

Natalia Chwin

**FUNKCJONALNE KONSEKWENCJE UTRATY AKTYWNOŚCI
GENU PTEN
W HIPOKAMPIE DOROSŁYCH MYSZY**

Praca doktorska wykonana
w Pracowni Modeli Zwierzęcych
Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego
Polskiej Akademii Nauk

PROMOTOR:

dr hab. Witold Konopka

PROMOTOR POMOCNICZY:

dr Anna Kiryk-Jaśkiewicz

Warszawa, 2024

Streszczenie

PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) to gen supresorowy, który reguluje homeostazę komórki oraz jej integralność poprzez hamowanie kaskad sygnalizacyjnych związanych z proliferacją i przeżyciem. Kodowana przez *PTEN* fosfataza równoważy aktywność kinazy PI3K, utrzymując prawidłową aktywację szlaku PI3K-AKT-mTOR. W początkowych badaniach nad białkiem PTEN podkreślano jego funkcję w hamowaniu procesów nowotworowych i regulacji metabolizmu. W neuronach wykazano związek PTEN z zaburzeniami neurorozwojowymi, w tym spektrum autyzmu (ang. Autism Spectrum Disorder [ASD]). Modele zwierzęce z warunkową inaktywacją genu *PTEN* w rozwoju embrionalnym czy wczesnym etapie postnatalnym ujawniły zmiany morfologiczne (hipertrofia) i funkcjonalne neuronów (zaburzenia synaptyczne) prowadzące do deficytów poznawczych, ataksji, epilepsji oraz zaburzeń społecznych przypominających ASD. Pomimo licznych badań nad funkcją PTEN w neuronach, nadal pozostaje pytanie, jaka jest rola tego białka w pełni zróżnicowanych neuronach u dorosłych osobników.

Kluczowym zagadnieniem badawczym niniejszej pracy było określenie, czy utrata funkcjonalnego PTEN w zróżnicowanych neuronach pobudzających hipokampa wpływa na zdolności poznawcze, ogólną aktywność zwierząt, pamięć socjalną, zdolności społeczne i zachowania komunikacyjne myszy. Badano także które z tych cech fenotypowych wynikają z utraty PTEN w rozwoju, a które są specyficzne dla dorosłych neuronów oraz czy występujące zmienności wskazują na fenotyp autystyczny.

W celu analizy funkcji PTEN w funkcjonalnych sieciach neuronalnych u dorosłych zwierząt zastosowano dwa indukowane modele zwierzęce. W pierwszym etapie wykorzystano model *Pten*, *CaMKII α -CreERT2*, w którym usunięcie genu *Pten* w neuronach pobudzających przodomózgowie indukowano tamoksyfenem (*Pten*-iCKO). Zaobserwowano wzmocnioną pamięć przestrzenną w testach IntelliCage, ale także zwiększoną śmiertelność między 7 a 13 tygodniem od indukcji mutacji. W drugim etapie zastosowano model *Pten**fl/fl*, gdzie delecja *Pten* była ograniczona tylko do hipokampa i indukowana wektorami AAV-*CaMKII α -Cre* (*Pten*-AAV-KO). Między 7 a 15 tygodniem od iniekcji wektorów AAV, dla modelu *Pten*-AAV-KO przeprowadzono testy uczenia się i pamięci przestrzennej w IntelliCage oraz konwencjonalne testy behawioralne z analizą wokalizacji ultradźwiękowej. Dodatkowo w 7 tygodniu od indukcji mutacji przeprowadzono analizę elektrofizjologiczną i sprawdzono pobudliwość neuronów CA1 w hipokampie.

