

Karolina Nizińska-Smolińska

Rola białka Mbd3 w procesie epileptogenezy

Praca doktorska

wykonana w Pracowni Epileptogenezy

Instytutu Biologii Doświadczalnej

im. M. Nenckiego PAN

PROMOTOR:

Prof. dr hab. Katarzyna Łukasiuk

Warszawa, 2022

FINANSOWANIE



GRANT Narodowego Centrum Nauki, OPUS 2015/19/B/NZ4/01401

Tytuł: „Rola MBD3 (*methyl-binding protein 3*) w epileptogenezie”

Kierownik: prof. dr hab. Katarzyna Łukasiuk

Składam serdeczne podziękowania

Pani prof. dr hab. Katarzynie Łukasiuk, promotor niniejszej rozprawy doktorskiej, za możliwość realizacji niniejszego projektu, przekazaną wiedzę, nieocenioną pomoc i opiekę naukową

Panu dr Bartoszowi Wojtasiowi, Pani mgr Sandrze Binias oraz Panu dr Bartłomiejowi Gielniewskiemu, z Pracowni Sekwencjonowania Instytutu Nenckiego, za przeprowadzenie procedury sekwencjonowania, analizę bioinformatyczną i przyjemną współpracę

Pani dr hab. Dorocie Nowickiej za wprowadzenie do techniki mikroskopii fluorescencyjnej, wsparcie i cenne uwagi

Pani dr Kindze Szydłowskiej oraz Panu mgr Maciejowi Olszewskiemu za okazaną pomoc w trakcie realizacji moich badań

Koleżankom z Pracowni Epileptogenezy za stworzenie wyjątkowej atmosfery i miłą współpracę

Moim Rodzicom, Mężowi i Bratu za nieustanne wsparcie i motywację

SPIS TREŚCI

Wykaz skrótów	9
1. Streszczenie.....	15
2. Summary	17
3. Wstęp	19
3.1 Padaczka.....	19
3.1.1 Padaczka skroniowa	20
3.2 Eksperymentalne modele drgawek i padaczki.....	25
3.2.1 Model padaczki skroniowej wywołanej stanem padaczkowym indukowanym drażnieniem ciała migdałowatego	27
3.2.2 Model napadów ostrych wywołanych podaniem PTZ	27
3.2.3 Model rozniecania.....	29
3.2.4 Model wyładowań epileptopodobnych <i>in vitro</i>	29
3.3 Modyfikacje epigenetyczne w regulacji ekspresji genów	30
3.3.1 Metylacja DNA.....	30
3.3.2 Kompleks NuRD.....	32
3.3.3 Białko MBD3.....	34
3.3.4 Zaburzenia modyfikacji epigenetycznych w padaczce.....	35
4. Cele i założenia pracy	39
5. Materiały i metody.....	40
5.1 Materiały	40
5.1.1 Wykaz stosowanych przeciwciał	40
5.1.2 Wykaz stosowanych zestawów	42
5.1.3 Pochodzenie pozostałych materiałów i odczynników.....	42
5.1.4 Najczęściej stosowane roztwory	43
5.1.5 Wykaz stosowanych wirusów	45
5.1.6 Materiał biologiczny.....	48
5.1.6.1 <i>In vivo</i> - Zwierzęta doświadczalne.....	48
5.1.6.2 <i>In vitro</i> - Hodowle pierwotne neuronów korowych.....	48

5.2	Metody.....	48
5.2.1	Implantacja elektrod do obserwacji EEG	48
5.2.2	Wirusy AAV i ich iniekcja do mózgu szczura	49
5.2.3	Metody w doświadczeniach <i>in vivo</i>	50
5.2.3.1	Testy behawioralne.....	50
5.2.3.1.1	Test reakcji na bodziec stresowy	51
5.2.3.1.2	Test otwartego pola	53
5.2.3.1.3	Test uniesionego labiryntu krzyżowego.....	53
5.2.4	Model drgawki ostrej wywołanej pentylenetetrazolem - Test PTZ	53
5.2.5	Rozniecanie z zastosowaniem PTZ.....	54
5.2.6	Eutanazja i pobranie tkanki.....	55
5.2.6.1	Izolowanie tkanki do badań poziomu RNA i białka	55
5.2.6.2	Perfuzja	55
5.2.7	Izolowanie białek z mózgu szczura.....	56
5.2.7.1	Przygotowanie ekstraktów białek z wyizolowanej tkanki	56
5.2.7.2	Metoda Bradforda - Oznaczenie stężenia białka	56
5.2.7.3	Elektroforeza białek – metoda Western Blot.....	56
5.2.7.3.1	Przygotowanie żelu poliakryloamidowego	56
5.2.7.3.2	Przygotowanie próbek do nałożenia na żel poliakryloamidowy.....	57
5.2.7.3.3	Rozdział elektroforetyczny na żelu poliakryloamidowym.....	57
5.2.7.3.4	Transfer białek na membranę nitrocelulozową	57
5.2.7.3.5	Detekcja białek metodą Western Blot	58
5.2.7.3.6	Oczyszczanie membrany	58
5.2.7.3.7	Detekcja białka referencyjnego	58
5.2.7.3.8	Analiza densytometryczna	59
5.2.8	Kwas rybonukleinowy	59
5.2.8.1	Izolowanie i oznaczenie stężenia RNA	59
5.2.8.2	Rozdział elektroforetyczny RNA	59
5.2.8.3	Odwrotna transkrypcja	59
5.2.8.4	Reakcja PCR w czasie rzeczywistym	60
5.2.8.5	Rozdział elektroforetyczny DNA.....	61
5.2.9	Histologia - Barwienie metodą Nissla	61
5.2.10	Immunofluorescencja	61

5.2.11	Metody w doświadczeniach <i>in vitro</i>	62
5.2.11.1	Hodowla dysocjowana neuronów korowych.....	62
5.2.11.2	Dysocjacja tkanki i założenie hodowli.....	62
5.2.11.3	Transfekcja komórek neuronalnych.....	63
5.2.11.4	Model wyładowań epileptopodobnych <i>in vitro</i>	63
5.2.11.5	Test MTT.....	64
5.2.11.6	Barwienie immunofluorescencyjne komórek na szkiełkach.....	64
5.2.11.7	Izolacja białek z hodowli pierwotnej neuronów korowych.....	65
5.2.11.8	Izolacja RNA z hodowli pierwotnej neuronów korowych.....	65
5.2.11.9	Sekwencjonowanie.....	66
5.2.11.9.1	Biblioteki cDNA do sekwencjonowania mRNA.....	66
5.2.11.9.2	Sekwencjonowanie nowej generacji.....	67
5.2.11.9.3	Analiza bioinformatyczna danych transkryptomicznych.....	67
5.2.11.9.4	Analiza funkcjonalna danych transkryptomicznych.....	68
5.2.12	Analiza statystyczna.....	68
6.	Wyniki.....	70
6.1	Ocena wpływu drgawek na ekspresję genu <i>Mbd3</i> oraz poziom białka Mbd3 <i>in vivo</i>	70
6.2	Ocena działania wirusów do obniżenia ekspresji i nadekspresji Mbd3 <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i>	73
6.2.1	Ocena działania wirusów do obniżenia i nadekspresji Mbd3 w hodowli pierwotnej neuronów korowych.....	73
6.2.2	Ekspresja wirusów po iniekcji do mózgu szczura.....	77
6.3	Wpływ obniżenia ekspresji genu <i>Mbd3</i> oraz zmniejszenia poziomu białka Mbd3 na zachowanie zwierząt i próg drgawkowy <i>in vivo</i>	84
6.3.1	Wpływ obniżenia ekspresji genu <i>Mbd3</i> oraz poziomu białka Mbd3 na dobrostan i zachowanie zwierząt doświadczalnych.....	84
6.3.2	Wpływ obniżenia ekspresji genu <i>Mbd3</i> oraz zmniejszenia poziomu białka Mbd3 na próg drgawkowy.....	87
6.4	Wpływ nadekspresji genu <i>Mbd3</i> oraz zwiększenia poziomu białka Mbd3 na zachowanie zwierząt i próg drgawkowy.....	89
6.4.1	Wpływ nadekspresji genu <i>Mbd3</i> oraz zwiększenia poziomu białka Mbd3 na dobrostan i zachowanie zwierząt doświadczalnych.....	89
6.4.2	Wpływ nadekspresji genu <i>Mbd3</i> oraz zwiększenia poziomu białka Mbd3 na próg drgawkowy.....	92

6.5	Określenie wpływu obniżenia ekspresji Mbd3 na epileptogenezę w modelu rozniecania przy użyciu PTZ.	94
6.5.1	Wpływ obniżenia ekspresji <i>Mbd3</i> i poziomu białka Mbd3 w mózgu szczura na zachowanie	95
6.5.2	Wpływ obniżenia ekspresji <i>Mbd3</i> i białka Mbd3 na proces epileptogenezy	98
6.6	Określenie wpływu nadekspresji <i>Mbd3</i> oraz wzrostu poziomu białka Mbd3 na epileptogenezę w modelu rozniecania przy użyciu PTZ.....	99
6.6.1	Wpływ nadekspresji białka Mbd3 w mózgu szczura na zachowanie	100
6.6.2	Wpływ nadekspresji <i>Mbd3</i> oraz poziomu białka Mbd3 na proces epileptogenezy	102
6.7	Wpływ nadekspresji Mbd3 na ekspresję genów w modelu wyładowań epileptopodobnych <i>in vitro</i>	104
6.7.1	Wpływ transfekcji na żywotność komórek w modelu wyładowań epileptopodobnych <i>in vitro</i>	105
6.7.2	Wpływ transfekcji oraz wyładowań epileptopodobnych na ekspresję Mbd3. .	106
6.7.3	Wpływ wyładowań epileptopodobnych na ekspresję genów w neuronach <i>in vitro</i>	107
6.7.4	Ocena wpływu wyładowań epileptopodobnych na poziom ekspresji genów w zależności od poziomu Mbd3.....	110
6.7.5	Wpływ nadekspresji Mbd3 na ekspresję genów w warunkach fizjologicznych lub po indukcji wyładowań epileptopodobnych	113
6.7.6	Wzory ekspresji genów zależne od poziomu białka Mbd3, w modelu zwiększonej aktywności epileptopodobnej.....	121
7.	Dyskusja	130
7.1	Wektory wirusowe, jako narzędzie modyfikacji ekspresji i poziomu białka Mbd3. .	130
7.2	Wpływ ekspresji Mbd3 na zachowanie zwierząt doświadczalnych.	131
7.3	Wpływ drgawki na poziom białka Mbd3.....	132
7.4	Wpływ ekspresji Mbd3 na próg drgawkowy <i>in vivo</i>	133
7.5	Wpływ ekspresji Mbd3 na epileptogenezę w modelu rozniecania PTZ.....	133
7.6	Wpływ wyładowań epileptopodobnych <i>in vitro</i> na ekspresję genów.	134
7.7	Białko Mbd3 w regulacji ekspresji genów.....	137
8.	Podsumowanie.....	143
9.	Wnioski.....	144

Bibliografia 145

Wykaz skrótów

AAV	wektor adenowirusowy (ang. <i>adeno-associated virus</i>)
ADP	adenozyno-5'-difosforan
ANOVA	analiza wariancji (ang. <i>analysis of variance</i>)
APS	nadsiarczan amonu (ang. <i>ammonium persulfate</i>)
Arg	arginina (ang. <i>arginine</i>)
ATP	adenozyno-5'-trifosforan (ang. <i>adenosine triphosphate</i>)
AVP	wazopresyna (ang. <i>arginine vasopressin</i>)
BDZ	benzodiazepina (ang. <i>benzodiazepine</i>)
BLA	jądro migdałowe podstawno boczne (ang. <i>basolateral amygdaloid nucleus</i>)
BLP	jądro migdałowe podstawne boczne, część tylnia (ang. <i>basolateral amygdala nucleus, posterior</i>)
BSA	surowicza albumina bydlęca (ang. <i>bovine serum albumin</i>)
C	cytozyna, jedna z jednostek budujących kwas nukleinowy (ang. <i>cytosin</i>)
CA1-4	pole CA1-4 (z łac. <i>cornu ammoni</i>) formacji hipokampa
CaMKIV	kinaza białkowa zależna od wapnia i kalmoduliny typu IV (ang. <i>Ca²⁺ / calmodulin kinases IV</i>)
cDNA	komplementarne DNA syntetyzowane na matrycy RNA (ang. <i>complementary DNA</i>)
Cec	jądro migdałowe środkowe, część otoczkowa (ang. <i>central amygdala nucleus, capsular</i>)
CeL	jądro migdałowe środkowe, część boczna (ang. <i>central amygdaloid nucleus, lateral</i>)
CeM	jądro migdałowe środkowe, część przyśrodkowa (ang. <i>central amygdala nucelus, medial</i>)

CHD3/4/5	helikaza chromodomenowa (ang. <i>chromodomain helicase DNA-binding protein</i>)
CMV	cytomegalowirus (ang. <i>human cytomegalovirus</i>)
CpG	dinukleotydy CG, określane mianem wysp CpG (ang. <i>cytosine-phosphate-guanine, CpG islands</i>)
CREB	białko CREB (ang. <i>cAMP response element binding protein</i>)
DMSO	dimetylosulfotlenek
DNA	kwasy deoksyrybonukleinowe (ang. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNaza	deoksyrybonukleaza (ang. <i>deoxyribonuclease</i>)
DNMT1-3	DNA metylotransferaza 1-3 (ang. <i>DNA methyltransferase 1-3</i>)
DNMTs	metylotransferazy DNA (ang. <i>DNA methyltransferases</i>)
DTT	ditiotreitól (ang. <i>dithiothreitol</i>)
dUTP	fosfataza (ang. <i>deoxyuridine triphosphate</i>)
EDTA	kwasy etylenogiaminotetraoctowe (ang. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EEG	elektroencefalografia (ang. <i>electroencephalography</i>)
EGTA	kwasy etylenoglikolo-bis-(2-aminoetylo)-tetraoctowe (ang. <i>ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-tetraacetic acid</i>)
FBS	surowica płodowa bydłeca (ang. <i>fetal bovine serum</i>)
G	guanina, jedna z jednostek budujących kwas nukleinowy (ang. <i>guanine</i>)
GABA	kwasy gamma-aminomasłowe, neurotransmiter (ang. <i>gamma-aminobutyric acid</i>)
GABA _{A-B}	receptor błonowy (ang. <i>gamma-aminobutyric acid type A / B receptor</i>)
GAERS	zwierzęcy, genetyczny model padaczki (ang. <i>Genetic Absence Epilepsy Rat from Strasbourg</i>)
GAPDH	dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (ang. <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>)
GATA	czynnik transkrypcyjny GATA (ang. <i>globin transcriptional factor</i>)

GFAP	kwaśne białko włóknkowe gleju (ang. <i>glial fibrillary acidic protein</i>)
GFP	białko zielonej fluorescencji (ang. <i>green fluorescent protein</i>)
Gly	glicyna (ang. <i>glycine</i>)
GRIK1	podjednostka 1 receptora kainowego dla glutaminianu (ang. <i>glutamate ionotropic receptor kainate type subunit 1</i>)
HBSS	zbilansowany roztwór soli Hanka (ang. <i>Hank's Balanced Salt Solution</i>)
HDAC	deacetylaza histonów (ang. <i>histone deacetylase</i>)
HEPES	kwas N-2-hydroksyetylopiperazyno-N'-2-etanosulfonowy (ang. <i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>)
IgG	immunoglobulina, typu G (ang. <i>immunoglobulin G</i>)
ILAE	międzynarodowa liga przeciwpadaczkowa (ang. <i>International League Against Epilepsy</i>)
IMG	jądro migdałowe, część śródrzeniowa szara (ang. <i>amygdaloid intramedullary gray</i>)
INHA	podjednostka α inhibiny (ang. <i>inhibin subunit alpha</i>)
KCNA4	kanał potasowy bramkowany napięciem, podjednostka α 4 (ang. <i>potassium voltage-gated channel subfamily A member 4</i>)
KCNAB2	podjednostka β 2 kanału potasowego bramkowanego napięciem (ang. <i>potassium voltage-gated channel subfamily A regulatory beta subunit 2</i>)
KPB	fosforan potasu (ang. <i>potassium phosphate buffer</i>)
LaDL	jądro migdałowe boczne, część grzbietowo-boczna (ang. <i>lateral amygdloid nucleus, dorsal-lateral</i>)
LaVM	jądro migdałowe boczne, część brzuszno-przyśrodkowa (ang. <i>lateral amygdaloid nucleus, ventromedial</i>)
MAP2	marker neuronalny (ang. <i>microtubule-associated protein-2</i>)
MBD	domena metylo-CpG (ang. <i>methyl CpG binding domain</i>)

MBD1-4	białka z rodziny MBD, zawierające domenę metylo-CpG (ang. <i>methyl CpG binding domain 1-4</i>)
MeCP2	białko z rodziny MBD, zawierające domenę metylo-CpG (ang. <i>methyl CpG binding protein 2</i>)
MES	zwierzęcy model napadu drgawkowego wywołany bodźcem elektrycznym (ang. <i>maximal electroshock seizure</i>)
MOPS	kwasy 3-(N-morfolino)-propanosulfonowe (ang. <i>3-(N-morpholino)propanesulfonic acid</i>)
mRNA	matrycowy kwas rybonukleinowy (ang. <i>messenger RNA</i>)
MTA	białko MTA (ang. <i>metastasis-associated protein</i>)
mTOR	kinaza treoninowo-serynowa (ang. <i>mammalian target of rapamycin</i>)
MTT	bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazolu (ang. <i>(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)</i>)
NaCl	sól fizjologiczna
Neun	neuronalny antygen jądrowy, marker neuronów (ang. <i>neuronal nuclei</i>)
Nf2	białko Nf2 (ang. <i>moesin-ezrin-radixin like (MERLIN) tumor suppressor</i>)
Notch	białko Notch
NuRD	kompleks NuRD (ang. <i>nucleosome remodeling and deacetylase complex</i>)
PB	bufor fosforanowy (ang. <i>phosphate buffer</i>)
pBRS	bufor pBRS (ang. <i>physiological recording solution</i>)
PBS	sól fizjologiczna w buforze fosforanowym (ang. <i>phosphate buffer saline</i>)
PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. <i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	paraformaldehyd (ang. <i>paraformaldehyde</i>)
PI3K/Akt	ścieżka sygnałowa kinazy 3-fosfatydyloinozytolu i kinazy białkowej AKT (ang. <i>phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway</i>)
PIPES	kwasy piperazyno-1,4-bis-(2-etanosulfonowe) (ang. <i>piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)</i>)

PMSF	fluorek fenylometylosulfonowy (ang. <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>)
PTZ	pentylenetetrazol (ang. <i>pentylenetetrazol</i>)
RBBP	białko RBBP (ang. <i>retinoblastoma-binding protein</i>)
RIN	kategoria integralności RNA (ang. <i>RNA integrity number</i>)
RNA	kwas rybonukleinowy (ang. <i>rybonucleic acid</i>)
RT-PCR	PCR w czasie rzeczywistym (ang. <i>real time PCR</i>)
SCN3A	podjednostka α białka kanału sodowego typu 3 (ang. <i>sodium channel protein type 3 subunit alpha</i>)
Scn3a	białko SCN3A (ang. <i>sodium voltage-gated channel alpha subunit 3</i>)
Scube3	białko Scube3 (ang. <i>signal peptide, CUB domain and EGF like domain containing 3</i>)
SDS	dodecylosiarczan sodu (ang. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SEM	błąd standardowy (ang. <i>standard error mean</i>)
shRNA	krótkie RNA o strukturze spinki do włosów (ang. <i>small hairpin RNA</i>)
Syn	ludzki promotor synapsyny (ang. <i>human synapsin 1 gene promoter</i>)
T	tymina, jedna z jednostek budujących kwas nukleinowy (ang. <i>thymine</i>)
TBE	bufor boranowy (ang. <i>tris-borate-EDTA</i>)
TBS	sól fizjologiczna buforowana za pomocą Tris (ang. <i>tris-buffered saline</i>)
TBS-T	sól fizjologiczna buforowana za pomocą Tris z dodatkiem 0,2% Tween 20
TEMED	N'N'N'N'-tetrametylenediamina (ang. <i>N'N'N'N'-tetramethylethyenediamine</i>)
TET	rodzina białek TET biorących udział w procesie demetylacji (ang. <i>ten-eleven translocation</i>), do rodziny należą białka TET1-3
TF	czynniki transkrypcyjne (ang. <i>transcriptional factors</i>)
T-PBS	roztwór PBS z dodatkiem Tritonu X-100 o odpowiednim stężeniu
TRD	domena represji transkrypcyjnej (ang. <i>transcriptional repressor domain</i>)
TREM2	białko TREM (ang. <i>tiggering receptor expressed on myeloid cells 2</i>)

Tris	2-amino-2-hydroksymetylo-propanodiol (ang. <i>2-amino-2hydroxymethylpropane-1,3-diol</i>)
U6	promotor polimerazy RNA III typu III, stosowany do kierowania ekspresją shRNA
WB	metoda immunoblottingu (ang. <i>western blot</i>)
ZF5	czynnik transkrypcyjny ZF5 (ang. <i>ZF5 transcriptional factor</i>)

W niniejszej rozprawie, zgodnie z nomenklaturą bazy Uniprot (www.uniprot.org), skróty nazw genów pisano kursywą, rozpoczynając od wielkiej litery i kontynuując małymi literami dla genów szczerzych. Natomiast ludzkie geny pisano wyłącznie wielkimi literami. W oznaczeniu białek zastosowano skróty nazw genów pisanych czcionką standardową.

Listy genów na podstawie wyników sekwencjonowania przedstawiono w tabelach zamieszczonych w materiałach dodatkowych. W opisie doświadczeń i wyników stosowano wielkie litery dla przyjętych skrótów nazw poszczególnych wirusów oraz nazw grup zwierząt.

1. Streszczenie

Białko MBD3 (ang. *methyl CpG binding domain 3*) należy do rodziny białek MBD, odpowiedzialnych za odczytywanie wzoru metylacji DNA. Białka rodziny MBD wiążą domenę metylo-CpG, a także biorą udział w tworzeniu heterochromatyny. Co ciekawe, białko MBD3 nie ma zdolności do selektywnego rozpoznawania wysp metylo-CpG, jednakże jego charakterystyczną cechą jest zdolność wiązania do 5-hydroksymetylocytozyny i niemetylowanego DNA.

Badania przeprowadzone przez Bednarczyk i współpracowników (Bednarczyk i wsp. 2016) z zastosowaniem modelu padaczki skroniowej, wywołanej elektryczną stymulacją ciała migdałowatego, u szczura, wykazały wzrost poziomu białek kompleksu NuRD, w tym białka Mbd3 w mózgu zwierząt z padaczką. Zaobserwowano również większą liczbę regionów DNA, do których przyłącza się kompleks NuRD, zawierający białko Mbd3, u zwierząt stymulowanych, w porównaniu do grupy zwierząt kontrolnych.

Celem doświadczeń przeprowadzonych w niniejszej rozprawie było zbadanie, czy białko Mbd3 uczestniczy w procesach prowadzących do zmiany progu drgawkowego.

Zbadano wpływ drgawek wywołanych pentyletetrazolem (PTZ) na poziom białka Mbd3 oraz ekspresję mRNA *Mbd3 in vivo*. Wykazano wzrost poziomu białka Mbd3 w korze śródwęchowej i ciele migdałowatym szczurów 4 godziny po wywołanej drgawce.

W dalszej części pracy oceniono wpływ obniżenia i podwyższenia poziomu białka Mbd3 na próg drgawkowy *in vivo*. W celu modyfikacji poziomu Mbd3 wykorzystano komercyjnie zaprojektowane wektory wirusowe AAV. Wykazano, że obniżenie poziomu Mbd3 wydłuża czas latencji do pojawienia się drgawki indukowanej iniekcją PTZ.

Przeprowadzone doświadczenia behawioralne wykazały, że obniżenie poziomu białka MBD3 zwiększa poziom lęku u zwierząt. Z kolei nadekspresja Mbd3 zmniejsza reakcje lękowe u zwierząt i nasila ich pobudliwość oraz zwiększa aktywność w teście otwartego pola.

Zbadano również wpływ obniżenia i podwyższenia poziomu białka Mbd3 na epileptogenezę w modelu rozniecania (ang. *kindling*) przy użyciu PTZ. Wykazano, że podwyższenie poziomu białka Mbd3 przyspiesza proces epileptogenezy i rozwój drgawek toniczno-klonicznych.

W celu identyfikacji roli białka Mbd3 w regulacji ekspresji genów przeprowadzono doświadczenia *in vitro*, z zastosowaniem modelu wyładowań epileptopodobnych wywołanych niedoborem magnezu. Wykazano, że nadekspresja Mbd3 *in vitro* wywołuje zmiany w ekspresji genów w sposób specyficzny dla czasu i stanu neuronów.

Dane otrzymane w wyniku realizacji tego projektu wskazują na udział białka Mbd3 w patologii padaczki.

2. Summary

MBD3 (methyl CpG binding domain 3) protein belongs to the MBD family of proteins, responsible for reading the DNA methylation pattern. MBD family proteins bind the methyl-CpG domain and are also involved in heterochromatin formation. Interestingly, MBD3 protein does not have the ability to selectively recognize methyl-CpG islands, however, its characteristic feature is the ability to bind to 5-hydroxymethylcytosine and unmethylated DNA.

A study by Bednarczyk and colleagues (Bednarczyk i wsp. 2016) using a rat model of temporal epilepsy induced by electrical stimulation of the amygdala showed an increase in NuRD complex proteins, including Mbd3 protein, in the brain of epileptic animals. A greater number of regions of DNA to which the NuRD complex, containing the Mbd3 protein, attaches was also observed in stimulated animals, compared to a group of control animals.

The aim of the experiments conducted in this dissertation was to investigate whether the Mbd3 protein participates in the processes leading to changes in the seizure threshold.

The effects of pentylenetetrazole (PTZ)-induced convulsions on Mbd3 protein levels and *Mbd3* mRNA expression *in vivo* were investigated. An increase in Mbd3 protein levels was demonstrated in the entorhinal cortex and amygdala of rats 4 hours after the induced convulsion.

The effects of decreasing and increasing Mbd3 protein levels on seizure threshold *in vivo* were further evaluated. Commercially designed AAV viral vectors were used to modify Mbd3 levels. It was shown that lowering the level of Mbd3 prolongs the latency time to the onset of a convulsion induced by PTZ injection.

Behavioral experiments have shown that downregulation of MBD3 protein increases anxiety in animals. In contrast, overexpression of Mbd3 decreases anxiety responses in animals and increases their excitability and activity in the open field test.

The effects of decreasing and increasing Mbd3 protein levels on epileptogenesis were also investigated in a kindling model using PTZ. Elevation of Mbd3 protein levels was shown to accelerate epileptogenesis and the development of tonic-clonic seizures.

In order to identify the role of Mbd3 protein in the regulation of gene expression, *in vitro* experiments were conducted using a model of magnesium deficiency-induced epileptic-like discharges. Overexpression of Mbd3 *in vitro* was shown to induce changes in gene expression in a time- and state-specific manner in neurons.

The data obtained from this project indicate the involvement of the Mbd3 protein in epilepsy pathology.

3. Wstęp

3.1 Padaczka

Padaczka jest jedną z najczęściej występujących chorób neurologicznych, pojawiającą się niezależnie od wieku, rasy i lokalizacji geograficznej (Banerjee, Filippi i Hauser 2009, Beghi 2020). Według Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *World Health Organization*) obecnie na świecie żyje około 50 milionów osób cierpiących na tę chorobę (https://www.who.int/health-topics/epilepsy#tab=tab_1, dostęp na dzień 02/05/2022). Szacuje się, że co roku diagnozuje się około 5 milionów nowych przypadków. W Polsce, na rok 2016, w publicznej służbie zdrowia zarejestrowanych było 643 tysiące osób cierpiących na padaczkę. Szacuje się, że współczynnik występowania tej choroby prawdopodobnie wzrośnie ze względu na wydłużającą się długość życia oraz rosnącą liczbę osób po 80 roku życia z potencjalnie padaczkogennymi uszkodzeniami mózgu (Jedrzejczak i wsp. 2021).

Padaczka, inaczej zwana epilepsją, jest przewlekłą chorobą neurologiczną charakteryzującą się długotrwałymi zaburzeniami funkcjonowania mózgu objawiającymi się powstawaniem spontanicznych napadów drgawkowych, a także neurobiologicznymi, poznawczymi, psychologicznymi i społecznymi konsekwencjami tego stanu (Fisher i wsp. 2005, Bell i wsp. 2011, Vezzani, Balosso i Ravizza 2019). Z definicji wynika, że do identyfikacji padaczki jest potrzebny co najmniej jeden napad drgawkowy (inaczej drgawka) (Fisher i wsp. 2005). Z kolei drgawka jest definiowana jako przejściowy objaw wywołany nieprawidłową nadmierną lub synchroniczną aktywnością neuronalną mózgu (Fisher i wsp. 2005). Mechanizmy odpowiedzialne za powstawanie drgawki i rozwój padaczki są wieloczynnikowe. Próg drgawkowy czy też wystąpienie napadu drgawkowego może zmieniać się w czasie w wyniku np. zmian fizjologicznych (Engel i wsp. 2013). Międzynarodowa Liga Przeciwpadaczkowa (ang. *International League Against Epilepsy*, ILAE) wprowadziła klasyfikację napadów drgawkowych wyróżniając trzy główne typy napadu: uogólniony, ogniskowy oraz nieznany (Fisher i wsp. 2017, Scheffer i wsp. 2017).

Mechanizmy leżące u podstaw rozwoju drgawek, a w efekcie padaczki są zróżnicowane. Wśród nich możemy wyróżnić zmiany strukturalne, genetyczne, metaboliczne, immunologiczne, infekcyjne oraz o nieznanym przyczynie (Scheffer i wsp. 2017, Fisher i wsp. 2017). Ze względu na różnorodność i złożoność mechanizmów leżących u podstaw powstawania napadów drgawkowych, ILAE sklasyfikowała i wprowadziła podział na padaczkę: ogniskową, uogólnioną, łączącą oba typy - ogniskowy i uogólniony, oraz padaczkę o niezidentyfikowanej przyczynie (Berg i Scheffer 2011, Fisher i wsp. 2017, Scheffer i wsp. 2017). Identyfikacja typu padaczki może

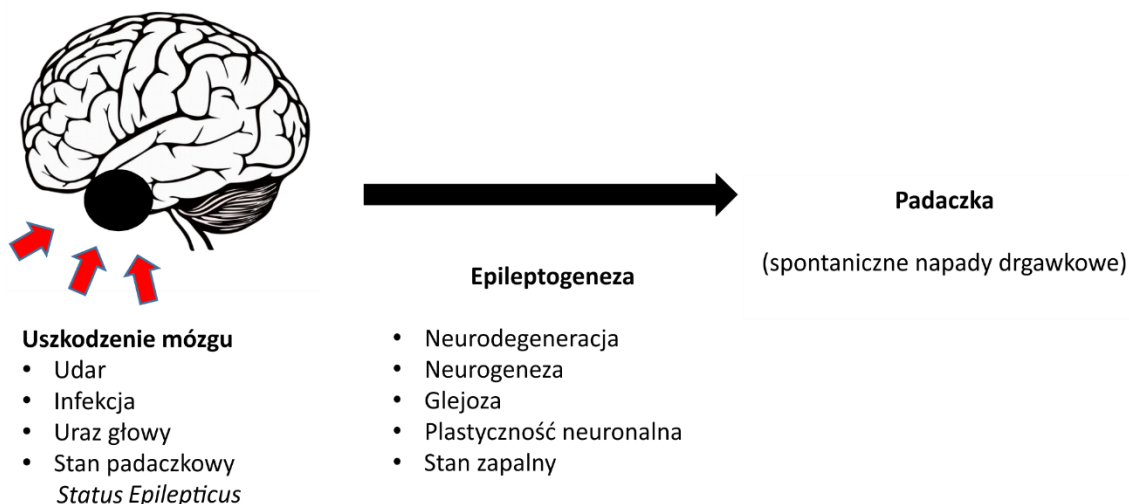
pozwoić na zastosowanie specjalistycznej i ukierunkowanej terapii (Berg i Scheffer 2011, Engel i wsp. 2013).

Celem terapii jest całkowite zahamowanie lub zmniejszenie intensywności i częstotliwości występowania spontanicznych napadów drgawkowych (Kwan i Brodie 2000, Galanopoulou i wsp. 2012). Główną metodą leczenia padaczki u pacjentów jest zastosowanie farmakoterapii. Niestety pomimo dostępności około 20 leków przeciwpadaczkowych, jedna trzecia pacjentów ze zdiagnozowaną padaczką pozostaje oporna na stosowaną farmakoterapię (Loscher i wsp. 2020). Szansą dla pacjentów z padaczką lekooporną jest resekcja ogniska padaczkowego która w znacznym stopniu ułatwia funkcjonowanie w życiu codziennym i zmniejsza śmiertelność (Casino 2004).

3.1.1 Padaczka skroniowa

Padaczka skroniowa (ang. *temporal lobe epilepsy*) jest padaczką ogniskową. Ognisko padaczkowe zlokalizowane jest w płacie skroniowym, składającym się z hipokampa, ciała migdałowatego oraz otaczającej go kory. Obszary te są powiązane ze sobą i innymi obszarami mózgu poprzez ogromną liczbę połączeń, które odpowiadają za wiele funkcji przypisanych do płata skroniowego, w tym procesy związane z pamięcią, tworzeniem wspomnień i emocji (Pitkanen i wsp. 1998). U pacjentów z padaczką skroniową niekiedy możliwe jest zdiagnozowanie przyczyny występowania spontanicznych napadów drgawkowych np. udar, uraz głowy, infekcja mózgu czy stan padaczkowy (Pitkanen i Sutula 2002).

Uszkodzenie mózgu powoduje kaskadę zdarzeń odpowiadających za proces epileptogenezy (Pitkanen i Sutula 2002). W procesie epileptogenezy, określanym jako czas latencji od uszkodzenia mózgu do pojawienia się pierwszego spontanicznego napadu drgawkowego, zachodzi szereg zmian, między innymi: neurogeneza, neurodegeneracja, plastyczność neuronalna, glejoza, pojawianie się komórek zapalnych, zmiany pobudliwości neuronów, uszkodzenie bariery krew-mózg, a także reorganizacja macierzy zewnątrzkomórkowej i zmiany na poziomie molekularnym zachodzące w obrębie pojedynczej komórki (Pitkanen i Lukasiuk 2011) (**Rycina 3.2.1**). Suma tych zmian prowadzi w efekcie do powstania spontanicznych napadów drgawkowych i rozpoznania padaczki, a nawracające napady mogą przyczynić się do dalszych zmian na poziomie komórkowym i molekularnym powodując dalszy rozwój choroby (Pitkanen i Sutula 2002).



Rycina 3.1.1.1 Proces rozwoju padaczki – przyczyny powstawania oraz zmiany zachodzące w okresie latencji, zwanym epileptogenezą.

Zmianą często występującą u pacjentów ze zdiagnozowaną padaczką skroniową jest tzw. stwardnienie hipokampa objawiające się utratą neuronów w obszarze CA1 i CA3, a także zakrętu zębatego (Pitkanen i wsp. 2002). Neurodegeneracja została zaobserwowana również w obszarach ciała migdałowatego i kory śródmózgowej (Pitkanen i wsp. 1998, Bartolomei i wsp. 2005). W eksperymentalnym modelu padaczki wywołanej stanem padaczkowym indukowanym elektryczną stymulacją ciała migdałowatego wykazano wysoki poziom neurodegeneracji w krótkim czasie po wywołaniu stanu padaczkowego (Pitkanen i wsp. 2002). Doświadczenia przeprowadzone w modelu rozniecania, przy pomocy elektrycznej stymulacji ciała migdałowatego, pokazały utratę neuronów w obszarze zakrętu zębatego zarówno u zwierząt, które spełniły kryterium rozniecania i rozwinęły spontaniczne napady drgawkowe oraz tych, które spełniły kryterium i nie rozwinęły spontanicznych drgawek. Stopień neurodegeneracji był wyższy w grupie, w której zaobserwowano spontaniczne napady drgawkowe (Brandt, Ebert and Loscher 2004). Powyższe wyniki wskazują, że spontaniczne napady drgawkowe powodują zwiększoną neurodegenerację w określonych obszarach mózgu.

Wytwarzanie nowych neuronów w hipokampie ma miejsce w obszarze zakrętu zębatego w strefie podziarnistej, położonej między warstwą komórek ziarnistych, a wnęką hipokampa i odbywa się przez całe życie (Walton 2012). Nowe neurony powstają z komórek macierzystych i są strukturalnie zintegrowane z siecią dojrzałych komórek ziarnistych (Castro-Torres i wsp. 2019). Zmiany związane z procesem neurogenezy na tym obszarze mogą prowadzić do powstania licznych zaburzeń neurologicznych, poznawczych, pamięci i procesu uczenia się (Zhao, Deng i Gage 2008). W przypadku ludzkiej oraz eksperymentalnej padaczki u myszy

warstwa komórek ziarnistych znajdująca się w obszarze zakrętu zębatego jest nieprawidłowa i charakteryzuje się rozproszeniem listków zakrętu zębatego oraz obecnością ektopowych komórek ziarnistych we wnętrzu hipokampa (Parent i wsp. 2006, Danzer 2019, Lybrand i wsp. 2021). W padaczce zaobserwowano zwiększenie liczby nowych komórek ziarnistych, na skutek występowania spontanicznych napadów drgawkowych (Pitkanen i Sutula 2002, Danzer 2019). W modelu padaczki wywołanej iniekcją pilokarpiny zaobserwowano nasiloną neurodegenerację oraz zwiększony proces neurogenezy, zlokalizowany w warstwie komórek ziarnistych, w grupie zwierząt charakteryzującą się wyższą częstotliwością spontanicznych napadów drgawkowych. U zwierząt z niską częstotliwością drgawek toniczno-klonicznych obserwowano zwiększoną neurogenezę oraz migrację komórek ziarnistych do warstwy molekularnej wnętrza hipokampa (Uemori, Toda i Seki 2017). Doświadczenia przeprowadzone z użyciem modelu padaczki wywołanej iniekcją pilokarpiny u myszy wykazały, że blokowanie procesu neurogenezy może zmniejszyć częstość występowania napadów drgawkowych oraz poprawić funkcje poznawcze (Cho i wsp. 2015, Lybrand i wsp. 2021). Z drugiej strony, u myszy pozbawionych genu cykliny D2, charakteryzujących się upośledzoną neurogenezą, nie zaobserwowano zmian w rozwoju padaczki wywołanej iniekcją kwasu kainowego do ciała migdałowatego (Kondratiuk i wsp. 2015).

Plastyczność neuronalna jest procesem uwarunkowanym przez mechanizmy komórkowe i molekularne, które regulują gęstość, strukturę i funkcjonalność połączeń synaptycznych. Zmiany neuroplastyczne obejmują tworzenie nowych połączeń neuronalnych w mózgu, wzrost transmisji synaptycznej w już istniejących synapsach oraz wzrost pobudliwości komórek nerwowych (Jarero-Basulto i wsp. 2018). W ludzkiej i eksperymentalnej padaczce obserwuje się zmiany plastyczności włókien kiciastych (Pitkanen i Sutula 2002). Włókna kiciaste to aksony komórek ziarnistych, których funkcją jest unerwienie komórek wnętrza i dendrytów wierzchołkowych komórek piramidalnych w obszarze CA3 i CA4 hipokampa (Sutula i wsp. 1989, Nissinen, Lukasiuk i Pitkanen 2001). W padaczce, nowe połączenia utworzone przez włókna kiciaste prowadzą do przebudowy połączeń synaptycznych i utworzenia zwrotnych obwodów pobudzających (Godale i Danzer 2018). W ludzkiej padaczce skroniowej oraz w eksperymentalnym modelu padaczki skroniowej wywołanej iniekcją kwasu kainowego, zaobserwowano bocznikowanie włókien kiciastych w obszarze CA2 oraz w mniejszym stopniu w regionie CA1 hipokampa, skorelowane z utratą neuronów w regionach CA3, CA4 (Freiman i wsp. 2021). Bocznikowanie włókien kiciastych zaobserwowano również w warstwie komórek ziarnistych oraz warstwie molekularnej hipokampa (Proper i wsp. 2001). Zmiany związane z bocznikowaniem włókien kiciastych mogą powodować nadpobudliwość hipokampa ze względu na zaburzenia równowagi procesów pobudzenia i hamowania (Haussler i wsp. 2016, Freiman i

wsp. 2021). W eksperymentalnym modelu padaczki skroniowej wywołanej iniekcją pilokarpiny, w którym zaobserwowano nieprawidłowe połączenia włókien kiciastych w obszarze hipokampa, zarejestrowano występowanie spontanicznych napadów drgawkowych i pogorszenie procesu uczenia się (Meller i wsp. 2021). W modelu rozniecania, zaobserwowano plastyczność włókien kiciastych w postaci przerostu aksonów komórek ziarnistych do wewnętrznej warstwy molekularnej zakrętu zębatego oraz pola CA3 (Amano i wsp. 1999, Bernardino i wsp. 2005). Doświadczenia przeprowadzone na skrawkach hipokampa wykazały, że włókna kiciaste uczestniczą we wzajemnym pobudzaniu się komórek ziarnistych oraz ułatwiają wywołanie zdarzeń przypominających napady drgawkowe (Buckmaster i Lew 2011).

W patofizjologii padaczki skroniowej ważną rolę odgrywają komórki glejowe. Do komórek glejowych, w ośrodkowym układzie nerwowym, zaliczamy astrocyty, oligodendrocyty oraz mikroglej (Devinsky i wsp. 2013). Glej, w zależności od fenotypu, może mieć zarówno właściwości neuroprotektoryjne jak i neurotoksyczne. Aktywna forma gleju zapobiega uszkodzeniom mózgu poprzez regulację stanu zapalnego, indukowanie plastyczności synaptycznej oraz przebudowę tkanek. Z kolei nieregulowana, reaktywna forma gleju uczestniczy w procesach wywołujących stan zapalny, może prowadzić do uszkodzenia tkanek i indukować neurodegenerację (Patel i wsp. 2019). W większości urazów i chorób mózgu, w których występują napady drgawkowe, obserwuje się obecność reaktywnej formy astrocytów, która charakteryzuje się zmianami morfologicznymi i biochemicznymi (Wetherington, Serrano i Dingledine 2008).

Astrocyty odpowiadają za regulację odpowiedzi na pojawienie się stanu zapalnego w mózgu oraz regulują odpowiedź odpornościową, wydzielając cytokiny i chemokiny w zdrowym mózgu (Aronica i wsp. 2012). W padaczce zidentyfikowano liczne zmiany strukturalne i metaboliczne astrocytów (Wetherington i wsp. 2008). W modelu padaczki skroniowej zaobserwowano zaburzoną morfologię astrocytów, między innymi zmniejszenie objętości ich rozgałęzienia (Plata i wsp. 2018). Astrocyty mogą również regulować szybkość śmierci neuronów (Ding i wsp. 2007). W modelu padaczki skroniowej zaobserwowano zaburzoną morfologię astrocytów, między innymi zmniejszenie objętości ich rozgałęzienia (Plata i wsp. 2018). Zmiany strukturalne gleju mogą skutkować rozwojem nadpobudliwości sieciowej, a w efekcie mogą prowadzić do pojawienia się napadów drgawkowych (Loewen i wsp. 2016, Plata i wsp. 2018). W genetycznym modelu przewlekłej astroglejozy u myszy, w którym astroglejoza występuje bez naruszenia bariery krew mózg oraz stanu zapalnego, zaobserwowano występowanie spontanicznych drgawek. Wynik ten wskazuje na udział gleju w rozwoju nadpobudliwości sieciowej, a w efekcie w rozwoju spontanicznych napadów drgawkowych (Robel i wsp. 2015).

Mikroglej uczestniczy w rozwoju mózgu, utrzymaniu prawidłowej homeostazy, odpowiedzi odpornościowej oraz reakcjach zapalnych (Devinsky i wsp. 2013, Zhao i wsp. 2018). Jego aktywacja obejmująca zwiększenie liczby i rozmiaru komórek może prowadzić do powstania zaburzeń neurologicznych, w tym rozwoju padaczki (Zhang i wsp. 2018). Doświadczenia przeprowadzone na mysim modelu padaczki indukowanej kwasem kainowym oraz modelu padaczki indukowanej pilokarpiną wykazały aktywację mikrogleju (Benson, Manzanero i Borges 2015). W modelu padaczki indukowanej pilokarpiną wykazano, że aktywacja mikrogleju indukuje reaktywną formę astrocytów (Sano i wsp. 2021). Uwolnienie cytokin prozapalnych przez aktywną formę mikrogleju powoduje wzrost pobudzenia neuronów i zwiększenie neurodegeneracji (Benson i wsp. 2015). Wraz z reaktywną formą astrocytów prowadzi do rozwoju padaczki (Hiragi, Ikegaya i Koyama 2018).

U pacjentów z lekooporną padaczką skroniową zaobserwowano nieprawidłową angiogenezę w mózgu oraz wzrost przepuszczalności dla immunoglobulin G (Loscher i Friedman 2020, Rusina, Bernard i Williamson 2021). Badania mikroskopowe wykazały pogrubienie błony podstawnej i skupienie perycytów, które stanowią grupę niezróżnicowanych komórek macierzystych ściśle przylegających do naczyń, oraz mikrogleju które prawdopodobnie przyczyniają się do dysfunkcji bariery krew mózg (Loscher i Friedman 2020). Bariera krew mózg stanowi złożony system oddzielający tkankę nerwową od układu krążenia, bierze udział w utrzymaniu prawidłowej homeostazy mózgu oraz jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania neuronów (Abbott i wsp. 2010). Zaburzenia budowy i funkcji bariery krew-mózg zostały zidentyfikowane w wielu chorobach neurologicznych, również u osób z padaczką skroniową jak i w licznych, zwierzęcych modelach padaczki (Michalak i wsp. 2013, Ndode-Ekane i wsp. 2010). W badaniach tkanki pochodzącej od pacjentów z padaczką skroniową zaobserwowano zwiększoną gęstość naczyń krwionośnych, pozytywnie skorelowaną z częstością występowania napadów drgawkowych (Rigau i wsp. 2007). Doświadczenia przeprowadzone z użyciem modeli zwierzęcych wykazały zaburzenia w integralności bariery krew mózg, w krótkim czasie po wywołaniu u zwierząt stanu padaczkowego (Leroy i wsp. 2003, Ndode-Ekane i wsp. 2010). W modelu padaczki wywołanej iniekcją kwasu kainowego do ciała migdałowatego myszy wykazano wzrost zawartości immunoglobulin G i albuminy w neuronach, w obszarze CA3 oraz zakrętu zębatego hipokampa (Michalak i wsp. 2013). Sugeruje się, że albumina indukuje aktywność padaczkową w mózgu (Ivens i wsp. 2007).

Reakcja zapalna i odpowiedź odpornościowa biorą udział w patogenezie wielu chorób mózgu, między innymi w padaczkę skroniowej w której interakcje neuronów z glem odgrywają ważną rolę (Bernardino i wsp. 2005). Powstanie stanu zapalnego w mózgu prowadzi do zmian w

jego mięszu, przepuszczalności bariery krew mózg, nadpobudliwości neuronów oraz uszkodzenia komórek. Zmiany te mogą skutkować obniżeniem progu drgawkowego, zapoczątkowaniem procesu epileptogenezy i w efekcie początek padaczki (Vezzani, Balosso i Ravizza 2008). Po wystąpieniu napadu drgawkowego zaobserwowano zmiany w ekspresji mRNA oraz białek niektórych cytokin w mózgu szczura (Plata-Salaman i wsp. 2000, Vezzani i wsp. 2002). Zmiany patologiczne obserwowane w padaczce takie jak neurodegeneracja, glejoza, wzrost neurogenezy oraz zmiany plastyczności włókien kiciastych mogą być efektem działania cytokin prozapalnych (Jankowsky i Patterson 2001, Ravizza i wsp. 2008).

3.2 Eksperymentalne modele drgawek i padaczki

Eksperymentalne zwierzęce modele padaczki odgrywają kluczową rolę w badaniu patofizjologicznych procesów rozwoju i mechanizmów działania padaczki. Są one znaczące dla rozwoju nowych metod leczenia i odkrycia nowych leków przeciwdrgawkowych (Rogawski 2006, Loscher 2017). Istnieje wiele zwierzęcych modeli padaczki, lecz tylko kilka z nich jest powszechnie wykorzystywanych do prowadzenia badań nad padaczką, epileptogenezą i napadami drgawkowymi (Loscher 2011).

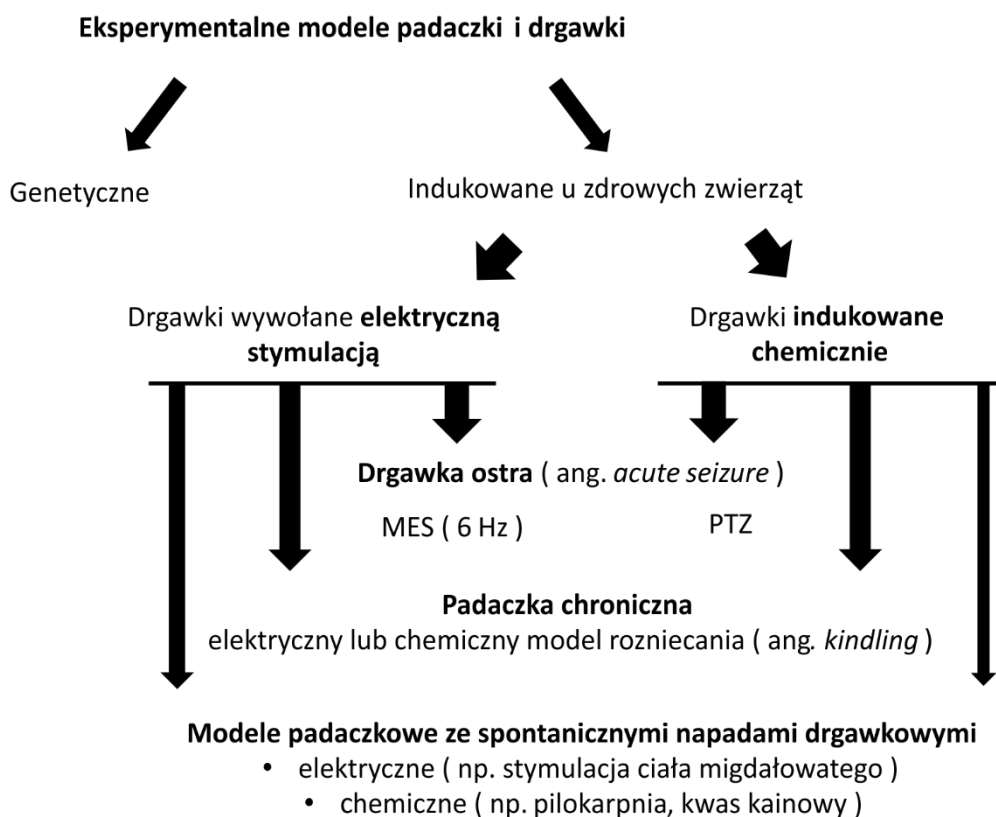
Modele ostrego napadu drgawkowego, inaczej zwanych modelami drgawki ostrej, indukowane są pojedynczym bodźcem bezpośrednio wywołującym napad drgawkowy. Bodziec ten może być chemiczny, z zastosowaniem np. pentylenetetrazolu, bądź elektryczny np. stymulacja prądem o częstotliwości 6Hz (Loscher 2017). Bodziec prowadzi do wywołania pojedynczego napadu drgawkowego, lecz nie powoduje występowania spontanicznych, powtarzających się napadów drgawkowych (Van Erum, Van Dam i De Deyn 2019, Zhang i Wong 2012). Modele te są stosowane zazwyczaj u zdrowych zwierząt bez problemów neurologicznych oraz służą między innymi do badania leków przeciwdrgawkowych (Loscher 2017) (**Rycina. 3.2.1**).

W badaniach nad padaczką stosuje się modele genetyczne, modele chroniczne oraz modele przewlekłe padaczki. W modelu genetycznym padaczka jest efektem występowania mutacji. Do modeli chronicznych zalicza się modele rozniecania, w których stosuje się powtarzalny bodziec podprogowy w celu wywołania drgawek oraz stopniowego nasilenia ich intensywności. Z kolei modele przewlekłe charakteryzują się stosowaniem pojedynczego bodźca, chemicznego lub elektrycznego prowadzącego do indukcji stanu padaczkowego lub bodźca fizycznego wywołującego traumatyczne uszkodzenie mózgu. Po okresie utajenia, zwanym procesem epileptogenezy pojawiają się spontaniczne, powtarzające się napady drgawkowe oraz zmiany strukturalne w mózgu podobne do tych obserwowanych w padaczce u ludzi (Loscher 2017, Van Erum i wsp. 2019).

Genetyczne modele padaczki pozwalają na zbadanie wpływu mutacji w procesie epileptogenezy a także służą do badania działania nowych leków przeciwpadaczkowych (Loscher 2017). Do modeli genetycznych należy np. model GAERS (ang. *Genetic Absence Epilepsy Rat from Strasbourg*), w którym spontaniczne napady drgawkowe pojawiają się u szczurów około 40 dnia po urodzeniu i utrzymują się przez całe życie (Touret i wsp. 2007).

W modelach odwzorowujących padaczkę nabytą stosuje się podanie środków farmakologicznych takich jak pilokarpina czy kwas kainowy w celu wywołania stanu padaczkowego uszkadzającego mózg i w efekcie prowadzącego do rozwoju padaczki (Loscher 2002, Nissinen i wsp. 2000, Lopes i wsp. 2016, Rusina i wsp. 2021, West i wsp. 2022) (**Rycina. 3.2.1**).

Wśród modeli padaczki wywołanych stymulacją elektryczną wyróżniamy model rozniecania oraz modele, w których spontaniczne napady padaczkowe powstają wskutek wywołania stanu padaczkowego (Loscher 2002, Loscher 2017). W obu przypadkach, zarówno chemicznej jak i elektrycznej stymulacji, drgawki mogą być obserwowane na poziomie behawioralnym jak i poprzez odczyt elektroencefalograficzny (EEG) (Akyuz i wsp. 2020, Drion i wsp. 2022) (**Rycina. 3.2.1**).



Rycina 3.2.1 Eksperymentalne modele padaczki i napadów drgawkowych. Wśród modeli drgawki wyróżniamy: MES (ang. *maximal electroshock seizure*) i Test PTZ (ang. *pentylenetetrazol*,

PTZ), które indukowane są pojedynczym bodźcem wywołującym napad drgawkowy. Z kolei modele padaczki możemy podzielić na modele genetyczne i indukowane chemicznie bądź elektrycznie. Są to modele chroniczne oraz modele przewlekłe padaczki, w których obserwuje się występowanie spontanicznych napadów drgawkowych (Loscher 2011, Loscher 2017).

Idealny zwierzęcy model padaczki powinien charakteryzować się występowaniem spontanicznych napadów drgawkowych, typami drgawek obserwowanych u ludzi, odczytem EEG oraz symptomami choroby odzwierciedlającymi zmiany na poziomie komórkowym i molekularnym oraz zaburzeniami aktywności neuronalnej obserwowanych w przypadku ludzkiej padaczki. Również wpływ leków przeciwpadaczkowych powinien być zbliżony do efektu obserwowanego u ludzi. Niestety żaden z dostępnych dotychczas modeli nie spełnia wszystkich wymienionych wymagań oraz nie odzwierciedla w pełni ludzkiej padaczki (Loscher i Schmidt 1988, Grone i Baraban 2015). Należy więc pamiętać, że wybór odpowiedniego modelu eksperymentalnego musi być dostosowany do założonych celów badawczych (Loscher 2011).

3.2.1 Model padaczki skroniowej wywołanej stanem padaczkowym indukowanym drażnieniem ciała migdałowatego

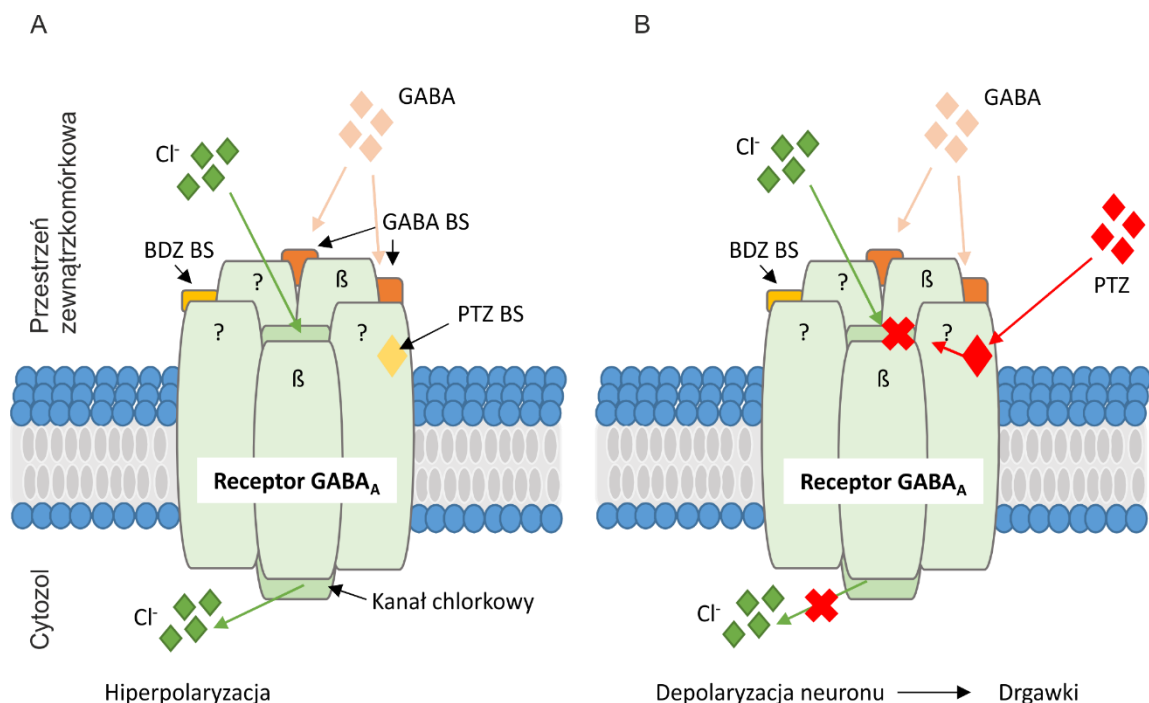
Ciało migdałowate jest strukturą należącą do płata skroniowego. W ludzkiej padaczce skroniowej obserwuje się jednostronne lub obustronne uszkodzenia tego regionu zarówno u dzieci jak i u osób dorosłych. Podobnie jest także po wystąpieniu stanu padaczkowego w padaczce eksperymentalnej (Pitkanen i wsp. 1998, Pitkanen i wsp. 2002).

Model padaczki skroniowej indukowanej elektryczną stymulacją ciała migdałowatego jest modelem padaczki przewlekłej, w którym stosuje się pojedynczy bodziec prowadzący do wywołania stanu padaczkowego u zdrowych zwierząt. Wywołany stan padaczkowy zapoczątkowuje serię zmian w mózgu prowadzących do rozwoju padaczki (Nissinen i wsp. 2000, Guzik-Kornacka i wsp. 2011). Oznaką rozwoju padaczki u zwierząt jest pojawienie się spontanicznych napadów drgawkowych, po okresie utajenia zwanym epileptogenezą. Zaletą modelu jest występowanie okresu latencji oraz obecność drgawek (Nissinen i wsp. 2000).

