

Dagmara Holm-Kaczmarek

**Rola białka ATRX w organizacji chromatyny
neuronów hipokampa mózgu szczura**

Praca doktorska
wykonana w Pracowni Neuromorfologii
Molekularnej i Systemowej oraz
w Pracowni Molekularnych Podstaw Ruchów
Komórkowych
Instytutu Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN

PROMOTORZY:

Dr hab. Adriana Magalska

Prof. dr hab. Maria Jolanta Rędownicz

Warszawa, 2023

Chciałabym podziękować...

Wszystkim osobom, które pomogły przy powstawaniu tej pracy i towarzyszyły mi w wędrówce przez studia doktoranckie.

Promotor dr hab. Adrianie Magalskiej za wiedzę i wskazówki.

Promotor prof. dr hab. Jolancie Rędowicz, za nieocenioną życzliwą pomoc, mentorskie wsparcie, poświęcony czas i zaangażowanie.

Świętej Pamięci Prof. Grzegorzowi Wilczyńskiemu (Grzesiowi), za jego wiarę w moje możliwości, dzięki której rozpoczęłam naukową przygodę, inspirujące dyskusje i serdeczność.

Wszystkim Koleżankom i Kolegom z byłej Pracowni Neuromorfologii Molekularnej i Systemowej a w szczególności Ani Skupień-Jaroszek i Asi Dzwonek za wspaniałą atmosferę pracy i ciekawe rozmowy.

Wszystkim Koleżankom z Pracowni Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych, za życzliwość, interesujące dyskusje i wsparcie.

Wszystkim osobom, które udzieliły mi rad i wskazówek merytorycznych oraz edytorskich, zwłaszcza prof. Annie Filipek oraz dr hab. Ewie Kublik.

Dziękuję również Rodzicom, za dzieciństwo wypełnione beztruską zabawą, trud włożony w moje wychowanie i edukację oraz wsparcie w dorosłym życiu.

Niniejszą pracę dedykuję ...

*brązowookiej dziewczynce i zielonookiej dziewczynce,
dziękując za świat cudów i możliwości, który dzięki nim oglądam.*

Streszczenie

Białko ATRX (ang. *alpha thalassemia mental retardation syndrome X-linked*) jest ważnym białkiem utrzymującym strukturę chromatyny o właściwościach helikazy. Występuje w różnych typach komórek i tkanek ssaków, a jego obecność wydaje się być szczególnie istotna w tkance nerwowej, gdyż mutacje w genie *ATRX* prowadzą do wystąpienia zespołu ATRX charakteryzującego się m.in. opóźnieniem umysłowym. Mimo tych obserwacji funkcja białka ATRX w neuronach jest wciąż mało poznana. Dane literaturowe sugerują, że głównym zadaniem tego białka jest uczestnictwo w przebudowie chromatyny i wyciszaniu sekwencji DNA. Jednak istnieją również doniesienia wskazujące na jego rolę w aktywacji ekspresji genów, co świadczy o jego ważnej, lecz niejednoznacznej roli.

Moje wstępne badania dotyczące występowania białka ATRX w neuronach hipokampa potwierdziły jego lokalizację w skondensowanych regionach DNA. W związku z tym, celem niniejszej rozprawy było określenie lokalizacji i roli białka ATRX w jądrze komórkowym neuronów w stanie spoczynkowym i po pobudzeniu. Cel ten realizowałam z wykorzystaniem pierwotnej hodowli neuronów hipokampalnych poddanych procedurze chemicznego wywoływania długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (cLTP). Analiza lokalizacji białka ATRX w jądrze neuronów wykazała, że w stanie spoczynkowym ATRX lokalizuje przy chromatynie, kolokalizując z chromocentrami, natomiast po wywołaniu cLTP towarzyszy zmianom w organizacji chromatyny otaczając jej skupienia, bądź kolokalizując z nimi, a także ze znacznikami euchromatyny, co wskazuje na dwojaką rolę ATRX w neuronach. Natomiast wyciszenie *Atrx* w neuronach prowadzi do zmian w organizacji chromatyny manifestujących się wzmożoną kondensacją chromatyny, czemu towarzyszą zmiany we wzorcu potranslacyjnych modyfikacji histonów. Ponadto zidentyfikowałam nową strukturę jąderkową złożoną z białka ATRX, które jest konieczne do jej utrzymania. Wykazałam również, że wyciszenie *Atrx* skutkuje zmianami funkcjonalnymi w neuronach, czego odzwierciedleniem są zmiany w morfologii drzewek dendrytycznych, które stają się mniejsze i mniej rozłożyste.

Podsumowując, uzyskane przeze mnie wyniki wskazują, iż białko ATRX odgrywa w neuronach ważną rolę w organizacji chromatyny oraz struktur jąderkowych, a możliwa zależność między strukturą chromatyny a morfologią komórki wymaga dalszych badań.

Summary

The ATRX (alpha thalassemia mental retardation syndrome X-linked) protein is an important protein that maintains chromatin structure with helicase properties. Its presence appears to be particularly important in neural tissue, as mutations in the *Atrx* gene lead to alpha thalassemia mental retardation syndrome X-linked (ATRAX) characterized by, among other things, mental retardation. Despite these observations, the function of the ATRX protein in neurons is still poorly understood. Literature data suggest that the main function of this protein is participation in chromatin remodeling and DNA sequence silencing. However, there are also reports indicating its role in the activation of gene expression, demonstrating its important but ambiguous role.

My preliminary studies on the occurrence of ATRX protein in hippocampal neurons confirmed its localization in condensed DNA regions. Therefore, the purpose of this dissertation was to determine the localization and role of the ATRX protein in the cell nucleus of neurons in the resting state and after stimulation. I pursued this goal using primary culture of hippocampal neurons subjected to a procedure for chemically inducing long term potentiation (cLTP). Analysis of the ATRX protein localization in the nucleus of neurons showed that in the resting state ATRX localizes at chromatin, colocalizing with chromocenters, while after cLTP evoking it accompanies changes in chromatin organization by surrounding chromatin clusters or colocalizing with them as well as with euchromatin markers, indicating an ambiguous role for ATRX in neurons. In contrast, silencing of *Atrx* in neurons leads to changes in chromatin organization manifested by increased chromatin condensation, accompanied by changes in the pattern of post-translational modifications of histones. In addition, I identified a new nucleolar structure composed of the ATRX protein, which is required for its maintenance. I also showed that silencing of *Atrx* results in functional changes in neurons, as reflected by changes in the morphology of dendritic trees, which become smaller and less spread out.

In conclusion, my results indicate that ATRX protein plays an important role in neurons in the organization of chromatin and nucleolar structures, and the possible relationship between chromatin structure and cell morphology requires further research.

Spis treści

Streszczenie	5
Summary	6
Wykaz skrótów	10
1. Wstęp	12
1.1 Budowa neuronu	13
1.2 Plastyczność.....	15
1.3 Jądro komórkowe.....	18
1.4 Jąderko	22
1.4.1 Charakterystyka wybranych białek jąderkowych	25
1.4.2 Stres jąderkowy.....	26
1.4.3 Jąderko komórek nerwowych	27
1.5 Mechanizmy kontrolujące strukturę chromatyny	28
1.5.1 Modyfikacje DNA	29
1.5.2 Warianty i modyfikacje potranslacyjne histonów	29
1.5.3 Kompleksy przebudowujące chromatynę	31
1.6 ATRX helikaza zależna od ATP	32
1.6.1 Budowa białka ATRX	33
1.6.2 Funkcje białka ATRX.....	34
1.6.3 Zespół ATRX.....	35
2. Założenia i cele pracy	37
3. Materiały	38
3.1 Odczynniki chemiczne.....	38
3.2 Materiał zwierzęcy do wyprowadzania hodowli neuronalnych	39
3.3 Odczynniki używane do przygotowania pożywek hodowlanych.....	39
3.4 Najczęściej stosowane roztwory	41
3.5 Materiały użyte na potrzeby hodowli bakteryjnych	42
3.6 Roztwory wykorzystane do pomiarów elektrofizjologicznych	42
3.7 Zestawy i materiały stosowane w metodach biologii molekularnej	43
3.8 Odczynniki stosowane w technikach immunocytochemicznych.....	43
3.9 Substancje biologicznie czynne	45
3.10 Wektor plazmidowy.....	45
4. Metodologia	47
4.1 Hodowla pierwotna neuronów hipokampa	47
4.1.1 Przygotowanie szkiełek nakrywkowych.....	47
4.1.2 Izolacja hipokampa i zakładanie hodowli hipokampalnej <i>in vitro</i>	47
4.1.3 Wysiewanie komórek oraz warunki hodowli	48

4.2	Transfekcja neuronów hipokampalnych metodą lipofekcji	48
4.3	Organotypowe hodowle skrawków hipokampalnych	49
4.4	Elektrofizjologia techniką <i>whole-cell patch-clamp</i>	49
4.5	Transdukcja wektorem wirusowym	50
4.6	Pobudzenie neuronów cLTP	50
4.7	Odpłukiwanie mieszaniny cLTP	51
4.8	Utrwalanie komórek	51
4.9	Barwienie immunofluorescencyjne	51
4.10	Indukcja stresu jąderkowego	52
4.11	Analiza struktury jąderkowych ciałek ATRX	52
4.12	Hodowle bakterii	53
4.12.1	Warunki hodowli bakterii.....	53
4.12.2	Produkcja i izolacja bakterii	53
4.13	Izolacja plazmidowego DNA	53
4.14	Przygotowanie ekstraktów białkowych z hodowli komórkowych i oznaczanie stężenia białka	53
4.15	Technika Western Blot.....	54
4.15.1	Elektroforeza białek w warunkach denaturujących	54
4.15.2	Immunodetekcja	55
4.16	Zbieranie i analiza obrazów mikroskopowych.....	55
4.16.1	Mikroskopia fluorescencyjna	55
4.16.2	Mikroskopia konfokalna	56
4.17	Analiza obrazów.....	56
4.17.1	Analiza w programie ImageJ.....	57
4.17.1.1	Pomiar intensywności sygnału fluorescencji w programie ImageJ	57
4.17.2	Analiza w programie PartSeg.....	58
4.18	Analiza statystyczna wyników	58
5.	Wyniki	59
5.1	Lokalizacja białka ATRX w neuronach hipokampalnych szczura	59
5.1.1	Lokalizacja białka ATRX w niepobudzonych neuronach hipokampalnych szczura.....	59
5.1.2	Lokalizacja białka ATRX w jądrach pobudzonych neuronów hipokampalnych szczura w modelu chemicznie wywołwanego LTP.....	60
5.3	Potwierdzenie zaistnienia pobudzenia chemicznego LTP	62
5.3.1	Rejestracja miniaturowych prądów postsynaptycznych (mEPSC)	62
5.3.2	Analiza poziomu białka cFOS w pobudzeniu c LTP	63
5.3.3	Analiza odwracalności skutków cLTP	63

5.4 Kolokalizacja ATRX z markerami modyfikacji histonów w jądrze neuronów hipokampalnych.....	66
5.4.1 Heterochromatyna konstytutywna	66
5.4.2 Chromatyna nieaktywna transkrypcyjnie	67
5.4.3 Chromatyna aktywna transkrypcyjnie	68
5.4.4 Kolokalizacja ATRX z markerem przestrzeni interchromatynowej.....	69
5.5 Białko ATRX w jąderku neuronów	70
5.5.1 Identyfikacja jąderkowego ciała zawierającego ATRX	70
5.6 Współwystępowanie białka ATRX w jądrze z jego partnerami – CTCF i DAXX	74
5.6.1 Analiza współwystępowania ATRX z CTCF	75
5.6.2 Analiza kolokalizacji ATRX z DAXX	76
5.6.3 Obecność jąderkowych ciałek ATRX w skrawkach mózgu myszy i szczura oraz w mysiej hodowli i linii komórkowej	77
5.7 Wpływ wyciszenia <i>Atrx</i> na organizację chromatyny w jądrach neuronów	79
5.7.1 Zmiany w organizacji chromatyny	80
5.7.2 Analiza przestrzenna (3D) upakowania chromatyny w jądrach neuronów hipokampalnych z wyciszonym <i>Atrx</i>	82
.....	84
5.7.3 Poziom białka cFOS po wyciszeniu <i>Atrx</i>	84
5.7.4 Wpływ wyciszenia ATRX na potranslacyjne modyfikacje histonów	85
5.7.5 Wpływ wyciszenia <i>Atrx</i> na obecność jąderkowych ciałek ATRX	87
5.10 Wpływ stresu jąderkowego na lokalizację ATRX w jąderku.....	88
5.10.1 Zahamowanie aktywności polimerazy RNA I.....	88
5.10.2 Wpływ zahamowania dojrzewania rRNA za pomocą 5-fluorouracylu na ATRX w jąderku.....	92
5.10.3 Wpływ rozbicia wiązań hydrofobowych na ciała ATRX.....	93
5.11 Wpływ wyciszenia <i>Atrx</i> na morfologię drzewek dendrytycznych	94
6. Dyskusja.....	98
6.1 Rola białka ATRX w neuronach.....	99
6.2 Białko ATRX a pobudzenie cLTP	101
6.3 Funkcje białka ATRX w jąderku neuronów	104
6.4 Białko ATRX a morfologia drzewka dendrytycznego	106
6.5 Podsumowanie	108
7. Podsumowanie i wnioski	109
8. Bibliografia	110
Spis publikacji doktorantki i doniesienia zjazdowe.....	119

Wykaz skrótów

ACSF	ang. <i>artificial cerebrospinal fluid</i> , sztuczny płyn mózgowo-rdzeniowy
AMP	ang. <i>adenosine 5'-monophosphate</i> , adenozymonofosforan
AMPA	ang. <i>α-amino-3-hydroksy-5-metylo-4-isoxazolepropionian</i> , kwas α-amino-3- hydroksy-5-metylo-4-izooksazolopropionowy
AraC	arabinozyd cytozyny, cytostatyk
ATP	adenozyno-5'-trifosforan
ATRX	ang. <i>alpha thalassemia mental retardation syndrome X-linked</i> , helikaza zależna od ATP
B23	białko jąderkowe GC, zwane również nukleofosminą (NMP1)
BSA	ang. <i>bovine serum</i> , albumina z bydlęcej surowicy
BRG1	ang. <i>Brahma-related gene-1</i> , aktywator transkrypcji, znany również pod nazwą SMARCA4
BDNF	ang. <i>Brain derived neurotrophic factor</i> , neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego
CamK II	ang. <i>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II</i> , kinaza białkowa II zależna od Ca ²⁺ i kalmoduliny
cAMP	cykliczny adenozyno-3',5'-monofosforan
cFOS	ang. <i>cellular Finkel-Biskis-Jinkismurine osteosarcoma protooncogene</i> , czynnik transkrypcyjny należący do genów wczesnej odpowiedzi
cLTP	chemiczne długotrwałe wzmocnienie synaptyczne
CNS	ang. <i>central nervous system</i> , ośrodkowy układ nerwowy
CTCF	ang. <i>CCCTC-binding factor</i> , białko strukturalne chromatyny wiążące się z genomową sekwencją CCCTC
DIV	ang. <i>Day in vitro</i> , dzień hodowli <i>in vitro</i>
DMSO	ang. <i>dimethyl sulfoxide</i> , dwumetylosulfotlenek
DNA	ang. <i>deoxyribonucleic acid</i> , kwas deoksyrybonukleinowy
DRB	ang. <i>5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole</i> , 5,6-dichloro-1-β-D-rybofuranosylobenzimidazol, inhibitor transkrypcji zależnej od RNA polimerazy II
DAXX	ang. <i>Death Domain Associated Protein</i> , białko wiążące domenę śmierci
DMEM	ang. <i>Dublecco's Modified Eagle Medium</i> , podłoże hodowlane
FBS	ang. <i>Fetal Bovine Serum</i> , płodowa surowica bydlęca
5-FU	5-fluorouracyl, inhibitor dojrzewania RNA
GABA	kwas gamma-aminomasłowy
GAPDH	ang. <i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> , dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego
GFP	ang. <i>Green fluorescent protein</i> , białko zielonej fluorescencji
HAT	ang. <i>histone acetyltransferaze</i> , acetylotransferaza histonowa
HEPES	kwas hydroksyetylodietylenodiaminoetanolosulfonowy

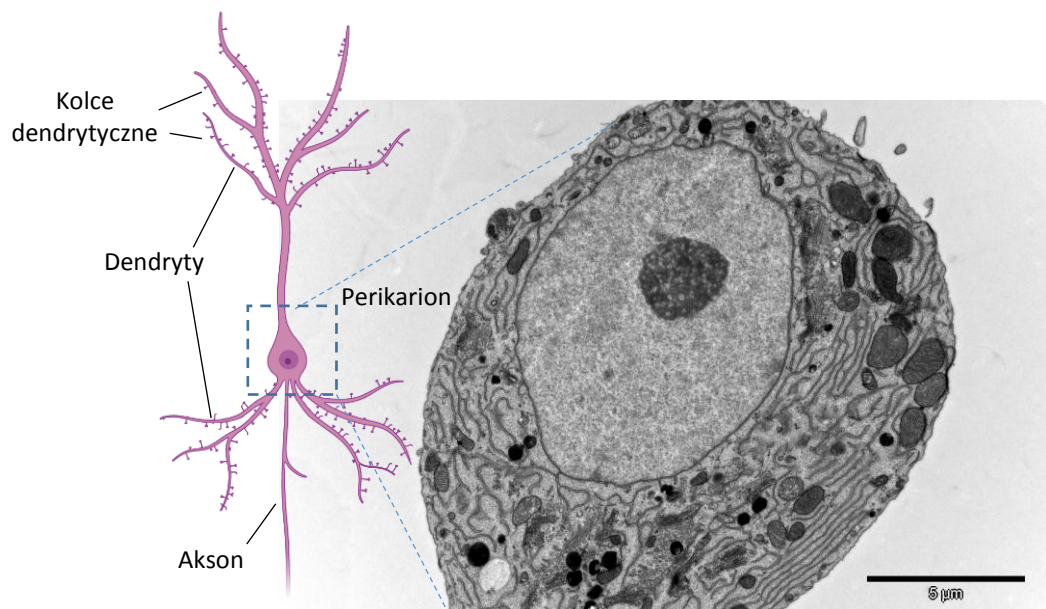
HMT	ang. <i>histone methyl transpherase</i> , metylotransferaza histonowa
HP1	ang. <i>heterochromatin protein 1</i> , białko oddziałujące z heterochromatyną
LB	ang. <i>Luria Bertani</i> , pożywka do mikrobiologicznej hodowli bakterii
LTD	ang. <i>long term depression</i> , długotrwałe osłabienie synaptyczne
LTP	ang. <i>long term potentiation</i> długotrwałe wzmocnienie synaptyczne
m. cz.	masa cząsteczkowa
mEPSC	ang. <i>miniature excitatory postsynaptic currents</i> , miniaturowe pobudzające prądy postsynaptyczne
MECP2	ang. <i>methyl CpG binding protein 2</i> , białko wiążące się ze zmetylowanym DNA, inhibitor transkrypcji
MEM	ang. <i>minimum essential medium</i> , minimalna pożywka hodowlana
NMDA	N-metylo-d-asparaginin
NOR	ang. <i>nucleolar organizer region</i> , obszar jąderkotwórczy
PABPN1	ang. <i>poly(A) binding protein nuclear 1</i> , czynniki dojrzewania końca 3' RNA
PBS	ang. <i>phosphate-buffered saline</i> , roztwór soli fizjologicznej buforowanej jonami fosforanowymi
PDL	ang. <i>poly-D-lysine</i> , poli-D-lizyna
PKA	ang. <i>cAMP dependent protein kinase</i> , kinaza zależna od cAMP
PML	ang. <i>promyelocytic leukaemia bodies</i> , ciała białaczki promielocytowej
RNA	ang. <i>ribonucleic acid</i> , kwas rybonukleinowy
rpm	ang. <i>revolutions per minute</i> , obroty na minutę
SEM	ang. <i>standard error of the mean</i> , błąd standardowy średniej
shRNA	ang. <i>short hairpin RNA</i> , krótkie RNA o strukturze spinki do włosów
TAD	ang. <i>topologically associating domains</i> , topologicznie związane domeny

1. Wstęp

Pamięć oraz uczenie się odgrywają kluczową rolę w naszym życiu. Pozwalają nam na zbudowanie wiedzy opartej na faktach, zasadach, umiejętnościach, ale także przekonaniach i informacjach o doświadczeniach osobistych, które są centrum naszego poczucia siebie jako jednostki. Zdolność uczenia się oraz zapamiętywania jest niezmiernie interesującą dziedziną badań, ale jednocześnie najbardziej zagadkowym zjawiskiem (Janiszewski, 1993). Możliwość uczenia się zawdzięczamy plastycznym właściwościom układu nerwowego, czyli umiejętności tworzenia i przechowywania śladu pamięciowego (Konturek, 1998). Według obecnej wiedzy neuroplastyczność odnosi się do zmian w liczbie i sile połączeń synaptycznych, które powstają w odpowiedzi na nowe doświadczenia w zmieniającym się otoczeniu. Tkanka nerwowa, z której zbudowany jest ośrodkowy układ nerwowy utworzona jest głównie przez neurony oraz komórki glejowe. Te dwa typy komórek pomimo licznych różnic morfologicznych i funkcjonalnych są silnie uzależnione od wzajemnych oddziaływań między sobą oraz naczyniami krwionośnymi. W klasycznym ujęciu to neuron jest podstawową jednostką strukturalną i czynnościową ośrodkowego układu nerwowego. Neurony charakteryzują się zdolnością reagowania stanem czynnościowym (impulsem) na pobudzenie i możliwością przewodzenia tego stanu na inne neurony. Struktura neuronów została zobrazowana po raz pierwszy w 1873 roku, kiedy to włoski neurobiolog Camillo Golgi opracował metodę barwienia preparatów histologicznych. Od tamtej pory drzwi do rozwoju badań nad neuronami stanęły przed badaczami otworem; 15 lat później Santiago Ramon y Cajal, hiszpański neurobiolog, udoskonalił metodę barwienia Golgiego, dzięki czemu mógł jeszcze lepiej opisać neuronalną architekturę. Ten hiszpański anatom zdefiniował takie pojęcia, jak dendryty, ciało komórki czy akson. Dokonał również obserwacji, iż kształt neuronów i ich rozmiar zależne są od ich położenia oraz roli, jaką spełniają w układzie nerwowym. Zarówno Ramon y Cajal, jak i Golgi za wkład w rozwój fizjologii i medycyny zostali uhonorowani Nagrodą Nobla w 1906 roku (De Carlos i Borrell, 2007; de Castro i in., 2007). Prace Ramona y Cajala zapoczątkowały trend w badaniach nad dokładniejszym poznaniem typów komórek neuronalnych oraz ich połączeń.

1.1 Budowa neuronu

Pod wieloma względami ciało komórki nerwowej (zwane perikarionem) niczym nie różni się od typowej komórki zwierzęcej – otoczone jest podwójną błoną fosfolipidową, zawiera jądro, aparat Golgiego, rybosomy, mitochondria, siateczkę śródplazmatyczną (Ryc 1.1). Jednak strukturalnie perikarion neuronu jest wyspecjalizowany w utrzymaniu dużej aktywności biosyntetycznej (Longstaff, 2011). Przykładem jest szorstkie retikulum endoplazmatyczne, które zawiera tak wiele rybosomów, iż tworzy charakterystyczne struktury zwane ciałkami Nissla. Kolejną cechą odróżniającą neuron od typowej komórki nienerwowej jest obecność wypustek - dendrytów oraz aksonu. Dendryty są silnie rozgałęzionymi przedłużeniami ciała komórki, tworzącymi tzw. drzewko dendrytyczne, a ich szczególną cechą oprócz tworzenia wielu rozgałęzień jest obecność na ich końcach licznych kolców dendrytycznych. Kolce dendrytyczne to wypustki błony podlegające plastycznym zmianom i charakteryzujące się mnogością kształtów. W odróżnieniu od dendrytów neurony posiadają tylko jeden akson, który bierze swój początek we wzgórku aksonalnym. Podobnie jak dendryty, akson zakończony jest licznymi rozgałęzieniami, tworzącymi końcowe kolaterale.



Rycina 1.1. Schematyczna budowa neuronu. Charakterystyczna budowa komórki neuronalnej cechuje się obecnością długich wypustek neuronalnych (akson i dendryty). Wnętrze ciała komórki wypełniają struktury typowe dla komórek eukariotycznych. Rycina na podstawie własnych obrazów mikroskopii elektronowej oraz grafiki neuronu nasysowanej w BioRender.

Fundamentalnym zadaniem neuronów jest otrzymywanie, przetworzenie i transmisja sygnału (Alberts, 2008). Dzięki obecności aksonów i dendrytów komórki nerwowe łączą się w sieć neuronalną, przekazują i integrują informacje w układzie nerwowym w postaci impulsów nerwowych (potencjałów czynnościowych). Impulsy te przekazywane są w jednym kierunku: dendryty odbierając sygnał przekazują go do ciała komórki, skąd propagowany jest do aksonów i presynaptycznych zakończeń, które przekazują sygnał dalej.

Obecnie przyjęta teoria neuronalna zakłada, że neurony stanowią odrębne elementy strukturalne - pomiędzy nimi nie ma bezpośredniej łączności, a między wypustkami istnieje niewielka przerwa – synapsa. Synapsy są wyspecjalizowanymi domenami błony komórkowej, będącymi miejscami kontaktu i komunikacji między neuronami (Yamada i Nelson, 2007). Typowa synapsa składa się z domen pre- i postsynaptycznych oddzielonych od siebie szczeliną synaptyczną. Synapsy różnią się mechanizmem przekazywania impulsu nerwowego, dzieli się na synapsy elektryczne oraz chemiczne (Alcamí i Pereda, 2019). O ile w synapsach elektrycznych impuls przekazywany jest bezpośrednio między komórkami, to w synapsach chemicznych sygnał przekazywany jest za pomocą neurotransmiterów, wydzielanych przez błonę presynaptyczną do szczeliny synaptycznej, wskutek potencjału czynnościowego. Pod wpływem działania neuroprzekaźnika na obecne w części postsynaptycznej receptory powstaje pobudzeniowy lub hamujący potencjał synaptyczny. Jeśli będzie wystarczająco duży, lub jeśli zsumuje się aktywność wielu synaps, to w ciele neuronu powstanie potencjał czynnościowy. To ile synaps i synaptycznych połączeń znajduje się w danej komórce zależy w dużej mierze od wielkości i rozłożystości drzewka dendrytycznego komórki nerwowej. Liczne rozgałęzienia aksonów i dendrytów umożliwiają neuronom tworzenie złożonych sieci sygnalizacyjnych, dochodzi do interakcji z wieloma innymi komórkami jednocześnie.

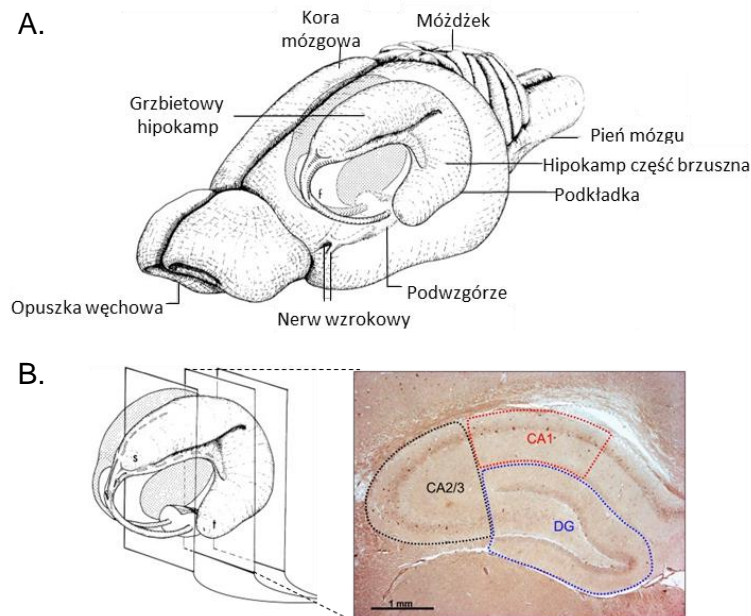
Drzewko dendrytyczne zbudowane z wielu mniejszych rozgałęzień utworzonych od jednego głównego dendrytu. Szerokość dendrytów zmniejsza się wraz z odległością od ciała komórki, natomiast szerokość aksonów jest stała. Udowodniono, iż patologiczne zmiany w morfologii drzewka dendrytycznego lub kolców dendrytycznych, są przyczyną wielu zaburzeń neurologicznych takich, jak autyzm, choroba Alzheimera, schizofrenia, czy zespół łamliwego chromosomu X (Kaufmann i Moser, 2000). Pokazano również, iż do zmian w morfologii drzewek dendrytycznych może dochodzić wskutek chronicznego stresu, co prowadzi do depresji (Eiland i in., 2012). Liczne badania, mające

na celu poznanie mechanizmów rozwoju neuronu możliwe są dzięki hodowli neuronów *in vitro*. Neurony pierwotnej hodowli *in vitro* wykształcają dendryty i aksony oraz charakteryzują się ekspresją tych samych białek znacznikowych, co komórki nerwowe *in vivo*, a badania nad nimi pozwoliły na identyfikację kluczowych czynników molekularnych odpowiedzialnych za polaryzację neuronu. Rozwój drzewka dendrytycznego jest skomplikowanym i wieloetapowym procesem, w którym wyróżnić można następujące fazy: inicjację i wzrost neurytów, różnicowanie dendrytów, tworzenie rozgałęzień dendrytów i formowanie synaps oraz stabilizację drzewka dendrytycznego. Poza programem genetycznym na kształt drzewka dendrytycznego i kolców dendrytycznych mają wpływ sygnały zewnątrzkomórkowe np. BDNF (ang. *brain-derived neurotrophic factor*) (Urbanska i in., 2008), który jest jak do tej pory jednym z najlepiej zbadanych czynników wzrostu. Dowiedziono, iż BDNF jest niezbędny w procesach wzrostu i rozgałęziania drzewka dendrytycznego, a badania z podawaniem czynnika BDNF w neuronach piramidowych *in vitro* wykazały wzrost liczby dendrytów (Horch i Katz, 2002). Zmiana siły połączeń międzyneuronalnych, czyli zmiana siły i liczby połączeń synaptycznych leży u podstaw zmian plastycznych.

1.2 Plastyczność

Pamięć i inne rodzaje długoterminowych zmian adaptacyjnych w mózgu zależą od plastyczności komunikacji neuronalnej, w tym mechanizmów plastyczności synaptycznej (Bramham, 2010). Pojęcie plastyczności sformułował po raz pierwszy Jerzy Konorski (Konorski, 1948). Zdefiniował je jako trwałe przekształcenia funkcjonalne w wyniku określonych bodźców lub ich kombinacji w określonych układach neuronów. Jednak dopiero kilka lat później udało się poznać mechanizmy plastyczności synaptycznej – długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (LTP) oraz długotrwałe osłabienie synaptyczne (LTD). W 1973 roku Tim Bliss oraz Terje Lomo opisali zjawisko LTP w hipokampie królika (Bliss i Lomo, 1973). Zauważyli, że kilkukrotne pobudzenie włókien kory węchowej królika bodźcami elektrycznymi powoduje wzrost reaktywności pobudzanej drogi nerwowej – uzyskali wzmocnienie wyładowań grupowych. Wzrost ten utrzymywał się przez kilka kolejnych godzin, a LTP zostało uznane za model procesów zachodzących podczas powstawania śladu pamięciowego (Kossut, 2019) i stało się najczęściej stosowanym modelem w badaniach nad pamięcią. Na nasze współczesne rozumienie podstaw pamięci bardzo duży wpływ miały badania z udziałem osoby –

znanej jako pacjent H.M. Mężczyzna ten utracił zdolność do tworzenia nowych wspomnień po chirurgicznym usunięciu dużej części obu płatów skroniowych, w tym hipokampa. Dzięki tym badaniom, a po nich wielu innym, wiemy że hipokamp jest strukturą szczególnie zaangażowaną w konsolidację nowo tworzonej pamięci epizodycznej w pamięć długotrwałą.



Rycina 1.2. Schemat budowy szczurzego hipokampa. A. Schemat mózgu szczura przedstawiający główne struktury mózgu, w tym hipokampa. B. Rycina przedstawia przekroje koronalne lewego hipokampa, na prawo obraz przykładowego przekroju z zaznaczonymi polami hipokampa (CA1, CA2, CA3, DG). Rycina na podstawie Selakovic i in., 2019, zmieniona oraz Cheung i Cardinal, 2005, zmieniona.

Formacja hipokampalna znajduje się głęboko we wnętrzu mózgu, po wewnętrznej stronie płata skroniowego (Duvernoy, 2005) i jest strukturą parzystą o kształcie zbliżonym do kształtu konika morskiego (stąd też jego nazwa, która z greki oznacza konika morskiego). Należy do starej kory mózgu (*archicortex*) i jest jedną z najstarszych filogenetycznie struktur mózgu. Jest też częścią układu limbicznego, który odpowiedzialny jest przede wszystkim za regulację zachowań emocjonalnych, a także stanów emocjonalnych takich, jak odczuwanie zadowolenia, przyjemności, strachu czy motywacji. Formacja hipokampalna charakteryzuje się budową wielowarstwową, w jej strukturze można wyróżnić następujące główne regiony: zakręt zębata (*gyrus dentatus*), róg Ammona (*cornus Ammonis*), podkładka (*subiculum*) przechodząca następnie w korę śródwęchową oraz hipokamp właściwy składający się z pól CA1, CA2, CA3, CA4 (Ryc. 1.2). W podstawowym obiegu informacji impulsy, które dochodzą z kory mózgowej do kory śródwęchowej zostają przekazane do zakrętu zębatego, który

następnie wysyła projekcje do pola CA3, a stamtąd do obszaru CA1. Z kolei CA1 wysyła projekcje do podpory hipokampa, regionu pośredniczącego w przepływie informacji z hipokampa do innych struktur mózgowia (Mierzejewski, Kostowski 2002). Hipokamp jest strukturą odpowiadającą za konsolidację pamięci epizodycznej w pamięć długotrwałą. Istnienie pamięci, której trwałość jest ograniczona jest koniecznym elementem do „buforowania” nadchodzących informacji i pozwala na dokładne zakodowanie w korze mózgowej bez interferencji z poprzednimi wspomnieniami (Gluck, 1997). Dowodem na rolę hipokampa w procesie zapamiętywania jest przerwanie połączeń korowo-podkorowych, spowodowane obustronnym usunięciem formacji hipokampa. Taki defekt u ludzi uniemożliwia wprowadzanie informacji do pamięci długotrwałej. Proces długotrwałego zapamiętywania pozostawia trwałe ślady pamięciowe, tzw. engramy w neuronach. Obecnie istnieje kilka hipotez mechanizmów pamięci długotrwałej, dotyczą one zwiększenia liczby nowopowstających synaps w sieciach neuronalnych oraz zmian w metabolizmie komórkowym – wzmożonej syntezy RNA i produkcji białek.

Plastyczność synaptyczna odnosi się do biochemicznych zmian, jakie zachodzą w synapsach na skutek pobudzenia. Na skutek bodźca środowiskowego dochodzi do powstania potencjału czynnościowego, który prowadzi do napływu jonów w części presynaptycznej, co powoduje uwolnienie cząsteczek neuroprzekaźnika do szczeliny synaptycznej. Cząsteczki te wiążą się z receptorami AMPA, znajdującymi się na błonie postsynaptycznej co powoduje otwarcie kanałów dla jonów sodu i podnosi potencjał neuronu. Kiedy potencjał wzrośnie na tyle, by przekroczyć próg pobudzenia dochodzi do depolaryzacji błony komórkowej. W warunkach, w których pojawia się dłuższa depolaryzacja wywołana silnym, tężcowym bodźcem, aktywacja receptorów glutaminianergicznych typu NMDA (dla N-metylo-D-asparagianu) prowadzi do zniesienia blokującego wpływu jonów magnezu i masywnego napływu jonów wapnia przez kanały jonowe w tych receptorach (Biała, 2007). Dokomórkowy napływ jonów wapnia poprzez kanały NMDA pełni kluczową rolę w indukcji LTP. Wzrastające wewnątrzkomórkowe stężenie jonów wapnia aktywuje kinazy białkowe takie jak zależna od wapnia i kalmoduliny kinaza typu II (ang. *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinaseII*, CaMKII) czy kinaza białkowa C (ang. *protein kinase C*, PKC), co prowadzi do fosforylacji receptorów AMPA (Byrne, 2008) oraz NMDA prowadząc do utrwalenia połączeń między neuronami i zwiększenia ich pobudliwości. Fosforylacji ulegają również czynniki transkrypcyjne takie, jak CREB (ang. *cAMP response element binding protein*),

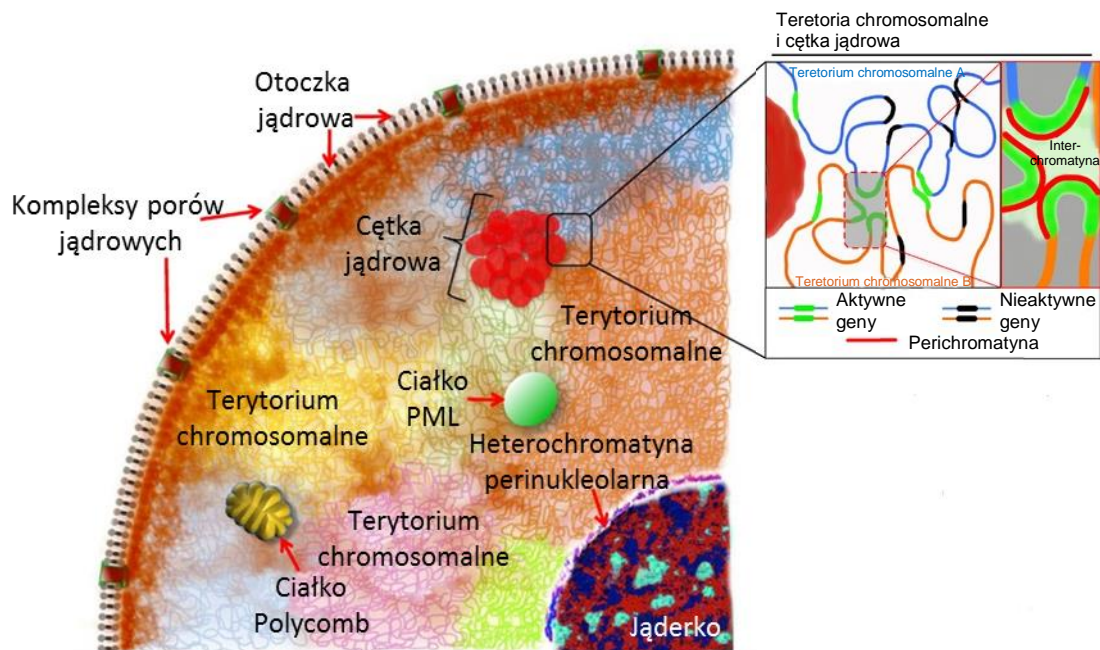
c-Fos i Jun-B, które wpływają na ekspresję genów, wiążąc się ze swoistymi sekwencjami DNA regulując w ten sposób transkrypcję. Początkowy etap LTP (nazywany wczesnym – ang. *early LTP*) jest niezależny od syntezy białek i można utożsamiać go z pamięcią krótkotrwałą (Rodrigues i in., 2004). W późnej fazie LTP (ang. *late LTP*) wysokie wewnątrzkomórkowe stężenie jonów wapnia aktywuje cyklazę adenylanową, co zwiększa stężenie cyklicznego adenozylo-3',5'-monofosforanu (cAMP). cAMP aktywuje kinazę białkową A (PKA), co powoduje fosforylację białka CREB. Następuje inicjacja transkrypcji, a to skutkuje ekspresją genów i syntezą nowych białek, które potrzebne są m.in. do przebudowy synaps (Rodrigues i in., 2004). Przeciwnie do LTP, proces długotrwałego osłabienia synaptycznego (LTD) powstaje wskutek wolniejszej depolaryzacji wywołanej słabszym bodźcem (Byrne, 2009). Wiąże się to ze słabszym napływem jonów wapnia, co aktywuje fosfatazy m.in. kalcyneurynę, co powoduje defosforylację białek, w tym także receptorów AMPA i czynnika CREB.

