the gap between neural activity and behavior. *Neuron*, *100*(2), 330–348. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.10.013>
322. Yin, F., Hoggatt, A. M., Zhou, J., & Herring, B. P. (2006). 130-kDa smooth muscle myosin light chain kinase is transcribed from a CARG-dependent, internal promoter within the mouse *mylk* gene. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *290*(6), C1599–C1609. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00289.2005>
323. Yoshioka, N., Gros, E., Li, H.-R., Kumar, S., Deacon, D. C., Maron, C., Muotri, A. R., Chi, N. C., Fu, X.-D., Yu, B. D., & Dowdy, S. F. (2013). Efficient Generation of Human iPSCs by a Synthetic Self-Replicative RNA. *Cell Stem Cell*, *13*(2), 246–254. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.06.001>
324. Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I. I., & Thomson, J. A. (2009). Human Induced Pluripotent Stem Cells Free of Vector and Transgene Sequences. *Science (New York, N.Y.)*, *324*(5928), 797–801. <https://doi.org/10.1126/science.1172482>
325. Yuste, R., & Bonhoeffer, T. (2001). Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annual Review of Neuroscience*, *24*, 1071–1089. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.1071>
326. Zaromytidou, A.-I., Miralles, F., & Treisman, R. (2006). MAL and Ternary Complex Factor Use Different Mechanisms To Contact a Common Surface on the Serum Response Factor DNA-Binding Domain. *Molecular and Cellular Biology*, *26*(11), 4134–4148. <https://doi.org/10.1128/MCB.01902-05>
327. Zhang, S. C., Wernig, M., Duncan, I. D., Brüstle, O., & Thomson, J. A. (2001). In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, *19*(12), 1129–1133. <https://doi.org/10.1038/nbt1201-1129>
328. Zhang, X., Azhar, G., Helms, S. A., & Wei, J. Y. (2011). Regulation of cardiac microRNAs by serum response factor. *Journal of Biomedical Science*, *18*(1), 15. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-18-15>
329. Zhang, Y., Pak, C., Han, Y., Ahlenius, H., Zhang, Z., Chanda, S., Marro, S., Patzke, C., Acuna, C., Covy, J., Xu, W., Yang, N., Danko, T., Chen, L., Wernig, M., & Südhof, T. C.

- (2013). Rapid Single-Step Induction of Functional Neurons from Human Pluripotent Stem Cells. *Neuron*, 78(5), 785–798. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.05.029>
330. Zhao, X., & Bhattacharyya, A. (2018). Human Models Are Needed for Studying Human Neurodevelopmental Disorders. *American Journal of Human Genetics*, 103(6), 829–857. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.10.009>
331. Zhou, W., & Freed, C. R. (2009). Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 27(11), 2667–2674. <https://doi.org/10.1002/stem.201>
332. Zhou, X., Feliciano, P., Shu, C., Wang, T., Astrovskaya, I., Hall, J. B., Obiajulu, J. U., Wright, J. R., Murali, S. C., Xu, S. X., Brueggeman, L., Thomas, T. R., Marchenko, O., Fleisch, C., Barns, S. D., Snyder, L. G., Han, B., Chang, T. S., Turner, T. N., ... Chung, W. K. (2022). Integrating de novo and inherited variants in 42,607 autism cases identifies mutations in new moderate-risk genes. *Nature Genetics*, 54(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01148-2>
333. Zhu, S., Li, W., Zhou, H., Wei, W., Ambasudhan, R., Lin, T., Kim, J., Zhang, K., & Ding, S. (2010). Reprogramming of Human Primary Somatic Cells by OCT4 and Chemical Compounds. *Cell Stem Cell*, 7(6), 651–655. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.11.015>
334. Zimprich, A., Mroz, G., Meyer zu Reckendorf, C., Anastasiadou, S., Förstner, P., Garrett, L., Hölter, S. M., Becker, L., Rozman, J., Prehn, C., Rathkolb, B., Moreth, K., Wurst, W., Klopstock, T., Klingenspor, M., Adamski, J., Wolf, E., Bekerredjian, R., Fuchs, H., ... Knöll, B. (2017). Serum Response Factor (SRF) Ablation Interferes with Acute Stress-Associated Immediate and Long-Term Coping Mechanisms. *Molecular Neurobiology*, 54(10), 8242–8262. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0300-x>
335. Zipursky, R. B., Lim, K. O., Sullivan, E. V., Brown, B. W., & Pfefferbaum, A. (1992). Widespread cerebral gray matter volume deficits in schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*, 49(3), 195–205. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1992.01820030027004>
336. Zito, K., Scheuss, V., Knott, G., Hill, T., & Svoboda, K. (2009). Rapid functional maturation of nascent dendritic spines. *Neuron*, 61(2), 247–258. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.054>
337. Ziv, N. E., & Smith, S. J. (1996). Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron*, 17(1), 91–102. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80283-4](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80283-4)