3.2.2 Model napadów ostrych wywołanych podaniem PTZ

W modelu napadów ostrych wywołanych podaniem pentylenetetrazolu (PTZ), jedna dawka PTZ prowadzi do wywołania zgeneralizowanej drgawki toniczno-klonicznej. Typową cechą tego modelu jest wywołanie jednego napadu drgawkowego, po którym nie następują spontaniczne i nawracające napady drgawkowe (Kovalenko i wsp. 2021).

Pentylenetetrazol jest bicykliczną pochodną tetrazolu oraz powszechnie stosowanym środkiem chemicznym wywołującym drgawki (Kalinowsky 1986). PTZ jako antagonistista receptora kwasu gamma-aminomasłowego, hamuje działanie synaps hamujących zamykając kanał chlorkowy i w ten sposób prowadzi do drgawek (Bazyan i wsp. 2001, Viswanatha i wsp. 2020, Taspinar i wsp. 2021) (**Rycina 3.2.2.1**). Dzięki wysokiej biodostępności łatwo przenika przez błony biologiczne, a jego szybka dystrybucja powoduje równomierne rozmieszczenie w mózgu (Samokhina i Samokhin 2018). PTZ jest powszechnie stosowany w badaniach pobudliwości mózgu ze względu na jego zdolność wywołania drgawek behawioralnych. Mniejsze dawki PTZ, u szczurów do 40 mg/kg m.c., u myszy do 20 mg/kg m.c., wywołują jedynie charakterystyczną aktywność neuronalną odczytywaną za pomocą EEG, natomiast wyższe dawki powodują drgawki behawioralne (Klioueva i wsp. 2001, Van Erum i wsp. 2019).



Rycina. 3.2.2.1 Mechanizm wywołania drgawki z zastosowaniem PTZ. Schemat receptora GABA_A, składającego się z 5 podjednostek (dwóch α, dwóch β oraz podjednostki γ), zlokalizowanego na błonie komórkowej neuronu. Po lewej stronie zaprezentowano stan fizjologiczny w którym dochodzi do przyłączenia cząsteczek GABA do ich receptora (oznaczonego GABA BS, ang. *GABA binding site*). Przyłączenie cząsteczek otwiera kanał chlorkowy umożliwiając przedostanie się cząsteczek chloru (Cl⁻) do cytozolu neuronu. Prowadzi to do hiperpolaryzacji komórki, a następnie do osiągnięcia stanu spoczynkowego (A). Po prawej stronie zaprezentowano wpływ PTZ na funkcjonowanie receptora GABA_A. Cząsteczki PTZ przyłączają się do receptora i blokują przepuszczalność kanału chlorkowego. Prowadzi to do depolaryzacji neuronu, a w konsekwencji neurony podlegają ciągłej stymulacji, co prowadzi do rozwoju drgawek oraz padaczki (B). Leki blokujące lub łagodzące działanie PTZ blokują wiązanie cząsteczek PTZ do receptora lub przyłączają się w miejscu wiązania benzodiazepiny (oznaczono: BDZ BS, ang. *benzodiazepine binding site*) (Viswanatha i wsp. 2020).

3.2.3 Model rozniecania

Model rozniecania (ang. *kindling*) jest zwierzęcym modelem epileptogenezy i przewlekłej padaczki, który jest powszechnie stosowanym do poszukiwania nowych leków przeciwpadaczkowych (Samokhina i Samokhin 2018). W modelu tym stosuje się wielokrotnie bodziec podprogowy chemiczny lub elektryczny. W efekcie prowadzi to z czasem do wywoływania u zwierząt drgawek toniczno-klonicznych po podaniu początkowo subkonwulsyjnego bodźca (Singh, Mishra i Goel 2021).

Wyróżniamy dwa protokoły rozniecania: krótki (15 dni), w którym bodźce są dostarczane w krótkich odstępach czasu (codziennie) oraz długi (około 38 dni), w którym bodziec jest dostarczany co drugi dzień (Samokhina i Samokhin 2018).

W tym modelu stosuje się zazwyczaj podprogowe dawki PTZ z zakresu 20 do 50 mg/kg (Samokhina i Samokhin 2018). Wysoki poziom PTZ utrzymuje się w mózgu przez pierwsze 2 godziny, natomiast zanika po 6 godzinach od momentu iniekcji (Sierraparedes i wsp. 1989).

3.2.4 Model wyładowań epileptopodobnych *in vitro*

Model spontanicznych, nawracających wyładowań epileptopodobnych jest modelem odwzorowującym drgawki w hodowli komórkowej (Cao i wsp. 2003, Jiang i wsp. 2010). Wykorzystuje się trzygodzinną inkubację hodowli dysocjowanych neuronów korowych w buforze pozbawionym magnezu ($-Mg^{2+}$), co indukuje chroniczną epileptopodobną aktywność elektrofizjologiczną neuronów (Cao i wsp. 2003, Jiang i wsp. 2010). Aktywność epileptopodobna w tym modelu została scharakteryzowana jako aktywność od 3 do 15 Hz i czasie trwania od 10s do 2 minut (Sombati i DeLorenzo 1995, DeLorenzo, Sombati i Coulter 2000).

Zaletą modelu wyładowań epileptopodobnych *in vitro* jest między innymi możliwość zastosowania interwencji i badania ich skutków na poziomie komórkowym i molekularnym (Deshpande i wsp. 2007, Nagarkatti i wsp. 2010). Model ten jest również rutynowo stosowany do badania biochemicznych mechanizmów leżących u podstaw padaczki nabytej (Deshpande i wsp. 2008). Ze względu na możliwość ścisłego kontrolowania środowiska zewnętrznego i utrzymywania się aktywności elektrofizjologicznej neuronów przez całą ich długość życia w hodowli, możliwe jest zbadanie zmian w neuronach, zachodzących w sytuacji zwiększonej aktywności elektrofizjologicznej (DeLorenzo i wsp. 2000, Deshpande i wsp. 2008).

3.3 Modyfikacje epigenetyczne w regulacji ekspresji genów

Epigenetyka zajmuje się badaniem zmian ekspresji genów wynikających z modyfikacji struktury chromatyny, bez zmian sekwencji DNA (Hauser, Henshall i Lubin 2018). Modyfikacje te są wynikiem interakcji genom – środowisko/czynniki zewnętrzne, oraz mogą być przekazywane podczas podziału komórkowego (Kobow i Blumcke 2011). Do mechanizmów epigenetycznych zaliczamy: metylację DNA, przebudowę chromatyny, modyfikacje białek histonowych, działanie niekodujących RNA oraz potranslacyjne modyfikacje histonów. Wśród potranslacyjnych modyfikacji białek histonowych wyróżniamy: metylację, acetylację, fosforylację, ubikwitynację, biotynylację, ADP-rybozylację oraz sumoilację (Kobow i Blumcke 2012, Berson i wsp. 2018, Boison i Rho 2020). Modyfikacje epigenetyczne odpowiadają za powstawanie licznych fenotypów, które stanowią wypadkową wszystkich modyfikacji, ich wzajemnego oddziaływania (Portela i Esteller 2010).

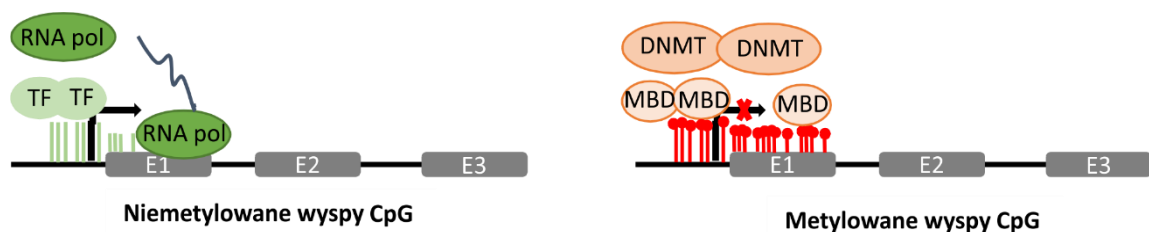
Modyfikacje epigenetyczne stanowią mechanizm regulacji ekspresji genów prowadząc do aktywacji lub wyciszenia ekspresji poszczególnych genów w odpowiednim miejscu oraz czasie (Wang i wsp. 2016, Hauser i wsp. 2018). Mechanizmy te są istotne dla przebiegu procesów fizjologicznych, a ich zaburzenia mogą prowadzić do rozwoju wielu chorób, w tym nowotworów i padaczki (Kinnaird i wsp. 2016, Boison i Rho 2020). Kontrola epigenetyczna regulacji ekspresji genów jest procesem dynamicznym i niezbędnym do utrzymania prawidłowych funkcji neuronalnych (Hauser i wsp. 2018). W ośrodkowym układzie nerwowym odgrywa bardzo ważną rolę w rozwoju mózgu, koordynuje samoodnowę i utrzymanie nerwowych komórek macierzystych podczas rozwoju kory mózgowej (MuhChyi i wsp. 2013). Bierze też udział w procesie neurogenezy, proliferacji, gliogenezy, kieruje migracją komórek, a także pośredniczy w plastyczności sieci neuronalnych (Wang i wsp. 2016).

3.3.1 Metylacja DNA

Metylacja DNA jest jak dotąd najlepiej poznanym mechanizmem epigenetycznym występującym u wyższych eukariontów, w tym również u ludzi (Smith i Meissner 2013, Hauser i wsp. 2018). Metylacja DNA polega na przeniesieniu grupy metylowej z S-adenozylometioniny na węgiel znajdujący się w pozycji 5' w strukturze cytozyny. Pomiędzy grupą metylową, a cytozyną zostaje utworzone wiązanie kowalencyjne. W rezultacie dochodzi do powstania 5-metylocytozyny, która może ulegać dalszej modyfikacji do 5-hydroksymetylocytozyny (Moore, Le i Fan 2013, Miller-Delaney i wsp. 2015, Hauser i wsp. 2018).

Proces metylacji DNA jest katalizowany przez metylotransferazy DNA (ang. *DNA methyltransferases*, DNMTs) (Wang i wsp. 2016). Metylotransferazy odpowiadają za przeniesienie grupy metylowej z S-adenozylometioniny na DNA (Portela i Esteller 2010). Do grupy metylotransferaz DNA zaliczamy: DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B oraz DNMT3L, jednakże tylko DNMT1, 3A i 3B są aktywne (Portela i Esteller 2010, Ginno i wsp. 2020). DNMT1 wykazuje silne powinowactwo do hemi-metylowanego DNA. Enzym ten katalizuje reakcję metylacji w trakcie mitozy, podczas której dochodzi do semikonserwatywnej replikacji DNA i jest odpowiedzialny za przekazywanie tzw. śladu pamięciowego – profilu metylacji komórkom potomnym. Z kolei DNMT3A oraz DNMT3B wykazują powinowactwo do niemetylowanego DNA, inicjując metylację podczas gametogenezy i embriogenezy (Kobow i Blumcke 2012). DNMT3L ulega ekspresji podczas gametogenezy, w momencie piętnowania genomowego. Stanowi czynnik stymulujący dla DNMT3A i DNMT3B, oddziałuje i współwystępuje z nimi w jądrze, pomimo iż jest katalitycznie nieaktywna (Portela i Esteller 2010).

U ssaków proces metylacji występuje w szczególności w regionach bogatych w dinukleotydy CG, określanymi mianem wysp CpG (Kobow i Blumcke 2012). Wyspy CpG stanowią odcinki sekwencji DNA, obejmujące około 1000 par zasad o wysokiej zawartości guaniny (G) i cytozyny (C) (G+C, około 50% sekwencji) (Portela i Esteller 2010, Moore i wsp. 2013). Regiony te znajdują się w około 60% promotorów genów (Portela i Esteller 2010). Wyspy CpG stanowią regiony silnie konserwowane oraz odgrywają istotną funkcję w ekspresji genów poprzez regulację struktury chromatyny i wiązanie czynników transkrypcyjnych (Moore i wsp. 2013). Ich metylacja powoduje stabilne wyciszenie ekspresji genów (Mohn i wsp. 2008) (**Rycina 3.3.1.1**).



Rycina 3.3.1.1 Metylacja DNA w regionie wysp CpG. Po lewej stronie zaprezentowano sytuację, w której wyspy CpG w promotorach genów są niemetylowane, co umożliwia przeprowadzenie transkrypcji przez polimerazę RNA. Po prawej stronie zaprezentowano metylowane wyspy CpG. Hipermetylacja prowadzi do inaktywacji procesu transkrypcji. Oznaczono: RNA pol – polimeraza RNA, TF – czynniki transkrypcyjne, DNMT – metylotransferazy DNA, MBD – białka z rodziny MBD zawierające domenę wiążącą metylo-CpG.

Metylacja DNA nie zachodzi jednak wyłącznie w obrębie wysp CpG. Metylacja w pobliżu wysp CpG, które stanowią regiony w sekwencji DNA o niższej gęstości CpG, bierze udział w procesie inaktywacji transkrypcji. Metylacja DNA zachodzi również w obrębie ciał genów, może warunkować wydajność elongacji oraz zapobiegać niewłaściwej inicjacji transkrypcji (Portela i Esteller 2010, Moore i wsp. 2013). Ponadto metylacja zachodzi w regionach sekwencji powtarzalnych DNA, których rola to ochrona integralności chromosomów (Doi i wsp. 2009, Portela i Esteller 2010).

Metylacja jest procesem odwracalnym. W procesie demetylacji biorą udział białka z rodziny TET (ang. *ten-eleven translocation*). W skład tej rodziny wchodzi białka: Tet1, Tet2 i Tet3 (Ito i wsp. 2010, Yildirim i wsp. 2011). Białka te są dioksygenazami, a w swojej strukturze zawierają również centrum katalityczne z atomem żelaza (Fe^{2+}) (Tahiliani i wsp. 2009). Katalizują one modyfikacje 5-metylocytozyny do 5-hydroksymetylocytozyny, na drodze hydroksylacji, który stanowi jeden z etapów demetylacji DNA (Ito i wsp. 2010).

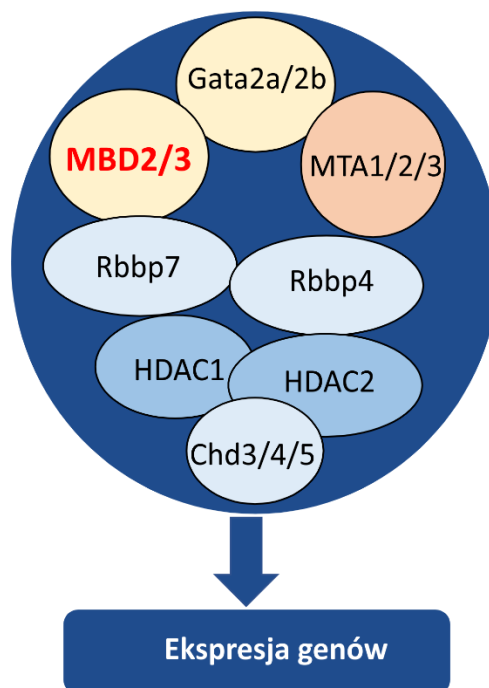
Główne funkcje metylacji DNA to inaktywacja chromosomu X u samic ssaków, piętnowanie genomowe tzw. imprinting genomowy oraz wyciszanie genów (Berson i wsp. 2018). Metylacja DNA odgrywa istotną rolę nie tylko w regulacji ekspresji genów u osobników zdrowych. Jej zaburzenia obserwowane są w licznych jednostkach chorobowych, między innymi w padaczce (Miller-Delaney i wsp. 2015, Wang i wsp. 2016).

3.3.2 Kompleks NuRD

Kompleks NuRD (ang. *nucleosome remodeling and deacetylase complex*) jest odpowiedzialny za regulację struktury chromatyny poprzez zmianę lokalizacji lub właściwości nukleosomu, który stanowi podstawowy element chromatyny (Shimbo i wsp. 2013). Kompleks NuRD jest jednym z czterech głównych ATP-zależnych kompleksów biorących udział w przebudowie chromatyny. Jego główną rolą jest przebudowa i deacetylacja histonów. Kompleks ten zaangażowany jest w podstawowe funkcje komórkowe, które mają miejsce podczas rozwoju, takie jak progresja cyklu komórkowego oraz stabilność genomu (Nitarska i wsp. 2016, Lai i Wade 2011).

Kompleks NuRD zawiera podjednostki o aktywności enzymatycznej, w tym: deacetylazę histonową (HDAC1/2, ang. *histone deacetylase*), która katalizuje deacetylację białek, oraz białko wiążące helikazy chromodomenowe (CHD3/4/5, ang. *chromodomain helicase DNA-binding protein*), które posiada zdolność przebudowy chromatyny zależną od ATP (Lai i Wade 2011). Pozostałe podjednostki kompleksu nie mają aktywności enzymatycznej. Zaliczamy do nich:

białko stabilizujące kompleks NuRD (MTA1/2/3, ang. *metastasis-associated protein*), białko wiążące histony (RBBP7/4, ang. *retinoblastoma-binding protein*), białko MBD (MBD2/3, ang. *methyl CpG binding domain*), które jest niezbędne dla aktywności kompleksu. W skład kompleksu wchodzi również czynniki transkrypcyjne GATA (GATA2A/2B, ang. *globin transcriptional factor*), które są kluczowe dla prawidłowego funkcjonowania kompleksu podczas procesu epigenetycznej regulacji ekspresji genów (Bednarczyk i wsp. 2016, Cai i wsp. 2014) (**Rycina 3.2.3.1**). Białka pozbawione właściwości enzymatycznych stanowią strukturalne komponenty kompleksu oraz bezpośrednio oddziałują na ogon histonowy (Lai i Wade 2011).



Rycina 3.2.2.1 Struktura kompleksu NuRD (ang. *nucleosome remodeling and deacetylase complex*). Kompleks zawiera: czynniki transkrypcyjne GATA (GATA2A/2B), białko MBD (Mbd2/3), białko stabilizujące kompleks NuRD (MTA1/2/3), białko wiążące histony (RBBP7/4), deacetylazę histonową (HDAC1/2) oraz helikazy chromodomenowe (CHD3/4/5).

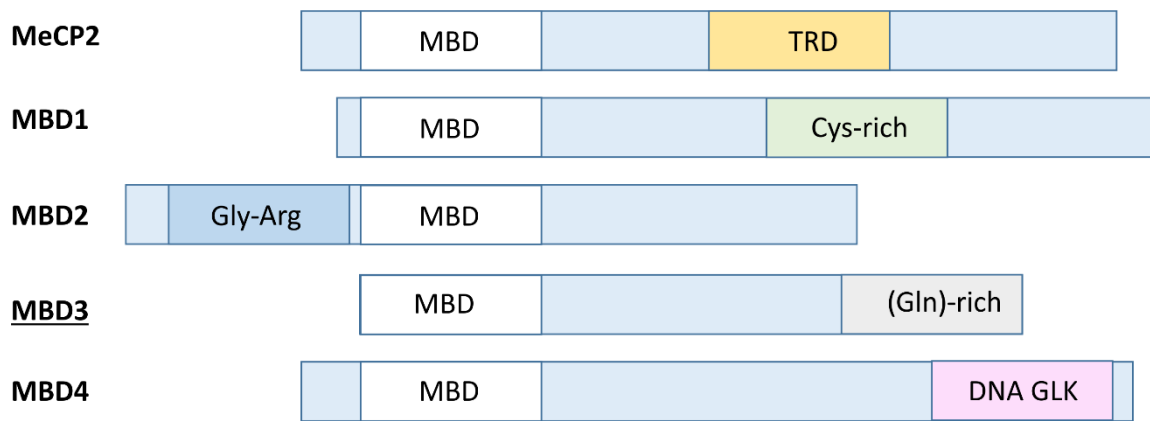
Białko Mbd2 oraz Mbd3 wchodzi w skład kompleksu NuRD i decydują o miejscu przyłączenia się kompleksu w sekwencji DNA (Yildirim i wsp. 2011). Białko Mbd2 umożliwia przyłączenie do miejsc metylowanych (Saito i Ishikawa 2002). Natomiast MBD3 umożliwia wiązanie do hydroksymetylowanych regionów DNA (Yildirim i wsp. 2011). Z kolei badania prowadzone na płazach *Xenopus* pokazały, że kompleks NuRD zawierający podjednostkę Mbd3 wykazuje specyficzną aktywność wiązania domeny mCpG (Saito i Ishikawa 2002, Cai i wsp. 2014).

3.3.3 Białko MBD3

Białko MBD3 (ang. *methyl CpG binding domain 3*) należy do rodziny białek MBD (ang. *methyl CpG binding domain*), stanowiących grupę białek odpowiedzialnych za odczytywanie wzoru metylacji DNA i wiążących się z domeną metylo-CpG oraz biorących udział w tworzeniu heterochromatyny (Dai i wsp. 2020). Do tej pory, u ssaków, zidentyfikowano 5 białek należących do rodziny MBD (Ghoshal i wsp. 2006). Są to: MeCP2 (ang. *methyl-CpG-binding protein 2*), MBD1, MBD2, MBD3 oraz MBD4 (Jung i wsp. 2002, Francis i wsp. 2002). Białka z tej rodziny wiążą się z 5-metylocytozyną poprzez ich konserwatywną domenę metylo-CpG oraz mogą pośredniczyć w wyciszaniu transkrypcji metylowanych promotorów poprzez przyłączanie kompleksu wyciszającego (**Rycina 3.3.3.1**) (Ghoshal i wsp. 2006). Domena MBD w białku Mbd3 może oddziaływać poprzez interakcje białko – białko oraz przyłączać onkoproteiny (Lai i Wade 2011).

Funkcja białka MBD1 nie została jeszcze dokładnie poznana. Wiadomo jednak, że białka MBD1-2 oraz MeCP2 mają aktywność hamowania ekspresji genów. Białka te wiążą się z metylowanymi wyspami CpG za pomocą domeny MBD i rekrutują deacetylazę histonową (HDAC) do miejsca TRD, domeny represji transkrypcyjnej. Deacetylacja histonów rdzeniowych H3 i H4 poprzez przyłączenie HDAC jest częściowo odpowiedzialna za represję genów, w której pośredniczą wymienione białka MBD (Saito i Ishikawa 2002). Natomiast białko MBD4 wyróżnia się z grupy pozostałych białek ze względu na konserwowaną, C-końcową domenę wykazującą aktywność glikozylazy (Hendrich i wsp. 1999, Jung i wsp. 2002). Dzięki niej odpowiada za rozpoznanie niedopasowania pary zasad tymina – guanina (T/G) oraz pełni funkcję naprawczą (Saito i Ishikawa 2002).

Białko MBD3 nie ma zdolności do selektywnego rozpoznawania wysp metylo-CpG, jednakże posiada zdolność wiązania do 5-hydroksymetylocytozyny i niemetylowanego DNA (Saito i Ishikawa 2002, Cramer i wsp. 2014). Hydroksymetylacja DNA to epigenetyczny proces regulacji ekspresji genów podczas którego dochodzi do dodania grupy hydroksymetylowej do pozycji C-5 cytozyny (Ishibashi i wsp. 2020). Funkcja białka MBD3 nie została do tej pory dokładnie poznana. Wiadomo jednak, że białka MBD2 i MBD3 są wysoce homologiczne i stanowią kluczowy element dla aktywności kompleksu NuRD (ang. *nucleosome remodeling and deacetylase complex*) (Saito i Ishikawa 2002, Leighton i Williams 2020).



Rycina 3.3.3.1 Budowa białek z rodziny MBD. Wszystkie białka posiadają domenę wiążącą metylované DNA (MBD). MeCP2 (ang. *methyl-CpG-binding protein 2*) zawiera domenę wiążącą represory (ang. *transcriptional repression domain*, TRD), MBD1 charakteryzuje się obecnością domeny ZnF Cys-x-x-Cys, MBD2 zawiera powtórzenia glicyny (Gly) lub argininy (Arg), MBD3 zawiera powtórzenia glutaminianu, natomiast białko MBD4 posiada domenę o aktywności glikozylazy DNA.

Doniesienia literaturowe wskazują, że białko MBD3 jest zaangażowane w rozwój padaczki (Menafrá i Stunnenberg 2014, Bednarczyk i wsp. 2016, Wang i wsp. 2021). MBD3 jest represorem transkrypcji i bierze udział w wyciszaniu ekspresji genów (Menafrá i Stunnenberg 2014). Zaobserwowano, że białko Mbd3 jest zlokalizowane w jądrach neuronów (Jung i wsp. 2003, Bednarczyk i wsp. 2016). Wykazano również jego obecność w oligodendrocytach oraz astrocytach zarówno w zdrowym mózgu jak i u zwierząt z eksperymentalną padaczką (Bednarczyk i wsp. 2016). W szczurzym modelu padaczki skroniowej wywołanej elektryczną stymulacją ciała migdałowatego zaobserwowano wzrost poziomu ekspresji białek kompleksu NuRD oraz białka Mbd3 (Stefaniuk i Lukasiuk 2010, Bednarczyk i wsp. 2016, Wang i wsp. 2021). Co ciekawe, myszy z obniżonym poziomem białka Mbd3 umierają na wczesnym etapie embriogenezy (Jung i wsp. 2003). Doświadczenia przeprowadzone na myszach z obniżonym za pomocą shRNA poziomem *Mbd3* wykazały zmniejszenie intensywności drgawek wywołanych podaniem litu i pilokarpiny (Wang i wsp. 2021).

3.3.4 Zaburzenia modyfikacji epigenetycznych w padaczce

Modyfikacje epigenetyczne odpowiadają za prawidłowe funkcjonowanie mózgu. Zmiany wynikające z zaburzeń modyfikacji epigenetycznych, mają szczególne znaczenie dla rozwoju mózgu i prowadzą do powstania licznych zaburzeń neurologicznych, w tym zaburzeń ze spektrum autyzmu, zaburzeń psychicznych, niepełnosprawności intelektualnej oraz padaczki (Portela i Esteller 2010, Berson i wsp. 2018).

Nieprawidłowa modyfikacja epigenetyczna chromatyny występuje w wielu chorobach neurologicznych (Kobow i Blumcke 2011). W padaczce nieprawidłowa modyfikacja epigenetyczna może dotyczyć między innymi zmian w obrębie ogonów histonów H3 i H4 (Sng, Taniura i Yoneda 2006), zwiększonej fosforylacji wariantu histonu H2A.X (Crowe i wsp. 2011), zmienionej ekspresji genów oraz wzorów metylacji DNA (Kobow i Blumcke 2012, Miller-Delaney i wsp. 2015, Debski i wsp. 2016).

W padaczce skroniowej zidentyfikowano liczne zaburzenia metylacji DNA (Hauser i wsp. 2018). Badania przeprowadzone na tkance pozyskanej od pacjentów z padaczką skroniową wykazały zwiększony poziom metylotransferaz DNA: DNMT1 i DNMT3a, w porównaniu do poziomu metylotransferaz DNA u osób zdrowych. Obie metylotransferazy wykryto w jądrze oraz cytoplazmie neuronów, a uzyskane dane wskazują, że mogą one uczestniczyć w patogenezie padaczki (Zhu i wsp. 2012).

U ludzi cierpiących na padaczkę zaobserwowano zmniejszony poziom 5-metylocytozyny oraz 5-hydroksymetylocytozyny w hipokampie oraz zwiększony poziom 5-metylocytozyny w korze nowej (ang. *neocortex*) (de Nijs i wsp. 2019). W padaczce zaobserwowano również zmiany w poziomie białek katalizujących reakcję demetylacji. W modelach doświadczalnych *in vitro* zaobserwowano wzrost poziomu białka TET1 po depolaryzacji komórek chlorkiem potasu, a u zwierząt doświadczalnych po wystąpieniu drgawki (Kaas i wsp. 2013). Badania przeprowadzone na ludzkiej tkance wykazały, że poziom białka TET2 jest wyższy u pacjentów ze zidentyfikowanym stwardnieniem hipokampa oraz u pacjentów z padaczką u których stwardnienie hipokampa nie wystąpiło, w porównaniu do zdrowych pacjentów. Wysoki poziom białka TET2 zaobserwowano u pacjentów z padaczką lekooporną. Natomiast nie stwierdzono różnic w poziomie TET1 i 5-hydroksymetylocytozyny (Kong i wsp. 2022).

Profilowanie transkryptomu hipokampów pochodzących od pacjentów z padaczką skroniową po resekcji neurochirurgicznej wykryło 146 genów, wykazujących zmienioną metylację DNA. Prawie 82% promotorów tych genów wykazało podwyższony stopień metylacji (hipermetylacja) (Miller-Delaney i wsp. 2015). Z kolei badania przeprowadzone na modelu padaczki skroniowej wywołanej kwasem kainowym wykazały 321 genów wykazujących zmienioną metylację DNA, w których ponad 90% genów wykazało hipometylację (Miller-Delaney i wsp. 2012). Badania przeprowadzone z zastosowaniem trzech różnych zwierzęcych modeli padaczki: modelu elektrycznej stymulacji ciała migdałowatego, modelu padaczki wywołanej iniekcją pilokarpiny oraz modelu urazowego uszkodzenia mózgu wykazały zmiany wzorów

metylacji DNA u zwierząt z wywołaną padaczką, w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Zaobserwowano wzrost poziomu metylacji w ciałach genów oraz hipometylację w regionach niekodujących. Zmiany metylacji DNA były specyficzne dla poszczególnych modeli padaczki, co sugeruje, że zaburzenia metylacji DNA są zależne od etiologii (Debski i wsp. 2016).

Zespół Retta (ang. *Rett syndrome*) jest chorobą neurologiczną sprzężoną z chromosomem X (Sandweiss, Brandt i Zoghbi 2020). Przyczyną choroby są mutacje punktowe w białku MeCP2 należącym do rodziny MBD (Portela i Esteller 2010, Kelly, De Carvalho i Jones 2010). Zespół może zostać rozpoznany u dzieci płci żeńskiej już na wczesnym etapie rozwoju, około 6-18 miesiąca życia. Zauważalne jest wówczas zahamowanie rozwoju, zaburzenia poruszania się oraz motoryki przewodu pokarmowego, a także zaburzeń oddychania i snu (Hoffbuhr i wsp. 2001, Samaco i Neul 2011, Vidal i wsp. 2019). Częstym zjawiskiem obserwowanym w zespole Retta jest spontaniczna aktywność padaczkowa (Wither i wsp. 2018). Spontaniczne napady drgawkowe są obserwowane u około 60-80% pacjentek w zależności od posiadanego genotypu (Vignoli i wsp. 2017). Wyższa częstość spontanicznych napadów drgawkowych jest obserwowana u osób u których zespół Retta uwidocznili się już na wczesnym etapie życia oraz u osób z bardziej zaawansowanymi zaburzeniami zdrowotnymi związanymi z tą chorobą (Glaze i wsp. 2010). U 95 % osób z zespołem Retta występuje utrata funkcji białka MeCP2 (Neul i wsp. 2008). Doświadczenia przeprowadzone na myszach pozbawionych genu MeCP2, u których również zaobserwowano spontaniczne drgawki, wykazały zmniejszoną przeżywalność, zaburzenia motoryczne oraz zmniejszenie masy ciała (Matagne i wsp. 2017, Sinnott i wsp. 2021). Zidentyfikowano osiem powszechnych mutacji tego genu, stanowiących około 60% wszystkich mutacji (Vidal i wsp. 2019).

Jedną z mutacji wywołujących padaczkę jest mutacja w promotorze genu kodującego reelinę. Funkcją reeliny jest kontrola migracji neuronów warstw korowych w rozwoju zarodkowym. Białko to kontroluje również wzrost dendrytów i plastyczność synaptyczną w okresie poporodowym oraz w wieku dorosłym (Dazzo i Nobile 2022). Zaburzenia ekspresji reeliny (obniżony poziom mRNA reeliny), prowadzą do uszkodzenia struktury hipokampa (Haas i wsp. 2002, Heinrich i wsp. 2006). Wykazano wzrost poziomu metylacji promotora genu kodującego reelinę u pacjentów z padaczką w porównaniu do zdrowych pacjentów (Kobow i wsp. 2009). W mysim modelu padaczki wywołanej podaniem kwasu kainowego wykazano obniżony poziom ekspresji mRNA reeliny w neuronach wnętrza hipokampa. Utrata neuronów wykazujących ekspresję mRNA reeliny jest ściśle skorelowana z rozproszeniem komórek ziarnistych. Jest to zjawisko powszechnie obserwowane wśród pacjentów z padaczką skroniową (Orcinha i wsp. 2016).

Badania przeprowadzone na pacjentach z padaczką skroniową wykazały zwiększoną ekspresję genu SCN3A, kodującego kanał sodowy, który jest odpowiedzialny za regulację pobudzenia neuronów. Wykazano, że myszy promotor genu SCN3A jest regulowany poprzez metylację wysp CpG (Deng i wsp. 2011). U myszy z napadami drgawkowymi zaobserwowano, że z pośród wszystkich genów kodujących kanały sodowe tylko ekspresja Scn3a mRNA uległa podwyższeniu. Sekwencja kodująca gen Scn3a stanowi miejsce wiązania białka MBD2. U myszy pozbawionych białka MBD2 wykazano zmniejszenie aktywności promotora Scn3a. Uzyskane wyniki sugerują, że proces metylacji i białko MBD2 biorą udział w regulacji poziomu ekspresji SCN3A i mogą uczestniczyć w procesie rozwoju padaczki (Li i wsp. 2015).

Omówione zaburzenia wskazują, że padaczka i występowanie spontanicznych napadów drgawkowych mogą być rezultatem wielu zaburzeń mechanizmów epigenetycznych, między innymi zaburzeń metylacji DNA. Ich dokładnie poznanie pozwoli na wypracowanie lepszych mechanizmów diagnostycznych oraz udoskonalenie dotychczasowych i stworzenie nowych metod leczenia.

4. Cele i założenia pracy

W niniejszej rozprawie doktorskiej postawiono hipotezę, że białko Mbd3 uczestniczy w procesach prowadzących do zmniejszenia progu drgawkowego poprzez zmiany w regulacji ekspresji genów.

Szczegółowe cele zawarte w niniejszej rozprawie to:

- ✓ Zbadanie wpływu drgawek na poziom białka Mbd3 oraz ekspresję genu *Mbd3 in vivo*.
- ✓ Zbadanie wpływu obniżenia poziomu białka Mbd3 na próg drgawkowy *in vivo*.
- ✓ Zbadanie wpływu nadekspresji białka Mbd3 na próg drgawkowy *in vivo*.
- ✓ Zbadanie wpływu obniżenia poziomu białka Mbd3 na epileptogenezę w modelu rozniecania przy użyciu PTZ.
- ✓ Zbadanie wpływu nadekspresji białka Mbd3 na epileptogenezę w modelu rozniecania przy użyciu PTZ.
- ✓ Zbadanie wpływu nadekspresji Mbd3 na regulację genów w modelu wyładowań epileptopodobnych *in vitro*.

5. Materiały i metody

5.1 Materiały

5.1.1 Wykaz stosowanych przeciwciał

Wykaz przeciwciał pierwszo i drugorzędowych zastosowanych w niniejszej pracy zamieszczono w **Tabeli 1**.

Tabela 1. Wykaz przeciwciał pierwszo i drugorzędowych oraz barwników fluorescencyjnych.

Przeciwciało	Źródło	Zastosowanie
Przeciwciała pierwszorzędowe		
Anty-MBD3 Poliklonalne, wyprodukowane w króliku	Bethyl Laboratories #A302-528A	WB: 1:1000
Anty-MAP2 Poliklonalne, wyprodukowane w króliku	Sigma-Aldrich #AB5622	Barwienia skrawków mózgu IF: 1:1000
Anty-GFAP Monoklonalne, wyprodukowane w myszy	Millipore #MAB3402	Barwienia skrawków mózgu IF: 1:1000
Anty-NeuN Poliklonalne, wyprodukowane w kurczaku	Millipore #ABN91	Barwienia neuronów z hodowli pierwotnej IF: 1:1000
Anty-NeuN Monoklonalne, wyprodukowane w myszy	Millipore #MAB377	Barwienia skrawków mózgu IF: 1:1000
Przeciwciała drugorzędowe		
Anty-IgG królika Poliklonalne, sprzężone z peroksydazą chrzanową, wyprodukowane w kozie	Merck #AP132P	WB: 1:20000
Anty-IgG królika Poliklonalne, biotylowane, wyprodukowane w koniu	Vector Laboratories #BA-1100	Barwienia skrawków mózgu IF: 1:2000

Anty-IgG kurczaka Poliklonalne, sprzężone z barwnikiem fluorescencyjnym Alexa Fluor 647, wyprodukowane w kozie	Invitrogen #A-21449	Barwienia neuronów z hodowli pierwotnej IF: 1:1000
Anty-IgG kozy Poliklonalne, sprzężone z barwnikiem fluorescencyjnym fluoresceiną (FITC), wyprodukowane w króliku	Vector Laboratories #FI-5000	Barwienia neuronów z hodowli pierwotnej IF: 1:1000
Anty-IgG myszy Poliklonalne, sprzężone z barwnikiem fluorescencyjnym Texas Red®, wyprodukowane w koniu	Vector Laboratories #TI-2000	Barwienia skrawków mózgu IF: 1:2000
Anty-IgG kurczaka Poliklonalne, sprzężone z barwnikiem fluorescencyjnym Texas Red®, wyprodukowane w kozie	Invitrogen #PA1-28796	Barwienie skrawków mózgu IF: 1:2000
Pozostałe przeciwciała i barwniki fluorescencyjne		
Anty-β-aktyna Przeciwciało monoklonalne, sprzężone z peroksydazą chrzanową, wyprodukowane w myszy	Sigma-Aldrich #A3854	WB 1:20000
Texas Red™ z awidyną D	Vector Laboratories #A-2006-5	Barwienia skrawków mózgu IF: 1:100
Hoechst 33342	ThermoFisher #62249	Barwienia neuronów z hodowli pierwotnej oraz skrawków mózgu IF: 1:1000

WB – immunobloting (Western Blot), IF – immunofluorescencja

5.1.2 Wykaz stosowanych zestawów

Zestaw do chemiluminescencji: ECL Western Blotting Analysis System (#RPN2108, Amersham)

Zestaw do izolacji RNA: Rneasy Mini Kit (#74106, Qiagen)

Zestaw do reakcji odwrotnej transkrypcji: Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (#K1641, ThermoFisher)

Zestaw do reakcji PCR w czasie rzeczywistym: Fast SYBR green master mix (#4385612, Life Technologies)

5.1.3 Pochodzenie pozostałych materiałów i odczynników

A&A Biotechnology: stayRNA (odczynnik)

Amersham: membrana nitrocelulozowa

BD Poland: szalki w rozmiarze 60 mm x 15 mm

Bio-rad: 30 % Akryloamid/bisakryloamid (29:1), Protein Assay (odczynnik)

Chempur: diwodorofosforan sodu (NaH_2PO_4), etanol 96 % i 99,9 %, glicyna, kwas octowy, kwas solny (HCl), metanol, wodorofosforan disodu (Na_2PO_4)

Eppendorf: probówki BioPur Safe lock

Fermentas: Page Ruler Prestained Protein Ladder (standard wielkości białek do elektroforezy)

Googlab: pipety serologiczne o pojemności 5 ml, 10 ml i 25 ml

Life Technologies: woda wolna od nukleaz,

Roche: PIC (koktajl inhibitorów proteaz)

Plastic One: elektrody nagrywające oraz śruby uziemiające, kable do nagrywania EEG, komutatory, wielokanałowy postument do elektrod

Promega: woda wolna od nukleaz

Sarstedt: filtr do sterylizacji 0,45 μm , końcówki do pipet z filtrem o różnej pojemności, probówki typu eppendorf o różnej pojemności

Sigma-Aldrich: borax, dimetylosulfotlenek (DMSO), kwas borowy, paraformaldehyd, poli-D-lizyna, surowicza albumina wołowa (BSA), 2-amino-2-hydroksometylo-propanodiol (Tris), Triton® X-100, Tween® 20, wodorotlenek sodu,

Thermo Fisher Scientific: B-27, FBS (płodowa surowica bydlęca), gentamycyna, GlutaMax, HBSS (ang. *Hank's Balanced Salt Solution*), Neurobasal, płytki 96-dołkowe oraz film adhezyjny do płytek 96-dołkowych do reakcji RT-PCR,

Vector Laboratories: Vectashield® Mounting Medium (zatapiacz)

VWR: płytki 96-dołkowe do reakcji Bradforda, probówki typu Falcon o pojemności 15 ml i 50 ml, wielodołkowe płytki hodowlane 12-dołkowe i 6-dołkowe

5.1.4 Najczęściej stosowane roztwory

Poniżej wymienione odczynniki zostały przygotowane na bazie sterylnej wody dejonizowanej, oczyszczanej w systemie MiliQ.

Najczęściej stosowane roztwory w niniejszej pracy:

Bufor boranowy (pH 8,5): 0,1 M kwas borowy, 0,1 M borax

Bufor do oczyszczania membrany nitrocelulozowej z przeciwciał (pH 3): 90 mM glicyny, 2 % SDS

Bufor fosforanowy, PB (pH 7,4): 0,2 M Na₂HPO₄, 0,2 M NaH₂PO₄

pBRS (pH 7,3): 145 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM CaCl₂, 10 mM glukoza, 0,002mM glicyna

pBRS z magnezem (pH 7,3): bufor pBRS z dodatkiem 1 mM MgCl₂

Roztwór soli fizjologicznej zawieszony w buforze fosforanowym, PBS (pH 7,4): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM KH₂PO₄

PBS-T: roztwór PBS z dodatkiem Tritonu X-100 o odpowiednim stężeniu (0,4% lub 0,1%)

PFA, paraformaldehyd (4 %): 8 % PFA zawieszony w wodzie dejonizowanej MiliQ (pH 7,4) i rozcieńczony 0,1 M bufor PB (pH 7,4)

Pożywka do pierwotnych hodowli neuronalnych korowych *in vitro*: 1x stężony roztwór B-27, 10 % FBS, 10 mg/ml Gentamycyna, 0,5 Mm Glutamax, Neurobasal

Pożywka do pierwotnych hodowli neuronalnych korowych *in vitro* bez FBS: 1x stężony roztwór B-27, 10 mg/ml Gentamycyna, 0,5 Mm Glutamax, Neurobasal

Roztwór lizujący do ekstrakcji białek: 0,5 M KCL, 0,5 M PIPES, 0,5 M EGTA, 1 M MgCl₂, 0,5 % Tritonx100, 100 mM PMSF, 1 M DTT, 1x stężony koktajl inhibitorów proteaz

Roztwór denaturująco-obciążający białka (pH 6,8): 2 % SDS, 25 % glicerol, 0,01 % błękit bromofenolowy, 62,5 mM Tris, 5 % β-merkaptoetanol

Roztwór do elektroforetycznego rozdzielania białek (pH 8,3): 192 mM glicyna, 25 mM Tris, 0,1 % SDS

Roztwór do transferu białek na membranę nitrocelulozową (pH 8,3): 192 mM glicyna, 25 mM Tris, 20 % metanol

Roztwór poli-D-lizyny do pokrycia szalek hodowlanych w hodowli *in vitro*: 50 µg/ml poli-D-lizyny zawieszony w 0,1 M buforze boranowym

Roztwór do rozdzielania elektroforetycznego, TBE (pH 8,0): 90 mM Tris, 90 mM H₃BO₃, 20 mM EDTA

Sól fizjologiczna buforowana TRISem, TBS (pH 7,4): 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl

TBS-T: rozcieńczony roztwór TBS z dodatkiem 0,1 % Tween 20

TCS: 30 % glikol etylenowy, 25 % glicerol, 0,05 M bufor PB

5.1.5 Wykaz stosowanych wirusów

W celu modyfikacji poziomu ekspresji genu *Mbd3* oraz białka Mbd3 zastosowaliśmy komercyjne przygotowane: wirus obniżający ekspresję (sh(MBD3)) oraz wirus do nadekspresji genu *Mbd3* (SYN-MBD3-GFP), a także wirusy kontrolne nie wywołujące zmiany poziomu ekspresji genu *Mbd3* oraz poziomu białka Mbd3 (odpowiednio: sh(scrambled)-GFP oraz SYN-GFP). Wirusy zostały zamówione w firmie Tebu-bio SAS (39 rue de Houdan - 78610 Le Perray-en-Yvelines Cedex, Francja). Zgodnie z zaleceniami producenta wirusy zostały rozpipetowane na mniejsze objętości i były przechowywane w temperaturze -80°C. Dokładny opis struktury oraz miana wirusów zastosowanych w niniejszej pracy został zamieszczony w **Tabeli 2**. Mapy wektorów wirusowych zostały przedstawione na **rycynie 5.1.5.1** oraz **5.1.5.2**.

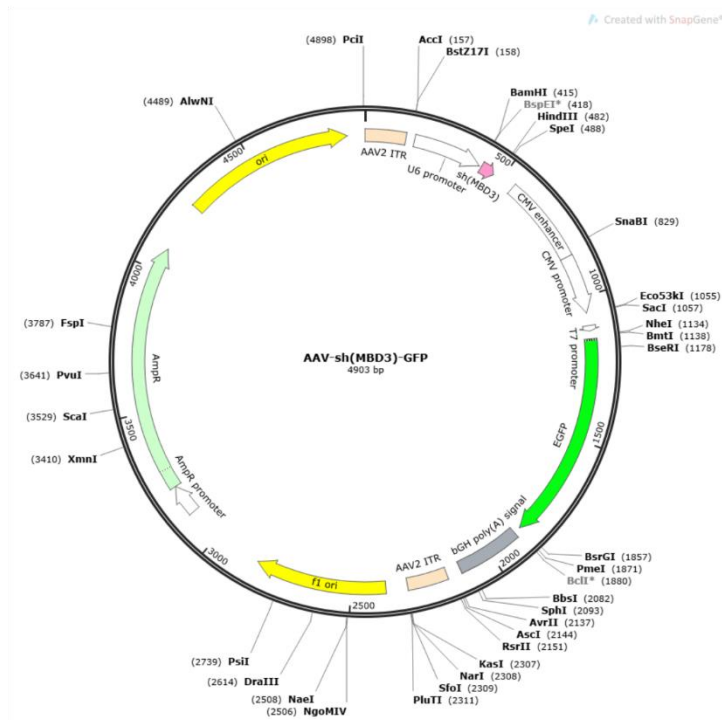
Tabela 2. Wykaz zastosowanych wirusów

Wirus	Producent	Stężenie	Struktura	Funkcja	Oznaczenie stosowane w pracy
AAV	Tebu-bio	0.1 mL >1E+13 VG/mL	ITR-U6-shRNA- polyT-CMV-GFP- polyA-ITR	Obniżenie ekspresji	sh(MBD3)
AAV	Tebu-bio	0.1 mL >1E+13 VG/mL	ITR-U6-scrambled- shRNA-polyT-CMV- GFP-polyA-ITR	Kontrola dla obniżenia	sh(scrambled)
AAV	Tebu-bio	0.1 ml at >1E+13 VG/mL	ITR-hSyn-rMBD3- GFP-WPRE-polyA- ITR	Nadekspresja	SYN-MBD3- GFP
AAV	Tebu-bio	0.1 ml at >1E+13 VG/mL	ITR-hSyn-GFP- polyA-ITR	Kontrola dla nadekspresji	SYN-GFP

A



B

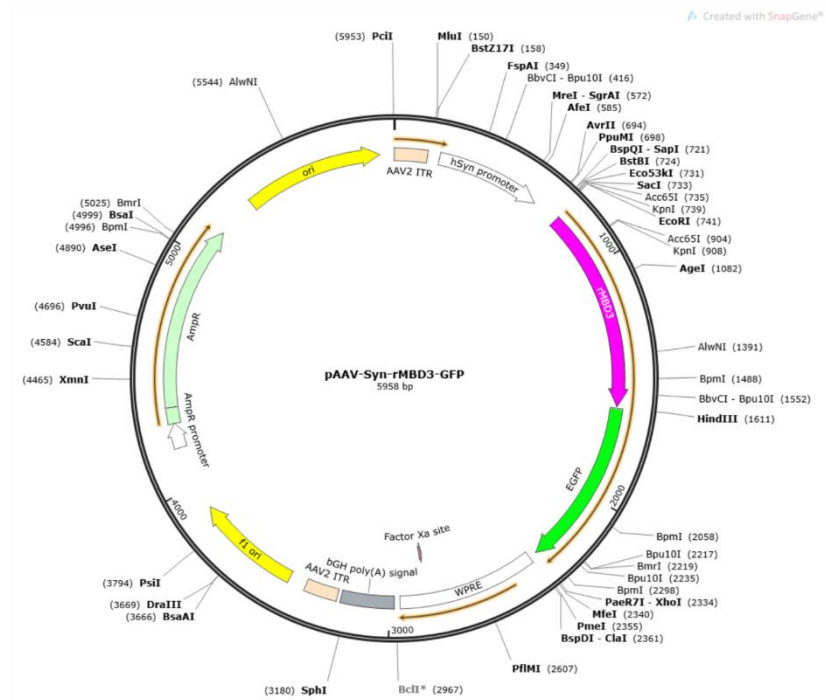


Rycina 5.1.5.1 Mapa wirusa kontrolnego (A) oraz wektora wirusowego do obniżenia ekspresji Mbd3 (B). Sekwencja sh(MBD3), w wirusie do obniżenia ekspresji i sh(scrambled), w wirusie kontrolnym została umieszczona pod promotorem U6.

A



B



Rycina 5.1.5.2 Mapa wirusa kontrolnego (A) oraz wektora wirusowego do nadekspresji Mbd3 (B). Sekwencja *Mbd3* została umieszczona pod ludzkim promotorem synapsynowym (A). W przypadku wirusa kontrolnego plazmid nie zawierał sekwencji *Mbd3* (B).

5.1.6 Materiał biologiczny

5.1.6.1 *In vivo* - Zwierzęta doświadczalne

W doświadczeniach *in vivo* wykorzystano dorosłe samce szczurów Sprague-Dawley w wadze początkowej 250-270 g, pochodzące ze zwierzętarni Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Zwierzęta doświadczalne były utrzymywane w stałych, kontrolowanych warunkach (24°C, wilgotność 50-60 %, cykl świetlny 12 godzin/12 godzin) z nieograniczonym dostępem do wody i pożywienia. W trakcie doświadczenia stosowano wzbogacenie środowiska poprzez umieszczenie w klatkach bytowych zwierząt zabawek (drewniane klocki, drewniane i pingpongowe piłeczki), drewnianych domków oraz poprzez dostarczanie raz w tygodniu przysmaków przeznaczonych dla tego gatunku. Przed rozpoczęciem procedur zwierzęta zostały oswojone z osobami przeprowadzającymi doświadczenie. Wszystkie procedury przeprowadzone na zwierzętach były zgodne z dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady UE (2010/63/UE) oraz uzyskały zgodę I Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach z siedzibą w Warszawie (uchwały nr 357/2017, 395/2017 oraz 838/2019).

5.1.6.2 *In vitro* - Hodowle pierwotne neuronów korowych

Do założenia pierwotnej hodowli neuronów korowych wykorzystano embriony Wistar w wieku 18 dni po zapłodnieniu (E18) wyizolowane z ciężarnej samicy pochodzącej ze zwierzętarni Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk, w Warszawie. Procedura zakładania hodowli neuronalnej korowej oraz pozostałych metod *in vitro* zostały opisane w rozdziale 5.2.11.

5.2 Metody

5.2.1 Implantacja elektrod do obserwacji EEG

Implantację elektrod i iniekcję wirusa do mózgu szczura przeprowadzono po dwóch tygodniach habituacji zwierząt do osób przeprowadzających doświadczenie oraz do pomieszczenia bytowego. Operacji poddano zwierzęta, które osiągnęły wagę 300 g. Do anestezji zastosowano isofluran (Bartex) w początkowej dawce 4 % w podawanym tlenie, a podczas operacji poziom podawanego isofluranu wynosił 1,5 % do 2 % w podawanym tlenie. Uśpione zwierzę unieruchamiano w aparacie stereotaktycznym (KOPF). Następnie przeprowadzano iniekcję domięśniową butorfanolu w dawce 0,2 mg (Butomidol, 10 mg/ml, Ritcher Pharma AG) w celu znieczulenia zwierząt. Implantacje elektrod przeprowadzono na podstawie procedury

opisanej przez Nissinena i wsp. (Nissinen i wsp. 2000) z modyfikacjami wprowadzonymi przez Guzik-Kornacką i wsp. (Guzik-Kornacka i wsp. 2011). Elektrode powierzchniową EEG do monitorowania drgawek implantowano nad korą czołową (przednio 3,0; bocznie 2,0 mm od Bregmy, #E363/20, PlasticOne), elektrodę referencyjną i elektrodę uziemiającą implantowano nad mózdzkiem (tylnie 10,0 mm; bocznie 2,0 mm od Bregmy, #E363/20, PlasticOne). Następnie przeprowadzano procedurę iniekcji wirusa do mózgu szczura opisaną w rozdziale 5.2.2. Końcówki elektrod umieszczano w gniazdku odbiorczym (#E363/2-TW/Spec, Plastic One) i przymocowano do czaszki za pomocą akrylu dentystycznego (Duracryl Plus, SpofaDental). Ranę zszywano wokół gniazdka. W celu ograniczenia odczuwania bólu na ranę stosowano bezpośrednio Lignokainę w żelu (20 mg/g, Lignocainum, typ A, Jelfa), a także wstrzykiwano podskórnie meloksykam w dawce 0,2 mg (Loxicom, 20 mg/ml, Norbrook).

Implantacji elektrod poddano jedynie zwierzęta po iniekcji stosowanych wirusów oraz przeznaczonych do doświadczeń z zastosowaniem testu PTZ, podczas którego monitorowane było EEG. Zwierzętom, które uczestniczyły w procedurze rozniecania PTZ nie implantowano elektrod. Jeden szczur kontrolny zmarł podczas operacji (n=1).

Szczury po zakończonej operacji obserwowano do momentu całkowitego wybudzenia. Przez kolejne dni ich stan zdrowia był ściśle kontrolowany i w przypadku wystąpienia niepokojących objawów konsultowany z lekarzem weterynarii Instytutu Biologii Doświadczalnej.

5.2.2 Wirusy AAV i ich iniekcja do mózgu szczura

Wirusy AAV (ang. *adeno-associated virus*) użyte w niniejszym doświadczeniu zostały zaprojektowane i zamówione w firmie Tebu-bio. Do produkcji wirusów została wykorzystana sekwencja szczurzego genu *Mbd3* (ang. *methyl-CpG binding domain protein 3*) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/362834>). Spis wirusów, informacje dotyczące miana oraz struktury zostały zamieszczone w rozdziale 5.1.5. Przed iniekcją do mózgu wirusy zostały rozcieńczone w stosunku 1:10 w sterylnym buforze PBS.

Wirusy wykorzystane w niniejszych doświadczeniach były podawane obustronnie do jądra migdałowatego podstawno boczno (ang. *Basolateral amygdaloid nucleus*, BLA). Koordynaty miejsca iniekcji (od dury AP: -2,8 ; L: \pm 4,7; DV: -7,2) zostały ustalone z wykorzystaniem atlasu mózgu szczura (Paxinos G. 2006). Miejsca iniekcji odmierzano stereotaktycznie od bregmy, a następnie otwierano czaszkę w miejscu podania. Igłę do iniekcji (NanoFil #33GBVLD, WPI) umieszczano w strzykawce (NanoFil 10 μ l, WPI) podłączonej do pompy UltraMicroPump (#UMP3, WPI). Po umieszczeniu igły w rejonie jądra podstawno-bocznego ciała

najbardziej stresującym dla zwierząt testem. Test otwartego pola i uniesionego labiryntu krzyżowego przeprowadzono z wykorzystaniem aren i pokoi behawioralnych należących do Pracowni Metod Behawioralnych Instytutu Nenckiego.

5.2.3.1.1 Test reakcji na bodziec stresowy

Test reakcji na bodziec stresowy (ang. *behavioral hyperexcitability test*) był przeprowadzany w 3 powtórzeniach w ciągu jednego dnia z godzinnymi przerwami między kolejnymi powtórzeniami. Każde z 3 powtórzeń było przeprowadzane przez innego, lecz znanego zwierzętom eksperymentatora. Podczas testu zwierzęta były umieszczane w nowej klatce. Następnie zwierzętom prezentowano następujące bodźce: bodziec wzrokowy (nieznany obiekt - długopis), bodźce czuciowe (dotyk długopisem oraz podniesienie przez eksperymentatora) oraz bodziec słuchowy (nieznany sygnał dźwiękowy), a zachowanie zwierząt było oceniane w czterech kategoriach: reakcja na pojawienie się nowego obiektu, reakcja na dotyk, reakcja na dźwięk oraz reakcja na podnoszenie. Reakcje oceniano według punktacji zamieszczonej w **Tabeli 3**.

Tabela 3. Punktacja w teście reakcji na bodziec stresowy.

Punktacja	Opis reakcji
Nowy obiekt	
1	Brak reakcji
2	Obwąchiwanie
3	Ucieczka
4	Zastygnięcie w bezruchu
5	Odskokzenie
6	Atakowanie
Dotyk	
1	Brak reakcji
2	Powolne odwrócenie się w stronę dotykanego miejsca
3	Ucieczka
4	Zastygnięcie w bezruchu
5	Przesunięcie w kierunku dotkniętego miejsca
6	Przesunięcie w przeciwnym kierunku
7	Gwałtowne odskokzenie
Dźwięk	
1	Brak reakcji
2	Nastawienie uszu, nieznaczne ruchy
3	Odskokzenie, nastroszenie sierści, wokalizacja
Podnoszenie	
1	Brak reakcji
2	Łatwe podnoszenie, wokalizacja
3	Oddalenie się, wzrok szczura skupiony na dłoniach eksperymentatora
4	Zastygnięcie w bezruchu, wokalizacja
5	Ucieczka
6	Atak

5.2.3.1.2 Test otwartego pola

Test otwartego pola (ang. *open field*) przeprowadzano po 2 dniach przerwy od zakończenia testu reakcji na bodziec stresowy. Do testu otwartego pola wykorzystano arenę w wymiarze 1x1 m i wysokości ścianek 35 cm. Badanego szczura umieszczano w środkowej części areny i monitorowano jego zachowanie przy pomocy programu WinTV (Hauppauge, USA) przez 15 minut. Po zakończeniu monitorowania szczura przenoszono do klatki transportowej, a arenę przecierano 0,1% kwasem octowym w celu pozbycia się śladów zapachowych. Po wyczyszczeniu areny badano kolejnego, losowo wybranego szczura. Pliki analizowano w programie EthoVisionXT (wersja 8.5, Noldus, USA). W programie wyznaczono następujące rejony areny: obszar zewnętrzny, pole środkowe oraz punkt centralny areny. Podczas analizy sprawdzano czas spędzony w poszczególnych rejonach areny, latencję do pojawienia się szczura w polu środkowym, szybkość przemieszczania się oraz pokonany dystans.