Pomimo faktu, iż regulacja transkrypcji leży u podłoża tych procesów zmiany zachodzące w jądrze i w strukturze chromatyny podczas pobudzenia neuronalnego pozostają słabo scharakteryzowane. Komórki nerwowe z definicji reagują na zewnętrzną stymulację, zatem w ich przypadku precyzyjna regulacja transkryptomu w odpowiedzi na pobudzenie jest bardzo ważna. (Benito i Barco, 2015; Walczak i in., 2013b; Yap i Greenberg, 2018).

1.3 Jądro komórkowe

Jądro komórkowe to miejsce przechowywania i transkrypcji materiału genetycznego. Jego wysoce uporządkowana i wyspecjalizowana struktura o niejednorodnym wnętrzu zapewnia możliwość pełnienia zróżnicowanych funkcji. Średnica jądra w zależności od typu komórki może wynosić od 3,5 do 20 μm (Khatau i in., 2009) czyniąc je największym organelum w komórce. Otoczone jest podwójną błoną fosfolipidową (Ryc.1.3), co warunkuje rozdzielenie transkrypcji i translacji w czasie i przestrzeni, a to z kolei umożliwia wielostopniową regulację ekspresji genów. Zewnętrzna błona przylega do cytoplazmy komórki i zachowuje ciągłość z szorstkim retikulum endoplazmatycznym, które odpowiada za biosyntezę i fałdowanie białek. Wewnętrzna błona przylega do blaszki jądrowej, która stanowi rusztowanie dla jądra. Jest to sieć delikatnych włókien białkowych utworzonych przez laminy, które nadają wytrzymałość mechaniczną jądra a jednocześnie pewną elastyczność. Jednak laminy pełnią też rolę w przestrzennej organizacji chromatyny tworząc tzw. domeny powiązane

z laminami LAD (ang. *Lamina-associated domain*) (Burke i Stewart, 2013; Nazer, 2022) Błona jądrowa jest nieprzepuszczalna dla większości cząstek, dlatego obecne są w niej pory jądrowe. Są to kanały zbudowane z nukleoporyn tworzących kompleks poru jądrowego, w skład którego wchodzi współosiowo położone pierścienie przechodzące przez obie błony tworząc niejako tunel. Umożliwiają one nieselektywny transport jonów i cząsteczek o masie poniżej 40 kDa z cytoplazmy do jądra komórkowego i w kierunku przeciwnym. Transport większych cząstek jest ściśle kontrolowany i zachodzi na zasadzie transportu aktywnego kontrolowanego przez białka transportowe – importyny i eksportyny. Rozpoznają one krótkie sekwencje sygnałowe, w które wyposażone są białka – sygnał lokalizacji jądrowej NLS (ang. *Nuclear Localization Signal*) bądź sygnał eksportu jądrowego NES (ang. *Nuclear Export Signal*).

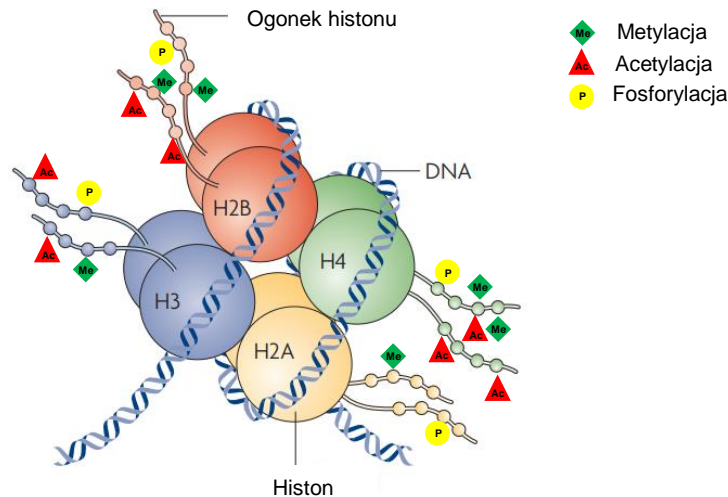


Rycina 1.3. Schemat budowy jądra komórkowego. Znaczną część jądra komórkowego wypełnia chromatyna zorganizowana w terytoria chromosomalne, pomiędzy tymi regionami znajduje się przestrzeń interchromatynowa wraz z cętkami jądrowymi (kolor czerwony). Wśród ciałek jądrowych występują m. in. jąderka, ciała PML i ciała Polycomb. Całość jądra otoczona jest otoczką jądrową z występującymi w niej licznymi kompleksami porów jądrowych. Rycina na podstawie Botchkareva i in., 2012, zmieniona.

Głównym składnikiem jądra komórkowego jest materiał genetyczny, który musi być odpowiednio upakowany, aby zmieścić się w relatywnie małej objętości jądra komórkowego. Dysproporcja długości genomowego DNA, które mierzy około 2 metrów i średnica jądra komórkowego, która jest około 200 tysięcy razy mniejsza powoduje, iż genom jądra interfazowego musi być upakowany w ściśle uporządkowany sposób. Uporządkowanie to musi zapewniać z jednej strony kompaktowość włókna DNA, ale z drugiej strony jego dostępność dla czynników zapewniających przetwarzanie

informacji genetycznej. Obecny stan wiedzy sugeruje kilka następujących mechanizmów. Podstawowym mechanizmem jest nawijanie dwuniciowego DNA wokół oktameru histonowego. Wspomniany oktamer składa się z dwóch kopii każdego z kanonicznych białek histonów H2A, H2B, H3, H4 – które wraz z helisą DNA tworzą razem nukleosom (Kornberg, 1974). Histony mają niewielką masę cząsteczkową (poniżej 23 kDa) i są silnie zasadowe. Ze względu na ważną i uniwersalną funkcję, jaką spełniają są białkami silnie konserwowanymi ewolucyjnie, a geny kodujące je występują w wielu kopiach w genomie (Talbert i Henikoff, 2010). Histony tworzące nukleosom, tzw. histony rdzeniowe mają też ściśle zakonserwowany plan budowy (ang. *histone fold domain*), pozwalający na skuteczną dimeryzację histonu H3 z H4 i H2A z H2B. Łącząc się w pary ustawiają się w konfiguracji głowa-ogon; przypomina to gest splecionych dłoni stąd też jego nazwa (ang. *hand-shake motif*) (Placek i Gloss, 2002). Kolejną strukturą, jaką tworzą histony jest „wiązka czterech helis” (ang. *four-helix bundle*). Dimery oddziałują ze sobą tworząc tetramer, poprzez wiązkę czterech helis między dwoma łańcuchami H3, czyli wiązanie histonu H3 z dimeru H3-H4 z histonem H3 drugiego dimeru. Dimer H2A-H2B wiąże się po obu stronach poprzez wiązkę czterech helis między H2B i H4. H2A jest jedynym histonem rdzeniowym, który nie jest bezpośrednio zaangażowany w wiązkę czterech helis w nukleosomie (Luger i in., 1997). Histony eukariotyczne posiadają N-końcowe fragmenty białka wystające swobodnie poza nukleosom tzw. ogony (ang. *histone tails*), są one miejscem szczególnie intensywnych modyfikacji potranslacyjnych (Ryc. 1.4).

Kolejne nukleosomy oddzielone są od siebie tzw. linkerowym DNA o zmiennej długości 10 – 80 pz, tworząc strukturę przypominającą „koraliki na sznurku”, zwaną też włóknem 10 nm (Felsenfeld i Groudine, 2003). W minionych latach postulowano, iż struktura ta ulega dalszej kondensacji do tzw. włókna 30 nm (Felsenfeld i Groudine, 2003). Miało do tego dochodzić poprzez przyłączenie histonu łącznikowego H1, który odpowiedzialny jest za kondensację włókna. Jednak badania z użyciem najnowszych metod nie wykazały istnienia włókna 30 nm *in vivo* (Fussner i in., 2012). Wiadomo natomiast, że histon H1 stabilizuje strukturę nukleosomu, jak również struktury chromatyny wyższego rzędu (Hergeth i Schneider, 2015).



Rycina 1.4. Nukleosom z modyfikacjami potranslacyjnymi histonów. Poglądowy model nukleosomu składający się z histonów wraz z zaznaczonymi przykładowymi modyfikacjami potranslacyjnymi. Na podstawie publikacji Tsankova (2007), zmienione.

W oparciu o stopień upakowania chromatyny można wyróżnić euchromatynę i heterochromatynę. Euchromatynę charakteryzuje luźny stopień upakowania, przez co może być aktywna transkrypcyjnie. Heterochromatyna jest zwartą formą chromatyny, a jej silne upakowanie uniemożliwia przebieg transkrypcji. Ponieważ jądro komórkowe posiada ograniczoną przestrzeń, stąd konieczność dużego upakowania DNA przy jednoczesnym zachowaniu możliwości szybkiego dostępu np. dla czynników transkrypcyjnych. Jeśli nie dochodziłoby do rozluźnienia struktury chromatyny, nie byłaby ona dostępna dla polimerazy. Można zatem powiedzieć, że przestrzenne zmiany struktury chromatyny również kontrolują ekspresję genów. W 2015 r. bracia Cremer zaproponowali model podziału jądra na obszary aktywne (ang. *Active Nuclear Compartment, ANC*) oraz nieaktywne (ang. *Inactive Nuclear Compartment, INC*) (Cremer, 2015) (Ryc 1.3). W aktywnym przedziale wyróżnili przestrzeń międzychromatynową (ang. *Interchromatin Compartment, IC*). Region ten charakteryzuje się małą gęstością nukleosomów i jest bogaty w kompleksy polimeraz, czynników transkrypcyjnych i replikacyjnych. Interchromatyna rozciąga się od porów jądrowych i pełni istotną rolę w procesie eksportu mRNA z jądra komórkowego (Sacharowski, 2019). Charakterystyczne dla interchromatyny jest znaczne wzbogacenie w potranslacyjną modyfikację H3K4me3. W jądrze istnieją także domeny topologiczne (ang. *Topologically Associating Domains, TADs*), które są jednostkami terytoriów chromosomowych i obejmują odcinki DNA o długości rzędu miliona par zasad.

W domenach tych dochodzi do licznych przestrzennych interakcji pomiędzy odcinkami DNA. Dzięki wypętleniom się nici chromatynowych dochodzi do przemieszczania się sekwencji regulatorowych, np. wzmacniaczy, lub sekwencji wyciszających w pobliżu regulowanych przez nie genów, które często występują w znacznej odległości od siebie wzdłuż liniowej cząsteczki DNA (Wilczynski, 2014). Kluczową rolę dla tego procesu przypisuje się białku CTCF (ang. *CCCTC binding factor*), które działa jako aktywator, represor bądź izolator transkrypcji (Kim i in., 2015). Tworzenie pętli fizycznie zbliża do siebie odcinki DNA oddalone od siebie liniowo, np. pomiędzy promotorem a wzmacniaczem (Mifsud i in., 2015).

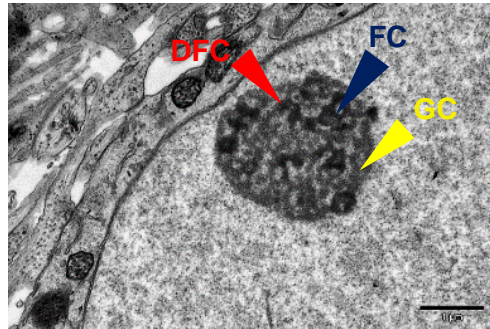
Dzięki mikroskopii elektronowej (Monneron, 1969), ale także konfokalnej (Spector, 2001) poza chromatyną możliwym było zdefiniowanie innych przedziałów jądra komórkowego. Bo chociaż wewnątrz jądra komórkowego nie jest podzielone błonami lipidowymi, to w jego budowie można wyróżnić przedziały różniące się swoimi funkcjami. Występują w nim liczne struktury takie, jak: jąderka, ciała Cajala, cętki jądrowe SC-35 (ang. *splicing speckles*), ciała PML, struktury OPT, macierz jądrowa i ciała Polycomb (Ryc.1.3). Ciała jądrowe mogą mieć różny kształt – od owalnych, jak np. ciała PML po nieregularne kształty cętek jądrowych. Taka kompartmentalizacja przestrzeni jądra, tworzona przez ciała jądrowe, umożliwia odpowiednią koncentrację makrocząstek (Galganski i in., 2017), zwiększając efektywność i specyficzność procesów zachodzących w ograniczonej przestrzeni jądrowej. Ciała jądrowe można również opisać jako konglomeraty zbudowane z kwasów nukleinowych i białek (choć nie wszystkie ciała jądrowe składają się z kwasów nukleinowych). Nie są otoczone błoną, ich integralność nie zależy więc od obecności błony lipidowej, a od oddziaływań między budującymi je cząsteczkami. Ten brak fizycznej bariery oddzielającej je od nukleoplazmy umożliwia stałą, swobodną wymianę składników, w odpowiedzi na potrzeby komórki.

1.4 Jąderko

Jednym z najważniejszych ciałek jądrowych jest jąderko. Morfologia jąderka jest tak łatwo dostrzegalna pod mikroskopem świetlnym, że już prawie 250 lat temu zostało zaobserwowane najpierw przez Felice Fontanę (1781 r.) a później opisane niezależnie przez Rudolfa Wagnera (1836 r.), Gabriela Valentini (1836/1839 r.) oraz oczywiście Roberta Browna (1831 r.). Temu ostatniemu przypisuje się nadanie nazwy *nucleolus* (jąderko), gdyż jako pierwszy naukowiec dostarczył tak szczegółowego opisu jądra

komórkowego (również on jako pierwszy użył nazwy *nucleus* (jądro) w odniesieniu do jądra komórkowego). Jednak od chwili uwidocznienia i opisanie jąderka minęło wiele lat nim udało się je bardziej poznać. Sama morfologia jąderek została na przykład pięknie zilustrowana w pracy Montgomery'ego (Montgomery, 1898), który wykonał imponującą liczbę 364 ilustracji jąderek. Jednak dopiero dzięki mikroskopii elektronowej możliwym było określenie struktury jąderka (Yasuzumi i in., 1958) oraz szczegółowe opisanie jego funkcji na poziomie ultrastrukturalnym. Dziś wiadomo już, że jąderko jest miejscem biogenezy rybosomów (Birnstiel i Hyde, 1963; Miller i Beatty, 1969; Perry, 1967). Zachodzi w nim transkrypcja genów kodujących 18S, 5.8S i 28S rRNA, obróbka pierwotnych transkryptów oraz wiązanie powstających cząsteczek rRNA ze składnikami pochodzącymi spoza jąderka: białkami rybosomalnymi i 5S rRNA. Następnie utworzone podjednostki rybosomów transportowane są do cytoplazmy, gdzie dochodzi do ich dojrzewania. W bliskim sąsiedztwie jąderka znajduje się tzw. heterochromatyna perinukleolarna (PH, ang. *peri-nucleolar heterochromatin*) Struktura ta związana jest z jąderkiem, ale stanowi odrębną część jądra. Jest miejscem przechowywania jądrowych rybonukleoprotein oraz transkryptów polimerazy III (genów 5S rRNA). Jąderko powstaje wokół regionów jąderkotwórczych (NOR), zwanych inaczej organizatorami jąderkotwórczymi a ich liczba i umiejscowienie są charakterystyczne dla danego gatunku. U ludzi jest to 10 obszarów jąderkotwórczych znajdujących się na krótkich ramionach pięciu par akrocentrycznych chromosomów (chromosomy 13, 14, 15, 21 oraz 22). Powstawanie jąderek jest zależne od aktywności komórki i jej biosyntetycznych zapotrzebowań, np. w komórkach o dużej aktywności i dużym zapotrzebowaniu na syntezę białek jąderko może zajmować nawet 25% objętości jądra komórkowego, co czyni jąderko największą substrukturą jądra komórkowego. W aktywnym transkrypcyjnie jąderku wyróżnia się trzy obszary: centrum fibrylarne (FC, ang. *fibrillar center*), gęsty składnik fibrylarny (DFC, ang. *dense fibrillar component*) i składnik ziarnisty (GC, ang. *granular component*) (Ryc. 1.5). Poszczególne etapy biosyntezy rybosomów zachodzą więc w odrębnych regionach. Proces ten zaczyna się w FC, gdzie następuje transkrypcja genu 45S przez polimerazę I. Na granicy FC i DFC gęstego składnika fibrylarnego znajdują się transkrypty rDNA. Dalsze etapy biogenezy rybosomów, w tym modyfikacje pre-rRNA i przetwarzanie go do dojrzałych rRNA (18S, 5.8S i 28S) oraz składanie rRNA z białkami rybosomalnymi i 5S rRNA zachodzą w DFC i GC. Końcowe produkty tego procesu, podjednostki rybosomów 40S i 60S, są eksportowane poza jądro, gdzie w cytoplazmie dochodzi do ich dojrzewania. Dojrzałe

podjednostki 40S i 60S łączą się ze sobą, tworząc kompletne jednostki rybosomów (80S u eukariontów). Dojrzałe rybosomy są gotowe do uczestnictwa w procesie translacji, czyli syntezy białek na podstawie informacji zawartej w mRNA.



Rycina 1.5. Obraz jąderka neuronów. Jąderko neuronów z zaznaczonymi obszarami gęsty składnik fibrylarny (DFC) kolor czerwony, centrum fibrylarne (FC) - granatowy oraz składnik ziarnisty (GC) - żółty. Rycina własna.

Z biofizycznego punktu widzenia jąderko jest odseparowane od jądra, pomimo iż nie jest otoczone żadną błoną, a formuje się poprzez aktywność polimerazy I oraz poprzez separację faz ciekłych (LLPS, ang. *liquid-liquid phase separation*) (Lafontaine i in., 2020). Jak trafnie to ujęto: „jąderko: organellum utworzone w wyniku budowy rybosomu” (Mélèse i Xue, 1995), co oznacza, że jąderka istnieją z powodu aktu biosyntezy rybosomów, w przeciwnym razie ich struktura reorganizuje się, a nawet rozkłada. Doświadczenia z zahamowaniem aktywności RNA polimerazy I pokazują, że jąderko rozpada się po zahamowaniu transkrypcji zależnej od polimerazy I (Kalita i in., 2008). Ten szybki montaż i demontaż jąderka możliwy jest właśnie dzięki właściwościom biofizycznym (brak błony i powstawanie na skutek separacji faz ciekłych) (Warmerdam i Wolthuis, 2019). Fascynująca organizacja struktury jąderka, które może się rozpadać i na nowo zreformować, gdy warunki zostaną znormalizowane podobne jest do kropelek cieczy, które pod ciśnieniem rozpadają się na mniejsze kropelki by później w innych warunkach połączyć się z powrotem. Doświadczenia *in vitro* dotyczące rekonstrukcji jąderek dowiodły, że wyizolowane białka jąderkowe takie, jak fibrylaryna i B23, są w próbkach oddzielone fazowo i tworzą skondensowane kropelki cieczy które wykazują cechy biofizyczne jąderka (Brangwynne i in., 2011; Feric i in., 2016) Dzięki tym unikalnym właściwościom jąderko może pełnić funkcję czujnika pośredniczącego w przekazywaniu czynników zewnętrznych takich jak np. stymulacja, a także jako czujnik stresu – w przypadku niekorzystnych warunków takich, jak deficyty metaboliczne lub stres oksydacyjny dochodzi do obniżenia syntezy rRNA (Grummt

i Ladurner, 2008) w sposób zależny i niezależny od białka p53 (Marquez-Lona i in., 2012), o czym więcej w podrozdziale 1.5.2.

1.4.1 Charakterystyka wybranych białek jąderkowych

Jąderko, oprócz rDNA zlokalizowanego w obszarach NOR, składa się głównie z białek (Kobayashi, 2008). Human Genome Atlas identyfikuje około 1000 białek jąderkowych. Wśród nich znajdują się białka rybosomowe RPL i RPS, enzymy odpowiedzialne za transkrypcję, jak np. polimeraza RNA I, enzymy katalizujące dojrzewanie pre-RNA, jak np. fibrylaryna czy białka regulatorowe, jak np. NPM1. Wiele białek jąderkowych nie jest bezpośrednio zaangażowanych w syntezę podjednostek rybosomowych, ale w inne procesy jak np. regulacja cyklu komórkowego, naprawa uszkodzeń DNA czy aktywacja innych białek. Jąderko koordynuje zatem wiele procesów zachodzących w komórce (Tsekrekou i in., 2017).

1.4.1.1 Nukleolina

Nukleolina (m. cz. ~110 kDa) jest najpowszechniej występującym białkiem w jąderku komórkowym, reprezentując około 10% całkowitej liczby białek obecnych w tym obszarze. Główną funkcją nukleoliny jest udział w biogenezie rybosomów, w tym transkrypcji rDNA, dojrzewaniu rRNA oraz składaniu i dojrzewaniu rybosomów.

1.4.1.2 Czynniki transkrypcyjny UBF

Białko UBF (ang. *Upstream Binding Factor*), (m.cz. ~ 90 kDa) odgrywa kluczową rolę w transkrypcji genów kodujących rybosomalne RNA (rRNA) (McStay i Grummt, 2008). Jest białkiem charakterystycznym dla centrum fibrylarnego jąderka. Białko UBF rozpoznaje dwa rejony promotora rDNA i poprzez interakcję z czynnikiem selekcyjny SL1 (ang. *selectivity factor 1*) oraz polimerazą RNA I odpowiada za inicjację transkrypcji. Białko UBF działa również w kompleksie z innymi czynnikami transkrypcyjnymi i białkami remodelującymi chromatynę, aby zapewnić odpowiednią ekspresję genów rRNA.

1.4.1.3 Białko B23

Wśród białek jąderkowych szczególną uwagę zwraca białko B23 (m.cz. ~ 37 kDa), znane również jako białko NPM1, nukleofosmina, numatryna bądź NO38. Występuje powszechnie w jąderku, dokładnie w centrum granularnym, gdzie

zaangażowane jest w każdym z etapów syntezy podjednostek rybosomów od etapu transkrypcji rDNA, przez dojrzewanie prekursorów rRNA, składanie podjednostek po ich eksport do cytoplazmy (Maggi i in., 2008). Posiada ono, tak jak i inne białka jąderkowe sygnał lokalizacji jąderkowej NoLS (ang. *nucleolar localization signal*), sygnał importu do jądra (NLS) oraz sygnał eksportu z jądra (NES). Obecność tych sekwencji sygnałowych, a co się z tym wiąże, przemieszczanie się białka B23 jest kluczowe dla biogenezy podjednostek rybosomowych i dla ich transportu z jądra do cytoplazmy gdzie ostatecznie są formowane. Białko B23 uznawane jest również za marker stresu jąderkowego, jako że zaobserwować można jego szybkie przemieszczanie się do jądra z jąderka podczas indukcji stresu komórkowego (Yang i in., 2016).

1.4.2 Stres jąderkowy

Mianem stresu jąderkowego określa się nieprawidłowe funkcjonowanie jąderka spowodowane zaburzeniami w biogenezie rybosomów oraz wadliwą architekturą jąderka. Warto zauważyć, iż stres jąderkowy może być wywołany przez wiele czynników stresogennych takich, jak: zahamowanie aktywności polimerazy RNA I (Yung i in., 1985), promieniowanie UV (Thielmann i in., 1999), uszkodzenia DNA (Yogev i in., 2008), ekspozycja na czynniki cytotoksyczne (Desnoyers i in., 1996), infekcja wirusowa (Matthews, 2001) czy szok cieplny (Liu i in., 1996), a także ekspozycja na reaktywne formy tlenu. Aktywacja klasycznego szlaku reakcji na stres jąderkowy powoduje uwolnienie białek rybosomalnych z jąderka do nukleoplazmy a następnie dochodzi do utraty integralności jąderka. Fizjologicznie stres jąderkowy występuje w komórkach starzejących się oraz apoptycznych. W odpowiedzi na ekspozycję na reaktywne formy tlenu dochodzi do zmian w interakcji pomiędzy białkiem B23, a białkiem ARF (p19) (ang. *alternate reading frame*), co z kolei inaktywuje ligazę MDM2 (ang. *Mouse Double Minute 2*) (Dai i in., 2004; Lindström i in., 2018; Rubbi i Milner, 2003). Ligaza MDM2 jest głównym regulatorem białka p53, poprzez ubikwitynację prowadzi do jego degradacji w proteasomie. Białko p53 to regulator komórkowy, tzw. „strażnik genomu” pełniący rolę supresora nowotworów, odpowiadający za kontrolę cyklu komórkowego i naprawę DNA oraz indukujący apoptozę w przypadku uszkodzeń genetycznych, co przyczynia się do utrzymania stabilności genomu i zapobiegania rozwojowi nowotworów. Inaktywacja ligazy MDM2 podczas stresu jąderkowego prowadzi do wzrostu poziomu białka p53, co prowadzi do zatrzymania komórki w cyklu komórkowym

bądź skierowania jej na drogę apoptozy. Warto zauważyć, że istnieją również specyficzne szlaki stresu jąderkowego niezależne od białka p53, które skutkują aktywacją apoptozy, zatrzymaniem cyklu komórkowego, starzeniem się komórki i uszkodzeniem DNA (James i in., 2014; Olausson i in., 2012) Te niezależne od białka p53 szlaki sygnałowe są szczególnie interesujące dla opracowania terapii leczenia nowotworów, ponieważ białko p53 odzwierciedla najczęściej zmutowany gen w różnych typach nowotworów.

Podsumowując jąderko jest niezwykle ważną substrukturą jądra, a jego funkcje wykraczają daleko poza samą biosyntezę rybosomów.

1.4.3 Jąderko komórek nerwowych

Funkcja jąderek jest szczególnie istotna dla komórek nerwowych. Pomimo że neurony są terminalnie zróżnicowanymi komórkami, muszą utrzymywać zdolność do wzrostu ze względu na ich specyficzną morfologię. Drzewka dendrytyczne neuronów rosną, ulegają przebudowie oraz tworzą nowe synapsy, co wymaga ciągłej syntezy rRNA dla zapewnienia stałych dostaw rybosomów. Te zapotrzebowania są na tyle duże, że przypominają te w komórkach dzielących się. Liczba jąderek w komórce neuronalnej waha się między 1 a 4 (średnio 2.2) (Hetman i Pietrzak, 2012). W badaniach nad plastycznymi zmianami po aktywacji neuronów często obserwowano wzmożoną aktywność jąderka (Richter i Klann, 2009; Vargas i in., 2000). Co ciekawe, badania nad izolowanymi dendrytami udowodniły, iż lokalna translacja już istniejących mRNA jest wystarczająca do utrzymania wczesnej fazy LTP (Reymann i Frey, 2007), ale długotrwałe zmiany takie, które zapewnią efektywne funkcjonowanie synapsy wymagają aktywacji ekspresji genów. Formowanie się pamięci długotrwałej wymaga syntezy nowych białek i ekspresji nowych genów, a integralność jąderka jest niezbędna do utrzymania długoterminowej plastyczności synaptycznej (Allen i in., 2014). Zaburzenia w funkcjonowaniu jąderka zostały zidentyfikowane w chorobach neurodegeneracyjnych m.in. w chorobie Parkinsona, Huntingtona oraz Alzheimerera (Núñez Villacís i in., 2018). Ponadto zaburzenia w powstawaniu rybosomów prowadzą do patologii w neurorozwoju. Mutacje w składowych rybosomów prowadzą do upośledzenia rozwoju mózgu objawiającego się małogłowie, autyzmem, deficytami intelektualnymi i/lub postępującą neurodegeneracją jak podsumowano w pracy przeglądowej zespołu Hetmana (Hetman i Słomnicki, 2019). W tej samej publikacji wskazano także, iż czynniki

egzogenne takie, jak alkohol czy wirus Zika również zakłócają rozwój układu nerwowego poprzez ingerencję w biogenezę rybosomów.

Podsumowując, jądro komórkowe wraz ze wszystkimi swoimi strukturami nie jest homogenne i to zróżnicowanie na domeny strukturalne i funkcjonalne zapewnia nie tylko bezpieczne przechowywanie materiału genetycznego, ale przede wszystkim doskonałą maszynę do kontroli procesów w nich zachodzących.

1.5 Mechanizmy kontrolujące strukturę chromatyny

W 1942 r. Waddington zdefiniował epigenetykę jako zespół różnych procesów i zależności zachodzących pomiędzy genotypem, a fenotypem. W 1957 r. przedstawił on tzw. epigenetyczny krajobraz, ilustrujący różne ścieżki rozwojowe, jakie może przyjąć komórka organizmu podczas swojego różnicowania, w zależności od tego, jakie geny są włączone, a jakie wyłączone. Nieco inną koncepcję epigenetyki zaproponował rok później mikrobiolog Nanney, który wyróżnił dwa systemy kontroli komórkowej: genetyczny – oparty na strukturze DNA, i pomocniczy, w który zaangażowane były specyficzne mechanizmy wpływające na ekspresję genów. I to właśnie te mechanizmy nazwał „epigenetycznymi”, które, jak stwierdził, są procesami biochemicznymi, jakim podlega genom. I tak np. indukowana przez środowisko lub traumatyczne przeżycia metylacja DNA zmienia właściwości kodowanego przez gen białka. Co więcej, taka zmiana chemiczna, jeśli dotyczy komórek rozrodczych, może zostać przekazana kolejnym pokoleniom w postaci zmian biologicznych, będących nośnikiem „pamięci” o przeszłych urazach. (Gapp i in., 2014). Kiedy w 2003 roku ukończono projekt sekwencjonowania ludzkiego DNA (ang. *Human Genome Project*) jasnym stało się, iż genomowe DNA ma znacznie mniejszą kontrolę nad biologicznymi procesami i stanami chorobowymi niż wcześniej uważano. Metody sekwencjonowania następnej generacji (ang. *next generation sequencing*) potwierdziły te przypuszczenia, wskazując czynniki epigenetyczne jako precyzyjne czynniki determinujące określoną transkrypcję. Przykładem takiej metody są metody typu C np. 3C (ang. *chromatin conformation capture*), a także ich udoskonalenia – 4C i 5C, które pozwalają na wizualizację organizacji chromatyny – czyli na przestrzenną analizę wybranego obszaru chromatyny i zrozumienie wzajemnej relacji między strukturą genomu a jego funkcją (Dekker 2002).

Szereg mechanizmów precyzyjnie reguluje strukturę DNA, po to, aby kontrolować, który gen ma ulegać ekspresji w określonym czasie. Organizmy eukariotyczne wykorzystują wiele mechanizmów wpływających na dostępność

określonych sekwencji regulatorowych w DNA, co prowadzi do aktywacji bądź represji transkrypcji. Zmiany epigenetyczne nie zmieniają właściwej, pierwotnej sekwencji jądrowego DNA, ale działają na jego dostępność dla czynników transkrypcyjnych oraz polimerazy DNA. Zdolność do regulowania organizacji chromatyny jest szczególnie ważna w komórkach nerwowych, które z definicji dynamicznie odpowiadają na zewnętrzną stymulację. Współcześnie można wyróżnić pięć elementów, które są kluczowe dla przebudowy chromatyny: modyfikacje DNA, warianty i modyfikacje potranslacyjne histonów, długie niekodujące RNA, kompleksy przebudowujące chromatynę i przestrzenne ułożenie chromatyny w jądrze komórkowym. (Sacharowski, 2019).

1.5.1 Modyfikacje DNA

Zasady, z których zbudowane jest DNA mogą ulegać chemicznym modyfikacjom. Główną i zarazem najlepiej poznaną modyfikacją DNA jest metylacja, która dotyczy cytozyn, po których w sekwencji następuje guanina. Takie miejsca nazywane są wyspami CpG. Za przenoszenie grup metylowych na pozycję 5 w cytozynie w regionach wysp CpG odpowiedzialne są metylotransferazy DNA (DNMT) (Wu i Zhang, 2014). Do tej pory poznano cztery metylotransferazy DNA: DNMT1, DNMT3A, DNMT3B oraz DNMT3L (Jin i Robertson, 2013). DNMT1 utrzymuje wzór metylacji DNA po replikacji. Pozostałe metylotransferazy wprowadzają metylacje *de novo*. Zmetylowane DNA rozpoznawane jest przez białka z domeną MBD (ang. *methyl-CpG binding domain*), a te z kolei rozpoznawane są przez kompleks deacetylazy histonu, który prowadzi do deacetylacji i kondensacji chromatyny. Silnej metylacji ulegają regiony satelitowe, elementy powtórzeniowe, regiony wewnątrzgenowe, a metylacja tych sekwencji zapewnia integralność genomu.

1.5.2 Warianty i modyfikacje potranslacyjne histonów

Jak już opisano w podrozdziale 1.4 zasadowe histony rdzeniowe (H2A, H2B, H3 i H4) łączą się z kwaśnym DNA, tworząc nukleosomy. Modyfikacje epigenetyczne histonów są złożone i mogą obejmować acetylację, metylację (jedno-, dwu- lub trójcząsteczkową), fosforylację, ubikwitynację lub sumoilację. Polegają one na przyłączeniu do cząsteczek histonów odpowiednio grup: acetylowych, metylowych, fosforanowych, ubikwityny lub białka SUMO (Rorbach-Dolata i in., 2017). Wymienione

grupy łączą się z ogonami histonów znajdującymi się na N-końcach przy udziale odpowiednich enzymów. Reakcje te są odwracalne poprzez działanie przeciwstawnych enzymów (np. acetylaza i deacetylaza). W wyniku potranslacyjnych modyfikacji histonów dochodzi do zmiany struktury i konformacji chromatyny. Wpływają w ten sposób na modulację ekspresji genów. Jak również wspomniano w podrozdziale 1.4 - w oparciu o stopień upakowania chromatyny można wyróżnić dwie kanoniczne, a właściwie trzy główne formy: euchromatyna – potocznie zwaną „otwartą” ze względu na luźny stopień upakowania. Jest ona aktywna transkrypcyjnie i charakteryzuje się obecnością potranslacyjnych modyfikacji takich jak trimetylacja histonu 3 na lizynie 4 (H3K4me3) oraz acetylacją (różnych) reszt lizynowych na N końcach histonów (Medrano-Fernández i Barco, 2016) Heterochromatyna - transkrypcyjnie nieaktywna forma charakteryzująca się potranslacyjnymi modyfikacjami o charakterze represyjnym. Heterochromatyna ma dwa stany funkcjonalne – jako heterochromatyna konstytutywna, dla której charakterystycznymi modyfikacjami są metylacje wysp CG i trimetylacja lizyny 9 na histonie 3 (H3K9me3) (Kouzarides, 2007) oraz jako heterochromatyna fakultatywna, która jak sama nazwa wskazuje, może wykazywać aktywność transkrypcyjną i znakowana jest trimetylacją lizyny 27 na histonie 3 (H3K27me3) (Botchkarev i in., 2012). Oprócz wymienionych modyfikacji histonów występuje szereg innych, charakterystycznych dla danych form chromatyny, które zebrane zostały w postaci podsumowania w Tabeli 1.1.

Tabela 1.1 Przykładowe modyfikacje histonów oraz ich wpływ na transkrypcję

Nazwa	Wpływ na transkrypcję
ACETYLACJA	
H3ac	aktywacja
H4ac	aktywacja
H3K4ac	aktywacja
H3K9ac	aktywacja
H3K14ac	aktywacja
H3K18ac	aktywacja
H3K27ac	aktywacja
H4K16ac	aktywacja
METYLACJA	
H3K4me2	aktywacja
H3K4me3	aktywacja
H3K9me2	represja
H3K9me3	represja
H3K27me3	represja

H3K36me3	aktywacja
H3K79me1	aktywacja
H4K20me2/me3	represja
FOSFORYLACJA	
H3S10P	aktywacja
UBIKWITYNACJA	
H2Aub	represja
H2Bub	aktywacja

W przeważającej większości acetylacje związane są z chromatyną aktywną transkrypcyjnie, natomiast metylacje z chromatyną nieaktywną transkrypcyjnie. Wyjątek stanowią metylacje lizyny (czwartej i trzydziestej szóstej) na histonie 3, które odpowiadają za aktywację transkrypcji.

Do nukleosomów mogą być wprowadzane warianty histonów o odmiennych właściwościach fizykochemicznych, wynikających ze zmienionej sekwencji aminokwasowej (Herre i Korb, 2019). W przeciwieństwie do kanonicznych histonów ekspresja i depozycja wariantów histonów jest niezależna od fazy cyklu komórkowego i włączana jest w określonych miejscach w chromatynie przez specjalne kompleksy białkowe. Przykładem jest inkorporacja wariantu histonu H3 – H3.3 do której dochodzi w odpowiedzi na wzrost aktywności neuronów (Maze i in., 2015).

1.5.3 Kompleksy przebudowujące chromatynę

Jak opisano w powyższych podrozdziałach, DNA i histony ulegają wielu modyfikacjom, ponadto chromatyna może być przebudowywana za sprawą wiązania nici niekodujących RNA, które również wpływają na dalsze procesy przebudowy. Wszystko to wymaga obecności maszynerii, która zintegruje te sygnały. Są nimi kompleksy przebudowujące chromatynę. Ze względu na pełnione przez nie funkcje można je podzielić na: kompleksy rozpoznające modyfikacje DNA (ang. *readers*), wprowadzające modyfikację (ang. *writers*) oraz usuwające modyfikacje (ang. *erasers*) (Herre i Korb, 2019) Działanie kompleksów przebudowujących chromatynę umożliwia modyfikację struktury chromatyny i wpływa na aktywność genów, poprzez ułatwienie dostępu do DNA dla czynników transkrypcyjnych i innych białek regulatorowych (Vincent i in., 2008). Działanie tych kompleksów wymaga energii, ponieważ zmiany w strukturze chromatyny takie, jak rozluźnianie, przemieszczanie nukleosomów i modyfikacje histonów, wymagają wyważenia sił wiążących DNA i histony. Stąd kompleksy przebudowujące chromatynę zawierają zazwyczaj podjednostkę zdolną do hydrolizy

ATP. Energia z hydrolizy ATP umożliwia im pokonywanie barier energetycznych, które są związane z przekształceniem struktury chromatyny. Istnieje wiele rodzajów kompleksów przebudowujących chromatynę, o różnych składach białek i o specyficznych funkcjach. Należą do nich kompleksy SWI/SNF (ang. *Switch/Sucrose Non-Fermentable*), ISWI (ang. *Imitation SWI*), CHD (ang. *Chromodomain Helicase DNA-binding*), INO80, NuRD (ang. *Nucleosome Remodeling and Deacetylase*) i wiele innych. Każdy z tych kompleksów ma unikalne cechy i jest zaangażowany w regulację różnych procesów biologicznych takich, jak rozwój, różnicowanie komórkowe, naprawa DNA, a także odpowiedź na stresy środowiskowe. Można zatem powiedzieć, że niektóre białka oraz kompleksy białkowe mają zdolność do rozpoznawania epigenetycznych znaczników i poprzez ich zdolności do przekształcania struktury chromatyny wpływają na transkrypcję.