DOROBEK NAUKOWY DOKTORANTKI

Publikacje, w których zawarto wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie:

- Liszewska Ewa*, **Majchrowicz Lena***, Krogulec Ewelina*, Kotulska Katarzyna, Kaczmarek Leszek, Kalita Katarzyna, Dobrzyń Agnieszka, Jaworski Jacek. Establishment of two hiPSC lines (IIMCBI001-A and IIMCBI002-A) from dermal fibroblasts of healthy donors and characterization of their cell cycle. *Stem Cell Res.* 2021, 102225. doi: 10.1016/j.scr.2021.102225.
- Roszkowska Matylda, Krysiak Anna, **Majchrowicz Lena**, Nader Karolina, Beroun Anna, Michaluk Piotr, Pekala Martyna, Jaworski Jacek, Kondrakiewicz Ludwika, Puścian Alicja, Knapska Ewelina, Kaczmarek Leszek, Kalita Katarzyna. SRF depletion in early life contributes to social interaction deficits in the adulthood. *Cell Mol Life Sci.* 2022, 79(5): 278. doi: 10.1007/s00018-022-04291-5.

Pozostałe publikacje:

- Satora Leszek, Bilaska-Kos Anna, **Majchrowicz Lena**, Suski Szymon, Sobecka Ewa, Korzelecka-Orkisz Agata, Formicki Krzysztof. The gill monogenean *Sciadicleithrum variabilum* induces histomorphological alterations in the gill tissues of the discus *Symphysodon aequifasciatus*. *Dis Aquat Org.* 2022, 152: 37-46. doi: 10.3354/dao03703
- Sołek Przemysław, Mytych Jennifer, Łannik Ewelina, **Majchrowicz Lena**, Koszła Oliwia, Kozirowska Anna, Kozirowski Marek. Cancer on-target: Selective enhancement of 3- bromopyruvate action by an electromagnetic field in vitro. *Free Radical Biology and Medicine.* 2022, 180: 153-164. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2022.01.011
- Sołek Przemysław, **Majchrowicz Lena**, Kozirowski Marek. Aloe arborescens juice prevents EMF-induced oxidative stress and thus protects from pathophysiology in the male reproductive system in vitro. *Enviromental Research*, 2018, 166: 141-149 doi: 10.1016/j.envres.2018.05.035
- Sołek Przemysław, **Majchrowicz Lena**, Błoniarz Dominika, Krotoszyńska Ewelina, Kozirowski Marek. Pulsed or continuous electromagnetic field induce p53/p21-mediated apoptotic signaling pathway in mouse spermatogenic cells in vitro and thus may affect male fertility. *Toxicology.* 2017, 382: 84-92. doi: 10.1016/j.tox.2017.03.015
- Kozirowska Anna, Sołek Przemysław, **Majchrowicz Lena**, Romerowicz-Misielak Maria. The impact of electromagnetic fields with frequency of 50 Hz on metabolic activity of cells in vitro. *Electrotechnical Review.* 2017, 1(1): 163-166. doi: 10.15199/48.2017.01.39

* pierwszy współautor