5.2.3.1.3 Test uniesionego labiryntu krzyżowego

Test uniesionego labiryntu krzyżowego (ang. *elevated plus maze*) przeprowadzano następnego dnia po teście otwartego pola. Do testu zastosowano labirynt składający się z dwóch otoczonych ściankami ramion (tzw. zamknięte ramiona, dł. 50 cm, szer. 14 cm, wys. 29 cm) i dwóch otwartych ramion (dł. 50 cm, szer. 14 cm). Labirynt był uniesiony na wysokość 50 cm nad podłogą. Przed rozpoczęciem monitorowania arenę przemywano 0,1 % kwasem octowym, a następnie umieszczano testowanego szczura w centralnym punkcie areny znajdującym się między ramionami. Zachowanie szczura było nagrywane przez 15 minut z zastosowaniem programu WinTV (Hauppauge, USA). Pliki analizowano w programie EthoVisionXT (wersja 8.5, Noldus, USA). W programie wyznaczono następujące rejony areny: obszar zamkniętych ramion, obszar otwartych ramion, pole centralne między ramionami. Przeanalizowano czas spędzony w poszczególnych ramionach areny, polu centralnym, latencję do pojawienia się w wybranych rejonach areny, liczbę wejść do obszaru zamkniętych ramion, liczbę wejść do obszaru otwartych ramion, szybkość przemieszczania się oraz dystans.

5.2.4 Model drgawki ostrej wywołanej pentylenetetrazolem - Test PTZ

2 dni po zakończeniu testów behawioralnych, przeprowadzano test PTZ. Zwierzęta doświadczalne ważono a następnie poddawano dootrzewnowo PTZ zawieszony w soli fizjologicznej w dawce 50 mg/kg m.c. Zwierzęta kontrolne otrzymały iniekcję dootrzewnową soli fizjologicznej. Wybrana dawka PTZ wywołuje u szczurów drgawki toniczno-kloniczne (stopnia 4-5 w skali Racine, **Tabela 4**).

Podczas testu PTZ rejestrowano EEG. Zwierzęta były monitorowane przez 60 minut od momentu wykonania iniekcji dootrzewnowej. Rejestrację EEG przeprowadzono z zastosowaniem systemu Comet EEG (Grass Technologies, USA) oraz kamery video (Panasonic WV-CP480). Nie monitorowano EEG zwierząt kontrolnych, które otrzymały iniekcję z soli fizjologicznej, natomiast przebywały one w klatkach do rejestracji EEG przez 60 minut. Dane otrzymane podczas rejestracji EEG zostały przeanalizowane manualnie z użyciem programu TWin EEG (v.4.5.3.23, Grass Technologies, USA). Za drgawkę uznawano wyładowanie trwające dłużej niż 5 sekund, o amplitudzie dwukrotnie wyższej od odczytu podstawowego oraz częstotliwości wynoszącej >5Hz.

Śmiertelność podczas testu PTZ wynosiła 0%.

Tabela 4. Zmodyfikowana skala Racine’a

Skala intensywności napadów drgawkowych	Objawy
1	Znieruchomienie, mruganie, rytmiczne skurcze pyska
2	Silniejsze skurcze pyska, rytmiczne kołysanie głową, prosty ogon
3	Rytmiczne ruchy jednej przedniej łapy
4	Przewrócenie na bok, rytmiczne ruchy przednich łap
5	Uogólnione drgawki toniczno-kloniczne

5.2.5 Rozniecanie z zastosowaniem PTZ

W celu określenia wpływu zwiększonego oraz zmniejszonego poziomu białka Mbd3 na epileptogenezę, grupę zwierząt po iniekcji poszczególnych wirusów poddano procedurze rozniecania (ang. *kindling*) przy użyciu PTZ. Model ten polega na wielokrotnym podaniu podprogowej dawki PTZ, która po pewnym czasie powoduje wystąpienie drgawek i stopniowe zwiększenie ich intensywności. Rozniecanie rozpoczęto w trzecim tygodniu (21 dnia) od iniekcji wirusa do mózgu szczura. Szczurom w niniejszym doświadczeniu nie implantowano elektrod, ponieważ zastosowano kryterium behawioralne. Osiągane drgawki behawioralne były nagrywane przez 30 minut z użyciem kamery video (Panasonic WV-CP480) oraz oceniane według skali Racine’a. W doświadczeniu wykonywano iniekcję dootrzewnową PTZ w dawce 35 mg/kg

m.c. w soli fizjologicznej. Iniekcje przeprowadzano 3 krotnie w ciągu tygodnia. Kryterium rozniecania było wywołanie drgawek stopnia 4-5 według skali Racine'a (**Tabela 4**, w rozdziale 5.2.4) podczas trzech następujących po sobie sesji. Śmiertelność w tym modelu wynosiła 10% (n=4).

5.2.6 Eutanazja i pobranie tkanki

5.2.6.1 Izolowanie tkanki do badań poziomu RNA i białka

W celu pozyskania tkanki do badań poziomu RNA i białka zwierzęta usypiano za pomocą izofluranu (Baxter) oraz dekapitowano przy użyciu gilotyny (World Precision Instruments). Wyizolowany z czaszki mózg płukano w roztworze soli fizjologicznej, a następnie umieszczano na schłodzonej szalce. Mózg układano na stronie brzusznej a następnie przecinano skalpelem w poprzek dwóch półkul. Następnie odseparowywano obie półkule od podwzgórza. W celu wyizolowania hipokampa półkulę kładziono korą w dół a następnie wywijano hipokamp i odcinano od kory. Następnie oddzielano korę śródwęchową od kory somatosensorycznej wzdłuż szczeliny węchowej. Tkanekę z prawej półkuli umieszczano w probówkach i mrożono na suchym lodzie. Przechowywano w temperaturze -80°C i wykorzystywano do badania poziomu białka. Tkanekę z lewej półkuli umieszczano w probówkach zawierających bufor StayRNA (#038-500, A&A biotechnology) zgodnie z zaleceniami producenta przechowywano przez noc w 4°C , a następnie odsączało bufor, tkankę zamrażano, przechowywano w -80°C i wykorzystano do badań mRNA.

5.2.6.2 Perfuzja

Szczury ważono, usypiano za pomocą izofluranu (Baxter) a następnie podawano iniekcję dootrzewną 2 ml/kg pentobarbitalu (Morbital, Biowet, 133,3mg/ml). Następnie przeprowadzano perfuzję z wykorzystaniem 200ml soli fizjologicznej, a następnie 200ml 4% paraformaldehydu (PFA) zawieszonego w buforze fosforanowo-sodowym. Wyizolowany mózg przechowywano w roztworze 4% PFA przez 4 godziny, a następnie inkubowano w roztworze 30% sacharozy zawieszony w roztworze 0,02M KPB, w 4°C aż do momentu, gdy mózgi opadły na dno probówki (typowo 24-48 godzin). Następnie mózgi zamrażano na suchym lodzie i przechowywano w temperaturze -80°C . Mózgi zwierząt skrojono przy użyciu kriostatu (Leica CM1860) na skrawki o grubości 30 μm . Skrawki przechowywano w szalkach 24-dołkowych wypełnionych buforem TCS. Pozyskaną tkankę wykorzystywano do barwień histologicznych i immunofluorescencyjnych.

5.2.7 Izolowanie białek z mózgu szczura

5.2.7.1 Przygotowanie ekstraktów białek z wyizolowanej tkanki

Wyizolowaną tkanką rozmrażano na lodzie a następnie przenoszono do próbki o pojemności 15 ml. Homogenizację tkanki przeprowadzano w obecności buforu do lizy zawierającego: 0,5 % TritonX100, 0,5 M KCL, 0,5 M PIPES, 1 M MgCl₂, 0,5 M EGTA, 1x stężony koktajl inhibitorów proteaz, 100 mM PMSF, 1 M DTT. Tkankę homogenizowano przez 20 sekund z użyciem homogenizatora Tissue Ruptor (Qiagen). Następnie homogenat przenoszono do nowej próbki i inkubowano przez 15-20 minut w temperaturze -20°C do całkowitego zamrożenia. Zamrożone próbki rozmrażano na lodzie a następnie wirowano w temperaturze 4°C przez 20 minut z szybkością 11000 rpm. Uzyskany nadsącz przenoszono do nowych probówek a następnie ponownie wirowano w temperaturze 4°C (20 minut, 11000 rpm). Otrzymany nadsącz - ekstrakt białkowy, przenoszono do nowej próbki. Stężenie białka mierzono metodą Bradforda, która została opisana w rozdziale 5.2.7.2.

5.2.7.2 Metoda Bradforda - Oznaczenie stężenia białka

W celu oznaczenia stężenia białka w ekstraktach mózgu szczura zastosowano metodę Bradforda. W reakcji kolorymetrycznej wykorzystano bufor Protein Assay (#500-0006, Bio-Rad) który rozcieńczono w proporcji 1:5. W celu wyznaczenia krzywej wzorcowej do dołków płytki 96-dołkowej nakładano po 10 µl BSA (surowicza albumina bydlęca, ang. *bovine serum albumin*) o stężeniu: 0,05; 0,1; 0,25 oraz 0,5 w trzech kolejnych powtórzeniach i dodawano 200 µl rozcieńzonego buforu Protein Assay. 1µl badanej próbki nakładano do dołka płytki 96-dołkowej i dodawano 200 µl wcześniej przygotowanego buforu Protein Assay. Próbki nakładano w trzech powtórzeniach. Następnie płytkę wytrząsano przez 3 sekundy. Reakcja kolorymetryczna była mierzona przy długości fali $\lambda=570$ nm przy użyciu programu Ascent Software Vision, w aparacie Multiskan (Photometric Microplate Reader ThermoSystems Lab). Uzyskane wyniki analizowano z zastosowaniem krzywej wzorcowej BSA, w programie Excel (2016).

5.2.7.3 Elektroforeza białek – metoda Western Blot

5.2.7.3.1 Przygotowanie żelu poliakryloamidowego

W celu przeprowadzenia rozdzielania elektroforetycznego ekstraktów białkowych przygotowano żel poliakryloamidowy SDS-PAGE (ang. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*), o grubości 1 mm, składający się z: 4 % żelu zagęszczającego (pH=6,8) oraz

12 % żelu rozdzielającego (pH=8,8). Górna warstwa żelu, zagęszczająca, zawierała: 4 % akrylamid, 125 mM Tris, 0,1 % SDS, 0,05 % APS oraz 0,1 % TEMED. Dolna warstwa, rozdzielająca, zawierała: 12 % akrylamid, 375 mM Tris, 0,1 % SDS, 0,05 % APS oraz 0,05 % TEMED. Reakcja polimeryzacji żelu była inicjowana dodaniem do mieszaniny nadsiarczanu amonu (APS) oraz tetrametyloetylenodiaminy (TEMED). W górnej warstwie żelu umieszczano między szkiełkami grzebień (15-dołkowy, Bio Rad, maksymalna pojemność dołka 24 μ l) w celu uzyskania kieszonek do nałożenia badanych próbek. Tak przygotowany żel, zabezpieczony folią, przechowywano w 4°C przez noc.

5.2.7.3.2 Przygotowanie próbek do nałożenia na żel poliakryloamidowy

W celu przygotowania próbek do nałożenia na żel poliakryloamidowy odmierzano 20 μ g białka oraz dodawano bufor denaturujący-obciążający (pH=6,8) zawierający: 2 % SDS, 25 % glicerol, 0,01 % błękit bromofenolowy, 62,5 mM Tris-HCl oraz 5 % β -merkaptoetanol. Gotowe próbki wirowano i inkubowano w temperaturze 95°C przez 4 minuty w celu przeprowadzenia procesu denaturacji termicznej białka.

5.2.7.3.3 Rozdział elektroforetyczny na żelu poliakryloamidowym

W celu identyfikacji badanego białka na podstawie względnej masy cząsteczkowej, zastosowano marker wielkości cząsteczek PageRuler Prestained Protein Ladder (#26616, Thermo Scientific). Rozdział elektroforetyczny prowadzono w aparacie do elektroforezy Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio Rad). Rozdział białek zachodził w warunkach denaturujących w obecności buforu do elektroforezy w składzie: 25 mM Tris, 192 mM glicyna oraz 0,1 % SDS, pH roztworu wynosiło 8,3. Pierwszy etap zagęszczania próbek prowadzono w temperaturze pokojowej, przy napięciu wynoszącym 95 V przez 25 minut. W kolejnym etapie, rozdzielającym, zwiększono napięcie do 135 V i prowadzono rozdział elektroforetyczny przez 50-60 minut, do momentu aż barwnik pojawił się na końcu żelu.

5.2.7.3.4 Transfer białek na membranę nitrocelulozową

Żel inkubowano przez 3 minuty w buforze do transferu, o składzie: 25 mM Tris, 192 mM glicyna, 20 % metanol. Następnie żel i membranę nitrocelulozową (#RPN82D, Amersham Hybond-ECL), wiążącą białka, umieszczano w aparacie Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio Rad) i prowadzono transfer w obecności buforu do transferu, na lodzie, przy napięciu 100 V przez 90 minut. Membranę inkubowano przez 1 minutę w buforze różu 0,1 % Ponceau S (#P7170, Sigma-Aldrich) rozpuszczonym w 5 % kwasie octowym, w celu sprawdzenia rozdziału białek i transferu

na membranę. Następnie płukano membranę trzykrotnie wodą MilliQ i inkubowano przez 5 minut w 1x stężonym buforze TBS-T, o składzie: 0,1 % Tween 20 w buforze TBS (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl).

5.2.7.3.5 Detekcja białek metodą Western Blot

W celu zablokowania niespecyficznego wiązania przeciwciał do membrany nitrocelulozowej przeprowadzono inkubację membrany w buforze blokującym zawierającym 5 % odtłuszczone mleko (Gostyń) zawieszone w TBS-T, przez godzinę w temperaturze pokojowej. Inkubację membrany, w dalszej części procedury prowadzono na wytrząsarce orbitalnej (40 obrotów na minutę). Membranę płukano trzykrotnie po 5 minut w TBS-T. Pierwszorzędowe przeciwciało specyficzne dla białka Mbd3, w rozcieńczeniu 1:1000 w TBS-T, inkubowano z membraną przez noc w temperaturze 4°C. Po zakończonej inkubacji, trzykrotnie płukano po 5 minut w TBS-T, a następnie membranę inkubowano z przeciwciałem drugorzędowym sprzężonym z peroksydazą chrzanową, rozcieńczonym w stosunku 1:20 000 w TBS-T przez 2 godziny. Po płukaniu trzykrotnie po 5 minut w TBS-T, membranę inkubowano w buforze do chemiluminescencji ECL Western Blotting Analysis System (#GERPN2106, Amersham). Następnie membrany umieszczano w kasecie (Hypercassette, Amersham Biosciences). Na wierzch membrany nakładano kliszę radiologiczną (#771 1468, Kodak) i inkubowano przez odpowiednią ilość czasu do uzyskania czytelnego sygnału prążków odpowiadających badanemu białku. Następnie kliszę wywoływano przy pomocy automatycznej wywoływarki (Optimax 2010 X-ray Film Processor).

5.2.7.3.6 Oczyszczanie membrany

W celu ponownego użycia membrany do detekcji innych białek, membranę inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej w buforze zawierającym 90 mM glicyny oraz 2 % SDS (pH buforu = 3). Następnie membrany płukano trzykrotnie po 5 minut buforem TBS-T.

5.2.7.3.7 Detekcja białka referencyjnego

Po zakończonym płukaniu membrany inkubowano w obecności 5 % odtłuszczonego mleka zawieszonego w TBS-T przez 60 minut. Jako białko referencyjne stosowano β -aktynę sprzężoną z peroksydazą chrzanową (#A3854, Sigma-Aldrich). W tym celu przeprowadzono 2 godzinną inkubację z przeciwciałem skierowanym przeciwko β -aktynie (stężenie 1:20 000 w TBS-T), a następnie płukano trzy razy po 5 minut w TBS-T w temperaturze pokojowej. Membranę wywoływano w obecności buforu ECL Western Blotting Analysis System, analogicznie do procedury opisanej w rozdziale 5.2.7.3.5.

5.2.7.3.8 Analiza densytometryczna

Zdjęcia kliszy wykonano z zastosowaniem skanera EPSON Perfection V700 Photo J221A. Intensywność uzyskanych prążków przeanalizowano z wykorzystaniem programu ImageJ. Wartość intensywności prążka odpowiadająca badanemu białku, dzielono przez wartość intensywności prążka białka kontrolnego (β -aktyny) pochodzącego z tej samej próby. Otrzymaną wartość traktowano jako relatywny poziom badanego białka dla poszczególnych prób. Następnie otrzymaną wartość podzielono przez średnią wartość uzyskaną dla prążków referencyjnych (β -aktyny). Otrzymany w ten sposób wynik przedstawia krotność zmiany poziomu badanego białka w odniesieniu do poziomu białka kontrolnego.

5.2.8 Kwas rybonukleinowy

5.2.8.1 Izolowanie i oznaczenie stężenia RNA

Procedurę izolowania RNA przeprowadzono zgodnie z protokołem zestawu do izolacji RNA: RNeasy Mini Kit (#74104, Qiagen). Pomiar stężenia RNA przeprowadzono w spektrofotometrze Nanodrop (DS-11 Spectrophotometer, DeNovix) przy długości fali $\lambda = 260$ nm i 280 nm. Wyizolowane mRNA przechowywano w temperaturze -80°C .

5.2.8.2 Rozdział elektroforetyczny RNA

Jakość wyizolowanego RNA sprawdzono na 1 % żelu agarozowym w obecności buforu MOPS: 20 mM MOPS, 5 mM octan sodu, 1 mM EDTA, 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bromek etydyny, pH 7,0. Próbkę RNA były zawieszane w 1x buforze obciążającym (#R0641, Thermo Scientific), a następnie po przepiętowaniu nanoszone na żel. Do identyfikacji wielkości RNA zastosowano marker GeneRuler 1Kb Plus (#SM1331, Thermo Fisher), który nakładano do pierwszego dołka żelu. Elektroforezę przeprowadzano przy stałym napięciu 70 V przez godzinę w aparacie do elektroforezy Mini-Sub Cell GT System (Bio-rad). Po zakończonej elektroforezie żele oglądano w transluminatorze UV InGenius (Syngene) oraz dokumentowano poprzez wykonanie zdjęć w programie GeneSnap (Syngene).

5.2.8.3 Odwrotna transkrypcja

Reakcję przepisania mRNA na matrycę cDNA przeprowadzano z zastosowaniem zestawu Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (#K1641, Thermo Scientific). Próbkę do reakcji przygotowano zgodnie z załączonym do zestawu protokołem. Końcowa objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 20 μl i zawierała 1x stężony bufor reakcyjny, 2 μl mieszaniny

Maxima Enzyme Mix zawierającej w swoim składzie odwrotną transkryptazę oraz 0,5 µg RNA. Reakcje przeprowadzono w termocyklerze (Eppendorf), inkubując kolejno przez 10 minut w 25°C, 15 minut w 50°C (reakcja odwrotnej transkrypcji) oraz 5 minut w 85°C (inaktywacja enzymu). Uzyskane cDNA rozcieńczano 50 razy i rozpipetowywano. Tak przygotowane próbki przechowywano w temperaturze -80°C. Otrzymane cDNA wykorzystano w reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

5.2.8.4 Reakcja PCR w czasie rzeczywistym

Reakcje PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzono z zastosowaniem zestawu Fast SYBR™ Green Master Mix (#4385612, Life Technologies). Próbkę przygotowywano zgodnie z protokołem załączonym do zestawu reakcyjnego, po czym dodawano startery opisane w **Tabeli 5**.

Tabela 5. Startery wykorzystane w reakcji PCR.

Gen	Nazwa startera	Sekwencja (od 5' do 3')
<i>Mbd3</i>	MBD3_for	TTACTATAGCCCCAGCGGGA
	MBD3_rev	AGTGCAGTGTTTCAGGTCAGG
<i>Gapdh</i>	GAPDH_for	GATTTGGCCGTATCGGAC
	GAPDH_rev	GAAGACGCCAGTAGACTC

Próbki nakładano do dołków płytki 96-dołkowej i wirowano w 4°C przez 3 minuty z szybkością 3500 rpm. Reakcje PCR przeprowadzono w urządzeniu StepOnePlus Real Time PCR Fast System (Applied Biosystem) z uwzględnieniem warunków zalecanych przez producenta. Profil termiczny reakcji został opisany w **Tabeli 6**. Program reakcji ustawiano w programie StepOne Software (v3.2, Applied Biosystem), a analizę uzyskanych danych przeprowadzono w programie Excel 2017 i GraphPad Prism 5. Poziomą ekspresję genu *Mbd3* normalizowano względem poziomu ekspresji genu referencyjnego – *Gapdh*, uzyskując relatywną wartość poziomu genu *Mbd3* dla każdej z badanych próbek. Uzyskane wartości dzielono przez średnią wartość próbek pochodzących od zwierząt kontrolnych w celu otrzymania krotności zmiany poziomu ekspresji badanego genu w stosunku do kontroli.

Tabela 6. Profil termiczny reakcji PCR w czasie rzeczywistym (RT-PCR).

	Temperatura (°C)	Czas (s)	Liczba cykli
Aktywacja enzymu	95	20	40
Denaturacja	95	3	
Elongacja	60	30	

5.2.8.5 Rozdział elektroforetyczny DNA

Jako dodatkową kontrolę reakcji RT-PCR przeprowadzano elektroforezę próbek w 0,8% żelu agarozowym w obecności 1x stężonego buforu TBE z dodatkiem barwnika Midori Green Advance DNA Stain (#MG04, Genetics). Próbki DNA zawieszano w 1x buforze obciążającym (#1037650, Qiagen), a następnie наносzono na żel. W celu określenia wielkości produktu reakcji zastosowano marker wielkości 1kb Plus DNA Ladder (#10787018, Invitrogen). Elektroforezę przeprowadzano przy napięciu 100 V przez około 40 minut w aparacie do elektroforezy Mini-Sub Cell GT System (Bio-rad). Po zakończonej elektroforezie żele obserwowano w transluminatorze UV InGenius (Syngene) oraz udokumentowano poprzez wykonanie zdjęć w programie GeneSnap (Syngene).

5.2.9 Histologia - Barwienie metodą Nissla

Skrawki przepłukiwano trzykrotnie buforem PBS i naciągano na pokryte żelatyną szkiełka podstawowe. Po wyschnięciu szkiełek przeprowadzano barwienie Nissla, podczas którego szkiełka, z naciągniętymi na nie skrawkami, były kolejno inkubowane w następujących buforach: 96 % etanol, 70 % etanol, 50 % etanol, woda destylowana, 0,1 % fiolet krezylu w 3 % kwasie octowym, woda destylowana (dwukrotne płukanie), 50 % etanol, 50 % etanol z 0,1 % kwasem octowym, 70 % etanol, 96 % etanol, 100 % etanol, ksilen z etanolem w proporcji 1:1, ksilen (2x). Po ostatniej inkubacji w ksylenie szkiełka zatapiano w DPX (Sigma-Aldrich). Przygotowane preparaty przechowywano w temperaturze pokojowej. Miejsce iniekcji sprawdzono pod światłem widzialnym w mikroskopie Nikon Optiphot-2.

5.2.10 Immunofluorescencja

Skrawki przenoszono z buforu TCS do dołków szalki 24-dołkowej zawierającej PBS. Przepłukiwano trzykrotnie po 15 minut buforem PBS w temperaturze pokojowej. W celu permeabilizacji błony komórkowej, skrawki inkubowano przez 90 minut w buforze 0,4 % T-PBS

(bufor PBS z 0,4 % Tritonu X-100) na wytrząsarce orbitalnej (prędkość 40 obrotów/minutę). Następnie przepłukiwano trzykrotnie buforem 0,4 % T-PBS z 15 minutową inkubacją. Skrawki blokowano przez godzinę w roztworze 2 % surowicy koziej (ang. *normal goat serum*) w 0,4 % T-PBS. Następnie, skrawki inkubowano przez noc w temperaturze 4°C w roztworze przeciwciała pierwszorzędowego zawieszonego w 0,4 % T-PBS w rozcieńczeniu 1:1000. Po trzykrotnym przepłukaniu buforem 0,4 % T-PBS, z 15 minutową inkubacją, skrawki inkubowano w roztworze przeciwciała drugorzędowego, w rozcieńczeniu 1:2000 przez 90 minut. Spis stosowanych przeciwciał zamieszczono w **Tabeli 1**, w rozdziale 5.1.1. Po ponownym płukaniu przeprowadzono 15 minutową inkubację z barwikiem Hoechst (#62249, ThermoFisher) w rozcieńczeniu 1:1000 w roztworze 0,4% T-PBS. Po trzykrotnym przepłukaniu buforem PBS z 10 minutową inkubacją, skrawki nakładano na szkiełka podstawowe i pozostawiano do całkowitego wyschnięcia, jednocześnie chroniąc przed ekspozycją skrawków na światło. Skrawki zatapiano w Vectashield® Mounting Medium (#H-1000, Vector Laboratories). Preparaty przechowywano w temperaturze 4°C, chroniąc przed nadmierną ekspozycją na światło. Zdjęcia preparatów wykonywano przy użyciu mikroskopu Nikon Eclipse 80 oraz lampy fluorescencyjnej Lumen 200 (Prior Scientific).

5.2.11 Metody w doświadczeniach *in vitro*

5.2.11.1 Hodowla dysocjowana neuronów korowych

Do założenia hodowli pierwotnej neuronów korowych wykorzystywano embriony w wieku 18 dni po zapłodnieniu (E18). Samicę ciężarną Wistar usypiano izofluranem (Baxter) a następnie dekapitowano. Wyizolowane embriony dekapitowano, a pozyskane czaszki embrionów umieszczano w schłodzonym buforze HBSS (#14170-088, Thermo Fisher).

5.2.11.2 Dysocjacja tkanki i założenie hodowli

Mózgi embrionów izolowano pod binokulem w buforze HBSS. Następnie izolowano obie półkule mózgu i po odwróceniu na stronę grzbietową (korę) izolowano hipokamp, a następnie korę. Pozyskaną korę przenoszono do 15ml probówki zawierającej świeży HBSS, następnie przemywano dwukrotnie zimnym buforem HBSS i inkubowano w temperaturze 37°C przez 15 minut z buforem HBSS zawierającym 0,2 % Trypsynę (#27250-0180, Thermo Fisher) i 0,15 mg/ml Dnazy (#DN-25, Sigma-Aldrich). Następnie usuwano nadsącz i dodawano ciepły 10 % FBS (#10106-151, Thermo Fisher) zawieszony w HBSS. Po dwukrotnym przepłukaniu fragmentów kory ciepłym HBSS odciągano bufor i dodawano 2 ml ciepłej pożywki zawierającej: 1x stężony roztwór B-27, 10 % FBS, 10 mg/ml Gentamycyny, 0,5 Mm Glutamax w pożywce,

Neurobasal, a następnie pipetowywano kilkakrotnie. Liczbę i żywotność komórek mierzono w pożywce zawierającej roztwór 0,4 % błękitu trypanu, pod mikroskopem za pomocą komory Neubauera (Marienfeld).

Wysiewano 200 tysięcy komórek na dołek, do dołków płytki 12-dołkowej pokrytej uprzednio poli-D-lizyną (ang. *poli-D-lysine*, #P7280, Sigma-Aldrich) o stężeniu 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ w 0,1 M buforze boranowym. Hodowle prowadzono w inkubatorze, w warunkach: 37°C i 5 % CO₂. 50 % pożywki wymieniano w 2 i 6 dniu po założeniu hodowli. Podczas wymiany pożywki używano pożywki nie zawierającej surowicy FBS w celu ograniczenia liczby astrocytów w hodowli.

W przypadku hodowli pierwotnej na szklanych szkiełkach, szkiełka o średnicy 18mm myto w 99,9% etanolu, a następnie autoklawowano i umieszczano w szalce 6-dołkowej. Następnie pokrywano poli-D-lizyną (ang. *poli-D-lysine*, #P7280, Sigma-Aldrich) o stężeniu 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zawieszoną w 0,1 M buforze boranowym. Zabezpieczoną, sterylną szalkę inkubowano przez całą noc w temperaturze pokojowej w komorze laminarnej. Następnie z szalki odciągano poli-D-lizynę i przepłukiwano trzykrotnie sterylną wodą dejonizowaną. Do dołków z umieszczonymi wewnątrz szkiełkami, wysiewano 400 tysięcy komórek na dołek płytki 6-dołkowej.

5.2.11.3 Transfekcja komórek neuronalnych

W celu sprawdzenia wpływu obniżenia i zwiększenia ekspresji Mbd3 komórki transfekowano dziewiątego dnia po założeniu hodowli. 1 μl wirusa dodawano do dołka szalki, delikatnie mieszano, a następnie szalkę przenoszono do inkubatora. Komórki hodowlane wysiane na szalce 6-dołkowej poddawano transfekcji 2 μl wirusa. Hodowle trzymano w stałych warunkach: 37°C i 5 % CO₂.

5.2.11.4 Model wyładowań epileptopodobnych *in vitro*

Procedurę wywołania wyładowań epileptopodobnych przeprowadzano siódmego dnia po transfekcji (dzień 16 hodowli) (Jiang i wsp. 2010). W celu wywołania wyładowań epileptopodobnych komórki inkubowano przez 3 godziny w buforze pBRS bez magnezu (Mg, pH=7,3) zawierającym 145 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM CaCl₂, 10 mM glukozę, 0,002 mM glicynę (-Mg²⁺ – warunki wywołujące wyładowania epileptopodobne). Kontrolę stanowiły komórki inkubowane w buforze pBRS z magnezem (1mM MgCl₂) (+Mg²⁺ – warunki fizjologiczne). Po zakończeniu inkubacji wymieniano 100 % buforu pBRS na świeżą, podgrzaną

pożywkę hodowlaną (37°C). Materiał do dalszych badań pobierano: 2, 6 i 24 godziny po indukcji wyładowań epileptopodobnych.

5.2.11.5 Test MTT

Żywołność komórek określano z zastosowaniem metody kolorymetrycznej – testu MTT (Kim i Rhim 2004). Podczas inkubacji neuronów w buforze MTT zachodzi proces przekształcenia soli tetrazoilowych (MTT), przez aktywność dehydrogenazy mitochondrialnej, która jest znacznikiem żywych komórek, do formazynu, który następnie wytrąca się w postaci fioletowych kryształów (Kim i Rhim 2004).

Z dołka szalki 12-dołkowej odciągano 900 µl pożywki a następnie dodawano bufor MTT (#M5655, 0,25 mg/ml, Sigma-Aldrich) i inkubowano przez 2 godziny w inkubatorze (temperatura 37°C, 5 % CO₂). Następnie odciągano bufor MTT tak, aby na dnie dołka pozostały jedynie powstałe, kryształy. W celu rozpuszczenia kryształów dodawano 1080 µl DMSO a następnie pipetowano kilkakrotnie. Do dołków płytki 96-dołkowej nakładano po 100 µl uzyskanych próbek w trzech powtórzeniach. Następnie płytkę wytrząsano przez 3 sekundy. Reakcja kolorymetryczna mierzono przy długości fali $\lambda=570$ przy użyciu programu Ascent Software Vision, w aparacie Multiskan (Photometric Microplate Reader ThermoSystems Lab). Żywołność komórek sprawdzano: 2, 6 i 24 godziny po zakończeniu inkubacji komórek z buforem pBRS zawierającym magnezem lub bez magnezu. Uzyskane wyniki przeanalizowano w programie Excel (2016).

5.2.11.6 Barwienie immunofluorescencyjne komórek na szkiełkach

W celu sprawdzenia skuteczności transfekcji wirusa przeprowadzono barwienie immunocytochemiczne komórek pochodzących z hodowli komórkowej założonej na szkiełkach. Hodowlę komórek na szkiełkach opisano w rozdziale 5.2.11.2. Dołki przepłukiwano roztworem PBS (2 ml/dołek) przez 3 minuty w temperaturze pokojowej, a następnie komórki utrwalano w roztworze 4 % paraformaldehydu (PFA) zawieszonym w 0,1 M bufor PB przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Następnie dołki przepłukano 3 razy po 5 minut roztworem PBS. Szkiełka inkubowano przez 45 minut w buforze 1 % T-PBS, po czym ponownie płukano trzykrotnie buforem 0,1 % T-PBS. Następnie blokowano przez godzinę w roztworze: 2 % BSA (surowicza albumina bydlęca, ang. *bovine serum albumin*) i 2 % surowicy koziej (ang. *normal goat serum*) i 2 % surowicy oślej (ang. *normal donkey serum*) zawieszonych w 0,1 % T-PBS. Następnie szkiełka inkubowano przez noc w roztworze z pierwszorzędowym przeciwciałem przeciwko Neun (**Tabela 1**, rozdział 5.1.1), rozcieńczonym 1:500 w 0,1 % T-PBS w temperaturze

4°C. Po trzykrotnym przepłukaniu buforem 0,1 % T-PBS skrawki inkubowano z przeciwciałem drugorzędowym sprzężonym z barwnikiem fluorescencyjnym Alexa Fluor 647, rozcieńczonym 1:1000 w 0,1 % T-PBS przez 90 minut. Po ponownym trzykrotnym płukaniu przeprowadzono inkubację z Hoechst (ThermoFisher) rozcieńczonym 1:1000 w 0,1 % T-PBS przez 15 minut. Na szkiełko podstawowe nakropiono Vectashield® Mounting Medium (#H-1000, Vector Laboratories) a następnie kładziono na nie szkiełko, na które wysiewano hodowle. Gotowe preparaty przechowywano w temperaturze 4°C, chroniąc przed ekspozycją na światło. Zdjęcia hodowli wykonano z zastosowaniem mikroskopu Olympus VS110.

5.2.11.7 Izolacja białek z hodowli pierwotnej neuronów korowych

W celu pozyskania ekstraktów białkowych z hodowli komórkowej, szalki dwukrotnie płukano zimnym buforem PBS. Następnie do każdego z dołków dodawano 70 µl buforu do lizy zawierającego: 0,5 % Tritonx100, 0,5 M KCL, 0,5 M PIPES, 1 M MgCl₂, 0,5 M EGTA, 1x stężony koktajl inhibitorów proteaz, 100 mM PMSF, 1 M DTT, zawieszonych w wodzie dejonizowanej MiliQ. Za pomocą skrobaczki do hodowli odrywano komórki od podłoża, a następnie przenoszono ekstrakt do probówki i zamrażano w -20°C. Zamrożone próbki rozmrażano na lodzie a następnie wirowano w temperaturze 4°C przez 20 minut z szybkością 11000 rpm. Uzyskany nadsącz przenoszono do nowych probówek a następnie ponownie wirowano w temperaturze 4°C (20 minut, 11000 rpm). Otrzymany ekstrakt białkowy przenoszono do nowej probówki a stężenie otrzymanego białka mierzono metodą Bradforda opisaną w podrozdziale 5.2.7.2. Tak przygotowane ekstrakty białkowe przechowywano w temperaturze -80°, a następnie wykorzystano do sprawdzenia poziomu białka metodą Western Blot. Metoda Western Blot została opisana w rozdziale 5.2.7.3.

5.2.11.8 Izolacja RNA z hodowli pierwotnej neuronów korowych

W celu wyizolowania RNA z hodowli komórkowej, szalkę dwukrotnie przepłukiwano sterylnym, zimnym buforem PBS. Po odciągnięciu buforu dodawano 400 µl Qiazolu (#79306, Qiagen) na dołek płytki 12-dołkowej, a następnie inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej delikatnie mieszając. Otrzymany homogenat pipetowano kilkakrotnie, przenoszono do probówek i dodawano 80 µl chloroformu (#C0549-1PT, Sigma). Próbkę wirowano przez 30 sekund, a następnie inkubowano przez 10-15 minut w temperaturze pokojowej do rozdzielenia się faz. Po zakończeniu inkubacji odciągano górną, wodną fazę. Dalszy ciąg procedury izolacji RNA przeprowadzano zgodnie z protokołem zestawu do izolacji RNA: RNeasy Mini Kit (#74104, Qiagen). Pomiar ilości RNA przeprowadzono na spektrofotometrze Nanodrop (DS-11

Spectrophotometer, DeNovix) przy długości fali $\lambda = 260$ nm i 280 nm. Wyizolowane RNA przechowywano w temperaturze -80°C .

5.2.11.9 Sekwencjonowanie

5.2.11.9.1 Biblioteki cDNA do sekwencjonowania mRNA

RNA pochodzące z hodowli pierwotnej neuronów korowych poddano sekwencjonowaniu w Pracowni Sekwencjonowania Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego. Jakość pozyskanego RNA została sprawdzona przy pomocy parametru RIN (ang. *RNA integrity number*) przy użyciu urządzenia Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) oraz odczytników Agilent RNA 6000 Nano Kit i Pico RIN. Biblioteki cDNA przygotowano z próbek, w których wartość RIN wyniosła powyżej 7 (skala od 0 do 10).

Przygotowanie bibliotek cDNA do sekwencjonowania zostało wykonane z zastosowaniem zestawu KAPA Stranded mRNAseq Kit (KAPA Biosystem Ltd), według zaleceń producenta. Izolację mRNA z puli całkowitego RNA (materiał wyjściowy 500 ng) przeprowadzono przy użyciu kulek magnetycznych zawierających przyłączone ogonki poli-T. Dzięki temu uzyskano specyficzne wiązanie z cząsteczkami polyA+ mRNA. Próbkę poddano fragmentacji termicznej w temperaturze 94°C przez 5 min. Następnie przeprowadzono przepisywanie mRNA na cDNA, na drodze odwrotnej transkrypcji, w którym kolejno syntetyzowana jest pierwsza i druga nić cDNA. Pierwsza nić cDNA syntetyzowana jest z użyciem starterów, które losowo przyłączają się do wszystkich fragmentów RNA (ang. *random primers*). Uzyskana przejściowa, hybrydowa struktura cDNA-RNA została następnie przekształcona w dwuniciowe cDNA z włączeniem fosfatazy dUTP (ang. *deoxyuridine triphosphate*) do drugiej nici. Specyficzność nici została uzyskana w czasie przeprowadzonej syntezy komplementarnego łańcucha nici cDNA. Następnie, przeprowadzono oczyszczanie dwuniciowego cDNA za pomocą kulek magnetycznych AMPure XT, analogicznie do procedury opisanej powyżej. Następnie kulki suszono w temperaturze pokojowej. Wysuszone kulki poddano ligacji sekwencji adaptorowych przy pomocy mieszaniny reakcyjnej. Następnie przeprowadzono procedurę reakcji PCR dla końcowej amplifikacji biblioteki. Profil termiczny reakcji PCR zamieszczono w **Tabeli 7**.

Tabela 7. Profil termiczny reakcji PCR dla końcowej amplifikacji biblioteki cDNA.

	Temperatura (°C)	Czas (s)
Etap I	98	45
Etap II	98	15
	60	30
	72	30
Etap III	72	300
Przechowywanie	4	-

W celu uzyskania odpowiedniego stężenia bibliotek przeprowadzono 11 cykli reakcji PCR. Po zakończonej reakcji, do mieszaniny dodano kulki AMPure XP (1:1). Końcowe stężenie oraz czystość próbek (zakres prawidłowy 1,8-2,2, pomiar wartości A260/A280) sprawdzono przy pomocy urządzenia Nanodrop (Thermo Scientific) oraz za pomocą odczynników QuatiFluor dsDNA System (Promega) i urządzenia Quantus Fluorometer (Promega). Natomiast, jakość uzyskanej biblioteki cDNA oceniono przy zastosowaniu zestawu odczynników Agilent High Sensitivity DNA Kit oraz urządzenia Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies).

5.2.11.9.2 Sekwencjonowanie nowej generacji

Sekwencjonowanie nowej generacji (ang. *new generation sequencing*) przeprowadzono w w Pracowni Sekwencjonowania Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, z zastosowaniem sekwenatora NovaSeq6000 (Illumina). Biblioteki zostały zsekwencjonowane w trybie sparowanych końców (ang. *paired-end sequencing*), liczba cykli 2x 101. Przed rozpoczęciem sekwencjonowania biblioteki doprowadzono do równej molarności wynoszącej 1,9 nM. Przygotowane biblioteki denaturowano przy użyciu 0,2 M wodorotlenku sodu, a następnie inkubowano 8 minut w temperaturze pokojowej. Reakcję zatrzymano przy użyciu 400 mM TrisHCl. Pojedyncze sekwencjonowanie, z użyciem chemii S1 pozwoliło na uzyskanie co najmniej 1,3 mld odczytów.

5.2.11.9.3 Analiza bioinformatyczna danych transkryptomycznych

Analiza bioinformatyczna została przeprowadzona w Pracowni Sekwencjonowania Instytutu Nenckiego. Dane uzyskane na drodze sekwencjonowania, w postaci plików fastq, porównano do referencyjnego genomu szczura rn6 przy zastosowaniu programu STAR (Dobin i wsp. 2013). Odczyty dla poszczególnych genów zliczono za pomocą algorytmu featureCountas (Liao, Smyth i Shi 2014) i znormalizowano metodą FPKM (ang. *fragments per kilobase of*

transcription per milion fragments mapped) (Zhao i wsp. 2021). Ilościowa analiza porównawcza w celu wyodrębnienia różnic w poziomie ekspresji poszczególnych genów została przeprowadzona z zastosowaniem metody DESeq2 (Love, Huber i Anders 2014). Przypisywanie genów do szlaków regulatorowych zostało przeprowadzone w programie R z zastosowaniem pakietu clusterProfiler oraz z zastosowaniem KEGG (ang. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (Yu i wsp. 2012).

W celu zbadania wzorów ekspresji genów, w hodowlach po transfekcji odpowiednimi konstrukcjami wirusowymi wykonano analizę skupień, w programie R z zastosowaniem pakietu Mfuzz Clustering.

5.2.11.9.4 Analiza funkcjonalna danych transkryptomycznych

Analizę nadreprezentacji motywów wiązania czynników transkrypcyjnych w grupach genów wykonano przy użyciu programu g:Profiler (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>).

Analizę funkcjonalną dla skupień zawierających grupy genów o podobnych wzorach ekspresji przeprowadzono w bazie Reactome (<https://reactome.org/>).

5.2.12 Analiza statystyczna

Wykresy zamieszczone w niniejszej rozprawie zostały sporządzone przy użyciu programu GraphPad Prism (wersja 5, GraphPad Software). Przy analizie uzyskanych wyników posłużono się testem t-Studenta, Chi-square oraz jednoczynnikową analizą ANOVA, z poprawką Bonferroniego.

Test t-studenta został zastosowany przy analizie wyników pochodzących z: przeprowadzonych testów behawioralnych, obserwacji EEG, wyników uzyskanych z testu PTZ, wyników uzyskanych podczas modelu rozniecania PTZ, w których porównywano grupę zwierząt po iniekcji wirusa obniżającego lub wywołującego nadekspresję *Mbd3* z grupą zwierząt kontrolnych. Test ten zastosowano również dla porównania wyników poziomu mRNA i białka dla poszczególnych grup zwierząt w odpowiednich punktach czasowych, a także wyników uzyskanych z testu MTT.

Test Chi-square przeprowadzono w celu sprawdzenia różnic między grupami zwierząt w stopniach rozwijanych drgawek ostrych indukowanych iniekcji progowej dawki PTZ.

Jednoczynnikowa ANOVA została zastosowana do zbadania poziomu ekspresji mRNA dla wybranych genów, na podstawie wyników sekwencjonowania, w celu porównania wyników poziomu mRNA i białka pomiędzy grupami zwierząt i wszystkimi punktami czasowymi,

Analizę jednoczynnikową ANOVA dla prób powtórzonych (ang. *ANOVA for repeated measures*) przeprowadzono dla rozwoju drgawek w poszczególnych sesjach w modelu rozniecania PTZ.

Istotność statystyczną obliczono w programie GraphPad Prism (v.5, GraphPad Software), a następnie oznaczono dla * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ oraz *** $p < 0,001$. Na wykresach przedstawiono wyniki zaprezentowano w postaci średnia \pm błąd standardowy (SEM).

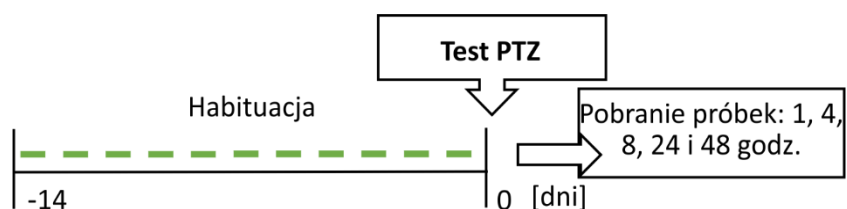
6. Wyniki

6.1 Ocena wpływu drgawek na ekspresję genu *Mbd3* oraz poziom białka *Mbd3* *in vivo*

Z doświadczeń przeprowadzonych przez Bednarczyk i wsp. w naszej pracowni wynika, że białko *Mbd3* może uczestniczyć w procesie rozwoju padaczki, w szczurzym modelu padaczki skroniowej indukowanej stanem padaczkowym wywołanym elektryczną stymulacją ciała migdałowatego. Bednarczyk i współpracownicy odkryli, że białko *Mbd3* oraz mRNA *Mbd3* ulegają ekspresji w neuronach, astrocytach i mikrogleju, oraz że poziom białka *Mbd3* wzrasta w ciele migdałowatym oraz korze gruszkowatej u zwierząt z padaczką, 14 dni po zainicjowaniu rozwoju padaczki (Bednarczyk i wsp. 2016).

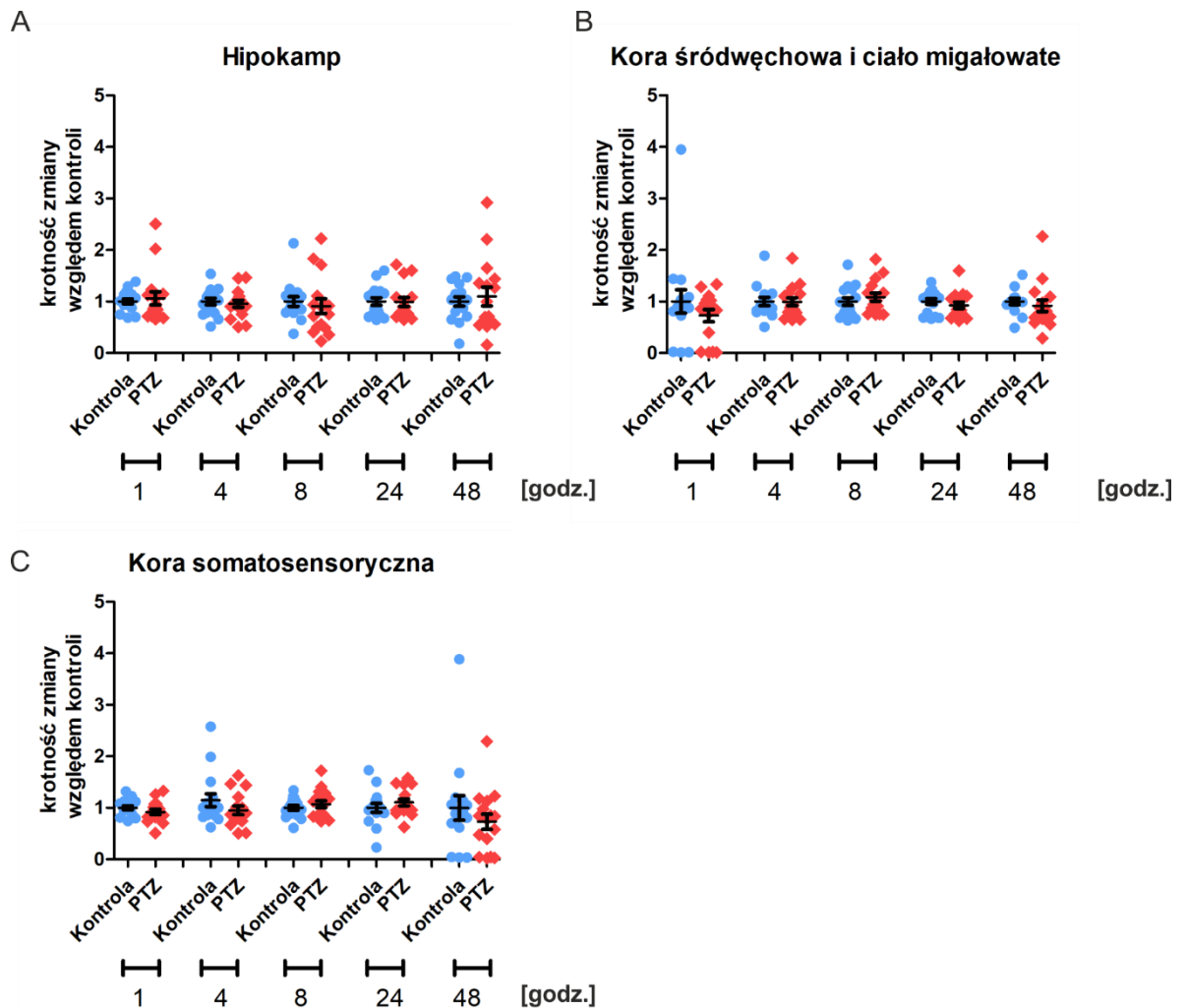
Ponieważ z poprzednich badań nie było jasne, czy wzrost poziomu *Mbd3* jest spowodowany mechanizmami zaangażowanymi w proces epileptogenezy, czy też jest efektem wystąpienia drgawki, w niniejszej rozprawie sprawdziliśmy, czy ekspresja genu *Mbd3* oraz poziom białka *Mbd3* ulegają zmianie na skutek drgawki. W tym celu zastosowaliśmy model ostrej drgawki wywołanej pentylenetetrazolem (PTZ), który został opisany w rozdziale 5.2.4.

Szczurom Sprague-Dawley, po 14 dniowej habituacji, podano dootrzewnowo PTZ, w dawce 50 mg/kg masy ciała (n=80). Szczury z grupy kontrolnej otrzymały iniekcję soli fizjologicznej (NaCl, n=80) (**Rycina 6.1.1**). Intensywność wywołanych drgawek była oceniana na podstawie skali Racine'a (rozdział 5.2.4, **Tabela 4**). U wszystkich zwierząt zaobserwowano drgawki toniczno-kloniczne, zidentyfikowane jako drgawki stopnia 4 i 5 w skali Racine'a. Poziom mRNA i białka zbadano w wybranych punktach czasowych: 1, 4, 8, 24 i 48 godzin po wystąpieniu drgawki (n=16 dla poszczególnych grup doświadczalnych).



Rycina 6.1.1 Schemat doświadczenia przeprowadzonego w celu sprawdzenia wpływu drgawki toniczno-klonicznej wywołanej iniekcją PTZ na ekspresję mRNA *Mbd3* i poziom białka *Mbd3* w mózgu szczura.

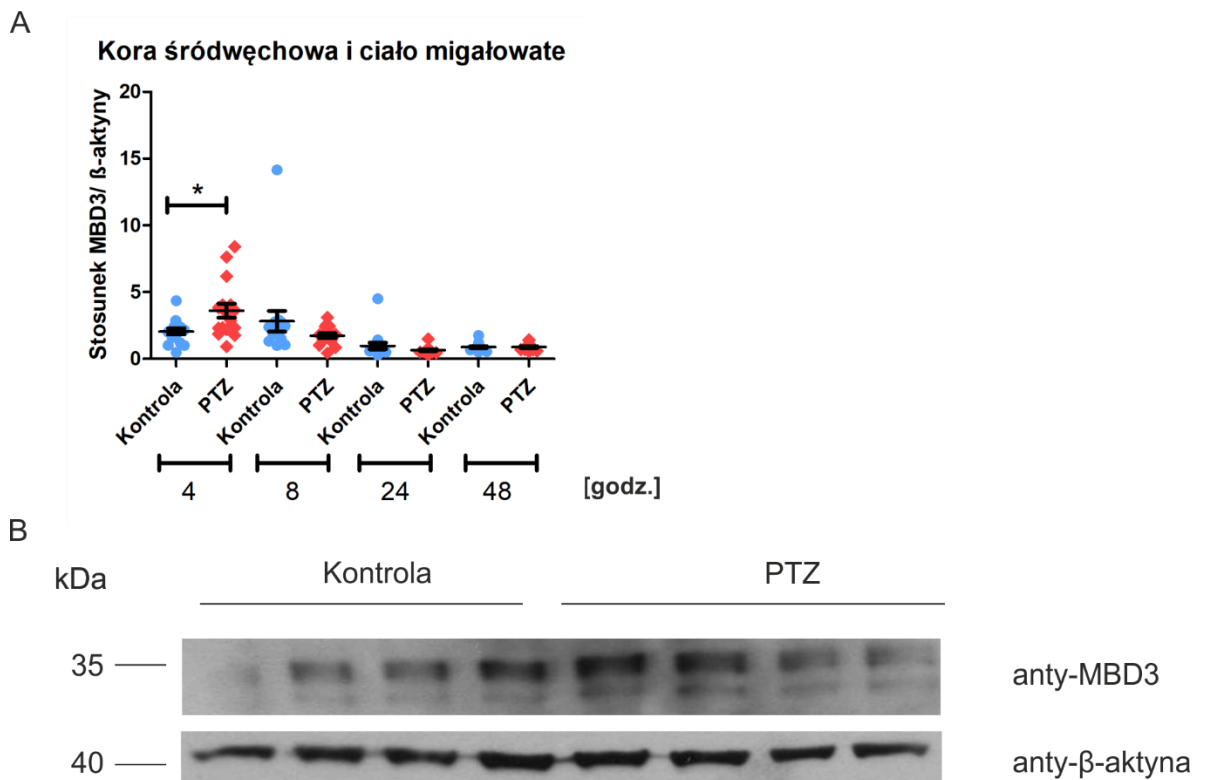
Poziom mRNA *Mbd3* został sprawdzony w ekstraktach pochodzących z hipokampa, kory śródwęchowej i ciała migdałowatego oraz kory somatosensorycznej (**Rycina 6.1.2**). Nie zaobserwowano zmian w poziomie mRNA *Mbd3* między zwierzętami kontrolnymi, a zwierzętami, u których wywołano drgawkę toniczno-kloniczną, w badanych punktach czasowych.



Rycina 6.1.2 Poziom mRNA *Mbd3* w hipokampie (A), w korze śródwęchowej i ciele migdałowatym (B) oraz w korze somatosensorycznej (C), w wybranych punktach czasowych po wywołaniu drgawki, u zwierząt kontrolnych oraz zwierząt, u których wywołano drgawkę toniczno-kloniczną za pomocą podania PTZ (średnia \pm SEM, T-test, n=16).

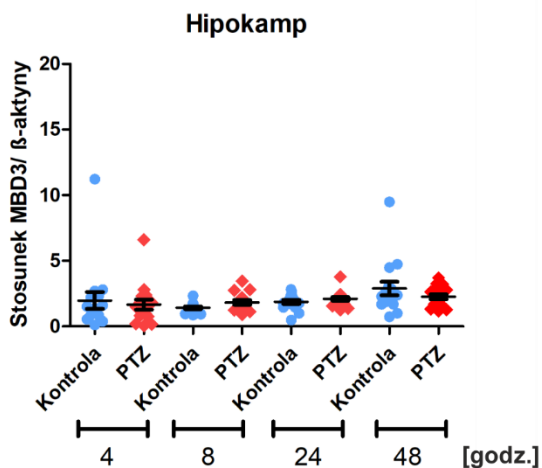
Następnie, metodą Western Blot, opisaną w rozdziale 5.2.7.3, zbadano poziom białka *Mbd3* 4, 8, 24 i 48 godzin po wystąpieniu drgawki w tkance pochodzącej z hipokampa, kory śródwęchowej i ciała migdałowatego oraz kory somatosensorycznej. Zaobserwowano, że drgawka spowodowała wzrost poziomu białka *Mbd3*, w korze śródwęchowej i ciele

migdałowatym po 4 godzinach od momentu wystąpienia drgawki (Kontrola: $2,1 \pm 0,2$; PTZ: $3,6 \pm 0,5$; $*p=0,0118$, $n=16$) (**Rycina 6.1.3**). Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w korze śródwęczowej 8, 24 i 48 godzin po wywołaniu drgawki (**Rycina 6.1.3 A**) ani w próbkach pochodzących z hipokampa oraz kory somatosensorycznej w żadnym punkcie czasowym (**Rycina 6.1.4**).

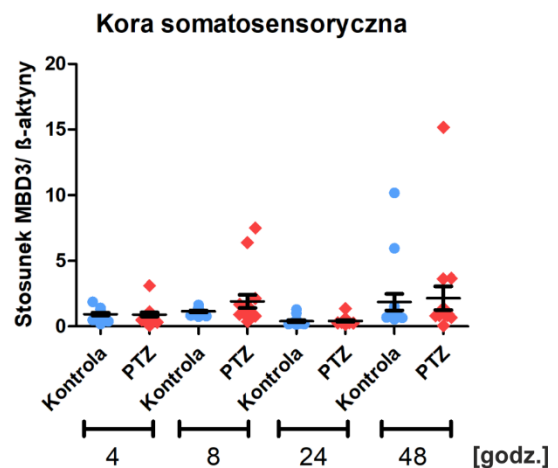


Rycina 6.1.3 Poziom białka Mbd3 w korze śródwęczowej po wywołaniu drgawki za pomocą PTZ. (A) Poziom białka Mbd3 w korze śródwęczowej i ciele migdałowatym 4, 8, 24 i 48 godzin po wywołaniu drgawki (średnia \pm SEM, T-test, $* p<0,05$) (B) oraz przykładowy obraz Western Blot pokazujący zmiany w poziomie białka Mbd3 na przykładzie 8 zwierząt w korze śródwęczowej 4 godziny po wywołaniu drgawki.

A



B



Rycina 6.1.4 Poziom białka Mbd3 w hipokampie (A) i korze somatosensorycznej (B) 4, 8, 24 i 48 godzin po wywołaniu drgawki za pomocą PTZ (średnia \pm SEM, T-test, n=16).

6.2 Ocena działania wirusów do obniżenia ekspresji i nadekspresji Mbd3 *in vitro* i *in vivo*.

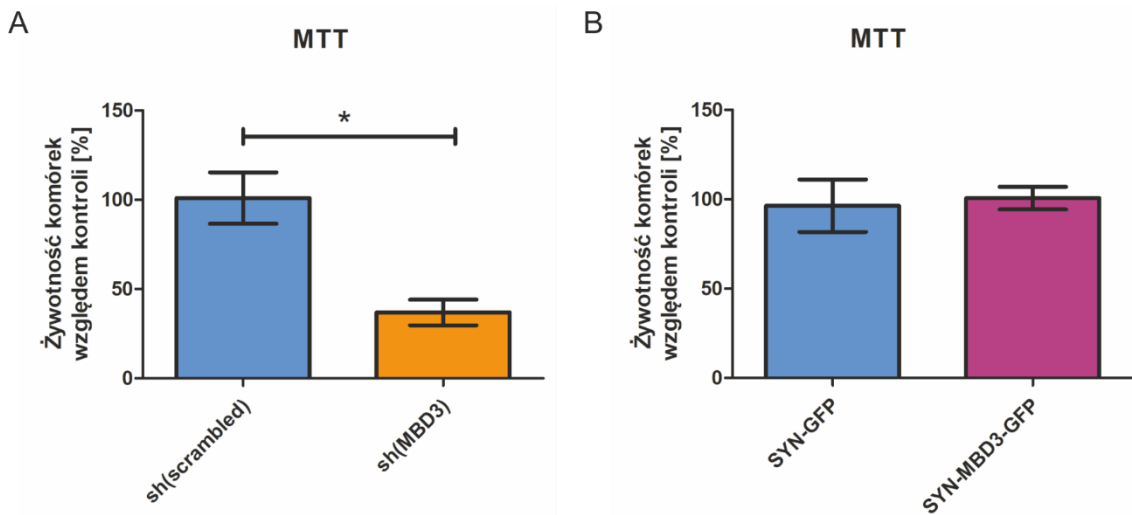
W celu modyfikacji poziomu ekspresji Mbd3 zastosowano komercyjnie przygotowane wirusy do obniżenia ekspresji i do nadekspresji Mbd3. Wszystkie stosowane wirusy zostały opisane w rozdziale 5.1.5. Działanie wirusów zostało sprawdzone w hodowli pierwotnej neuronów korowych oraz *in vivo*, po mikroiniekcji do mózgu. Zastosowane metody *in vitro* zostały opisane w rozdziale 5.2.11, natomiast procedura wykonania iniekcji wirusów do mózgu szczura została opisana w rozdziale 5.2.2.