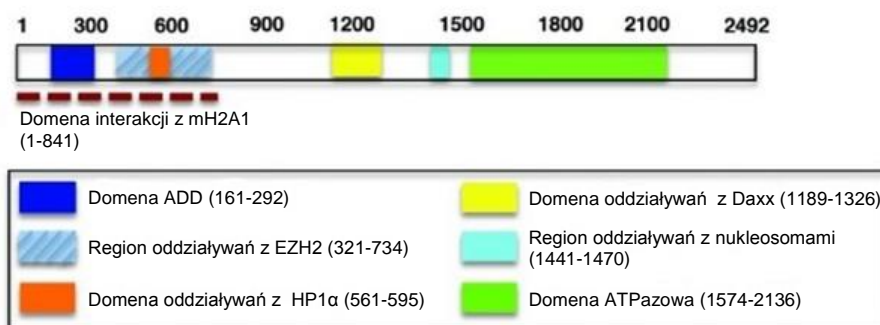
1.6 ATRX helikaza zależna od ATP

Jednym z białek należących do rodziny SWI/SNF, regulujących strukturę chromatyny, jest białko ATRX. Białko ATRX kodowane jest u ssaków przez gen *ATRX*, zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu X, a jego mutacje zostały po raz pierwszy zidentyfikowane u pacjentów cierpiących na zespół niepełnosprawności intelektualnej sprzężonej z niedokrwistością (α -talasemią X) (Gibbons i in., 1991). Stąd wzięła się nazwa zespołu ATRX – α -talasemia z opóźnieniem umysłowym o dziedziczeniu sprzężonym z chromosomem X (ang. *alpha thalasemia mental retardation syndrome X-linked*) (OMIM# 301040). Białko ATRX zlokalizowane jest głównie w jądrze komórkowym, gdzie działa jako helikaza DNA i uczestniczy w procesach związanych z replikacją, transkrypcją oraz naprawą DNA. Ekspresja *ATRX* może być różna w zależności od typu komórki, tkanki oraz etapu rozwoju organizmu. Białko ATRX występuje powszechnie we wszystkich komórkach ssaków, a jego synteza może być różna w zależności od typu komórki, tkanki oraz etapu rozwoju organizmu. Wysoki poziom białka ATRX zaobserwowano w embrionalnej tkance nerwowej, co wskazuje na kluczowy udział białka ATRX w rozwoju mózgu (Pang i in., 2023). Ponadto białko ATRX zaangażowane jest w organizację pericentrycznej chromatyny podczas różnicowania neuronów (Marano i in., 2019). Regulacja struktury chromatyny, nie tylko podczas różnicowania, ma nadrzędne znaczenie dla wielu podstawowych procesów jądrowych – ekspresji genów, naprawy DNA, replikacji i rekombinacji. Białko ATRX okazuje się być bardzo ważnym graczem zaangażowanym we wszystkie

te procesy (Clynes i in., 2013). Główną i najlepiej opisaną funkcją białka ATRX jest włączanie wariantu histonu H3.3 do swoistych regionów genomu takich, jak telomery, heterochromatyna, rRNA i pericentryczne regiony heterochromatyny (Dyer i in., 2017).

1.6.1 Budowa białka ATRX

Białko ATRX jest wielodomenowym białkiem o m. cz. 280 kDa. Jest produktem genu *ATRX* o długości ok. 300 kpz, składającego się z 35 eksonów (Picketts i in., 1996; Villard i in., 1997). Istnieją również doniesienia o transkrybowanej krótszej formie ATRX, w której brakuje domeny zależnej od ATP (Garrick i in., 2004). Porównanie sekwencji nukleotydów ludzkiego i mysiego genu kodującego *ATRX* wykazuje 85% homologii, co świadczy o wysokiej konserwacji ewolucyjnej tego białka (Picketts i in., 1998). Białko ATRX należy do rodziny białek SWI/SNF (ang. *SWItching defective/Sucrose NonFermenter*) (Picketts i in., 1996) i lokalizuje głównie przy heterochromatynie (McDowell i in., 1999). C-końcowa część białka ATRX zawiera domeny o aktywności helikazy zależnej od ATP o homologii do białek z rodziny SNF2 (ang. *sucrose non fermentable*) (Ryc.1.6). Białka z rodziny Snf2 przekształcają energię pochodzącą z hydrolizy ATP na energię mechaniczną, umożliwiającą przebudowę struktury chromatyny (Ryan i Owen-hughes, 2014). N-koniec białka ATRX zawiera nietypową domenę ADD (ATRX-DNMT3-DNMT3L) z motywem palca cynkowego, która wiąże się z ogonem histonu H3 (Ratnakumar i Bernstein, 2013). Domena taka występuje również w metyltransferazach DNA (DNMTs), czyli enzymach katalizujących reakcje metylacji. W budowie białka ATRX wyróżnić można również domeny wiążące z białkami m.in. białkiem Daxx.



Rycina 1.6. Struktura białka ATRX. Schemat organizacji domen białka ATRX przedstawiono różnymi kolorami zgodnie z legendą pod schematem. Fragment N-końcowy posiada domenę ADD oraz odpowiada za oddziaływanie z białkami EZH2 czy HP1 α . Fragment C-końcowy posiada domenę ATPazową. Rycina na podstawie publikacji Ratnakumar i in. (2013), zmieniona.

1.6.2 Funkcje białka ATRX

Analizy całego genomu w mysich i ludzkich komórkach wskazują, że białko ATRX ma tendencję do wiązania się z sekwencjami bogatymi w G o wysokim potencjale do tworzenia kwadrupleksów G. Białko ATRX lokalizuje na telomerach, pericentromerycznej chromatynie, bierze udział w inaktywacji chromosomu X (Baumann i De La Fuente, 2009; McDowell i in., 1999; Wong i in., 2010), co wskazuje na jego rolę w tworzeniu bądź utrzymaniu nieaktywnej transkrypcyjnie chromatyny. ATRX posiada w swojej budowie domenę ADD, która rozpoznaje i łączy się ze zmodyfikowanym histonem H3K9me3 na heterochromatynie. Co więcej, białko ATRX łączy się z białkami związanymi z wyciszeniem chromatyny - HP1 α (Ryc. 1.6) i HP1 β (Bérubé i in., 2000), warunkując obecność tych białek na telomerach (Wong i in., 2010). Inne białka opisywane w literaturze jako partnerzy ATRX również wskazują na jego udział w wyciszaniu transkrypcji - EZH2 (ang. *Enhancer of zeste homolog 2*) uczestniczy w metylacji histonów, MeCP2 (ang. *methyl-CpG binding protein 2*) rozpoznaje i łączy się z sekwencjami GC. Ponadto udowodniono, iż ATRX wraz białkiem MeCP2 kontrolują obłożenie nukleosomów w miejscach wiązania czynnika CTCF, umożliwiając w ten sposób lokalne konfiguracje pętli chromatyny i represję ekspresji imprintowanych genów w mózgu (Kernohan i in., 2014). Spośród znanych partnerów białka ATRX na szczególną uwagę zasługuje białko DAXX (ang. *Death Domain Associated Protein*, białko 6 związane ze śmiercią). Zostało ono po raz pierwszy opisane przy interakcji w cytoplaźmie z klasycznym receptorem Fas, biorącym udział w regulacji apoptozy (Yang, 1997). To wielofunkcyjne białko zostało również opisane zarówno w cytoplazmie, jak i jądrze (brak jednak doniesień z jąderka) jako białko opiekuńcze histonów, jest również jednym z konstytutywnych składników ciałek jądrowych PML (Ishov i in., 1999). Białko DAXX tworzy kompleks z białkiem ATRX i wspólnie odpowiadają za depozycję histonu H3.3. Pod względem budowy białka wariant histonu H3.3 różni się tylko pięcioma aminokwasami w porównaniu do kanonicznego histonu H3.1 (Trovato i in., 2020), ale obecność właśnie tych odmiennych aminokwasów warunkuje rozpoznawanie histonu H.3.3 przez kompleks ATRX/DAXX i wbudowywanie go do telomerów czy heterochromatyny pericentromerycznej (Elsaesser i in., 2011; Goldberg i in., 2011; Lewis i in., 2010). Analiza ChIP-seq ATRX potwierdziła powiązanie ATRX z heterochromatyną, ale co niezmiernie ciekawe, ujawniła też różnorodne miejsca jego z euchromatyną (Truch i in., 2022), w szczególności ATRX wiąże aktywne elementy

regulatorowe, takie jak geny palca cynkowego, wzmacniacze, promotory i ciała genów. Autorzy wskazują, iż ATRX działa w sposób stochastyczny, ułatwiając różne jądrowe procesy zarówno w heterochromatynie jak i w euchromatynie. Wiadomym jest również, że mutacje w genie *ATRX* skutkują obniżoną ekspresją α -globuliny, a białko ATRX wiąże się fizycznie z klastrem genu α -globuliny, co ponownie wskazuje na jego rolę w aktywacji transkrypcji (Higgs i in., 2005).

1.6.3 Zespół ATRX

Mutacje w genie *ATRX* są przyczyną występowania zespołu ATRX. Do jego typowych objawów należą niepełnosprawność umysłowa, hipotonia mięśniowa, dystroficzne cechy twarzy, anomalie układu moczowo-płciowego oraz obecność wtrętów hemoglobiny H w badaniu obwodowym krwi. Zespół ten objawia się już od wczesnego dzieciństwa. Wielu z pacjentów nie potrafi chodzić do późnego dzieciństwa, rozwój mowy ogranicza się zwykle do kilku słów. Pojawiają się również napady drgawkowe (1/3 przypadków), zazwyczaj są to napady kloniczno-toniczne lub miokloniczne (Gibbons i Higgs, 2000). Pełen fenotyp mutacji został zebrany w Tabeli 1.2. Należy dodać, że fenotyp chorobowy przejawiają jedynie osobniki płci męskiej, osobniki płci żeńskiej dzięki obecności dwóch kopii chromosomu X, nawet jeśli są nosicielkami mutacji, nie wykazują objawów.

Tabela 1.2 Zestawienie cech zespołu ATRX

Zaburzenia w budowie twarzoczaszki	mikrocefalia aplazja zatok czołowych hipoplazja środkowego piętra twarzy małe uszy nisko osadzone uszy uszy zrotowane do tyłu hiperteloryzm oczny zmarszczki nakątne niski grzbiet nosa nos o trójkątnym kształcie przodopochylenie nozdrzy szeroko rozstawione górne siekacze ubytek przegrody międzykomorowej
Zaburzenia wzrostu	pourodzeniowe zahamowanie wzrostu
Zaburzenia układu pokarmowego	przepuklina pępowinowa zaparcia refluks żołądkowo-przełykowy

Zaburzenia układu kostnego	stopa końsko-szpotawa kifoskolioza półkręgi kolana koślawe
Zaburzenia neuronalne	czuciowo-nerwowa utrata słuchu (rzadko) upośledzenie umysłowe
Zaburzenia w obrębie jamy ustnej	"rybie usta" pełne wargi glossoptoza (zapadanie języka)
Zaburzenia układu moczowo-płciowego	wygładzona moszna mikropenis spodziectwo wnętrostwo agenezja nerki wodonercze

Mutacje w genie *ATRX* powodują również występowanie innych zespołów takich, jak: zespół Chudleya-Lowry'ego, zespół Juberga-Marsidiego, zespół Carpentera-Waziri, zespół Holmesa-Ganga i zespół Smitha-Finemana-Myersa, które obecnie określa się terminem „upośledzenie umysłowe sprzężone z chromosomem X” (OMIM#309580) (Abidi i in., 2005, Villard i Fontes, 2002). W zespołach tych nie występują objawy hematologiczne, charakterystyczne dla zespołu *ATRX*. (Clynes i in., 2013)

Sekwencjonowanie nowej generacji próbek krwi pochodzących od 986 pacjentów z niesyndromicznym opóźnieniem umysłowym (ID) zidentyfikowało warianty *ATRX* jako jedną z najczęstszych przyczyn tych zespołów chorobowych (Morgan i in., 2015). Wskazuje to, że białko *ATRX* jest niezwykle ważne dla rozwoju prawidłowych funkcji poznawczych.

Pierwsze doniesienia o zespole *ATRX* pojawiły się ponad 30 lat temu i do dzisiaj nie istnieje żadna skuteczna terapia. Obiecujące dane docierają jednak z Japonii, gdzie wykorzystano potencjalną strategię terapeutyczną ukierunkowaną na kwadrupeksy G zmniejszającą zaburzenia poznawcze związane z zespołem *ATRX* (Shioda, 2018). Badania te są obecnie w fazie badań klinicznych. Dalsze badania nad tym interesującym i niejednoznacznym czynnikiem remodelującym chromatynę są niewątpliwie bardzo ważne.

2. Założenia i cele pracy

Niniejsza rozprawa dotyczy poznania roli białka ATRX w organizacji chromatyny neuronów hipokampalnych. W badaniach przeprowadzonych w byłej Pracowni Neuromorfologii Molekularnej i Systemowej oraz w Pracowni Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych wykazano, że podczas pobudzenia neuronalnego w jądrach neuronów dochodzi do globalnej reorganizacji struktury chromatyny. W oparciu o te odkrycia postawiłam hipotezę, iż **białko ATRX bierze udział w organizacji chromatyny po pobudzeniu synaptycznym.**

Hipotezę tę postanowiłam zweryfikować poprzez realizację następujących celów badawczych:

1. analizę lokalizacji białka ATRX w jądrach neuronów hipokampalnych w stanie spoczynkowym i po pobudzeniu wywołującym długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (LTP);
2. zbadanie, czy białko ATRX współwystępuje z modyfikacjami potranslacyjnymi histonów;
3. sprawdzenie, czy obniżenie poziomu białka ATRX powoduje zaburzenia organizacji chromatyny neuronów;
4. analizę morfologii struktur jąderkowych zawierających ATRX;
5. analizę morfologii neuronów z obniżonym poziomem białka ATRX.

3. Materiały

3.1 Odczynniki chemiczne

Najczęściej używane odczynniki chemiczne na potrzeby niniejszej pracy doktorskiej zaprezentowano w formie tabeli 3.1

Tabela 3.1 Związki chemiczne

Nazwa	Producent	Numer katalogowy
Aceton	Sigma	A1410
Alkohol etlowy bezwodny 99,8%	Gibco	16140-071
Chlorek Magnezu ($MgCl_2$)	Sigma Aldrich	M8266
Chlorek potasu (KCl)	POCH	794121116
Chlorek sodu (NaCl)	POCH	874870116
Chlorek wapnia ($CaCl_2$)	Sigma	G8769
Difosforan sodu (NaH_2PO_4)	POCH	742020112
Diwodorofosforan potasu (KH_2PO_4)	Sigma	276855-100ML
DMSO Dimetylosulfotlenek	Sigma-Aldrich	276855
EDTA	POCH	396480111
EGTA	BioShop	EGT101.25
Gliceryna	BioShop	GLN001.1
Glicyna	Thermo Fisher	H3570
K_2SO_4	POCH	BA9603115
Kwas azotowy 65%	POCH	531360115
Kwas borowy	Sigma	K3375-5G
Kwas kynureninowy	Roche	11243217001
Metanol	Sigma Aldrich	322415
Mleko w proszku odtłuszczone	Spółdzielnia Mleczarska w Gostyniu	-
Pafarormaldehyd	Sigma	P6148
Siarczan potasu (K_2SO_4)	POCH	7778805
Siarczan sodu (Na_2SO_4)	POCH	7757826
Sacharoza	BioShop	SUC507.1
TRIS tris(hydroksymetylo)aminometan	BioShop	TRS001.1
Triton X-100	Sigma	11332481001
Tween 20	Sigma	P9416
Wodorotlenek sodu (NaOH)	POCH	810981118

3.2 Materiał zwierzęcy do wyprowadzania hodowli neuronalnych

Wszystkie procedury z wykorzystaniem zwierząt do założenia hodowli z osesków zostały przeprowadzone zgodnie z regulacjami i za zgodą I Lokalnej Komisji Etycznej do spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie oraz z regulacjami i wytycznymi Uniwersytetu Bordeaux CNRS oraz za zgodą Komitetu Opieki i Użytkowania Zwierząt. Oseski P0 szczurów rasy Wistar pochodziły ze Zwierzętarni Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego, natomiast oseski P5 szczurów rasy Wistar pochodziły ze Zwierzętarni Uniwersytetu Bordeaux CNRS.

3.3 Odczynniki używane do przygotowania pożywek hodowlanych

Najczęściej używane odczynniki do przygotowania hodowli neuronów przedstawiono w Tabeli 3.2. W Tabeli 3.3 zawarto składy buforów i pożywek używanych w celu wyprowadzenia i utrzymania hodowli neuronalnych. Materiały wykorzystywane do hodowli neuronalnej wyszczególniono w Tabeli 3.4.

Tabela 3.2 Odczynniki używane do przygotowania pożywek hodowlanych

Nazwa	Producent	Numer katalogowy
B27 suplement	Thermo Fisher	23227
Boraks	POCH	796080110
BSA- albumina surowicy wołowej	GIBCO	17504-044
Cysteina	Lab Empire S.C.	CYS555.10
GlutaMax (100x)	Sigma	H0887-100ML
Inhibitor trypsyny	Sigma Aldrich	T9253
HEPES	Sigma	S8830
Kwas kynureninowy	Sigma Aldrich	K3375-5G
Kwas pirogronowy	Sigma Aldrich	107360
Laminina	Roche	11243217001
Odczynnik GlutaMAX	Life Technologies	35050061
Papaina	Worthington	LS003126
Pirogronian sodu	Life Technologies	11360070
Płodowa surowica bydłęca (HI FBS)	Life Technologies	16140071
Poli-D-lizyna	Sigma Aldrich	P7886
OptiMEM	Gibco	11058021
Pożywka DMEM	Thermo Fisher Scientific	11995065
Pożywka Neurobasal A 1x	Life Technologies	10888022

Pożywka minimalna MEM 1x	Life Technologies	51200046
Roztwór czerwieni fenolowej	Sigma Aldrich	P0290
Roztwór D-(+)-glukozy 45%	Sigma Aldrich	G8769
Roztwór MEM aminokwasów egzogennych 100x	Sigma Aldrich	M7145
Roztwór penicylina-streptomycyna	Thermo Fisher	15140-148
Roztwór soli GBSS	Sigma Aldrich	G9779
Surowica końska	Invitrogen	16050130

Tabela 3.3 Skład buforów i pożywek użytych do przygotowania dysocjowanej hodowli neuronalnej oraz organotypowej hodowli skrawków hipokampalnych

Nazwa buforu/pożywki	Skład
Bufor boranowy 0.1 M pH 8,5	0.1 M kwas borowy 0.1 M czertoboran sodu dziesięciowodny (boraks)
Pożywka dysocjacyjna DM pH7,4	1 M Na ₂ SO ₄ 0,5 M K ₂ SO ₄ 1 M MgCl ₂ , 100 mM CaCl ₂ , 1 M HEPES, 2,5 M glukozy 45%, 0,5% Phenol Red, 0,1 M NaOH
Pożywka 10x Ky/Mg	10 mM kwas kynureninowy 100 mM MgCl ₂ 5 mM HEPES 0,5% Phenol Red NaOH do ustalenia pH
DM+Ky/Mg	90 ml DM 10 ml Ky/Mg
Roztwór papainy	9.7 ml DM+Ky/Mg 4.5 mg cysteine 25 µl 1M NaOH 100 U papaina
Roztwór inhibitora trypsyny	10 ml DM+Ky/Mg 100mg inhibitor trypsyny 15 µl NaOH
Roztwór do preparacji tkanki w hodowli organotypowej	GBSS 99% 1% glukoza
Pożywka Neurobasal A/B27	97% NeurobasalA 2% Supplement B27 1% Penicylina/ streptomycyna 1% GlutaMax (100X)

Pożywka MEM/FBS	MEM 82,85% 10% FBS 1% 100x MEM 3,15 % - 45% glukozy 1% GlutaMax 1% pirogronianu sodu 1% mieszaniny penicyliny i streptomycyny
MEM/HS	MEM 46,88% 25% surowica końska – HS 25% HBSS 1,12 % - 45% glukozy 1% GlutaMax 1% mieszaniny penicyliny i streptomycyny

Tabela 3.4 Materiały wykorzystywane do hodowli neuronalnej

Nazwa	Producent/pochodzenie	Numer katalogowy
Inserty 0.4 μ M Milicell	Millipore	PIHP03050
Płytki 6-dółkowe	VWR	734-2323
Płytki 12-dółkowe	VWR	734-2324
Płytki 24-dółkowe	VWR	734-2325
Szkiełka nakrywkowe 13mm, grubość 1.5	VWR	631-0150
Szkiełka nakrywkowe 18mm, grubość 1.5	VWR	631-0153

3.4 Najczęściej stosowane roztwory

Do sporządzania roztworów używano wody oczyszczonej przez odwróconą osmozę i ultrafiltrację, otrzymywaną przy pomocy aparatury firmy Millipore: Milli-RO® Plus. W Tabeli 3.5 wymieniono składy najczęściej stosowanych roztworów.

Tabela 3.5 Skład najczęściej stosowanych roztworów

Nazwa	Skład
Roztwory do immunofluorescencji	
10 x PBS	1,3 M NaCl; 0,07 M Na ₂ HPO ₄ 0,014 M KH ₂ PO ₄ ; 0,027 M KCl
Bufor utrwalający	4% PFA; 4% sacharoza w 1x PBS pH 7,4
PBS-T	0,1% Triton X-100 w 1 x PBS pH 7,4
Bufor blokujący	5 % BSA w 1 x PBS – T
Roztwory używane do pracy z białkami i techniki Western Blot	
10 x bufor do elektroforezy białek (Tris – glicyna-SDS)	0,25 M Tris pH 8,4; 2 M glicyna 10% SDS

10 x TBS	0,5 M Tris-HCl pH 7,5; 1,5 M NaCl
1 x TBS- T	0,05 M Tris-HCl; 0,15 M NaCl; 0,1% Tween20
1 x Bufor Towbin'a	0,025 M Tris Base; 0,192 M glicyny; 1% SDS; 20% metanol
5 x bufor Laemmliego	0,315 M Tris-HCl pH6,8; 50% glicerol; 10% SDS; 25% β -merkaptoetanol; 0,0125% błękit bromofenolowy
1 x bufor do lizy tkanki	50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% SDS
Bufor blokujący błony nitrocelulozowe	5% mleko odtłuszczone w 1x TBS - T
Roztwór czerwieni Ponceau S	0,25% czerwien Ponceau S; 40 % metanol; 15% kwas octowy

3.5 Materiały użyte na potrzeby hodowli bakteryjnych

Do uzyskania hodowli bakteryjnych wykorzystano wyszczególnione poniżej szczepy i podłoża:

- Szczepy bakteryjne *Escherichia coli* DH5 α ; Invitrogen

Podłoża:

- LB (ang. *Luria-Bertani Broth*); Sigma, numer katalogowy C7352-25G
- LB Agar; Bio-Shop, numer katalogowy: LBL406
- Pożywka SOC (ang. *super optimal catabolite repression*), Sigma-Aldrich, numer katalogowy: 85469
- Podłoże selekcyjne LB + - LB lub LB Agar, antybiotyk chloramfenikol 100 μ g/mL

Antybiotyki:

- Ampicylina, sól sodowa (100 μ g/mL); Bio-Shop; numer katalogowy: AMP201

3.6 Roztwory wykorzystane do pomiarów elektrofizjologicznych

Składy roztworów wykorzystanych do pomiarów elektrofizjologicznych przedstawiono w formie tabeli (Tabela 3.6)

Tabela 3.6 Składy roztworów do elektrofizjologii

Nazwa roztworu	Skład
Roztwór do inkubacji, tzw. sztuczny płyn mózgowo-rdzeniowy (aCSF) pH (7,3-7,4) utrzymywano poprzez napowietrzanie karbogenem (mieszanka 95% O ₂ – 5% CO ₂).	125 mM NaCl, 25 mM NaHCO ₃ , 3 mM KCl, 1.25 mM NaH ₂ PO ₄ , 2 mM CaCl ₂ , 1 mM MgCl ₂ , 3 mM pirogronian sodu, 25 mM glukoza
Roztwór do elektrody	125 mM Cs-metanosulfonian 10 mM CsCl, 10 mM HEPES, 0.3 mM EGTA, 2 mM MgATP, 0,3 mM NaGTP, pH=7,25

3.7 Zestawy i materiały stosowane w metodach biologii molekularnej

W metodach biologii molekularnej wykorzystano komercyjne zestawy do biologii molekularnej zestawione w formie Tabeli 3.7.

Tabela 3.7 Komercyjne zestawy do biologii molekularnej

Nazwa	Producent	Numer katalogowy
Zestaw do oczyszczania plazmidowego DNA - Plasmid Maxi Kit	Qiagen	12162
Zestaw po pomiaru stężenia białka: DC Protein Assay	Thermo Scientific	23252
Zestaw do chemiluminescencji - Amersham ECL Prime Western Blotting	GE Helthcare	RPN2232
Błony nitrocelulozowe; Whatman	Sigma Aldrich	WHA1001125
Filmy światłoczułe	Foma	-
Lipofectamine2000	Invitrogen	11668019
Standardy mas cząsteczkowych		
PageRuler™	Fermentas	26625
Spectra™	Fermentas	26617

3.8 Odczynniki stosowane w technikach immunocytochemicznych

Listę przeciwciał użytych w badaniach na potrzeby ninjszej rozprawy wymieniono w Tabeli 3.8 (przeciwciała pierwszorzędowe) oraz Tabeli 3.9 (przeciwciała drugorzędowe).

Tabela 3.8 Lista używanych przeciwciał pierwszorzędowych

Przeciwciało	Rozcieńczenie	Producent	Nr. katalogowy
ATRX	1:200	Santa Cruz Biotechnology	Sc-1540B
ATRX (D-5)	1:100	Santa Cruz Biotechnology	Sc-55584
B23	1:1000	Abcam	ab10530
c-FOS	1:1000	Synaptic System	226004
CTCF	1:200	Santa Cruz Biotechnology	Sc-271474
DAXX	1:200	Santa Cruz Biotechnology	Sc-7152
H3K9ac	1:1000	Abcam	Ab12179
H3K9me2	1:500	Abcam	Ab1220
H3K9me3	1:100	Merck Millipore	07-442
H4K20me2me3	1:500	Abcam	Ab78517
NeuN	1:1000	Merck Millipore	ABN91
Nukleolina	1:1000	Abcam	Ab22758
Polimeraza RNA I	1:100	Santa Cruz Biotechnology	Sc-48385
PABPN1	1:1000	Abcam	Ab75855
SFa66	1:100	Abcam	Ab77800
UBF	1:200	Santa Cruz Biotechnology	Sc-13125

Wszystkie przeciwciała drugorzędowe używane na potrzeby tej pracy pochodziły od jednego producenta - Jackson ImmunoResearch, wszystkie też stosowane były w rozcieńczeniu 1:250. Szczegóły przeciwciał drugorzędowych wymienione w Tabeli 3.9.

Tabela 3.9 Lista używanych przeciwciał drugorzędowych

Specyficzność	Fluorochrom	nr.katalogowy.
królik	CY3	711-166-152
królik	Alexa 488	711-546-152
królik	Alexa 647	703-606-155
mysz	CY3	715-165-150
mysz	Alexa 488	715-545-150
mysz	Alexa 647	715-606-151
kurczak	Alexa 647	703-606-155
kawia domowa	Alexa 647	706-605-148

Ponadto w technikach immunocytochemicznych zastosowano wymienione poniżej odczynniki:

- barwnik Hoechst 33258; Invitrogen
- Vectashield; H-1000, Vector Laboratories
- inhibitory proteaz i fosfataz; S8830, Sigma

Tabela 3.10 Lista przeciwciał używanych do immunodetekcji

Specyficzność	Antygen	Rozcieńczenie	Producent	nr. katalogowy
przeciwciało z peroksydazą chrzanową z kozy	IgG myszy	1 : 5000	Milipore	AP308P
przeciwciało z peroksydazą chrzanową z kozy	IgG królika	1 : 5000	Milipore	AP307P

3.9 Substancje biologicznie czynne

Wykorzystywane w doświadczeniach środki farmakologiczne zebrano i scharakteryzowano w Tabeli 3.10.

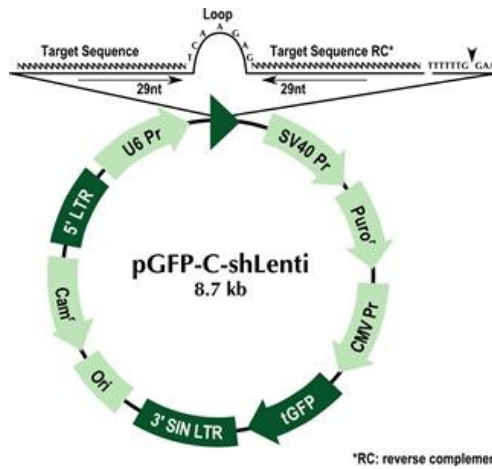
Tabela 3.11. Środki farmakologiczne używane w doświadczeniach

Nazwa	Efekt działania	Producent	Numer katalogowy
Aktynomycyna D	Blokuje aktywność RNA polimerazy I	Sigma Aldrich	A7030
Chloramfenikol	Antybiotyk	BioShop	CLR201.10
5-Fluorouracyl	Ctyostatyk, zaburza syntezę RNA i DNA	Sigma Aldrich	F-6627
1,6-Heksanodiol	Rozbija słabe wodorowe wiązania w komórkach	Sigma Aldrich	240117
Odczynniki do wzbudzania chemicznego LTP			
Forskolina	Stymuluje cAMP zwiększając jego poziom w komórce	Sigma Aldrich	F6886
Pikrotoksyna	Wiążąc się do receptora GABA obniża próg pobudzenia	Sigma Aldrich	P1675
Rolipram	Hamuje rozkład cAMP poprzez zahamowanie aktywności fosfodiesterazy-4	Sigma Aldrich	R6520

3.10 Wektor plazmidowy

Wektor plazmidowy użyty do wyciszenia endogennego genu *Atrx* pochodzi z firmy OriGene i występuje pod nazwą: shATRX, numer katalogowy TL704354. Plazmid ten, jest plazmidem ekspresyjnym pGFP-C-shLenti, umożliwiającym jednoczesną konstytutywną produkcję krótkiego interferującego RNA (shRNA, ang. *short harpin RNA*) oraz GFP (ang. *green fluorescent protein*) w komórkach ssaczych. Sekwencja shRNA komplementarna do szczurzej, regulowana jest przez promotor polimerazy RNA

III - U6 RNA. cDNA kodujące GFP znajduje się pod kontrolą promotora CMV. Niesie gen oporności na chloramfenikol.



Rycina 3.1. Mapa plazmidu shATRX. Graficzne przedstawienie plazmidu wraz z zaznaczonymi najważniejszymi informacjami: promotor U6 dla szpilki RNA, promotor CMV dla GFP, gen oporności dla kanamycyny. Mapa pochodzi ze strony producenta (OriGene) <https://www.origene.com/catalog/vectors/shrna-vectors/tr30023/pgfp-c-shlenti-shrna-vector>.

Plazmid ten został wykorzystany do wyprodukowania wirusa w usługowej Pracowni Modeli Zwierzęcych Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie.

4. Metodologia

4.1 Hodowla pierwotna neuronów hipokampa

4.1.1 Przygotowanie szkiełek nakrywkowych

Pierwszym etapem przygotowawczym do hodowli hipokampa *in vitro* jest przygotowanie szkiełek nakrywkowych, na których neurony będą hodowane. Szkiełka nakrywkowe ułożono pojedynczo w porcelanowych statywach i umieszczono w 68% kwasie azotowym na 48 godz. Po tym czasie płukano je osiem razy, co 15 min. w kolejnych zmianach wody MiliQ, a na koniec suszono i sterylizowano w piecu w temp. 180°C przez 3 godz. Dzień przed planowaną hodowlą szkiełka nakrywkowe umieszczano w płytce, odpowiednio 12 lub 24-dołkowej, pokrywano kroplą mieszaniny poli-D-lizyny (0,05 mg/mL) z lamininą (0,25 mg/mL) w buforze boranowym i inkubowano przez noc w temp. pokojowej, chroniąc płytki przed światłem ze względu na światłoczułość lamininy. Następnego dnia szkiełka płukano 3-krotnie sterylną wodą destylowaną. Po serii płukań szkiełka suszono i tak pozostawiano do momentu użycia. Szkiełka pokryte PDL z dodatkiem lamininy zapewniają dobrą przyczepność komórek do podłoża, ponadto laminina oprócz wspomnianej adhezji wydłuża żywotność komórek (Sendrowski i in., 2008).

4.1.2 Izolacja hipokampa i zakładanie hodowli hipokampalnej *in vitro*

Przed preparatyką wszystkie roztwory oraz narzędzia wysterylizowano w autoklawie. Tkanki z nowonarodzonych osesków pobierano w sterylnych warunkach. Po humanitarnym uśmierceniu zwierzęcia, dekapitowane głowy umieszczono na lodzie, a następnie przeprowadzono izolację mózgu. Poprzez rozcięcie powłok skórnych i czaszki wydobyto mózg za pomocą sterylnej szpatułki i umieszczono go w zimnym roztworze DM-Ky/Mg na lodzie. Po przecięciu mózgowia na pół, wzdłuż półkul, wydobyto pień mózgu i błony zewnętrzne. Struktura hipokampa jest łatwa w ocenie morfologicznej (Ryc. 1.2), co było znaczącym ułatwieniem przy izolacji. Wyizolowane hipokampy umieszczono na lodzie w zimnym roztworze DM-Ky/Mg następnie delikatnie przenoszono je do próbówki typu falcon o objętości 50 ml zawierającej zimny roztwór DM-Ky/Mg. Następnie trzykrotnie przemyto świeżym, zimnym roztworem DM-Ky/Mg, po czym usunięto roztwór znad hipokampów i dodano 5 ml roztworu zawierającego

100 jednostek papainy, całość dwukrotnie inkubowano przez 15 min. w cieplarni z delikatnym mieszaniem (temp. 37°C). Po tym czasie delikatnie odciągnięto roztwór z nad hipokampów i dwukrotnie ciepłym DM-Ky/Mg, a następnie trzykrotnie ciepłym roztworem MEM+FBS przepłukano tkankę i usunięto cały roztwór z nad hipokampów. W 2 ml pożywki MEM+FBS przeprowadzono dysocjację hipokampów używając do tego sterylnych końcówek do pipet typu eppendorf o objętości 1 ml. Zawieszoną komórek hipokampa przeniesiono do próbówki typu falcon zawierającej 20 ml ciepłego (37°C) roztworu MEM+FBS, a następnie zwirowano przez 10 min. przy 10 000 rpm w temp. pokojowej. Supernatant odebrano, a komórki zawieszono w 2 ml pożywki MEM/FBS.

4.1.3 Wysiewanie komórek oraz warunki hodowli

Do dołków płytki ze szkiełkami opisanymi w podrozdziale 4.1.1. dodano odpowiednio po 500 µl MEM/FBS na dołek płytki 24-dołkowej i 1000 µl MEM/FBS na dołek płytki 12-dołkowej. Zawieszoną komórek w 2 ml roztworu MEM/FBS zliczono w komorze Bürkera i wysiano w ilości 75 000 komórek na wcześniej przygotowane szkiełko nakrywkowe o średnicy 13mm lub w gęstości 100 000 komórek na szkiełko o średnicy 18 mm. Płytki umieszczono w inkubatorze, w warunkach o temp. 37°C i atmosferze zawierającej 5% CO₂. Po trzech godzinach (jest to czas umożliwiający komórkom osadzenie się na szkiełkach pokrytych PDL) zmieniono roztwór na pożywkę hodowlaną Neurobasal A suplementowaną B27. Drugiego dnia od założenia hodowli dodano roztwór AraC do końcowego stężenia 2,5 µM w celu eliminacji komórek makro- i mikrogleju, oraz ewentualnych fibroblastów. Po czternastu dniach od założenia hodowli szkiełka z dobrze rozwiniętymi kulturami komórkowymi wykorzystano do dalszych badań.

4.2 Transfekcja neuronów hipokampalnych metodą lipofekcji

Hodowle neuronalne transfekowano w 3 lub 7 dniu hodowli *in vitro* (DIV3 lub DIV7) przy użyciu metody lipofekcji. Przed rozpoczęciem procedury przygotowano podłoże kondycjonowane poprzez dodanie 500 µl świeżej pożywki NB-A/B27 do dołków z hodowanymi neuronami. Po upływie co najmniej godziny pobierano 250 µl pożywki kondycjonowanej NB-A/B27 z dołków z hodowlami neuronalnymi i zahowano do użycia w dalszym etapie procedury. Poniższa procedura opisuje transfekcję neuronów

hipokampalnych hodowanych w 1 dołku szalki 24-dołkowej. Do 1 μg DNA dodawano 50 μl podłoża NB-A, równolegle przygotowywano mieszaninę składającą się z 1,6 μl Lipofectamine 2000 oraz 50 μl podłoża NB-A. Obie te mieszaniny łączono, a następnie bezpośrednio zakraplano do dołka. Po upływie godziny zmieniano pożywkę na podłoże składające się z podłoża kondycjonowanego i niekondycjonowanego w stosunku 1:1.

4.3 Organotypowe hodowle skrawków hipokampalnych

Hodowle skrawków hipokampalnych wyprowadzane były ze szczurzych osesków w 5 dniu po narodzinach (P5), zgodnie z protokołem opisanym przez Stoppini (Stoppini i in., 1991). Z mózgow izolowano hipokampy (analogicznie jak w podrozdziale 4.1.2.), które następnie cięto koronalnie na skrawki o grubości 300 μm , przy użyciu elektrycznego ostrza do tkanek (ang. *tissue chopper*). Izolowanie hipokampów przebiegało w zimnej pożywce GBSS + glukoza. Skrawki umieszczano po 4-5 sztuk na insertach hodowlanych w płytce 6-dołkowej i inkubowano w temp. 36°C w atmosferze 5% CO₂. Trzeciego dnia *in vitro* (DIV3) pożywkę suplementowano AraC, a następnie podłoże hodowlane zmieniano co 2 dni.

4.4 Elektrofizjologia techniką *whole-cell patch-clamp*

Celem analizy zmian funkcjonalnych komórek pobudzonych cLTP (ang. *chemical long term potentiation*) zastosowano technikę rejestracji elektrofizjologicznej z pojedynczych neuronów metodą *patch-clamp* w konfiguracji *whole-cell*, w hodowlach organotypowych stymulowanych przez 2 godz. roztworem odczynników wywołujących cLTP (50 μM forskolina, 50 μM pikrotoksyna oraz 0,2 μM rolipram). Kontrolę traktowano równą objętością rozpuszczalnika DMSO również przez 2 godz. Prądy rejestrowano przy użyciu wzmacniacza ITC-18 HEKA (HEKA Elektronik). Sygnały analogowe filtrowano dolnoprzepustowo przy 10 kHz i zbierano przy 20 kHz przy użyciu oprogramowania PatchMaster. Skrawki przenoszono do komory rejestracyjnej zanurzonej i stale perfundowanej w sztucznym płynie mózgowo-rdzeniowym (aCSF). Kapilary ze szkła borokrzemianowego o rezystancji 3-5 M Ω wypełniono roztworem elektrodowym. Miniaturowe prądy postsynaptyczne (mEPSC) rejestrowane były w konfiguracji „*whole-cell*” w trybie stabilizacji napięcia przy -70 mV w temp. 36°C.

Analizowano dwa parametry: amplitudę pojedynczych zdarzeń mEPSC wywołanych spontanicznym uwolnieniem neuroprzekaźnika oraz interwały czasowe

między zdarzeniami. Do analizy danych wykorzystano program IgorPro (Wavemetrics, USA) oraz pClamp 10.3 (Molecular Devices, Axon Instruments, Sunnyvale, CA, USA).

4.5 Transdukcja wektorem wirusowym

Hodowle neuronalne transdukowano w 3. dniu hodowli *in vitro* (DIV3) wektorem wirusowym z rodzaju lentiwirusów drugiej generacji wyprodukowanym w Pracowni Modeli Zwierzęcych Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. M Nenckiego. Do produkcji wirusa użyto DNA plazmidowego z podrozdziału 3.10. Transdukcję przeprowadzono poprzez dodanie do hodowli neuronów odpowiedniej objętości pożywki z wirusem tak, aby stosunek liczby cząstek wirusa do liczby komórek docelowych wynosił 200 MOI (ang. *multiplicity of infection*). Komórki hodowano przez kolejne dni i wykorzystano do dalszych eksperymentów w 14 dniu hodowli (DIV 14).