Myszy *Pten*-AAV-KO osiągnęły lepsze wyniki w uczeniu przestrzennym i pamięci w porównaniu do myszy kontrolnych aż do momentu postępującej neurodegeneracji. Dodatkowo, mutanty *Pten*-AAV-KO wykazywały zwiększoną aktywność ruchową

w IntelliCage i potwierdzoną w teście otwartego pola, obniżony poziom lęku (zależny od płci) we wznieśionym labiryncie krzyżowym, łagodne zaburzenia w teście socjalności i nowości społecznej (zależne od płci) oraz podwyższoną aktywność eksploracyjną podczas bezpośrednich interakcji socjalnych. Wraz z upływem czasu zaobserwowano postępującą heterogeniczność grupy *Pten*-AAV-KO, związaną także z wystąpieniem drgawek u niektórych mutantów. Pomiedzy 7 a 15 tygodniem u części mutantów w ogóle nie zaobserwowano wokalizacji ultradźwiękowych. Analiza struktury wokalizacji u pozostałych mutantów w 15 tygodniu od indukcji mutacji wykazała różnice w jakości emitowanych dźwięków i liczbie epizodów. Zwierzęta kontrolne wykonywały mniejszą liczbę nawoływań o podobnej strukturze spektralnej, co sugeruje synchronizację mózgów osobników wchodzących w interakcje społeczne, podczas gdy myszy u *Pten*-AAV-KO zaobserwowano odmienny fenotyp. W 15 tygodniu nie obserwowano już znaczących różnic w uczeniu się pomiędzy mutantami a grupą kontrolną, co mogło być związane z normalizacją aktywności kinazy mTOR, obserwowaną w tym czasie. Jednocześnie obserwowano postępujące procesy neurodegeneracyjne w obrębie pól CA hipokampa i zakrętu zębatego. Mutację potwierdzono po 7 tygodniach, wykazując obniżenie poziomu *Pten* i wzrost aktywności kinazy mTOR w hipokampie. Analiza aktywności elektrofizjologicznej neuronów CA1 hipokampa w modelu *Pten*-AAV-KO, wykazała, że przeciwstawne adaptacje błony komórkowej i plastyczności synaptycznej, mogące pełnić rolę mechanizmu kompensacyjnego w utrzymywaniu homeostazy w sieci neuronalnej. Obniżona pobudliwość neuronów, objawiająca się hiperpolaryzacją błony oraz zmniejszoną częstotliwością potencjałów czynnościowych, prawdopodobnie chroni komórki przed ekscytotoksycznością wynikającą z nadmiernej aktywacji. Jednocześnie zwiększona amplituda i częstotliwość miniaturowych EPSC w tych neuronach sugeruje wzmocnioną transmisję synaptyczną, co potencjalnie może wpływać na polepszoną zdolność uczenia się, obserwowaną w 7 tygodniu od transdukcji wektorami AAV.

Powyższe obserwacje wskazują na istotną funkcję białka *Pten* w modulacji procesów uczenia się i zapamiętywania, poprzez udział w zachowaniu równowagi w aktywacji szlaku PI3K-AKT. Utrata własności hamującej prowadzi do zmian w zachowaniu zwierząt, możliwości wystąpienia stanów drgawkowych, a w dłuższej perspektywie do procesów neurodegeneracyjnych. Nie można natomiast jednoznacznie stwierdzić, że zmiany wywołane indukowaną mutacją genu *Pten* w neuronach hipokampa mózgu myszy dorosłych mogą stanowić zwierzęcy model spektrum autyzmu. W części eksperymentalnej niniejszej rozprawy wykazano odrębne od neurorozwojowych funkcje genu *Pten* w zróżnicowanych neuronach osobników dorosłych.

ABSTRACT

PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) belongs to a group of tumor suppressor genes whose function is to maintain stable cell growth and integrity by inhibiting the cascade of intracellular signals that activate the expression of genes responsible for growth, survival and proliferation. The *PTEN* gene encodes a phosphatase enzyme with dual activity, targeting both proteins and lipids. The key action of PTEN phosphatase is its opposing activity to PI3K kinase, an interaction that maintains activation of this pathway at appropriate levels. Early reports on PTEN's function indicated its important role in regulating the cell's metabolic pathways and in inhibiting tumorigenesis. In the context of PTEN's function in neurons, its association with Autism Spectrum Disorder (ASD), a neurodevelopmental disorder, has been demonstrated. In order to precisely study the function of Pten in neurons, a number of animal models were generated with conditional inactivation of the *Pten* gene during embryonic development. Structural changes of neurons characterized by hypertrophy of perikaryon and nerve cell protrusions were observed, which affected functional abnormalities in synaptic transmission and excitability, contributing to impaired memory, impaired social interaction, and finally ataxia and the development of epilepsy in transgenic animals. In these models, it has been possible to obtain a phenotypic picture similar to the features observed in ASD.