6.2.1 Ocena działania wirusów do obniżenia i nadekspresji Mbd3 w hodowli pierwotnej neuronów korowych.

W celu określenia wpływu wirusów na poziom białka Mbd3 wykonano analizę metodą Western Blot z przeciwciałem skierowanym przeciwko białku Mbd3. Żywotność neuronów w hodowli sprawdzono testem MTT (opisany w rozdziale 5.2.11.5).

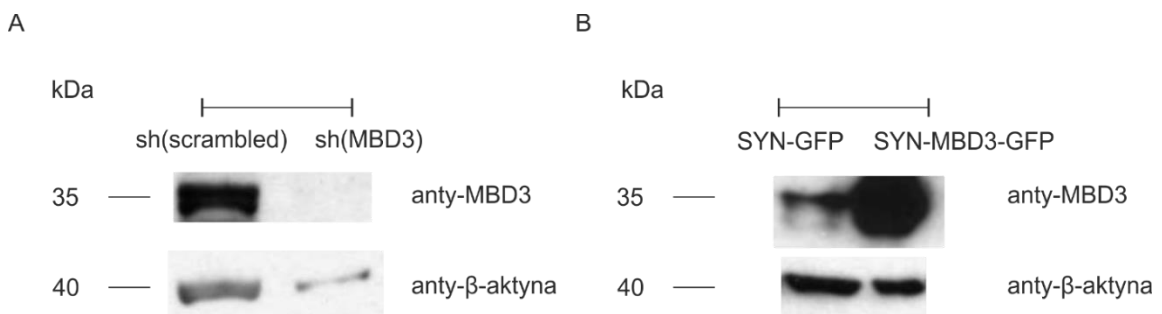
Zaobserwowano spadek żywotności komórek po transfekcji wirusem do obniżenia ekspresji Mbd3 (sh(MBD3)) 2 tygodnie po przeprowadzeniu transfekcji, w porównaniu do transfekcji z wirusem kontrolnym (sh(scrambled)) (sh(scrambled): $100,9 \pm 14,43$; sh(Mbd3): $36,88 \pm 7,239$; *p=0,0166, n=3) (**Rycina 6.2.1.1 A**).

Nie zaobserwowano również zmian w żywotności komórek po transfekcji wirusem do nadekspresji Mbd3 (SYN-MBD3-GFP), a także wirusem kontrolnym (SYN-GFP) (**Rycina 6.2.1.1 B**).



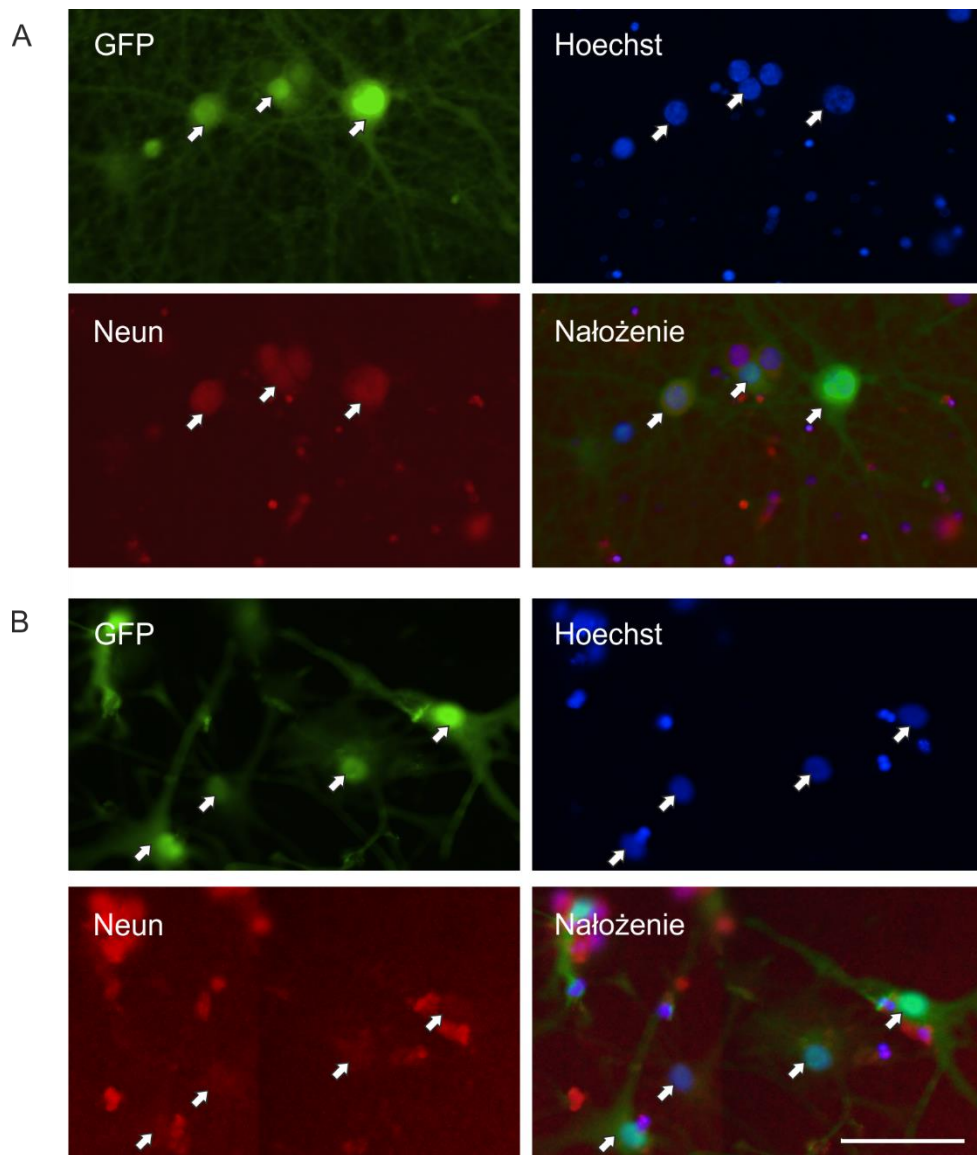
Rycina 6.2.1.1 Żywotność komórek 2 tygodnie po transfekcji wirusami do obniżenia ekspresji Mbd3 (A), nadekspresji (B) oraz odpowiednimi wirusami kontrolnymi. Wyniki testu MTT zostały obliczone na podstawie trzech niezależnych hodowli (średnia \pm SEM, T-test, * $p < 0,05$).

Następnie metodą Western Blot, opisaną w rozdziale 5.2.7.3, zbadano poziom białka Mbd3 w komórkach 2 tygodnie po transfekcji poszczególnymi wirusami. Zaobserwowano obniżenie ekspresji po transfekcji wirusem sh(MBD3), w porównaniu do kontroli (sh(scrambled)) (**Rycina 6.2.1.2 A**). Natomiast po transfekcji wirusem do nadekspresji Mbd3 (SYN-MBD3-GFP) wykazano wzrost poziomu białka, w porównaniu do komórek transfekowanych wirusem kontrolnym (SYN-GFP) (**Rycina 6.2.1.2 B**).

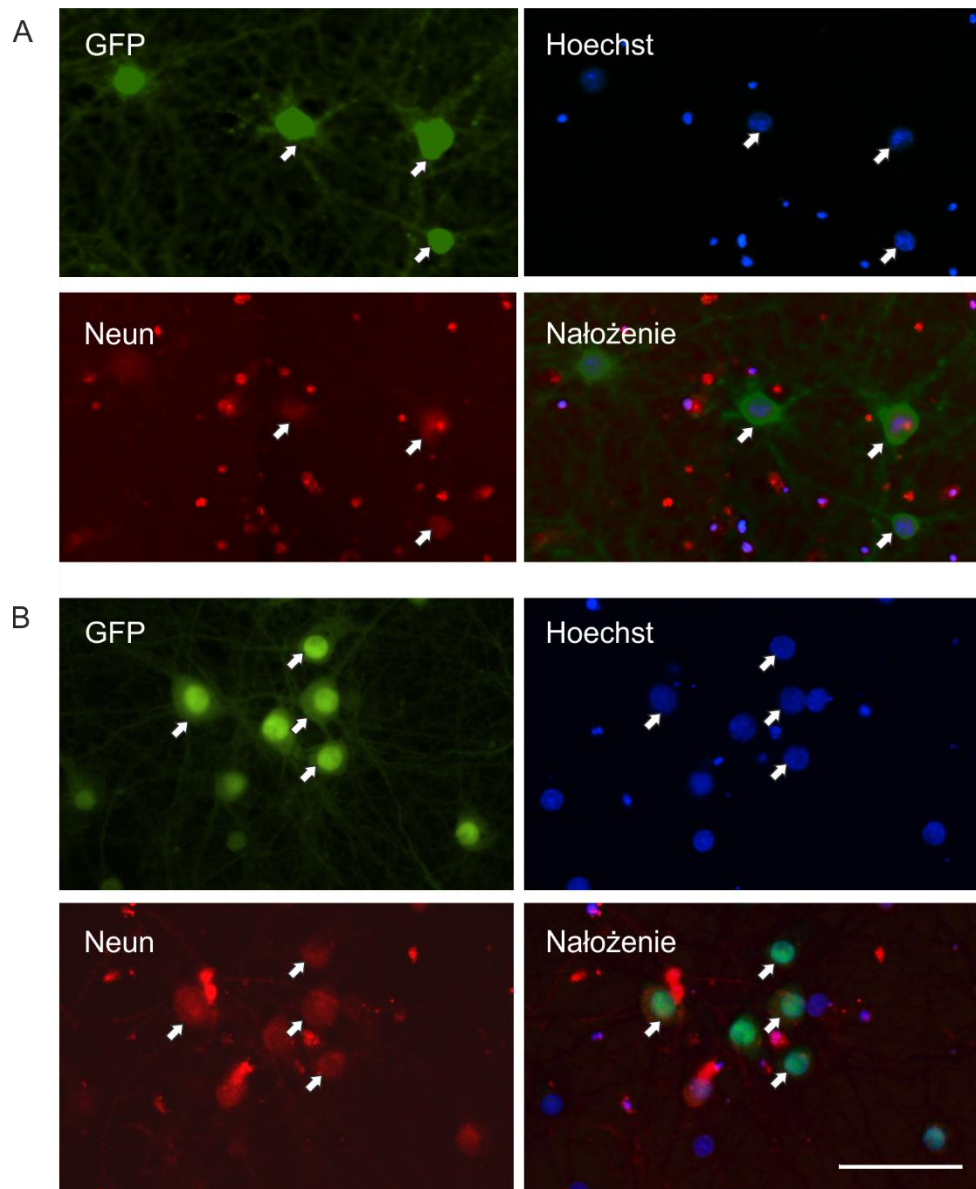


Rycina 6.2.1.2 Poziom białka Mbd3 2 tygodnie po transfekcji wirusem do obniżenia ekspresji Mbd3 (sh(MBD3)) (A), wirusem do nadekspresji (SYN-MBD3-GFP) (B) oraz odpowiednimi wirusami kontrolnymi (sh(scrambled) i SYN-GFP) (A, B) w hodowli pierwotnej neuronów korowych.

W celu sprawdzenia lokalizacji ekspresji zastosowanych w niniejszej pracy wirusów w hodowli pierwotnej neuronów korowych wykonano barwienie immunofluorescencyjne. Procedurę barwienia opisano w rozdziale 5.2.11.6. Zaobserwowano obecność wirusa do obniżenia ekspresji Mbd3 (sh(MBD3)), wirusa do nadekspresji Mbd3 (SYN-MBD3-GFP) oraz odpowiadających im wirusom kontrolnym w neuronach.



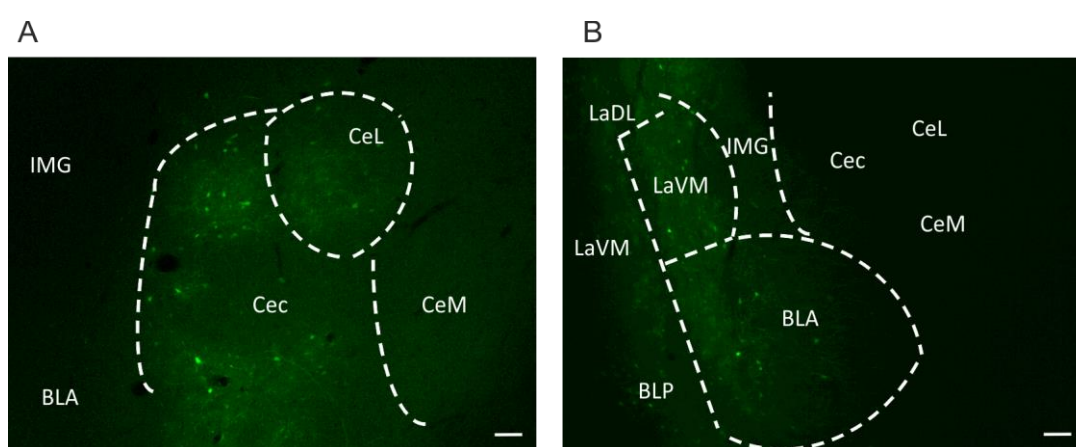
Rycina 6.2.1.3 Lokalizacja ekspresji wirusa kontrolnego (sh(scrambled) GFP) (A) oraz wirusa do obniżenia poziomu białka Mbd3 (sh(MBD3) GFP) (B), w hodowli pierwotnej neuronów korowych 2 tygodnie po transfekcji. Przykładowe obrazy barwienia immunofluorescencyjnego z zastosowaniem przeciwciała anti-Neun (znacznik neuronów, kolor czerwony) oraz odczynnika Hoechst (znacznik jąder komórkowych, kolor niebieski). Skala: 50 μ m.



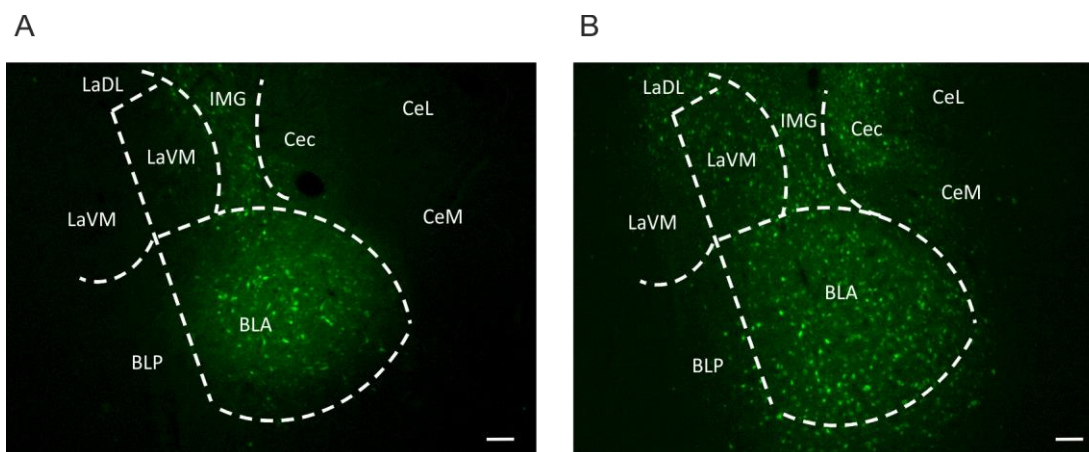
Rycina 6.2.1.4 Lokalizacja ekspresji wirusa kontrolnego (SYN-GFP) (A) oraz wirusa do nadekspresji białka Mbd3 (SYN-MBD3-GFP) (B) w hodowli pierwotnej neuronów korowych, 2 tygodnie po transfekcji. Przykładowe obrazy barwienia immunofluorescencyjnego z zastosowaniem przeciwciała anti-Neun (znacznik neuronów, kolor czerwony) oraz odczynnika Hoechst (znacznik jąder komórkowych, kolor niebieski). Skala: 50 μ m.

6.2.2 Ekspresja wirusów po iniekcji do mózgu szczura.

W celu sprawdzenia ekspresji i rozprzestrzeniania się poszczególnych wirusów w mózgu szczura zbadano tkankę pobraną 2 tygodnie po iniekcji wirusów do BLA. Opis perfuzji i przygotowania tkanki został przedstawiony w rozdziale 5.2.6.2. Miejsce iniekcji wirusa określono identyfikując koniec traktu igły na skrawkach wybarwionych metodą Nissla. Obszar, w którym rozprzestrzenił się wirus udokumentowano na podstawie fluorescencji (**Ryciny: 6.2.2.1, 6.2.2.2**). Ekspresję wirusów zaobserwowano w obszarze ciała migdałowatego oraz w przylegających obszarach kory i prążkowie.



Rycina 6.2.2.1 Ekspresja i rozprzestrzenianie się wirusów w mózgu szczura. A – rozprzestrzenienie się wirusa kontrolnego dla obniżenia ekspresji (sh(scrambled)) (szczur nr 02_22_02_22), B - rozprzestrzenienie się wirusa do obniżenia ekspresji Mbd3 (sh(MBD3))(szczur nr 02_07_02_22) w mózgu szczura. Oznaczenia: BLA – jądro migdałowe podstawno boczne (ang. *Basolateral amygdaloid nucleus*), Cec – jądro migdałowe środkowe, część otoczkowa (ang. *Central amygdala nucleus, capsular*), CeL – jądro migdałowe środkowe, część boczna (ang. *Central amygdaloid nucleus, lateral*), CeM – jądro migdałowe środkowe, część przyśrodkowa (ang. *Central amygdala nucelus, medial*), BLP – jądro migdałowe podstawne boczne, część tylna (ang. *Basolateral amygdala nucleus, posterior*), LaVM – jądro migdałowe boczne, część brzuszno-przyśrodkowa (ang. *Lateral amygdaloid nucleus, ventromedial*), LaDL – jądro migdałowe boczne, część grzbietowo-boczna (ang. *Lateral amygdaloid nucleus, dorsal-lateral*), IMG – jądro migdałowe, część śródrdzeniowa szara (ang. *Amygdaloid intramedullary gray*). Skala 100 μm .



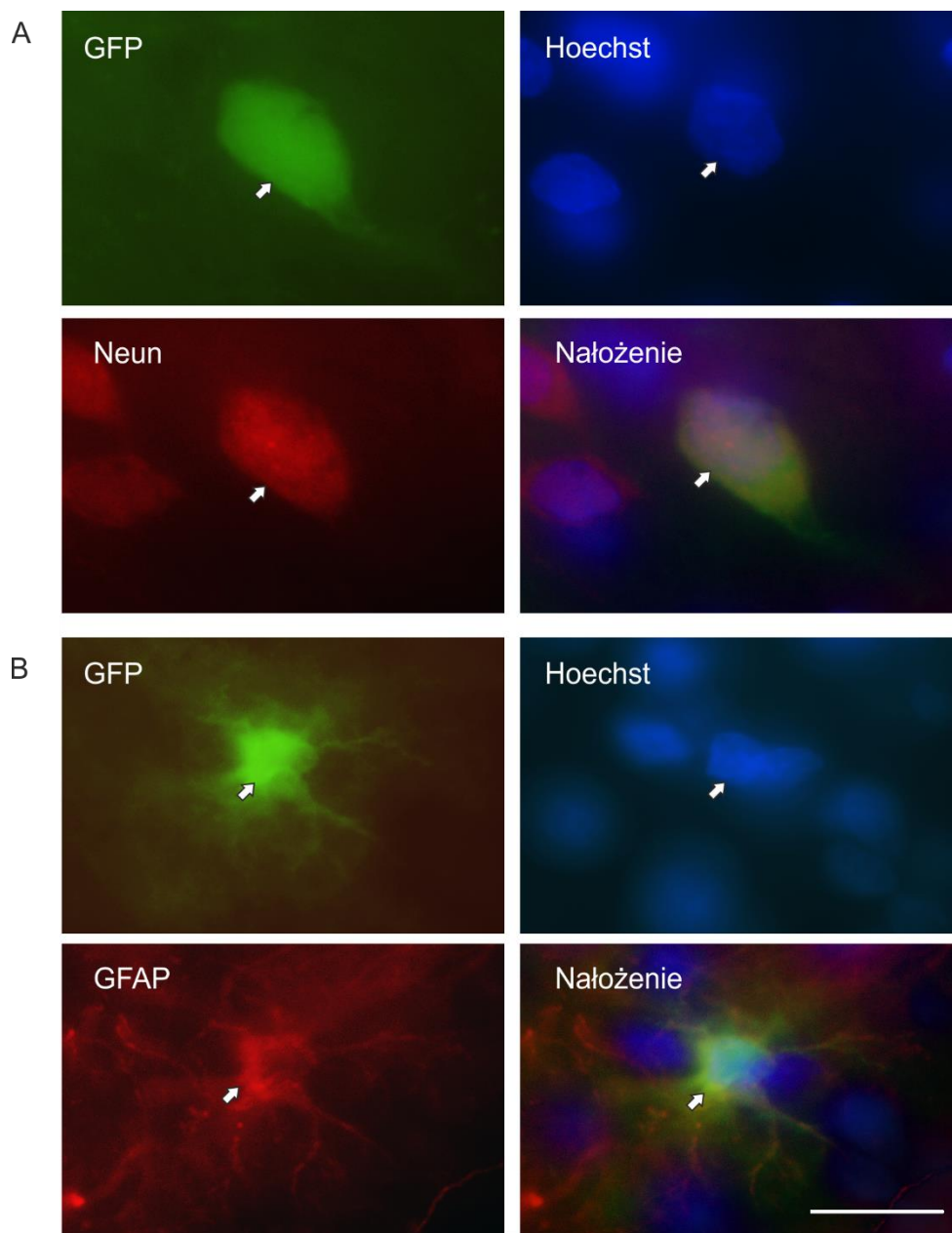
Rycina 6.2.2.2 Ekspresja i rozprzestrzenianie się wirusów w mózgu szczura. A – rozprzestrzenienie się wirusa kontrolnego dla nadekspresji (SYN-GFP) (szczur nr 03_23_02_22), B - rozprzestrzenienie się wirusa do nadekspresji Mbd3 (SYN-MBD3-GFP) (szczur nr 03_07_03_22) w mózgu szczura. Oznaczenia: BLA – jądro migdałowe podstawno boczne (ang. *Basolateral amygdaloid nucleus*), Cec – jądro migdałowe środkowe, część otoczkowa (ang. *Central amygdala nucleus, capsular*), CeL – jądro migdałowe środkowe, część boczna (ang. *Central amygdaloid nucleus, lateral*), CeM – jądro migdałowe środkowe, część przyśrodkowa (ang. *Central amygdala nucelus, medial*), BLP – jądro migdałowe podstawne boczne, część tylnia (ang. *Basolateral amygdala nucleus, posterior*), LaVM – jądro migdałowe boczne, część brzuszno-przyśrodkowa (ang. *Lateral amygdaloid nucleus, ventromedial*), LaDL – jądro migdałowe boczne, część grzbietowo-boczna (ang. *Lateral amygdaloid nucleus, dorsal-lateral*), IMG – jądro migdałowe, część śródrdzeniowa szara (ang. *Amygdaloid intramedullary gray*). Skala 100 μ m.

Lokalizację komórkową ekspresji wirusów, po iniekcji do BLA mózgu szczura, zbadano na podstawie barwień immunofluorescencyjnych z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko markerom neuronów i astrocytów (**Ryciny 6.2.2.3-6**). Procedurę barwienia opisano w rozdziale 5.2.10.

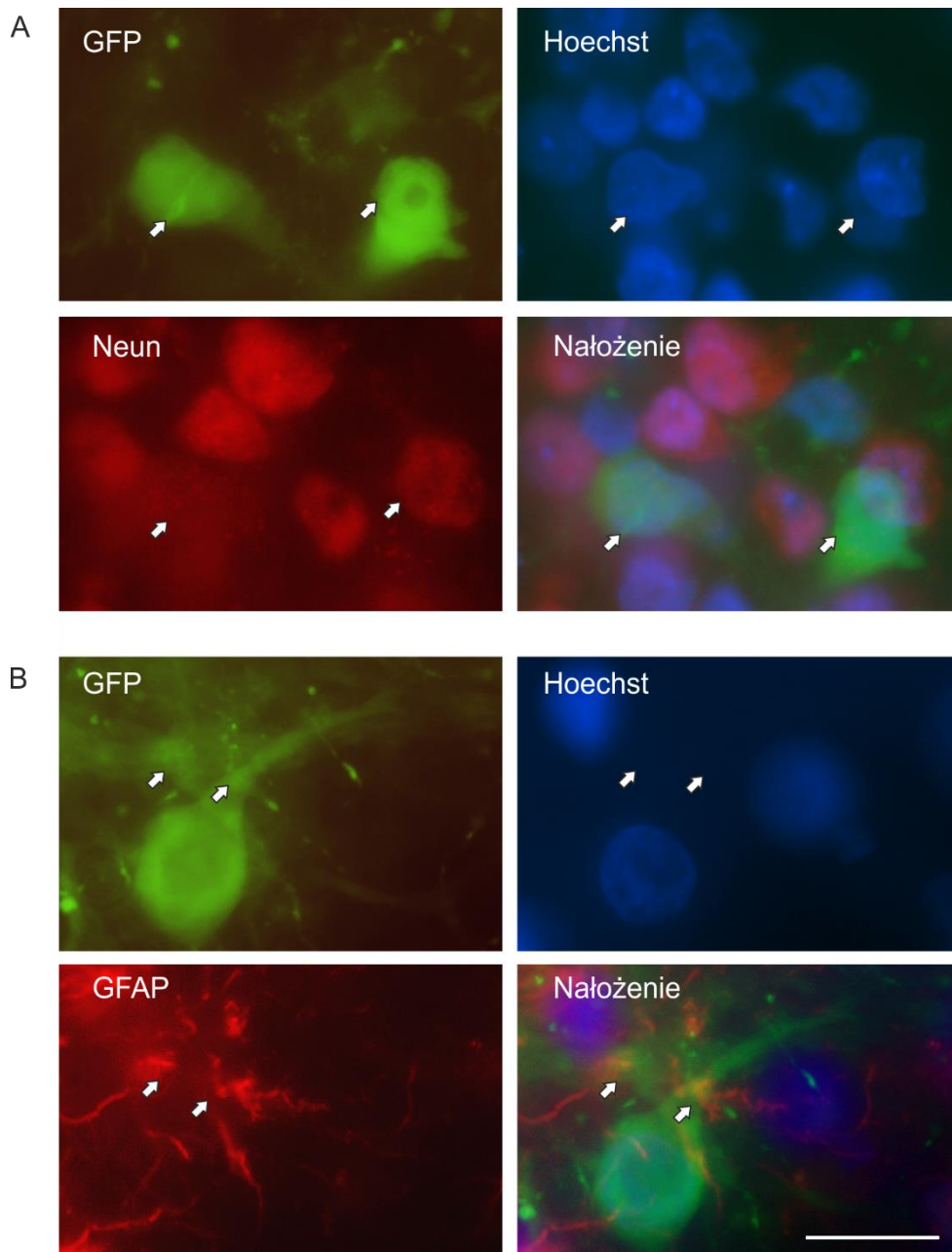
Obecność egzogenego białka Mbd3 wyznakowanego białkiem reporterowym GFP i produkowanego przez wirus do nadekspresji Mbd3 (SYN-MBD3-GFP) oraz wirusa kontrolnego (SYN-GFP) produkującego białko reporterowe GFP zaobserwowano tylko w neuronach (**Rycina 6.2.2.5 i 6.2.2.6**).

Wirus obniżający ekspresję Mbd3 (sh(MBD3)), a także wirus kontrolny (sh(scrambled)) ulega ekspresji w neuronach i nielicznych astrocytach (**Rycina 6.2.2.3 i 6.2.2.4**).

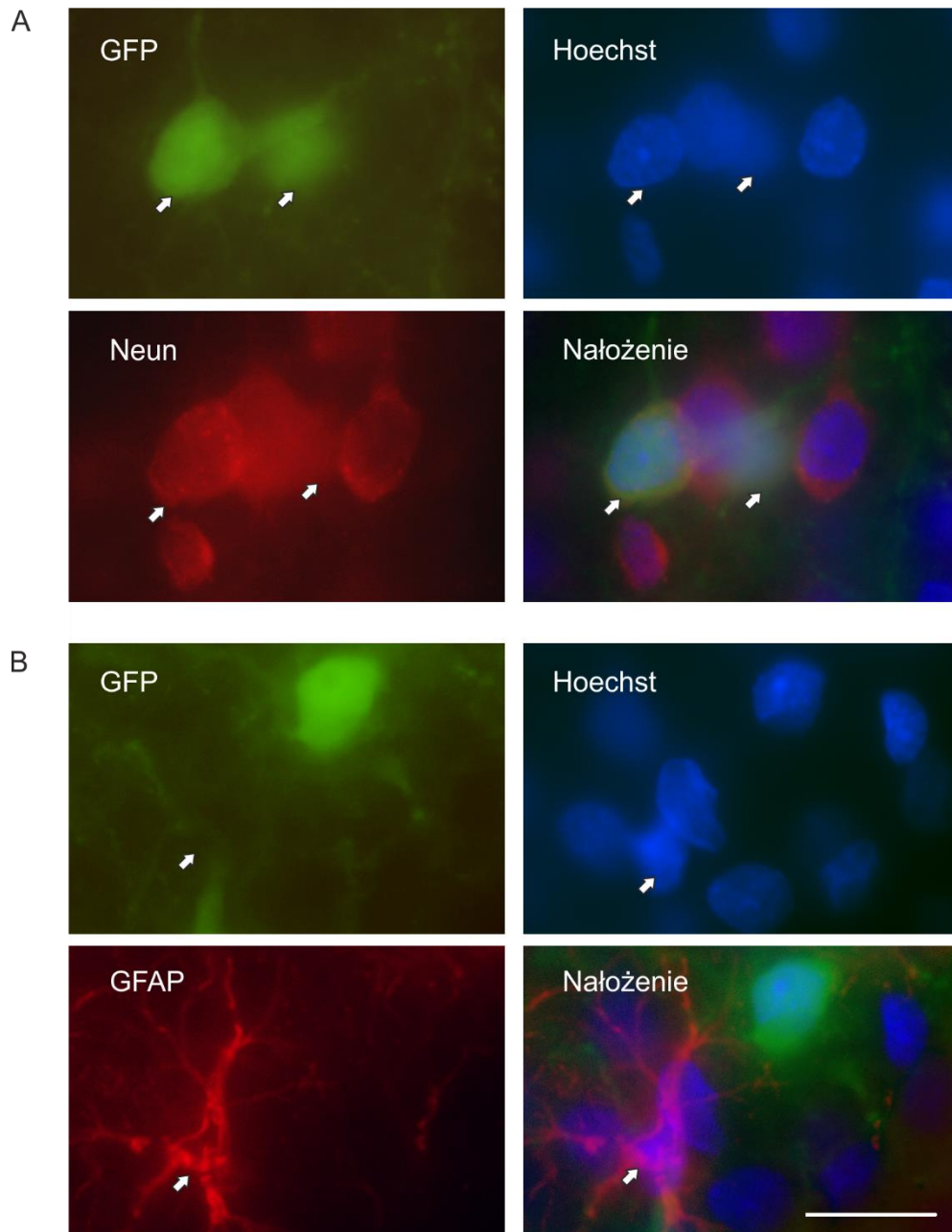
Co ciekawe, w neuronach z obniżonym poziomem Mbd3 oraz w neuronach stransfekowanych wirusem kontrolnym sh(scrambled), zaobserwowano zmiany morfologii w postaci zgrubień wypustek neuronów. Większą liczbę zgrubień obserwowano w rejonach bliższych miejscu iniekcji wirusa w BLA. W części zgrubień wykryto również nagromadzenie białka MAP2 (**Rycina 6.2.2.7**).



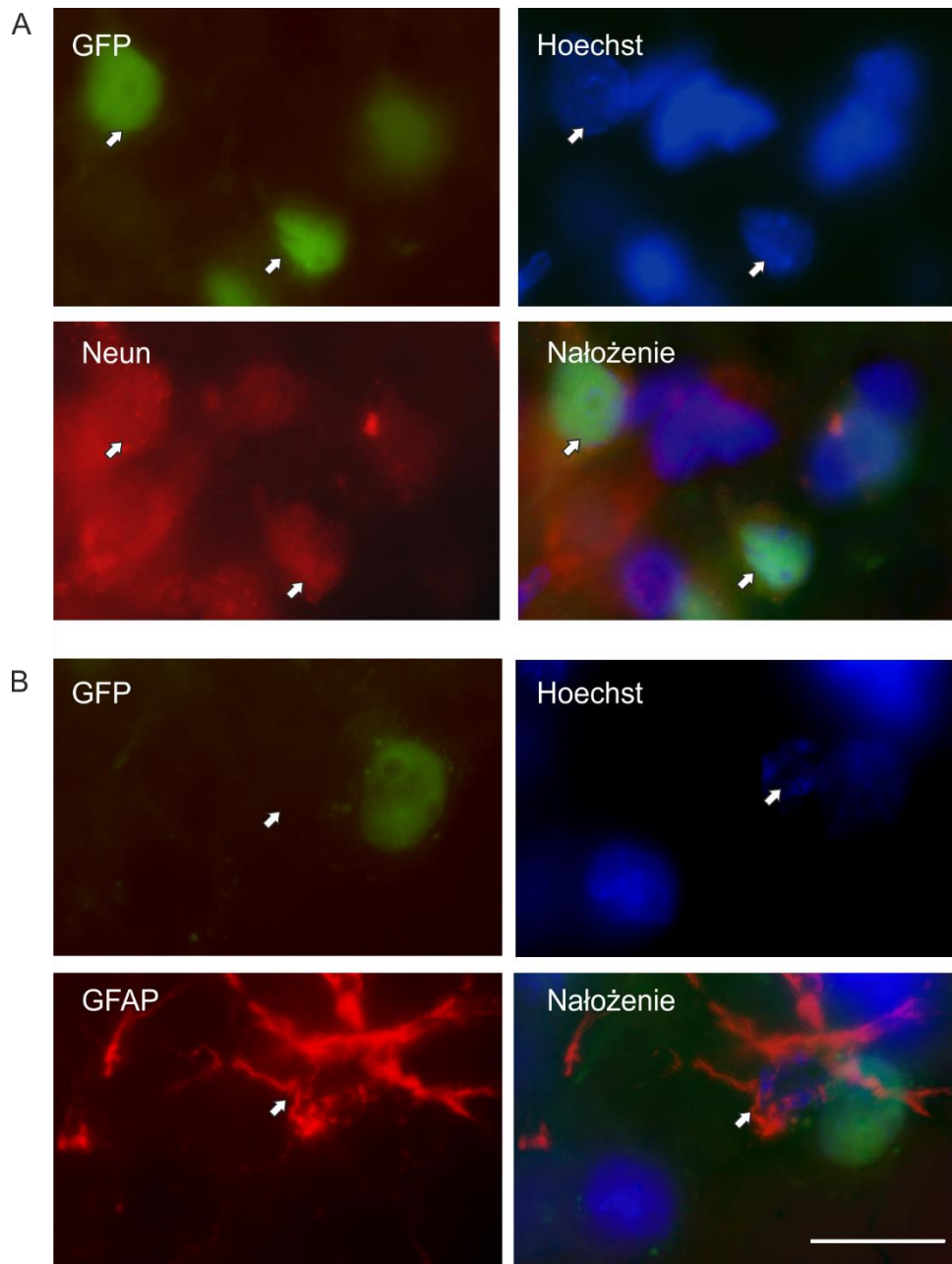
Rycina 6.2.2.3 Lokalizacja komórkowa ekspresji wirusa kontrolnego (sh(scrambled)) w mózgu szczura. Szczur numer 02_22_02_22. Przykładowe obrazy ekspresji wirusa z regionu BLA mózgu szczura, uzyskane w wyniku przeprowadzenia barwienia immunofluorescencyjnego z zastosowaniem przeciwciała anti-Neun (znacznik neuronów, kolor czerwony) (A), anti-GFAP (znacznik astrocytów, kolor czerwony) (B) oraz odczynnika Hoechst (znacznik jądra komórkowego, kolor niebieski)(A,B). Strzałkami oznaczono przykładowe neurony (A) oraz astrocyty (B) w których zidentyfikowano ekspresję wirusa kontrolnego. Skala: 25 μ m.



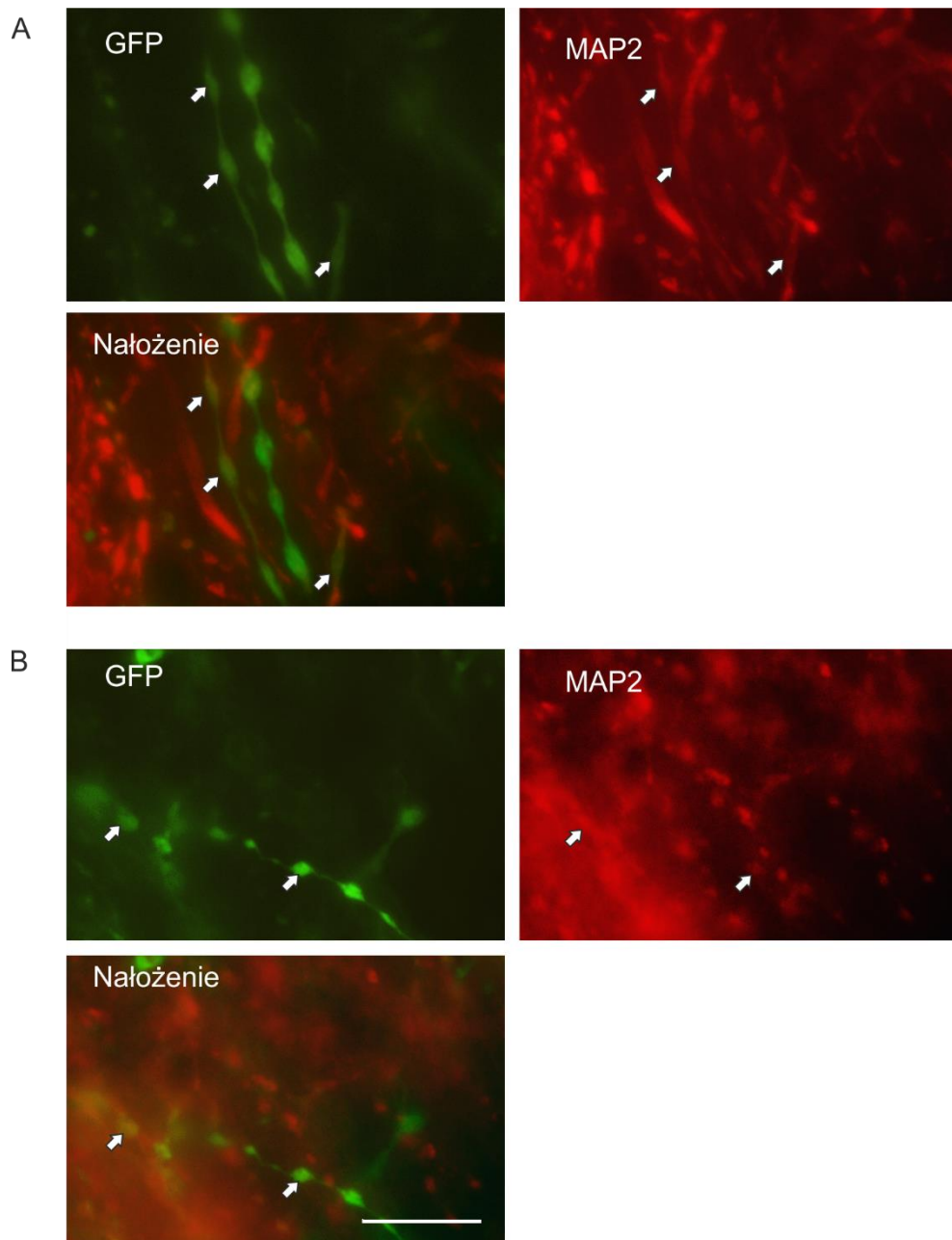
Rycina 6.2.2.4 Lokalizacja komórkowa ekspresji wirusa do obniżenia ekspresji *Mbd3* (sh(MBD3)) w mózgu szczura. Szczur numer 02_07_02_22. Przykładowe obrazy ekspresji wirusa z regionu BLA mózgu szczura, uzyskane w wyniku przeprowadzenia barwienia immunofluorescencyjnego z zastosowaniem przeciwciała anti-Neun (znacznik neuronów, kolor czerwony) (A), anti-GFAP (znacznik astrocytów, kolor czerwony) (B) oraz odczynnika Hoechst (znacznik jądra komórkowego, kolor niebieski)(A,B). Strzałkami oznaczono przykładowe neurony (A) oraz astrocyty (B) w których zidentyfikowano ekspresję wirusa obniżającego ekspresję *Mbd3*. Skala: 25 μ m.



Rycina 6.2.2.5 Lokalizacja komórkowa ekspresji wirusa kontrolnego (SYN-GFP) dla nadekspresji w mózgu szczura. Szczur numer 03_23_02_22 Przykładowe obrazy ekspresji wirusa z regionu BLA mózgu szczura, uzyskane w wyniku przeprowadzenia barwienia immunofluorescencyjnego z zastosowaniem przeciwciała anty-Neun (znacznik neuronów, kolor czerwony) (A), anty-GFAP (znacznik astrocytów, kolor czerwony) (B) oraz odczynnika Hoechst (znacznik jądra komórkowego, kolor niebieski)(A,B). Strzałkami oznaczono przykładowe neurony (A, B) w których zidentyfikowano ekspresję wirusa kontrolnego. Nie wykazano kolokalizacji w astrocytach (B). Skala: 25 μ m.



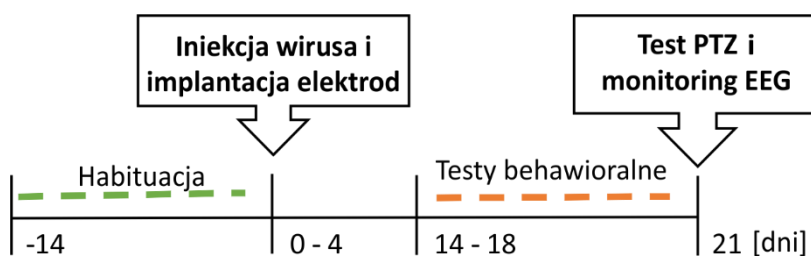
Rycina 6.2.2.6 Lokalizacja komórkowa ekspresji wirusa do nadekspresji Mbd3 (SYN-MBD3-GFP) w mózgu szczura. Szczur nrumer 03_23_02_22. Przykładowe obrazy ekspresji wirusa z regionu BLA mózgu szczura, uzyskane w wyniku przeprowadzenia barwienia immunofluorescencyjnego z zastosowaniem przeciwciała anty-Neun (znacznik neuronów, kolor czerwony) (A), anty-GFAP (znacznik astrocytów, kolor czerwony) (B) oraz odczynnika Hoechst (znacznik jądra komórkowego, kolor niebieski)(A,B). Strzałkami oznaczono przykładowe neurony (A, B) w których zidentyfikowano ekspresji białka Mbd3-GFP. Nie wykazano kolokalizacji w astrocytach (B). Skala: 25µm.



Rycina 6.2.2.7 Morfologia wypustek neuronów w mózgu szczura po transfekcji wirusem kontrolnym (sh(scrambled), szczur numer 02_22_02_22) (A) oraz wirusem do obniżenia ekspresji Mbd3 (sh(MBD3), szczur numer 02_07_02_22) (B). Przykładowe obrazy ekspresji wirusa z regionu BLA mózgu szczura, uzyskane w wyniku przeprowadzenia barwienia immunofluorescencyjnego z zastosowaniem przeciwciała anty-MAP2 (znacznik mikrotubul, kolor czerwony) Strzałkami oznaczono przykładowe zmienione wypustki neuronów (A, B) w których zidentyfikowano ekspresji produktu odpowiednio stosowanych wirusów. Skala: 50µm.

6.3 Wpływ obniżenia ekspresji genu *Mbd3* oraz zmniejszenia poziomu białka Mbd3 na zachowanie zwierząt i próg drgawkowy *in vivo*.

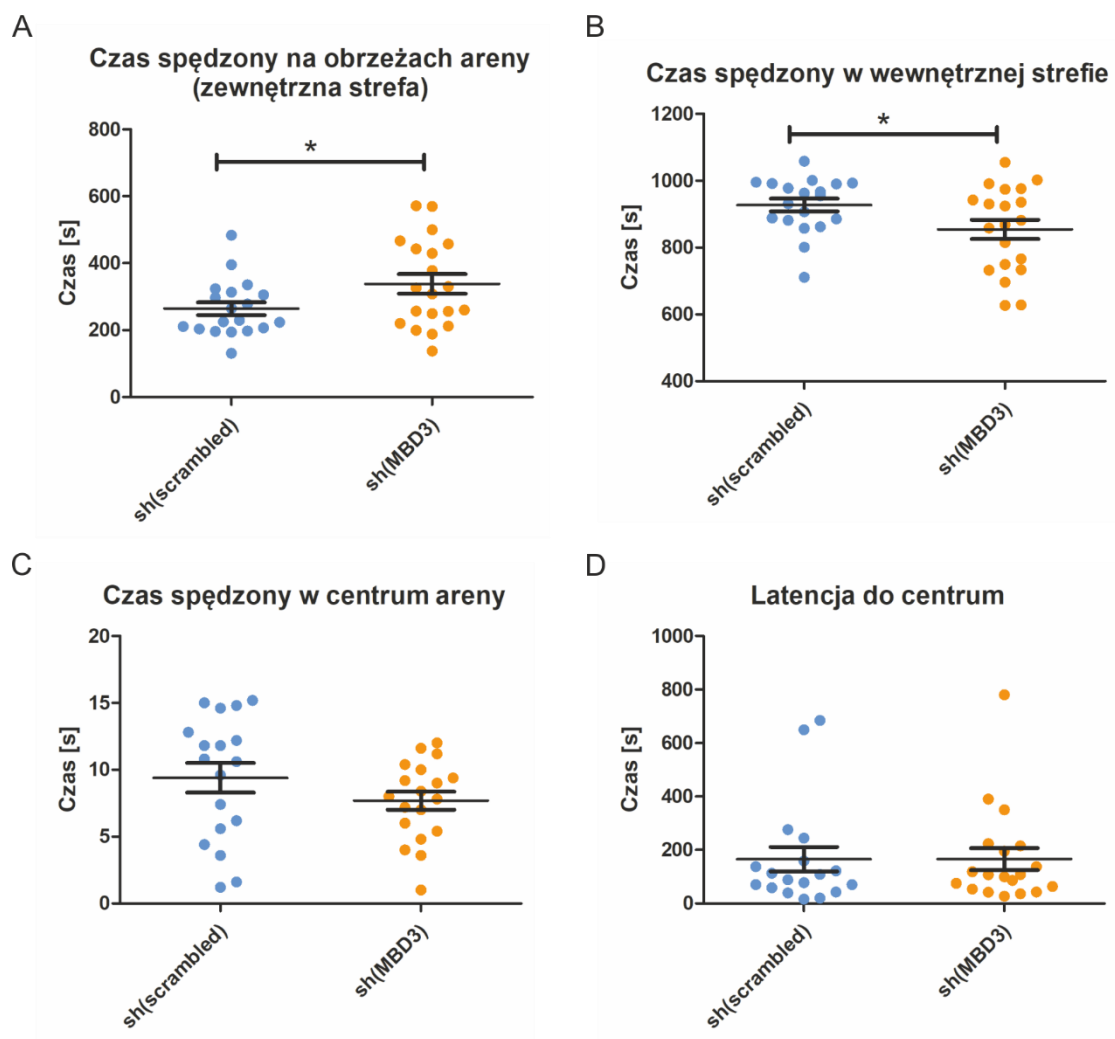
W niniejszej rozprawie postawiliśmy hipotezę mówiącą, że zmiany poziomu białka Mbd3 oraz ekspresji genu *Mbd3* mogą wpływać na próg drgawkowy. W celu przetestowania tej hipotezy przeprowadziliśmy iniekcję wirusa obniżającego ekspresję Mbd3 (sh(MBD3), n=20), oraz iniekcję wirusa kontrolnego (sh(scrambled), n=19), do obszaru BLA w mózgu szczura. Po okresie rekonwalescencji przeprowadzono następujące testy behawioralne: test reakcji na bodziec stresowy (14 dnia doświadczenia), test otwartego pola (17 dnia doświadczenia) oraz test uniesionego labiryntu krzyżowego (18 dnia doświadczenia). Po 2 dniach od zakończenia testów zwierzęta podłączono do systemu monitorowania EEG i wykonano test PTZ. Podczas testu zwierzęta doświadczalne były monitorowane przez 60 minut od momentu iniekcji dootrzewnowej PTZ. Zwierzętom kontrolnym podano dootrzewnowo sól fizjologiczną i nie były one monitorowane w systemie EEG. Schemat doświadczenia został przedstawiony na **Rycinie 6.3.1**.



Rycina 6.3.1 Schemat doświadczenia przeprowadzonego w celu oceny wpływu zmian ekspresji mRNA *Mbd3* oraz poziomu białka Mbd3 na zachowanie i próg drgawkowy *in vivo*.

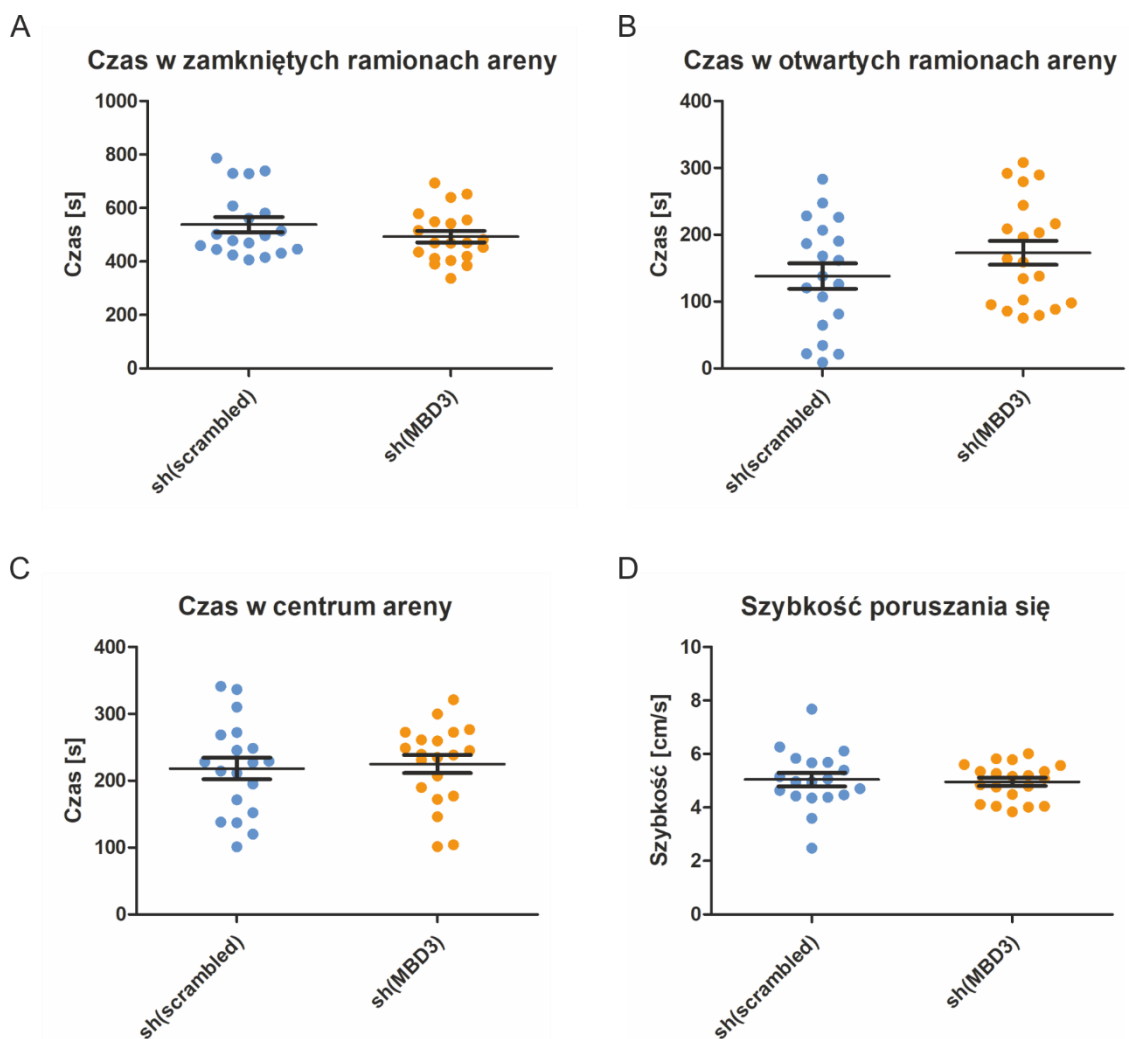
6.3.1 Wpływ obniżenia ekspresji genu *Mbd3* oraz poziomu białka Mbd3 na dobrostan i zachowanie zwierząt doświadczalnych.

W celu oceny wpływu wirusa obniżającego ekspresję Mbd3 na dobrostan i zachowanie zwierząt doświadczalnych, przeprowadzono serię testów behawioralnych. Poszczególne testy behawioralne zostały opisane w rozdziale 5.2.3.1. Nie zaobserwowano różnic pomiędzy zwierzętami kontrolnymi, a zwierzętami z obniżoną ekspresją *Mbd3* w teście reakcji na bodziec stresowy (**Rycina 6.3.1.1**).



Rycina 6.3.1.2 Test otwartego pola. Oceniano: czas spędzony na obrzeżach arenie (A), czas spędzony w wewnętrznej strefie (B), czas spędzony w centrum (C) oraz latencją do centrum arenie (D) (średnia \pm SEM, T-test, sh(scrambled) n=19, sh(MBD3) n=20, * p<0,05).

Następnego dnia po zakończeniu testu otwartego pola przeprowadzono test uniesionego labiryntu krzyżowego. Nie zaobserwowano różnic między grupą zwierząt z obniżoną ekspresją Mbd3 (sh(MBD3)), a grupą zwierząt kontrolnych w czasie spędzonym w zamkniętych i otwartych ramionach arenie, czasie spędzonym w centralnym punkcie arenie oraz szybkości poruszania się zwierząt (**Rycina 6.3.1.3**).

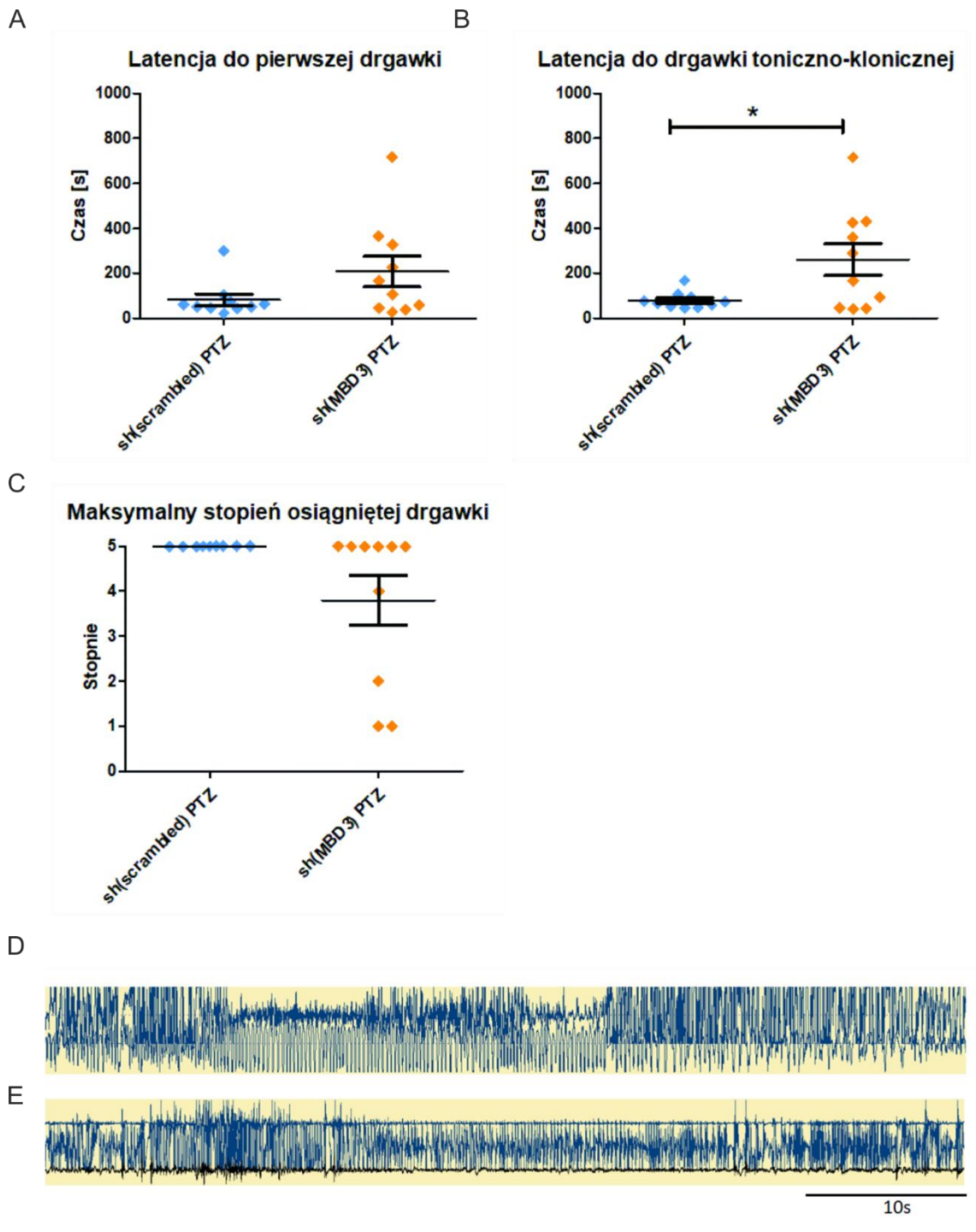


Rycina 6.3.1.3 Test uniesionego labiryntu krzyżowego: czas spędzony w zamkniętych (A) i otwartych (B) ramionach areny, czas spędzony w centralnym punkcie areny (C) oraz szybkość poruszania się zwierząt (D) (średnia \pm SEM, T-test, sh(scrambled) n=19, sh(MBD3) n=20).