4.6 Pobudzenie neuronów cLTP

Długotrwałe wzmocnienie synaptyczne było wzbudzane w 14-dniowych (DIV14) neuronach hipokampalnych poprzez chemiczną indukcję mieszaniną forskoliny (50 μ M), rolipramu (50 nM) oraz pikrotoksyny (200 μ M). Odczynniki te rozpuszczone były w DMSO, dlatego też jako kontrolę używano tej samej objętości DMSO. Forskolina bezpośrednio stymuluje cyklazę adenylową (cAMP), tym samym zwiększając jej poziom w komórce. Rolipram wspiera to działanie poprzez zahamowanie fosfodiesterazy-4 (ang. *Phosphodiesterase 4*, PDE4), która w fizjologicznych warunkach rozkłada cAMP (Otmakhov i in., 2004). Pikrotoksyna obniża próg pobudzenia i potęguje efekt pobudzenia, ponieważ jako antagonist receptoru GABA blokuje napływ jonów chlorkowych do komórki, co powoduje że nie dochodzi do wyciszenia sygnału. Jak wspomniano we Wstępie, wysoki poziom cAMP indukuje szereg szlaków przekazywania sygnałów, w tym tych odpowiedzialnych za aktywację kinazy A i kinazy MAP oraz ekspresję genów odpowiedzi wczesnej.

Poniższa procedura opisuje wzbudzenie neuronów hipokampalnych hodowanych w 1 dołku szalki 24-dołkowej. Do 20 μ l podłoża NB-A dodano mieszaniny cLTP lub analogicznej objętości DMSO, a następnie bezpośrednio zakraplano mieszaninę do dołka. Po upływie dwóch godz. całość pożywki ściągano z dołka i utrwalano komórki. W przypadku eksperymentów pokazujących zmiany w czasie (ang. *time course*)

komórki utrwalano w określonych punktach czasowych, od 10 min do 3 godz. po dodaniu cLTP.

4.7 Odplukiwanie mieszaniny cLTP

Neurony stymulowane w sposób opisany w podrozdziale 4.6 zostały poddane odplukiwaniu poprzez odebranie całości pożywki zawierającej mieszaninę do cLTP i dodanie kondycjonowanej pożywki NB-A. Następnie neurony utrwalano w wybranych punktach czasowych – po upływie od 10 min. do 3 godz.

4.8 Utrwalanie komórek

Do utrwalenia komórek używano 4% paraformaldehydu (PFA) w buforze fosforanowym (PBS). Do utrwalenia komórek celem obrazowania drzewek dendrytycznych używano 4% PFA z 4% sacharozą w buforze fosforanowym (PBS). Najpierw odbierano całość pożywki z nad komórek a następnie delikatnie dodawano 4% PFA ogrzanego do temp. 37°C i inkubowano przez 10 min. w temp. pokojowej. Po tym czasie odbierano całą objętość PFA i płukano komórki PBS. Utrwalone komórki przechowywano w temp. 4°C w roztworze PBS.

4.9 Barwienie immunofluorescencyjne

Procedura znakowania obejmowała dwa dni. Wszystkie buforzy miały temp. pokojową. Pierwszego dnia utrwalone komórki trzykrotnie przepłukano buforem PBS po 10 min., za każdym razem odciągając bufor i zastępując go świeżym, a następnie permabilizowano komórki przez 10 min. 0,1% roztworem TritonX-100 w PBS i ponownie przepłukano buforem PBS jak wcześniej. Niespecyficzne miejsca wiązania przeciwciał blokowano 5% roztworem BSA w buforze PBS przez godz. Inkubacja z przeciwciałem pierwszorzędowym w 5% roztworze BSA w buforze PBS trwała przez noc w temp. 4°C. Pierwszorzędowe przeciwciała wykorzystane w pracy przedstawiono w Tabeli 3.8. W przypadku stosowania więcej niż jednego przeciwciała pierwszorzędowego neurony inkubowano jednocześnie dwoma przeciwciałami pierwszorzędowymi z zachowaniem zasady, iż każde przeciwciało pochodzi od innego gospodarza. Następnego dnia nieswoiście związane przeciwciała oraz ich nadmiar odplukano trzykrotnie 0,1 % roztworem TritonX-100 (3 x 5min.). Następnie komórki inkubowano z przeciwciałem drugorzędowym skoniugowanym z fluorochromem.

Listę przeciwciał drugorzędowych wymieniono w Tabeli 3.9. Inkubacja trwała 60 min., w temp. pokojowej, w ciemności, aby zapobiec wyświecaniu fluorochromu, po czym odpłukano nadmiar przeciwciał PBS-T (3x5min.) i dwukrotnie przepłukano PBS (po 5 min.). W celu uwidocznienia jąder komórkowych zastosowano znakowanie barwnikiem Hoechst o stężeniu 1µg/ml w PBS przez 5 min. Po tym czasie ponownie przepłukano 0,1% roztworem tritonu oraz PBS-T (3x5min, 1x5min). Gotowe preparaty zamknięto na szkiełkach podstawowych przy pomocy Vectashield. Brzegi szkiełek nakrywkowych dodatkowo zabezpieczono przed wysychaniem transparentnym lakierem do paznokci. Gotowe preparaty przechowywano w temp. -20°C w zaciemnianych pudełkach.

4.10 Indukcja stresu jąderkowego

Celem zahamowania transkrypcji i wywołania stresu jąderkowego użyto inhibitora polimerazy RNA I - D-aktynomycyny o stężeniu 0,05µg/ml w przedziale czasowym od 10 min. do 4 godz. poprzez dodanie do pożywki z neuronami odpowiedniej objętości inhibitora. Następnie komórki stymulowano przez 2 godz. cLTP, jako kontroli użyto analogicznej objętości rozpuszczalnika DMSO.

Inną metodą wywołania stresu jąderkowego jest zahamowanie dojrzewania rRNA przy użyciu 5-fluorouracylu. Należy on do analogów pirymidyn i stosowany jest jako cytostatyk w leczeniu nowotworów a także jest jednym z czynników powodujących stres jąderkowy (Rubbi i Milner, 2003). Dodanie 10 µM 5-FU na 24 godz. do pożywki hodowlanej komórek *in vitro* powoduje zahamowanie procesu dojrzewania prekursorów rybosomalnego RNA. Jako kontrolę użyto analogiczną objętość rozpuszczalnika DMSO.

4.11 Analiza struktury jąderkowych ciałek ATRX

W celu określenia właściwości jąderkowych struktur znakowanych ATRX użyłam 1,6-heksanodiolu powodującego rozbitcie słabych wiązań hydrofobowych w neuronach *in vitro*. 1,6-heksanodiol jest alkoholem powodującym rozbitcie hydrofobowych wiązań (ang. *liquid-liquid phase separation*). Heksanodiol rozpuszczony w pożywce NB-A dodano do pożywki w dołkach płytki z neuronami *in vitro* tak, aby jego stężenie końcowe wynosiło 5% i inkubowano przez 10 min. w temp. pokojowej. Po tym czasie komórki utrwalono jak opisano w podrozdziale 4.8.

4.12 Hodowle bakterii

4.12.1 Warunki hodowli bakterii

Do hodowli bakterii używano podłoża płynnego LB oraz podłoża stałego LB z dodatkiem 1,5% agaru. Po procesie autoklawowania i schłodzeniu do temp. 50°C, do podłoża dodawano chloramfenikol o stężeniu końcowym 34 µg/ml.

4.12.2 Produkcja i izolacja bakterii

Do produkcji i izolacji pojedynczych klonów bakteryjnych używano podłoża stałego LB. Podłoże wylewano na szalki Petriego, pozostawiano do zastygnięcia, po czym suszono w temp. 37°C przez 1 godz. Zawiesinę bakterii rozprowadzano gładką po powierzchni szalki, a następnie hodowano w 37°C przez 18 godz. W celu izolacji plazmidowego DNA pojedyncze kolonie bakterii namnażano w płynnym podłożu LB. Podłoże zaszczepiano bakteriami i hodowano z wytrząsaniem 250 rpm w temp. 37°C przez 18 godz. (namnażanie plazmidowego DNA).

4.13 Izolacja plazmidowego DNA

DNA plazmidowe, które w późniejszych etapach było używane do transfekcji komórek eukariotycznych, powinno charakteryzować się wysokim stopniem czystości oraz być wolnym od endotoksyn. Do oczyszczenia plazmidowego DNA uzyskanego jak opisano w podrozdziale 4.14 używano zestawów firmy Qiagen Plasmid Maxi Kit. Procedura izolacji DNA przebiegała zgodnie z protokołem dołączonym do zestawu.

Stężenie i czystość preparatów DNA ustalano spektrofotometrycznie poprzez pomiar absorbancji przy długościach fal 260 nm i 280 nm, z użyciem spektrometru NanoDrop One (Thermo Scientific). Czystość preparatów określano poprzez wyznaczenie współczynnika A260nm/A280nm. Preparat DNA uznawano za czysty wówczas, gdy wartości współczynnika mieściły się w zakresie 1,8 - 2,0.

4.14 Przygotowanie ekstraktów białkowych z hodowli komórkowych i oznaczenie stężenia białka

Sześćcio-dołkową płytkę z neuronami przeznaczonymi na ekstrakty białkowe do elektroforezy białek umieszczono na lodzie i przepłukano zimnym PBS. Następnie neurony zalewano buforem RIPA z dodatkiem inhibitorów proteaz i zdrapywano przy

użyciu skrobaka cytologicznego (zdrapywaczki) oraz końcówki pipety typu eppendorf. Następnie lizaty przenoszono pipetą do probówek i wykorzystywano do dalszych doświadczeń lub zamrażano w temp. - 80°C.

Oznaczanie stężenia białka w ekstraktach białkowych wykonywano w płytkach 96-dołkowych przy użyciu zestawu do oznaczania stężenia białka – BCA Protein Assay, zgodnie z instrukcją dołączoną przez producenta. Krzywą wzorcową wyznaczano na podstawie rozcieńczeń BSA w buforze, którego używano do lizy. Analizowany materiał mierzony był w dwóch rozcieńczeniach. Każde rozcieńczenie BSA i badanych próbek, powtarzane było w trzech dołkach. Po zakończeniu reakcji detekcji białek, wartości absorbancji odczytywano przy długości fali 595 nm w czytniku do płytek 96-dołkowych (Bio-Rad). Odczyty dla znanych ilości BSA służyły wykreśleniu krzywej wzorcowej, do której dopasowywano funkcję liniową. Równanie funkcji służyło następnie do wyliczenia stężeń białka w analizowanych ekstraktach.

4.15 Technika Western Blot

4.15.1 Elektroforeza białek w warunkach denaturujących

Elektroforezę białek w żelu denaturującym (ang. *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE) przeprowadzano zgodnie z procedurą opisaną przez Laemmliego (1970 r.). Rozdział białek wykonywano przy użyciu systemu Mini-Protean III (Bio-Rad). Przygotowywano dwuwarstwowe żele poliakrylamidowe o wymiarach 80 x 100 x 1 mm. Pierwszą warstwę od góry stanowił żel zagęszczający o długości około 2 cm, składający się z: 4% akrylamid/bis-akrylamid (9:1); 0,125 M Tris-HCl pH 6,8, natomiast drugą warstwę stanowił żel rozdzielający zawierający: 6-12% (wyższe stężenia stosowano w celu analizy białek o niższej masie cząsteczkowej) akrylamid/bis-akrylamid (9:1); 0,375 M Tris-HCl pH 8,8. W składzie obu żeli znajdował się 0,1% SDS. Polimeryzacja żeli była indukowana przez dodanie nadsiarczanu amonu i katalizatora TEMED do stężeń odpowiednio 0,05% i 0,1%. Do próbek białkowych, przed nałożeniem na żel, dodawano odpowiednią objętość 5x stężonego buforu Laemmliego, a następnie podgrzewano w bloku termicznym przez 5 min. w temp. 95°C. Elektroforezę prowadzono w buforze do elektroforezy białek. Do momentu przejścia czoła barwnika przez granicę żelu rozdzielającego, elektroforezę prowadzono przy napięciu 90V, a następnie przy 140V do momentu przejścia określonej wysokości barwnika. W celu

wyznaczenia mas cząsteczkowych analizowanych białek używano komercyjnych wzorców m. cz. białek wymienionych w podrozdziale 3.5., Tabela 3.7.

4.15.2 Immunodetekcja

W celu przeprowadzenia immunodetekcji z przeciwciałami, po zakończeniu rozdzału elektroforetycznego, białka przenoszono z żelu na błonę nitrocelulozową (Whatman) metodą mokrego elektrotransferu w buforze Towbina w aparacie firmy BioRad, stosując prąd o stałym natężeniu 250 mA przez 1,5 godz. w temp. 4°C. W przypadku transferu dużych białek o m. cz. przekraczającej 300kDa (jakim jest ATRX) elektortransfer trwał całą noc (16 godz.) i stosowano stałe napięcie o wysokości 100 V. W celu oceny jakości i wydajności transferu, po jego zakończeniu białka immobilizowane na błonie nitrocelulozowej barwiono w roztworze czerwieni Ponceau S w celu oceny jakości transferu. Następnie błonę odpłukiwano buforem TBS-T, blokowano inkubując przez 1 godz. w temp. pokojowej w buforze do blokowania błony nitrocelulozowej po elektrotransferze. Membranę inkubowano przez noc w 4°C z przeciwciałem pierwszorzędowym, odpowiednio rozcieńczonym w buforze do blokowania zawierającym 5% mleko, bądź 5% BSA w TBS-T (Tabela 3.5). Następnego dnia błonę płukano sześciokrotnie buforem TBS-T (każdorazowo przez 10 min.), po czym inkubowano przez 1 godz. w temp. pokojowej z odpowiednim przeciwciałem drugorzędowym sprzężonym z peroksydazą chrzanową, rozcieńczonym w buforze do blokowania. Błonę ponownie płukano, a następnie przeprowadzano detekcję reakcji z przeciwciałami stosując zestaw do chemiluminescencji - Amersham ECL Prime Western Blotting. Do wizualizacji wyniku wykorzystywano błonę światłoczułą. Lista przeciwciał użytych w technice Western Blot znajduje się w Tabeli 10 3.

4.16 Zbieranie i analiza obrazów mikroskopowych

4.16.1 Mikroskopia fluorescencyjna

Materiał do analizy obrazu zbierano przy użyciu kamery cyfrowej połączonej z mikroskopem fluorescencyjnym firmy Nikon. Celem obrazowania drzewka dendrytycznego neuronów z hodowli *in vitro* obrazy zbierano przy użyciu suchego obiektywu powiększającego 20 razy. Do obsługi kamery cyfrowej, zapamiętywania

i wstępnej obróbki zdjęć otrzymanych przy użyciu mikroskopu Nikon używano program Image Pro Plus (MediaCybernetics).

4.16.2 Mikroskopia konfokalna

Materiał do analizy obrazu zbierano przy użyciu kamery cyfrowej połączonej z systemem fotopowielacz–detektor mikroskopu konfokalnego LSM 780 firmy Zeiss lub Zeiss LSM 800 Airyscan (Pracownia Obrazowania Struktury i Funkcji Tkankowych, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN). Do obrazowania wykorzystywano obiektyw immersyjny 63x/1.4 oraz lasery diodowe o następujących długościach fal: 405 nm (wzbudzenie barwnika Hoechst), 561 nm (wzbudzenie fluorochromu CY3), 647 nm (wzbudzenie fluorochromu Alexa 647). Ponadto używałam lasera argonowego 488 nm (wzbudzenie fluorochromu Alexa 488).

Z każdego preparatu wybierałam co najmniej 5 pól widzenia i skanowałam z rozdzielczością 80 nm x 80 nm x 210 nm w osi x, y, całą grubość pojedynczej warstwy komórek na preparacie (zwykle około 60-70 warstw) celem uzyskania później trójwymiarowej rekonstrukcji do dalszej analizy. Każdorazowo podczas skanowania zbierano również obraz kulek kalibrujących o średnicy 500 nm dla wszystkich czterech zakresów długości fal i na podstawie ich położenia dokonywano korekcji przesunięcia pomiędzy poszczególnymi kanałami. Całość obrazowania i korekcji przeprowadzono przy użyciu programu ZEN (Blue i Black edition, ZEN). W rozdziale Wyniki przedstawiono obrazy reprezentujące pojedynczą, środkową warstwę neuronów o grubości 0,21 µm lub złożenie wszystkich warstw wzdłuż osi Z, o czym informowano w opisie rycin.

4.17 Analiza obrazów

Wszystkie obrazy analizowano w programie ImageJ (Fiji) z wykorzystaniem następujących „wtyczek”: *Colocalization colormap*, *NeuronJ*, *3D segmentation* oraz *RGB Profile*.

Do analizy rekonstrukcji jąder neuronów 3D wykorzystałam program *PartSeg* (Bokota i in., 2021)

4.17.1 Analiza w programie ImageJ

4.17.1.1 Pomiar intensywności sygnału fluorescencji w programie ImageJ

Obrazy analizowano przy użyciu programu ImageJ. Poprzez złożenie pojedynczych warstw ze wszystkich głębokości preparatu (Z-stack) uzyskano maksymalną projekcję sygnału z której następnie mierzono pola (ROI) o tej samej powierzchni przy użyciu opcji *Measure*. Wykresy przedstawiają wartości (w jednostkach umownych) dla poszczególnych wariantów.

4.17.1.2 Analiza kolokalizacji

Analizy kolokalizacji dokonano dzięki mapie kolorów kolokalizacji (Colocalization colormap), która jest „wtyczką” programu ImageJ pozwalającą na analizę ilościową i wizualizację kolokalizacji w postaci mapy kolorów (Gorlewicz, 2020) poprzez analizę dystrybucji pomiędzy parami korespondujących ze sobą pikseli dwóch różnych kanałów. Algorytm tej „wtyczki” opiera się na kalkulacji znormalizowanych wartości pikseli podzielonych przez iloczyn maksymalnych średnich odchyień. Następnie dla każdego zbioru (x,y) skoordynowano znormalizowany iloczyn odchylenia średniego (nMDP, ang. *normalized mean deviation product*):

$$\text{nMDP} = \frac{(A_i - \bar{A})(B_i - \bar{B})}{(A_{\text{max}} - \bar{A})(B_{\text{max}} - \bar{B})}$$

gdzie: A_i oraz B_i są wartościami dla konkretnego piksela “i”, \bar{A} i \bar{B} są średnimi, A_{max} oraz B_{max} są najwyższymi wartościami intensywności pikseli w danych sygnałach A oraz B.

Dzięki temu generowana jest mapa korelacji, która jest dystrybucją przeliczonych wartości nMDP w skali od -1 do 1, gdzie -1 oznacza brak kolokalizacji a 1 silną kolokalizację. Obraz końcowy przedstawia wynik kolokalizacji dwóch kanałów w postaci mapy ciepła, gdzie ciepłe kolory korespondują z wysoką kolokalizacją - wartościami powyżej 0, natomiast zimne z brakiem kolokalizacji - wartości ujemne. Metoda ta przelicza także indeks korelacji (Icorr), który reprezentuje frakcje pozytywnie

skorelowanych (kolokalizujących) pikseli. Dla przykładu Icorr 0.95 oznacza nałożenie kolokalizacji w 92%, natomiast Icorr 0.50 oznacza 0% kolokalizację.

4.17.1.3 Wyznaczenie profilu RGB

Do wyznaczenia profilu RGB (ang. *Red Green Blue*) wykorzystano wtyczkę programu ImageJ, która umożliwia dokładną ocenę kolokalizacji. Po konwersji obrazu do RGB wyznaczono za pomocą strzałki przekrój jądra a następnie wyznaczono profil intensywności fluorescencji dla danego przekroju i zaprezentowano go w postaci wykresu, gdzie na osi y są wartości intensywności fluorescencji, a na osi x odległość wyznaczona przez strzałkę (odległość mierzona w pikselach). Początek strzałki wyznacza 0 na osi x.

4.17.2 Analiza w programie PartSeg

Do analizy uzyskanych obrazów mikroskopowych wykorzystano program PartSeg (Bokota i in., 2021), który posiada dwa moduły – ROI Mask oraz ROI Analysis. Pierwszym krokiem do analizy było przeprowadzenie segmentacji jąder komórkowych przy wykorzystaniu modułu ROI Mask. Na podstawie sygnału pochodzącego ze znakowania DNA, o manualnie dobranej wartości tak, aby zaznaczona była cała objętość jądra, program tworzył maskę stanowiącą trójwymiarowe granice jądra. Następnie wyodrębnione pojedyncze jądra były poddane dalszej analizie z wykorzystaniem modułu ROI Analysis.

4.18 Analiza statystyczna wyników

Analizy ilościowe powstały w oparciu o co najmniej 3 niezależne powtórzenia biologiczne. Do opracowania wyników statystycznych wykorzystano program GraphPrism. Wyniki przedstawiono jako wykresy słupkowe przedstawiające średnie z podaniem błędów standardowych średniej (SEM) jako słupki błędów. Normalność rozkładów sprawdzano testem Shapiro-Wilka lub, gdy liczebność na to nie pozwalała, testem Kolmogorova-Smirnova. Istotność statystyczną różnic pomiędzy dwiema grupami badano testem t Studenta dla rozkładów normalnych, bądź testem U Manna Whitneya w przypadkach odchylenia od rozkładu normalnego. Za krytyczny poziom istotności przyjęto standardowo wartość $p < 0,05$ a poziomy istotności oznaczano odpowiednio: * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$. Dla wyników nieistotnych statystycznie użyto oznaczenia „ns”.

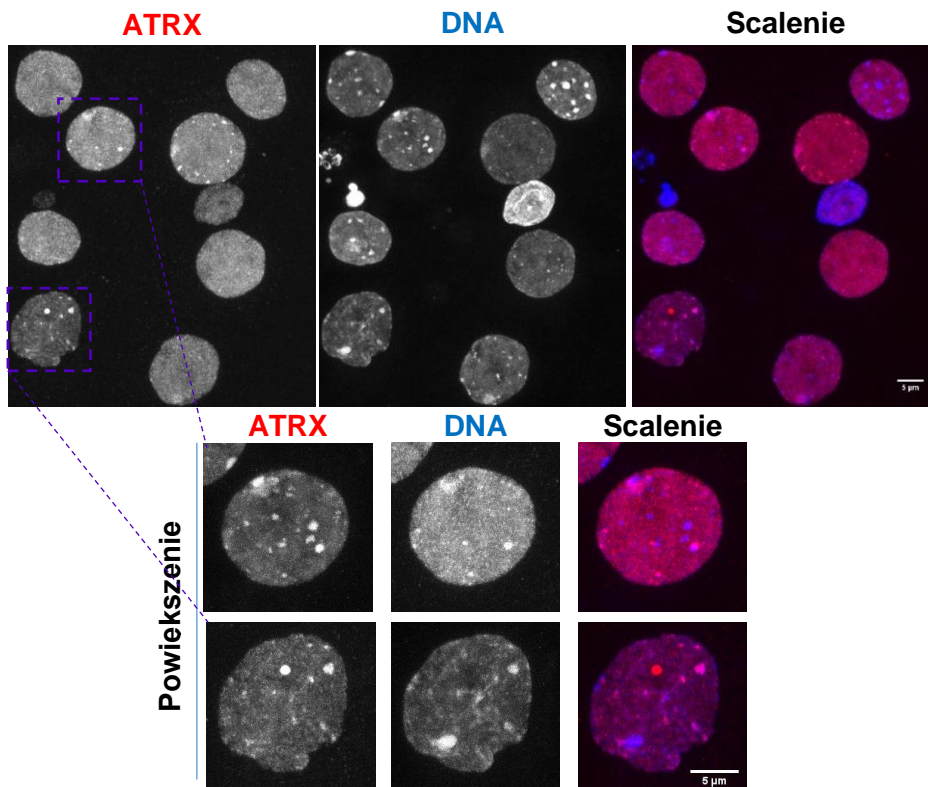
5. Wyniki

5.1 Lokalizacja białka ATRX w neuronach hipokampalnych szczura

Jak opisano w rozdziale 1.7 Wstępu większość badań nad białkiem ATRX w komórkach zdolnych do podziału wskazuje na jego lokalizację w powtarzalnych, heterochromatycznych regionach genomu. W tych miejscach ATRX odgrywa pomocniczą rolę w szerokim zakresie procesów jądrowych, ułatwiając replikację, modyfikację chromatyny i transkrypcję. Badania opisane w niniejszej rozprawie dotyczą neuronów - komórek terminalnie zróżnicowanych, niepodlegających dalszym podziałom.

5.1.1 Lokalizacja białka ATRX w niepobudzonych neuronach hipokampalnych szczura

W celu zbadania lokalizacji białka ATRX w dojrzałych neuronach hipokampalnych pochodzących z 14 dnia hodowli *in vitro* (DIV 14) przeprowadzono barwienie z użyciem przeciwciała specyficznego rozpoznającego białko ATRX (Ryc. 5.1). Białko ATRX w niepobudzonych neuronach hipokampalnych szczura występuje w jądrze komórkowym w rozproszeniu w całej objętości jądra. Jego zagęszczenie występuje w ciałku Barra. Ponadto zagęszczenia ATRX występują z zagęszczeniami heterochromatyny (DNA foci i/lub chromocentra), jednak nie jest to regułą, ponieważ zaobserwowałam zarówno chromocentra z kolokalizacją ATRX oraz chromocentra pozbawione ATRX. Poza chromocentrami ATRX tworzy także skupienia w innych obszarach chromatyny, widoczne na Rycinie 5.1 jako skondensowane znakowanie ATRX. W jąderku zaobserwować można nieopisane dotąd kuliste struktury jąderkowe silnie wyznakowane ATRX.

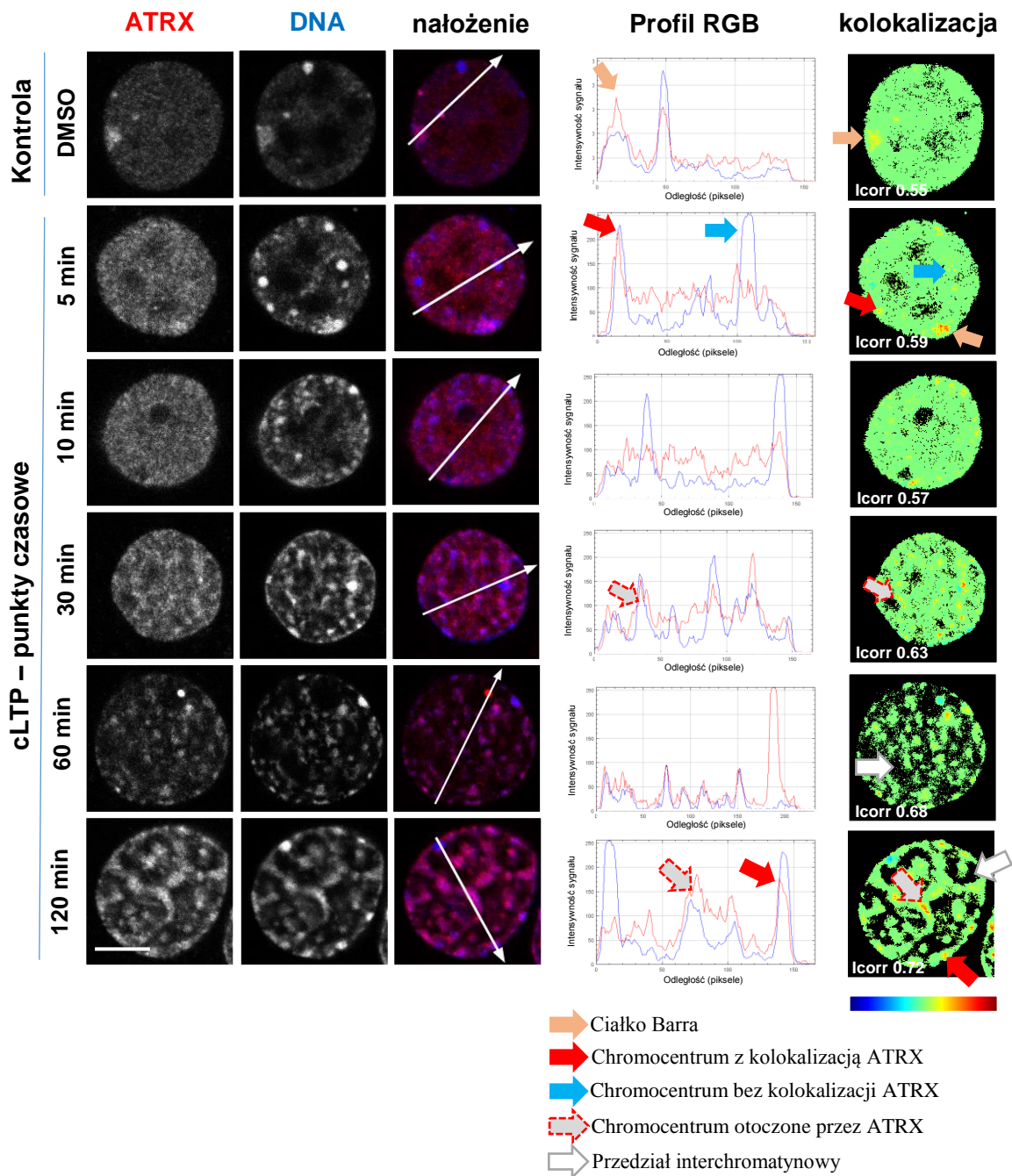


Rycina 5.1. Lokalizacja białka ATRX w jądrze niepobudzonych neuronów hipokampa. Znakowanie immunofluorescencyjne białka ATRX (czerwony), DNA (niebieski), uwidocznione na obrazach z mikroskopu konfokalnego. Obrazy są wynikiem scalenia warstw w osi Z. Dolny panel przedstawia powiększenie wybranych reprezentatywnych jąder neuronów. Skala 5 µm.

5.1.2 Lokalizacja białka ATRX w jądrach pobudzonych neuronów hipokampalnych szczura w modelu chemicznie wywołwanego LTP

Wykazaliśmy, że w wyniku pobudzenia chromatyna neuronów podlega globalnej restrukturyzacji i proces ten jest zależny od deacetylazy HDAC1 (Grabowska i in., 2022). W wyniku stymulacji hipokampalnych neuronów cLTP dochodzi do rearanżacji chromatyny. Proces ten zaczyna się bezpośrednio tuż po indukcji pobudzenia i manifestuje się początkowo formowaniem skupisk skondensowanej chromatyny (DNA foci). Wraz z trwaniem pobudzenia dochodzi do coraz silniejszego upakowania DNA w dobrze rozpoznawalne domeny. Zmiany te dotyczą zarówno chromatyny położonej centralnie, jak i tej zlokalizowanej tuż pod otoczką jądrową.

Wzór znakowania ATRX wykazuje kolokalizację przy kondensującej się chromatynie (Rycina 5.2). Wraz ze wzrostem czasu pobudzenia dochodzi do silniejszej kolokalizacji ATRX i DNA. Uwagę zwracają również obszary ze skupieniem białka ATRX, w których nie ma silnie skondensowanej chromatyny.

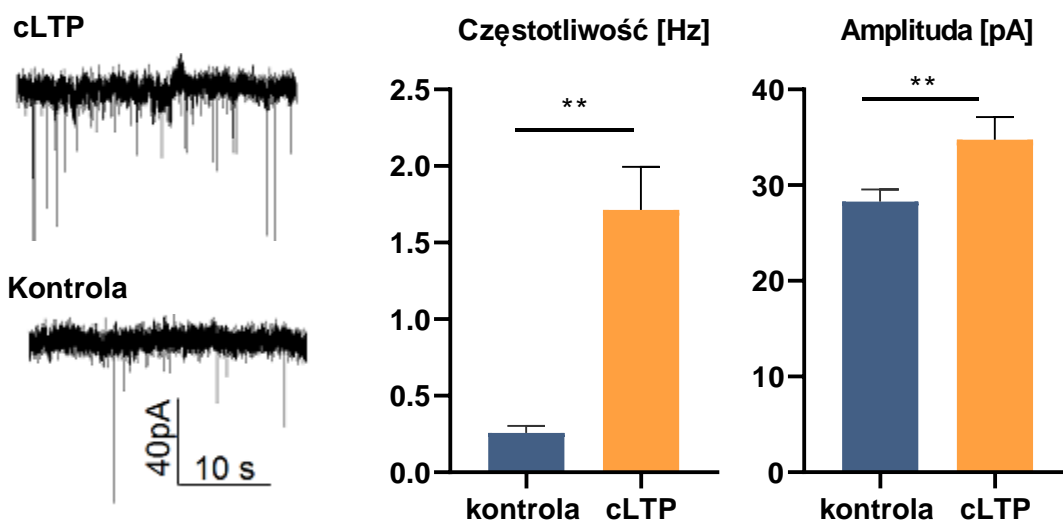


Rycina 5.2. Lokalizacja białka ATRX w jądrze pobudzonych neuronów Znakowanie immunofluorescencyjne białka ATRX (czerwony) oraz DNA (niebieski) uwidocznione na obrazach z mikroskopu konfokalnego. Obrazy prezentują pojedynczą warstwę obrazu konfokalnego o grubości 0,21 μm która pochodzi ze środka jądra. W pierwszym rzędzie zaprezentowano przykładową komórkę kontrolną, w której wzór ATRX rozproszony jest w całym jądrze i skupia się przy chromocentrach. Kolejne rzędy prezentują punkty czasowe pobudzenia cLTP. Wraz ze wzrostem skondensowania chromatyny dochodzi do skondensowania wzoru ATRX, co dodatkowo zobrazowano za pomocą profilu RGB, gdzie oś x prezentuje przekrój jądra, zgodne z zaznaczeniem strzałki, a oś y intensywność sygnału fluorescencyjnego. Analiza kolokalizacji zaprezentowana na obrazach z mapą ciepła wraz z zaznaczonymi wartościami współczynnika Icorr na obrazach. Skala 5 μm .

5.3 Potwierdzenie zaistnienia pobudzenia chemicznego LTP

5.3.1 Rejestracja miniaturowych prądów postsynaptycznych (mEPSC)

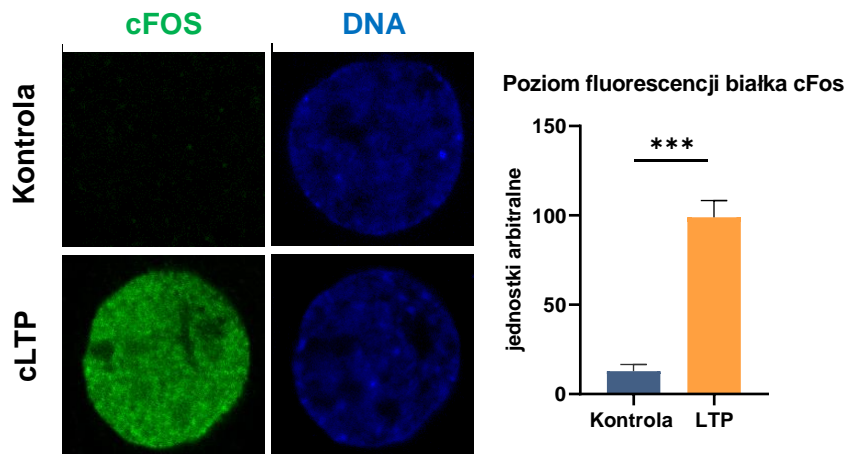
Aby zweryfikować, czy w moich warunkach doświadczalnych, po pobudzeniu cLTP dochodzi do charakterystycznych dla LTP zmian w częstotliwości i amplitudzie miniaturowych prądów postsynaptycznych, dokonałam pomiarów elektrofizjologicznych na skrawkach organotypowych szurzego hipokampa. Przy wykorzystaniu techniki „*patch clamp*” w konfiguracji „*whole cell*”, w trybie stabilizacji napięcia, dokonałam pomiarów elektrofizjologicznych miniaturowych prądów postsynaptycznych (mEPSC). Zgodnie z przewidywaniami, po wywołaniu cLTP obserwuje się wzrost amplitudy prądów, a także wzrasta ich częstotliwość. Jest to zgodne z założeniem, iż pobudzenie synaptyczne w wyniku zmian plastycznych jest coraz silniejsza. Wzmocniony impuls nerwowy może być łatwiej przekazywany, co stanowi podstawowe założenia modelu LTP.



Rycina 5.3. Potwierdzenie wywołania pobudzenia neuronów cLTP. Wyniki pomiarów elektrofizjologicznych hipokampalnych komórek regionu CA3 zmierzonych metodą *patch clamp*. Po lewej przebiegi przykładowych miniaturowych prądów postsynaptycznych dla kontroli DMSO oraz po dwugodzinnej stymulacji cLTP. Po prawej, wykresy przedstawiające średnie wartości częstotliwości (lewy wykres) oraz amplitudy (prawy wykres) dla kontroli (n=5) przedstawionej na słupku w kolorze niebieskim oraz po stymulacji cLTP (n=5) przedstawione na słupku w kolorze pomarańczowym. Wyniki zostały przeanalizowane testem t-Studenta, a istotność statystyczna przedstawiona w postaci gwiazdek nad wykresem. Słupki błędów prezentują wartości SEM, ** p<0,01.

5.3.2 Analiza poziomu białka cFOS w pobudzeniu cLTP

Pobudzenie neuronów cLTP skutkuje szybką ekspresją genów wczesnej odpowiedzi. Przykładem takiego genu jest *cFOS*, którego poziom rośnie po stymulacji komórek, gen ten uznawany jest zatem jako wskaźnik pobudzenia (Kaczmarek, 1992). Sprawdziłam więc, czy w zastosowanym modelu pobudzenia cLTP dochodzi do wzrostu ekspresji białka cFOS. W stanie spoczynkowy poziom białka cFOS jest niezauważalny na obrazach konfokalnych przedstawionych na Ryc 5.4. (górny panel). Dolny panel przedstawia komórki stymulowane cLTP (120 min. od rozpoczęcia stymulacji), a poziom cFOS (kolor zielony) wzrasta, co zostało zmierzone, jako intensywność fluorescencji przy użyciu programu ImageJ.