Despite many years of research into the function of the *Pten* gene in neurons, still little is known about its importance in fully differentiated neurons in adults. This has largely been due to the limited availability of genetic engineering tools to perform appropriate manipulations.

The main objective of this dissertation was to verify the research hypothesis of whether increased stimulation of the PI3K-AKT pathway due to loss of functional Pten protein in differentiated excitatory neurons in the hippocampal area affects the cognitive abilities of the animals studied. In addition, the effect of the introduced mutation on the animals' locomotor activity, anxiety, social memory, social behavior and communication abilities was examined. The aforementioned was aimed at determining whether the variation present could be indicative of an autistic phenotype, and which traits depend on the absence of the *Pten* gene during development, and which are unique to differentiated neurons.

The first stage of the study used a mouse model of Pten-CaMKII α -CreER^{T2} with conditional tamoxifen-inducible deletion of the *Pten* gene in differentiated forebrain excitatory neurons in adult animals (Pten-iCKO). It was observed that the mutants showed enhanced spatial memory in tests performed in IntelliCage cages. However, increased

mortality was observed in these animals between 7 and 13 weeks after mutation activation. For this reason, the next step used a *Pten* fl/fl animal model in which the *Pten* gene mutation, induced with AAV-CaMKII α -Cre vectors, was restricted to hippocampal neurons (Pten-AAV-KO). Between 7 and 15 weeks after AAV vector injection, learning ability and spatial memory tests were performed in IntelliCage and conventional behavioral tests with analysis of ultrasound vocalizations at specific time points. The efficacy of the mutation was confirmed after about 7 weeks by reduced levels of Pten protein in the hippocampus and concomitant increased activity of mTOR kinase (as an effector to deregulate the PI3K-Pten interaction). During this time, too, Pten-AAV-KO mice performed better in learning and memory tests compared to the control group. In addition, Pten-AAV-KO mutants were characterized by increased locomotor excitability in IntelliCage and the open field test, reduced anxiety levels (sex-dependent) in the elevated plus maze, and increased exploratory activity during social interactions. In the early stages after induction (between 2 and 7 weeks), no significant differences were observed in the socialization and social novelty test, as well as in the social interaction test. As time passed, a revealing heterogeneity of the Pten-AAV-KO group was observed, due to occurred seizures in few individuals. Between 7 and 15 weeks, ultrasonic vocalizations were not observed at all in some mutants. Analysis of the structure of vocalizations in the remaining mutants revealed differences in the quality of the sounds emitted and the number of episodes at 15 weeks after mutation induction. Control animals were characterized by fewer vocalizations with similar spectral structure, suggesting synchronization of the brains of individuals interacting socially. In Pten-AAV-KO mice, by contrast, communication occurred in a chaotic manner. In addition, at week 15, significant differences in learning were no longer observed between the mutants and the control group, which may be related to the normalization of mTOR activity observed at that time. Moreover, progressive neurodegenerative processes in the hippocampus were observed around this time.

The above observations point to an important function of the Pten protein in modulating the efficiency of learning and memory, through its participation in maintaining a balance in the activation of the PI3K-AKT pathway. Loss of this inhibitory property leads, at the level of the organism, to changes in animal behavior, the possibility of convulsive states, and, in the long-term, even the initiation of neurodegenerative processes. However, Pten-AAV-KO mice cannot be clearly identified as a model of the autism spectrum, as indicated by the fact that during the course of the studies carried out, functions of the *Pten* gene in the differentiated neurons of adults were shown to be distinct from neurodevelopmental ones.