6.3.2 Wpływ obniżenia ekspresji genu *Mbd3* oraz zmniejszenia poziomu białka *Mbd3* na próg drgawkowy

2 dni po zakończeniu testów behawioralnych, przeprowadzono test PTZ, opisany w rozdziale 5.2.4. Zwierzęta po otrzymaniu iniekcji dootrzewnowej były monitorowane i nagrywane w systemie EEG przez 60 minut (rozdział 5.2.5). Liczebność zwierząt wynosiła po 10 szczurów na grupę. 100% zwierząt kontrolnych, oznaczonych sh(scrambled) osiągnęło stopień 5 drgawki, natomiast tylko 70% zwierząt z obniżoną ekspresją *Mbd3*, oznaczone sh(MBD3) osiągnęło drgawkę toniczno-kloniczną stopnia 4-5 w skali Racine'a (**Rycina 6.3.2.1 B**). 30% zwierząt z obniżoną ekspresją *Mbd3* rozwinęło drgawki maksymalnie stopnia 1-2. Różnica ta nie osiągnęła znamienności statystycznej ($p=0,075$, Test Chi-square). Zaobserwowano statystycznie

istotne wydłużenie czasu latencji do drgawki toniczno-klonicznej u zwierząt z obniżoną ekspresją *Mbd3* w porównaniu do zwierząt kontrolnych (sh(scrambled) PTZ: 79,5±11,7; sh(*MBD3*) PTZ: 261,3±70,8; * p=0,0209) (Rycina 6.3.2.1 B).



Rycina 6.3.2.1 Wpływ obniżenia ekspresji *Mbd3* na wyniki testu PTZ. Oceniono: czas do pojawiania się drgawki w zapisie EEG (A), czas do pojawienia się drgawki toniczno-klonicznej stopnia 4-5 (B) oraz maksymalny stopień drgawki w skali Racine'a (C) (średnia ± SEM, T-test,

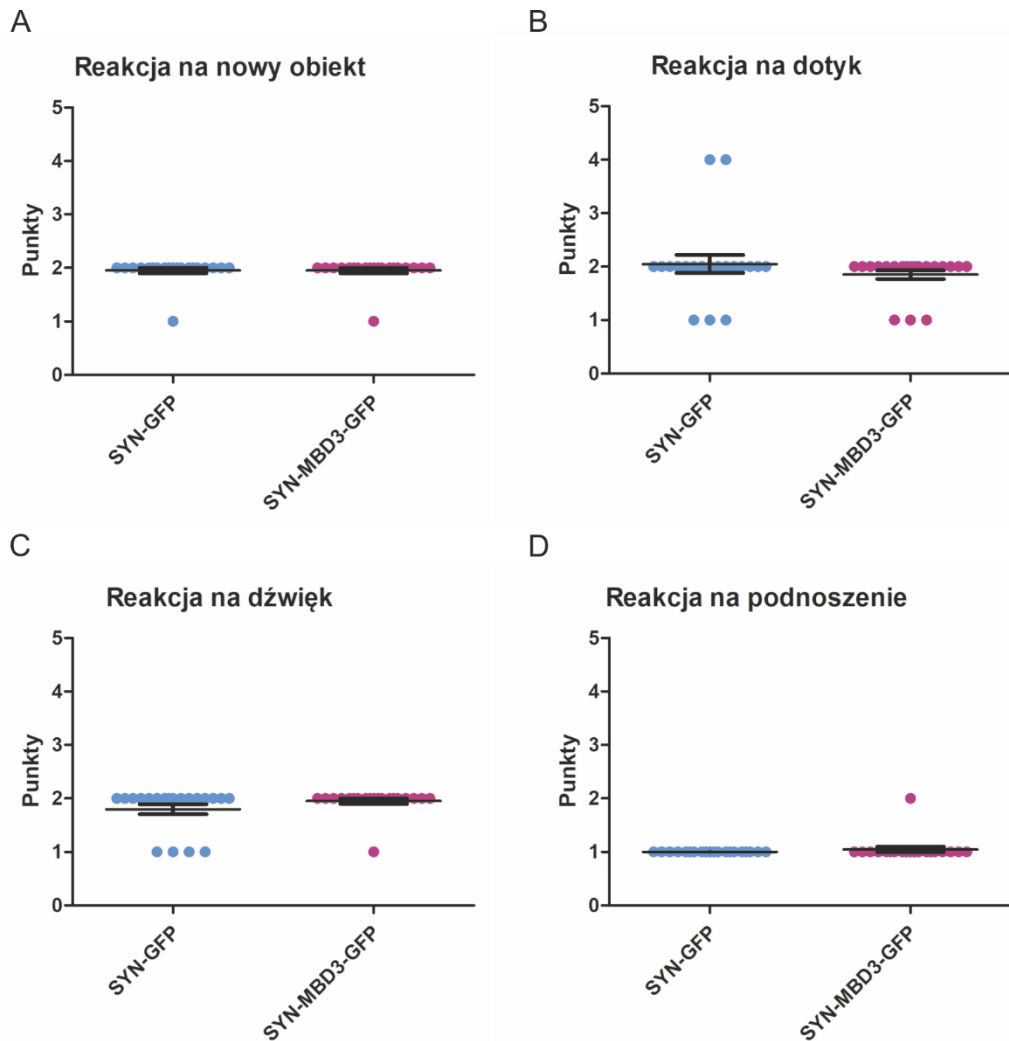
n=10, *p<0,05). Zarejestrowane, reprezentatywne drgawki wywołane iniekcją PTZ zaprezentowano dla szczura kontrolnego (numer szczura 11_24_06_20, sh(scrambled)) (D) oraz dla szczura z obniżoną ekspresją *Mbd3* (numer szczura 03_22_06_20, sh(MBD3)) (E). Zapis z elektrod umieszczonych nad korą mózgową.

6.4 Wpływ nadekspresji genu *Mbd3* oraz zwiększenia poziomu białka *Mbd3* na zachowanie zwierząt i próg drgawkowy.

W celu sprawdzenia czy wzrost poziomu białka *Mbd3* wpływa na próg drgawkowy wykonaliśmy test PTZ po iniekcji wirusa do nadekspresji *Mbd3* (SYN-MBD3-GFP, n=20) oraz wirusa kontrolnego (SYN-GFP, n=20). Analogicznie do poprzedniego doświadczenia, zwierzęta po dwutygodniowej habituacji zostały poddane zabiegowi implantacji elektrod i iniekcji wirusów do BLA. Po okresie rekonwalescencji zwierzęta poddano testom behawioralnym, a następnie zwierzęta podłączono do systemu monitorowania EEG i przeprowadzono test PTZ. Podczas testu zwierzęta doświadczalne były monitorowane przez 60 minut od momentu iniekcji dootrzewnowej PTZ. Natomiast zwierzęta kontrolne poddano iniekcji dootrzewnowej z soli fizjologicznej i nie były one monitorowane w systemie EEG. Schemat doświadczenia został przedstawiony na **Rycinie 6.3.1**.

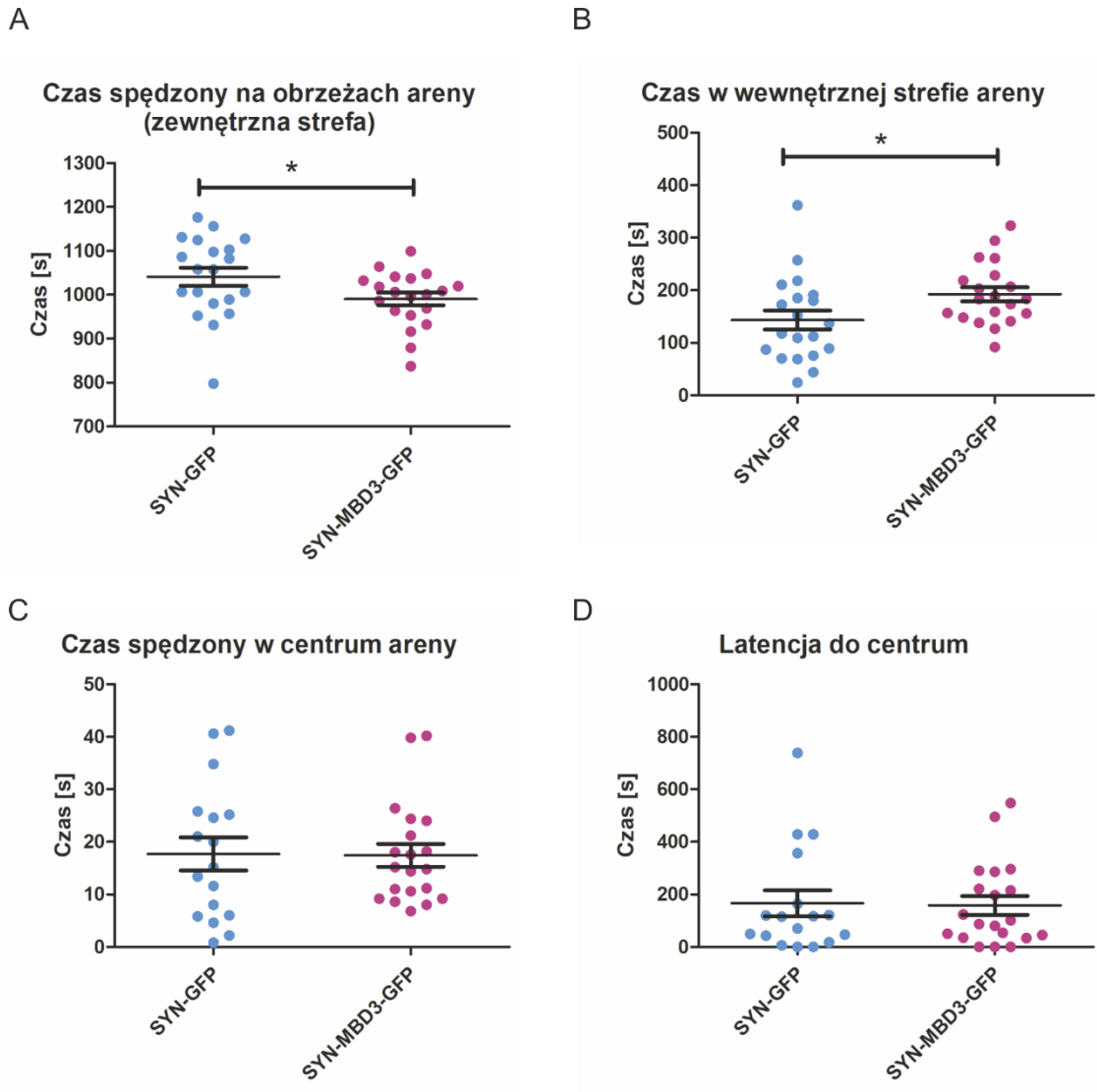
6.4.1 Wpływ nadekspresji genu *Mbd3* oraz zwiększenia poziomu białka *Mbd3* na dobrostan i zachowanie zwierząt doświadczalnych.

Nie zaobserwowano różnic pomiędzy zwierzętami kontrolnymi (SYN-GFP), a zwierzętami z nadekspresją *Mbd3* (SYN-MBD3-GFP) w teście reakcji na bodziec stresowy (**Rycina 6.4.1.1**).



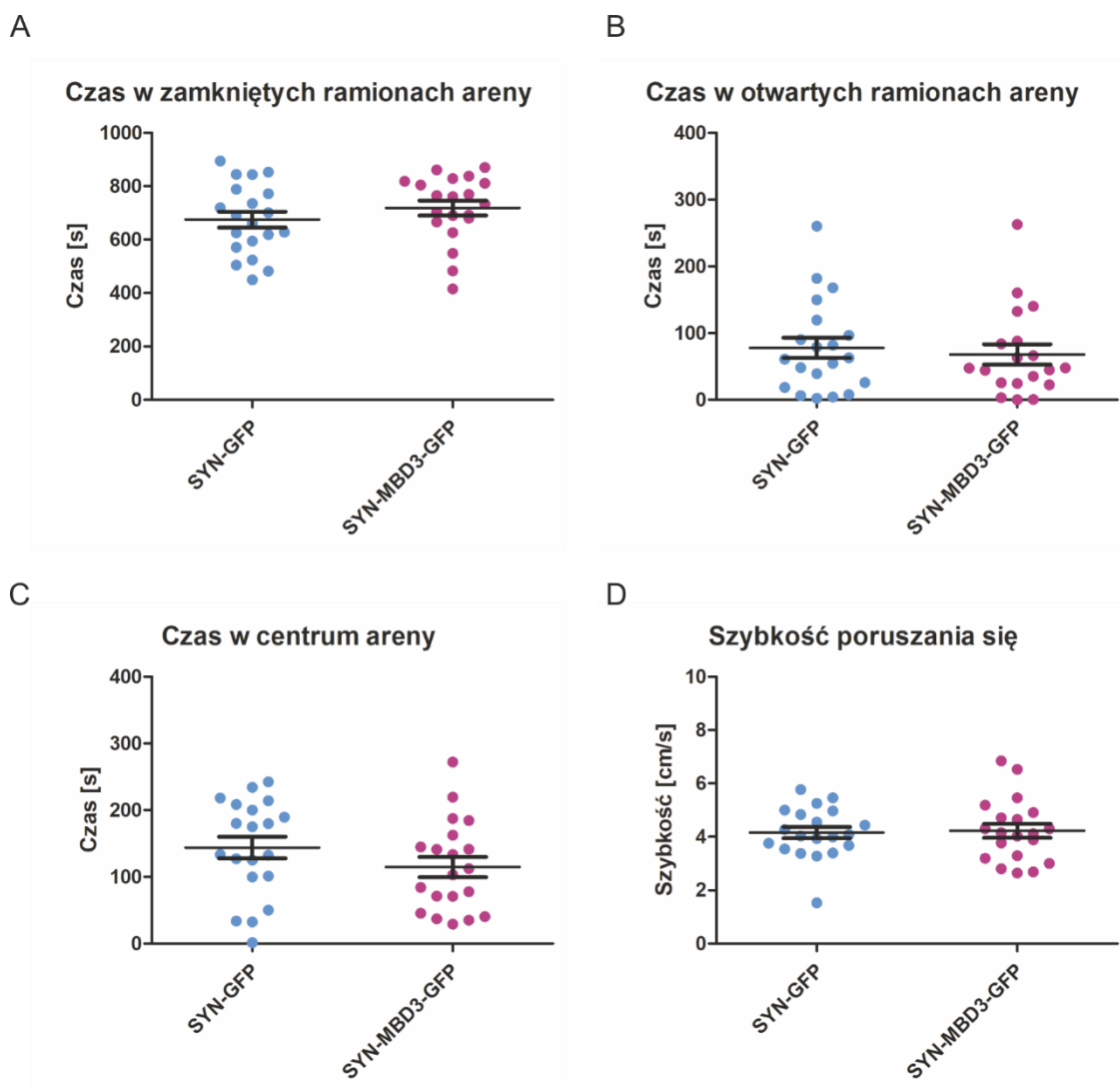
Rycina 6.4.1.1 Test reakcji na bodziec stresowy. Oceniono poziom reakcji na bodziec: wzrokowy (A), czuciowy (B), słuchowy (C) oraz na podnoszenie (D) (średnia \pm SEM, T-test, $n=20$).

Kolejnym wykonanym testem był test otwartego pola. Zaobserwowano skrócenie czasu przebywania zwierząt z nadekspresją Mbd3 (SYN-MBD3-GFP) w zewnętrznych strefach areny (SYN-GFP: $1041 \pm 20,6$; SYN-MBD3-GFP: $990,5 \pm 14,2$; $*p=0,0491$) (**Rycina 6.4.1.2 A**) w porównaniu do zwierząt kontrolnych (SYN-GFP), a tym samym wydłużony czas ich przebywania w wewnętrznej strefie (SYN-GFP: $143,3 \pm 18,2$; SYN-MBD3-GFP: $192,3 \pm 13,1$; $*p=0,0351$) (**Rycina 6.4.1.2 B**). Nie zaobserwowano różnic w czasie spędzonym w centralnym obszarze areny oraz w czasie latencji do pojawienia się szczura w centrum. Wyniki zaprezentowano na **Rycinie 6.4.1.2**.



Rycina 6.4.1.2 Test otwartego pola. Oceniano: czas spędzony na obrzeżach arenie (A), czas spędzony w wewnętrznej strefie (B), czas spędzony w centrum (C) oraz latencję do momentu pojawienia się szczura w centrum arenie (D) (średnia \pm SEM, T-test, $n=20$, * $p<0,05$).

Następnego dnia po zakończeniu testu otwartego pola przeprowadzono test uniesionego labiryntu krzyżowego. Nie zaobserwowano różnic między grupą zwierząt z nadekspresją Mbd3 (SYN-MBD3-GFP), a grupą zwierząt kontrolnych (SYN-GFP) w czasie spędzonym w zamkniętych i otwartych ramionach arenie, czasie spędzonym w centralnym punkcie arenie oraz szybkości poruszania się zwierząt (**Rycina 6.4.1.3**).



Rycina 6.4.1.3 Test uniesionego labiryntu krzyżowego: czas spędzony w zamkniętych (A) i otwartych (B) ramionach areny, czas spędzony w centralnym punkcie areny (C) oraz szybkość poruszania się zwierząt (D) (średnia \pm SEM, T-test, n=20).

6.4.2 Wpływ nadekspresji genu *Mbd3* oraz zwiększenia poziomu białka *Mbd3* na próg drgawkowy

2 dni po zakończeniu testów behawioralnych, przeprowadzono test PTZ. Procedura testu została opisana w rozdziale 5.2.4. Analogicznie do poprzedniego doświadczenia, zwierzęta po otrzymaniu iniekcji dootrzewnowej były monitorowane i nagrywane w systemie EEG przez 60 minut (rozdział 5.2.5). Liczebność grup wynosiła po 10 zwierząt na grupę. 80% zwierząt z nadekspresją *Mbd3* rozwinęło drgawki toniczno-kloniczne stopnia 4-5 w skali Racine'a, a 20% zwierząt rozwinęło drgawki 1 i 3 stopnia. 90% zwierząt kontrolnych (SYN-GFP) rozwinęło drgawki toniczno-kloniczne 4-5 stopnia, natomiast 10% zwierząt rozwinęło drgawki 1 stopnia ($p=0,5361$, Test Chi-square, porównanie pomiędzy grupą z nadekspresją *Mbd3*, a grupą kontrolną). Nie

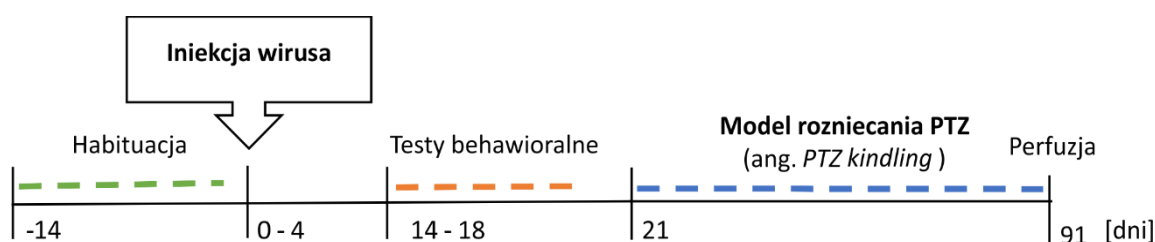
6.5 Określenie wpływu obniżenia ekspresji Mbd3 na epileptogenezę w modelu rozniecania przy użyciu PTZ.

Doświadczenia przeprowadzone przez Bednarczyk i wsp. (Bednarczyk i wsp. 2016) wykazały wzrost poziomu białka Mbd3 w mózgu zwierząt epileptycznych, w modelu padaczki skroniowej wywołanej elektryczną stymulacją ciała migdałowatego szczura. Powyższa obserwacja skłoniła nas do zbadania roli Mbd3 w procesie epileptogenezy. Jako model epileptogenezy zastosowaliśmy rozniecanie (ang. *kindling*) z zastosowaniem pentylenotetrazolu (PTZ).

W niniejszym doświadczeniu wykorzystano następujące grupy zwierząt: szczury z obniżeniem ekspresji Mbd3 (n=10) oraz szczury kontrolne (sh(scrambled), n=10).

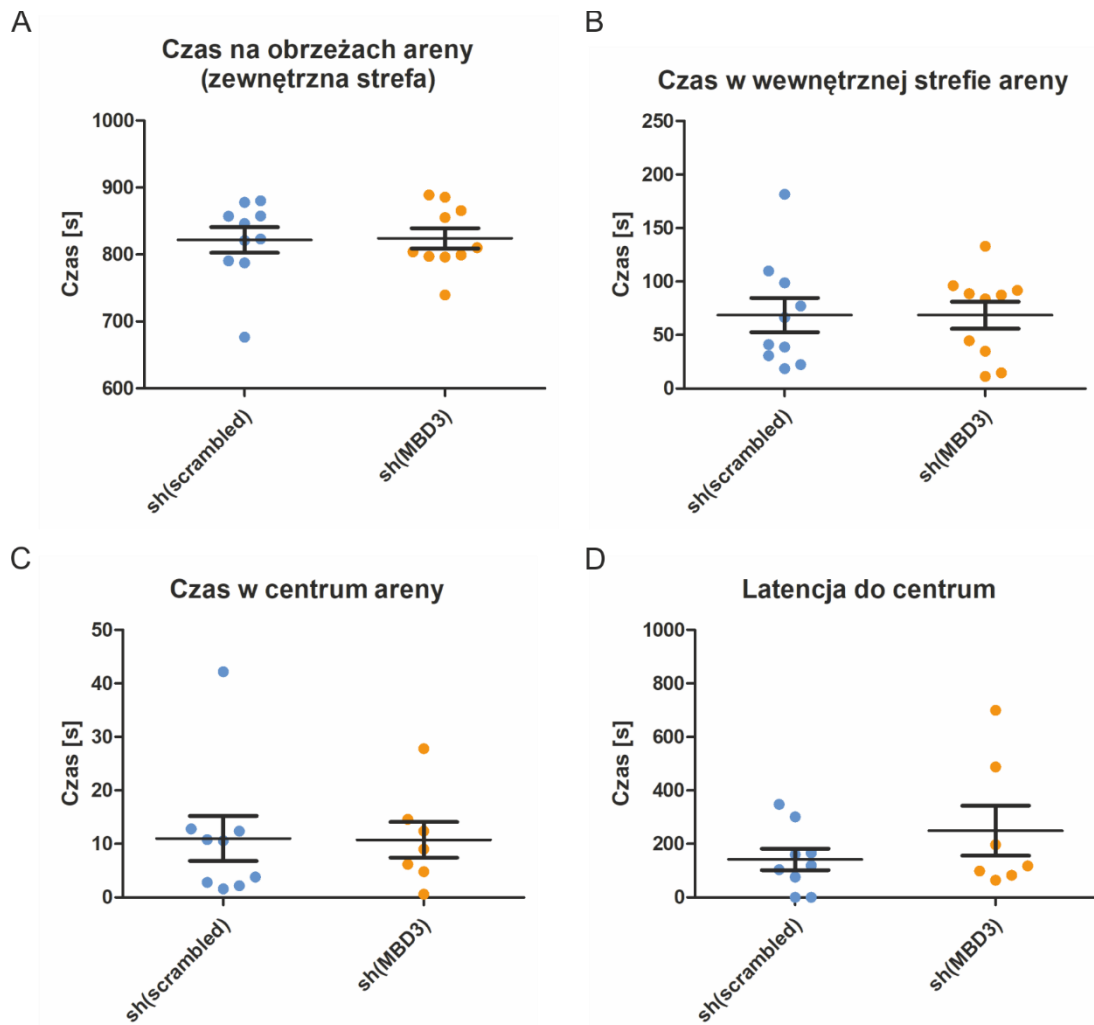
W przeciwieństwie do doświadczeń, w którym wykonywano test PTZ, zwierzętom nie implantowano elektrod i nie były one monitorowane pod EEG.

Po okresie rekonwalescencji przeprowadzono następujące testy behawioralne: test reakcji na bodziec stresowy (14 dnia doświadczenia), test otwartego pola (17 dnia doświadczenia) oraz test uniesionego labiryntu krzyżowego (18 dnia doświadczenia), a następnie poddano procedurze rozniecania PTZ. Zwierzętom podawano iniekcje dootrzewnowe PTZ w dawce podprogowej 35 mg/kg m.c., 3 razy w tygodniu (co drugi dzień). Zwierzęta obserwowano przez 30 minut po iniekcji, a intensywność osiąganych przez nie drgawek oceniono w skali Racine'a. Kryterium rozniecania stanowiło osiągnięcie drgawek stopnia 4-5 podczas trzech następujących po sobie sesji. Schemat doświadczenia przedstawiono na **Rycinie 6.5.1**.



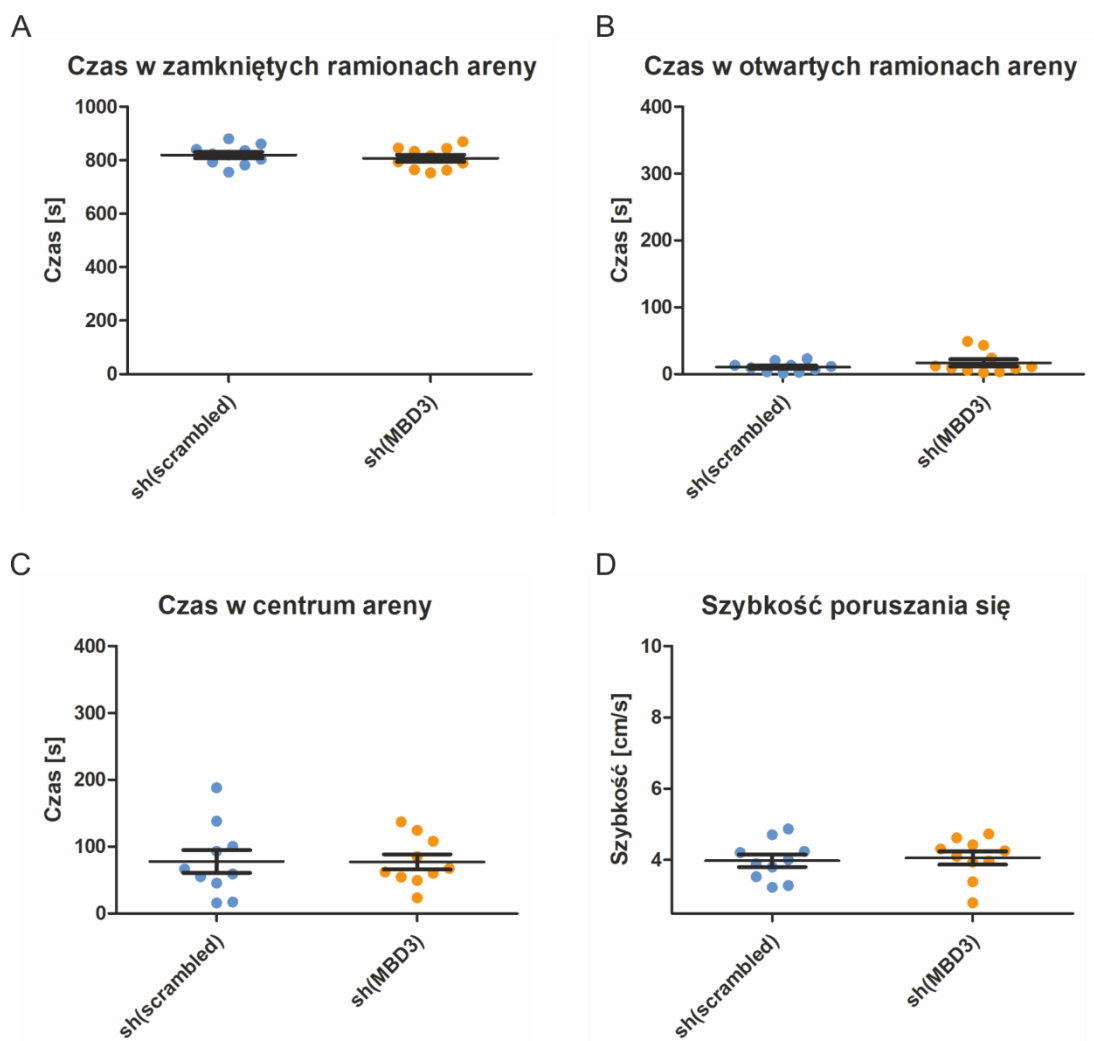
Rycina 6.5.1 Schemat doświadczenia z zastosowaniem modelu rozniecania PTZ.

doświadczalnymi w latencji do pojawienia się szczura w centrum. Wyniki zaprezentowano na **Rycinie 6.5.1.2**.



Rycina 6.5.1.2 Test otwartego pola u zwierząt z obniżoną ekspresją Mbd3. Sprawdzono: czas spędzony w zewnętrznej strefie (A), czas w wewnętrznym polu aren (B), czas w centrum aren (C) oraz latencję do pojawienia się w centrum aren (D) (średnia \pm SEM, T-test, n=10).

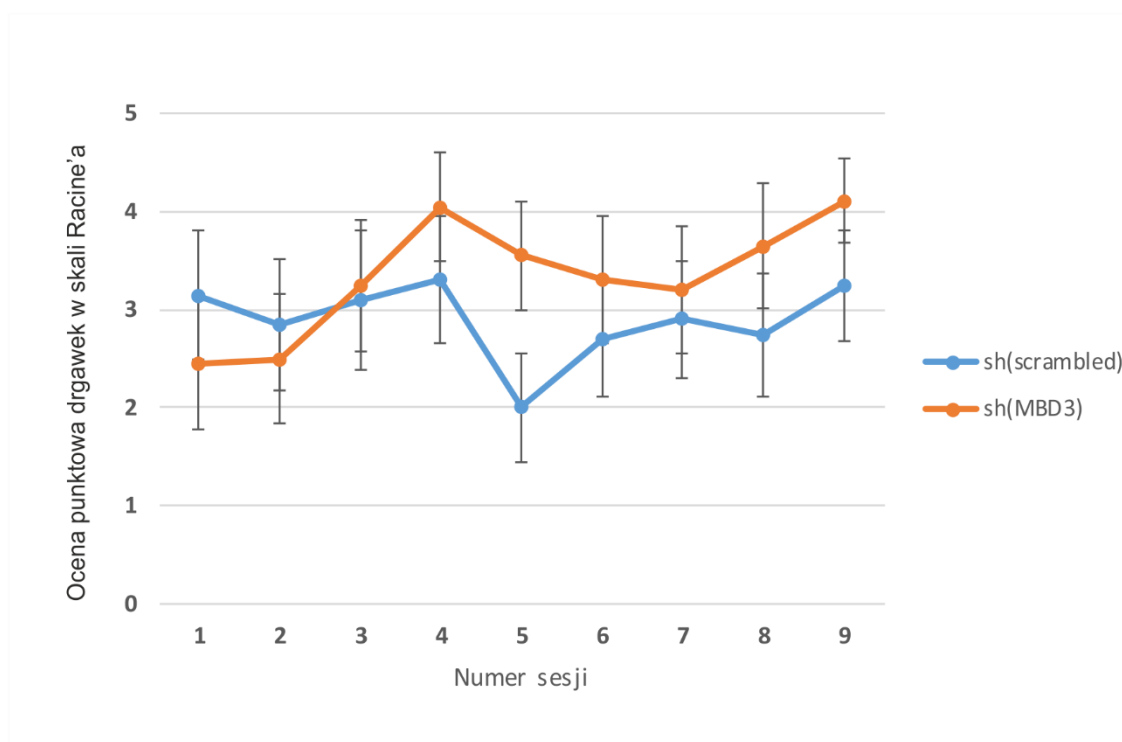
Następnego dnia po zakończeniu testu otwartego pola zwierzęta wykonano test uniesionego labiryntu krzyżowego. Nie zaobserwowano różnic między grupą zwierząt z obniżoną ekspresją Mbd3 (sh(MBD3)), a grupą zwierząt kontrolnych (sh(scrambled)) w czasie spędzonym w zamkniętych i otwartych ramionach aren, czasie spędzonym w centralnym punkcie aren oraz szybkości poruszania się zwierząt (**Rycina 6.5.1.3**).



Rycina 6.5.1.3 Test uniesionego labiryntu krzyżowego u zwierząt z obniżoną ekspresją Mbd3. Podczas testu sprawdzono: czas w zamkniętych ramionach areny (A), czas w otwartych ramionach areny (B), czas w centrum areny (C) oraz szybkość poruszania się zwierząt po arenie (D) (średnia \pm SEM, T-test, n=10).

6.5.2 Wpływ obniżenia ekspresji *Mbd3* i białka *Mbd3* na proces epileptogenezy

W celu określenia wpływu obniżenia poziomu białka *Mbd3* na epileptogenezę wykonano test rozniecania przy użyciu PTZ. Model ten został opisany w rozdziale 5.2.5. Nie zaobserwowano różnic w intensywności drgawek w poszczególnych sesjach w grupie zwierząt z obniżoną ekspresją *Mbd3* (sh(MBD3)) (n=10) (**Rycina 6.5.2.1**).

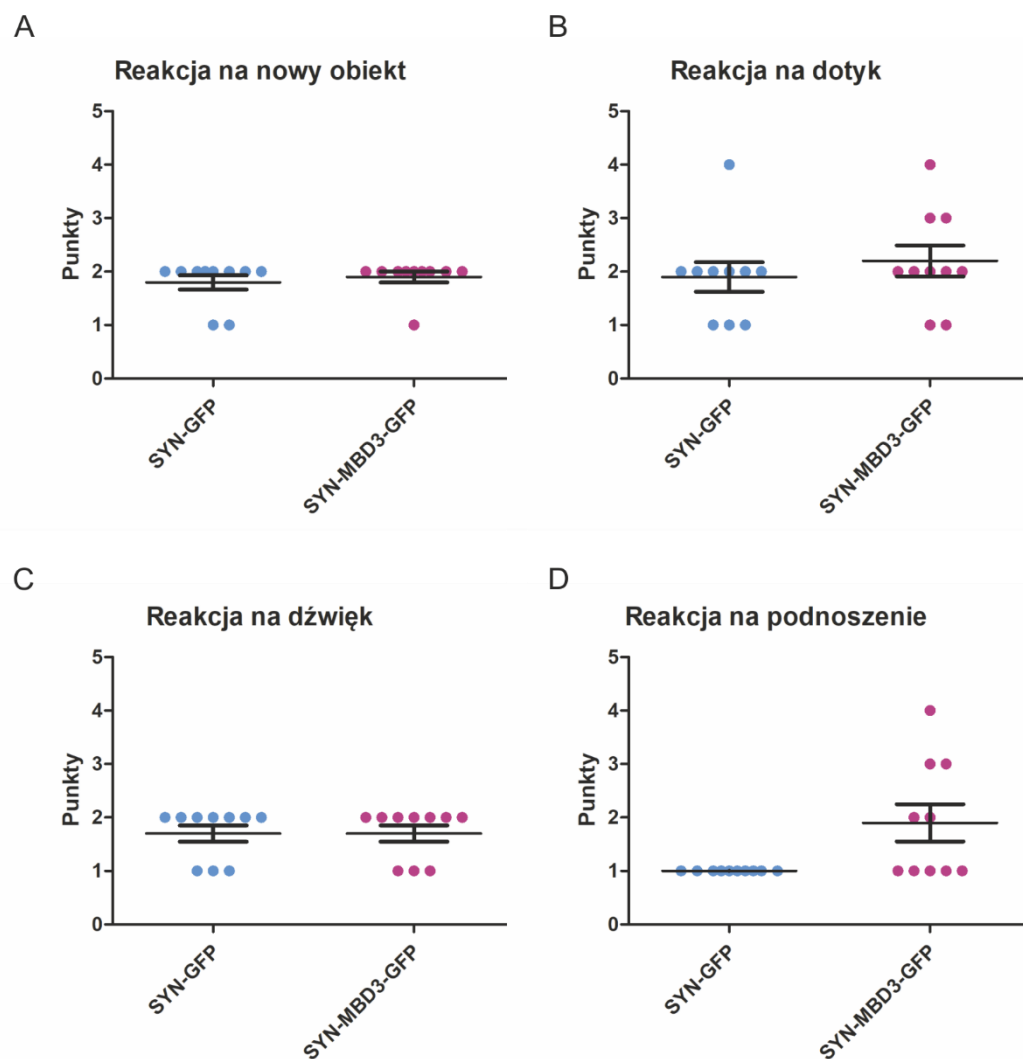


Rycina 6.5.2.1 Intensywność drgawek w poszczególnych sesjach rozniecania PTZ. Ocena punktowa drgawek osiąganych przez zwierzęta kontrolne (sh(scrambled)) oraz zwierząt z obniżoną ekspresją *Mbd3* (sh(MBD3)), w poszczególnych sesjach do momentu spełnienia przez większość grupy kryterium (średnia \pm SEM, jednoczynnikowa ANOVA dla prób powtórzonych, n=10).

Dodatkowo sprawdzono następujące parametry: numer sesji z pierwszą drgawką stopnia 4-5 według skali Racine', numer sesji w którym zostało spełnione kryterium (3 następujące po sobie sesje z drgawkami stopnia 4-5), liczba sesji do osiągnięcia kryterium od pierwszej sesji z drgawką stopnia 4-5 oraz liczba sesji z drgawkami stopnia 4-5 do momentu osiągnięcia kryterium lub śmierci. Nie zaobserwowano różnic w grupie zwierząt z obniżoną ekspresją *Mbd3* (sh(MBD3)) w porównaniu do zwierząt kontrolnych, po iniekcji wirusa kontrolnego (sh(scrambled)) w powyżej wymienionych parametrach (**Rycina 6.5.2.2**). Śmiertelność w tym doświadczeniu wyniosła 10% w grupie zwierząt z obniżoną ekspresją *Mbd3* oraz 10% w grupie zwierząt kontrolnych (sh(scrambled)).

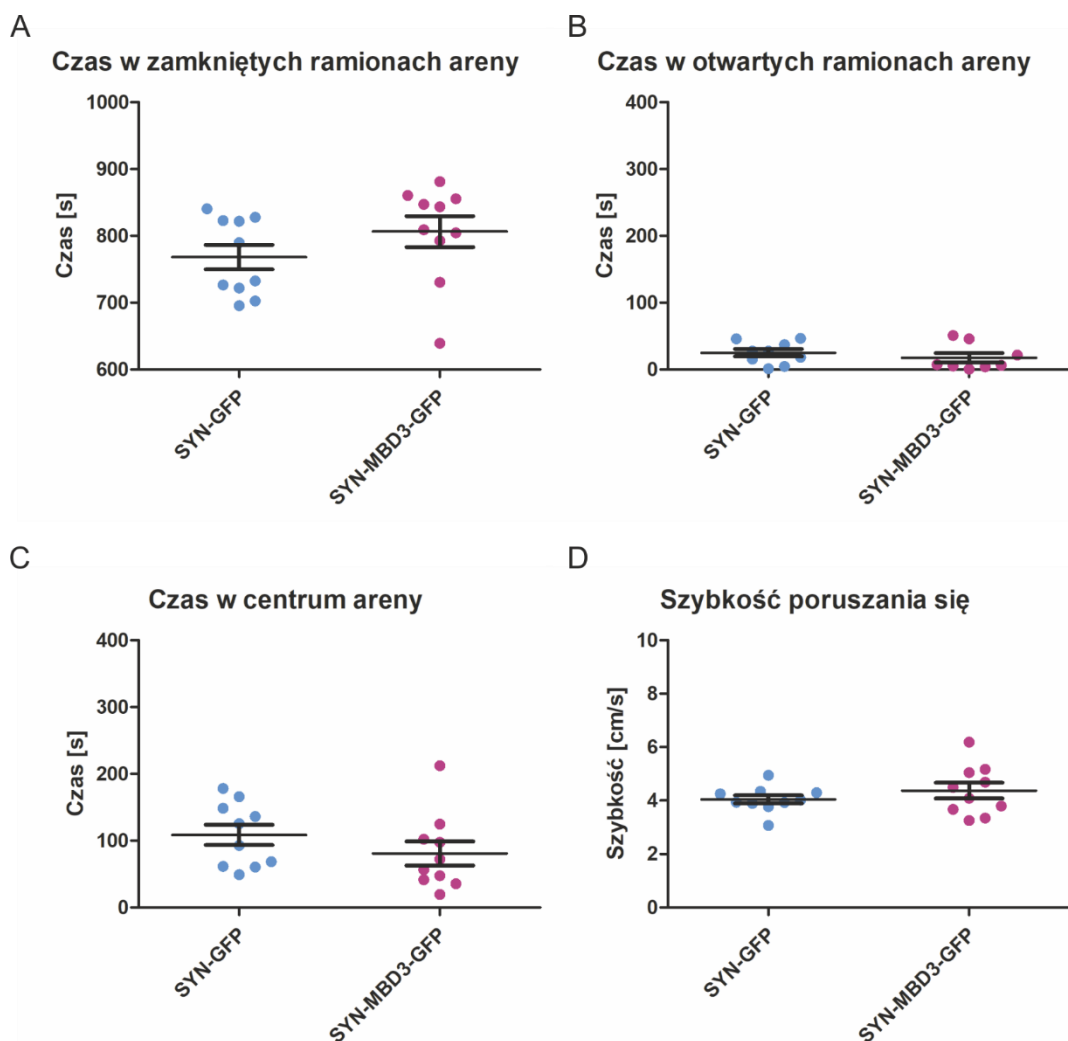
6.6.1 Wpływ nadekspresji białka Mbd3 w mózgu szczura na zachowanie

W celu oceny wpływu iniekcji wirusa do nadekspresji Mbd3 (SYN-MBD3-GFP) na dobrostan i zachowanie zwierząt doświadczalnych, przeprowadzono następujące tety behawioralne: test stresu, test otwartego pola oraz test uniesionego labiryntu krzyżowego. Poszczególne testy behawioralne zostały opisane w rozdziale 5.2.3.1. Nie zaobserwowano różnic pomiędzy zwierzętami kontrolnymi (SYN-GFP), a zwierzętami z nadekspresją Mbd3 (SYN-MBD3-GFP) w teście reakcji na bodziec stresowy (n=10) (**Rycina 6.6.1.1**).



Rycina 6.6.1.1 Test reakcji na bodziec stresowy u zwierząt z nadekspresją Mbd3. Oceniano reakcję na bodziec: wzrokowy – nowy obiekt (A), czuciowy – dotyk nowym obiektem (B), słuchowy – głośny dźwięk (C) oraz na podnoszenie (D) (średnia \pm SEM, T-test, n=10).

Nie wykazano różnic w teście otwartego pola między zwierzętami kontrolnymi, a zwierzętami z nadekspresją Mbd3 w czasie spędzonym w zewnętrznej strefie areny, wewnętrznym polu oraz w centralnym obszarze areny. Nie zaobserwowano również różnic

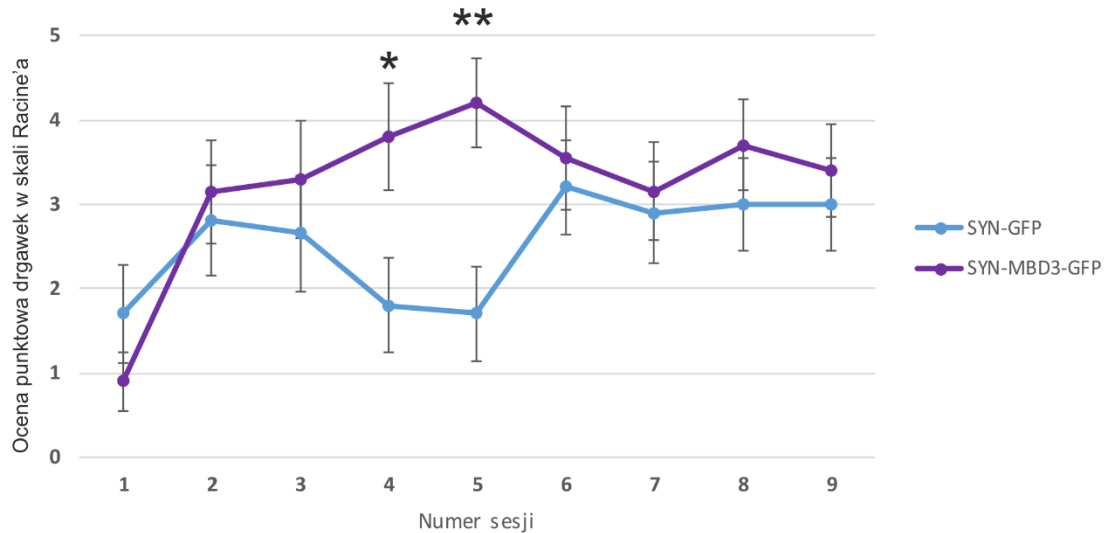


Rycina 6.6.1.3 Test uniesionego labiryntu krzyżowego u zwierząt z nadekspresją Mbd3. Sprawdzono: czas w zamkniętych ramionach areny (A), czas w otwartych ramionach areny (B), czas w centrum areny (C) oraz szybkość poruszania się zwierząt po arenie (D) (średnia \pm SEM, T-test, n=10).

6.6.2 Wpływ nadekspresji *Mbd3* oraz poziomu białka Mbd3 na proces epileptogenezy

W celu określenia wpływu nadekspresji Mbd3 na epileptogenezę grupę zwierząt z nadekspresją Mbd3 oraz grupę zwierząt kontrolnych poddano procedurze rozniecania przy użyciu PTZ. Model ten został opisany w rozdziale 5.2.5. W trakcie trwania doświadczenia oceniano rozwój drgawek w poszczególnych sesjach, w grupie zwierząt z nadekspresją Mbd3 (SYN-MBD3-GFP, n=10) oraz grupie zwierząt kontrolnych (SYN-GFP, n=10). Zaobserwowano, większą intensywność drgawek u zwierząt z nadekspresją Mbd3 w czwartej (SYN-GFP: $1,8 \pm 0,6$ vs SYN-MBD3-GFP: $3,8 \pm 0,6$; *p=0,0287) oraz piątej (SYN-GFP: $1,7 \pm 0,6$ vs SYN-MBD3-GFP: $4,2 \pm$

0,5; **p=0,0049) sesji rozniecania, w porównaniu do zwierząt kontrolnych (n=10) (**Rycina 6.6.2.1**). Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w pozostałych sesjach.

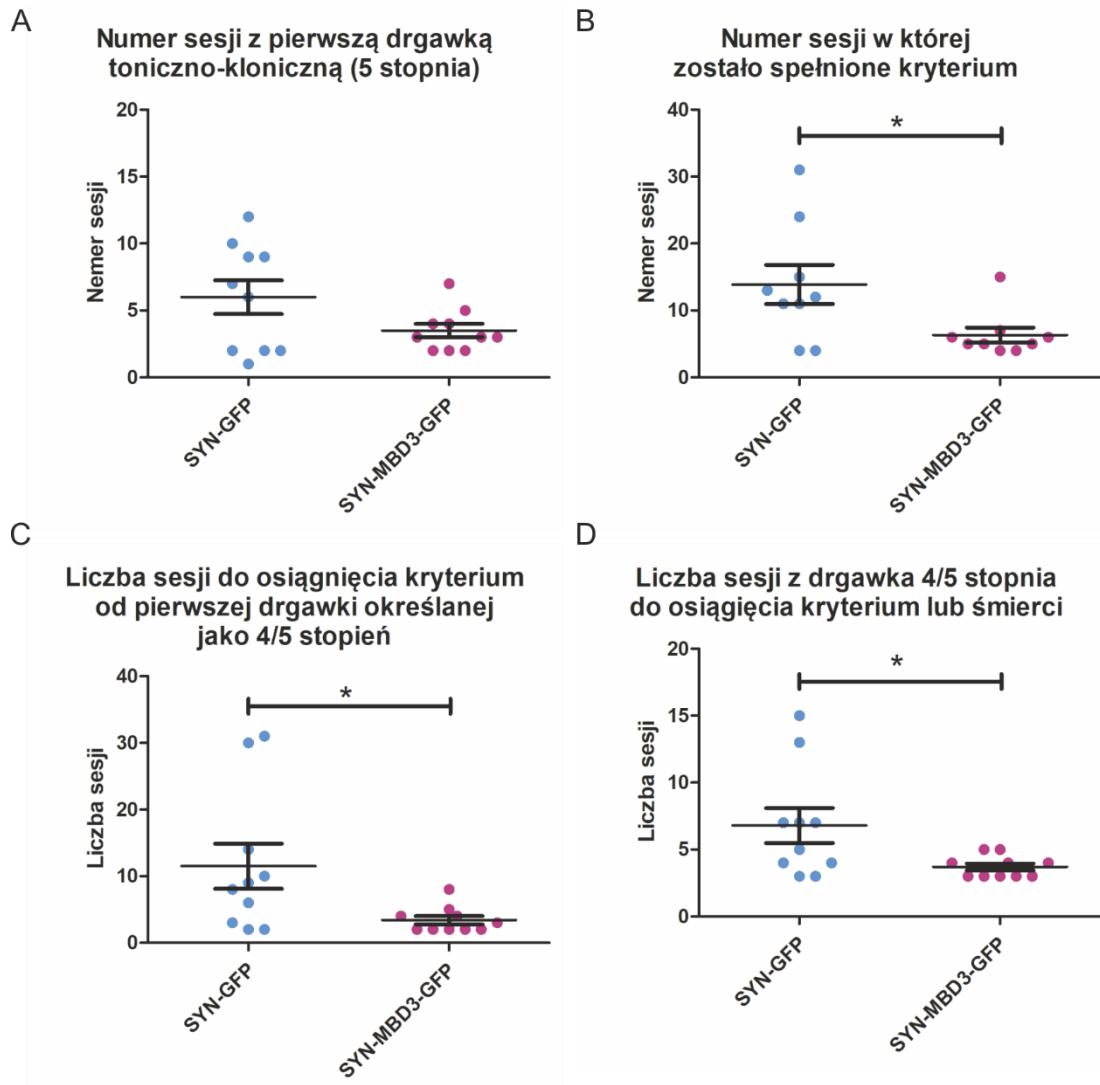


Rycina 6.6.2.1 Intensywność drgawek w poszczególnych sesjach rozniecania PTZ. Ocena punktowa stopni drgawek osiąganych przez zwierzęta kontrolne (SYN-GFP) oraz zwierząt z nadekspresją Mbd3 (SYN-MBD3-GFP), w poszczególnych sesjach do momentu spełnienia przez większość grupy kryterium (średnia \pm SEM, jednoczynnikowa ANOVA dla prób powtórzonych, n=10, * p<0,05, ** p<0,01).

Porównano również następujące parametry: numer sesji z pierwszą drgawką stopnia 4-5, numer sesji w którym zostało spełnione kryterium (3 następujące po sobie sesje z drgawkami stopnia 4-5), liczba sesji do osiągnięcia kryterium od pierwszej sesji z drgawką stopnia 4-5 oraz liczba sesji z drgawkami stopnia 4-5 do momentu osiągnięcia kryterium lub śmierci.

Nie zaobserwowano różnic w grupie zwierząt z nadekspresją Mbd3 (SYN-MBD3-GFP) oraz grupie zwierząt kontrolnych (SYN-GFP) w numerze sesji, w której zwierzęta rozwinęły pierwszą, drgawkę toniczno-kloniczną określaną jako stopień 4-5 w skali Racine'a (**Rycina 6.6.2.2 A**). Zwierzęta z nadekspresją Mbd3 szybciej osiągały kryterium rozniecania w porównaniu do zwierząt kontrolnych (SYN-GFP: $13,9 \pm 2,9$ vs SYN-MBD3-GFP: $6,3 \pm 3,1$; *p=0,0281, n=10, **Rycina 6.6.2.2 B**). Ponadto zwierzęta z nadekspresją Mbd3 potrzebowały mniejszej liczby sesji do osiągnięcia kryterium licząc od pierwszej drgawki ocenianej jako stopień 4-5 (SYN-GFP: $11,5 \pm 3,4$ vs SYN-MBD3-GFP: $3,4 \pm 0,6$; *p=0,0302, n = 10, **Rycina 6.6.2.2 C**). Zaobserwowano również mniejszą liczbę sesji z drgawką o stopniu 4-5, w skali Racine'a, do czasu osiągnięcia kryterium lub śmierci u zwierząt z nadekspresją Mbd3 w porównaniu do zwierząt kontrolnych (SYN-GFP: $6,8 \pm 1,3$ vs SYN-MBD3-GFP: $3,7 \pm 1,3$; *p=0,0318, n = 10, **Rycina 6.6.2.2 D**). Śmiertelność w tym

doświadczeniu wyniosła 10% w grupie zwierząt z nadekspresją Mbd3 oraz 10% w grupie zwierząt kontrolnych (SYN-GFP).



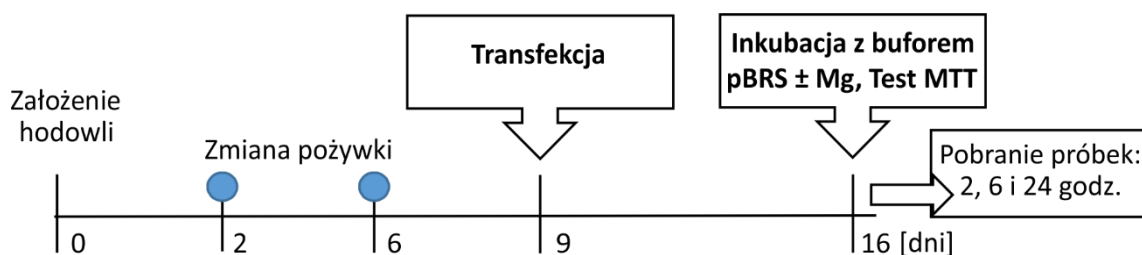
Rycina 6.6.2.2 Rozniecanie przy użyciu PTZ u zwierząt z nadekspresją Mbd3 (SYN-MBD3-GFP) oraz zwierząt kontrolnych (SYN-GFP). Sprawdzono: numer sesji z pierwszą, drgawką stopnia 4-5 (A), numer sesji w którym zostało spełnione kryterium (B), liczba sesji do osiągnięcia kryterium od pierwszej sesji z drgawką stopnia 4-5 (C) oraz liczba sesji z drgawkami stopnia 4-5 do momentu osiągnięcia kryterium lub śmierci (D) (średnia \pm SEM, T-test, $n=10$, * $p<0,05$).

6.7 Wpływ nadekspresji Mbd3 na ekspresję genów w modelu wyładowań epileptopodobnych *in vitro*.

Bednarczyk i współpracownicy wykazali zmiany wiązania Mbd3 do DNA w 14 dni po zainicjowaniu epileptogenezy (Bednarczyk i wsp. 2016). W przypadku niektórych genów, zmianom wiązania Mbd3 do DNA towarzyszyły zmiany poziomu ekspresji genu docelowego u

osobników, u których wystąpiły spontaniczne drgawki. Biorąc pod uwagę powyższe dane postanowiono scharakteryzować zmiany w ekspresji genów wywołane zwiększeniem poziomu Mbd3 w neuronach w warunkach zwiększonej pobudliwości. W tym celu zastosowano model wyładowań epileptopodobnych w neuronach korowych *in vitro*, wywołanych przejściowym niedoborem Mg^{2+} w pożywce. Model ten jest dobrze scharakteryzowany pod względem elektrofizjologicznym i często używany do badań efektów zwiększonej aktywności neuronów (Cao i wsp. 2003, Jiang i wsp. 2010, Deshpande i wsp. 2007).

Hodowla pierwotna neuronów korowych została poddana transfekcji wirusami AAV: wirusem wywołującym nadekspresję Mbd3 (SYN-MBD3-GFP) oraz wirusem kontrolnym (SYN-GFP). Procedurę transfekcji opisano w rozdziale 5.2.11.3. Następnie wywołano spontaniczne, nawracające wyładowania epileptopodobne jak opisano w rozdziale 5.2.11.4. Plan doświadczenia zaprezentowano na **Rycinie 6.7.1**.

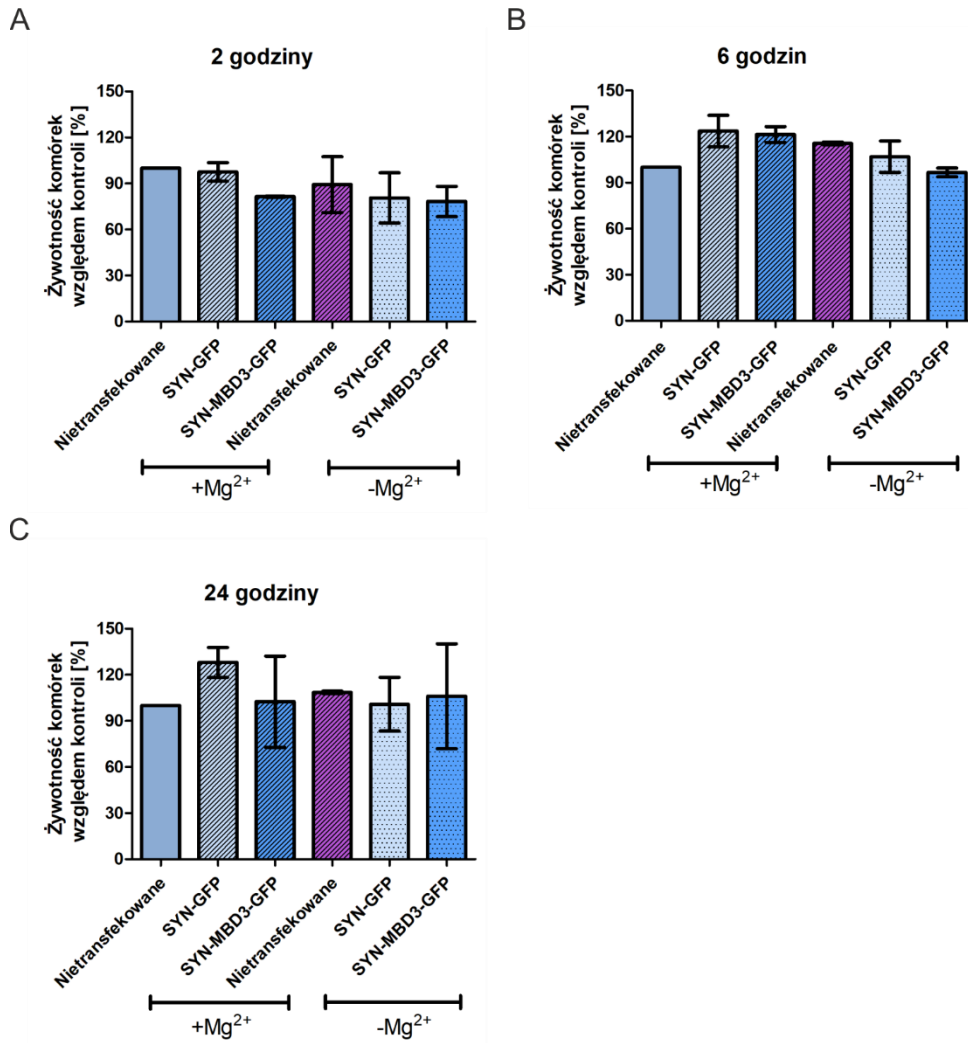


Rycina 6.7.1 Schemat doświadczenia z zastosowaniem modelu spontanicznych, nawracających wyładowań epileptopodobnych *in vitro*. Transfekcję neuronów wirusem wywołującym nadekspresję Mbd3 (SYN-MBD3-GFP) lub wirusem kontrolnym (SYN-GFP) przeprowadzono w 9 dniu od założenia hodowli. W celu oceny wpływu transfekcji oraz wpływu indukcji wyładowań epileptopodobnych na żywotność hodowli przeprowadzono test MTT. RNA do sekwencjonowania zostało wyizolowane 2, 6 i 24 godziny po indukcji wyładowań epileptopodobnych.