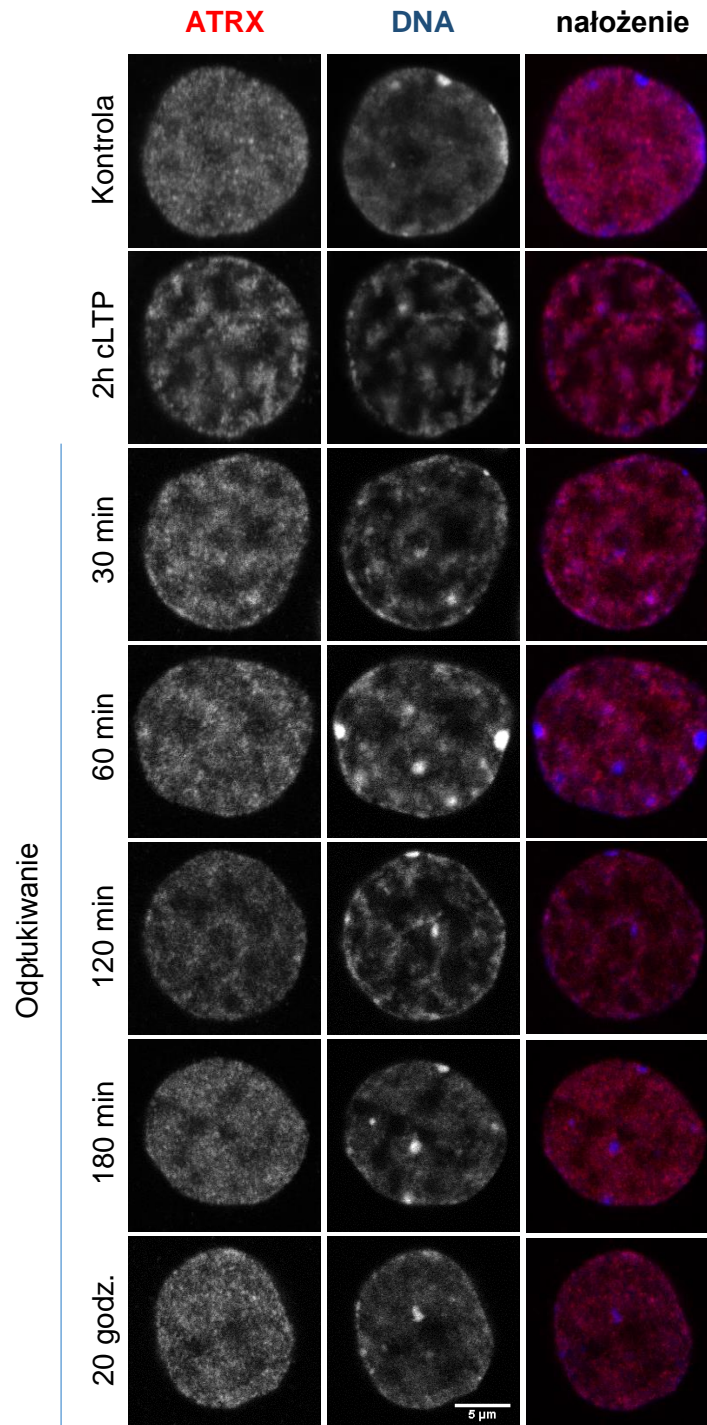


Rycina 5.4. Znakowanie na obecność białka cFOS przed i po pobudzeniu cLTP w neuronach hipokampa hodowanych *in vitro*. Znakowanie immunofluorescencyjne białka cFOS (zielony) oraz DNA (niebieski) uwidocznione na obrazach z mikroskopu konfokalnego. Przedstawiony obraz pochodzi ze skanowania pojedynczej warstwy preparatu o grubości 0,21 μm ze środka jądra. Górny panel przedstawia kontrolne komórki, dolny po dwugodzinnej stymulacji cLTP. Skala 5 μm . W wyniku pobudzenia neuronów hipokampalnych cLTP przez dwie godz. dochodzi do wzrostu ekspresji białka cFOS, które widoczne jest w całej objętości jądra komórkowego. W stanie spoczynkowym (kontrola DMSO) poziom białka cFOS jest niemalże niewidoczny. Wykres słupkowy przedstawia średni poziom fluorescencji dla komórek kontrolnych DMSO (N=3, n=25) reprezentowanych kolorem niebieskim. Słupki cLTP w kolorze pomarańczowym, (N=3, n=24). Na osi y przedstawiono arbitralne wartości fluorescencji zmierzonej w programie ImageJ. Wyniki przeanalizowano testem U Manna-Whitneya a poziom istotności statystycznej przedstawiono w postaci gwiazdek nad SEM. *** p<0,001.

5.3.3 Analiza odwracalności skutków cLTP

Celem zbadania, czy zmiany zachodzące w organizacji struktury chromatyny po pobudzeniu są odwracalne oraz jak zmienia się wzór znakowania białka ATRX

towarzyszący tym zmianom, przeprowadzono odpłukiwanie odczynników do cLTP z neuronów poddanych uprzednio dwugodzinnej stymulacji. Zaobserwowano, że wzór chromatyny ze skupionego w liczne chromocentra i wokół otoczki perinukleolarnej rozluźnia się. Zmianom ulega również wzór znakowania ATRX. Po odpłukaniu mieszaniny do cLTP wzór ATRX pozostaje skupiony wokół chromatyny i powoli powraca do wyjściowego (rozproszonego w całym jądrze), jest to jednak proces wolniejszy niż w przypadku samej chromatyny. Na Ryc.5.5 widać, iż nawet po 180 min. od odpłukania odczynników cLTP wzór znakowania ATRX nadal jest bardziej skoncentrowany w niektórych obszarach (prawdopodobnie w tych, w których wcześniej była silnie skondensowana chromatyna).



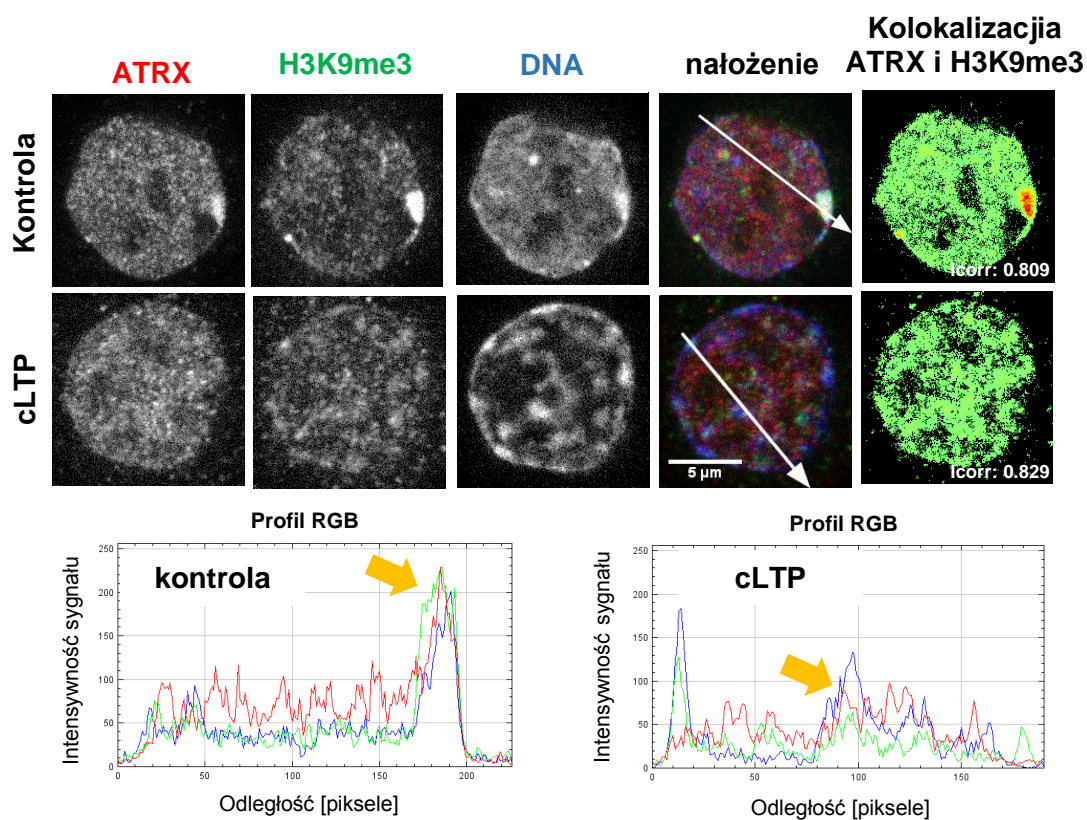
Rycina 5.5. Jądrowa lokalizacja ATRX względem chromatyny po odpłukiwaniu odczynników do cLTP. Znakowanie anti-ATRX(czerwony) uwidocznione na obrazach z mikroskopu konfokalnego. Chromatynę jądra komórkowego zabarwiono barwnikiem Hoechst (niebieski). Przedstawiony obraz pochodzi ze skanowania pojedynczej warstwy preparatu o grubości 0,21 μm ze środka jądra. Kolumny przedstawiają znakownia (od lewej) na ATRX, DNA oraz nałożenie obu kanałów, po dwugodzinnym pobudzeniu cLTP a następnie w wybranych punktach czasowych po odpłukaniu mieszaniny do cLTP Skala 5 μm.

5.4 Kolokalizacja ATRX z markerami modyfikacji histonów w jądrze neuronów hipokampalnych

Zmianom konformacji chromatyny towarzyszą modyfikacje histonów. Sprawdzono, czy wzór znakowania ATRX kolokalizuje z modyfikacjami histonów. Przykładowe zdjęcia wybranych modyfikacji podsumowano na Ryc. 5.6.

5.4.1 Heterochromatyna konstytutywna

Trimetylacja lizyny 9 na histonie 3 (H3K9me3) jest markerem chromocentrow – heterochromatyny konstytutywnej, czyli obszarów chromatyny najsilniej skondensowanej, która nie ulega transkrypcji. W niepobudzonych neuronach hipokampalnych *in vitro* znakowanie na ATRX oraz H3K9me3 wykazuje kolokalizację, co świadczy o tym iż ATRX obecny jest na chromatynie nieaktywnej transkrypcyjnie. Po pobudzeniu cLTP struktura chromatyny ulega zmianie, chromocentra pozostają jednak skondensowane, również poziom trimetylacji H3K9 pozostaje na podobnym poziomie jak przed pobudzeniem.

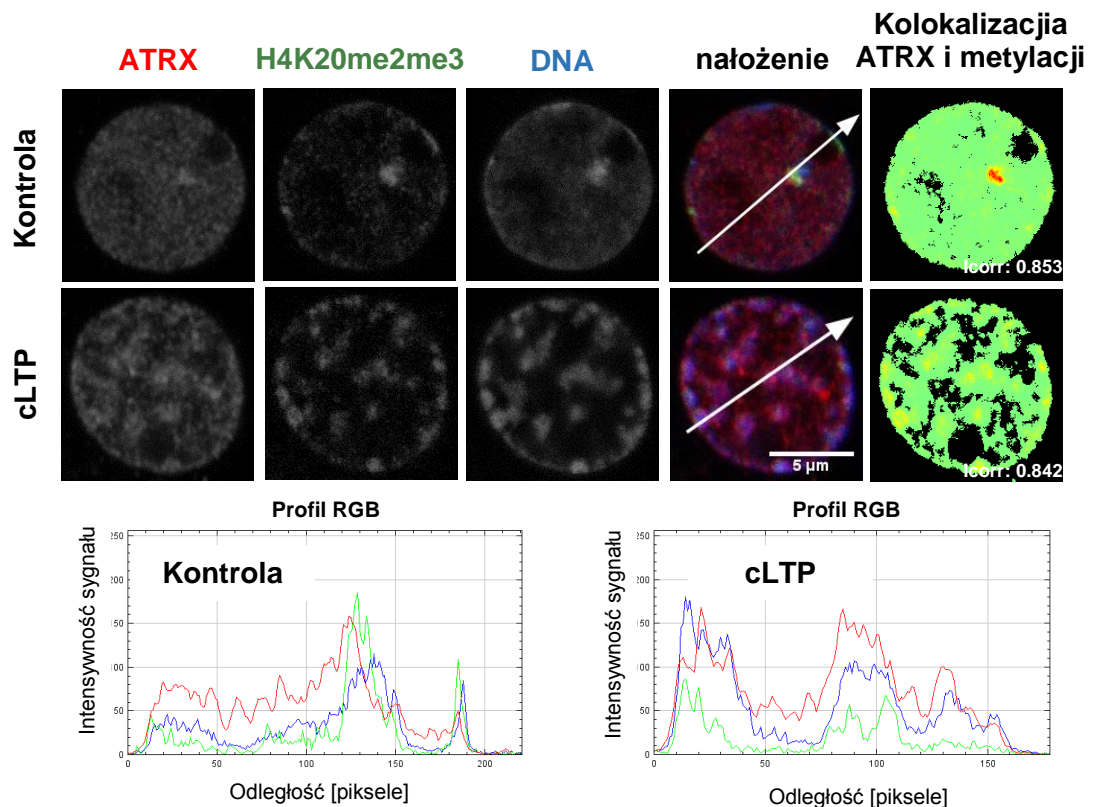


Rycina 5.6. Lokalizacja ATRX względem chromocentrow (nieaktywnej transkrypcyjnie chromatyny). Znakowanie anti-ATR X (czerwony), anti H4K9me3 (zielony) oraz DNA (niebieski) w kontroli (DMSO) oraz po 2 godz. pobudzeniu cLTP uwidocznione na obrazach

z mikroskopu konfokalnego. Przedstawione obrazy pochodzą ze skanowania pojedynczej warstwy preparatu o grubości 0,21 μm . Na scaleniu pojedynczych warstw kanałów zaznaczono przebieg linii do analizy profilu RGB. Wykresy RGB przedstawiają kolokalizację ATRX względem nieaktywnej transkrypcyjnie chromatyny w warunkach kontrolnych i po pobudzeniu. Oś x reprezentuje odległość (mierzona w pikselach) zgodnie z zaznaczoną linią na scalonym obrazie, Oś y przedstawia poziom fluorescencji dla kanału czerwonego, zielonego i niebieskiego. Żółta strzałka wskazuje kolokalizację ATRX w chromocentrach. Skala 5 μm .

5.4.2 Chromatyna nieaktywna transkrypcyjnie

Trimetylacja i dimetylacja lizyny 20 w histonie 4 (H4K20me2me3) jest znacznikiem transkrypcyjnie nieaktywnej chromatyny. W komórkach kontrolnych (niepobudzonych) obserwujemy kolokalizację tego markera (Ryc. 5.7), m.in. w chromocentrach oraz jako rozproszony wzór w całej objętości jądra. Po pobudzeniu dochodzi do zmiany wzoru metylacji histonu, modyfikacja ta staje się bardziej skupiona, zwłaszcza w obszarach przy skondensowanej chromatynie.



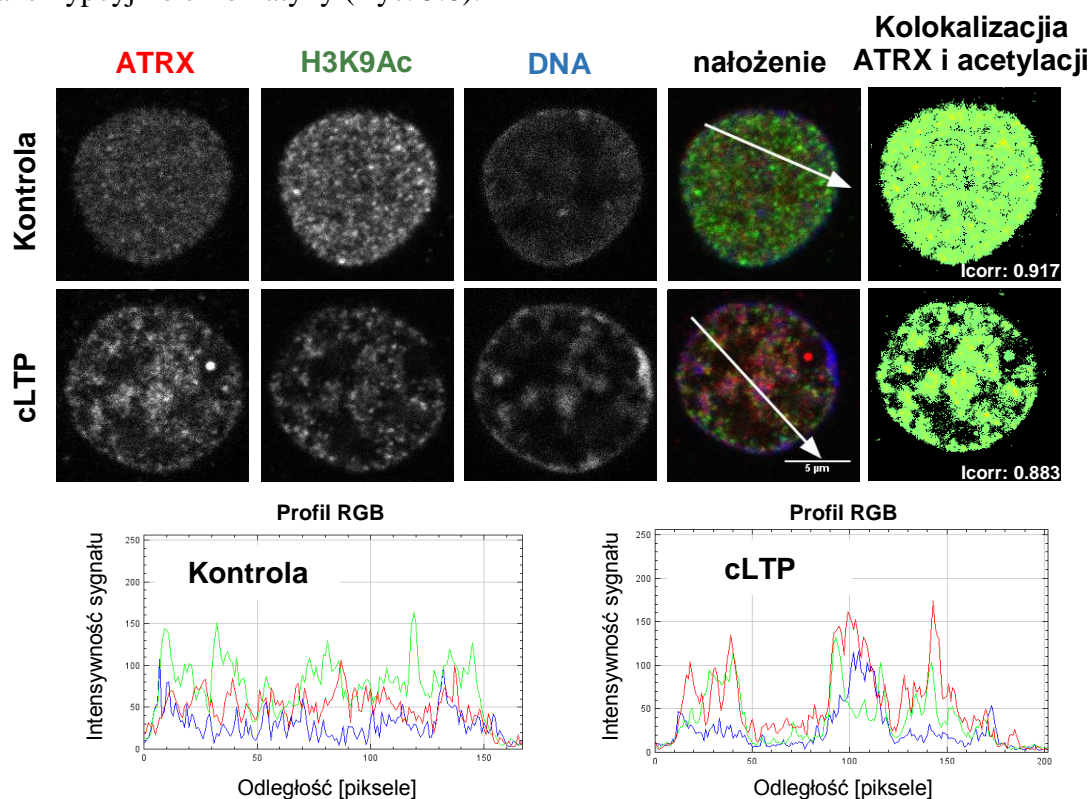
Rycina 5.7. Lokalizacja ATRX względem nieaktywnej transkrypcyjnie chromatyny. Znakowanie anti-ATRAX (czerwony) oraz anti H4K20me2me3 (zielony) w kontroli (DMSO) oraz po 2 godz. pobudzeniu cLTP uwidocznione na obrazach z mikroskopu konfokalnego. Chromatynę jądra komórkowego zabarwiono Hoechst (niebieski). Przedstawione obrazy pochodzą ze skanowania pojedynczej warstwy preparatu o grubości 0,21 μm , ze środka jądra. Wyniki kolokalizacji ATRX oraz H4K20me2me3 przeanalizowano za pomocą „wtyczki” *colocalization colormap* wraz z podaną wartością Icorr. Na nałożeniu pojedynczych warstw kanałów zaznaczono przebieg linii do analizy profilu RGB. Wykresy RGB przedstawiają

kolokalizację ATRX względem nieaktywnej transkrypcyjnie chromatyny w warunkach kontrolnych i po pobudzeniu. Oś x reprezentuje odległość zgodnie z zaznaczoną linią na scalonym obrazie, oś y przedstawia poziom fluorescencji dla kanału czerwonego, zielonego i niebieskiego. Skala 5 μm .

Przyglądając się znakowaniu ATRX oraz metylacji wyraźnie widać kolokalizację w stanie bazalnym w silnie skondensowanym regionie DNA. Po pobudzeniu uwagę zwraca fakt, iż ATRX współwystępuje z metylacją lizyny 20 na histonie 4, ale (podobnie jak w przypadku acetylacji) występują także obszary dużego skupienia ATRX bez wyraźnego skupienia H4K20me2me3.

5.4.3 Chromatyna aktywna transkrypcyjnie

Acetylacja lizyny 9 na histonie 3 (H3K9Ac) jest znacznikiem transkrypcyjnie aktywnej chromatyny. W niepobudzonych (kontrolnych komórkach) wzór acetylacji jest rozproszony, miejscami tworząc niewielkie skupiska, podobnie jak wzór ATRX. Po pobudzeniu (cLTP) acetylacja zlokalizowana jest w miejscach aktywnej transkrypcyjnie chromatyny (Ryc. 5.8).



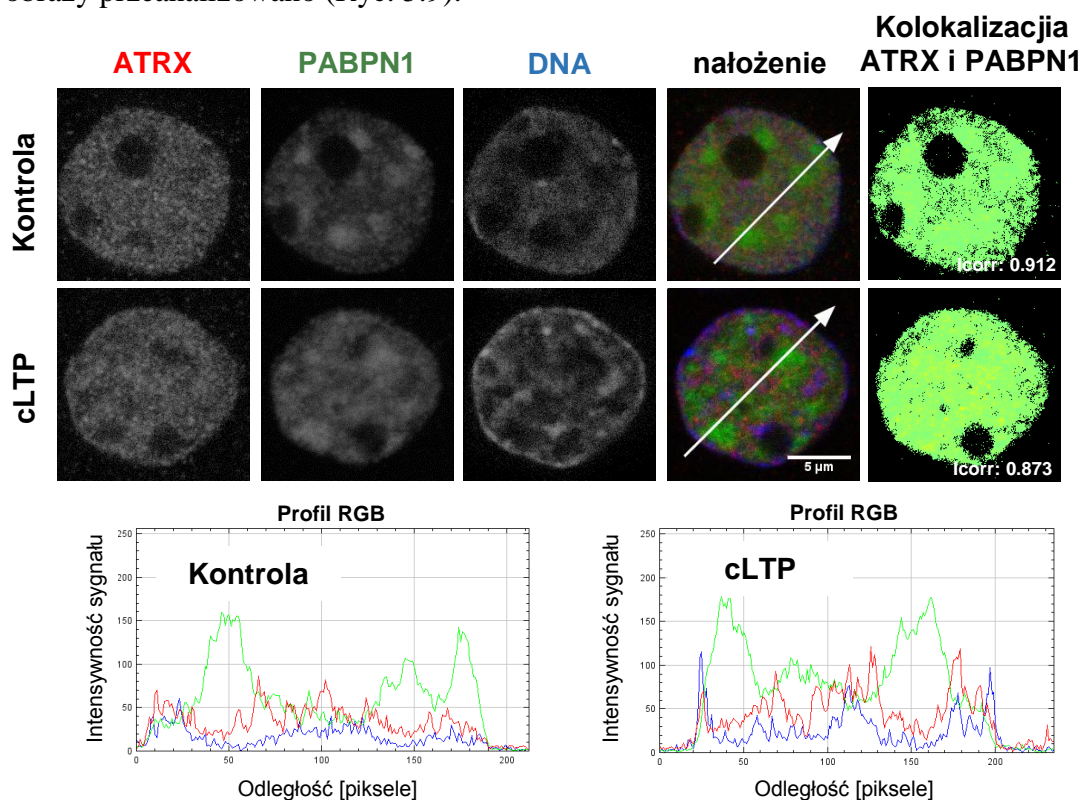
Rycina 5.8. Lokalizacja ATRX względem aktywnej transkrypcyjnie chromatyny. Znakowanie anti-ATRAX (czerwony) oraz anti-H3K9Ac (zielony) w kontroli (DMSO) oraz po 2 godz. pobudzeniu cLTP uwidocznione na obrazach z mikroskopu konfokalnego w skali szarości

celem lepszego kontrastu. Chromatynę jądra komórkowego zabarwiono barwnikiem Hoechst (niebieski). Przedstawione obrazy pochodzą ze skanowania pojedynczej warstwy preparatu o grubości 0,21 μm pochodzącej ze środka jądra komórkowego. Wyniki kolokalizacji ATRX oraz H3K9Ac przeanalizowane za pomocą wtyczki „colocalization colormap” wraz z podaną wartością Icorr. Na nałożeniu pojedynczych warstw kanałów zaznaczono przebieg linii do analizy profilu RGB. Wykresy RGB przedstawiają kolokalizację ATRX względem aktywnej transkrypcyjnie chromatyny w warunkach kontrolnych i po pobudzeniu. Oś x reprezentuje odległość zgodnie z zaznaczoną linią na scalonym obrazie, Oś y przedstawia poziom fluorescencji dla kanału czerwonego, zielonego i niebieskiego. Skala 5 μm .

Co ciekawe wzór znakowania ATRX oraz acetylacji kolokalizuje, co widać analizując profil RGB. Acetylacja wyraźnie gromadzi się w obszarach blisko granic skondensowanej chromatyny, gdzie jest markerem euchromatyny. Wzór ATRX kolokalizuje z tymi obszarami, co wskazuje na rolę białka ATRX, ważną przy aktywacji transkrypcji po pobudzeniu synaptycznym.

5.4.4 Kolokalizacja ATRX z markerem przestrzeni interchromatynowej

W jądrze komórkowym między skupieniami chromatyny występuje tzw. przestrzeń interchromatynowa, która jest wzbogacona w czynniki splicingowe pre-mRNA. Przykładem znacznika tego obszaru jądra jest białko PABPN1, które jest czynnikiem dojrzewania końca 3' mRNA. Celem sprawdzenia, czy białko ATRX kolokalizuje z tym obszarem jądra dokonano znakowania immunofluorescyjnego, a obrazy przeanalizowano (Ryc. 5.9).



Rycina 5.9. Lokalizacja ATRX względem przestrzeni interchromatynowej (cętki jądrowe). Znakowanie anti-ATRX (czerwony) oraz anti-PABPN1 (zielony) w kontroli (DMSO) oraz po 2 godz. pobudzeniu cLTP uwidocznione na obrazach z mikroskopu konfokalnego. Chromatynę jądra komórkowego zbarwiono barwnikiem Hoechst (niebieski). Przedstawione obrazy pochodzą ze skanowania pojedynczej warstwy preparatu o grubości 0,21 μm . Wyniki kolokalizacji ATRX oraz PABPN1 przeanalizowane za pomocą „wtyczki” *colocalization colormap* wraz z podaną wartością I_{corr} . Na scaleniu pojedynczych warstw kanałów zaznaczono przebieg linii do analizy profilu RGB. Wykresy RGB przedstawiają kolokalizację ATRX względem cętek jądrowych w kontroli i w pobudzeniu. Oś x reprezentuje odległość zgodnie z zaznaczoną linią na skalonym obrazie, oś y przedstawia poziom fluorescencji dla kanału czerwonego, zielonego i niebieskiego. Skala 5 μm .

Zarówno w kontroli (DMSO), jak i po pobudzeniu wzór znakowania ATRX nie kolokalizuje z białkiem PABPN1, lokalizując się przy obrzeżach granic cętek jądrowych, co widać na wykresie RGB, zwłaszcza po pobudzeniu komórek cLTP.

5.5 Białko ATRX w jąderku neuronów

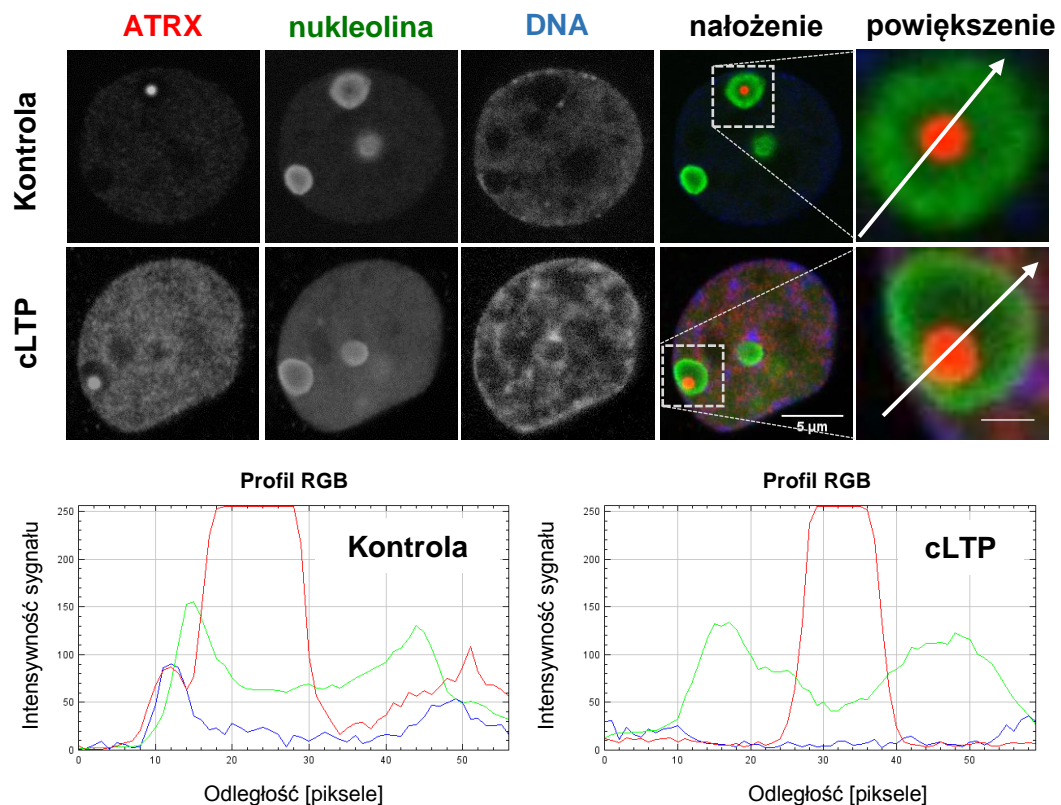
5.5.1 Identyfikacja jąderkowego ciała zawierającego ATRX

Znakowanie immunocytochemiczne celem obrazowania białka ATRX w jądrze pozwoliło mi na odkrycie w części analizowanych jąderek nieopisanego dotąd kulistego ciała zawierającego to białko. Ciała te charakteryzują się średnicą poniżej 1 μm , występują w niektórych neuronach w liczbie od 1 do 3 (bez zależności parzyście/nieparzyście); nazwałam tę strukturę ciałkiem ATRX. Zaobserwowałam, że liczba tych ciałek wzrasta po pobudzeniu cLTP lub wskutek infekcji wirusem. Brak danych literaturowych na temat funkcjonowania ATRX w jąderku zachęcił mnie do zbadania potencjalnej roli tego białka w tym regionie jądra.

Aby zobrazować potencjalne oddziaływania między jąderkowymi ciałkami ATRX, a innymi białkami jąderkowymi, wykonałam znakowania immunofluorescencyjne z zastosowaniem przeciwciał skierowanych przeciwko nukleolinie, która jest białkiem charakterystycznym dla jąderka, przeciw UBF w celu wyznaczenia centrum fibrylarnego (FC) jąderka, przeciw B23 do wyznaczenia obszaru granularnego (GC) jąderka, a także przeciw polimerazie RNA I celem sprawdzenia czy ATRX kolokalizuje w obszarze gdzie zachodzi aktywna transkrypcja. Wyniki przedstawiono na poniższych Rycinach 5.10 – 5.13.

5.5.1.1 Analiza współwystępowania białka ATRX z nukleoliną

Nukleolina jest jednym z najpowszechniej występujących białek w jąderku, zlokalizowana jest głównie w obszarze gęstego skłádnika włókniwego (DFC) oraz granularnego (GC) jąderka. Celem określenia, czy jąderkowe ciała ATRX kolokalizują z nukleoliną wykonano znakowanie immunofluorescencyjne, a wyniki przedstawiono na Rycinie 5.10. Jąderkowe ciało ATRX w zasadzie nie kolokalizuje z nukleoliną, lecz po pobudzeniu oba białka wydają się współwystępować na obrzeżach ciałek.

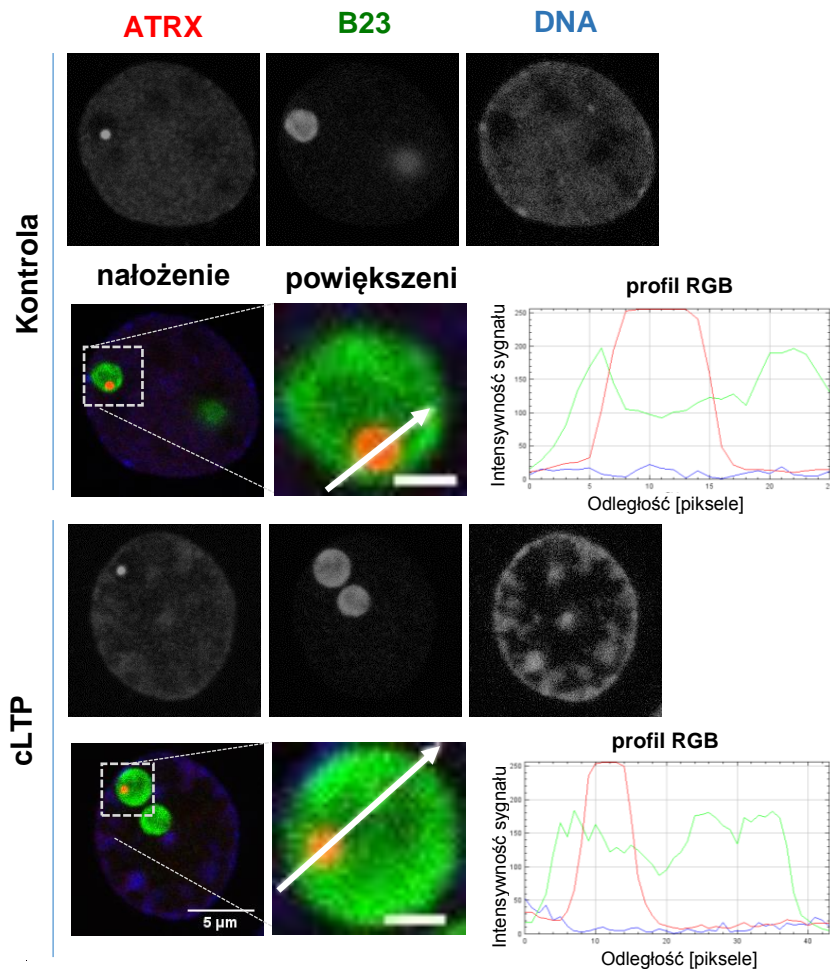


Rycina 5.10. Lokalizacja ATRX i nukleoliny. Znakowanie anti-ATR (czerwony) oraz anti-nukleolina (zielony) w kontroli (DMSO) oraz po 2 godz. pobudzeniu cLTP uwidocznione na obrazach z mikroskopu konfokalnego. Chromatynę jądra neuronów zabarwiono Hoechst (niebieski). Przedstawione obrazy pochodzą ze skanowania pojedynczej warstwy preparatu o grubości 0,21 μm , ze środka jądra. Na nałożeniu pojedynczych warstw kanałów zaznaczono fragment obrazu, który został następnie powiększony i zaprezentowany po prawej. Skala 5 μm i 1 μm dla powiększonego obrazu.

5.5.1.2 Analiza współwystępowania ATRX z B23

Białko B23 powszechnie występuje w centrum granularnym jąderka, pełniąc rozliczne funkcje, związane głównie z syntezą rybosomów. Celem określenia kolokalizacji białka ATRX z tym białkiem jąderkowym wykonałam znakowanie

immunofluorescencyjne, a następnie przeanalizowałam przy użyciu profilu RGB. Reprezentatywne obrazy przedstawione na Ryc. 5.11 oraz analiza profilu RGB uwidaczniają, że białko ATRX w zasadzie nie kolokalizuje z białkiem B23, choć oba białka wydają się kolokalizować na obrzeżach ciałek.

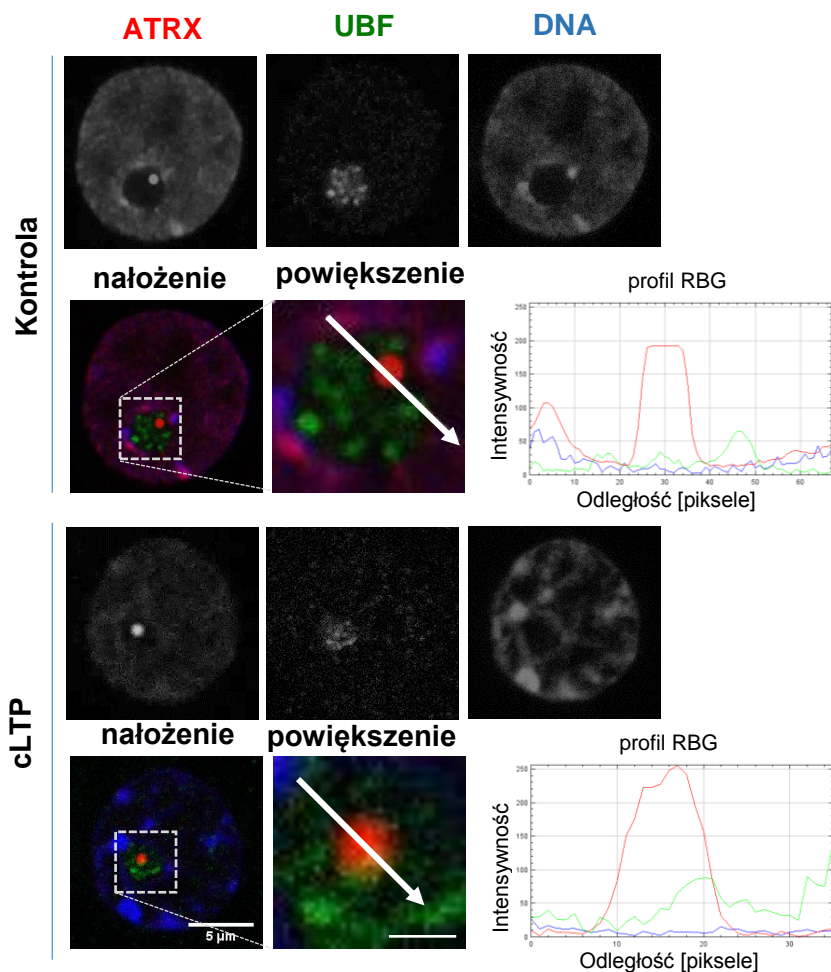


Rycina 5.11. Lokalizacja ATRX i B23. Znakowanie anti-ATRX (czerwony) oraz anti-B23 (zielony) w kontroli (DMSO) oraz po 2 godz. pobudzeniu cLTP uwidocznione na obrazach z mikroskopu konfokalnego. Chromatynę jądra komórkowego zabarwiono barwnikiem Hoechst (niebieski). Przedstawione obrazy pochodzą ze skanowania pojedynczej warstwy preparatu o grubości 0,21 μm, ze środka jądra. Na nałożeniu pojedynczych warstw kanałów zaznaczono fragment obrazu, który został następnie powiększony i zaprezentowany po prawej. Zaznaczona strzałka wyznacza przekrój jąderka, który został przeanalizowany profilem RGB. Na osi y poziom fluorescencji kanałów, na osi x odległość zgodnie z zaznaczoną strzałką. Skala 5 μm i 1 μm dla powiększonego obrazu.

5.5.1.3 Analiza współwystępowania ATRX z UBF

Białkiem charakterystycznym dla centrum fibrylarnego jest UBF, który odpowiada za transkrypcję genów rDNA. I podobnie jak dla nukleoliny i B23 znakowanie immunofluorescencyjne na białko ATRX oraz białko UBF nie wykazało w zasadzie

kolokalizacji, natomiast oba białka wydają się kolokalizować po pobudzeniu cLTP na obrzeżach ciała.

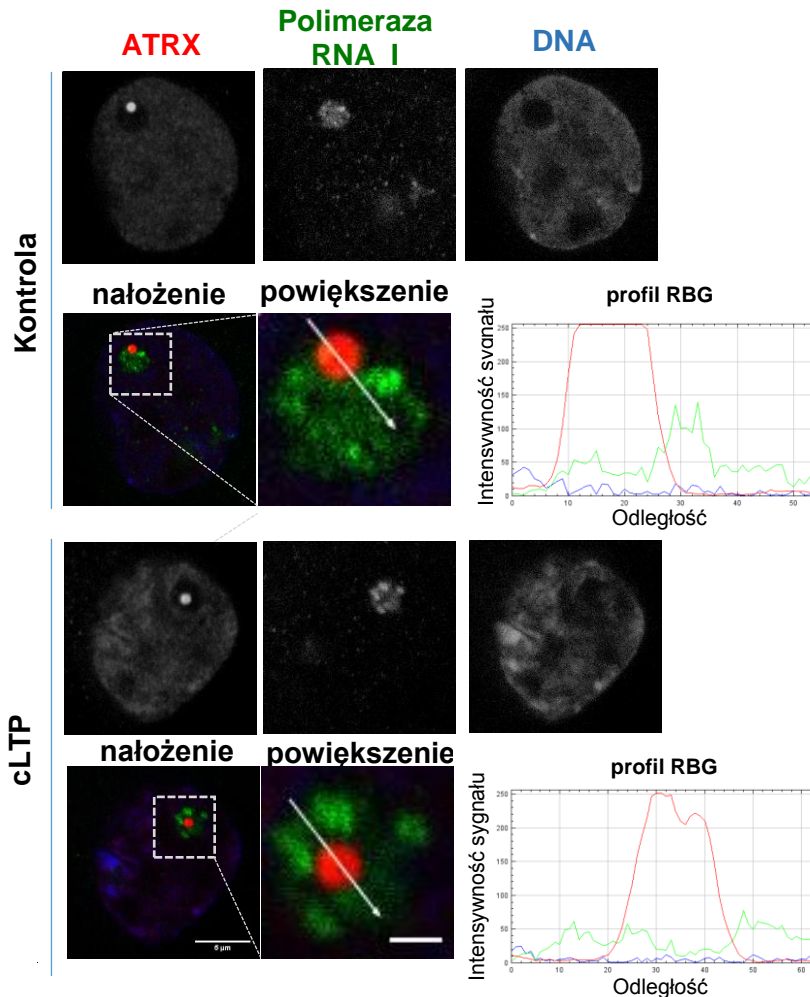


Rycina 5.12. Lokalizacja ATRX i białka UBF. Znakowanie anti-ATRX (czerwony) oraz UBF (zielony) w kontroli (DMSO) oraz po 2 godz. pobudzeniu cLTP uwidocznione na obrazach z mikroskopu konfokalnego. Chromatynę jądra komórkowego zabarwiono Hoechst (niebieski). Przedstawione obrazy pochodzą ze skanowania pojedynczej warstwy preparatu o grubości 0,21 μm . Na scaleniu pojedynczych warstw kanałów zaznaczono fragment obrazu, który został następnie powiększony i zaprezentowany po prawej. Zaznaczona strzałka wyznacza przekrój jąderka, który został przeanalizowany profilem RGB. Na osi y poziom fluorescencji kanałów, na osi x odległość zgodnie z zaznaczoną strzałką. Skala 5 μm i 1 μm dla powiększonego obrazu.