6.7.1 Wpływ transfekcji na żywotność komórek w modelu wyładowań epileptopodobnych *in vitro*.

W celu określenia wpływu transfekcji oraz wpływu indukcji wyładowań epileptopodobnych na żywotność komórek, przeprowadzono test MTT (opisany w rozdziale 5.2.11.5). Żywotność komórek sprawdzono w trzech punktach czasowych: 2, 6 i 24 godziny po zakończonej 3 godzinnej inkubacji w pożywce pozbawionej Mg^{2+} ($-Mg^{2+}$). Kontrolę stanowiła hodowla inkubowana w pożywce zawierającej Mg^{2+} ($+Mg^{2+}$), nie poddana transfekcji. Wyniki testu MTT pochodzące z trzech niezależnych hodowli.

Nie zaobserwowano różnic w poziomie żywotności komórek w hodowli pierwotnej neuronów korowych w wyniku wywołania wyładowań epileptopodobnych (-Mg²⁺) ani w środowisku fizjologicznym (+Mg²⁺) po transfekcji wirusem wywołującym nadekspresję Mbd3 (SYN-MBD3-GFP) ani wirusem kontrolnym (SYN-GFP)(Rycina 6.7.1.1).



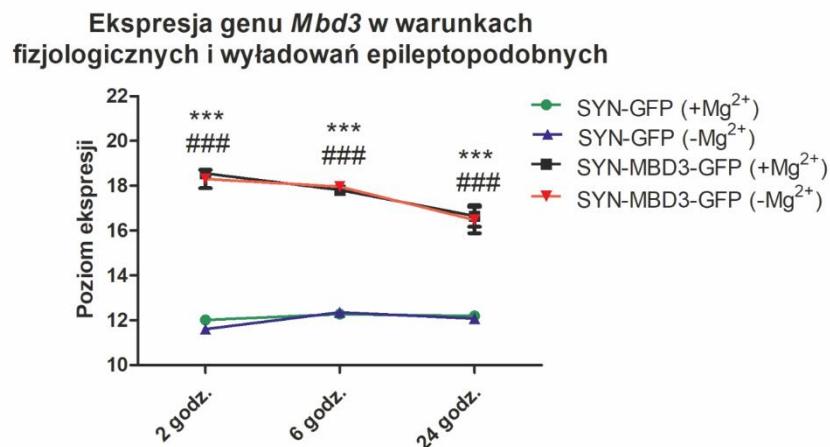
Rycina 6.7.1.1 Ocena żywotności komórek testem MTT w modelu wyładowań epileptopodobnych 2 godziny (A), 6 godzin (B) i 24 godziny (C) po 3 godziny wywołaniu wyładowań epileptopodobnych. (-Mg²⁺) – warunki wywołujące wyładowania epileptopodobne; (+Mg²⁺) – warunki fizjologiczne; (średnia ± SEM, T-test).

6.7.2 Wpływ transfekcji oraz wyładowań epileptopodobnych na ekspresję Mbd3.

W celu sprawdzenia efektywności ekspresji wirusa kodującego Mbd3 (SYN-MBD3-GFP), z bazy danych sekwencjonowania wyodrębniono dane o poziomach ekspresji mRNA *Mbd3* po transfekcji oraz po wywołaniu wyładowań epileptopodobnych.

Zaobserwowano zwiększenie ekspresji mRNA *Mbd3* w komórkach transfekowanych wirusem do nadekspresji *Mbd3* zarówno warunkach fizjologicznych (SYN-GFP 2 godziny: $12,0 \pm 0,1$ vs SYN-MBD3-GFP 2 godziny: $18,5 \pm 0,1$; *** $p < 0,0001$; SYN-GFP 6 godzin: $12,3 \pm 0,1$ vs SYN-MBD3-GFP 6 godzin: $17,8 \pm 0,1$; *** $p < 0,0001$; SYN-GFP 24 godziny: $12,2 \pm 0,0$ vs SYN-MBD3-GFP 24 godziny: $16,6 \pm 0,5$; *** $p = 0,0008$) jak i po wywołaniu wyładowań epileptopodobnych we wszystkich badanych punktach czasowych (SYN-GFP 2 godziny: $11,6 \pm 0,1$ vs SYN-MBD3-GFP 2 godziny: $18,3 \pm 0,4$; ### $p < 0,0001$; SYN-GFP 6 godziny: $12,4 \pm 0,2$ vs SYN-MBD3-GFP 6 godziny: $17,9 \pm 0,1$; ### $p < 0,0001$; SYN-GFP 24 godziny: $12,1 \pm 0,1$ vs SYN-MBD3-GFP 24 godziny: $16,5 \pm 0,6$; ### $p = 0,001$) (Rycina 6.7.2.1).

Samo wywołanie wyładowań epileptopodobnych, nie miało wpływu na poziom ekspresji mRNA *Mbd3* (Rycina 6.7.2.1).



Rycina 6.7.2.1 Ekspresja mRNA *Mbd3* 2, 6 i 24 godziny po indukcji wyładowań epileptopodobnych. Komórki z nadekspresją *Mbd3* (SYN-MBD3-GFP) w warunkach fizjologicznych (***) $p < 0,001$ oraz po wywołaniu wyładowań epileptopodobnych (### $p < 0,001$) w porównaniu do próbek transfekowanych wirusem kontrolnym (SYN-GFP). (-Mg²⁺) – warunki wywołujące wyładowania epileptopodobne; (+Mg²⁺) – warunki fizjologiczne; (średnia ± SEM, jednoczynnikowa ANOVA).

6.7.3 Wpływ wyładowań epileptopodobnych na ekspresję genów w neuronach *in vitro*.

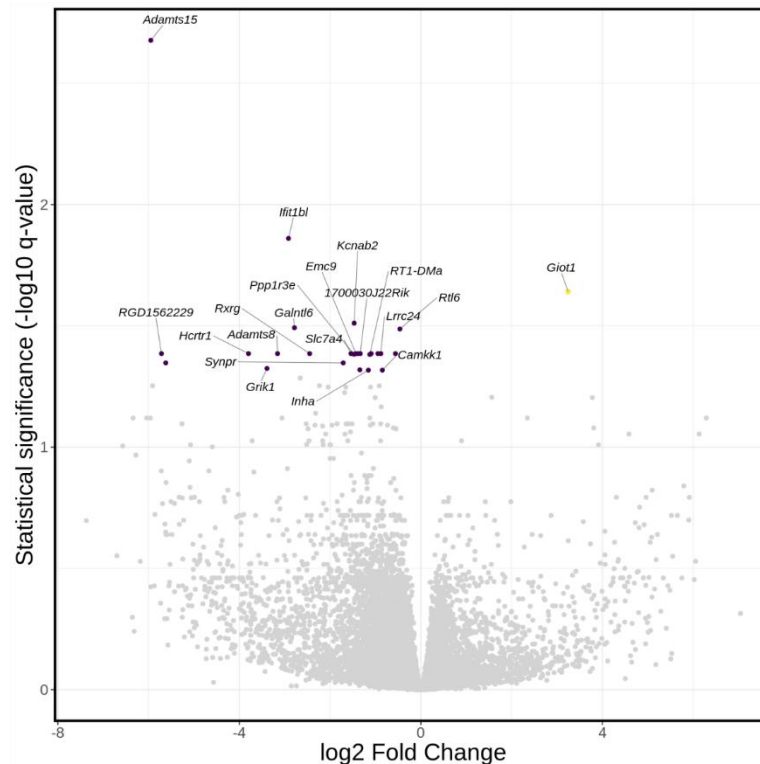
W niniejszym doświadczeniu sprawdzono wpływ wyładowań epileptopodobnych na poziom ekspresji genów w komórkach nietransfekowanych.

Nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w ekspresji genów 2 i 6 godziny po wywołaniu wyładowań epileptopodobnych w stosunku do warunków fizjologicznych. Natomiast

zaobserwowano zmiany w ekspresji 25 genów 24 godziny po wywołaniu wyładowań epileptopodobnych (**Rycina 6.7.3.1**). Ekspresja 1 z nich uległa podwyższeniu, a 24 genów obniżyła się. Geny o zmienionym poziomie ekspresji przedstawiono w **Tabeli MD1** w rozdziale Materiały dodatkowe.

Przeprowadzona analiza funkcjonalna z zastosowaniem programu Reactome (<https://reactome.org/>, wersja 82, stan na dzień 30/11/2022) wykazała, że geny, których ekspresja uległa zmianie pod wpływem działania modelu wyładowań epileptopodobnych, indukowanym niedoborem magnezu, są w dużej mierze zaangażowane w proces glikozylacji, aktywacji receptora dla kwasu kainowego oraz fosforylacji białek (**Tabela 8**).

Co ciekawe, znaleziono 4 motywy wiązania czynników transkrypcyjnych dla genów, których ekspresja uległa zmianie 24 godziny po indukcji wyładowań epileptopodobnych w stosunku do warunków fizjologicznych. Zidentyfikowane motywy wiązania czynników transkrypcyjnych i lista zawierających je genów zostały zaprezentowane w **Tabeli 9**. Szczególnie interesujący jest motyw ZF5, występujący w promotorach 21 z 25 genów, których ekspresja uległa zmianie po 24 godzinach od indukcji wyładowań epileptopodobnych (**Tabela 9**).



Rycina 6.7.3.1 Zmiany poziomu ekspresji genów wywołane przez wyładowania epileptopodobne w nietransfekowanych neuronach korowych *in vitro*. Ekspresję sprawdzono 24 godziny po wywołaniu wyładowań epileptopodobnych, w porównaniu do warunków fizjologicznych ($p < 0,05$).

Tabela 8. Analiza funkcjonalna genów o zmienionym poziomie ekspresji ($p < 0,05$) 24 godziny po indukcji wyładowań epileptopodobnych w hodowli neuronów korowych (<https://reactome.org/>, wersja 82, stan na dzień 30/11/2022). W tabeli umieszczono procesy o najwyższej wartości prawdopodobieństwa.

Procesy / uczestnictwo w ścieżkach sygnałowych	Znalezione	Stosunek	Wartość p
Aktywacja receptora kwasu kainowego (przepuszczalność dla sodu)	1/2	1,72E-04	0,01
Gen B3GALTL (ang. <i>Beta-1,3-glycosyltransferase-like</i>) w patogenezie Zespołu Peters-plus	2/38	0,003	0,015
O-glikozylacja białek zawierających domenę TSR (ang. <i>thrombospondin type 1 repeat domains</i>)	2/39	0,003	0,016
O-glikozylacja	3/114	0,01	0,019
Aktywacja RAC1 (ang. <i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>) w synaptogenezie wywołanej przez receptor N-metylo-D-asparaginowego (NMDAR, ang. <i>anti-N-methyl-D-aspartate receptor</i>)	1/7	6,02E-04	0,034
Fosforylacja CREB1 (ang. <i>cyclic AMP-responsive element-binding protein 1</i>) poprzez aktywację kaskady CaMKII/CaMKK/CaMKIV (ang. <i>Calcium/calmodulin-dependent kinases</i>)	1/8	6,88E-04	0,038
Wiązanie oreksyny i neuropeptydów z odpowiednimi receptorami	1/8	6,88E-04	0,038
Choroby związane z glikozylacją białek	2/71	0,006	0,038
Działanie jonotropowe receptora kwasu kainowego	1/10	8,60E-04	0,048
Aktywacja receptora kwasu kainowego	1/10	8,60E-04	0,048
Hormony glikoproteinowe	1/10	8,60E-04	0,048
Fosforylacja CREB (ang. <i>cyclic AMP-responsive element-binding protein</i>) przez aktywację CaMK IV (ang. <i>Calcium/calmodulin-dependent kinases type IV</i>)	1/10	8,60E-04	0,048

Tabela 9. Motywy wiązania czynników transkrypcyjnych w promotorach genów, których ekspresja uległa zmianie 24 godziny po indukcji wyładowań epileptopodobnych w hodowli nietransfekowanych neuronów korowych. Listę czynników transkrypcyjnych wygenerowano przy użyciu programu g:Profiler (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>, stan na dzień 25/11/2022). W tabeli umieszczono czynniki transkrypcyjne o najwyższej wartości prawdopodobieństwa.

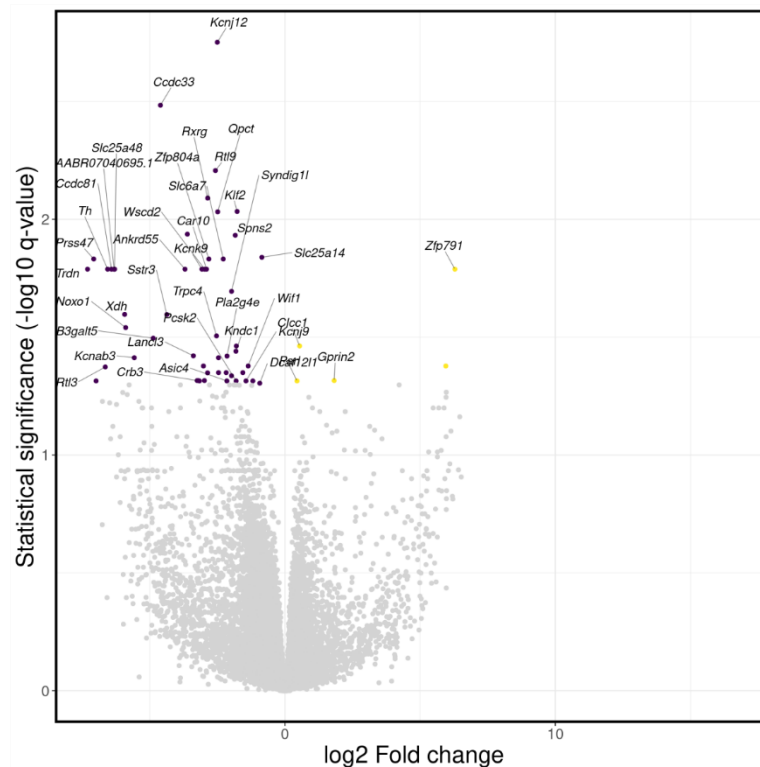
Czynnik transkrypcyjny	Motyw	Wartość p	Geny
ZF5	GSGCGCGR	5,11x10 ⁻⁴	<i>Adamts15, Adamts8, Bola1, Camkk1, Emc9, Grik1, Hcrtr1, Inha, Kcnab2, Lrrc24, Polr3k, Ppp1r3e, RGD1562229, RT1-DMa, Rtl6, Rxrg, Sh3rf3, Slc7a4, Synpr, 1700030J22Rik, AABR07001519.1</i>
VDR	RRTGNMCTNNTGAMCCNYNT	1,39x10 ⁻²	<i>Adamts15, Bola1, Camkk1, Drp2, Emc9, Galntl6, Grik1, Hcrtr1, Ihit1bl, Inha, Kcnab2, Polr3k, Ppp1r3e, RGD1562229, RT1-DMa, Rtl6</i>
MTF-1	TGCGCAC	2,46x10 ⁻²	<i>Bola1, Camkk1, Hcrtr1, Kcnab2, Polr3k, RGD1562229, RT1-DMa, Sh3rf3, Slc7a4, AABR07001519.1</i>
ATF2	VGTGACGTMACN	4,03x10 ⁻²	<i>Adamts15, Bola1, Emc9, Hcrtr1, Inha, Kcnab2, Lrrc24, Ppp1r3e, RGD1562229, Rtl6, Rxrg, Slc7a4, 1700030J22Rik, AABR07001519.1, Giot1</i>

6.7.4 Ocena wpływu wyładowań epileptopodobnych na poziom ekspresji genów w zależności od poziomu Mbd3.

W celu oceny wpływu wyładowań epileptopodobnych na ekspresję genów porównaliśmy zmiany ekspresji genów wywołane wyładowaniami epileptopodobnymi w hodowlach z nadekspresją Mbd3 oraz w hodowlach transfekowanych wirusem kontrolnym. Materiał do badań pobrano 2, 6 i 24 godziny po wywołaniu wyładowań epileptopodobnych.

Porównano ekspresję genów po wywołaniu wyładowań epileptopodobnych w hodowlach transfekowanych wirusem kontrolnym (SYN-GFP) po wywołaniu wyładowań epileptopodobnych w stosunku hodowli transfekowanych tym samym wirusem i inkubowanych w środowisku fizjologicznym. Nie zaobserwowano różnic w poziomie ekspresji genów w 2

godziny i 6 godzin po wywołaniu wyładowań epileptopodobnych. Natomiast w 24 godziny po indukcji wyładowań epileptopodobnych zaobserwowano zmienioną ekspresję 49 genów (**Rycina 6.7.4.1, Tabela MD 2** w rozdziale materiały dodatkowe). Analiza funkcjonalna za pomocą programu Reactome (<https://reactome.org/>, wersja 82, stan na dzień 30/11/2022) wykazała że zmienione geny są w dużej mierze zaangażowane w funkcjonowanie kanałów potasowych (**Tabela 10**).

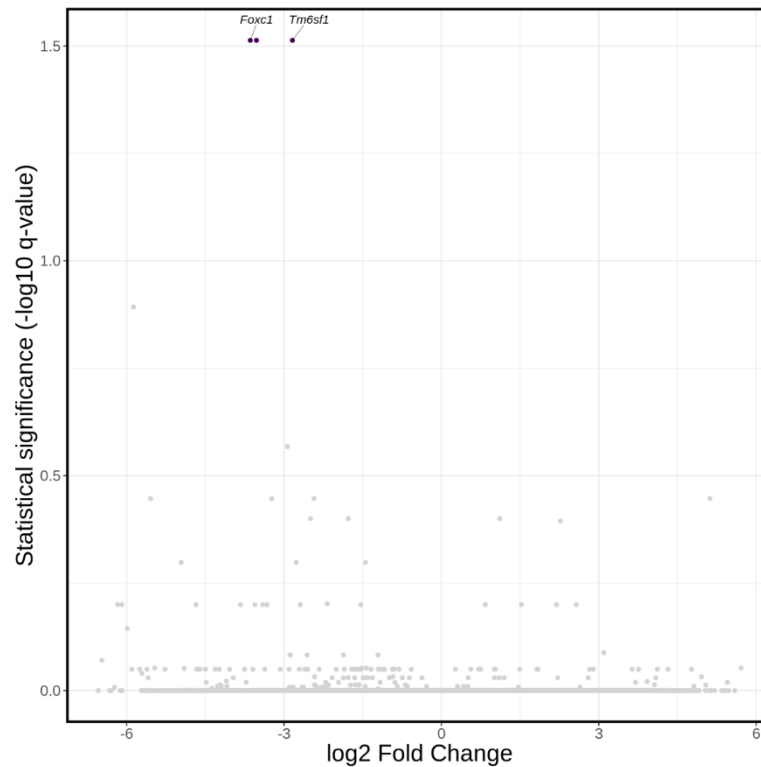


Rycina 6.7.4.1 Zmiany poziomu ekspresji genów 24 godziny po wywołaniu wyładowań epileptopodobnych hodowli pierwotnej neuronów korowych po transfekcji wirusem kontrolnym SYN-GFP ($p < 0,05$).

Nie zaobserwowano statystycznie istotnych zmian 2 i 6 godzin po wywołaniu wyładowań epileptopodobnych w stosunku do warunków fizjologicznych w hodowlach neuronów ze zwiększoną ekspresją *Mbd3*. Zidentyfikowano 2 geny, których ekspresja uległa obniżeniu 24 godziny po wywołaniu wyładowań epileptopodobnych (**Rycina 6.7.4.2, Tabela MD 3** w rozdziale materiały dodatkowe). Analiza funkcjonalna za pomocą programu Reactome (<https://reactome.org/>, wersja 82, stan na dzień 30/11/2022) nie wykazała ścieżek w których te geny byłyby nadreprezentowane.

Porównując liczbę genów o zmienionym poziomie ekspresji po nadekspresji *Mbd3* w stosunku do liczby genów o zmienionym poziomie ekspresji po transfekcji wirusem kontrolnym

(SYN-GFP) można sugerować, że podwyższony poziom białka Mbd3 w hodowli pierwotnej neuronów korowych zapobiega zmianom ekspresji niektórych genów wywołanych na skutek zwiększonej aktywności epileptopodobnej.



Rycina 6.7.4.2 Zmiany poziomu ekspresji genów 24 godziny po wywołaniu wyładowań epileptopodobnych w hodowli pierwotnej neuronów korowych po transfekcji wirusem wywołującym nadekspresję Mbd3 (SYN-MBD3-GFP) ($p < 0,05$).

Tabela 10. Analiza funkcjonalna genów o zmienionym poziomie ekspresji ($p < 0,05$) 24 godziny po indukcji wyładowań epileptopodobnych w hodowli neuronów korowych transfekowanych wirusem kontrolnym (SYN-GFP) (<https://reactome.org/>, wersja 82, stan na dzień 30/11/2022). W tabeli umieszczono procesy o najwyższej wartości prawdopodobieństwa.

Procesy / uczestnictwo w ścieżkach sygnałowych	Znalezione	Stosunek	Wartość p
Kanały potasowe	5/103	0,009	0,0013
Kanał potasowy (K+) udział Task1 – 2 (ang. <i>potassium channel subfamily K member</i>)	1/2	1,72E-04	0,026
Potencjał spoczynkowy błony	2/19	0,002	0,027

6.7.5 Wpływ nadekspresji Mbd3 na ekspresję genów w warunkach fizjologicznych lub po indukcji wyładowań epileptopodobnych

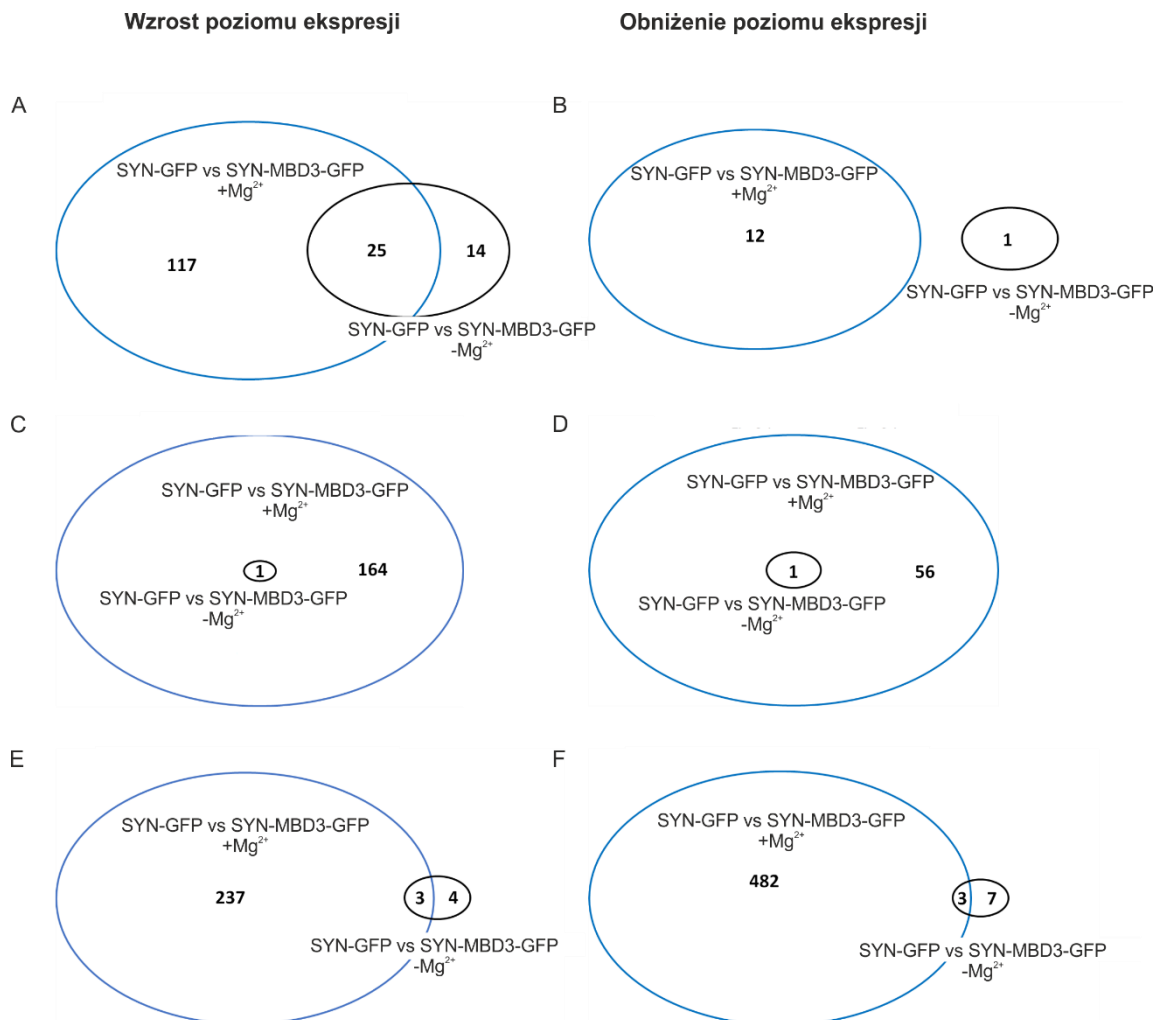
W dalszej części pracy porównaliśmy zmiany ekspresji genów w hodowlach z nadekspresją Mbd3 (SYN-MBD3-GFP) do zmian ekspresji genów zachodzących po transfekcji wirusem kontrolnym (SYN-GFP).

W 2 godziny po wywołaniu wyładowań epileptopodobnych zaobserwowano wzrost ekspresji 39 genów oraz obniżenie ekspresji 1 genu w hodowlach z nadekspresją Mbd3 (SYN-MBD3-GFP) w porównaniu do hodowli transfekowanych wirusem kontrolnym (SYN-GFP) (**Rycina 6.7.5.1 A-B**). Natomiast w warunkach fizjologicznych genów zwiększających poziom ekspresji było 142 (**Rycina 6.7.5.1 A**), a zmniejszających 12 (**Rycina 6.7.5.1 B**). Zaobserwowano 25 genów zwiększających poziom ekspresji zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i w warunkach zwiększonych wyładowań epileptopodobnych (**Rycina 6.7.5.1 A**). Analiza funkcjonalna za pomocą programu Reactome (<https://reactome.org/>, wersja 82, stan na dzień 30/11/2022) wykazała, że zmienione geny są w dużej mierze zaangażowane w szlak sygnalizacyjny Notch (**Tabela 11**).

6 godzin po wywołaniu wyładowań epileptopodobnych w hodowlach z nadekspresją Mbd3 (SYN-MBD3-GFP) w porównaniu do hodowli transfekowanych wirusem kontrolnym (SYN-GFP) zaobserwowano 1 gen zwiększający i 1 gen zmniejszający poziom ekspresji (**Rycina 6.7.5.1 C-D**). W warunkach fizjologicznych genów zwiększających poziom ekspresji było 165 (**Rycina 6.7.5.1 C**), a zmniejszających – 57 (**Rycina 6.7.5.1 D**). Analiza funkcjonalna za pomocą programu Reactome (<https://reactome.org/>, wersja 82, stan na dzień 30/11/2022) wykazała, że zmienione geny są zaangażowane w aktywację kinaz (**Tabela 11**).

24 godziny po wywołaniu wyładowań epileptopodobnych w hodowlach z nadekspresją Mbd3 (SYN-MBD3-GFP) w porównaniu do hodowli transfekowanych wirusem kontrolnym (SYN-GFP) zaobserwowano 7 genów zwiększających (**Rycina 6.7.5.1 E**) i 10 genów zmniejszających poziom ekspresji (**Rycina 6.7.5.1 F**). W warunkach fizjologicznych genów zwiększających poziom ekspresji było 240, a zmniejszających poziom ekspresji było 485. Zaobserwowano 3 geny ze zwiększonym poziomem ekspresji oraz 3 geny z obniżonym poziomem ekspresji zarówno w warunkach fizjologicznych i epileptopodobnych (**Rycina 6.7.5.1 E-F**). Analiza funkcjonalna za pomocą programu Reactome (<https://reactome.org/>, wersja 82, stan na dzień 30/11/2022) wykazała, że zmienione geny są zaangażowane w metabolizm hormonów steroidowych, fruktozy oraz aktywację kinaz (**Tabela 11**).

Geny, których ekspresja ulega zmianie zarówno w warunkach fizjologicznych jak i w warunkach zwiększonych wyładowań epileptopodobnych mogą być generalnie zależne od białka Mbd3. Geny te przedstawiono w **Tabela MD 4** w rozdziale materiały dodatkowe.



Rycina. 6.7.5.1 Liczba genów których ekspresja uległa zmianie po nadekspresji Mbd3 ($p < 0.05$) w środowisku fizjologicznym lub po wywołaniu wyładowań epileptopodobnych 2 (A-B), 6 (C-D) i 24 godziny (E-F) po wywołaniu wyładowań epileptopodobnych. SYN-GFP – transfekcja wirusem kontrolnym, SYN-MBD3-GFP – transfekcja wirusem do nadekspresji *Mbd3*, (-Mg²⁺) – warunki wywołujące wyładowania epileptopodobne (kolor czarny); (+Mg²⁺) – warunki fizjologiczne (kolor niebieski)

Tabela 11. Analiza funkcjonalna genów zmieniających poziom ekspresji ($p < 0,05$) w hodowli pierwotnej neuronów korowych w warunkach fizjologicznych i po wywołaniu wyładowań epileptopodobnych w zależności od poziomu ekspresji Mbd3 2, 6 i 24 godziny po wywołaniu wyładowań epileptopodobnych (<https://reactome.org/>, wersja 82, stan na dzień 30/11/2022). W tabeli umieszczono procesy o najwyższej wartości prawdopodobieństwa.

Punkt czasowy	Procesy / uczestnictwo w ścieżkach sygnałowych	Znalezione	Stosunek	Wartość p
2 godziny	NR1H3 i NR1H2 (ang. <i>Nuclear Receptor Subfamily 1 group H member 2-3</i>) regulują ekspresję genów związanych z transportem cholesterolu	3/66	0,004	0,008
	Przebudowa frakcji cholesterolu (ang. <i>high-density lipoprotein</i>)	2/24	0,002	0,001
	Proteoglikany macierzy pozakomórkowej	3/79	0,005	0,013
	Interakcje białek błony podstawnej – lamin	2/31	0,002	0,016
	Sygnalizacja za pośrednictwem NR1H2 i NR1H3 (ang. <i>Nuclear Receptor Subfamily 1 group H member 2-3</i>)	3/85	0,006	0,016
	Aktywacja sygnalizacji PTK2 (ang. <i>Protein Tyrosine Kinase 2</i>) przez receptor MET (ang. <i>single pass tyrosine kinase receptor</i>)	2/32	0,002	0,017
	Transkrypcja i translacja przed NOTCH	3/89	0,006	0,018
	MET (ang. <i>single pass tyrosine kinase receptor</i>) w mobilności komórek	2/45	0,003	0,032
	Ekspresja i przetwarzanie przed NOTCH	3/114	0,008	0,034
	Sygnalizacja jądrowa przez ERBB4 (ang. <i>Erb-B2 receptor tyrosine kinase 4</i>)	2/47	0,003	0,035
	LFNG (ang. <i>Beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase lunatic fringe</i>) w regulacji szlaku NOTCH	1/6	3,95E-04	0,036
	Regulacja transportu i wychwytu insulinopodobnego czynnika wzrostu (ang. <i>Insulin like growth factor</i>) przez	3/127	0,008	0,045

	białka wiążące insulinopodobny czynnik wzrostu			
	Przebudowa lipoprotein osocza	2/56	0,004	0,048
	Niekanoniczna aktywacja NOTCH3	1/8	5,27E-04	0,048
6 godzin	GTPazy RHO aktywujące PAK (ang. <i>p21-activated kinases</i>)	1/21	0,002	0,016
24 godziny	Biosynteza fruktozy	½	1,72E-04	0,002
	Metabolizm fruktozy	1/7	6,02E-04	0,008
	Biosynteza pregnenolonu	1/12	0,001	0,013
	GTPazy RHO aktywujące PAK (ang. <i>p21-activated kinases</i>)	1/21	0,002	0,023
	Metabolizm hormonów steroidowych	1/35	0,003	0,038

Zaobserwowano geny, których poziom ekspresji uległ zmianie po transfekcji wirusem wywołującym nadekspresję Mbd3 (SYN-MBD3-GFP), w porównaniu do transfekcji wirusem kontrolnym jedynie w warunkach zwiększonych wyładowań epileptopodobnych, a nie w warunkach fizjologicznych (**Ryciny 6.7.5.1, Tabela MD 5** w rozdziale materiały dodatkowe). Ponieważ sytuacja, w której występują jednocześnie wyładowania epileptopodobne i zwiększony poziom Mbd3 naśladuje warunki opisane przez Bednarczyk i wsp. w modelu zwierzęcym padaczki, można oczekiwać, że geny zmieniające poziom ekspresji jedynie w tych warunkach, mają znaczenie w patologii choroby.

Analiza funkcjonalna za pomocą programu Reactome (<https://reactome.org/>, wersja 82, stan na dzień 30/11/2022) wykazała, że zmienione geny są głównie zaangażowane działanie receptora czynnika wzrostu fibroblastów (ang. *Fibroblast growth factor receptor 1*), a także w szlak sygnałowy reelinu i PI3K (**Tabela 12**).

Tabela 12. Analiza funkcjonalna genów ze zmienionym poziomem ekspresji ($p < 0.05$) w warunkach zwiększonych wyładowań epileptopodobnych, ale nie w warunkach fizjologicznych w hodowli pierwotnej neuronów korowych transfekowanych wirusem wywołującym nadekspresję Mbd3 (SYN-MBD3-GFP) lub wirusem kontrolnym (SYN-GFP)(<https://reactome.org/>, wersja 82, stan na dzień 30/11/2022). W tabeli umieszczono procesy o najwyższej wartości prawdopodobieństwa.

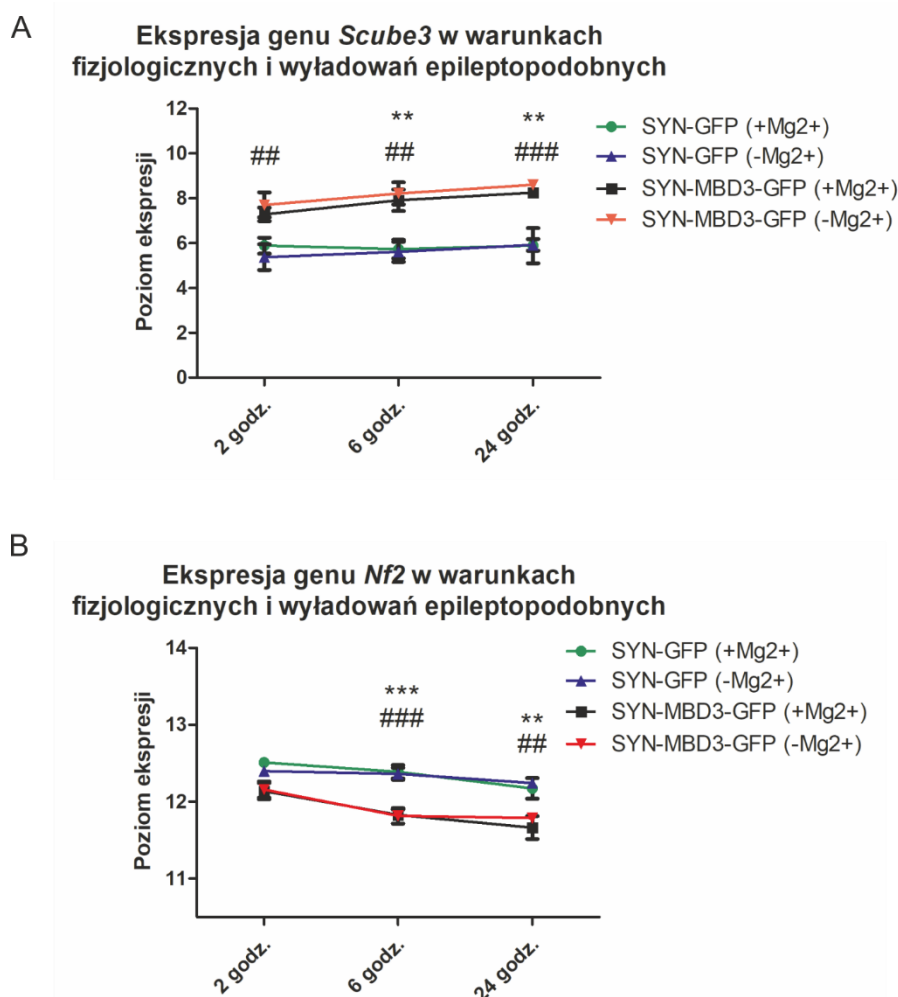
Punkt czasowy	Procesy / uczestnictwo w ścieżkach sygnałowych	Znalezione	Stosunek	Wartość p
2 godziny	Sygnalizacja FGFR1 (ang. <i>Fibroblast growth factor receptor 1</i>)	2/5	3,29E-04	1,26E-04
	Aktywacja receptora FGFR1 (ang. <i>Fibroblast growth factor receptor 1</i>)	3/39	0,003	2,86E-04
	Sygnalizacja przez FGFR1 (ang. <i>Fibroblast growth factor receptor 1</i>) w patologii	3/49	0,003	5,54E-04
	Sygnalizacja przez aktywowane mutacje punktowe FGFR1 (ang. <i>Fibroblast growth factor receptor 1</i>)	2/15	9,88E-04	0,001
	Wiązanie i aktywacja liganda FGFR1 (ang. <i>Fibroblast growth factor receptor 1</i>)	2/21	0,001	0,002
	FGFR1 (ang. <i>Fibroblast growth factor receptor 1</i>) w kaskadzie, w której pośredniczy fosfolipaza C	2/22	0,001	0,002
	Sygnalizacja przez FGFR (ang. <i>Fibroblast growth factor receptor</i>) w patologii	3/82	0,005	0,002
	FGFR1 w kaskadzie PI-K (ang. <i>Fibroblast growth factor receptor 1</i>)	2/28	0,002	0,004
	FGFR1 w kaskadzie SHC (ang. <i>Fibroblast growth factor receptor 1</i>)	2/30	0,002	0,004
	Sygnalizacja FGFR1 (ang. <i>Fibroblast growth factor receptor 1</i>) za pośrednictwem FRS (ang. <i>Fibroblast growth factor receptor</i>)	2/31	0,002	0,005
	Sygnalizacja interleukiny-37	2/36	0,002	0,006
	Negatywna regulacja sygnalizacji FGFR1 (ang. <i>Fibroblast growth factor receptor 1</i>)	2/39	0,003	0,007

	Sygnalizacja za pośrednictwem FGFR2 (ang. <i>Fibroblast growth factor receptor 2</i>) – pętla aktywacyjna	2/42	0,003	0,008
	Sygnalizacja jądrowa przez ERBB4 (ang. <i>Erb-B2 receptor tyrosine kinase 4</i>)	2/47	0,003	0,01
	Regulacja transkrypcji przez rodzinę czynników transkrypcyjnych AP-2	2/52	0,003	0,012
	Kaskada PI3K (ang. <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>)	2/58	0,004	0,015
	Sygnalizacja przez fuzję FGFR1 (ang. <i>Fibroblast growth factor receptor 1</i>) błony komórkowej	1/5	3,29E-04	0,016
	Sygnalizacja przez FGFR1 (ang. <i>Fibroblast growth factor receptor 1</i>)	2/62	0,004	0,017
	Sygnalizacja przez interleukiny	6/658	0,043	0,019
	Sygnalizacja za pośrednictwem IRS (ang. <i>insulin receptor substrate</i>)	2/65	0,004	0,019
	NR1H3 i NR1H2 (ang. <i>Nuclear Receptor Subfamily 1 group H member 2-3</i>) w regulacji ekspresji genów związanych z transportem cholesterolu	2/66	0,004	0,019
	Wpływ IGF1R (ang. <i>type 1 insulin-like growth factor receptor</i>) na IRS (ang. <i>insulin receptor substrate</i>)	2/69	0,005	0,021
	Wiązanie i aktywacja ligandu FGFR1c (ang. <i>Fibroblast growth factor receptor 1c</i>)	1/7	4,61E-04	0,022
	Kaskada sygnalizacyjna IGF1R (ang. <i>Fibroblast growth factor receptor 1</i>)	2/72	0,005	0,023
	Kaskada sygnalizacyjna receptora insuliny	2/72	0,005	0,023
6 godzin	-	-	-	-
24 godziny	Kanały potasowe aktywowane wapniem	2/9	7,74E-04	5,55E-04
	Działanie cGMP (ang. <i>cyclic guanosine monophosphate</i>)	2/16	0,001	0,002

Regulacja tlenu azotu w której pośredniczy cyklaza guanylowa	2/23	0,002	0,004
Zahamowanie wzrostu aksonu za pośrednictwem receptorów EPHA (ang. <i>Ephrin type-A receptor 3</i>)	2/29	0,002	0,005
POMT2 (ang. <i>protein O-mannosyl-transferase 2</i>) w patogenezie dystrofii mięśniowej	1/3	2,58E-04	0,011
POMT1 (ang. <i>protein O-mannosyl-transferase 1</i>) w patogenezie dystrofii mięśniowej	1/3	2,58E-04	0,011
Aktywacja RAC1 (ang. <i>Rac Family Small GTPase 1</i>) przez NTRK2 (ang. <i>neurotrophic receptor tyrosine kinase 2</i>)	1/5	4,30E-04	0,019
Szlak sygnałowy Reeliny	1/5	4,30E-04	0,019
Sygnalizacja FLT3 (ang. <i>receptor-type tyrosine protein kinase</i>) przez kinazy z rodziny SRC (ang. <i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src</i>)	1/6	5,16E-04	0,022
Interakcje semaforyny	2/64	0,006	0,025
Aktywacja przekaźnictwa NTRK2 (ang. <i>neurotrophic receptor tyrosine kinase 2</i>) przez FYN (ang. <i>tyrosine protein kinase</i>)	1/7	6,02E-04	0,026
Pobieranie tlenu i uwalniania dwutlenku węgla w erytrocytach	1/8	6,88E-04	0,03
Białko <i>Nef</i> i transdukcja sygnału	1/9	7,74E-04	0,034
Homeostaza trombocytów	2/88	0,008	0,044
Szlak Vav1 (ang. <i>Proto-oncogene vav</i>) zależny od CD28 (ang. <i>T-cell-specific surface glycoprotein CD28</i>)	1/12	0,001	0,044
Odwracalna hydratacja dwutlenku węgla	1/12	0,001	0,044
Wymiana O ₂ /CO ₂ w erytrocytach	1/12	0,001	0,044
Interakcje PECAM1 (ang. <i>platelet endothelial cell adhesion molecule</i>)	1/12	0,001	0,044

Pochłanianie dwutlenku węgla i uwalnianie tlen w erytrocytach	1/12	0,001	0,044
Sygnalizacja EPH-Efryna	2/92	0,008	0,048

Co ciekawe, zaobserwowano, że dwa geny zwiększają poziom ekspresji zarówno 6 godzin jak i 24 godziny po wywołaniu wyładowań epileptopodobnych po transfekcji wirusem wywołującym nadekspresję Mbd3 (SYN-MBD3-GFP), w porównaniu do transfekcji wirusem kontrolnym (SYN-GFP), zarówno w warunkach fizjologicznych jak i w warunkach zwiększonych wyładowań epileptopodobnych. Były to geny *Scube3* (ang. *signal peptide, CUB domain and EGF like domain containing 3*) i *Nf2* (ang. *moesin-ezrin-radixin like (MERLIN) tumor suppressor*) (Rycina. 6.7.5.2, Tabela MD 4 w rozdziale materiały dodatkowe).



Rycina 6.7.5.2 Zmiany poziomu ekspresji genu *Scube3* (A) i *Nf2* (B) w warunkach fizjologicznych oraz zwiększonych wyładowań epileptopodobnych w zależności od poziomu MBD3. (-Mg²⁺) – warunki wywołujące wyładowania epileptopodobne; (+Mg²⁺) – warunki fizjologiczne; (średnia ± SEM, jednoczynnikowa ANOVA).

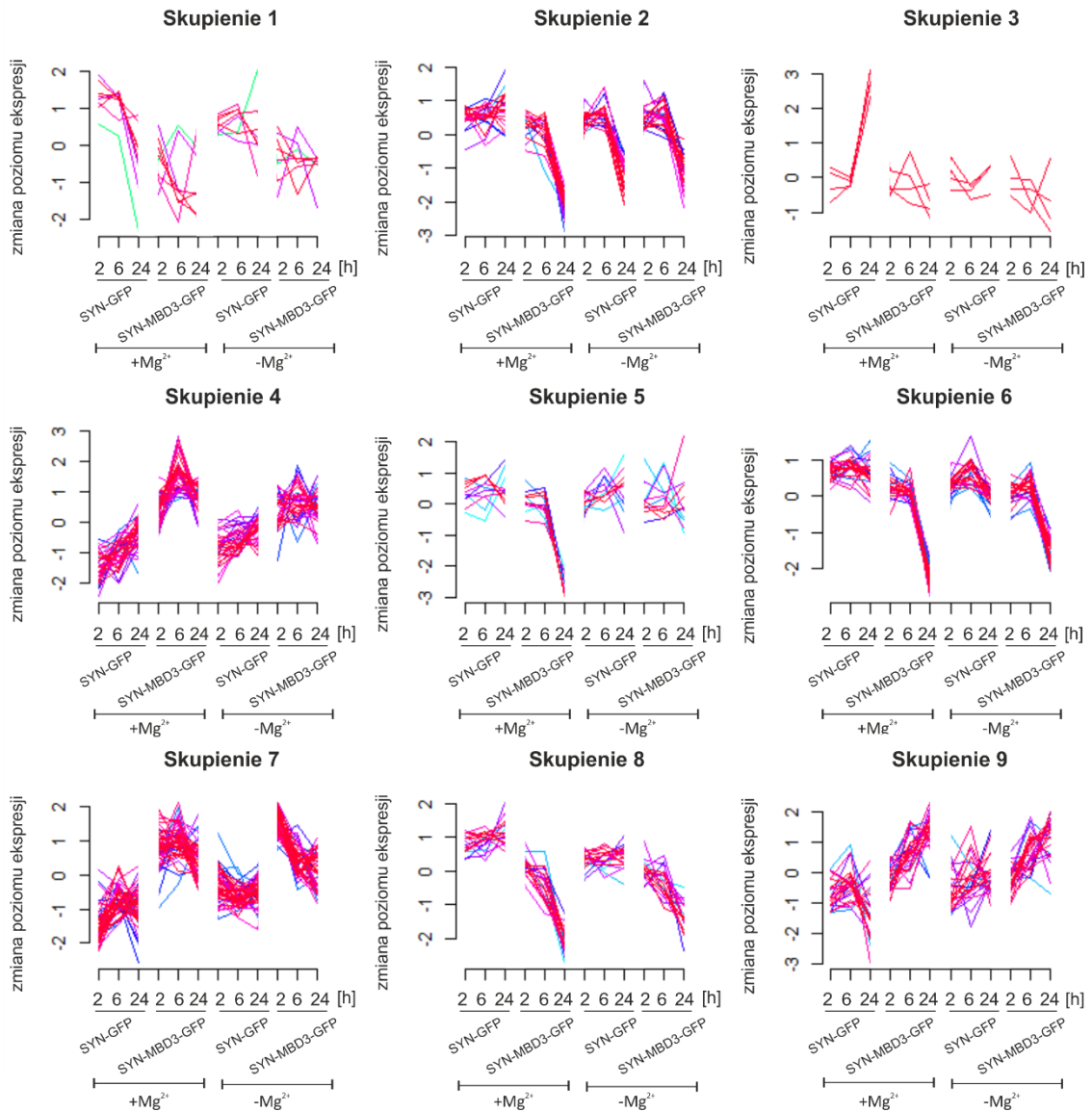
6.7.6 Wzory ekspresji genów zależne od poziomu białka Mbd3, w modelu zwiększonej aktywności epileptopodobnej.

W celu wykrycia genów, których ekspresja zmienia się w podobny sposób, przeprowadzono analizę skupień (rozdział 5.2.11.9.3). Geny zostały podzielone na 9 skupień, z których każde grupuje geny o podobnych przebiegach zmian w poziomach ekspresji w zależności od warunków (fizjologiczne vs. po wywołaniu wyładowań epileptopodobnych), poziomu ekspresji Mbd3 (transfekcja wirusem do nadekspresji Mbd3 vs. wirusem kontrolnym) oraz czasu od indukcji wyładowań epileptopodobnych (2, 6 i 24 godziny). Skupienia będące wynikiem analizy przedstawiono na **Rycinie 6.7.6.1**.

Zaobserwowano, że skupienie numer 4, 6, 7, 8 i 9 wykazują pewne podobieństwa w przebiegach ekspresji genów. W skupieniach tych widoczne są różnice w poziomie ekspresji genów w hodowlach ze zwiększonym poziomem *Mbd3* w stosunku do hodowli transfekowanych wirusem kontrolnym. Wzrost poziomu ekspresji na skutek nadekspresji *Mbd3* zaobserwowano w skupieniach numer 4, 7 oraz 9. Z kolei obniżenie poziomu ekspresji zaobserwowano w klastrze 6 i 8. Wpływ wyładowań epileptopodobnych mniej zauważalny. Można sugerować, że zmiana poziomu ekspresji tych genów została wywołana nadekspresją genu *Mbd3* zarówno w warunkach fizjologicznych jak i epileptopodobnych. Przebieg ekspresji genu *Mbd3* znaleziono w skupieniu 7 (**Rycina 6.7.6.1**).

W przypadku skupień 2 i 3, wywołanie wyładowań epileptopodobnych spowodowało zmianę profilów ekspresji genów na zbliżone do nadekspresji *Mbd3* w warunkach fizjologicznych, charakteryzujących się spadkiem ekspresji po 24 godziny. Wywołanie wyładowań epileptopodobnych nie miało już wpływu na profile ekspresji genów w hodowli z nadekspresją *Mbd3* (**Rycina 6.7.6.1**). Listę genów należących do tych skupień zaprezentowano w **Tabeli MD 6** w rozdziale materiały dodatkowe.

W skupieniu 5 znalazły się geny, które obniżały poziom ekspresji w hodowlach z nadekspresją *Mbd3* w warunkach fizjologicznych. Wywołanie wyładowań epileptopodobnych zapobiegało temu obniżeniu (**Rycina 6.7.6.1, Tabela MD 6** w rozdziale materiały dodatkowe). Możemy sugerować, że wyładowania epileptopodobne znoszą efekt działania nadekspresji *Mbd3*.



Rycina 6.7.6.1 Analiza skupień zmian ekspresji genów w różnych punktach czasowych po indukcji wyładowań epileptopodobnych w zależności od warunków (fizjologiczne vs. po wywołaniu wyładowań epileptopodobnych) oraz poziomu ekspresji Mbd3 (nadekspresja vs. kontrola). Wykresy przedstawiają krotność zmiany ekspresji genów ($p < 0.01$) w porównaniu do poziomu ekspresji w hodowli nie poddanej transfekcji i inkubowanej odpowiednio : w warunkach fizjologicznych ($+Mg^{2+}$) lub warunkach zwiększonej aktywności epileptopodobnej ($-Mg^{2+}$). Poszczególne skupienia zawierają grupy genów których profile ekspresji są do siebie zbliżone. Kolorem czerwonym kolorem oznaczone zostały geny z najwyższą wartością, odcienie zbliżone do czerwonego wskazują na wysoką wartość, natomiast odcienie koloru niebieskiego i zielonego wskazują na najmniejszą wartość członkostwa w danym klastrze. ($-Mg^{2+}$) – warunki wywołujące wyładowania epileptopodobne; ($+Mg^{2+}$) – warunki fizjologiczne, h – godziny, SYN-GFP – wirus kontrolny, SYN-MBD3-GFP – wirus wywołujący nadekspresję Mbd3;

Analizę funkcjonalną genów przyporządkowanych do poszczególnych skupień przeprowadzono w bazie Reactome (<https://reactome.org/>) (**Tabela 13**). Co ciekawe, przeprowadzona analiza wykazała rolę genów, których ekspresja uległa zmianie pod wpływem nadekspresji Mbd3, między innymi w procesach regulowanych przez białko NOTCH (**Tabela 13**, skupienie 4), białko MeCP2, należące do rodziny białek MBD (**Tabela 13**, skupienie 8), oraz w szlaku sygnałowym PI3K (**Tabela 13**, klaster 7).

W skupieniach 2 i 3 zaobserwowano udział genów kodujących receptory błonowe bramkowe napięciem lub zależne od białka G (**Tabela 13**, skupienie 2) oraz zaangażowanych w regulację ekspresji genów (**Tabela 13**, skupienie 3).

Natomiast w skupieniu 5 zaobserwowano, między innymi udział genów w regulacji hormonów glikoproteinowych i biosyntezie hormonów peptydowych (**Tabela 13**, skupienie 5).

Tabela 13. Analiza funkcjonalna białek kodowanych przez przyporządkowanych do indywidualnych skupień w analizie skupień. Analizę przeprowadzono w bazie Reactome (<https://reactome.org/>, wersja 82, stan na dzień 25/11/2022). W tabeli umieszczono procesy o najwyższej wartości prawdopodobieństwa.

Skupienie	Procesy / uczestnictwo w ścieżkach sygnałowych	Znalezione	Stosunek	Wartość p
Skupienie 1	Aktywacja RAC1 (ang. <i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>) w synaptogenezie wyzwalanej przez receptor N-metylo-D-asparaginowego (NMDAR, ang. <i>anti-N-methyl-D-aspartate receptor</i>)	1/7	6,02E-04	0,016
	Fosforylacja CREB1 (ang. <i>cyclic AMP-responsive element-binding protein 1</i>) poprzez aktywację kaskady CaMKII/CaMKK/CaMKIV (ang. <i>Calcium/calmodulin-dependent kinases</i>)	1/8	6,88E-04	0,018
	Fosforylacja CREB (ang. <i>cyclic AMP-responsive element-binding protein</i>) przez aktywację CaMK IV (ang. <i>Calcium/calmodulin-dependent kinases type IV</i>)	1/10	8,60E-04	0,022

	Udział RHOBTB1 (ang. <i>Rho related BTB domain Containing 1</i>) w cyklu GTPazy	1/23	0,002	0,05
Skupienie 2	Wtórne przekazywanie w sygnalizacji netryny 1 (ang. <i>netrin-1</i>)	2/10	8,60E-04	0,002
	Sygnalizacja netryny 1 (ang. <i>netrin-1</i>)	3/50	0,004	0,004
	Kanały TRP (ang. <i>Transient receptor potential</i>)	2/28	0,002	0,014
	Hamowanie kanałów bramkowanych napięciem dla Ca ²⁺ poprzez podjednostki Gbeta / gamma	2/29	0,002	0,015
	Kanały potasowe bramkowane białkiem G	2/29	0,002	0,015
	Aktywacja kanałów potasowych bramkowanych białkiem G	2/29	0,002	0,015
	Kanały dla K ⁺	2/35	0,003	0,021
	Klasyczne kanały Kir (ang. <i>inward-rectifier potassium channel</i>)	1/4	3,44E-04	0,025
	Aktywacja receptorów GABA _B	2/43	0,004	0,03
	Transport przez błononowy abakawiru	1/5	4,30E-04	0,031
	Netryna (ang. <i>Netrin</i>) w sygnałach awersyjnych	1/8	6,88E-04	0,049
Skupienie 3	Regulacja ekspresji genów w komórkach beta	2/35	0,002	2,36e-04
	Regulowana FOXO transkrypcja genów zaangażowanych w stres oksydacyjny i metabolizm i genów neuronalnych	2/49	0,003	4,61e-04
	Regulacja rozwoju komórek beta	2/67	0,004	8,56e-04
	Zaburzenia glukokinazy cytozolowej w rozwoju cukrzycy typu 2	1/3	1,98e-04	0,002
	Regulowana FOXO transkrypcja genów	2/110	0,007	0,002
	Aktywacja BTK (ang. <i>Bruton's tyrosine kinase</i>) przez białka GPCR (ang. <i>G-protein coupled receptors</i>)	1/19	0,001	0,012

	Niedobór MyD88 (ang. <i>myeloid differentiation primary response 88</i>)	1/26	0,002	0,017
	Niedobór interleukiny IRAK4 (ang. <i>interleukin-1 receptor-associated kinase 4</i>)	1/27	0,002	0,018
	Zaburzenia nukleoproteiny TRP (ang. <i>Transient receptor potential</i>) w rozwoju raka brodawkowego tarczycy	1/36	0,002	0,023
	Sygalizacja białka DAP12 (ang. <i>TYRO protein, tyrosine kinase-binding protein</i>)	1/36	0,002	0,023
	Sygnalizacja przez białko G	1/39	0,003	0,025
	Regulacja glukokinazy przez białko regulacyjne glukokinazy	1/40	0,003	0,026
	Aktywacja białka WASP (ang. <i>Wiskott-Aldrich syndrome protein</i>) i WAVE (ang. <i>verprolin-homologous protein</i>) przez GTPazy RHO	1/41	0,003	0,027
	Choroby związane z kaskadą sygnalizacyjną TLR (ang. <i>toll like receptor</i>)	1/42	0,003	0,027
	Choroby układu odpornościowego	1/42	0,003	0,027
	Interakcje DAP12 (ang. <i>TYRO protein, tyrosine kinase-binding protein</i>)	1/53	0,003	0,034
Skupienie 4	Regulacja transkrypcji przez doemnę wewnątrzkomórkową NOTCH2	2/16	0,001	0,008
	Regulacja sygnalizację NOTCH przez RUNX3 (ang. <i>RUNX family transcription factor 3</i>)	2/16	0,001	0,008
	Regulacja ekspresji genów w późnych fazach komórek prekursorowych trzustki	2/20	0,001	0,013
	Regulacja transkrypcyjna różnicowania jąder	2/21	0,001	0,014
	Czynnik transkrypcyjny TFAP2 w regulacji transkrypcji genów czynników wzrostowych i ich receptorów	2/21	0,001	0,014

	SLC2A1 (ang. <i>solute carrier family 2 member 1</i>) w patogenezie zespołu niedoboru transportera glukozy	1/2	1,32E-04	0,017
	Przebudowa frakcji cholesterolu (ang. <i>high-density lipoprotein</i>)	2/24	0,002	0,018
	Regulacja ekspresji genów związanych z transportem cholesterolu NR1H3 i NR1H2 (ang. <i>Nuclear Receptor Subfamily 1 group H member 2-3</i>)	3/66	0,004	0,019
	Regulacja transkrypcji przez domenę wewnątrzkomórkową NOTCH4	2/26	0,002	0,021
	Metabolizm witaminy C	2/26	0,002	0,021
	Ścieżka transkrypcyjna Notch-HLH	2/28	0,002	0,024
	Regulacja transkrypcji genów zaangażowanych w uwalnianie cytochromu C przez TP53 (ang. <i>TP53-binding protein 1</i>)	2/33	0,002	0,033
	Sygnalizacja za pośrednictwem NR1H2 i NR1H3 (ang. <i>Nuclear Receptor Subfamily 1 group H member 2-3</i>)	3/85	0,006	0,036
	Regulacja transkrypcji przez domenę wewnątrzkomórkową NOTCH3	2/36	0,002	0,038
	Sygnalizacja NOTCH2	2/38	0,003	0,042
Skupienie 5	Sygnalizacja przez MST1 (ang. <i>macrophage stimulating 1</i>)	1/5	4,30E-04	0,01
	Hormony glikoproteinowe	1/10	8,60E-04	0,02
	Biosynteza hormonów peptydowych	1/12	0,001	0,023
Skupienie 6	Inaktywacja kanałów sodowych	1/8	5,27E-04	0,036
Skupienie 7	Sygnalizacja przez FGFR (ang. <i>Fibroblast growth factor receptor</i>) w patologii	9/82	0,005	1,30E-06
	Sygnalizacja przez FGFR2 (ang. <i>Fibroblast growth factor receptor</i>) wariant IIIa TM	5/24	0,002	1,59E-05

Aktywacja zmutowanego receptora FGFR2 (ang. <i>Fibroblast growth factor receptor 2</i>)	6/43	0,003	2,12E-05
Sygnalizacja przez FGFR2 (ang. <i>Fibroblast growth factor receptor 2</i>) w patologii	6/58	0,004	1,09E-04
Kaskada PI3K (ang. <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>)	6/58	0,004	1,09E-04
Sygnalizacja za pośrednictwem IRS (ang. <i>insulin receptor substrate</i>)	6/65	0,004	2,01E-04
Sygnalizacja konstytutywna przez nieprawidłowy szlak PI3K (ang. <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>) w nowotworze	7/96	0,006	2,50E-04
Regulacja IRS (ang. <i>insulin receptor substrate</i>) przez receptor insulinopodobny czynnika wzrostu 1 typu 1 (IGF1R, ang. <i>insulin-like growth factor receptor 1</i>)	6/69	0,005	2,76E-04
FGFR2 (ang. <i>Fibroblast growth factor receptor 2</i>) w kaskadzie, w której pośredniczy fosfolipaza C	4/25	0,002	3,15E-04
Kaskada sygnalizacyjna receptora insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 typu 1 (IGF1R, ang. <i>insulin-like growth factor receptor 1</i>)	6/72	0,005	3,45E-04
Kaskada sygnalizacyjna receptora insuliny	6/72	0,005	3,45E-04
Wiązanie i aktywacja liganda FGFR2 (ang. <i>Fibroblast growth factor receptor 2</i>)	4/26	0,002	3,65E-04
Sygnalizacja przez receptor insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 typu 1 (IGF1R, ang. <i>insulin-like growth factor receptor 1</i>)	6/73	0,005	3,71E-04

	FGFR2 (ang. <i>Fibroblast growth factor receptor 2</i>) w kaskadzie PI3K (ang. <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>)	4/31	0,002	7,03E-04
	Interakcje białek błony podstawnej – lamin	4/31	0,002	7,03E-04
	Kaskada, w której pośredniczy SHC: FGFR2 (ang. <i>Fibroblast growth factor receptor 2</i>)	4/33	0,002	8,85E-04
	Sygnalizacja FGFR2 (ang. <i>Fibroblast growth factor receptor 2</i>) za pośrednictwem białek FRS (ang. <i>Fibroblast growth factor receptor</i>)	4/34	0,002	9,87E-04
	Sygnalizacja PI3K/AKT w nowotworze	7/124	0,008	0,001
	Regulacja szlaku sygnałowego PI3K/AKT za pośrednictwem PI5P (ang. <i>phosphatidylinositol-5-phosphate</i>), PP2A (ang. <i>phosphatase 2A protein</i>) i IER3 (ang. <i>radiation-inducible immediate-early gene IEX-1</i>)	7/129	0,008	0,001
	Sygnalizacja przez receptor insuliny	6/99	0,007	0,002
	Sygnalizacja FGFR1 (ang. <i>Fibroblast growth factor receptor 1</i>)	2/5	3,29E-04	0,002
	Sygnalizacja FGFR2 (ang. <i>Fibroblast growth factor receptor 2</i>)	2/5	3,29E-04	0,002
	Negatywna regulacja sygnalizacji FGFR2 (ang. <i>Fibroblast growth factor receptor 2</i>)	4/41	0,003	0,002
	Negatywna regulacja szlaku sygnałowego PI3K/AKT	7/137	0,009	0,002
	Sygnalizacja za pośrednictwem (ang. <i>Fibroblast growth factor receptor 2</i>) FGFR2 – pętla aktywacyjna	4/42	0,003	0,002
Skupienie 8	Regulacja neuronalnych receptorów i kanałów przez MeCP2	2/32	0,002	0,005
	Regulacja transkrypcyjna przez MeCP2	2/100	0,007	0,039

Skupienie 9	Zaburzenia ALG6 (ang. <i>alpha-1,3-glucosyltransferase</i>) w glikozylacji	1/1	8,60E-05	0,007
	Biosynteza fruktozy	1/2	1,72E-04	0,014
	Synteza fosfatydyloinozytolu	1/5	4,30E-04	0,034
	Metabolizm fruktozy	1/7	6,02E-04	0,048

7. Dyskusja

W niniejszej rozprawie po raz pierwszy wykazaliśmy, że: (I) drgawki powodują przejściowy, specyficzny dla struktury, wzrost poziomu Mbd3; (II) obniżenie poziomu Mbd3 opóźnia rozwój drgawek ostrych; (III) nadekspresja Mbd3 *in vivo* ma efekt proepileptogenny; (IV) Mbd3 bierze udział w regulacji genów w modelu wyładowań epileptopodobnych *in vitro*. Ponadto zaobserwowaliśmy, że zmiany w poziomie Mbd3 w ciele migdałowatym wywołują specyficzne zmiany w zachowaniu zwierząt.