5.5.1.4 Analiza współwystępowania ATRX z polimerazą RNA I

Polimeraza RNA I to enzym wykorzystujący matrycę DNA do przepisywania informacji na RNA. W jąderku obszary, gdzie zachodzi intensywna transkrypcja rDNA są znakowane polimerazą RNA I. Dlatego barwienie na polimerazę RNA I oraz białko ATRX pozwoliło na analizę współwystępowania tych dwóch białek. Wyniki

przedstawione na Ryc. 5.13 wskazują, iż białko ATRX nie kolokalizuje z polimerazą RNA I ani w stanie spoczynkowym, ani w stanie pobudzenia, co widać na reprezentatywnych obrazach konfokalnych oraz na wykresach analizy profilu RGB.



Rycina 5.13. Lokalizacja ATRX i polimerazy RNA I. Znakowanie anty-ATRX (czerwony) oraz polimeraza RNA I (zielony) w kontroli (DMSO) oraz po 2 godz. pobudzeniu cLTP uwidocznione na obrazach z mikroskopu konfokalnego. Chromatynę jądra komórkowego zabarwiono Hoechst (niebieski). Przedstawione obrazy pochodzą ze skanowania pojedynczej warstwy preparatu o grubości 0,21 μm , ze środka jądra. Na nałożeniu pojedynczych warstw kanałów zaznaczono fragment obrazu, który został następnie powiększony i zaprezentowany po prawej. Zaznaczona strzałka wyznacza przekrój jąderka, który został przeanalizowany profilem RGB. Na osi y poziom fluorescencji kanałów, na osi x odległość zgodnie z zaznaczoną strzałką. Skala 5 μm i 1 μm dla powiększonego obrazu.

5.6 Współwystępowanie białka ATRX w jądrze z jego partnerami – CTCF i DAXX

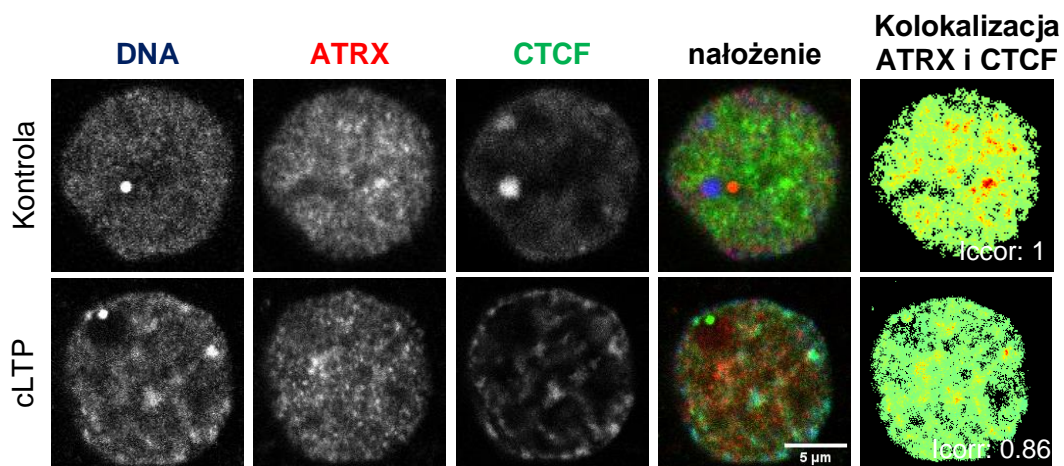
Wśród dotychczas opisanych partnerów białka ATRX szczególną uwagę zwracają zwłaszcza te białka, które również opisywane są jako biorące udział w przebudowie

chromatyny. Białkami takimi są CTCF (ang. *CCCTC-binding factor*) oraz DAXX (ang. *Death Domain Associated Protein*).

5.6.1 Analiza współwystępowania ATRX z CTCF

Białko CTCF jest kluczowym czynnikiem transkrypcyjnym i regulatorowym biorącym udział w regulacji ekspresji genów oraz w organizacji struktury chromatyny (Kim i in., 2015). Jest to wielodomenowe białko, które pełni istotną rolę w organizacji przestrzennej chromatyny oraz w kontrolowaniu dostępu do genów. Białko CTCF wiąże się z określonymi sekwencjami DNA, które zawierają charakterystyczne motywy CCCTC. Sekwencje te znajdują się w różnych miejscach w genomie, w tym w obszarach regulatorowych genów oraz w granicach domen chromosomowych, a wiążąc się z nimi białko CTCF może działać zarówno jako aktywator, jak i represor ekspresji genów, w zależności od kontekstu i jego lokalizacji w obrębie chromosomu (Kim i in., 2015).

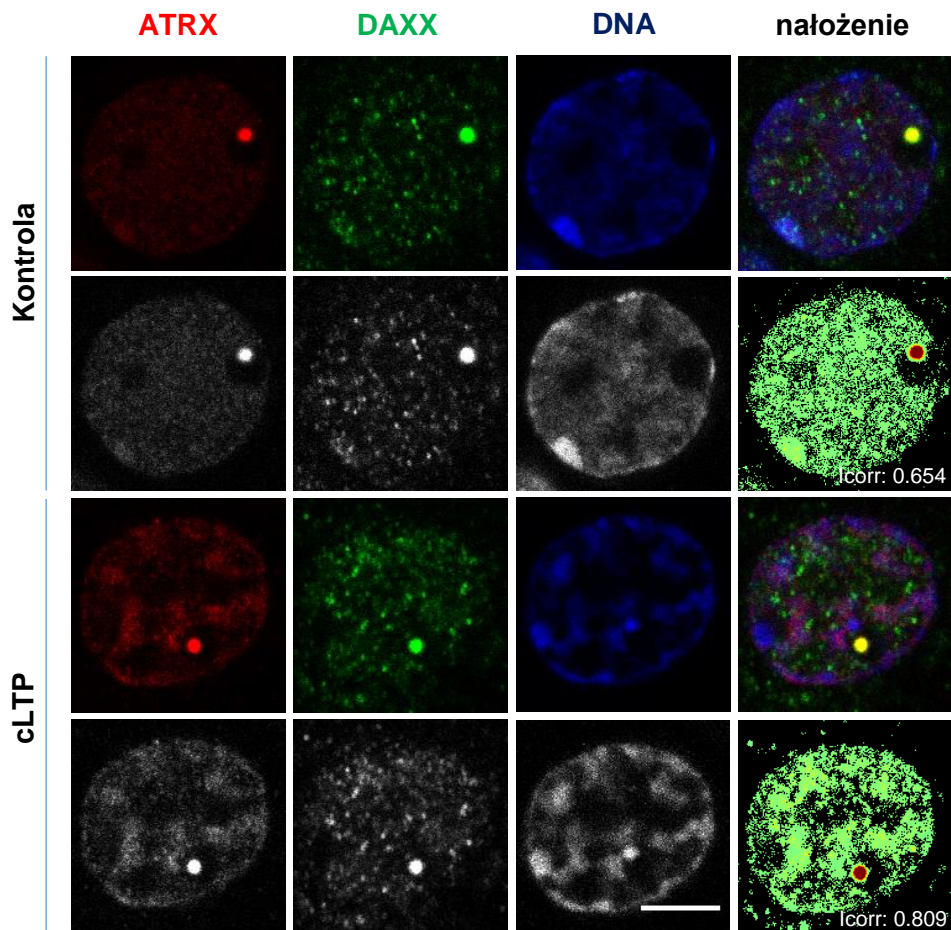
W celu określenia, czy w badanych przeze mnie neuronach CTCF oddziałuje z ATRX wykonałam znakowanie z wykorzystaniem przeciwciał anti-CTCF i anti-ATRX (Ryc. 5.14). Jak wynika z przedstawionych obrazów oba białka kolokalizują w stanie spoczynkowym neuronów, a lokalizacja wydaje się spadać w cLTP.



Rycina 5.14. Lokalizacja białka ATRX i białka CTCF. Znakowanie na ATRX (czerwony) oraz CTCF (zielony), DNA (niebieski) w stanie spoczynkowym (DMSO) oraz po 2 godz. pobudzeniu (cLTP). Skala 5 µm.

5.6.2 Analiza kolokalizacji ATRX z DAXX

Szereg znakowań immunocytochemicznych pozwolił mi na zdefiniowanie, iż ciała ATRX kolokalizują z białkiem Daxx (białko 6 związane ze śmiercią). Zostało ono po raz pierwszy opisane przy interakcji w cytoplazmie z klasycznym receptorem Fas, biorącym udział w regulacji apoptozy (Yang, 1997). To wielofunkcyjne białko zostało również opisane zarówno w cytoplazmie, jak i jądrze (brak jednak doniesień z jąderka) jako partner dla PML czy jako partner odpowiadający za depozycję histonu H3.3. Na Rycinie 5.15 przedstawiłam znakowania białka ATRX oraz DAXX w stanie spoczynkowym oraz po pobudzeniu cLTP.



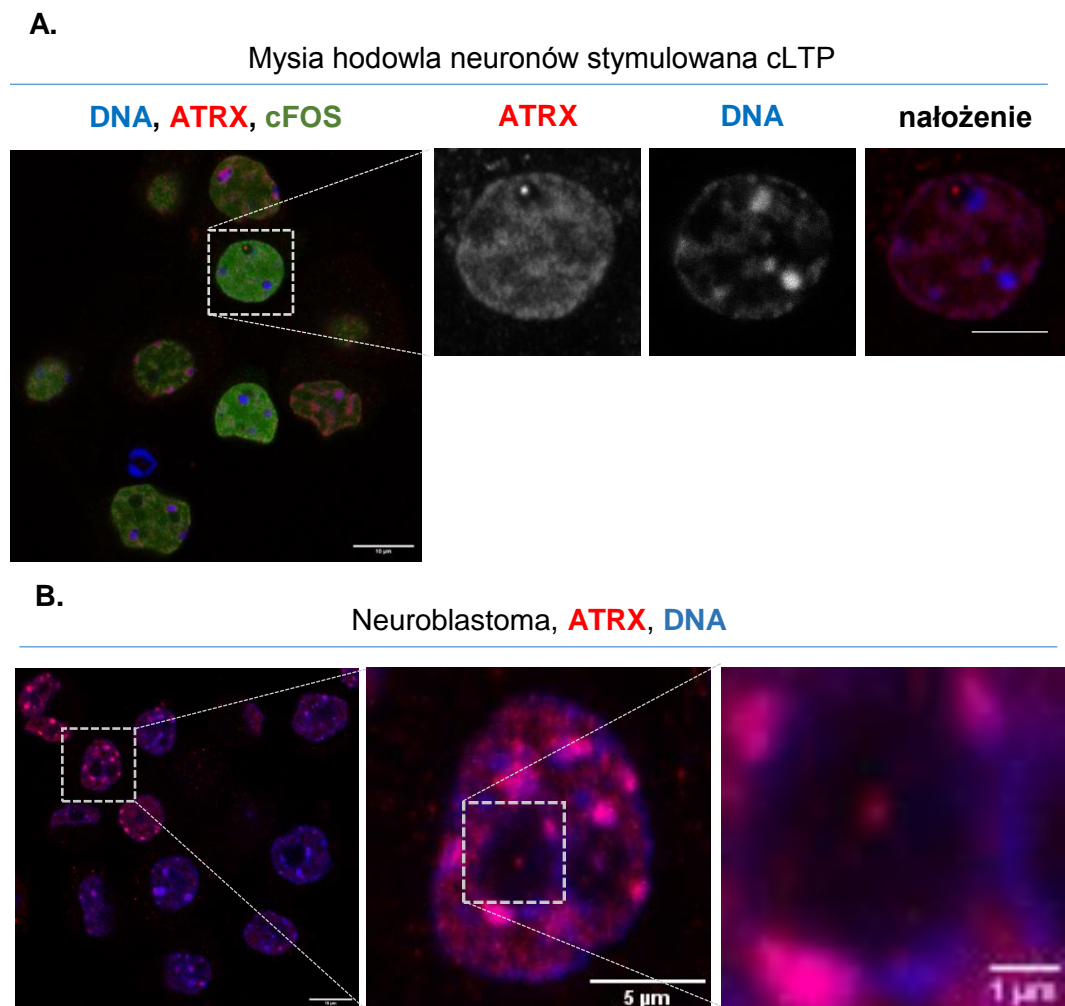
Rycina 5.15. Lokalizacja białka ATRX i białka DAXX. Znakowanie na ATRX (czerwony) oraz DAXX (zielony), DNA (niebieski) w stanie spoczynkowym (DMSO) oraz po 2 godz. pobudzeniu (cLTP). Pod kolorowymi obrazami te same warstwy zaprezentowane w skali szarości. Ciepła mapa kolokalizacji wskazuje na bliskie współwystępowanie ATRX i DAXX, zwłaszcza w jąderku gdzie silna kolokalizacja białka ATRX oraz DAXX wskazuje iż razem tworzą ciało jąderkowe. Skala 5 μ m.

Uzyskane obrazy wskazują, że ATRX i DAXX oddziałują również w ciałku ATRX, co może sugerować, iż biorą w nim udział w regulacji genów rDNA poprzez

wbudowywanie wariantu histonu H3.3, tak jak już to opisano w literaturze w kontekście regulacji chromatyny jądrowej, lub, w zupełnie nowym, nieopisanym jeszcze procesie.

5.6.3 Obecność jąderkowych ciałek ATRX w skrawkach mózgu myszy i szczura oraz w mysiej hodowli i linii komórkowej

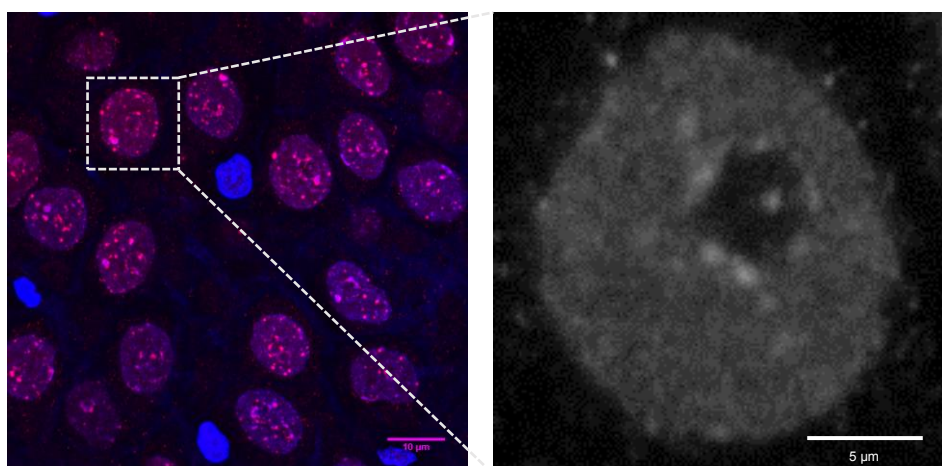
Opisane powyżej jąderkowe ciała ATRX zaobserwowałam w hodowli neuronów szczurzych, ale ich występowanie nie ogranicza się tylko do hodowli neuronów *in vitro*. Analogiczne struktury zaobserwowałam w mysiej hodowli hipokampalnej (Ryc.5.16A), a także w lini komórkowej nerwiaka zarodkowego (neuroblastoma) (Ryc. 5.16B).



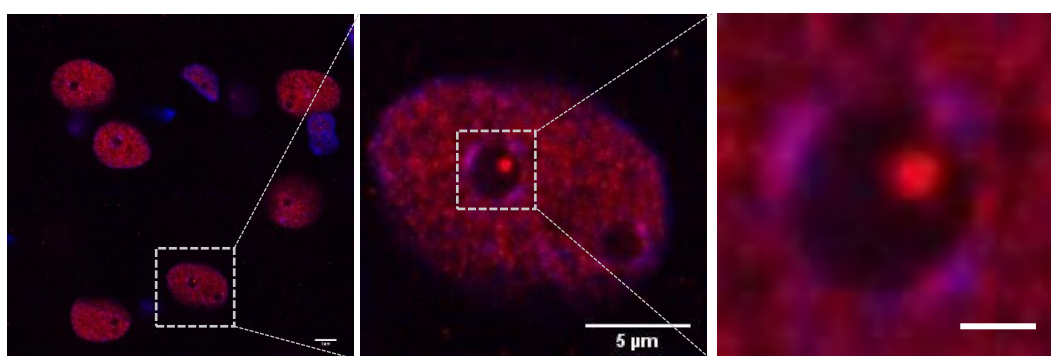
Rycina 5.16. Znakowanie ATRX w mysiej hodowli neuronów stymulowana chemicznym LTP oraz w linii komórkowej neuroblastomy. A. Przykładowe pole widzenia i wybrane przykładowe jądro z mysiej hodowli hipokampalnej po 2 godz. stymulacji cLTP, wyznakowane na ATRX (czerwony), cFOS (zielony) oraz DNA (niebieski). Ostatnia kolumna przedstawia nałożenie warstw ATRX i DNA. Skala 10 μm i 5 μm na powiększonym zdjęciu. **B.** Znakowanie na anti-ATRX (czerwony) oraz anti-DNA (niebieski), po prawej powiększone jądro komórkowe i dalej jądro w którym stwierdziłam obecność ciała ATRX.

Następnie postanowiłam sprawdzić, czy ciała ATRX występują w szczurzym hipokampie *in vivo*. W tym celu przeprowadziłam znakowanie immunohistochemiczne na skrawkach pochodzących z mózgu szczura poddanego stymulacji HFS (ang. *high frequency stimulation*) (Ryc.5.17A), preparaty uzyskałam dzięki uprzejmości Tambudzai Kanhemy Jacobsen z Uniwersytetu Bergen. Występowanie jąderkowych ciałek ATRX nie jest ogranicza się jedynie do formacji hipokampa. Udało mi się też zidentyfikować jąderkowe ciała ATRX również w innych strukturach mózgowia myszy takich, jak amygdala Ryc. 5.17B. Preparaty mysich mózgow uzyskałam dzięki uprzejmości dr Any Martin Gonzalez z Insytutu Nenckiego.

A. Szczurzy hipokamp, pole CA3, stymulacja LTP HFS, **ATRX** oraz **DNA**



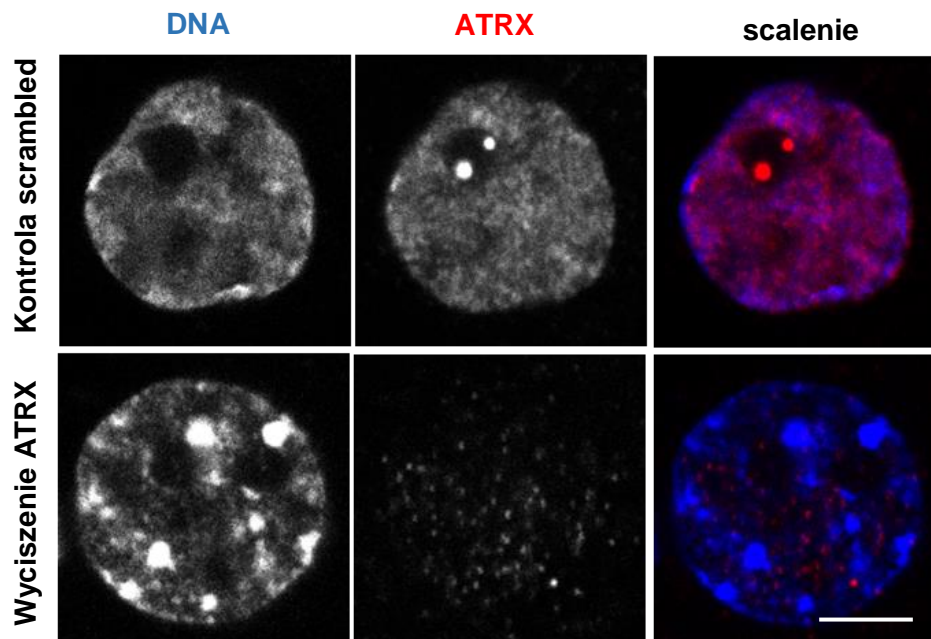
B. Mysz, Amygdala, warunkowanie strachem **ATRX** **DNA**



Rycina 5.17. Występowanie ciałek ATRX *in vivo* w przykładowych strukturach mózgu gryzoni. **A.** Komórki regionu CA3 szczurzego hipokampa po 1 godz. stymulacji HF LTP ATRX wyznakowany na czerwono, DNA na niebiesko. Obraz po prawej przedstawia powiększone jądro komórkowe z jąderkowym ciałkiem ATRX w skali szarości **B.** Obraz mysiej tkanki pochodzącej z regionu ciała migdałowatego, stymulowane poprzez doświadczenia z warunkowaniem strachem. ATRX na czerwono, DNA na niebiesko. Obrazy po prawej przedstawiają powiększone jądro i jąderko zgodnie z zaznaczeniem kwadratem. Skala 10 μm dla wyjściowych zdjęć oraz 5 μm i 1 μm dla powiększonych obrazów.

5.7 Wpływ wyciszenia *Atrx* na organizację chromatyny w jądrach neuronów

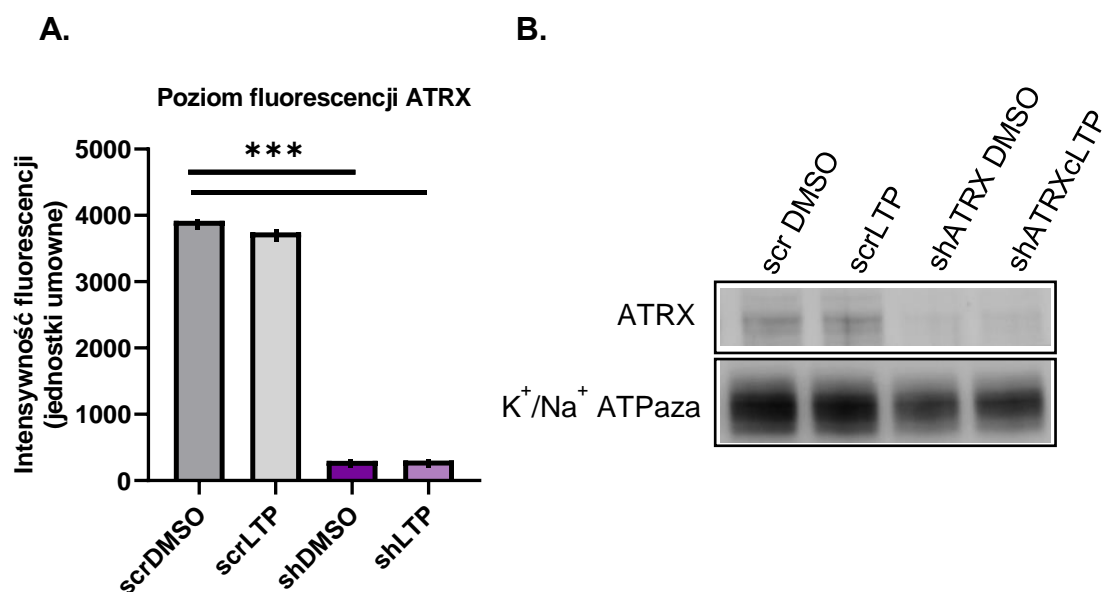
Za pomocą wektora lentiwirusowego, niosącego sekwencję szpilki RNA (shRNA, ang. *short hairspin RNA*) specyficznej dla szczurzego *Atrx* i jednocześnie sekwencję białka zielonej fluorescencji (GFP, ang. *Green Fluorescence Protein*), udało się wyciszyć *Atrx* na poziomie zarówno transkryptu, jak i białka (Ryc. 5.18 i 5.19). Wyciszenie *Atrx* skutkuje dramatycznymi zmianami w strukturze chromatyny (Ryc 5.18). Zauważyłam bardzo silną kondensację chromatyny, która formuje się w liczne foci DNA, co wskazuje, że dochodzi do nadmiernego upakowania materiału genetycznego. Nasuwa się wniosek, iż ATRX jako helikaza, jest niezbędna do „otwierania” chromatyny i zapobiegania jej nadmiernej kondensacji. Stąd też przy obniżeniu poziomu białka ATRX chromatyna jest silniej upakowana.



Rycina 5.18. Wyciszenie białka ATRX. Przykładowe jądra neuronów z wyciszonym białkiem ATRX (dolny wiersz) oraz kontrola (górnny wiersz). Od lewej znakowanie anty-ATR (czerwony), anty-DNA (niebieski) oraz nałożenie warstw. Wszystkie obrazy prezentują scalenie warstw w osi z, skala 5 μm .

Poziom wyciszenia *Atrx* zmierzyłam na obrazach konfokalnych w programie ImageJ, jak opisałam wcześniej w Metodach. Pomiarów dokonałam dla wszystkich grup eksperymentalnych (stan spoczynkowy i po pobudzeniu) transdukowanych wirusem wyciszającym *Atrx* lub wirusem zawierającym kontrolną sekwencję (scrambled, scr). Wyniki tych pomiarów wyraźnie wskazują, iż poziom wyciszenia jest bardzo wysoki, gdyż intensywność sygnału ATRX w grupie wyciszonej jest bliska zera (Ryc. 5. 19 A).

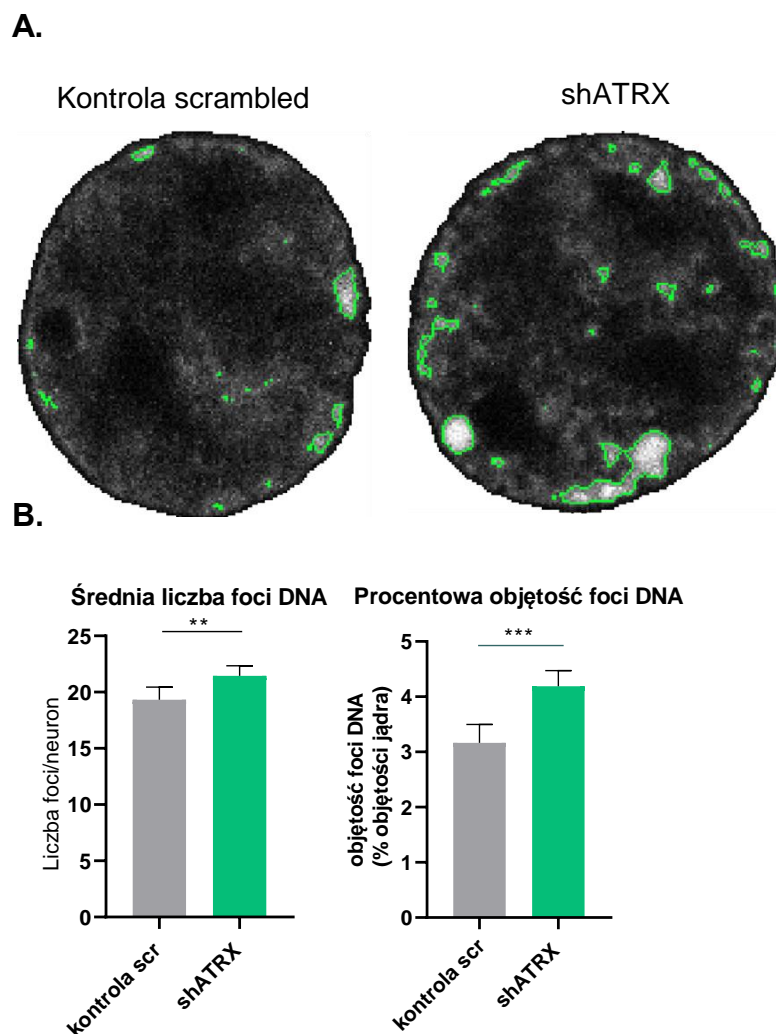
Poziom białka ATRX oszacowałam również przy użyciu techniki Western Blot. Również tu udało mi się potwierdzić znaczne obniżenie poziomu białka ATRX (Ryc. 5.19 B)



Rycina 5.19. Wyciszenie *Atrx*. **A.** Wykres przedstawia intensywność sygnału fluorescencyjnego ATRX z obrazów konfokalnych dla poszczególnych grup. Analizowano po 30 komórek dla każdej z grup z trzech niezależnych hodowli. Wyniki przeanalizowałam testem t-Studenta, a poziom istotności statystycznej przedstawiono w postaci gwiazdek nad SEM. *** $p < 0,001$. **B.** Immunodetekcja Western Blot z przeciwciałem wykrywającym białko ATRX. W przypadku grup kontrolnych (scr DMSO i scr LTP) widoczne prążki na wysokości około 315 kD, co odpowiada m. cz. ATRX. K⁺/Na⁺ ATPazy użyto jako kontroli nałożenia próbek.

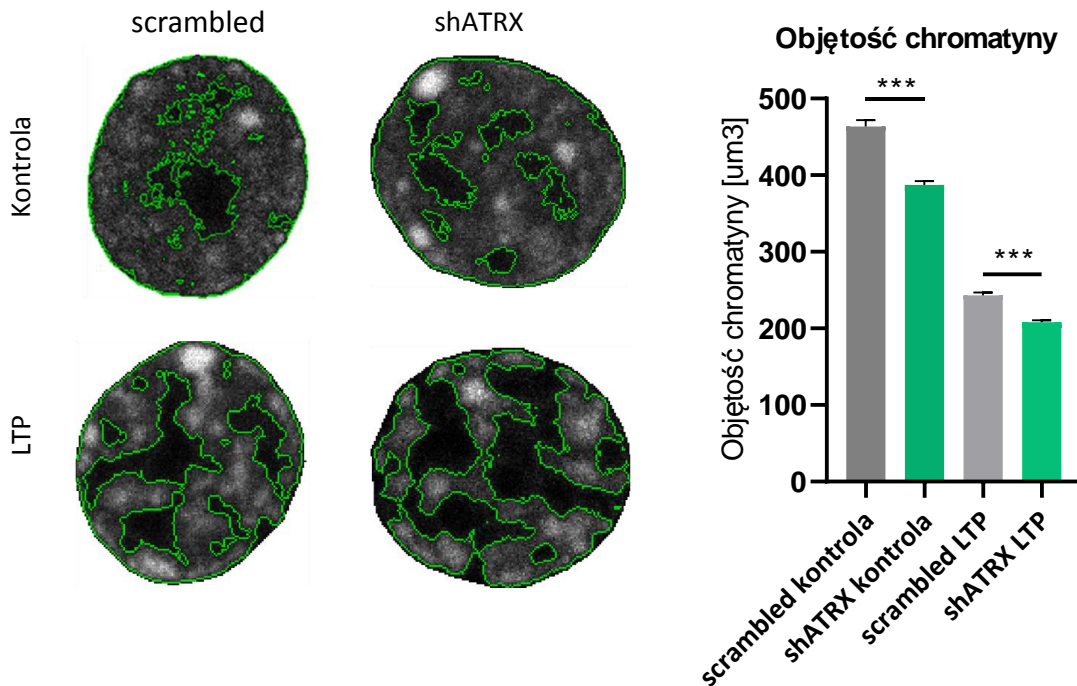
5.7.1 Zmiany w organizacji chromatyny

Stymulacja neuronów wpływa na przestrzenną organizację chromatyny (Grabowska i in., 2022), która wraz z pobudzeniem ulega coraz silniejszej kondensacji. Aby dowiedzieć się jakim zmianom ulega chromatyna, neurony z obniżonym poziomem białka ATRX, poddawałam pobudzeniu cLTP (Ryc 5.20 – 5.21). Jako kontrolę użyłam wirusa scrambled (scr), a jako kontrolę cLTP użyłam odpowiedniej objętości rozpuszczalnika DMSO. Następnie neurony utrwalalam 4% PFA i poddawałam znakowaniu immunocytochemicznemu. Preparaty obrazowałam przy użyciu mikroskopii konfokalnej, następnie uzyskane dane analizowałam w programie PartSeg. Różnice w stopniu skondensowania chromatyny widoczne były już w neuronach kontrolnych (z wyciszonym *Atrx*, w stanie spoczynkowym) (Ryc. 5.20). Analiza wykazała, że po pobudzeniu zarówno liczba foci DNA/chromocentrów oraz ich objętość wzrasta w stosunku do neuronów kontrolnych.



Rycina 5.20. Wpływ obniżenia poziomu białka ATRX na strukturę chromatyny A. Przykładowe segmentacje jąder neuronów (kontrolne scrambled) oraz z wyciszonym *Atrx* (shATRX) z zaznaczonymi zieloną otoczką foci DNA. **B** Wykresy słupkowe liczebności foci DNA (średnia liczba foci na komórkę) pokazują wzrost przy wyciszeniu *Atrx*. Wykres słupkowy prezentujący objętość chromocentów wyrażoną jako udział procentowy jądra wskazuje na wzrost objętości chromocentów w grupie pozbawionej ATRX. Badana grupa liczyła 220 komórek kontrolnych (scrambled) oraz 255 badanych (shATRX). Wyniki przeanalizowałam testem t-Studenta, a poziom istotności statystycznej przedstawiono w postaci gwiazdek nad SEM. ** $p < 0,01$.

Aby określić zmiany w organizacji całej chromatyny neuronów dokonałam segmentacji jąder neuronów, a następnie obliczyłam całkowitą objętość chromatyny dla każdej z grup badawczych (wyciszenie i jego kontrola, w stanie spoczynkowym i po pobudzeniu cLTP). Wyniki przedstawiłam na Ryc. 5.21. Objętość, jaką zajmuje chromatyna maleje po wyciszeniu *Atrx* i spadek ten jest jeszcze silniejszy po pobudzeniu cLTP.

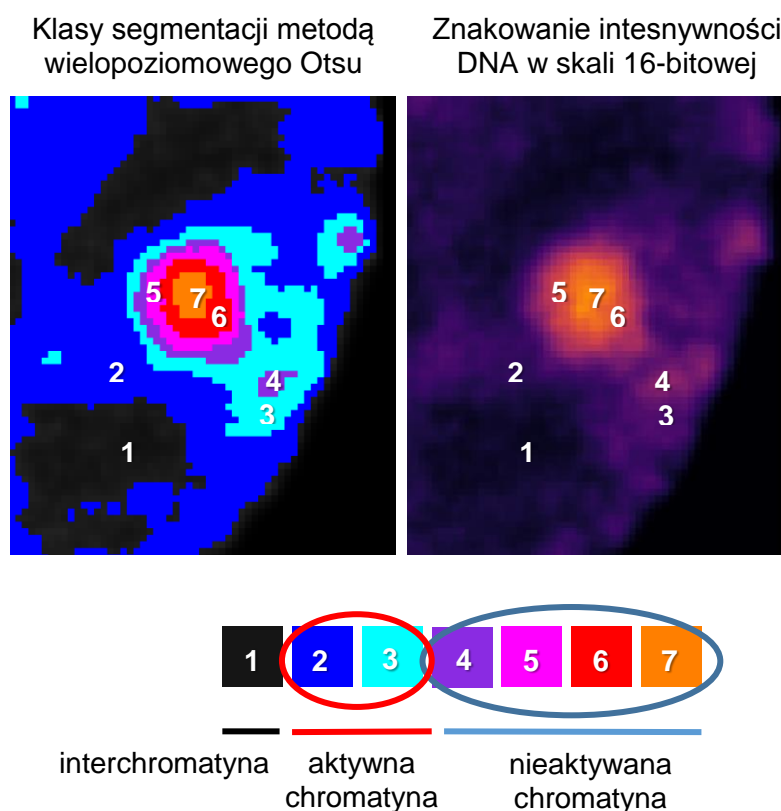


Rycina 5.21. Segmentacja chromatyny przy wyciszeniu białka ATRX. Przykładowe wysegmentowane jądra (kontrolne scrambled) oraz z wyciszonym *Atrx* (shATRX) pobudzone (2 godz.) i niepobudzone cLTP. Chromatyna zaznaczona zieloną otoczką na podstawie analizy w programie PartSeg. Wykres przedstawia dane ilościowe analizy, wyciszenie ATRX powoduje spadek w całkowitej objętości chromatyny, spadek ten pogłębia się po pobudzeniu neuronów cLTP. Badana grupa liczyła 220 komórek kontrolnych (scrambled) oraz 255 badanych (shATRX). Wyniki przeanalizowałam testem t-studneta, a poziom istotności statystycznej przedstawiono w postaci gwiazdek nad SEM. *** $p < 0,001$.

5.7.2 Analiza przestrzenna (3D) upakowania chromatyny w jądrach neuronów hipokampalnych z wyciszonym *Atrx*

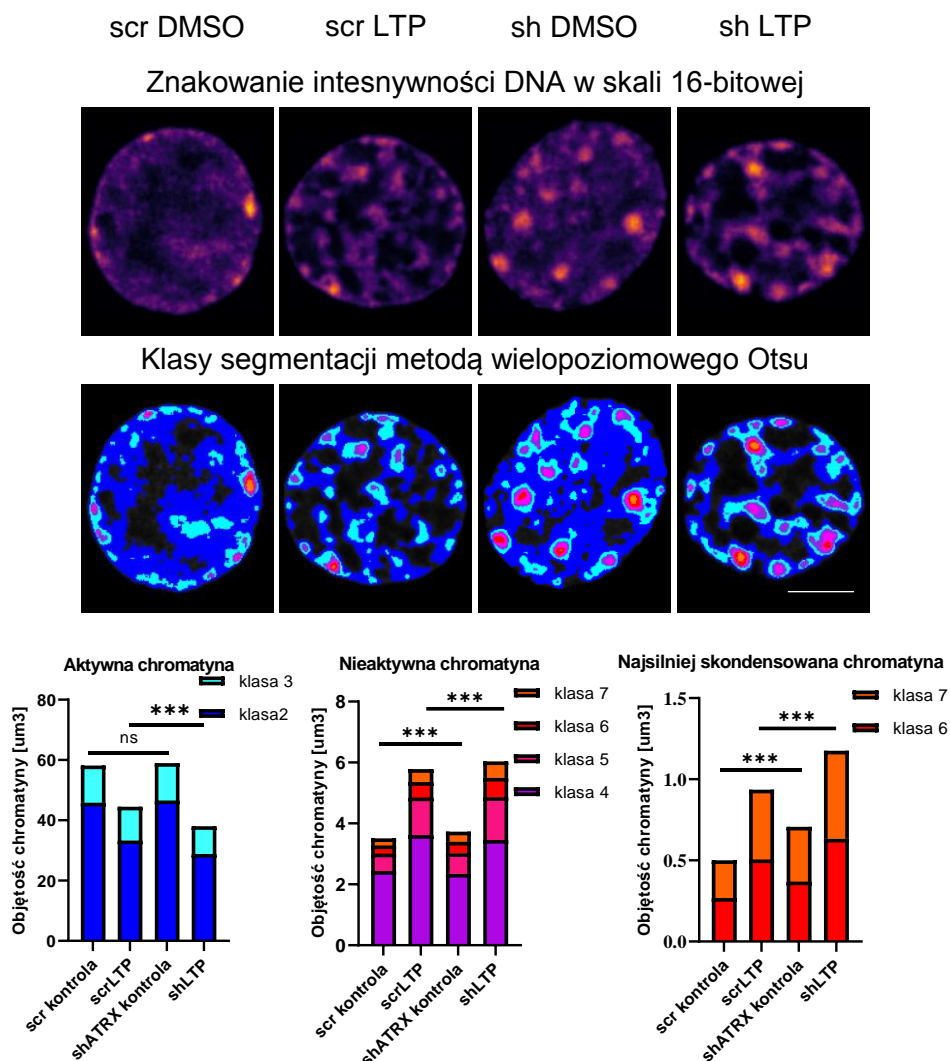
W oparciu o intensywność barwienia DNA przeprowadziłam ilościową analizę 3D przy pomocy programu PartSeg. Program ten pozwala na wyodrębnienie ze zdjęć poszczególnych jąder komórkowych poprzez nałożenie maski. Segmentacja w oparciu o nałożoną maskę została dostosowana manualnie za pomocą progu intensywności znakowania DNA. Następnie na wyodrębnionych jądrach przeprowadziłam automatyczną analizę rozszerzoną metodą Otsu (Multiple Otsu – wielopoziomowe progowanie Otsu) (Ryc.5.22). Metoda ta polega na binaryzacji obrazu i podzieleniu go na klasy w oparciu o intensywność pikseli, która koresponduje ze stopniem skondensowania chromatyny (im większa intensywność, tym większa kondensacja, i odwrotnie - im mniejsza intensywność, tym mniejsza kondensacja). Wyniki zostały podzielone na 7 klas, a każdy ze zbiorów segmentacji Otsu reprezentuje daną klasę

chromatyny, zaczynając od klasy 1, która jest reprezentacją interchromatyny, klasy 2-3 prezentują aktywną chromatynę, natomiast klasy 4-7 nieaktywną chromatynę. Najsilniej upakowaną klasą chromatyny jest klasa 7, a najluźniejszą jej formą jest klasa 2.