7.1 Wektory wirusowe, jako narzędzie modyfikacji ekspresji i poziomu białka Mbd3.

W toku realizacji projektu do modyfikacji poziomu Mbd3 zastosowaliśmy komercyjnie przygotowane wirusy AAV. Wykazaliśmy wysoką skuteczność tych wirusów w obniżeniu (sh(MBD3)) jak i zwiększeniu (SYN-MBD3-GFP) poziomu białka Mbd3 *in vitro*. Zgodnie z oczekiwaniami, ekspresję genów z konstruktów, znajdujących się pod kontrolą promotora synapsyny w wirusie SYN-MD3-GFP i wirusie kontrolnym SYN-GFP, wykrywaliśmy jedynie w neuronach. W przypadku ekspresji z wirusa sh(MBD3) i sh(scrambled), która kontrolowana była przez promotor U6, produkt obserwowaliśmy w neuronach i nielicznych astrocytach. Zaobserwowaliśmy obniżenie żywotności hodowli po transfekcji wirusem obniżającym poziom Mbd3 (sh(MBD3)), w porównaniu do wirusa kontrolnego (sh(scrambled)). Jednocześnie nie zaobserwowaliśmy toksyczności *in vitro* wirusa do nadekspresji Mbd3 (SYN-MBD3-GFP) i obu wirusów kontrolnych.

Po iniekcji wirusów do mózgu wykazaliśmy ekspresję z wirusa do nadekspresji Mbd3 (SYN-MBD3-GFP) oraz wirusa kontrolnego (SYN-GFP) jedynie w neuronach. Natomiast wirus obniżający poziom Mbd3 w hodowli (sh(MBD3)) i wirus kontrolny (sh(scrambled)) ulegały ekspresji w neuronach i nielicznych astrocytach. Ekspresję wszystkich wirusów zaobserwowaliśmy w rejonie ciała migdałowatego, a także w niewielkim stopniu, w przylegających obszarach kory i prążkowie.

Zaobserwowaliśmy zmiany w morfologii aksonów niektórych komórek nerwowych, po transfekcji wirusem obniżającym ekspresję Mbd3 (sh(MBD3)) lub wirusem kontrolnym (sh(scrambled)). Zmiany występowały w komórkach zlokalizowanych w pobliżu miejsca iniekcji i wykazujących wysoką ekspresję produktów wirusowych. Przypominały one żylakowatości (ang. *axonal varicosities*) występujące między innymi w tkance osób po traumatycznym urazie mózgu (Tang-Schomer i wsp. 2012). Żylakowatości zaobserwowano również w tkance pacjentów u których zdiagnozowano chorobę Alzheimera oraz w modelu choroby Alzheimera u myszy (Stokin

i wsp. 2005, Gu 2021). Możliwe, że żyłakowatości powstające po transfekcji sh(MBD3) lub sh(scrambled) są efektem stresu wywołanego nadmierną produkcją wirusa w komórce.

Podsumowując, zastosowane przez nas wektory wirusowe są skutecznym narzędziem modulacji poziomu Mbd3 *in vitro* i *in vivo*.

7.2 Wpływ ekspresji Mbd3 na zachowanie zwierząt doświadczalnych.

W toku realizacji projektu zbadaliśmy wpływ zmian poziomu Mbd3 w mózgu na dobrostan i zachowanie zwierząt doświadczalnych. Zaburzenia zachowania były niewielkie i wysoce specyficzne. Nie zaobserwowaliśmy zmian w zachowaniu zwierząt w teście reakcji na bodziec stresowy oraz teście uniesionego labiryntu krzyżowego.

Efekt zmian w poziomie Mbd3 uwidocznił się jedynie w teście otwartego pola. Zwierzęta z obniżoną ekspresją Mbd3, częściej przebywały w zewnętrznych strefach areny, w porównaniu do zwierząt kontrolnych po iniekcji wirusa kontrolnego. Jednocześnie zaobserwowaliśmy, że zwierzęta krócej przebywały w wewnętrznej strefie areny. Natomiast, zwierzęta z nadekspresją Mbd3 mniej czasu spędzały w zewnętrznej strefie, a więcej w strefie wewnętrznej areny, w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Specyficzność dysfunkcji zachowania może tłumaczyć miejsce iniekcji wirusów. Były one wstrzykiwane do ciała migdałowatego, czyli struktury kluczowej dla reakcji lękowych (Gale i wsp. 2004, Kim i wsp. 2017).

Test otwartego pola jest powszechnie stosowanym testem behawioralnym w badaniach nad padaczką w modelach eksperymentalnych. Parametry takie jak skrócenie czasu przebywania zwierząt wewnątrz areny czy zmniejszona aktywność motoryczna są wskaźnikami zwiększonego poziomu lęku (Pрут i Belzung 2003). Na podstawie danych literaturowych można wnioskować, że zmiany w poziomie lęku zwierząt badanego testem otwartego pola zależą także zastosowanego modelu padaczki (Inostroza i wsp. 2012). Uzyskane przez nas wyniki sugerują, że zaburzenia ekspresji Mbd3 wywołują zaburzenia reakcji lękowych, być może przez zmiany w ekspresji genów.

Brak jest danych dotyczących wpływu Mbd3 na zachowania lękowe. Wykazano natomiast, że inne białko z rodziny MBD, MeCP2 bierze udział w odpowiedzi na stres we wczesnym okresie życia. Badania przeprowadzone przez Murgatroyd i współpracowników pokazały, że stres we wczesnym etapie życia myszy prowadzi do hipometylacji miejsc wiązania MeCP2 do DNA (Murgatroyd i wsp. 2009). Sugeruje się, że fosforylacja MeCP2 indukuje nadekspresję genu AVP (wazopresyny, ang. *arginine vasopressin*) w neuronach, której równocześnie towarzyszy zwiększona aktywność osi podwzgórze – przysadka – kora nadnerczy

oraz zwiększony poziom stresu zaobserwowany w teście wymuszonego pływania (ang. *forced swimming test*) (Murgatroyd i wsp. 2009). Nie wiadomo, czy podobny mechanizm bierze udział w regulacji zachowań lękowych przez Mbd3.

W niniejszej pracy doktorskiej wykonaliśmy test otwartego pola po nadekspresji lub obniżeniu ekspresji Mbd3, w dwóch doświadczeniach: drgawki ostrej wywołanej PTZ i rozniecania z użyciem PTZ. Były one analizowane rozdzielnie, ponieważ w przypadku rozniecania PTZ nie implantowano zwierzętom elektrod. W doświadczeniu rozniecania PTZ nie zaobserwowaliśmy istotnego statystycznie wpływu zmian poziomu Mbd3 na zachowanie zwierząt. Zachowany został jednak trend i kierunki zmian zaobserwowane w doświadczeniu drgawki ostrej wywołanej PTZ. Brak znamienych różnic w doświadczeniu rozniecania PTZ może wynikać z mniejszej liczby zwierząt (n=10), która w przypadku drgawki ostrej wywołanej PTZ była dwukrotnie wyższa (n=20). Tę interpretację potwierdza analiza mocy testu i liczebności grupy przeprowadzona w programie PQStat (wersja 1.8.4) która wykazała, że liczebność zwierząt potrzebna do uzyskania mocy testu na poziomie 0,95 wynosi 20.

7.3 Wpływ drgawki na poziom białka Mbd3

Doświadczenia przeprowadzone przez Bednarczyk i współpracowników wykazały wzrost poziomu białka Mbd3 w ciele migdałowatym oraz korze gruszkowatej u zwierząt z padaczką, 14 dni po zainicjowaniu rozwoju padaczki (Bednarczyk i wsp. 2016). W celu zbadania czy wzrost poziomu Mbd3 był spowodowany mechanizmami zaangażowanymi w proces epileptogenezy, czy też był wywołany przez spontaniczne drgawki sprawdziliśmy, czy ekspresja poziom białka Mbd3 ulega zmianie na skutek drgawki. W doświadczeniu z zastosowaniem testu PTZ, zaobserwowaliśmy przejściowy wzrost poziomu białka Mbd3 w korze śródwęchowej i ciele migdałowatym zwierząt, w krótkim czasie po drgawce.

Podobny efekt zaobserwowano w pracy Francis i współpracowników, gdzie zaobserwowano wzrost poziomu mRNA Mbd3, w hipokampie 24 godziny po drgawce toniczno-klonicznej w przebiegu rozniecania przy pomocy bodźca elektrycznego (Francis i wsp. 2002). Zmiana ekspresji miała charakter przejściowy, ponieważ po 28 dniach, poziom ekspresji Mbd3 wracał do poziomu wyjściowego (Francis i wsp. 2002).

Podsumowując, wzrost poziomu Mbd3 u zwierząt z padaczką może być przynajmniej częściowo wytłumaczony występowaniem drgawek.

7.4 Wpływ ekspresji Mbd3 na próg drgawkowy *in vivo*.

Wyniki Bednarczyk i współpracowników skłoniły nas do zadania pytania, czy zaobserwowany w modelu doświadczalnym padaczki zwiększony poziom Mbd3 ułatwia ekspresję drgawek. W związku z tym zbadaliśmy wpływ poziomu Mbd3 na próg drgawkowy *in vivo* wykorzystując model drgawki ostrej wywołanej PTZ. Nie wykazaliśmy wpływu podwyższenia poziomu Mbd3 na charakterystykę drgawek wywołanych PTZ. Zaobserwowaliśmy natomiast, że obniżenie poziomu Mbd3 wydłuża czas latencji do rozwinięcia drgawki toniczno-klonicznej w modelu drgawki ostrej wywołanej iniekcją PTZ, wykazując działanie przeciwdrgawkowe.

Podobny efekt zaobserwowali Wang i współpracownicy, którzy pokazali, że obniżona ekspresja Mbd3 u myszy prowadzi do zmniejszenia intensywności drgawek wywołanych podaniem pilokarpiny – u żadnego ze zwierząt zaobserwowano drgawki co najwyżej stopnia 2 w skali Racine’a, podczas gdy 80% zwierząt kontrolnych rozwinęło stan padaczkowy z drgawkami co najmniej stopnia 4 (Wang i wsp. 2021).

Badania przeprowadzone przez Wang i współpracowników wskazują również, że obniżenie *MBD3* prowadzi do obniżenia poziomu metylacji cg25748868, zlokalizowanego w transkrypcie genu *TREM2* (ang. *tiggering receptor expressed on myeloid cells 2*), który jest zaangażowany w regulację ścieżki sygnałowej kinazy 3-fosfatydyloinozytolu i kinazy białkowej AKT (PI3K/Akt, ang. *phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway*). Z danych literaturowych wiadomo, że nadekspresja *TREM2* aktywuje szlak PI3K/Akt prowadząc do zahamowania procesu apoptozy komórek neuronalnych (Liu, Chu i Wang 2019). Doświadczenie przeprowadzone przez Wang i współpracowników sugeruje, że *MBD3* i *DNMT1* (DNA metylotransferaza 1, ang. *DNA methyltransferase 1*) nasilają hipermetylację badanego regionu cg25748868 i sprzyjają wystąpieniu padaczki poprzez hamowanie szlaku sygnałowego PI3K/Akt prowadząc do apoptozy i uszkodzenia neuronów (Wang i wsp. 2021).

Na podstawie naszych obserwacji oraz doświadczenia przeprowadzonego przez Wang i współpracowników wnioskujemy, że obniżenie poziomu Mbd3 ma działanie przeciwdrgawkowe. Nie wiemy, czy podłoże molekularne jest podobne w obu modelach eksperymentalnych, jednak analiza naszych danych transkryptomicznych wskazuje, że można brać pod uwagę taką możliwość w związku z wykryciem szlaku PI3K/Akt w naszej analizie funkcjonalnej.

7.5 Wpływ ekspresji Mbd3 na epileptogenezę w modelu rozniecania PTZ.

W niniejszej rozprawie wykazaliśmy po raz pierwszy, że nadekspresja Mbd3 przyspiesza rozniecanie PTZ, czyli ma działanie proepileptogenne. Zaobserwowaliśmy wyższą intensywność

drgawek u zwierząt z nadekspresją Mbd3 oraz krótszy okres latencji do spełnienia kryterium rozniecania. Nie zaobserwowaliśmy natomiast efektu obniżenia poziomu Mbd3 na rozniecanie PTZ.

Niewiele wiadomo o udziale zwiększonego poziomu białka Mbd3 w procesie epileptogenezy i rozwoju padaczki. Pierwszym badaniem na ten temat jest praca Bednarczyk i współpracowników, gdzie pokazano wzrost poziomu białka Mbd3 w ciele migdałowatym i korze śródwęchowej zwierząt z eksperymentalną padaczką wywołaną elektryczną stymulacją ciała migdałowatego (Bednarczyk i wsp. 2016). Nasze dane o wpływie nadekspresji Mbd3 na rozniecanie PTZ są szczególnie interesujące w kontekście badań Bednarczyk i współpracowników, ponieważ mogą świadczyć, że podwyższony poziom Mbd3 po zainicjowaniu padaczki u szczura ma dodatkowy efekt proepileptogeny i przyczynia się do rozwoju padaczki.

Mechanizm proepileptogenego wpływu Mbd3 nie jest poznany. Bednarczyk i współpracownicy zaobserwowali zmiany w wiązaniu Mbd3 do DNA w 14 dni po zainicjowaniu epileptogenezy. W przypadku niektórych genów, zmiany wiązania Mbd3 do DNA wystąpiły u osobników, u których zaobserwowano spontaniczne drgawki (Bednarczyk i wsp. 2016). Sugeruje to udział Mbd3 w epigenetycznej regulacji ekspresji genów, co może mieć udział również w epileptogenezie.

Wang i współpracownicy na podstawie badań *in vitro* postawili hipotezę o roli białka Mbd3 w hamowaniu szlaku sygnałowego PI3K/Akt prowadzącego do uszkodzenia neuronów i apoptozy. MBD3 sprzyja wystąpieniu padaczki poprzez regulację szlaku sygnałowego PI3K/Akt prowadząc neurodegeneracji. Nie wiadomo jednak, czy takie zjawisko zachodzi *in vivo*.

7.6 Wpływ wyładowań epileptopodobnych *in vitro* na ekspresję genów.

W niniejszej pracy po raz pierwszy przeprowadziliśmy analizę ekspresji genów w modelu wyładowań epileptopodobnych *in vitro* wywołanych niedoborem magnezu. W celu zbadania wpływu wyładowań epileptopodobnych na ekspresję genów przeprowadziliśmy sekwencjonowanie próbek pochodzących z pierwotnej hodowli neuronów korowych, inkubowanych w warunkach fizjologicznych i w warunkach zwiększonych wyładowań epileptopodobnych.

Zaobserwowaliśmy grupę genów, których ekspresja uległa zmianie, 24h po indukcji wyładowań epileptopodobnych. Natomiast, w 2 i 6 godzin po zainicjowaniu wyładowań epileptopodobnych zmian nie zaobserwowaliśmy.

Niewiele wiadomo o roli genów zmieniających poziom ekspresji pod wpływem wyładowań epileptopodobnych, które wykryliśmy w naszym doświadczeniu. Przeszukanie bazy Pubmed wykazało, że tylko 3 z wykrytych przez nas genów były badane w kontekście padaczki. Są to: podjednostka α inhibiny – INHA (ang. *inhibin subunit alpha*), podjednostka $\beta 2$ kanału potasowego bramkowanego napięciem – KCNAB2 (ang. *potassium voltage-gated channel subfamily A regulatory beta subunit 2*) oraz podjednostka 1 receptora kainowego dla glutaminianu - GRIK1 (ang. *glutamate ionotropic receptor kainate type subunit 1*) (**Tabela MD 1**).

Funkcja inhibiny α jest najlepiej poznana w jajnikach i jądrach, jednak ulega ona ekspresji również w mózgu (Fujimura i wsp. 1999). Co ciekawe, wykryto polimorfizm w INHA predysponujący do drgawek z napadem nieświadomości (drgawek typu absence) w padaczce młodzieńczej (Yalcin i wsp. 2011). Mechanizm wpływu tego polimorfizmu na drgawki nie jest jasny.

Produkt genu KCNAB2 jest jednostką pomocniczą kanału potasowego KCNA4 (kanał potasowy bramkowany napięciem, podjednostka $\alpha 4$), regulowanego przez aktywność drgawkową w modelu padaczki chronicznej wywołanej pilokarpiną (Winden i wsp. 2015). Utrata genu KCNAB2 jest przyczyną wystąpienia padaczki u pacjentów z syndromem delecji 1p36 (Heilstedt i wsp. 2001).

Gen GRIK1 koduje podjednostkę selektywnego dla kwasu kainowego GluR5. Receptor dla kwasu kainowego zaliczany jest do receptorów jonotropowych glutaminianu (Falcon-Moya, Sihra i Rodriguez-Moreno 2018). Wysoką gęstość receptorów dla kwasu kainowego wykazano w hipokampie, strukturze zaangażowanej w rozwój padaczki (Bahn, Volk i Wisden 1994). Wykazano, że receptory dla kainianu zawierające podjednostkę GluR5 regulują hamowanie synaptyczne w hipokampie (Clarke i wsp. 1997). Receptor ten był badany w padaczce, co omówimy poniżej.

W przypadku pozostałych genów, nie ma w literaturze informacji o ich związku z padaczką, niemniej analiza funkcjonalna tej grupy genów wskazuje na ich zaangażowanie w procesy, które mogą być związane z patologią padaczki (**Tabela 8**).

Jedna grupa funkcji, jaka została wykryta w analizie funkcjonalnej, to aktywacja receptora dla kwasu kainowego. Aktywacja receptora dla kwasu kainowego ma szczególne znaczenie w rozwoju aktywności epileptycznej neuronów i indukcji napadów drgawkowych. Kwas kainowy jest analogiem glutaminianu i neurotoksyną stosowaną między innymi w modelach padaczki skroniowej. Efektem działania kwasu kainowego jest wystąpienie napadów

drgawkowych i rozwój padaczki (Vincent i Mülle 2009, Fritsch i wsp. 2014). Aktywacja receptora kwasu kainowego hamuje uwalnianie neurotransmitera GABA, co wraz z aktywacją postsynaptycznych receptorów kwasu kainowego prowadzi do zwiększonej pobudliwości komórek nerwowych i może prowadzić do wystąpienia napadów drgawkowych (Falcon-Moya i wsp. 2018). Z kolei zastosowanie antagonistów receptora kwasu kainowego zapobiega rozwojowi pobudliwości neuronów (Falcon-Moya i wsp. 2018).

Kolejną grupą procesów jest fosforylacja wewnątrzkomórkowego białka CREB (ang. *cAMP response element binding protein*). Defosforylowany CREB, w formie nieaktywnej zlokalizowany jest w jądrze komórkowym (Wang i wsp. 2020a). Fosforylację CREB może przeprowadzić wiele kinaz białkowych, między innymi kinaza białkowa zależna od wapnia i kalmoduliny typu IV (ang. *Ca²⁺ / calmodulin kinases IV*, CaMKIV) (Mertz i wsp. 2020). CREB, będąc czynnikiem transkrypcyjnym, reguluje ekspresję genów w komórce. Ponadto, sygnalizacja CREB zmienia pobudliwość komórek i reguluje plastyczność synaptyczną (Mertz i wsp. 2020). Aktywna forma CREB jest istotna do przekazywania wielu sygnałów zewnątrzkomórkowych, co prowadzi do aktywacji genów zaangażowanych w patogenezę i rozwój padaczki (Wang i wsp. 2020a). Badania przeprowadzone przez Floriano-Sancheza wykazały grupę genów regulowanych przez CREB, których ekspresja uległa zmianie u dzieci z padaczką, w porównaniu do zdrowych pacjentów (Floriano-Sanchez i wsp. 2018). Wykazano zwiększoną ekspresję CREB między innymi w modelu padaczki skroniowej wywołanej iniekcją litu i pilokarpiny, jak również w tkance pochodzącej od pacjentów ze zdiagnozowaną padaczką (Zhu i wsp. 2015, Guo i wsp. 2014).

W dalszej części pracy, przeprowadziliśmy analizę motywów wiązania czynników transkrypcyjnych w promotorach genów których ekspresja była regulowana przez wyładowania epileptopodobne. Wykazaliśmy, że 84% zidentyfikowanych genów, których ekspresja uległa zmianie pod wpływem wyładowań epileptopodobnych, zawiera w sekwencji promotora motyw wiązania czynnika transkrypcyjnego ZF5.

O roli czynnika transkrypcyjnego ZF5 wiadomo niewiele. Nieliczne dane o potencjalnej roli tego białka w padaczce pochodzą z naszego zespołu. Doświadczenia przeprowadzone przez Dębskiego i współpracowników w modelu padaczki skroniowej indukowanej iniekcją pilokarpiny, wyłoniły grupy genów, których wzór ekspresji w cyklu okołodobowym ulegał zmianie pod wpływem padaczki (Debski i wsp. 2020). Analiza miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych w promotorach tych genów wykazała nadreprezentację czynnika transkrypcyjnego ZF5 (Debski i wsp. 2020). Na podstawie danych o reprezentacji miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych uzyskanych w niniejszej pracy i wyników uzyskanych przez

Dębskiego i współpracowników (Debski i wsp. 2020) sugerujemy, że czynnik transkrypcyjny ZF5 może być zaangażowany w rozwój padaczki.

Nasze wyniki analizy zmian ekspresji genów po wywołaniu wyładowań epileptopodobnych wykazują podobieństwa ze zmianami molekularnymi zachodzącymi na skutek drgawek i podczas epileptogenezy i padaczki. Upewnia to nas, że wyładowania epileptopodobne *in vitro* to użyteczny model w badaniach zjawisk molekularnych zachodzących w padaczce.

7.7 Białko Mbd3 w regulacji ekspresji genów.

Ze względu na ogromną ilość danych uzyskanych z eksperymentu profilowania transkryptomu w hodowli, w niniejszej rozprawie, mimo kompleksowego przedstawienia wyników, w dyskusji skoncentrujemy się jedynie na tych porównaniach, które mają największe znaczenie w odpowiedzi na pytanie o rolę Mbd3 w patogenezie padaczki.

Dane dotyczące udziału Mbd3 w regulacji ekspresji genów oraz w procesach regulujących funkcjonowanie komórek są nieliczne i sprzeczne. Wiadomo, że myszy pozbawione genu *Mbd3* umierają we wczesnych etapach embriogenezy (Hendrich i wsp. 2001). Zarodkowe komórki macierzyste z obniżoną ekspresją genu *Mbd3* nie wykazują spadku żywotności ale nie są w stanie tworzyć stabilnego kompleksu NuRD, a ich zdolność do różnicowania się jest zaburzona (Kaji, Nichols i Hendrich 2007, Kaji i wsp. 2006). Z kolei w modelu wyładowań epileptopodobnych wywołanych niskim stężeniem Mg^{2+} w hodowli neuronów hipokampalnych zaobserwowano, że w warunkach zwiększonej aktywności elektrofizjologicznej transfekcja wirusem obniżającym ekspresję *Mbd3* powoduje spadek apoptozy i wzrost przeżywalności komórek w porównaniu do komórek nietransfekowanych oraz po transfekcji wirusem kontrolnym (Wang i wsp. 2021).

Bednarczyk i współpracownicy (Bednarczyk i wsp. 2016) wykazali zmiany w wiązaniu *Mbd3* do DNA po zainicjowaniu epileptogenezy. W przypadku niektórych genów, u osobników u których wystąpiły spontaniczne drgawki, zmianom wiązania *Mbd3* do DNA towarzyszyły zmiany poziomu ekspresji (Bednarczyk i wsp. 2016). Doświadczenia przeprowadzone przez Bednarczyk i współpracowników, pozwoliły również na identyfikację genów których poziom uległ zmianie po wywołaniu u zwierząt padaczki (Bednarczyk i wsp. 2016). Geny te są zaangażowane w proces neurogenezy, rozwój układu nerwowego, a także adhezji komórkowej (Bednarczyk i wsp. 2016).

W niniejszej rozprawie zbadaliśmy ekspresję genów w modelu wyładowań epileptopodobnych *in vitro*, aby określić wpływ nadekspresji białka Mbd3 na ekspresję genów. Zaobserwowaliśmy zarówno geny, których poziom ekspresji ulegał zmianie po nadekspresji Mbd3 zarówno w warunkach fizjologicznych jak i w warunkach zwiększonych wyładowań epileptopodobnych (**Rycina 6.7.5.1, Tabela MD 4**), jak i takie, których poziom ekspresji zmieniał się tylko w po wywołaniu wyładowań epileptopodobnych (**Rycina 6.7.5.1, Tabela MD 5**).

Geny regulowane przez Mbd3 niezależnie od warunków biorą udział w między innymi w procesach związanych z działaniem szlaku sygnałowego NOTCH, regulacji transportu i wychwytu insulinopodobnego czynnika wzrostu (ang. *Insulin like growth factor*), a także biosyntezy i metabolizmu fruktozy (**Tabela 11**).

Zmiany ekspresji genów po nadekspresji Mbd3 i wyładowaniach epileptopodobnych, czyli w warunkach najbardziej zbliżonych do warunków w mózgu zwierząt epileptycznych zaangażowane są w sygnalizację i aktywację receptora czynnika wzrostu fibroblastów (ang. *Fibroblast growth factor receptor*), szlak sygnałowy reeliny, a także szlak sygnałowy PI3K (**Tabela 12**).

W dalszej próbie zrozumienia wpływu nadekspresji Mbd3 na funkcjonowanie neuronów skoncentrowaliśmy się na analizie skupień która w naszej opinii najlepiej ilustruje zachowanie grup genów (**Rycina 6.7.6.1**).

Spośród skupień przedstawionych na **Rycinie 6.7.6.1**, skupienia nr 4, 6, 7, 8 i 9 grupują geny w których zmiany ekspresji wywoływane są nadekspresją Mbd3, a wpływ środowiska (fizjologiczne vs. wyładowania epileptopodobne) jest mniej zaznaczony. Analiza funkcjonalna wykazała, że są to geny zaangażowane między innymi w regulację przez białko MeCP2, szlak sygnałowy Notch, oraz w szlak sygnałowym PI3K/Akt (**Tabela 13**).

Białko MeCP2 należy do rodziny białek MBD, uczestniczy w metylacji DNA oraz wykazuje aktywność hamowania ekspresji genów (Saito i Ishikawa 2002, Carouge i wsp. 2010). Co ciekawe, białko MeCP2 reguluje ekspresję genów na wielu poziomach, między innymi w procesie transkrypcji, składania i dojrzewania RNA oraz regulacji mikro RNA (Cheng i Qiu 2014). Mutacje punktowe w białku MeCP2, najczęściej prowadzące do utraty funkcji, odpowiadają za powstanie zespołu Retta, w którym występują napady drgawkowe (Portela i Esteller 2010, Kelly i wsp. 2010, Neul i wsp. 2008). Doświadczenia przeprowadzone przez Lee i współpracowników wykazały, że białko MeCP2 oprócz bezpośredniego wiązania DNA może oddziaływać z chromatyną poprzez interakcje z histonami. Wykazano, że białko MeCP2 może wiązać się bezpośrednio z histonem H3. Lee i współpracownicy wykazali również wyższe powinowactwo

białka MeCP2 do potranslacyjnie zmodyfikowanego histonu H3 (trimetylacja lizyny 27 histonu H3), który bierze udział w procesie hamowania transkrypcji (Lee i wsp. 2020). Lee i współpracownicy zasugerowali, że zmodyfikowany histon H3 może regulować transkrypcję poprzez rekrutowanie MeCP2 (Lee i wsp. 2020).

Szlak sygnałowy Notch reguluje rozwój ośrodkowego układu nerwowego (Wu i wsp. 2018). Jest również zaangażowany w rozwój padaczki. Na przykład wykazano aktywację szlaku sygnalizacyjnego Notch w eksperymentalnym modelu padaczki skroniowej wywołanej iniekcją kwasu kainowego, a także w tkance pochodzącej od pacjentów z epilepsją (Sha i wsp. 2014). Wykazano, że ścieżka sygnałowa Notch ulega aktywacji w odpowiedzi na wywołany stan padaczkowy. Sha i współpracownicy zaobserwowali wysoki poziom białka Notch1, w hipokampie, utrzymujący się do 5 dni od wywołania stanu padaczkowego (Sha i wsp. 2014). Ponadto wykazali, że aktywacja Notch jest pozytywnie skorelowana ze wzrostem częstotliwości napadów drgawkowych, co sugeruje że aktywacja sygnalizacji Notch podczas epileptogenezy może zwiększyć ryzyko rozwoju padaczki i promować występowanie napadów drgawkowych (Sha i wsp. 2014). Doświadczenia przeprowadzone przez Wu i współpracowników z zastosowaniem inhibitora Notch wykazały, że szlak sygnałowy Notch reguluje aktywację mikrogleju w modelu padaczki skroniowej u szczura, wywołanej iniekcją litu i pilokarpiny (Wu i wsp. 2018). Wu i współpracownicy zaobserwowali aktywację Notch 72 godziny po wywołaniu stanu padaczkowego, a zastosowanie inhibitora Notch zahamowało nadekspresję Notch. Zaobserwowano również obniżenie aktywacji mikrogleju, a w konsekwencji zahamowanie uwalniania cytokin prozapalnych (Wu i wsp. 2018). Mechanizm aktywacji szlaku sygnałowego Notch w odpowiedzi na drgawkę pozostaje nieznanym.

Szlak sygnałowy PI3K/Akt pełni rolę w utrzymaniu żywotności, proliferacji i dojrzewaniu komórek oraz metabolizmie glikogenu (Xiao i wsp. 2016). Odgrywa on również rolę w padaczce. Wang i współpracownicy zaproponowali szlak sygnałowy PI3K/Akt jako mechanizm sprzyjający rozwojowi padaczki w badaniach nad wpływem obniżonej ekspresji Mbd3. Badania przeprowadzone przez Wang i współpracowników wykazały, że obniżenie Mbd3 prowadzi do obniżenia poziomu metylacji cg25748868, zlokalizowanego w transkrypcie genu *TREM2* (Wang i wsp. 2021). Wiadomo, że nadekspresja *TREM2* aktywuje szlak PI3K/Akt prowadząc do zahamowania procesu apoptozy komórek neuronalnych (Liu i wsp. 2019). Doświadczenia przeprowadzone przez Wang i współpracowników wykazały, że mikro RNA 124, regulujące różnicowanie komórek i uczestniczące w rozwoju układu nerwowego, może regulować szlak sygnałowy PI3K/Akt, a tym samym wykazywać działanie protekcyjne funkcji poznawczych w modelu padaczki skroniowej wywołanej iniekcją litu i pilokarpiny u szczura (Wang, An i Zhao

2020b). Szlak sygnałowy PI3K/Akt jest związany ze szlakiem mTOR (kinazy treoninowo-serynowej, ang. *mammalian target of rapamycin*) (Hodges i Lugo 2020). Aktywacja i sygnalizacja poprzez szlak mTOR reguluje procesy indukowane napadami drgawkowymi takie jak mechanizmy plastyczności synaptycznej, proliferacja komórek, zmiany ekspresji białek kanałów jonowych, które mogą wpływać na rozwój padaczki (Citraro i wsp. 2016).

Kolejnymi interesującymi skupieniami, są skupienia nr 2 i 3 (**Rycina 6.7.6.1, Tabela MD 6**), w których wzór ekspresji genów zmieniał się na skutek nadekspresji Mbd3 w stosunku do kontroli w środowisku fizjologicznym, natomiast w po indukcji wyładowań epileptopodobnych nie zmieniał się i niezależnie od poziomu Mbd3, był zbliżony do wzoru ekspresji w warunkach fizjologicznych po nadekspresji Mbd3. Można sugerować, że w tym przypadku wyładowania epileptopodobną naśladowały działanie zwiększonego poziomu Mbd3. Geny w tych skupieniach są zaangażowane między innymi w aktywację kanałów potasowych bramkowanych białkiem G oraz aktywację receptorów GABA_B.

Zaburzenia związane z funkcjonowaniem kanałów potasowych są obserwowane w licznych chorobach neurologicznych, w tym padaczce. Jednym z poznanych typów kanałów potasowych jest kanał bramowany białkiem G. Przyłączenie się białka G do receptora skutkuje uwolnieniem przepływu potasu w kierunku zewnętrznym, co prowadzi do hiperpolaryzacji błony i zahamowania pobudliwości komórek. Utrata funkcji kanałów potasowych bramkowanych białkiem G może prowadzić do nadmiernej pobudliwości neuronów i sprzyjać rozwojowi padaczki (D'Adamo i wsp. 2013).

GABA jest głównym hamującym neuroprzekaźnikiem w strukturach mózgu. Wyróżnia się dwa typy receptorów GABA: A - jonotropowy i B – metabotropowy, aktywowany białkiem G. Postsynaptyczna aktywacja receptorów GABA_B powoduje otwarcie kanałów potasowych prowadząc do hiperpolaryzacji błony, zarówno w neuronach glutaminergicznych jak i interneuronach hamujących. Z kolei presynaptyczna aktywacja receptorów GABA_B w zakończeniach aksonów komórek pobudzających i hamujących zmniejsza napływ jonów wapnia, regulując uwalnianie neuroprzekaźników (Avoli i Levesque 2022). Doświadczenia przeprowadzone z zastosowaniem myszy transgenicznych pozbawionych receptora GABA_B rozwinęły spontaniczne drgawki (Schuler i wsp. 2001).

Ostatnim interesującym skupieniem, które wyróżniamy w tej dyskusji jest skupienie 5 (**Rycina 6.7.6.1, Tabela MD 6**). W skupieniu tym znalazły się geny, w przypadku których wyładowania epileptopodobne zapobiegają zmianom ekspresji wywoływanym przez

nadekspresję Mbd3. Są to geny zaangażowane między innymi w biosyntezę hormonów peptydowych.

Hormony peptydowe to peptydy, które są wydzielane bezpośrednio do krwioobiegu. Wśród nich wyróżniamy między innymi oksytocynę, wazopresynę, insulinę, i hormon adrenokortykotropowy (Tager i Steiner 1974). Danych dotyczących udziału hormonów peptydowych w padaczce jest niewiele. Wykazano, że oksytocyna wykazuje działanie hamujące drgawki wywołane PTZ u szczura (Erbas i wsp. 2013). Doświadczenia przeprowadzone na modelu rozniecania PTZ wykazały, że insulina opóźnia rozwój drgawek i zmniejsza ich intensywność (Cheng i wsp. 2021).

Przyjrzelśmy się również dynamice zmian ekspresji genów. Zmiany ekspresji genów sprawdzono w trzech punktach czasowych. Większość zmian obserwowaliśmy tylko w jednym punkcie czasowym, co świadczy o przejściowym charakterze tych zmian. Zaobserwowaliśmy jedynie dwa geny których ekspresja uległa zmianie zarówno 6 jak i 24 godziny po indukcji wyładowań epileptopodobnych. Gen *Nf2* (ang. *moesin-ezrin-radixin like (MERLIN) tumor suppressor*) wykazuje obniżony poziom ekspresji zarówno 6 godzin jak i 24 godziny po zakończonej indukcji wyładowań epileptopodobnych. Mutacja w genie *Nf2* została zidentyfikowana w dziedzicznej chorobie zwanej neurofibromatozą typu 2 (DiFrancesco i wsp. 2014, Ruggieri i wsp. 2005). Natomiast gen *Scube3* (ang. *signal peptide, CUB domain and EGF like domain containing 3*) wykazuje podwyższony poziom ekspresji, w tych samych punktach czasowych. Badania przeprowadzone przez Qiu i współpracowników wykazały, że ekspresja genu *Scube3* ulega podwyższeniu w mózgu pacjentów z glejakiem wykazującymi sponaniczne drgawki (Qiu i wsp. 2020).

Dodatkowo, na podstawie danych sekwencjonowania wykazaliśmy, że ekspresja genu *Mbd3* nie ulega zmianie pod wpływem wyładowań epileptopodobnych *in vitro*. Sugeruje to, że zmiany w poziomie białka Mbd3, jakie wykryliśmy *in vivo* po wywołaniu drgawki, nie są prostą konsekwencją zwiększenia aktywności elektrofizjologicznej neuronów. Zrozumienie tej sprzeczności wymaga dalszych badań.

Kompleksowa analiza danych transkryptomicznych o wpływie poziomu Mbd3 i stanu pobudzenia neuronów wskazuje na złożone relacje. Podwyższony poziom Mbd3 w wywołuje zmiany wzorów ekspresji genów wywołanych zwiększonym pobudzeniem neuronów, co może powodować długotrwałe skutki dla funkcjonowania mózgu, w tym większą podatność nad drgawki. Ponieważ wzrost pobudzenia neuronów, powoduje przejściowy wzrost ekspresji Mbd3, może storzyć się pętla prowadząca do pogłębiania patologii mózgu. Przeciwdziałanie

proepileptycznemu działaniu zwiększonego poziomu Mbd3 w mózgu można zaproponować jako cel terapii.

8. Podsumowanie

Podsumowując, na podstawie przeprowadzonych doświadczeń wykazaliśmy, że:

1. Drgawka powoduje przejściowe podwyższenie poziomu białka Mbd3 w korze śródwęchowej i ciele migdałowatym, w modelu drgawki wywołanej PTZ.
2. Zmiany poziomu ekspresji Mbd3 w ciele migdałowatym wywołują zmiany w zachowaniu zwierząt doświadczalnych.
3. Obniżenie poziomu Mbd3 wydłuża czas latencji do momentu drgawki toniczno-klonicznej, w modelu ostrego napadu drgawkowego wywołanego dootrzewnową iniekcją PTZ.
4. Nadekspresja Mbd3 przyspiesza epileptogenezę w modelu rozniecania PTZ.
5. Nadekspresja Mbd3 wywołuje zmiany w ekspresji genów w sposób specyficzny dla czasu i stanu neuronów.

9. Wnioski

Wyniki opisane w niniejszej rozprawie doktorskiej pozwalają na sformułowanie następujących wniosków:

1. Drgawki mogą przyczyniać się do wzrostu poziomu białka Mbd3 w epileptycznym mózgu;
2. Białko Mbd3 ma działanie proepileptyczne;
3. Białko Mbd3 reguluje ekspresję genów w sposób specyficzny dla czasu i stanu neuronów;
4. Białko Mbd3 reguluje ekspresję wielu genów zaangażowanych w liczne mechanizmy potencjalnie uczestniczące w rozwoju padaczki.

Bibliografia

- Abbott, N. J., A. A. K. Patabendige, D. E. M. Dolman, S. R. Yusof & D. J. Begley (2010) Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of Disease*, 37, 13-25.
- Akyuz, E., Z. Doganyigit, Y. N. Paudel, E. Kaymak, S. Yilmaz, A. Uner & M. F. Shaikh (2020) Increased ACh-Associated Immunoreactivity in Autonomic Centers in PTZ Kindling Model of Epilepsy. *Biomedicines*, 8.
- Amano, S., M. Ikeda, S. Uemura, J. Fukuoka, A. Tsuji, M. Sasahara, Y. Hayase & F. Hazama (1999) Mossy fiber sprouting in the dentate gyrus in a newly developed epileptic mutant, Ihara epileptic rat. *Brain Research*, 834, 214-218.
- Aronica, E., T. Ravizza, E. Zurolo & A. Vezzani (2012) Astrocyte immune responses in epilepsy. *Glia*, 60, 1258-1268.
- Avoli, M. & M. Levesque (2022) GABA(B) Receptors: are they Missing in Action in Focal Epilepsy Research? *Current Neuropharmacology*, 20, 1704-1716.
- Bahn, S., B. Volk & W. Wisden (1994) KAINATE RECEPTOR GENE-EXPRESSION IN THE DEVELOPING RAT-BRAIN. *Journal of Neuroscience*, 14, 5525-5547.
- Banerjee, P. N., D. Filippi & W. A. Hauser (2009) The descriptive epidemiology of epilepsy-A review. *Epilepsy Research*, 85, 31-45.
- Bartolomei, F., M. Khalil, F. Wendling, A. Sontheimer, J. Regis, J. P. Ranjeva, M. Guye & P. Chauvel (2005) Entorhinal cortex involvement in human mesial temporal lobe epilepsy: An electrophysiologic and volumetric study. *Epilepsia*, 46, 677-687.
- Bazyan, A. S., V. V. Zhulin, M. N. Karpova, N. Y. Klishina & R. N. Glebov (2001) Long-term reduction of benzodiazepine receptor density in the rat cerebellum by acute seizures and kindling and its recovery 6 months later by a pentylentetrazole challenge. *Brain Research*, 888, 212-220.
- Bednarczyk, J., K. J. Debski, A. M. Bot & K. Lukasiuk (2016) MBD3 expression and DNA binding patterns are altered in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Scientific Reports*, 6.
- Beghi, E. (2020) The Epidemiology of Epilepsy. *Neuroepidemiology*, 54, 185-191.
- Bell, B., J. J. Lin, M. Seidenberg & B. Hermann (2011) The neurobiology of cognitive disorders in temporal lobe epilepsy. *Nature Reviews Neurology*, 7, 154-164.
- Benson, M. J., S. Manzanero & K. Borges (2015) Complex alterations in microglial M1/M2 markers during the development of epilepsy in two mouse models. *Epilepsia*, 56, 895-905.
- Berg, A. T. & I. E. Scheffer (2011) New concepts in classification of the epilepsies: Entering the 21st century. *Epilepsia*, 52, 1058-1062.
- Bernardino, L., R. Ferreira, A. J. Cristovao, F. Sales & J. O. Malva (2005) Inflammation and Neurogenesis in Temporal Lobe Epilepsy. *Cns & Neurological Disorders-Drug Targets*, 4, 349-360.
- Berson, A., R. Nativio, S. L. Berger & N. M. Bonini (2018) Epigenetic Regulation in Neurodegenerative Diseases. *Trends in Neurosciences*, 41, 587-598.
- Boison, D. & J. M. Rho (2020) Epigenetics and epilepsy prevention: The therapeutic potential of adenosine and metabolic therapies. *Neuropharmacology*, 167.
- Brandt, C., U. Ebert & W. Loscher (2004) Epilepsy induced by extended amygdala-kindling in rats: lack of clear association between development of spontaneous seizures and neuronal damage. *Epilepsy Research*, 62, 135-156.
- Buckmaster, P. S. & F. H. Lew (2011) Rapamycin Suppresses Mossy Fiber Sprouting But Not Seizure Frequency in a Mouse Model of Temporal Lobe Epilepsy. *Journal of Neuroscience*, 31, 2337-2347.
- Cai, Y., E. J. Geutjes, K. de Lint, P. Roepman, L. Bruurs, L. R. Yu, W. Wang, J. van Blijswijk, H. Mohammad, I. de Rink, R. Bernards & S. B. Baylin (2014) The NuRD complex cooperates with DNMTs to maintain silencing of key colorectal tumor suppressor genes. *Oncogene*, 33, 2157-2168.

- Cao, H. Y., Y. W. Jiang, Z. W. Liu & X. R. Wu (2003) Effect of recurrent epileptiform discharges induced by magnesium-free treatment on developing cortical neurons in vitro. *Developmental Brain Research*, 142, 1-6.
- Carouge, D., L. Host, D. Aunis, J. Zwiller & P. Anglard (2010) CDKL5 is a brain MeCP2 target gene regulated by DNA methylation. *Neurobiology of Disease*, 38, 414-424.
- Cascino, G. D. (2004) Surgical treatment for epilepsy. *Epilepsy Research*, 60, 179-186.
- Castro-Torres, R. D., J. Landa, M. Rabaza, O. Busquets, J. Olloquequi, M. Ettcheto, C. Beas-Zarate, J. Folch, A. Camins, C. Auladell & E. Verdaguer (2019) JNK Isoforms Are Involved in the Control of Adult Hippocampal Neurogenesis in Mice, Both in Physiological Conditions and in an Experimental Model of Temporal Lobe Epilepsy. *Molecular Neurobiology*, 56, 5856-5865.
- Cheng, T. L. & Z. L. Qiu (2014) MeCP2: multifaceted roles in gene regulation and neural development. *Neuroscience Bulletin*, 30, 601-609.
- Cheng, Y. H., X. Zeng, Q. T. Mai, X. Y. Bai, Y. Jiang, J. J. Li, S. Q. Fan & H. Ding (2021) Insulin injections inhibits PTZ-induced mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neurological deficits via the SIRT1/PGC-1 alpha/SIRT3 pathway. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, 1867.
- Cho, K. O., Z. R. Lybrand, N. Ito, R. Brulet, F. Tafacory, L. Zhang, L. Good, K. Ure, S. G. Kernie, S. G. Birnbaum, H. E. Scharfman, A. J. Eisch & J. Hsieh (2015) Aberrant hippocampal neurogenesis contributes to epilepsy and associated cognitive decline. *Nature Communications*, 6.
- Citraro, R., A. Leo, A. Constanti, E. Russo & G. De Sarro (2016) mTOR pathway inhibition as a new therapeutic strategy in epilepsy and epileptogenesis. *Pharmacological Research*, 107, 333-343.
- Clarke, V. R. J., B. A. Ballyk, K. H. Hoo, A. Mandelzys, A. Pellizzari, C. P. Bath, J. Thomas, E. F. Sharpe, C. H. Davies, P. L. Ornstein, D. D. Schoepp, R. K. Kamboj, G. L. Collingridge, D. Lodge & D. Bleakman (1997) A hippocampal GluR5 kainate receptor regulating inhibitory synaptic transmission. *Nature*, 389, 599-603.
- Cramer, J. M., J. N. Scarsdale, N. M. Walavalkar, W. A. Buchwald, G. D. Ginder & D. C. Williams (2014) Probing the Dynamic Distribution of Bound States for Methylcytosine-binding Domains on DNA. *Journal of Biological Chemistry*, 289, 1294-1302.
- Crowe, S. L., S. Tsukerman, K. Gale, T. J. Jorgensen & A. D. Kondratyev (2011) Phosphorylation of Histone H2A.X as an Early Marker of Neuronal Endangerment following Seizures in the Adult Rat Brain. *Journal of Neuroscience*, 31, 7648-7656.
- D'Adamo, M. C., L. Catacuzzeno, G. Di Giovanni, F. Franciolini & M. Pessia (2013) K⁺ channelepsy: progress in the neurobiology of potassium channels and epilepsy. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7.
- Dai, Y. J., J. S. Li, M. Y. Li, Z. H. Liu, J. Liu, L. Y. An & F. L. Du (2020) Methyl-CpG-binding domain 3 (Mbd3) is an important regulator for apoptosis in mouse embryonic stem cells. *American Journal of Translational Research*, 12, 8147-8161.
- Danzer, S. C. (2019) Adult Neurogenesis in the Development of Epilepsy. *Epilepsy Currents*, 19, 316-320.
- Dazzo, E. & C. Nobile (2022) Epilepsy-causing Reelin mutations result in impaired secretion and intracellular degradation of mutant proteins. *Human Molecular Genetics*, 31, 665-673.
- de Nijs, L., K. Choe, H. Steinbusch, O. Schijns, J. Dings, D. L. A. van den Hove, B. P. F. Rutten & G. Hoogland (2019) DNA methyltransferase isoforms expression in the temporal lobe of epilepsy patients with a history of febrile seizures. *Clinical Epigenetics*, 11.
- Debski, K. J., N. Ceglia, A. Ghestem, A. I. Ivanov, G. E. Brancati, S. Broer, A. M. Bot, J. A. Muller, S. Schoch, A. Becker, W. Loscher, M. Guye, P. Sassone-Corsi, K. Lukasiuk, P. Baldi & C. Bernard (2020) The circadian dynamics of the hippocampal transcriptome and proteome is altered in experimental temporal lobe epilepsy. *Science Advances*, 6.

- Debski, K. J., A. Pitkanen, N. Puhakka, A. M. Bot, I. Khurana, K. N. Harikrishnan, M. Ziemann, A. Kaspi, A. El-Osta, K. Lukasiuk & K. Kobow (2016) Etiology matters - Genomic DNA Methylation Patterns in Three Rat Models of Acquired Epilepsy. *Scientific Reports*, 6.
- DeLorenzo, R. J., S. Sombati & D. A. Coulter (2000) Effects of topiramate on sustained repetitive firing and spontaneous recurrent seizure discharges in cultured hippocampal neurons. *Epilepsia*, 41, S40-S44.
- Deng, G. F., J. M. Qin, X. S. Sun, Z. Y. Kuang, T. Su, Q. H. Zhao, Y. W. Shi, X. R. Liu, M. J. Yu, Y. H. Yi, W. P. Liao & Y. S. Long (2011) Promoter Analysis of Mouse Scn3a Gene and Regulation of the Promoter Activity by GC Box and CpG Methylation. *Journal of Molecular Neuroscience*, 44, 115-121.
- Deshpande, L. S., J. K. Lou, A. Mian, R. E. Blair, S. Sombati & R. J. DeLorenzo (2007) In vitro status epilepticus but not spontaneous recurrent seizures cause cell death in cultured hippocampal neurons. *Epilepsy Research*, 75(2-3):171-9, T - ppublish.
- Deshpande, L. S., N. Nagarkatti, J. M. Ziobro, S. Sombati & R. J. DeLorenzo (2008) Carisbamate prevents the development and expression of spontaneous recurrent epileptiform discharges and is neuroprotective in cultured hippocampal neurons. *Epilepsia*, 49, 1795-1802.
- Devinsky, O., A. Vezzani, S. Najjar, N. C. De Lanerolle & M. A. Rogawski (2013) Glia and epilepsy: excitability and inflammation. *Trends in Neurosciences*, 36, 174-184.
- DiFrancesco, J. C., R. Sestini, F. Cossu, M. Bolognesi, E. Sala, S. Mariani, E. Saracchi, L. Papi & C. Ferrarese (2014) Novel neurofibromatosis type 2 mutation presenting with status epilepticus. *Epileptic Disorders*, 16, 132-137.
- Ding, S., T. Fellin, Y. Zhu, S. Y. Lee, Y. P. Auberson, D. F. Meaney, D. A. Coulter, G. Carmignoto & P. G. Haydon (2007) Enhanced astrocytic Ca²⁺ signals contribute to neuronal excitotoxicity after status epilepticus. *Journal of Neuroscience*, 27, 10674-10684.
- Dobin, A., C. A. Davis, F. Schlesinger, J. Drenkow, C. Zaleski, S. Jha, P. Batut, M. Chaisson & T. R. Gingeras (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29, 15-21.
- Doi, A., I. H. Park, B. Wen, P. Murakami, M. J. Aryee, R. Irizarry, B. Herb, C. Ladd-Acosta, J. S. Rho, S. Loewer, J. Miller, T. Schlaeger, G. Q. Daley & A. P. Feinberg (2009) Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nature Genetics*, 41, 1350-U123.
- Drion, C. M., L. Kooijman, D. Chan, J. Berkhout, E. A. van Vliet, W. J. Wadman & J. A. Gorter (2022) No persistent effects of intracerebral curcumin administration on seizure progression and neuropathology in the kindling rat model for temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research*, 181.
- Engel, J. (1996) Introduction to temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research*, 26, 141-150.
- Engel, J., A. Pitkanen, J. A. Loeb, F. E. Dudek, E. H. Bertram, A. J. Cole, S. L. Moshe, S. Wiebe, F. E. Jensen, I. Mody, A. Nehlig & A. Vezzani (2013) Epilepsy biomarkers. *Epilepsia*, 54, 61-69.
- Erbas, O., M. Yilmaz, H. A. Korkmaz, S. Bora, V. Evren & G. Peker (2013) Oxytocin inhibits pentylentetrazol-induced seizures in the rat. *Peptides*, 40, 141-144.
- Falcon-Moya, R., T. S. Sihra & A. Rodriguez-Moreno (2018) Kainate Receptors: Role in Epilepsy. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11.
- Fisher, R. S., W. V. Boas, W. Blume, C. Elger, P. Genton, P. Lee & J. Engel (2005) Epileptic seizures and epilepsy: Definitions proposed by the International League against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, 46, 470-472.
- Fisher, R. S., J. H. Cross, J. A. French, N. Higurashi, E. Hirsch, F. E. Jansen, L. Lagae, S. L. Moshe, J. Peltola, E. Roulet Perez, I. E. Scheffer & S. M. Zuberi (2017) Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 58, 522-530.