Rycina 5.22. Metoda segmentacji. Przykładowe zdjęcie metody wielopoziomowego progowania Otsu, przedstawiające siedem klas chromatyny o rosnącej intensywności DNA (lewy panel). Zdjęcie po prawej przedstawia znakowanie DNA przedstawione w skali 16-bitowej oznaczonej kolorami (im cieplejsze kolory tym większa intensywność znakowania DNA).

Uzyskane wyniki segmentacji poddałam dalszej analizie statystycznej, a wyniki przedstawiłam na Ryc. 5.23. Wartości dla każdej z analizowanych klas odzwierciedlają rzeczywistą objętość chromatyny w danym przedziale, stąd analizując wyniki skupiłam się na różnicach dla poszczególnych przedziałów, tj. aktywnej i nieaktywnej chromatyny, oraz najsilniej upakowanej chromatyny tworzącej DNA foci (Ryc. 5.23). Analiza wyników pokazuje, iż objętość aktywnej chromatyny spada po wyciszeniu *Atrx*, rośnie natomiast objętość nieaktywnej transkrypcyjnie chromatyny. Największą różnicę w objętości chromatyny można zaobserwować w przedziale najsilniej skondensowanych klas (klasa 6 i 7). Zarówno w stanie spoczynkowym, jak i po pobudzeniu dochodzi do wzrostu objętości foci DNA po wyciszeniu *Atrx*.

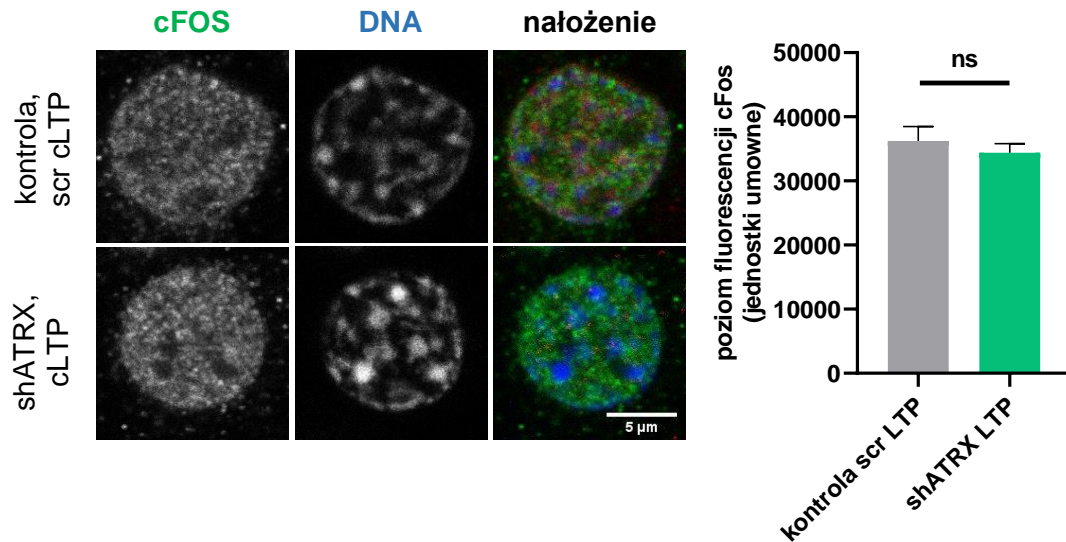


Rycina 5.23. Segmentacja chromatylny i analiza zmian jej objętości. Przykładowe wysegmentowane jądra dla każdej z grup eksperymentalnych (kontrola scrambled niepobudzona/pobudzona oraz wyciszenie *Atrx* (shATRX) niepobudzone/pobudzone). Górny panel przedstawia znakowanie DNA w skali 16-bitowej, dolny panel przedstawia te same jądra podzielone na klasy w oparciu o segmentację wielopoziomową Otsu. Wykresy słupkowe prezentują zmiany w objętości danej klasy chromatylny (przedstawione jako udział procentowy całej objętości jądra). Badana grupa liczyła odpowiednio: 212 komórek w grupie scr kontrola, 264 - shATRX kontrola, 287 - scr LTP i 257 - shATRX LTP. Istotność statystyczna zmierzona testem U Manna-Whitneya wynosi $p < 0,001$ - ***.

5.7.3 Poziom białka cFOS po wyciszeniu *Atrx*

Wiedząc, iż po wyciszeniu *Atrx* dochodzi do znacznej kondensacji chromatylny, postanowiłam sprawdzić, czy zmianie ulega również ekspresja genów biorących udział we wczesnej odpowiedzi. Jak już wcześniej wspomniano, przykładem takiego genu jest *cFOS*. Porównałam więc poziom fluorescencji znakowania białka cFOS w obrazach konfokalnych dla grupy kontrolnej (scrambled) oraz z wyciszonym *Atrx* (shATRX)

pobudzonych cLTP (Ryc. 5. 24). Wyniki analizy poziomu fluorescencji białka cFOS przedstawiłam na wykresie. Po wyciszeniu *Atrx* dochodzi do nieznacznego obniżenia poziomu intensywności znakowania cFOS, zmiany te nie są jednak istotne statystycznie.

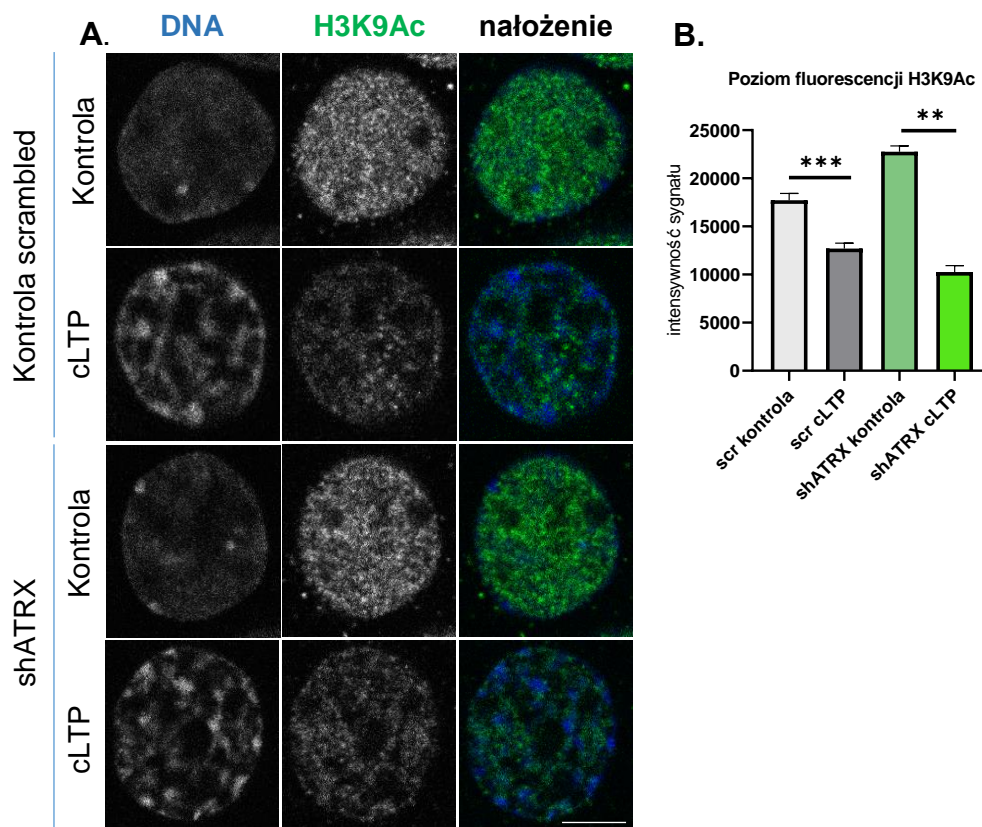


Rycina 5.24. Poziom cFOS po wyciszeniu *Atrx*. Przykładowe obrazy jąder po pobudzeniu LTP i wyznakowaniu na ATRX (czerwony), cFOS (zielony) oraz DNA (niebieski). Kontrola (scrambled) przedstawiona w górnym wierszu, w dolnym wyciszenie *Atrx* (shATRX). Skala 5 µm. Wykres po prawej przedstawia analizę ilościową; dokonano pomiaru sygnały intensywności znakowania cFOS w trzech niezależnych powtórzeniach biologicznych (N=3) na grupie komórek liczących co najmniej 20 komórek dla każdej z grup. Słupki błędów prezentują SEM. Istotność statystyczna zmian mierzona testem t-studenta wyniosła $p = 0.4855$, co oznacza brak istotności statystycznej (ns).

5.7.4 Wpływ wyciszenia ATRX na potranslacyjne modyfikacje histonów

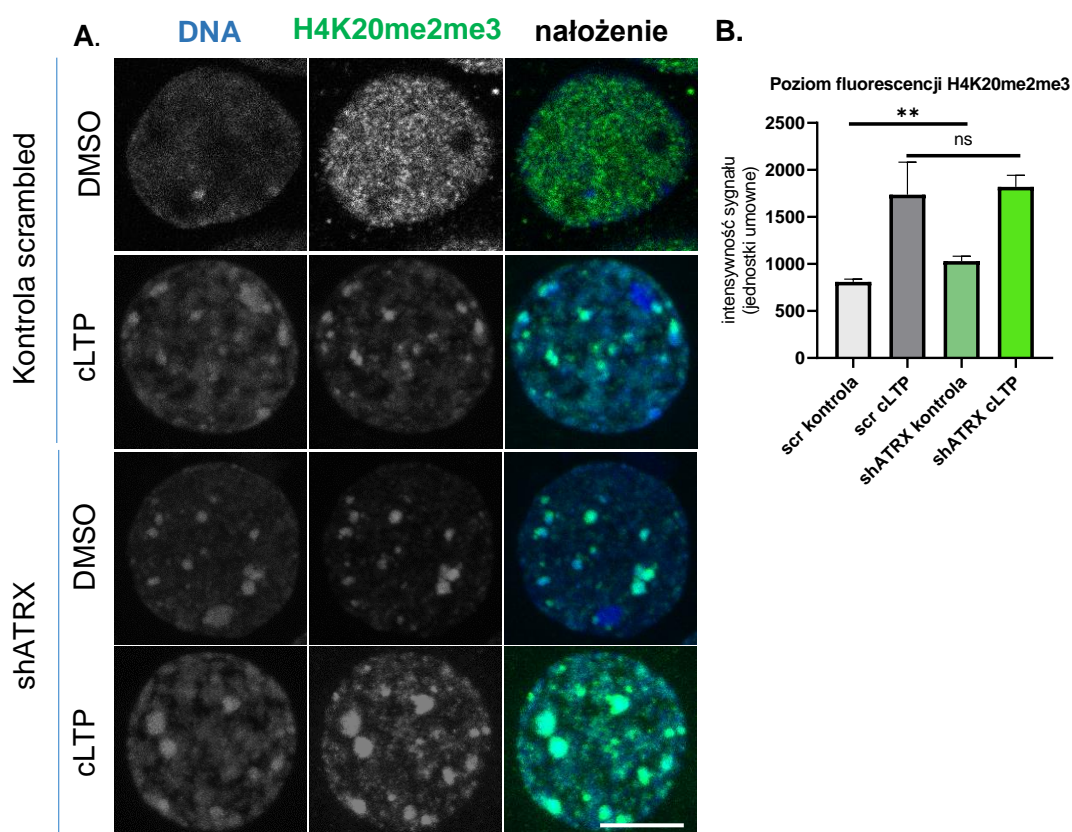
Obniżenie poziomu białka ATRX w komórkach hipokampalnych hodowanych *in vitro* poprzez powodowanie zmian w konformacji chromatyny (czyli wzmożoną kondensację) powinno wpływać również na potranslacyjne modyfikacje histonów. W niniejszej pracy skupiłam się na dwóch modyfikacjach – acetylacji lizyny 9 na histonie 3 (H3K9Ac), która jest charakterystyczna dla chromatyny aktywnej transkrypcyjnie oraz di- i trimetylacji lizyny 20 na histonie 4 (H4K20me2me3), która jest znacznikiem chromatyny nieaktywnej transkrypcyjnie.

Zaobserwowano wzrost acetylacji H3K9Ac w stanie spoczynkowym oraz spadek poziomu acetylacji po pobudzeniu cLTP w neuronach z obniżonym poziomem ATRX (Ryc. 5. 25).



Rycina 5.25. Wpływ wyciszenia *Atrx* na acetylację H3K9Ac. **A.** Przykładowe jądra komórkowe znakowane na H3K9Ac (zielony) oraz DNA (niebieski) po obniżeniu białka ATRX lub w kontroli (górny panel). Skala 5 μ m. **B.** Wykres przedstawia analizę ilościową poziomu fluorescencji H3K9Ac dla wszystkich badanych grup. Liczba *n* dla każdej z badanych grup wynosiła co najmniej 50 neuronów; z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych ($N=3$). Słupki błędów prezentują SEM. Istotność statystyczna zmian mierzona testem t-Studenta wyniosła *** co odpowiada $p < 0,001$ i ** co odpowiada $p < 0,01$.

W przypadku analizy metylacji H4K20me2me3 zaobserwowałam, że wyciszeniu *Atrx* towarzyszy hipermetylacja tego histonu, znaczny wzrost metylacji zaobserwowałam zarówno w kontroli DMSO, jak i cLTP. Hipermetylacja była widoczna w postaci dużych rozmiarów skupienia w sąsiedztwie silnie skondensowanej chromatyny (Ryc. 5.26).

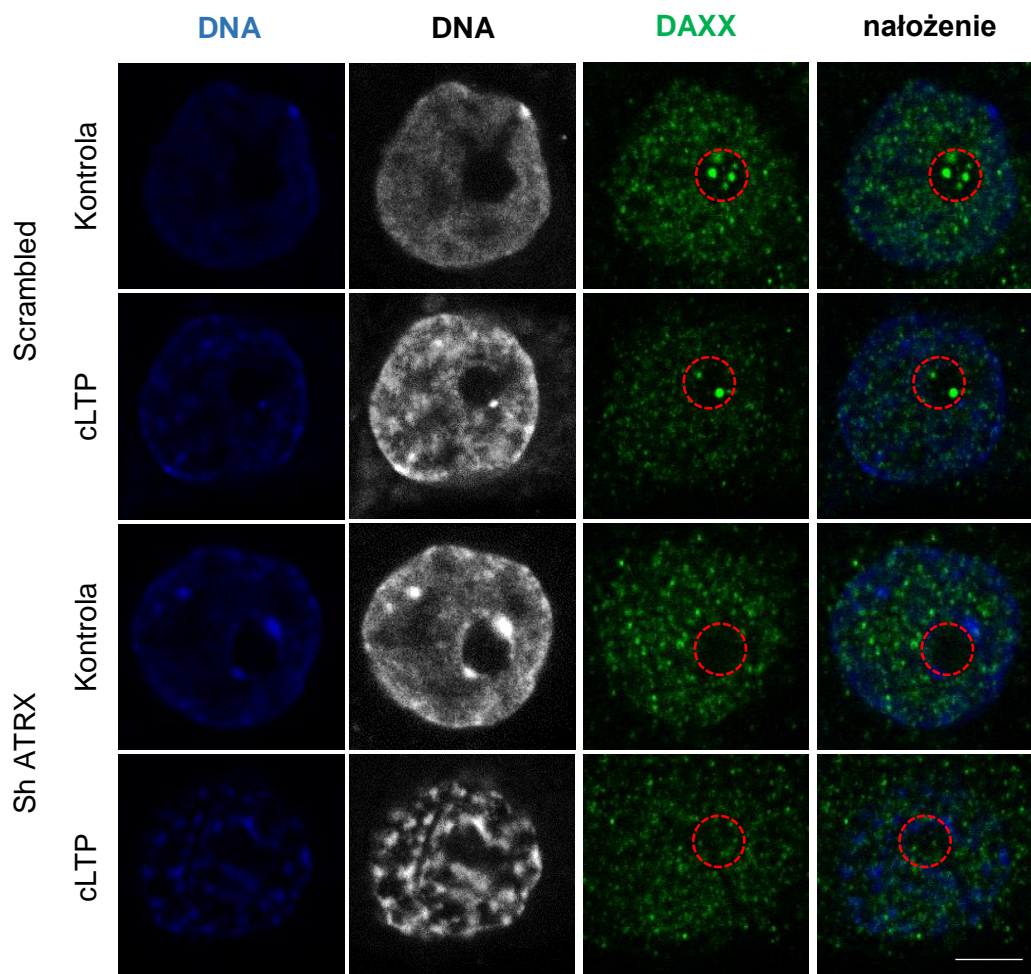


Rycina 5.26. Wpływ wyciszenia *Atrx* na metylację H4K20me2me3. **A.** Przykładowe jądra komórkowe znakowane na H4K20me2me3 (zielony) oraz DNA (niebieski) po wyciszeniu białka ATRX lub w kontroli (górny panel). **B.** Analiza ilościowa przedstawiona na wykresie słupkowym, wyciszenie *Atrx* powoduje wzrost metylacji w niepobudzonych komórkach oraz w komórkach pobudzonych cLTP. Skala 5 μ m. Liczba n dla każdej z grup wynosiła co najmniej 50 neuronów, z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych (N=3). Istotność statystyczna zmian mierzona testem t-Studenta wynosi ** co odpowiada $p < 0,01$.

Wyniki te potwierdziły zatem udział białka ATRX w organizacji chromatyny. Wyciszenie *Atrx* skutkuje silniejszym upakowaniem chromatyny i zmianom tym towarzyszą zmiany we wzorze modyfikacji potranslacyjnych histonów.

5.7.5 Wpływ wyciszenia *Atrx* na obecność jąderkowych ciałek ATRX

W celu sprawdzenia czy ciała są obecne w neuronach z obniżonym poziomem białka ATRX wykorzystałam znakowanie przeciwko białku DAXX. Analizowałam neurony pochodzące z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych, wyszukując występowania ciałek jąderkowych z białkiem DAXX każdorazowo w pięciu różnych płaszczyznach na każdym z trzech preparatów.



Rycina 5.27. Przykładowe jądra znakowane na DAXX (zielony) oraz DNA (niebieski). Poszczególne wiersze przedstawiają warianty kontrolne i z wyciszonym *Atrx* stymulowane LTP oraz kontrolne (DMSO). Granice jąderka (zaznaczone czerwonymi okręgami) wyznaczone po podstawie barwienia DNA w skali szarości (druga kolumna) z dostosowaną jasnością świecenia tak aby wyraźnie widać było obszar jąderka. Skala 5 μm .

Jak wynika z analizy obrazów przedstawionych na Ryc. 5.27 wyciszenie *Atrx* skutkuje zanikiem wyżej opisanych ciałek jąderkowych, co świadczy o kluczowej roli białka ATRX w powstawaniu i/lub utrzymaniu ciałek jąderkowych.

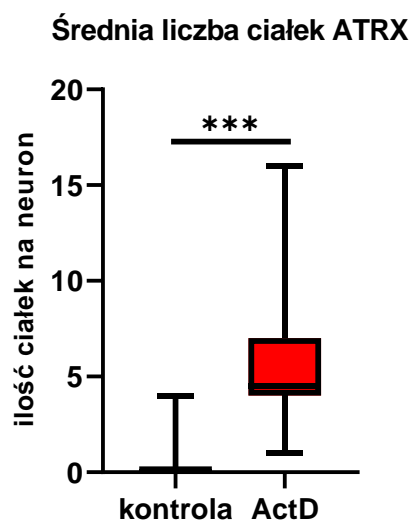
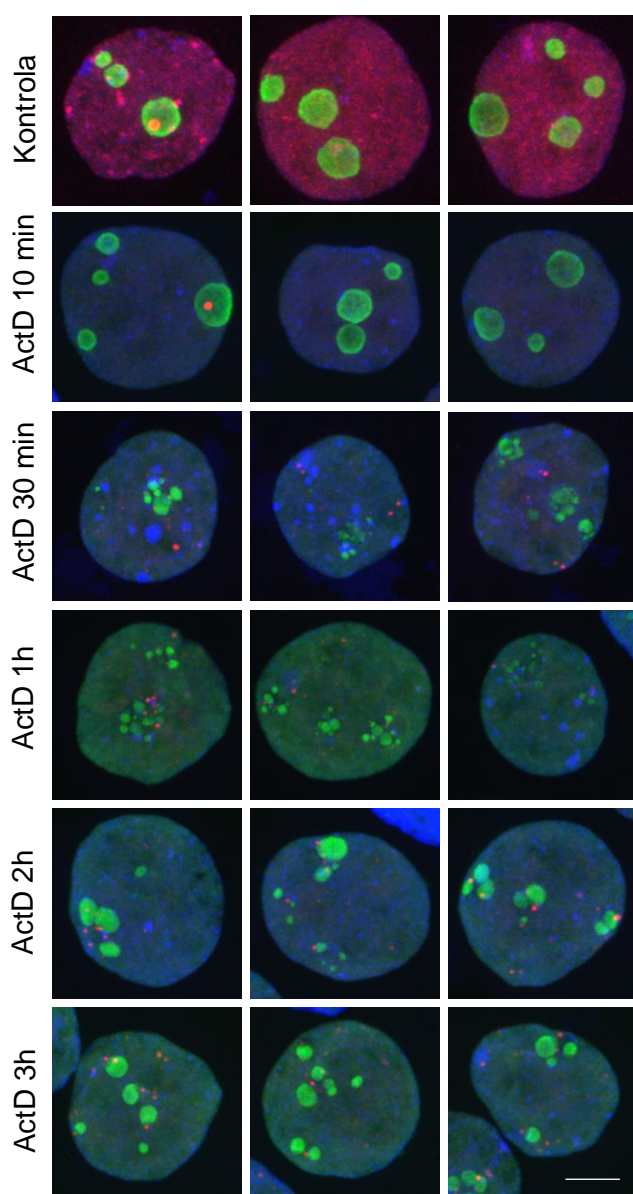
5.10 Wpływ stresu jąderkowego na lokalizację ATRX w jąderku

5.10.1 Zahamowanie aktywności polimerazy RNA I

Dane literaturowe wykazują, że użycie D-aktynomycyny (ActD) w stężeniu (0,05 $\mu\text{g/ml}$) blokującym polimerazę RNA I, ale nieblokującym polimerazy RNA II, prowadzi do rozpadu jąderka (Kalita i in., 2008) UBF i fibrylaryna ulegają wówczas translokacji na obrzeża jąderka, a B23 i nukleolina – translokacji do nukleoplazmy (Boulon i in.,

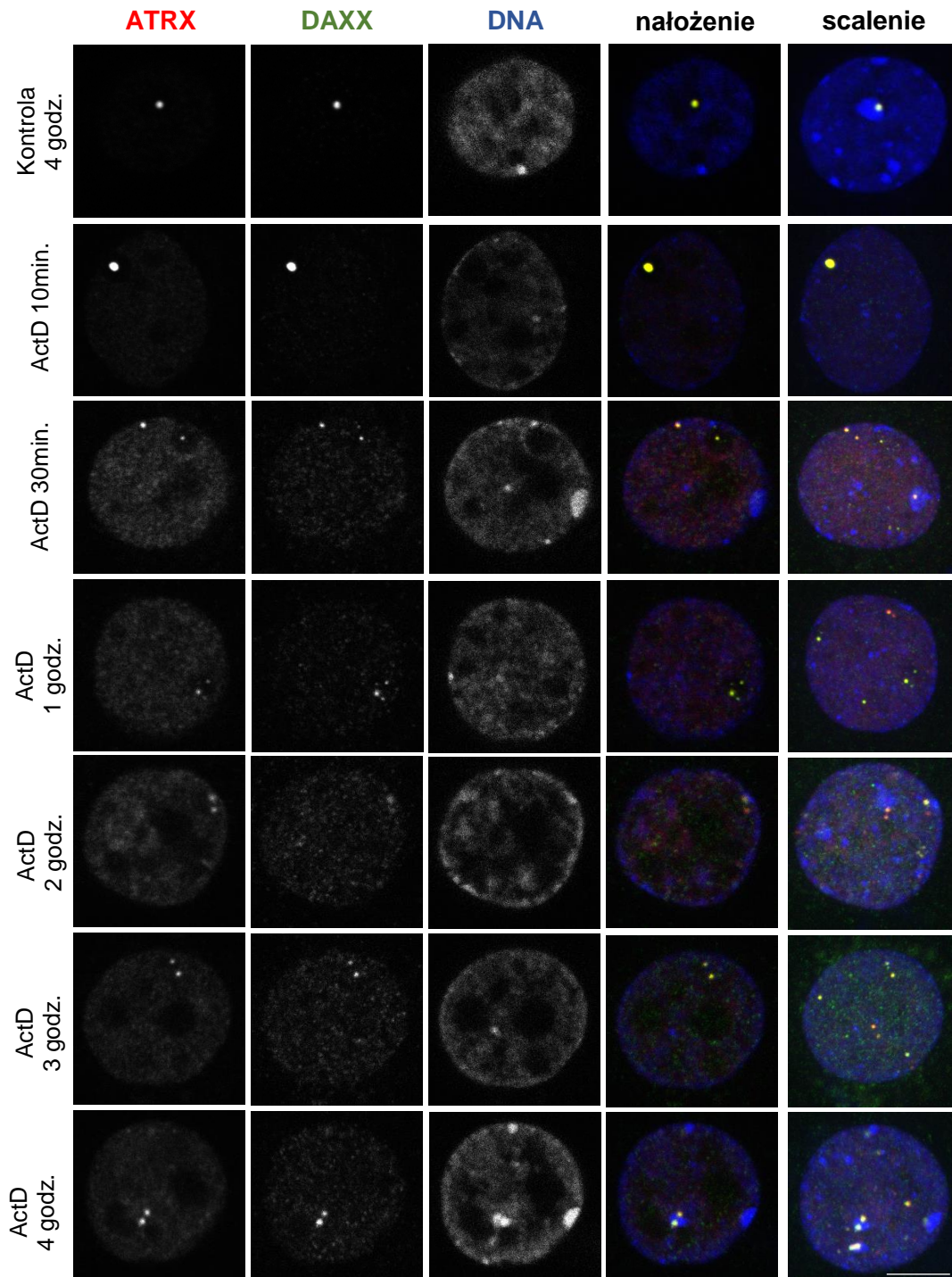
2010). Ponieważ wykazałam obecność białka ATRX w jąderku postanowiłam zbadać, jaki wpływ na jego lokalizację ma stres jąderkowy wywołany użyciem tego inhibitora. W tym celu przeanalizowałam obrazy mikroskopii konfokalnej preparatów znakowanych na obecność ATRX oraz znacznika jąderka – nukleoliny w warunkach zahamowania polimerazy RNA I przy użyciu ActD (Ryc. 5. 28). Jąderko w tych warunkach ulega drastycznej dezintegracji, a pozostałości jąderka przesuwają się na obrzeża jądra. Zaobserwowałam, że w tych warunkach wzrasta liczba ciałek ATRX, pojawiają się one już po 30 min. od dodania ActD w niemal w każdym neuronie, w liczbie od 2 do 16 (Ryc. 5.28), a ich wielkość jest mniejsza niż typowych ciałek w warunkach bez stresu jąderkowego. Analiza ilości ciałek po 2 godz. od zahamowania aktywności polimerazy RNA I wykazała, że ciałka występują w każdym neuronie, a ich liczba średnio wynosi ok. 5. Zaobserwowałam również przemieszczanie się ciałek ATRX z obszaru „post-jąderkowego” w kierunku otoczki jądrowej.

ATRX, nukleolina, DNA



Rycina 5.28. Wpływ zahamowania polimerazy RNA I na morfologię jąder i ciałek ATRX. Znakowanie immunofluorescencyjne neuronów; ATRX (czerwony), nukleolina (zielony) DNA (niebieski) z trzech powtórzeń badawczych (każda kolumna to jedno powtórzenie). Przedstawione przykładowe jądra składają się z nałożenia trzech kanałów i ze scalenia warstw w osi z. W górnym panelu zaprezentowano kontrolę, w poniższych wierszach wybrane punkty czasowe stresu jąderkowego (od 10 min. do 3 godz.). Skala 5 μ m. Wykres prezentuje średnią ilość ciałek ATRX na neuron w kontroli i po zastosowaniu ActD przez 2 godz. dla trzech powtórzeń biologicznych (N=3, kontrola n=53 oraz ActD n=54). Istotność statystyczna zmierzona testem U Manna-Whitneya wynosi *** co odpowiada $p < 0,001$.

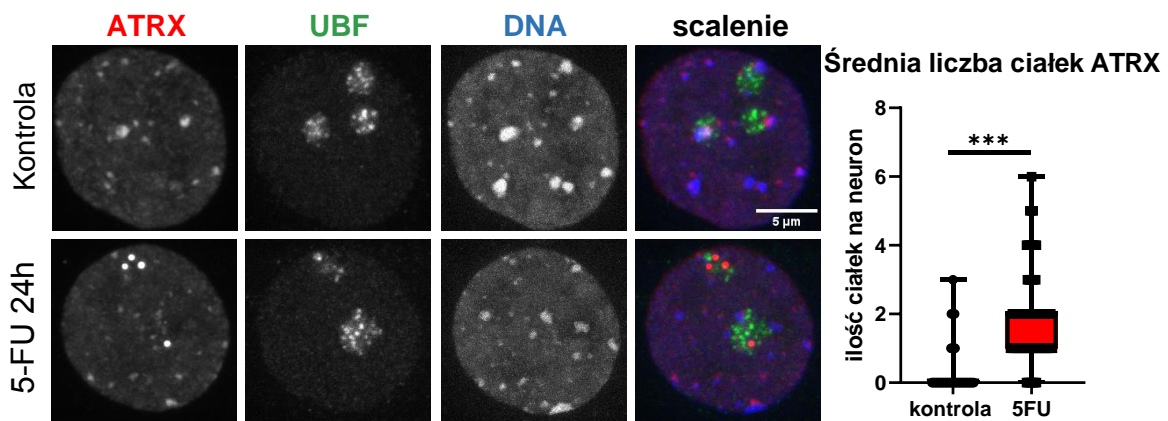
Następnie neurony traktowane ActD znakowałam na ATRX i jego partnera - DAXX. Wyniki te potwierdziły, że stres jąderkowy wywołany ActD prowadzi do zwiększenia liczby ciałek ATRX (Ryc 5. 29), a ciała te mimo zmiany lokalizacji z jąderka na obrzeża jądra cały czas kolokalizują z białkiem DAXX.



Rycina 5.29. Kolokalizacja jąderkowego ciała ATRX i DAXX w warunkach stresu jąderkowego. Znakowanie immunofluorescencyjne neuronów; ATRX (czerwony), DAXX (zielony) DNA (niebieski) prezentowane w skali szarości dla lepszej wizualizacji. W ostatniej kolumnie scalenie nałożonych kanałów w osi z, które wyraźnie uwidacznia kolokalizację ATRX i DAXX. Skala 5 μ m.

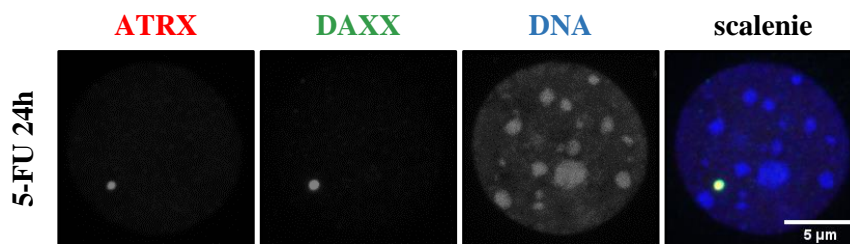
5.10.2 Wpływ zahamowania dojrzewania rRNA za pomocą 5-fluorouracylu na ATRX w jąderku

Celem sprawdzenia, czy białko ATRX zaangażowane jest w procesy związane z dojrzewaniem rybosomów przeprowadziłam doświadczenia z zahamowaniem syntezy RNA poprzez inkubację neuronów z 5-FU przez 24 godz. Indukowany w ten sposób stres jąderkowy nie powoduje rozpadu jąderka, jąderko zachowuje swoją integralność w przeciwieństwie do traktowania ActD. Zahamowaniu ulega natomiast dojrzewanie rRNA. 5-Fluorouracyl strukturalnie podobny jest do uracylu, główna różnica w budowie to zastąpienie atomu fluoru z atomem wodoru w pozycji 5 w pierścieniu pirymidowym. Wbudowywanie cząsteczek 5-FU zamiast cząsteczek uracylu skutkuje zaburzeniem transkrypcji, co w konsekwencji prowadzi do inhibicji syntezy RNA. Zahamowanie syntezy RNA w opisanym modelu powoduje wzrost liczby jąderkowych ciałek ATRX (Ryc 5.30).



Rycina 5.30. Zahamowanie dojrzewania rybosomów przy użyciu 5-FU. Przykładowe jądra komórkowe przedstawione jako złożenie warstw w osi Z. Znakowanie na ATRX (czerwony), UBF jako znacznik jąderka (zielony), DNA (niebieski), ostatnia kolumna przedstawia nałożenie wszystkich kanałów oraz warstw w osi Z. Skala 5 μ m. B. Wykres przedstawia liczbę ciałek ATRX po inhibicji 5-FU (n=74) oraz w kontroli (n=50), obserwujemy znaczny wzrost ilości ciałek ATRX po inhibicji dojrzewania RNA (wynik analizy dla 3 powtórzeń biologicznych, N=3). Istotność statystyczna zmian testem U Manna-Whitneya wynosi *** co odpowiada $p < 0,001$.

Celem sprawdzenia, czy ciała ATRX po zahamowaniu dojrzewania RNA kolokalizują z białkiem DAXX przeprowadzono dodatkowe znakowanie immunofluorescencyjne na obecność białka DAXX. Wyniki przedstawiono na Ryc. 5. 31.

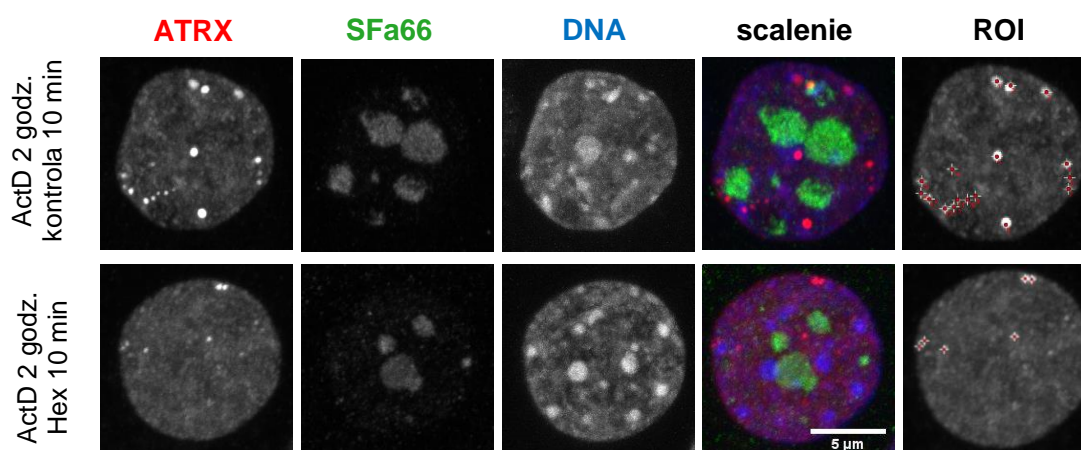


Rycina 5.31. Ciałka ATRX po zahamowaniu dojrzewania RNA kolokalizują z białkiem DAXX. Przykładowe neurony znakowane na ATRX (czerwony), DAXX (zielonym), DNA (niebieski) w warunkach stresu jąderkowego. Analiza obrazów potwierdza kolokalizację jąderkowych ciałek ATRX z DAXX po zahamowaniu dojrzewania RNA przy użyciu 5-FU. Skala 5 μm .

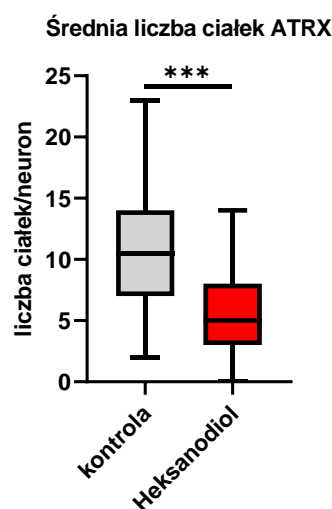
Analiza obrazów wykazała, że ATRX i DAXX nadal kolokalizują w warunkach stresu wywołanego 5-FU.

5.10.3 Wpływ rozbicia wiązań hydrofobowych na ciała ATRX

Celem dalszej charakterystyki ciałek ATRX przeprowadziłam doświadczenie z rozbiciem wiązań hydrofobowych w komórce, czyli separacji faz ciekłych (ang. *liquid-liquid phase separation*), po to aby określić właściwości ciałek ATRX. Przy użyciu 5% heksanodiolu udało mi się wykazać, że ciała ATRX powstają poprzez separację faz ciekłych (Ryc. 5. 32). Do tego doświadczenia wybrano neurony traktowane ActD, ponieważ w komórkach tych (jak pokazano na wcześniejszych rycinach (Ryc. 5.28 i Ryc. 5. 29) obserwowany jest znaczny wzrost liczby ciałek ATRX. Dodanie 5% heksanodiolu do komórek traktowanych ActD skutkowało zmniejszeniem średniej liczby ciałek o połowę. Jako kontrolę działania heksanodiolu użyto znakowania na białko SFa66, które jest znacznikiem struktur jąderkowych nazywanych paraspeklami. Wskutek działania heksanodiolu struktury te zmieniają swoją objętość, spada również ich liczebność (Ryc. 5. 32).