- Floriano-Sanchez, E., F. Brindis, D. Ortega-Cuellar, I. Ignacio-Mejia, E. Moreno-Arriola, P. Romero-Morelos, E. Ceballos-Vasquez, M. G. Cordova-Espinoza, C. K. Arregoitia-Sarabia, R. Sandoval-Pacheco, L. Carmona-Aparicio & N. Cardenas-Rodriguez (2018) Differential Gene Expression Profile Induced by Valproic Acid (VPA) in Pediatric Epileptic Patients. *Genes*, 9.
- Francis, J., B. Jung, G. Zhang, J. Cheng, W. Ho, W. M. Burnham & J. H. Eubanks (2002) Kindling induces the mRNA expression of methyl DNA-binding factors in the adult rat hippocampus. *Neuroscience*, 113, 79-87.
- Freiman, T. M., U. Haussler, J. Zentner, S. Doostkam, J. Beck, C. Scheiwe, A. Brandt, C. A. Haas & B. Puhahn-Schmeiser (2021) Mossy fiber sprouting into the hippocampal region CA2 in patients with temporal lobe epilepsy. *Hippocampus*, 31, 580-592.
- Fritsch, B., J. Reis, M. Gasiior, R. M. Kaminski & M. A. Rogawski (2014) Role of GluK1 Kainate Receptors in Seizures, Epileptic Discharges, and Epileptogenesis. *Journal of Neuroscience*, 34, 5765-5775.
- Fujimura, H., K. Ohsawa, M. Funaba, T. Murata, E. Murata, M. Takahashi, M. Abe & K. Torii (1999) Immunological localization and ontogenetic development of inhibin alpha subunit in rat brain. *Journal of Neuroendocrinology*, 11, 157-163.
- Galanopoulou, A. S., P. S. Buckmaster, K. J. Staley, S. L. Moshe, E. Perucca, J. Engel, W. Loscher, J. L. Noebels, A. Pitkanen, J. Stables, H. S. White, T. J. O'Brien, M. Simonato, C. Amer Epilepsy Soc Basic Sci & G. Int League Epilepsy Working (2012) Identification of new epilepsy treatments: Issues in preclinical methodology. *Epilepsia*, 53, 571-582.
- Gale, G. D., S. G. Anagnostaras, B. P. Godsil, S. Mitchell, T. Nozawa, J. R. Sage, B. Wiltgen & M. S. Fanselow (2004) Role of the basolateral amygdala in the storage of fear memories across the adult lifetime of rats. *Journal of Neuroscience*, 24, 3810-3815.
- Ghoshal, K., X. Li, J. Datta, S. M. Bai, I. Pogribny, M. Pogribny, Y. Huang, D. Young & S. T. Jacob (2006) A folate- and methyl-deficient diet alters the expression of DNA methyltransferases and methyl CpG binding proteins involved in epigenetic gene silencing in livers of F344 rats. *Journal of Nutrition*, 136, 1522-1527.
- Ginno, P. A., D. Gaidatzis, A. Feldmann, L. Hoerner, D. Imanci, L. Burger, F. Zilbermann, A. Peters, F. Edenhofer, S. A. Smallwood, A. R. Krebs & D. Schubeler (2020) A genome-scale map of DNA methylation turnover identifies site-specific dependencies of DNMT and TET activity. *Nature Communications*, 11.
- Glaze, D. G., A. K. Percy, S. Skinner, K. J. Motil, J. L. Neul, J. O. Barrish, J. B. Lane, S. P. Geerts, F. Annese, J. Graham, L. McNair & H. S. Lee (2010) Epilepsy and the natural history of Rett syndrome. *Neurology*, 74, 909-912.
- Godale, C. M. & S. C. Danzer (2018) Signaling Pathways and Cellular Mechanisms Regulating Mossy Fiber Sprouting in the Development of Epilepsy. *Frontiers in Neurology*, 9.
- Grone, B. P. & S. C. Baraban (2015) Animal models in epilepsy research: legacies and new directions. *Nature Neuroscience*, 18, 339-343.
- Gu, C. (2021) Rapid and Reversible Development of Axonal Varicosities: A New Form of Neural Plasticity. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 14.
- Guo, J., H. Wang, Q. Wang, Y. M. Chen & S. L. Chen (2014) Expression of p-CREB and activity-dependent miR-132 in temporal lobe epilepsy. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 7, 1297-1306.
- Guzik-Kornacka, A., A. Sliwa, G. Plucinska & K. Lukasiuk (2011) Status epilepticus evokes prolonged increase in the expression of CCL3 and CCL4 mRNA and protein in the rat brain. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 71, 193-207.
- Haas, C. A., O. Dudeck, M. Kirsch, C. Huszka, G. Kann, S. Pollak, J. Zentner & M. Frotscher (2002) Role for reelin in the development of granule cell dispersion in temporal lobe epilepsy. *Journal of Neuroscience*, 22, 5797-5802.
- Hauser, R. M., D. C. Henshall & F. D. Lubin (2018) The Epigenetics of Epilepsy and Its Progression. *Neuroscientist*, 24, 186-200.

- Hausler, U., K. Rinas, A. Kiliyas, U. Egert & C. A. Haas (2016) Mossy Fiber Sprouting and Pyramidal Cell Dispersion in the Hippocampal CA2 Region in a Mouse Model of Temporal Lobe Epilepsy. *Hippocampus*, 26, 577-588.
- Heilstedt, H. A., D. L. Burgess, A. E. Anderson, A. Chedrawi, B. Tharp, O. Lee, C. D. Kashork, D. E. Starkey, Y. Q. Wu, J. L. Noebels, L. G. Shaffer & S. K. Shapira (2001) Loss of the potassium channel beta-subunit gene, KCNAB2, is associated with epilepsy in patients with 1p36 deletion syndrome. *Epilepsia*, 42, 1103-1111.
- Heinrich, C., N. Nitta, A. Flubacher, M. Muller, A. Fahrner, M. Kirsch, T. Freiman, F. Suzuki, A. Depaulis, M. Frotscher & C. A. Haas (2006) Reelin deficiency and displacement of mature neurons, but not neurogenesis, underlie the formation of granule cell dispersion in the epileptic hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 26, 4701-4713.
- Hendrich, B., J. Guy, B. Ramsahoye, V. A. Wilson & A. Bird (2001) Closely related proteins MBD2 and MBD3 play distinctive but interacting roles in mouse development. *Genes & Development*, 15, 710-723.
- Hendrich, B., U. Hardeland, H. H. Ng, J. Jiricny & A. Bird (1999) The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. *Nature*, 401, 301-304.
- Hiragi, T., Y. Ikegaya & R. Koyama (2018) Microglia after Seizures and in Epilepsy. *Cells*, 7.
- Hodges, S. L. & J. N. Lugo (2020) Therapeutic role of targeting mTOR signaling and neuroinflammation in epilepsy. *Epilepsy Research*, 161.
- Hoffbuhr, K., J. M. Devaney, B. LaFleur, N. Sirianni, C. Scacheri, J. Giron, J. Schuette, J. Innis, M. Marino, M. Philippart, V. Narayanan, R. Umansky, D. Kronn, E. P. Hoffman & S. Naidu (2001) MeCP2 mutations in children with and without the phenotype of Rett syndrome. *Neurology*, 56, 1486-1495.
- Inostroza, M., E. Cid, L. M. de la Prida & C. Sandi (2012) Different Emotional Disturbances in Two Experimental Models of Temporal Lobe Epilepsy in Rats. *Plos One*, 7.
- Ishibashi, T., I. Kajihara, S. Mizuhashi, H. Kuriyama, T. Kimura, H. Kanemaru, K. Makino, A. Miyashita, J. Aoi, T. Makino, S. Fukushima, K. Kita & H. Ihn (2020) Methyl-CpG binding domain protein 3: a new diagnostic marker and potential therapeutic target of melanoma. *Bioscience Trends*, 14, 390-395.
- Ito, S., A. C. D'Alessio, O. V. Taranova, K. Hong, L. C. Sowers & Y. Zhang (2010) Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*, 466, 1129-U151.
- Ivens, S., D. Kaufer, L. P. Flores, I. Bechmann, D. Zumsteg, O. Tomkins, E. Seiffert, U. Heinemann & A. Friedman (2007) TGF-beta receptor-mediated albumin uptake into astrocytes is involved in neocortical epileptogenesis. *Brain*, 130, 535-547.
- Jankowsky, J. L. & P. H. Patterson (2001) The role of cytokines and growth factors in seizures and their sequelae. *Progress in Neurobiology*, 63, 125-149.
- Jarero-Basulto, J. J., Y. Gasca-Martinez, M. C. Rivera-Cervantes, M. E. Urena-Guerrero, A. I. Feria-Velasco & C. Beas-Zarate (2018) Interactions Between Epilepsy and Plasticity. *Pharmaceuticals*, 11.
- Jedrzeczak, J., B. Majkowska-Zwolinska, A. Chudzicka-Bator, I. Zerda, M. Wladysiuk & B. Godman (2021) Economic and social cost of epilepsy in Poland: 5-year analysis. *European Journal of Health Economics*, 22, 485-497.
- Jiang, Q. A., Y. Wu, J. M. Wang, X. R. Wu, J. O. Qin & Y. W. Jiang (2010) Characterization of developing rat cortical neurons after epileptiform discharges. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 28, 455-463.
- Jung, B. P., G. Zhang, W. Ho, J. Francis & J. H. Eubanks (2002) Transient forebrain ischemia alters the mRNA expression of methyl DNA-binding factors in the adult rat hippocampus. *Neuroscience*, 115, 515-524.
- Jung, B. P., G. M. Zhang, R. Nitsch, J. Trogadis, S. Nag & J. H. Eubanks (2003) Differential expression of methyl CpG-binding domain containing factor MBD3 in the developing and adult rat brain. *Journal of Neurobiology*, 55, 220-232.

- Kaas, G. A., C. Zhong, D. E. Eason, D. L. Ross, R. V. Vachhani, G. I. Ming, J. R. King, H. J. Song & J. D. Sweatt (2013) TET1 Controls CNS 5-Methylcytosine Hydroxylation, Active DNA Demethylation, Gene Transcription, and Memory Formation. *Neuron*, 79, 1086-1093.
- Kaji, K., I. M. Caballero, R. MacLeod, J. Nichols, V. A. Wilson & B. Hendrich (2006) The NuRD component Mbd3 is required for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature Cell Biology*, 8, 285-292.
- Kaji, K., J. Nichols & B. Hendrich (2007) Mbd3, a component of the NuRD co-repressor complex, is required for development of pluripotent cells. *Development*, 134, 1123-1132.
- Kalinowsky, L. B. (1986) HISTORY OF CONVULSIVE THERAPY. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 462, 1-4.
- Kelly, T. K., D. D. De Carvalho & P. A. Jones (2010) Epigenetic modifications as therapeutic targets. *Nature Biotechnology*, 28, 1069-1078.
- Kim, J., X. Y. Zhang, S. Muralidhar, S. A. LeBlanc & S. Tonegawa (2017) Basolateral to Central Amygdala Neural Circuits for Appetitive Behaviors. *Neuron*, 93, 1464-+.
- Kim, S. & H. Rhim (2004) Ginsenosides inhibit NMDA receptor-mediated epileptic discharges in cultured hippocampal neurons. *Archives of Pharmacal Research*, 27, 524-530.
- Kinnaird, A., S. Zhao, K. E. Wellen & E. D. Michelakis (2016) Metabolic control of epigenetics in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 16, 694-707.
- Klioueva, I. A., E. van Luijtelaa, N. E. Chepurnova & S. A. Chepurnov (2001) PTZ-induced seizures in rats: effects of age and strain. *Physiology & Behavior*, 72, 421-426.
- Kobow, K. & I. Blumcke (2011) The methylation hypothesis: Do epigenetic chromatin modifications play a role in epileptogenesis? *Epilepsia*, 52, 15-19.
- (2012) The emerging role of DNA methylation in epileptogenesis. *Epilepsia*, 53, 11-20.
- Kobow, K., I. Jeske, M. Hildebrandt, J. Hauke, E. Hahnen, R. Buslei, M. Buchfelder, D. Weigel, H. Stefan, B. Kasper, E. Pauli & I. Blumcke (2009) Increased Reelin Promoter Methylation Is Associated With Granule Cell Dispersion in Human Temporal Lobe Epilepsy. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 68, 356-364.
- Kondratiuk, I., G. Plucinska, D. Miszczuk, G. Wozniak, K. Szydłowska, L. Kaczmarek, R. K. Filipkowski & K. Lukasiuk (2015) Epileptogenesis following Kainic Acid-Induced Status Epilepticus in Cyclin D2 Knock-Out Mice with Diminished Adult Neurogenesis. *Plos One*, 10.
- Kong, F. C., L. Q. Lang, J. Hu, X. L. Zhang, M. K. Zhong & C. L. Ma (2022) A novel epigenetic marker, Ten-eleven translocation family member 2 (TET2), is identified in the intractable epileptic brain and regulates ATP binding cassette subfamily B member 1 (ABCB1) in the blood-brain barrier. *Bioengineered*, 13, 6638-6649.
- Kovalenko, A. A., M. V. Zakharova, O. E. Zubareva, A. P. Schwarz, T. Y. Postnikova & A. V. Zaitsev (2021) Alterations in mRNA and Protein Expression of Glutamate Receptor Subunits Following Pentylene-tetrazole-induced Acute Seizures in Young Rats. *Neuroscience*, 468, 1-15.
- Kwan, P. & M. J. Brodie (2000) Early identification of refractory epilepsy. *New England Journal of Medicine*, 342, 314-319.
- Lai, A. Y. & P. A. Wade (2011) Cancer biology and NuRD: a multifaceted chromatin remodelling complex. *Nature Reviews Cancer*, 11, 588-596.
- Lee, W., J. Kim, J. M. Yun, T. Ohn & Q. Z. Gong (2020) MeCP2 regulates gene expression through recognition of H3K27me3. *Nature Communications*, 11.
- Leighton, G. & D. C. Williams (2020) The Methyl-CpG-Binding Domain 2 and 3 Proteins and Formation of the Nucleosome Remodeling and Deacetylase Complex. *Journal of Molecular Biology*, 432, 1624-1639.
- Leroy, C., C. Roch, E. Koning, I. J. Namer & A. Nehlig (2003) In the lithium-pilocarpine model of epilepsy, brain lesions are not linked to changes in blood-brain barrier permeability: an autoradiographic study in adult and developing rats. *Experimental Neurology*, 182, 361-372.

- Li, H. J., R. P. Wan, L. J. Tang, S. J. Liu, Q. H. Zhao, M. M. Gao, Y. H. Yi, W. P. Lia, X. F. Sun & Y. S. Long (2015) Alteration of Scn3a expression is mediated via CpG methylation and MBD2 in mouse hippocampus during postnatal development and seizure condition. *Biochimica Et Biophysica Acta- Gene Regulatory Mechanisms*, 1849, 1-9.
- Liao, Y., G. K. Smyth & W. Shi (2014) featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 30, 923-930.
- Liu, A. H., M. Chu & Y. P. Wang (2019) Up-Regulation of Trem2 Inhibits Hippocampal Neuronal Apoptosis and Alleviates Oxidative Stress in Epilepsy via the PI3K/Akt Pathway in Mice. *Neuroscience Bulletin*, 35, 471-485.
- Loewen, J. L., M. L. Barker-Haliski, E. J. Dahle, H. S. White & K. S. Wilcox (2016) Neuronal Injury, Gliosis, and Glial Proliferation in Two Models of Temporal Lobe Epilepsy. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 75, 366-378.
- Lopes, M. W., S. C. Lopes, D. B. Santos, A. P. Costa, F. M. Goncalves, N. de Mello, R. D. Prediger, M. Farina, R. Walz & R. B. Leal (2016) Time course evaluation of behavioral impairments in the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy & Behavior*, 55, 92-100.
- Loscher, W. (2002) Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research*, 50, 105-123.
- (2011) Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure-European Journal of Epilepsy*, 20, 359-368.
- (2017) Animal Models of Seizures and Epilepsy: Past, Present, and Future Role for the Discovery of Antiseizure Drugs. *Neurochemical Research*, 42, 1873-1888.
- Loscher, W. & A. Friedman (2020) Structural, Molecular, and Functional Alterations of the Blood-Brain Barrier during Epileptogenesis and Epilepsy: A Cause, Consequence, or Both? *International Journal of Molecular Sciences*, 21.
- Loscher, W., H. Potschka, S. M. Sisodiya & A. Vezzani (2020) Drug Resistance in Epilepsy: Clinical Impact, Potential Mechanisms, and New Innovative Treatment Options. *Pharmacological Reviews*, 72, 606-638.
- Loscher, W. & D. Schmidt (1988) WHICH ANIMAL-MODELS SHOULD BE USED IN THE SEARCH FOR NEW ANTIEPILEPTIC DRUGS - A PROPOSAL BASED ON EXPERIMENTAL AND CLINICAL CONSIDERATIONS. *Epilepsy Research*, 2, 145-181.
- Love, M. I., W. Huber & S. Anders (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15.
- Lybrand, Z. R., S. Goswami, J. F. Zhu, V. Jarzabek, N. Merlock, M. Aktar, C. Smith, L. Zhang, P. Varma, K. O. Cho, S. Y. Ge & J. Hsieh (2021) A critical period of neuronal activity results in aberrant neurogenesis rewiring hippocampal circuitry in a mouse model of epilepsy. *Nature Communications*, 12.
- Matagne, V., Y. Ehinger, L. Saidi, A. Borges-Correia, M. Barkats, M. Bartoli, L. Villard & J. C. Roux (2017) A codon-optimized Mecp2 transgene corrects breathing deficits and improves survival in a mouse model of Rett syndrome. *Neurobiology of Disease*, 99, 1-11.
- Meller, S., C. Kaufer, B. Gailus, C. Brandt & W. Loscher (2021) Scopolamine prevents aberrant mossy fiber sprouting and facilitates remission of epilepsy after brain injury. *Neurobiology of Disease*, 158.
- Menafra, R. & H. G. Stunnenberg (2014) MBD2 and MBD3: elusive functions and mechanisms. *Frontiers in Genetics*, 5.
- Mertz, C., S. Krarup, C. D. Jensen, S. E. H. Lindholm, C. Kjaer, L. H. Pinborg & L. K. Bak (2020) Aspects of cAMP Signaling in Epileptogenesis and Seizures and Its Potential as Drug Target. *Neurochemical Research*, 45, 1247-1255.
- Michalak, Z., T. Sano, T. Engel, S. F. C. Miller-Delaney, M. Lerner-Natoli & D. C. Henshall (2013) Spatio-temporally restricted blood-brain barrier disruption after intra-amygdala kainic acid-induced status epilepticus in mice. *Epilepsy Research*, 103, 167-179.

- Miller-Delaney, S. F. C., K. Bryan, S. Das, R. C. McKiernan, I. M. Bray, J. P. Reynolds, R. Gwinn, R. L. Stallings & D. C. Henshall (2015) Differential DNA methylation profiles of coding and non-coding genes define hippocampal sclerosis in human temporal lobe epilepsy. *Brain*, 138, 616-631.
- Miller-Delaney, S. F. C., S. Das, T. Sano, E. M. Jimenez-Mateos, K. Bryan, P. G. Buckley, R. L. Stallings & D. C. Henshall (2012) Differential DNA Methylation Patterns Define Status Epilepticus and Epileptic Tolerance. *Journal of Neuroscience*, 32, 1577-1588.
- Mohn, F., M. Weber, M. Rebhan, T. C. Roloff, J. Richter, M. B. Stadler, M. Bibel & D. Schubeler (2008) Lineage-specific polycomb targets and de novo DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors. *Molecular Cell*, 30, 755-766.
- Moore, L. D., T. Le & G. P. Fan (2013) DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology*, 38, 23-38.
- MuhChyi, C., B. Juliandi, T. Matsuda & K. Nakashima (2013) Epigenetic regulation of neural stem cell fate during corticogenesis. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 31, 424-433.
- Murgatroyd, C., A. V. Patchev, Y. Wu, V. Micale, Y. Bockmuhl, D. Fischer, F. Holsboer, C. T. Wotjak, O. F. X. Almeida & D. Spengler (2009) Dynamic DNA methylation programs persistent adverse effects of early-life stress. *Nature Neuroscience*, 12, 1559-U108.
- Nagarkatti, N., L. S. Deshpande, D. S. Carter & R. J. DeLorenzo (2010) Dantrolene inhibits the calcium plateau and prevents the development of spontaneous recurrent epileptiform discharges following in vitro status epilepticus. *European Journal of Neuroscience*, 32, 80-88.
- Ndode-Ekane, X. E., N. Hayward, O. Grohn & A. Pitkanen (2010) VASCULAR CHANGES IN EPILEPSY: FUNCTIONAL CONSEQUENCES AND ASSOCIATION WITH NETWORK PLASTICITY IN PILOCARPINE-INDUCED EXPERIMENTAL EPILEPSY. *Neuroscience*, 166, 312-332.
- Neul, J. L., P. Fang, J. Barrish, J. Lane, E. B. Caeg, E. O. Smith, H. Zoghbi, A. Percy & D. G. Glaze (2008) Specific mutations in Methyl-CpG-Binding Protein 2 confer different severity in Rett syndrome. *Neurology*, 70, 1313-1321.
- Nissinen, J., T. Halonen, E. Koivisto & A. Pitkanen (2000) A new model of chronic temporal lobe epilepsy induced by electrical stimulation of the amygdala in rat. *Epilepsy Research*, 38, 177-205.
- Nissinen, J., K. Lukasiuk & A. Pitkanen (2001) Is mossy fiber sprouting present at the time of the first spontaneous seizures in rat experimental temporal lobe epilepsy? *Hippocampus*, 11, 299-310.
- Nitarska, J., J. G. Smith, W. T. Sherlock, M. M. G. Hillege, A. Nott, W. D. Barshop, A. A. Vashisht, J. A. Wohlschlegel, R. Mitter & A. Riccio (2016) A Functional Switch of NuRD Chromatin Remodeling Complex Subunits Regulates Mouse Cortical Development. *Cell Reports*, 17, 1683-1698.
- Orcinha, C., G. Munzner, J. Gerlach, A. Kiliyas, M. Follo, U. Egert & C. A. Haas (2016) Seizure-Induced Motility of Differentiated Dentate Granule Cells Is Prevented by the Central Reelin Fragment. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10.
- Parent, J. M., R. C. Elliott, S. J. Pleasure, N. M. Barbaro & D. H. Lowenstein (2006) Aberrant seizure-induced neurogenesis in experimental temporal lobe epilepsy. *Annals of Neurology*, 59, 81-91.
- Patel, D. C., B. P. Tewari, L. Chaunsali & H. Sontheimer (2019) Neuron-glia interactions in the pathophysiology of epilepsy. *Nature Reviews Neuroscience*, 20, 282-297.
- Paxinos G., C. W. 2006. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Hard Cover Edition.
- Pitkanen, A. & K. Lukasiuk (2011) Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. *Lancet Neurology*, 10, 173-186.
- Pitkanen, A., J. Nissinen, J. Nairismagi, K. Lukasiuk, O. H. J. Grohn, R. Miettinen & R. Kauppinen (2002) Progression of neuronal damage after status epilepticus and during

- spontaneous seizures in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Do Seizures Damage the Brain*, 135, 67-83.
- Pitkanen, A. & T. P. Sutula (2002) Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. *Lancet Neurology*, 1, 173-181.
- Pitkanen, A., J. Tuunanen, R. Kalviainen, K. Partanen & T. Salmenpera (1998) Amygdala damage in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research*, 32, 233-253.
- Plata, A., A. Lebedeva, P. Denisov, O. Nosova, T. Y. Postnikova, A. Pimashkin, A. Brazhe, A. V. Zaitsev, D. A. Rusakov & A. Semyanov (2018) Astrocytic Atrophy Following Status Epilepticus Parallels Reduced Ca²⁺ Activity and Impaired Synaptic Plasticity in the Rat Hippocampus. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11.
- Plata-Salaman, C. R., S. E. Ilyin, N. P. Turrin, D. Gayle, M. C. Flynn, A. E. Romanovitch, M. E. Kelly, Y. Bureau, H. Anisman & D. C. McIntyre (2000) Kindling modulates the IL-1 beta system, TNF-alpha, TGF-beta 1, and neuropeptide mRNAs in specific brain regions. *Molecular Brain Research*, 75, 248-258.
- Portela, A. & M. Esteller (2010) Epigenetic modifications and human disease. *Nature Biotechnology*, 28, 1057-1068.
- Proper, E. A., G. H. Jansen, C. W. M. van Veelen, P. C. van Rijen, W. H. Gispen & P. N. E. de Graan (2001) A grading system for hippocampal sclerosis based on the degree of hippocampal mossy fiber sprouting. *Acta Neuropathologica*, 101, 405-409.
- Prut, L. & C. Belzung (2003) The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*, 463, 3-33.
- Qiu, P. C., Y. Y. Lu, S. Zhang, H. Li, H. Bao, Y. Q. Ji, F. Fang, H. F. Tang & G. Cheng (2020) Reduction of SCUBE3 by a new marine-derived asterosaponin leads to arrest of glioma cells in G1/S. *Oncogenesis*, 9.
- Ravizza, T., B. Gagliardi, F. Noe, K. Boer, E. Aronica & A. Vezzani (2008) Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: Evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of Disease*, 29, 142-160.
- Rigau, V., M. Morin, M. C. Rousset, F. de Bock, A. Lebrun, P. Coubes, M. C. Picot, M. Baldy-Moulinier, J. Bockaert, A. Crespel & M. Lerner-Natoli (2007) Angiogenesis is associated with blood-brain barrier permeability in temporal lobe epilepsy. *Brain*, 130, 1942-1956.
- Robel, S., S. C. Buckingham, J. L. Boni, S. L. Campbell, N. C. Danbolt, T. Riedemann, B. Sutor & H. Sontheimer (2015) Reactive Astroglia Causes the Development of Spontaneous Seizures. *Journal of Neuroscience*, 35, 3330-3345.
- Rogawski, M. A. (2006) Molecular targets versus models for new antiepileptic drug discovery. *Epilepsy Research*, 68, 22-28.
- Ruggieri, M., P. Iannetti, A. Polizzi, I. La Mantia, A. Spalice, O. Gilibertos, N. Platania, A. L. Gabriele, V. Albanese & L. Pavone (2005) Earliest clinical manifestations and natural history of neurofibromatosis type 2 (NF2) in childhood: A study of 24 patients. *Neuropediatrics*, 36, 21-34.
- Rusina, E., C. Bernard & A. Williamson (2021) The Kainic Acid Models of Temporal Lobe Epilepsy. *Eneuro*, 8.
- Saito, M. & F. Ishikawa (2002) The mCpG-binding domain of human MBD3 does not bind to mCpG but interacts with NuRD/Mi2 components HDAC1 and MTA2. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 35434-35439.
- Samaco, R. C. & J. L. Neul (2011) Complexities of Rett Syndrome and MeCP2. *Journal of Neuroscience*, 31, 7951-7959.
- Samokhina, E. & A. Samokhin (2018) Neuropathological profile of the pentylenetetrazol (PTZ) kindling model. *International Journal of Neuroscience*, 128, 1086-1096.
- Sander, T., T. Hildmann, R. Kretz, R. Furst, U. Sailer, G. Bauer, B. Schmitz, G. Beckmannagetta, T. F. Wienker & D. Janz (1997) Allelic association of juvenile absence epilepsy with a

- GluR5 kainate receptor gene (GRIK1) polymorphism. *American Journal of Medical Genetics*, 74, 416-421.
- Sandweiss, A. J., V. L. Brandt & H. Y. Zoghbi (2020) Advances in understanding of Rett syndrome and MECP2 duplication syndrome: prospects for future therapies (vol 19, pg 689, 2020). *Lancet Neurology*, 19, E9-E9.
- Sano, F., E. Shigetomi, Y. Shinozaki, H. Tsuzuki, K. Saito, K. Mikoshiba, H. Horiuchi, D. L. Cheung, J. Nabekura, K. Sugita, M. Aihara & S. Koizumi (2021) Reactive astrocyte-driven epileptogenesis is induced by microglia initially activated following status epilepticus. *Jci Insight*, 6.
- Scheffer, I. E., S. Berkovic, G. Capovilla, M. B. Connolly, J. French, L. Guilhoto, E. Hirsch, S. Jain, G. W. Mathern, S. L. Moshe, D. R. Nordli, E. Perucca, T. Tomson, S. Wiebe, Y. H. Zhang & S. M. Zuberi (2017) ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 58, 512-521.
- Schuler, V., C. Luscher, C. Blanchet, N. Klix, G. Sansig, K. Klebs, M. Schmutz, J. Heid, C. Gentry, L. Urban, A. Fox, W. Spooren, A. L. Jatou, J. M. Vigouret, M. Pozza, P. H. Kelly, J. Mosbacher, W. Froestl, E. Kaslin, R. Korn, S. Bischoff, K. Kaupmann, H. van der Putten & B. Bettler (2001) Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic GABA(B) responses in mice lacking GABA(B1). *Neuron*, 31, 47-58.
- Sha, L. Z., X. F. Wu, Y. Yao, B. Wen, J. Feng, Z. Q. Sha, X. Q. Wang, X. L. Xing, W. C. Dou, L. R. Jin, W. T. Li, N. L. Wang, Y. Shen, J. H. Wang, L. W. Wu & Q. Xu (2014) Notch Signaling Activation Promotes Seizure Activity in Temporal Lobe Epilepsy. *Molecular Neurobiology*, 49, 633-644.
- Shimbo, T., Y. Du, S. A. Grimm, A. Dhasarathy, D. Mav, R. R. Shah, H. D. Shi & P. A. Wade (2013) MBD3 Localizes at Promoters, Gene Bodies and Enhancers of Active Genes. *Plos Genetics*, 9.
- Sierraparedes, G., R. Sotootero, E. Mendezalvarez, J. Galanvaliente, E. Aguilarveiga & G. Sierramarcuno (1989) EXPERIMENTAL SPIKE-AND-WAVE DISCHARGES INDUCED BY PENTYLENETETRAZOL AND TOLERANCE TO REPEATED INJECTIONS - AN ELECTROPHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL-STUDY. *Epilepsy Research*, 4, 139-146.
- Singh, T., A. Mishra & R. K. Goel (2021) PTZ kindling model for epileptogenesis, refractory epilepsy, and associated comorbidities: relevance and reliability. *Metabolic Brain Disease*, 36, 1573-1590.
- Sinnett, S. E., E. Boyle, C. Lyons & S. J. Gray (2021) Engineered microRNA-based regulatory element permits safe high-dose miniMECP2 gene therapy in Rett mice. *Brain*, 144, 3005-3019.
- Smith, Z. D. & A. Meissner (2013) DNA methylation: roles in mammalian development. *Nature Reviews Genetics*, 14, 204-220.
- Sng, J., H. Taniura & V. Yoneda (2006) Histone modifications in kainate-induced status epilepticus. *Journal of Neurochemistry*, 98, 88-89.
- Sombati, S. & R. J. Delorenzo (1995) RECURRENT SPONTANEOUS SEIZURE ACTIVITY IN HIPPOCAMPAL NEURONAL NETWORKS IN CULTURE. *Journal of Neurophysiology*, 73, 1706-1711.
- Stefaniuk, M. & K. Lukasiuk (2010) Cloning of expressed sequence tags (ESTs) representing putative epileptogenesis-related genes and the localization of their expression in the normal brain. *Neuroscience Letters*, 482, 230-234.
- Stokin, G. B., C. Lillo, T. L. Falzone, R. G. Bruschi, E. Rockenstein, S. L. Mount, R. Raman, P. Davies, E. Masliah, D. S. Williams & L. S. B. Goldstein (2005) Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Science*, 307, 1282-1288.
- Sutula, T., G. Cascino, J. Cavazos, I. Parada & L. Ramirez (1989) MOSSY FIBER SYNAPTIC REORGANIZATION IN THE EPILEPTIC HUMAN TEMPORAL-LOBE. *Annals of Neurology*, 26, 321-330.

- Tager, H. S. & D. F. Steiner (1974) PEPTIDE HORMONES. *Annual Review of Biochemistry*, 43, 509-538.
- Tahiliani, M., K. P. Koh, Y. H. Shen, W. A. Pastor, H. Bandukwala, Y. Brudno, S. Agarwal, L. M. Iyer, D. R. Liu, L. Aravind & A. Rao (2009) Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1. *Science*, 324, 930-935.
- Tang-Schomer, M. D., V. E. Johnson, P. W. Baas, W. Stewart & D. H. Smith (2012) Partial interruption of axonal transport due to microtubule breakage accounts for the formation of periodic varicosities after traumatic axonal injury. *Experimental Neurology*, 233, 364-372.
- Taspinar, N., A. Hacimuftuoglu, S. Butuner, B. Togar, G. Arslan, A. Taghizadehghalehjoughi, U. Okkay, E. Agar, R. Stephens, H. Turkez & A. M. Abd El-Aty (2021) Differential effects of inhibitors of PTZ-induced kindling on glutamate transporters and enzyme expression. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 48, 1662-1673.
- Touret, M., S. Parrot, L. Denoroy, M. F. Belin & M. Didier-Bazes (2007) Glutamatergic alterations in the cortex of genetic absence epilepsy rats. *Bmc Neuroscience*, 8.
- Uemori, T., K. Toda & T. Seki (2017) Seizure severity-dependent selective vulnerability of the granule cell layer and aberrant neurogenesis in the rat hippocampus. *Hippocampus*, 27, 1054-1068.
- Van Erum, J., D. Van Dam & P. P. De Deyn (2019) PTZ-induced seizures in mice require a revised Racine scale. *Epilepsy & Behavior*, 95, 51-55.
- Vezzani, A., S. Balosso & T. Ravizza (2008) The role of cytokines in the pathophysiology of epilepsy. *Brain Behavior and Immunity*, 22, 797-803.
- (2019) Neuroinflammatory pathways as treatment targets and biomarkers in epilepsy. *Nature Reviews Neurology*, 15, 459-472.
- Vezzani, A., D. Moneta, C. Richichi, M. Aliprandi, S. J. Burrows, T. Ravizza, C. Perego & M. G. De Simoni (2002) Functional role of inflammatory cytokines and antiinflammatory molecules in seizures and epileptogenesis. *Epilepsia*, 43, 30-35.
- Vidal, S., A. Pascual-Alonso, M. Rabaza-Gairi, E. Gerotina, N. Brandi, P. Pacheco, C. Xiol, M. Pineda, J. Armstrong & G. Rett Working (2019) Characterization of large deletions of the MECP2 gene in Rett syndrome patients by gene dosage analysis. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 7.
- Vignoli, A., M. N. Savini, M. S. Nowbut, A. Peron, K. Turner, F. La Briola & M. P. Canevini (2017) Effectiveness and tolerability of antiepileptic drugs in 104 girls with Rett syndrome. *Epilepsy & Behavior*, 66, 27-33.
- Vincent, P. & C. Mulle (2009) KAINATE RECEPTORS IN EPILEPSY AND EXCITOTOXICITY. *Neuroscience*, 158, 309-323.
- Viswanatha, G. L., H. Shylaja, D. V. Kishore, M. V. Venkataranganna & N. B. L. Prasad (2020) Acteoside Isolated from *Colebrookea oppositifolia* Smith Attenuates Epilepsy in Mice Via Modulation of Gamma-Aminobutyric Acid Pathways. *Neurotoxicity Research*, 38, 1010-1023.
- Walton, R. M. (2012) Postnatal Neurogenesis: Of Mice, Men, and Macaques. *Veterinary Pathology*, 49, 155-165.
- Wang, G. M., Z. P. Zhu, D. H. Xu & L. C. Sun (2020a) Advances in Understanding CREB Signaling-Mediated Regulation of the Pathogenesis and Progression of Epilepsy. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 196.
- Wang, H. Y., Y. M. Feng, J. Y. Sun, W. Zhang, Z. B. Han, S. K. Yu, Y. F. Gu, X. B. Cheng, Z. G. Lin & M. Na (2021) Methyl-CpG-Binding Domain Protein 3 Promotes Seizures by Recruiting Methyltransferase DNMT1 to Enhance TREM2 Methylation. *Neurochemical Research*, 46, 2451-2462.

- Wang, L., X. W. Fu, X. Peng, Z. Xiao, Z. G. Li, G. J. Chen & X. F. Wang (2016) DNA Methylation Profiling Reveals Correlation of Differential Methylation Patterns with Gene Expression in Human Epilepsy. *Journal of Molecular Neuroscience*, 59, 68-77.
- Wang, R. L., X. L. An & S. Z. Zhao (2020b) Effect of miR-124 on PI3K/Akt signal pathway in refractory epilepsy rats. *Cellular and Molecular Biology*, 66, 146-152.
- West, P. J., K. Thomson, P. Billingsley, T. Pruess, C. Rueda, G. W. Saunders, M. D. Smith, C. S. Metcalf & K. S. Wilcox (2022) Spontaneous recurrent seizures in an intra-amygdala kainate microinjection model of temporal lobe epilepsy are differentially sensitive to antiseizure drugs. *Experimental Neurology*, 349.
- Wetherington, J., G. Serrano & R. Dingledine (2008) Astrocytes in the epileptic brain. *Neuron*, 58, 168-178.
- Winden, K. D., A. Bragin, J. Engel & D. H. Geschwind (2015) Molecular alterations in areas generating fast ripples in an animal model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of Disease*, 78, 35-44.
- Wither, R. G., S. Colic, B. L. Bardakjian, O. C. Snead, L. Zhang & J. H. Eubanks (2018) Electrographic and pharmacological characterization of a progressive epilepsy phenotype in female MeCP2-deficient mice. *Epilepsy Research*, 140, 177-183.
- Wu, L., Y. S. Li, M. H. Yu, F. Yang, M. Q. Tu & H. B. Xu (2018) Notch Signaling Regulates Microglial Activation and Inflammatory Reactions in a Rat Model of Temporal Lobe Epilepsy. *Neurochemical Research*, 43, 1269-1282.
- Xiao, Z. H., J. Peng, N. Gan, A. Arafat & F. Yin (2016) Interleukin-1 beta Plays a Pivotal Role via the PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway in the Chronicity of Mesial Temporal Lobe Epilepsy. *Neuroimmunomodulation*, 23, 332-344.
- Yalcin, O., B. Baykan, K. Agan, Z. Yapici, D. Yalcin, G. Dizdarer, D. Turkdogan, C. Ozkara, A. Unalp, D. Uluduz, G. Gul, D. Kuscu, S. Ayta, K. Tutkavul, S. Comu, B. Tatli, C. Meral, N. Bebek & S. H. Caglayan (2011) An association analysis at 2q36 reveals a new candidate susceptibility gene for juvenile absence epilepsy and/or absence seizures associated with generalized tonic-clonic seizures. *Epilepsia*, 52, 975-983.
- Yildirim, O., R. W. Li, J. H. Hung, P. B. Chen, X. J. Dong, L. S. Ee, Z. P. Weng, O. J. Rando & T. G. Fazio (2011) Mbd3/NURD Complex Regulates Expression of 5-Hydroxymethylcytosine Marked Genes in Embryonic Stem Cells. *Cell*, 147, 1498-1510.
- Yu, G. C., L. G. Wang, Y. Y. Han & Q. Y. He (2012) clusterProfiler: an R Package for Comparing Biological Themes Among Gene Clusters. *OmicS-a Journal of Integrative Biology*, 16, 284-287.
- Zhang, B. & M. Wong (2012) Pentylentetrazole-induced seizures cause acute, but not chronic, mTOR pathway activation in rat. *Epilepsia*, 53, 506-511.
- Zhang, B., J. Zou, L. R. Han, B. Beeler, J. L. Friedman, E. Griffin, Y. S. Piao, N. R. Rensing & M. Wong (2018) The specificity and role of microglia in epileptogenesis in mouse models of tuberous sclerosis complex. *Epilepsia*, 59, 1796-1806.
- Zhao, C. M., W. Deng & F. H. Gage (2008) Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*, 132, 645-660.
- Zhao, X. F., Y. Liao, S. Morgan, R. Mathur, P. Feustel, J. Mazurkiewicz, J. Qian, J. Chang, G. W. Mathern, M. A. Adamo, A. L. Ritaccio, M. Gruenthal, X. J. Zhu & Y. F. Huang (2018) Noninflammatory Changes of Microglia Are Sufficient to Cause Epilepsy. *Cell Reports*, 22, 2080-2093.
- Zhao, Y. D., M. C. Li, M. M. Konate, L. Chen, B. Das, C. Karlovich, P. M. Williams, Y. A. Evrard, J. H. Doroshov & L. M. McShane (2021) TPM, FPKM, or Normalized Counts? A Comparative Study of Quantification Measures for the Analysis of RNA-seq Data from the NCI Patient-Derived Models Repository. *Journal of Translational Medicine*, 19.
- Zhu, Q., L. Wang, Y. Zhang, F. H. Zhao, J. Luo, Z. Xiao, G. J. Chen & X. F. Wang (2012) Increased Expression of DNA methyltransferase 1 and 3a in Human Temporal Lobe Epilepsy. *Journal of Molecular Neuroscience*, 46, 420-426.

Zhu, Y., C. S. Li, Y. Y. Wang & S. N. Zhou (2015) Change of MicroRNA-134, CREB and p-CREB expression in epileptic rat. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 8, 292-298.

Materiały dodatkowe

Tabela MD 1. Lista genów o zmienionym poziomie ekspresji ($p < 0,05$) 24 godziny po indukcji wyładowań epileptopodobnych w hodowli nietransfekowanych neuronów korowych. Nazwy genów przedstawiono na podstawie bazy danych DAVID (<https://david.ncicrf.gov/tools.jsp>, stan na dzień 22/08/2022).

Geny o obniżonym poziomie ekspresji 24 godziny po indukcji wyładowań epileptopodobnych w hodowli nietransfekowanych neuronów korowych				
Nazwa genu (skrót)	Pełna nazwa genu w języku angielskim	Krotność zmiany względem kontroli	Wartość p	Badania nad padaczką
Adamts15	<i>ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 15</i>	-5,95	1,18e-07	
Adamts8	<i>ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 8</i>	-3,154	4,02e-05	
Bola1	<i>bola family member 1</i>	-0,94	2,16e-05	
Camkk1	<i>calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 1</i>	-0,84	7,06e-05	
Drp2	<i>dystrophin related protein 2</i>	-1,09	4,03e-05	
Emc9	<i>ER membrane protein complex subunit 9</i>	-1,43	1,99e-05	
Galnt16	<i>polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 6</i>	-2,78	9,08e-06	
Grik1	<i>glutamate ionotropic receptor kainate type subunit 1</i>	-3,39	6,15e-05	(Sander i wsp. 1997)
Hcrtr1	<i>hypocretin receptor 1</i>	-3,79	3,86e-05	
Ifit1bl	<i>interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1B-like</i>	-2,91	1,55e-06	
Inha	<i>inhibin subunit alpha</i>	-1,15	6,99e-05	(Yalcin i wsp. 2011)
Kcnab2	<i>potassium voltage-gated channel subfamily A regulatory beta subunit 2</i>	-1,47	6,90e-06	(Heilstedt i wsp. 2001)
Lrrc24	<i>leucine rich repeat containing 24</i>	-0,88	4,15e-05	
Polr3k	<i>RNA polymerase III subunit K</i>	-0,56	4,18e-05	
Ppp1r3e	<i>protein phosphatase 1, regulatory subunit 3E</i>	-1,47	4,44e-05	
RGD1562229	<i>similar to hypothetical protein FLJ40298</i>	-5,71	3,23e-05	
RT1-DMa	<i>RT1 class II, locus Dma</i>	-1,12	4,68e-05	
Rtl6	<i>retrotransposon Gag like 6</i>	-0,46	1,10e-05	

Rxrg	<i>retinoid X receptor gamma</i>	-2,44	3,86e-05	
Sh3rf3	<i>SH3 domain containing ring finger 3</i>	-1,34	6,50e-05	
Slc7a4	<i>solute carrier family 7, member 4</i>	-1,54	3,41e-05	
Synpr	<i>Synaptoporin</i>	-1,71	5,58e-05	
1700030J22Rik	<i>RIKEN cDNA 1700030J22 gene</i>	-1,33	3,87e-05	
AABR07001519.1	(nazwa niezidentyfikowana)	-1,39	3,07e-05	
Geny o zwiększonym poziomie ekspresji 24 godziny po indukcji wyładowań epileptopodobnych w hodowli nietransfekowanych neuronów korowych				
Giot1	<i>gonadotropin inducible ovarian transcription factor 1</i>	3,24	3,86e-06	

Tabela MD 2. Lista genów o zmienionym poziomie ekspresji ($p < 0,05$) 24 godziny po indukcji wyładowań epileptopodobnych w hodowli neuronów korowych transfekowanych wirusem kontrolnym (SYN-GFP). Nazwy genów przedstawiono na podstawie bazy danych DAVID (<https://david.ncicrf.gov/tools.jsp>, stan na dzień 03/11/2022).

Geny o obniżonym poziomie ekspresji 24 godziny po indukcji wyładowań epileptopodobnych			
Nazwa genu (skrót)	Pełna nazwa genu w języku angielskim	Krotność zmiany względem kontroli	Wartość p
<i>Kcnj12</i>	<i>potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 12</i>	-2,50	1,00E-07
<i>Ccdc33</i>	<i>coiled-coil domain containing 33</i>	-4,60	3,70E-07
<i>Rtl9</i>	<i>retrotransposon Gag like 9</i>	-2,57	1,05E-06
<i>Rxrg</i>	<i>retinoid X receptor gamma</i>	-2,86	1,84E-06
<i>Klf2</i>	<i>Kruppel-like factor 2</i>	-1,77	2,61E-06
<i>Qpct</i>	<i>glutaminy-peptide cyclotransferase</i>	-2,49	3,15E-06
<i>Spns2</i>	<i>sphingolipid transporter 2</i>	-1,84	5,28E-06
<i>Slc25a14</i>	<i>solute carrier family 25 member 14</i>	-0,85	7,36E-06
<i>Zfp804a</i>	<i>zinc finger protein 804A</i>	-2,81	9,99E-06
<i>Prss47</i>	<i>serine protease 47</i>	-7,07	9,92E-06
<i>Slc6a7</i>	<i>solute carrier family 6 member 7</i>	-2,28	9,27E-06
<i>Th</i>	<i>tyrosine hydroxylase</i>	-6,56	1,29E-05
<i>Ccdc81</i>	<i>coiled-coil domain containing 81</i>	-6,41	1,79E-05
<i>Trdn</i>	<i>Triadin</i>	-7,30	1,71E-05
<i>Ankrd55</i>	<i>ankyrin repeat domain 55</i>	-3,70	1,54E-05
AABR07040695.1	(nazwa niezidentyfikowana)	-6,32	1,90E-05
<i>Kcnk9</i>	<i>potassium two pore domain channel subfamily K member 9</i>	-3,07	1,54E-05
<i>Car10</i>	<i>carbonic anhydrase 10</i>	-2,90	1,98E-05
<i>Slc25a48</i>	<i>solute carrier family 25, member 48</i>	-6,30	1,37E-05
<i>Zfp791</i>	<i>zinc finger protein 791</i>	6,29	1,71E-05
<i>Wscd2</i>	<i>WSC domain containing 2</i>	-2,97	2,02E-05
<i>Syndig1l</i>	<i>synapse differentiation inducing 1-like</i>	-1,97	2,62E-05
<i>Xdh</i>	<i>xanthine dehydrogenase</i>	-5,93	3,43E-05
<i>Sstr3</i>	<i>somatostatin receptor 3</i>	-4,37	3,58E-05

Noxo1	<i>NADPH oxidase organizer 1</i>	-5,89	4,23E-05
Trpc4	<i>transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4</i>	-2,53	4,76E-05
B3galt5	<i>Beta-1,3-galactosyltransferase 5</i>	-4,87	5,05E-05
Clcc1	<i>chloride channel CLIC-like 1</i>	0,54	5,84E-05
Kndc1	<i>kinase non-catalytic C-lobe domain containing 1</i>	-1,81	6,35E-05
Lancl3	<i>LanC like 3</i>	-3,39	6,85E-05
Pla2g4e	<i>phospholipase A2, group IVE</i>	-2,14	7,09E-05
Gpr61	<i>G protein-coupled receptor 61</i>	-2,46	7,64E-05
Kcnab3	<i>potassium voltage-gated channel subfamily A regulatory beta subunit 3</i>	-5,57	7,60E-05
Wif1	<i>Wnt inhibitory factor 1</i>	-1,36	8,99E-05
Rtl3	<i>retrotransposon Gag like 3</i>	-6,64	9,32E-05
Kcnv1	<i>potassium voltage-gated channel modifier subfamily V member 1</i>	-2,17	0,000106045
Ackr1	<i>atypical chemokine receptor 1</i>	-1,56	0,000104137
Dleu7	<i>deleted in lymphocytic leukemia, 7</i>	-2,46	0,000103504
Aard	<i>alanine and arginine rich domain containing protein</i>	-2,86	0,000108797
Gpr83	<i>G protein-coupled receptor 83</i>	-3,21	0,000130989
Crb3	<i>crumbs cell polarity complex component 3</i>	-3,25	0,000130494
C1ql2	<i>complement C1q like 2</i>	-2,98	0,000129414
Gprin2	<i>G protein regulated inducer of neurite outgrowth 2</i>	1,82	0,000128499
Pcsk2	<i>proprotein convertase subtilisin/kexin type 2</i>	-1,81	0,000145894
Asic4	<i>acid sensing ion channel subunit family member 4</i>	-2,15	0,000150631
Kcnj9	<i>potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 9</i>	-1,44	0,000142251
Parl	<i>presenilin associated, rhomboid-like</i>	0,45	0,000148633
Spatc1l	<i>spermatogenesis and centriole associated 1-like</i>	-3,16	0,000139157
Dcaf12l1	<i>DDB1 and CUL4 associated factor 12-like 1</i>	-0,93	0,000156809

Tabela MD 3. Lista genów o zmienionym poziomie ekspresji ($p < 0,05$) 24 godziny po indukcji wyładowań epileptopodobnych w hodowli neuronów z nadekspresją Mbd3 (SYN-MBD3-GFP). Nazwy genów przedstawiono na podstawie bazy danych DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>, stan na dzień 03/11/2022).

Geny o obniżonym poziomie ekspresji 24 godziny po indukcji wyładowań epileptopodobnych			
Nazwa genu (skrót)	Pełna nazwa genu w języku angielskim	Krotność zmiany względem kontroli	Wartość p
<i>Tm6sf1</i>	<i>transmembrane 6 superfamily member 1</i>	-2,84	4,29e-06
<i>Foxc1</i>	<i>forkhead box C1</i>	-3,64	4,47e-06

Tabela MD 4. Lista genów zmieniających poziom ekspresji ($p < 0,05$) w hodowli pierwotnej neuronów korowych w warunkach fizjologicznych i po wywołaniu wyładowań epileptopodobnych po nadekspresji Mbd3 2, 6 i 24 godziny po wywołaniu wyładowań epileptopodobnych. Nazwy genów przedstawiono na podstawie bazy danych DAVID (<https://david.ncicrf.gov/tools.jsp>, stan na dzień 22/08/2022).

		Warunki fizjologiczne (+Mg ²⁺)		Warunki wywołujące wyładowania epileptopodobne (-Mg ²⁺)	
Nazwa genu (skrót)	Pełna nazwa genu w języku angielskim	Krotność zmiany względem kontroli	Wartość p	Krotność zmiany względem kontroli	Wartość p
2 godziny					
Cachd1	<i>cache domain containing 1</i>	0,81	0,0001	0,88	3,33E-05
Ccdc80	<i>coiled-coil domain containing 80</i>	1,47	9,09E-06	1,39	2,79E-05
Ephx1	<i>epoxide hydrolase 1</i>	1,49	2,80E-05	1,48	2,97E-05
Fbxo2	<i>F-box protein 2</i>	0,87	0,0001	1,09	1,38E-06
Gldc	<i>glycine decarboxylase</i>	1,49	1,12E-07	1,23	1,13E-05
Gsn	<i>Gelsolin</i>	0,89	0,0002	1,25	2,21E-07
Hapln3	<i>hyaluronan and proteoglycan link protein 3</i>	1,23	8,20E-05	1,32	2,86E-05
Igfbp2	<i>insulin-like growth factor binding protein 2</i>	1,11	0,0005	1,26	9,56E-05
Lamb2	<i>laminin subunit beta 2</i>	0,95	2,06E-05	0,84	0,0001
Mlc1	<i>modulator of VRAC current 1</i>	1,03	0,0001	1,11	4,29E-05
Msx1	<i>msh homeobox 1</i>	1,78	9,11E-07	1,54	2,20E-05
Notch3	<i>notch receptor 3</i>	1,68	1,91E-05	1,53	9,85E-05
Npepl1	<i>aminopeptidase-like 1</i>	1,07	2,51E-07	0,96	4,50E-06
Ntsr2	<i>neurotensin receptor 2</i>	1,24	4,53E-05	1,39	5,92E-06
Osgin1	<i>oxidative stress induced growth inhibitor 1</i>	1,35	6,61E-05	1,31	0,0001
Pbxip1	<i>PBX homeobox interacting protein 1</i>	1,25	2,15E-05	1,13	0,0001
Pltp	<i>phospholipid transfer protein</i>	1,45	3,87E-06	1,53	1,08E-06

Ptprv	<i>protein tyrosine phosphatase. receptor type. V</i>	1,52	0,0003	1,79	2,93E-05
Rab13	<i>RAB13. member RAS oncogene family</i>	1,24	2,77E-06	1,05	6,58E-05
Sirt2	<i>sirtuin 2</i>	0,51	0,0001	0,56	3,30E-05
Slc12a4	<i>solute carrier family 12 member 4</i>	0,86	1,65E-05	0,95	1,83E-06
Slc14a1	<i>solute carrier family 14 member 1</i>	1,86	2,93E-05	1,71	0,0001
Slc39a12	<i>solute carrier family 39 member 12</i>	1,47	0,0005	1,62	0,0001
Sparc	<i>secreted protein acidic and cysteine rich</i>	1,03	4,48E-05	1,09	1,53E-05
AABR07073181.1	(nazwa niezidentyfikowana)	0,97	0,0001	1,07	2,59E-05
6 godzin					
Nf2	<i>moesin-ezrin-radixin like (MERLIN) tumor suppressor</i>	-0,54	1,20E-06	-0,56	6,12E-07
Scube3	<i>signal peptide. CUB domain and EGF like domain containing 3</i>	2,22	4,75E-05	2,67	1,07E-06
24 godziny					
Nf2	<i>moesin-ezrin-radixin like (MERLIN) tumor suppressor</i>	-0,50	6,34E-06	-0,45	5,33E-05
Tcp11	<i>t-complex 11</i>	-4,99	3,11E-05	-6,14	2,51E-05
1110032F04Rik	(nazwa niezidentyfikowana)	-4,64	0,0002	-7,11	3,75E-07
Akr1b1	<i>aldo-keto reductase family 1 member B1</i>	1,19	0,002	0,87	0,03
Hopx	<i>HOP homeobox</i>	1,47	1,46E-05	1,42	2,83E-05
Scube3	<i>signal peptide. CUB domain and EGF like domain containing 3</i>	2,22	4,05E-05	2,71	5,96E-07

Tabela MD 5. Lista genów ze zmienionym poziomem ekspresji jedynie w hodowli pierwotnej neuronów korowych z nadekspresją Mbd3 po wywołaniu wyładowań epileptopodobnych w porównaniu do hodowli transfekowanych wirusem kontrolnym w tych samych warunkach. Ekspresję genów zbadano 2, 6 i 24 godziny po indukcji wyładowań epileptopodobnych ($p < 0,05$). Nazwy genów podano na podstawie bazy danych DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp> , stan na dzień 22/08/2022).

Nazwa genu (skrót)	Pełna nazwa genu w języku angielskim	Krotność zmiany względem kontroli	Wartość p
2 godziny			
Strbp	<i>spermatid perinuclear RNA binding protein</i>	-0,64	0,0001
ApoE	<i>apolipoprotein E</i>	1,16	9,99E-05
C1r	<i>complement C1r</i>	1,21	0,0001
Celsr1	<i>Cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 1</i>	1,24	0,0001
Ech1	<i>enoyl-CoA hydratase 1</i>	1,12	0,0001
Fgfr1	<i>Fibroblast growth factor receptor 1</i>	1,10	1,21E-06
Gse1	<i>Gse1 coiled-coil protein</i>	0,72	7,10E-05
Gstt3	<i>glutathione S-transferase, theta 3</i>	2,42	0,0001
Ifi27	<i>Interferon, alpha-inducible protein 27</i>	1,11	5,94E-05
Mmp2	<i>matrix metalloproteinase 2</i>	1,86	8,45E-05
Parvb	<i>parvin beta</i>	1,03	0,0001
Ptpn14	<i>protein tyrosine phosphatase. non-receptor type 14</i>	1,60	0,0001
Rfx2	<i>regulatory factor X2</i>	1,96	5,84E-05
Sil1	<i>SIL1 nucleotide exchange factor</i>	0,67	9,91E-05
Sod1	<i>superoxide dismutase 1</i>	0,58	9,44E-05
6 godzin			
-	-	-	-
24 godziny			
Cdca8	<i>cell division cycle associated 8</i>	-0,83	6,94E-06
Fbxo17	<i>F-box protein 17</i>	-5,78	1,86E-05
Kcnmb2	<i>potassium calcium-activated channel subfamily M regulatory beta subunit 2</i>	-5,91	5,05E-05

Loricrin	<i>loricrin cornified envelope precursor protein</i>	-2,14	3,05E-05
Tm6sf1	<i>transmembrane 6 superfamily member 1</i>	-2,54	4,65E-05
Ube2c	<i>ubiquitin-conjugating enzyme E2C</i>	-2,11	4,83E-06
Ca4	(nazwa niezidentyfikowana)	-3,57	4,04E-05
Fyn	<i>FYN proto-oncogene, Src family tyrosine kinase</i>	0,41	8,09E-06
Map4k2	<i>mitogen activated protein kinase kinase kinase kinase 2</i>	0,89	5,37E-05
Myh11	<i>myosin heavy chain 11</i>	1,17	2,45E-06
Pomt1	<i>protein-O-mannosyltransferase 1</i>	0,48	4,95E-06

Tabela MD 6. Lista genów dla wybranych skupień. Nazwy genów podano na podstawie bazy danych DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp> , stan na dzień 24/11/2022).

Nazwa genu (skrót)	Pełna nazwa genu w języku angielskim
Skupienie 2	
<i>Btbd16</i>	<i>BTB domain containing 16</i>
<i>Car10</i>	<i>carbonic anhydrase 10</i>
<i>Ccdc33</i>	<i>coiled-coil domain containing 33</i>
<i>Cntn4</i>	<i>contactin 4</i>
<i>Dleu7</i>	<i>deleted in lymphocytic leukemia, 7</i>
<i>Gpr85</i>	<i>G protein-coupled receptor 85</i>
<i>Grik3</i>	<i>glutamate ionotropic receptor kainate type subunit 3</i>
<i>Grm6</i>	<i>glutamate metabotropic receptor 6</i>
<i>Kcnj12</i>	<i>potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 12</i>
<i>Kcnj9</i>	<i>potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 9</i>
<i>Lancl3</i>	<i>zinc finger DHHC-type palmitoyltransferase 9</i>
<i>Mdp1</i>	<i>zinc finger translocation associated</i>
<i>Mtfp1</i>	<i>LanC like 3</i>
<i>Plcx3</i>	<i>magnesium-dependent phosphatase 1</i>
<i>Prokr2</i>	<i>mitochondrial fission process 1</i>
<i>Slc22a3</i>	<i>phosphatidylinositol-specific phospholipase C, X domain containing 3</i>
<i>Spatc1l</i>	<i>prokineticin receptor 2</i>
<i>Stpg3</i>	<i>solute carrier family 22 member 3</i>
<i>Trpc4</i>	<i>spermatogenesis and centriole associated 1-like</i>
<i>Trpc5</i>	<i>sperm-tail PG-rich repeat containing 3</i>
<i>Unc5a</i>	<i>transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4</i>
<i>Btbd16</i>	<i>transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 5</i>
<i>Car10</i>	<i>unc-5 netrin receptor A</i>
AABR07071765.1	(nazwa niezidentyfikowana)
Skupienie 3	
<i>Btk</i>	<i>Bruton tyrosine kinase</i>
<i>Gck</i>	<i>glucokinase</i>
<i>Klhl1</i>	<i>kelch-like family member 1</i>

1110032F04Rik	(nazwa niezidentyfikowana)
Skupienie 5	
Evpl	<i>envoplakin</i>
Galntl6	<i>polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 6</i>
Inha	<i>inhibin subunit alpha</i>
Mst1r	<i>macrophage stimulating 1 receptor</i>
Prrg3	<i>proline rich and Gla domain 3</i>
RGD1559747	<i>similar to Zinc finger and SCAN domain containing protein 2 (Zinc finger protein 29)</i>
Serpinf1	<i>serpin family F member 1</i>
Tmem150c	<i>transmembrane protein 150C</i>
AABR07045032.1	(nazwa niezidentyfikowana)
AC130970.1	(nazwa niezidentyfikowana)