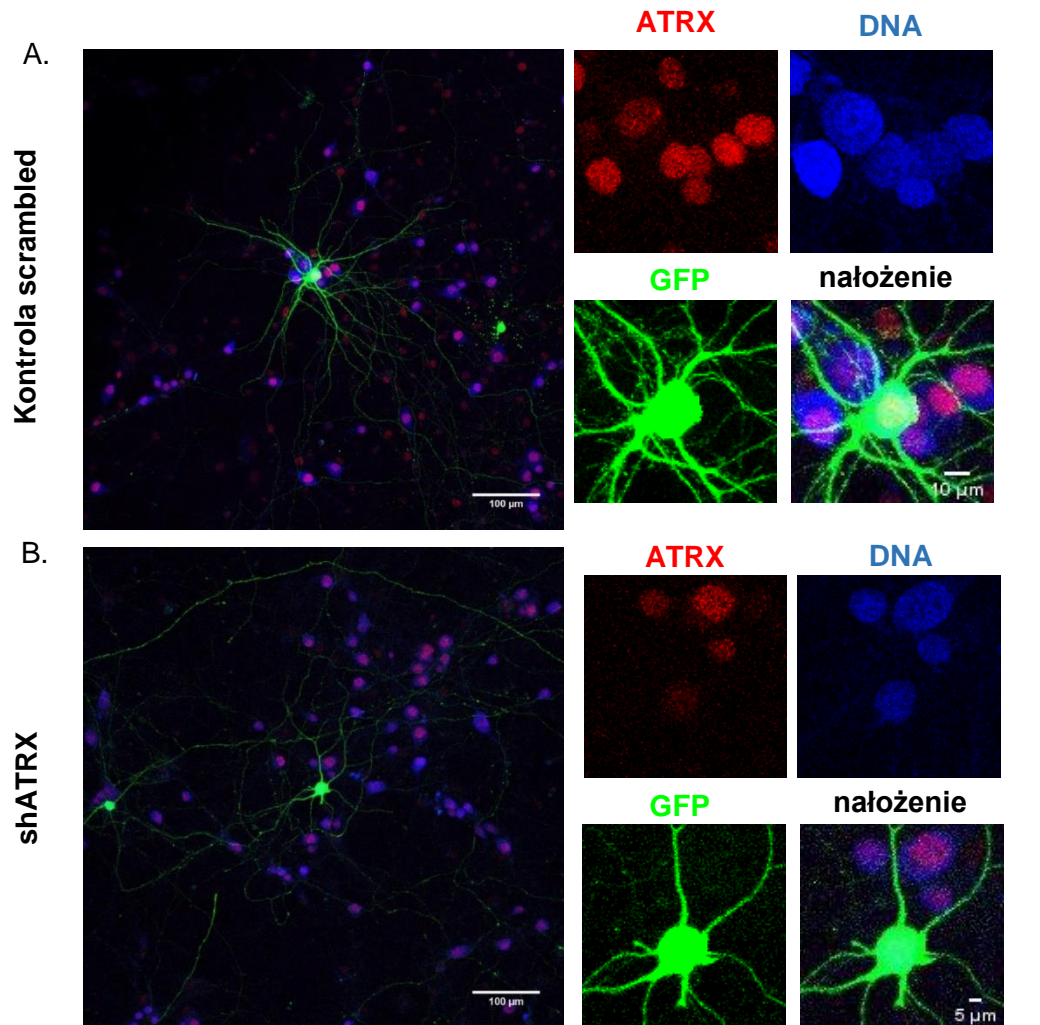
Rycina 5.32. Rozbicie wiązań hydrofobowych skutkuje rozpadem ciałek ATRX. Przykładowe jądra neuronów traktowane ActD przez 2 godz., a następnie poddane rozbiciu wiązań hydrofobowych heksanodiolem (dolny panel). Górne obrazy przedstawiają kontrolę heksanodiolu. Ostatnia kolumna reprezentuje metodę liczenia ciałek ATRX jako liczenie ROI (ang. *region of interest*) w programie ImageJ. Wykres słupkowy prezentuje liczbę ciałek ATRX, po zastosowaniu heksanodiolu, liczba ciałek spada o połowę. Analizę przeprowadzono na trzech niezależnych powtórzeniach biologicznych (N=3), a całkowita liczebność grup wynosi odpowiednio n=66 dla kontroli i n=69 dla wariantu eksperymentalnego. Istotność statystyczna zmian mierzona testem t-Studenta wynosi *** co odpowiada $p < 0,001$.



5.11 Wpływ wyciszenia *Atrx* na morfologię drzewek dendrytycznych

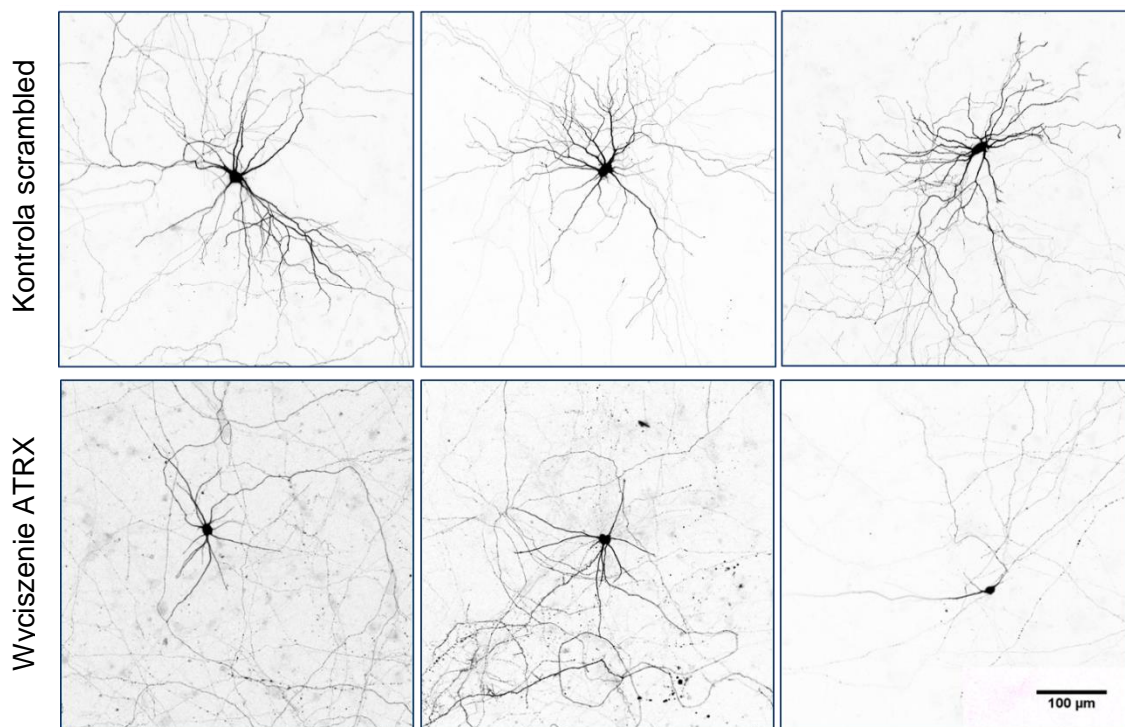
W celu zbadania, czy i jak zmiany w organizacji heterochromatyny i/lub obecność ciałek jąderkowych ATRX w neuronach z wyciszonym *Atrx* przekładają się na zmiany funkcjonalne neuronów, postanowiłam dokonać analizy drzewek dendrytycznych neuronów kontrolnych i tych z obniżonym poziomem białka ATRX. W tych doświadczeniach wykorzystałam wektor plazmidowy opisany w podrozdziale 3.9, który wprowadzałam do neuronów za pomocą techniki transfekcji. Transfekcja komórek nerwowych ma niską wydajność, co w tym przypadku było zaletą, gdyż pozwoliło mi na uzyskanie pojedynczej transfekowanej komórki na jedno pole widzenia. Ponadto, wspomniany plazmid dzięki ekspresji fluorescencyjnego białka GFP umożliwił mi identyfikację transfekowanych komórek oraz uwidocznienie ich morfologii. W celu potwierdzenia, że obserwowane wyniki są spowodowane wyciszeniem ekspresji *Atrx* przez shRNA, a nie są skutkiem niespecyficznego efektu zastosowania techniki shRNA,

neurony kontrolne transfekowano plazmidem kodującymi shRNA „scrambled” (scr), który również posiadał metkę GFP. Zaobserwowałam, iż drzewko dendrytyczne neuronów z obniżonym poziomem białka ATRX jest zubożone zarówno w kontekście całkowitej długości wypustek, jak i liczby rozgałęzień (Ryc. 5. 33 oraz Ryc. 5. 34).



Rycina 5.33. Wpływ wyciszenia *Atrx* na morfologię drzewka dendrytycznego. Przykładowe obrazy znakowania na ATRX (czerwony) i DNA (niebieski) oraz ekspresja GFP (zielony) pozwalająca na określenie wielkości i rozgałęzienia drzew dendrytycznych. **A.** Kontrola scrambled o typowej morfologii drzewka dendrytycznego. **B.** Wyciszenie *Atrx* wpływa na zubożenie rozgałęzień drzewka dendrytycznego. **C.** Walidacja poziomu wyciszenia *Atrx* metodą transfekcji, wykres prezentuje poziom fluorescencji ATRX w kontroli n=104 (szary) i po wyciszeniu *Atrx* n=104 (zielony). Zmiany analizowano testem U Manna-Whitneya słupki błędów przedstawiają SEM, a poziom istotności statystycznej przedstawiono w postaci gwiazdek nad SEM. *** p<0,001.

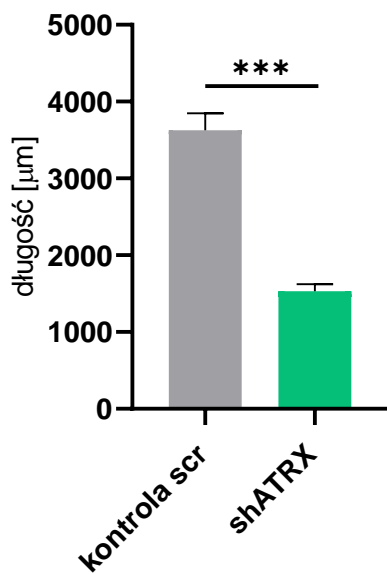
W celu porównania morfologii drzewka dendrytycznego skoncentrowałam się na jego dwóch podstawowych cechach: złożoności drzewka dendrytycznego oraz jego ekspansywności, czyli zdolności do rozprzestrzeniania się dendrytów na powierzchni wokół ciała neuronów. Przy pomocy programu NeuronJ dla każdego z analizowanych neuronów, wykonałam maskę z odrysowanymi dendrytami na podstawie sygnału GFP. Z tak przygotowanych masek w sposób automatyczny odczytywałam długość poszczególnych dendrytów oraz ich sumaryczną długość. Przykładowe rekonstrukcje drzewek dendrytycznych przedstawiono na Ryc. 5.34, a wyniki analizy ilościowej na Ryc. 5.35.



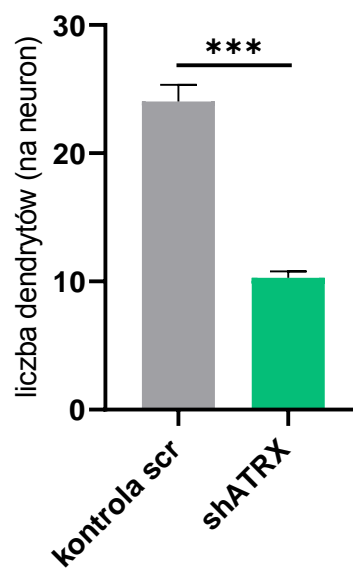
Rycina 5.34. Przykładowe drzewka dendrytyczne kontrolne i z obniżonym poziomem białka ATRX. Górny panel przedstawia kontrolne drzewka (scrambled), uwagę zwracają liczne rozgałęzienia i długość wypustek. Na dolnym panelu komórki z wyciszonym *Atrx*, drzewko dendrytyczne jest widocznie mniejsze oraz mniej rozgałęzione.

Do analizy ilościowej wykorzystano co najmniej trzy powtórzenia biologiczne, a całkowita liczba analizowanych komórek wynosiła odpowiednio $n=62$ dla grupy kontrolnej i $n=63$ dla grupy z wyciszonym *Atrx*.

Średnia długość dendrytów w neuronie



Średnia liczba dendrytów w neuronie



Rycina 5.35. Analiza ilościowa morfologii drzewka dendrytycznego po wyciszeniu *Atrx*. Średnia długość dendrytów po wyciszeniu *Atrx* (zielony) spada niemal dwukrotnie, zmniejsza się też rozłożystość drzewka dendrytycznego, wyciszenie *Atrx* powoduje spadek średniej liczby dendrytów.

Analiza ilościowa potwierdziła obserwacje uzyskane w obrazach mikroskopowych. Średnia liczba dendrytów spadała ponad dwukrotnie, podobnie jak średnia długość dendrytów, co oznacza, że wyciszenie *Atrx* wpływa na morfologię drzewka dendrytycznego.

6. Dyskusja

W badaniach nad strukturą chromatyny rola białek przebudowujących chromatynę jest silnie ugruntowana. W kontekście tego dynamicznego procesu regulacyjnego, białko ATRX posiadające aktywność ATPazową, odgrywa niezmiernie istotną funkcję. Postawiona w niniejszej pracy hipoteza zakładała, iż białko to stanowi kluczowy element regulacji struktury chromatyny w jądrach neuronów, niezbędnej do prawidłowej transkrypcji genów, zwłaszcza po pobudzeniu synaptycznym. Białko ATRX kontroluje dostępność genów mających ulegać transkrypcji, przy równoczesnym tłumieniu ekspresji genów mających nie ulegać transkrypcji. Podczas pobudzenia synaptycznego dochodzi do reorganizacji struktury chromatyny i zmian w transkryptomie (Barr i Bertram, 1949; Benito i Barco, 2015; Billia i in., 1992; Grabowska i in., 2022; Tao-Cheng, 2018; Walczak i in., 2013a; Yap i Greenberg, 2018). Badania przeprowadzone w byłej już Pracowni Neuromorfologii Molekularnej i Systemowej oraz kontynuowane w Pracowni Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych potwierdziły te obserwacje, zidentyfikowaliśmy bowiem jedno z białek odpowiedzialnych za rearanżację struktury chromatyny po pobudzeniu synaptycznym - deacetylazę 1 histonów, HDAC1 (Grabowska i in., 2022).

Przeprowadzone przeze mnie badania wykazały, że również białko ATRX podczas pobudzenia synaptycznego bierze udział w organizacji chromatyny, szczególnie w warunkach pobudzenia synaptycznego, gdzie obserwowałam wzrost kolokalizacji ATRX i skondensowanej chromatyny w jądrach neuronów hipokampalnych. Co więcej, zaobserwowałam, że obniżenie poziomu białka ATRX powoduje nadmierną kondensację chromatyny, co potwierdza rolę tego białka w regulacji organizacji chromatyny również w jądrach neuronów. Stwierdziłam, stosując techniki immunofluorescencyjne, że białko ATRX występuje w wielu przedziałach jądra neuronów szczura i myszy oraz nerwiaka (neuroblastoma), gdzie jest obecne również w jąderku. Co ciekawe, właśnie w jąderku odkryłam obecność białka ATRX w niezidentyfikowanym dotychczas ciałku jąderkowym, które z racji tego, że to białko jest niezbędne dla jego utworzenia nazwałam ciałkiem ATRX. Co więcej wykazałam, że obniżenie poziomu białka ATRX zaburza organizację drzewek dendrytycznych. Uzyskane wyniki pogłębiły dotychczasową wiedzę o białku ATRX w funkcjonowaniu neuronów, zwłaszcza w kontekście pobudzenia

neuronalnego i stanowią zaczyn do przeprowadzenia dalszych badań w celu poznania funkcji tego intrygującego białka.

6.1 Rola białka ATRX w neuronach

Pomimo znaczącej roli białka ATRX w prawidłowym rozwoju neuronów, a także jego związku z zaburzeniami kognitywnymi u ludzi, funkcja białka ATRX w ośrodkowym układzie nerwowym nie jest dobrze poznana. Może to wynikać z faktu, że - jak wykazano u myszy- delecja genu *Atrx* w linii zarodkowej powoduje obumieranie embrionów (Garrick i in., 2006), natomiast warunkowa delecja *Atrx* w komórkach neuroprogenitorowych prowadzi do nadmiernych uszkodzeń DNA spowodowanych stresem replikacyjnym DNA i późniejszą apoptozą zależną od Tp53 (Seah i in., 2008; Watson i in., 2013). W rozwijającym się mózgu obserwuje się wysoki poziom białka ATRX, co wskazuje na jego ważną rolę dla rozwoju i funkcjonowania mózgu. Ważnego odkrycia dokonali Marano i in., którzy udowodnili, iż podczas różnicowania neuronów białko to bierze udział w organizacji chromatyny pericentrycznej poprzez interakcję z transkryptem RNA *Xist* (ang. *X-inactive specific transcript*) i wynikającą z tego stymulację kompleksu PRC2 (ang. *Polycomb-repressive complex 2*) do inaktywowania jednej z kopii chromosomu X (Marano i in., 2019). Ta interakcja wskazuje na rolę białka ATRX w utrzymywaniu struktury heterochromatyny podczas różnicowania się neuronów. Natomiast w innym badaniu, przeprowadzonym przez Buninę i in., badano transkryptom różnicujących się neuronów myszy i wykazano, że białko ATRX wraz z czynnikiem transkrypcyjnym SOX2 wpływają na wzrost aktywności rejonu wzmacniacza (enhancera) oraz aktywację ekspresji genów w tych neuronach (Bunina i in., 2020). Jest to zatem kolejny dowód potwierdzający rolę białka ATRX w regulacji ekspresji genów, w tym przypadku białko to odpowiada za aktywację i wzmocnienie transkrypcji określonych genów.

Jak wynika z powyższych (oraz wielu innych) prac białko ATRX jest niezbędne dla prawidłowego rozwoju neuronów, a także do ich przeżycia (Bérubé i in., 2005; Seah i in., 2008). Programowana śmierć komórek odgrywa ważną rolę w rozwoju kory mózgu poprzez usuwanie nadmiernej liczby neuronów, które są generowane w strefie podkomorowej, ale nie są następnie włączane do warstw mózgu. W pracy Bérubé i in.

(Bérubé i in., 2005) wykorzystano dwie różne krzyżówki transgeniczne *Cre* do zaburzenia ekspresji genu *Atrx* u myszy i zaobserwowano znaczącą i nieprawidłową utratę neuronów podczas rozwoju kory mózgowej, co manifestuje się zmniejszonym przodomózgiem. Natomiast u pacjentów z zespołem ATRX badania rezonansem magnetycznym (MRI) wykazały atrofię mózgu w rejonie istoty białej (Singh i in., 2023; Wada i in., 2013). Białko ATRX oddziałuje również z innymi białkami, które biorą udział w rozwoju, takim przykładem może być białko MECP2. Mutacje w genie *Mecp2* powodują zespół Retta, czyli uwarunkowaną genetycznie chorobę neurorozwojową, diagnozowaną w szczególności u dziewczynek, objawiającą się przede wszystkim uwstecznieniem rozwoju, zachowaniami autystycznymi, zaburzeniami motoryki ciała i padaczką (Percy i in., 2023). Białko MECP2 wraz z białkiem ATRX odpowiada za prawidłowy rozwój neuronów (Wenderski i Maze, 2016), zaś samo białko ATRX jest niezbędne do prawidłowego formowania chromocentrorów podczas różnicowania neuronów (Marano i in., 2019).

Najnowsze doniesienia z pracy Singha i współ. (Singh i in., 2023) implikują, iż inaktywacja ATRX w neuronach wpływa na aktywność synaptyczną i plastyczność, a więc prowadzi to potencjalnie do zaburzeń kognitywnych. Bardzo interesującego odkrycia dokonali również Gugustea i współ., którzy udowodnili, że ATRX jest wymagany w pobudzających neuronach przodomózgowia do osiągnięcia prawidłowego LTP w hipokampie (Gugustea i in., 2020). To odkrycie sugeruje, że białko ATRX jest zaangażowane w modulację plastyczności synaptycznej w hipokampie. Wcześniej Noh i współ. dowiedli, iż białko ATRX pełni funkcje ochronne wobec małych satelitarnych powtórzeń w neuronach podczas pobudzenia synaptycznego (Noh i in., 2015). W pracy tej opisano zdolność białka ATRX do rozpoznawania zależnej od aktywności synaptycznej kombinatorycznej modyfikacji histonów, trimetylacji histonu H3 lizyny 9/fosforylacji seryny 10 (H3K9me3S10ph) w neuronach. W neuronach taka zmiana metylacji na fosforylację następuje wyłącznie po okresach stymulacji i występuje zwłaszcza w heterochromatycznych powtórzeniach. Podobnie jak w moich badaniach, w tej pracy wykazano zmianę lokalizacji białka ATRX po pobudzeniu w jądrach neuronów myszy, o czym poniżej (rozdział 6.2).

A zatem powyższe doniesienia wskazują, że białko ATRX może być istotne dla rozwoju i funkcjonowaniu mózgu poprzez zaangażowanie w regulacji ekspresji genów w odpowiedzi na pobudzenie synaptyczne.

6.2 Białko ATRX a pobudzenie cLTP

Większość badań przeprowadziłam przy użyciu szczurzych dysocjowanych hipokampalnych neuronów hodowanych *in vitro*. Model ten, powszechnie wykorzystywany przez neurobiologów, pozwala - w porównaniu do badań *in vivo* - na stosunkowo łatwe i efektywne przeprowadzenie manipulacji genetycznych takich, jak wyciszenie czy nadekspresja produkcji białka, a także na manipulacje farmakologiczne. Ponadto, umożliwia obrazowanie morfologii pojedynczych neuronów, w tym jąder i drzewek dendrytycznych (Banker i Cowan, 1977; Beaudoin i in., 2012; Michaluk i in., 2011).

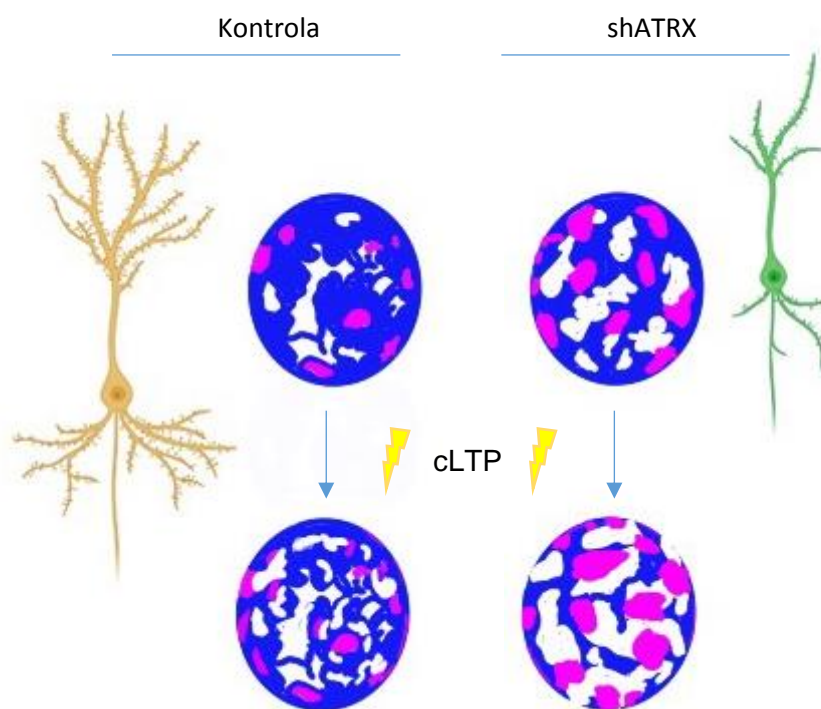
Badania nad strukturą chromatyny skupiają się przede wszystkim na komórkach zdolnych do podziału, w których dochodzi do zmian w strukturze chromatyny wraz z kolejnymi fazami cyklu komórkowego. Natomiast neurony, po zróżnicowaniu z postmitotycznych neuroblastów, nie ulegają już dalszym podziałom komórkowym. Jako komórki pobudliwe ulegają natomiast pobudzeniu synaptycznemu, któremu - jak wykazano - towarzyszą zmiany w organizacji chromatyny, które są bardzo dynamiczne (Grabowska i in., 2022). W warunkach hodowli *in vitro* neuronów pobudzenie można uzyskać poprzez zastosowanie tzw. chemicznego modelu pobudzenia (cLTP), opartego o mieszaninę trzech związków farmakologicznie czynnych - forskoliny, rolipramu i pikrotoksyny (Otmakhov i in., 2004; Jaworski i in., 2018; Kaczmarek i Chaudhuri, 1997). Pobudzone w ten sposób neurony wykazują obecność białka cFOS, które jest markerem aktywacji, a także dochodzi w nich do ekspresji genów wczesnej odpowiedzi takich, jak *Arc*, *Egr1*, *Egr2* czy *Bdnf* (Argilli i in., 2008).

Wciąż niewiele wiadomo o mechanizmach związanych z regulacją organizacji chromatyny w jądrach pobudzonych neuronów. Jednym z takich mechanizmów wydaje się być zaangażowanie białka ATRX, które jest nie tylko istotne dla rozwoju mózgu, ale także - jak wykazano w innych typach komórek - bierze udział w regulacji ekspresji genów i utrzymywanie struktury chromatyny. Co więcej, zostało ono nawet nazwane „strażnikiem chromatyny” (Aguilera i López-Contreras, 2023). Jest ono badane głównie w kontekście udziału w replikacji DNA, utrzymywania telomerów, regulacji ekspresji genów i naprawy DNA (Clynes i in., 2014; Aguilera i López-Contreras, 2023). Niewiele jednak wiadomo o jego roli podczas pobudzenia synaptycznego, a zwłaszcza jego udziału w dynamicznej przebudowie struktury chromatyny w jądrach neuronów.

Moje badania wykazały, że białko ATRX wykazuje wysoką responsywność na tę dynamikę, gdyż po pobudzeniu towarzyszy zmianom w organizacji chromatyny. Wzór znakowania ATRX pokrywa się z kondensacją chromatyny, a kolokalizacja ta wzrasta po pobudzeniu cLTP. Dlatego też niezmiernie ciekawym było sprawdzenie mechanizmów, czy białko ATRX jest - w trakcie pobudzenia synaptycznego - (i) związane z aktywacją ekspresji genów poprzez otwieranie chromatyny, czy też może (ii) pełnić rolę białka „wyciszającego” regiony chromatyny tak, aby zapobiec ekspresji genów zbędnych w czasie pobudzenia. Jeszcze inną możliwością wydaje się być jego (iii) przyłączanie do regionów, które mają być aktywowane wkrótce po ustaniu pobudzenia. Moje badania sugerują, że białko ATRX wydaje się brać udział we wszystkich tych procesach, co czyni go białkiem wielofunkcyjnym. Wynikać to może m.in. wielodomenowej budowy tego dużego białka (m.c. ~280 kDa), umożliwiającej nie tylko wykazywanie aktywności helikazy, ale także oddziaływania z innymi białkami (np. histonami) i/lub kompleksami białek i DNA (Hashimoto i in., 2010). Co ciekawe, białko ATRX bierze również udział w wyciszaniu sekwencji DNA wirusa podczas infekcji, wykazano bowiem, że wiąże się ono z DNA wirusa opryszczki już po 15 minutach po jego wniknięciu do jądra gospodarza (Cabral i in., 2018).

W pobudzonych neuronach dochodzi do intensywnej ekspresji genów, konieczna jest więc ścisła kontrola genomu (Misteli, 2020). Moja obserwacja, że białko ATRX towarzyszy rearanżacji chromatyny w czasie pobudzenia cLTP wydaje się sugerować, iż bierze ono udział w regulacji ekspresji genów podczas pobudzenia. Aby sprawdzić, czy jest to związane z „wyciszaniem” sekwencji DNA, czy też z aktywacją genów dokonałam jednoczesnego znakowania immunofluorescencyjnego białka ATRX oraz wybranych modyfikacji histonów. Modyfikacje histonów są charakterystyczne dla aktywnej i nieaktywnej transkrypcyjnie chromatyny (Jenuwein i Allis, 2001). Wyniki okazały się zaskakujące, a mianowicie okazało się, iż w stanie spoczynkowym białko ATRX kolokalizuje nie tylko z heterochromatyną (wskaźnikiem tego jest metylacja reszty lizyny 20 na histonie 4 – H4K20me2me3), co sugeruje, że zaangażowane jest w „wyciszenie” ekspresji bądź utrzymywanie chromatyny w stanie nieaktywnym - „wyciszenia”, ale także zauważono jego obecność przy aktywnej chromatynie, której znakiem jest acetylacja reszty lizynowej 9 w histonie 3 (H3K9Ac). Jak się spodziewałam, po pobudzeniu cLTP zaobserwowałam zmianę wzoru acetylacji i kolokalizację białka ATRX z tak modyfikowanym histonem. Natomiast obniżenie

poziomu białka ATRX spowodowało znaczne zmiany w organizacji chromatyny oraz we wzorze modyfikacji (Rycina 6.1). Zaobserwowałam bowiem znaczny wzrost metylacji reszty lizynowej 20 w histonie 4 (H4K20me), prowadzący do powstania hipermetylacji histonu (H4K920me2me3). I zgodnie z oczekiwaniami, po pobudzeniu zaobserwowałam znaczny spadek poziomu H3K9Ac. Natomiast po pobudzeniu cLTP nie zauważyłam w modyfikowanych genetycznie neuronach statystycznie istotnych zmian w poziomie białka cFos, co wskazuje, że należy ostrożnie interpretować wyniki dotyczące udziału białka ATRX w ekspresji genów wczesnej odpowiedzi na pobudzenie synaptyczne.



Rycina 6.1. Zmiany w organizacji chromatyny. Kontrolne komórki w stanie spoczynkowym wykazują obecność rozproszonej chromatyny (kolor niebieski) i nielicznych skupień DNA (chromocentra) (kolor różowy). Wyciszenie *Atrx* skutkuje kondensacją chromatyny, która skupia się w liczne foci DNA, a kondensacja ta pogłębia się po pobudzeniu cLTP. Zmianom ulega morfologia drzewka dendrytycznego, wyciszenie *Atrx* skutkuje jego zmniejszeniem.

Należy podkreślić, że większość moich wyników uzyskałam techniką mikroskopii konfokalnej, a zatem aby poznać wpływ na i/lub oddziaływanie białka ATRX z modyfikowanymi histonami należałoby przeprowadzić badania z wykorzystaniem innych technik, np. immunoprecypitacji czy też ligacji zbliżeniowej in situ (PLA, ang. *proximity ligation assay*). Niestety, ze względu na ograniczenia czasowe nie udało mi się tego sprawdzić. Mam jednak nadzieję, iż badania te będą kontynuowane w przyszłości.

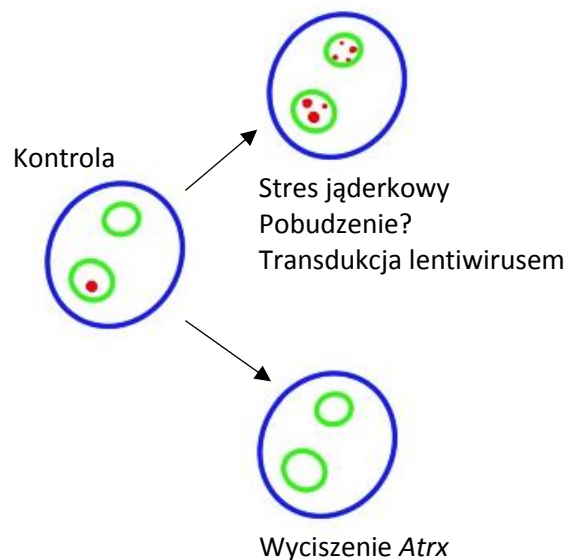
6.3 Funkcje białka ATRX w jąderku neuronów

W niniejszej rozprawie, przy użyciu technik znakowania immunocytologicznego, po raz pierwszy wykazałam obecność białka ATRX w jąderku. Co więcej, po raz pierwszy przedstawiłam dowód na jego występowanie w nieopisanych dotychczas ciałkach w jąderku neuronów szczurzych zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* - w skrawkach mózgu szczura. Ciałka te nazwałam ciałkami ATRX.

Jąderko jako centrum biogenezy rybosomów jest niezbędne do wzrostu rozwijających się neuronów, włączając w to zarówno morfogenezę neurytów, jak i długotrwałe utrzymywanie dojrzałych neuronów (Hetman i Pietrzak, 2012). Biogeneza rybosomów jest złożonym procesem, bierze w nim udział 80 rybosomalnych i ponad 200 nie-rybosomalnych białek (Freed i in., 2010). Większość etapów biogenezy rybosomów zachodzi w jąderku, które zawiera setki kopii genu *pre-rRNA 47S (rDNA)* (Sirri i in., 2008), ale w większości komórek tylko około połowa tych genów jest aktywna transkrypcyjnie, natomiast druga połowa jest wyciszona epigenetycznie (Sharifi i Bierhoff, 2018). Ten transkrypcyjnie nieaktywny fragment *rDNA* jest kluczowy dla organizacji struktury i utrzymywania integralności genomu. Białko ATRX nie było dotychczas opisywane jako białko jąderkowe, mimo że w jąderku występują liczne powtórzenia *rDNA*, a jak wiadomo białko to wykazuje duże powinowactwo do łączenia się z sekwencjami powtórzeniowymi w genomie. Brakuje jednak danych literaturowych opisujących białko ATRX w jąderku, szczególnie w jąderku neuronów. Badania w komórkach nowotworowych z mutacją *ATRX* dokonane przez Wonga i współ. wykazały, że białko ATRX jest wymagane do utrzymania struktury powtórzeń *rDNA* (Udugama i in., 2018). Badacze ci pokazali bowiem, że podobnie jak w telomerach, również na powtórzeniach *rDNA* dochodzi do depozycji wariantu histonu H3.3 dzięki obecności kompleksu ATRX-DAXX. Ponadto, wykazali, że obniżenie poziomu białka ATRX prowadzi do zaburzeń w strukturze heterochromatyny, co w następstwie zaburza stabilność i liczbę powtórzeń *rDNA*, a w konsekwencji prowadzi do znacznego spadku produkcji podjednostek rybosomów.

W moich badaniach wykazałam, iż w jąderku białko ATRX występuje w nieopisanych dotychczas strukturach - ciałkach ATRX (Rycina 6.2). W ciałkach tych białko ATRX jedynie częściowo (na ich obrzeżach) kolokalizuje z białkami jąderkowymi – nukleoliną, B23 i UBF, natomiast nie kolokalizuje z polimerazą RNA I, co sugeruje,

że ciała te nie są zaangażowane w procesie transkrypcji rRNA, ale mogą uczestniczyć m.in. w procesach dojrzewania i lub/transkrypcji rDNA. Białko ATRX występuje w tych strukturach w kompleksie z białkiem DAXX, opisanym wcześniej partnerem ATRX (Xue i in., 2003). Stwierdziłam również, że obecność białka ATRX jest konieczna do formowania ciałek ATRX, gdyż jego brak uniemożliwia ich tworzenie. Intrygującym był fakt, że w warunkach stresu jąderkowego te ciała były wciąż obecne i zachowany był kompleks ATRX-DAXX. Nie zaobserwowałam natomiast w tych ciałkach kolokalizacji ATRX z innym partnerem – czynnikiem transkrypcyjnym CTCF, kluczowym dla regulacji ekspresji genów i w organizacji struktury chromatyny (Kim i in., 2015). Co ciekawe, w nukleoplazmie kolokalizacja białka ATRX i CTCF spada po pobudzeniu cLTP, natomiast z DAXX – wzrasta po pobudzeniu, co wydaje się dodatkowo potwierdzać moje obserwacje wskazujące na zaangażowanie białka ATRX w organizacji chromatyny w odpowiedzi na pobudzenie.



Rycina 6.2. Zmiany w ilości jąderkowych ciałek ATRX. Schematyczne przedstawienie jąder neuronów (niebieski) z jąderkami (zielony). Ciała ATRX (czerwony) w warunkach stresowych występują w jąderkach liczniej niż w kontroli, zanikają jednak po rozbiciu słabych wiązań wodorowych przez 1,6-heksanodiol.

Na podstawie powyższych obserwacji nie można spekulować, jaką rolę pełnią te ciała w jąderkach neuronów, nie wiemy również, czy są one obecne w innych typach tkanek/komórek. Wiemy natomiast, że ich liczba wzrasta po pobudzeniu cLTP oraz w warunkach stresu jąderkowego (wywołanego działaniem ActD). Po rozpadzie jąderka w wyniku działania ActD, ciała ATRX przesuwały się w kierunku obrzeża jądra komórkowego. Jest to zgodne z powszechnie uznaną hipotezą, iż nieaktywne sekwencje kierowane są na obrzeża jądra, co m.in. udowodniono w pracy Skupień-Jaroszek i współ.

(Skupien-Jaroszek i in., 2021). Wzrost liczby ciałek zaobserwowałam także po działaniu 5-fluorouracylu, powszechnie stosowanego chemioterapeutyku, który wbudowuje się w miejsce uracylu w łańcuchach DNA, skutkując zaburzeniem transkrypcji, a więc zahamowaniem syntezy RNA. Co ciekawe, w warunkach stresu jąderkowego dodanie 1,6-heksanodiolu - czynnika powodującego rozbicie wiązań wodorowych, sprzyjając tym samym rozdzieleniu faz płynnych, prowadzi do znacznego zmniejszenia liczby tych ciałek (Ryc 6.2). Obserwacje te wskazują zatem na dynamikę tworzenia tych ciałek w zależności od stanu pobudzenia neuronu, aktywacji procesu transkrypcji oraz stresu jąderkowego.

Kwestią istotną jest również fakt, że nie obserwowałam ciałek ATRX w jąderkach wszystkich neuronów widocznych w analizowanych polach widzenia; szacuję, że występowały one w ok. 20% jąderek. Trudno mi spekulować o przyczynach tego spostrzeżenia, odpowiedzi mogą udzielić kolejne badania. Z pewnością należałoby zbadać przebieg tworzenia tych ciałek; sprawdzić, czy i jakie inne białka – poza DAXX – współtworzą ciała ATRX; zbadać, czy ich obecność jest charakterystyczna jedynie dla neuronów, czy też mogą być one obecne w innych komórkach układu nerwowego, np. w gleju i w innych tkankach. W tym kontekście istotna jest obserwacja, że prowadzące do utraty funkcji mutacje w genie *ATRX* zostały wykryte w ok. 40% ludzkich glejaków (Pang i in., 2023). Ponadto, trwają badania nad określeniem w glejakach korelacji pomiędzy poziomem białka ATRX, a przeżywalnością pacjentów (Chaurasia i in., 2016). Interesująca wydaje się również obserwacja, że w neurosekrecyjnych komórkach PC12 wśród partnerów dla niekonwencjonalnej miozyny VI jest G22p1, białko o aktywności helikazy DNA, co sugeruje możliwość oddziaływania tego motoru molekularnego również z białkiem ATRX (Majewski i in., 2018). Co więcej, nieopublikowane wyniki z naszej grupy wskazują, że miozyna VI jest obecna w jąderku i bierze udział w organizacji jąderka i rybosomów (Nowak i in., dane nieopublikowane). Z pewnością należałoby również sprawdzić, czy brak ATRX wpływa na organizację rybosomów i syntezę białek, czyli kluczowych procesów związanych z funkcjonowaniem jąderka.

6.4 Białko ATRX a morfologia drzewka dendrytycznego

Wielkość i złożoność drzewka dendrytycznego mają kluczowe znaczenie dla funkcjonalności połączeń pomiędzy neuronami. Stąd też zaburzenia w morfologii drzewka skutkują nieprawidłowościami w transmisji sygnałów i w konsekwencji prowadzą do upośledzenia funkcji mózgowia. Zaburzenia takie obserwuje się w różnych

stanach patologicznych takich, jak np. choroba Alzheimera, upośledzenie umysłowe, epilepsja i stany chronicznego stresu (van Elburg i van Ooyen, 2010). W niniejszej pracy wykazałam, iż wyciszenie genu *Atrx*, skutkujące znacznym obniżeniem poziomu białka ATRX prowadzi do zmniejszenia rozmiaru oraz rozłożystości drzewek dendrytycznych w analizowanych neuronach (Rycina 6.1). Jest to zgodne z obserwacjami innych badaczy, którzy wykazali *in vivo*, iż delecja *ATR*X w neuronach spowodowała zmniejszenie drzewek dendrytycznych (Tamming i in., 2017, 2020). Towarzyszyły temu zmiany w transkrypcji genów oraz deficyty w pamięci długotrwałej. A zatem moje wyniki popierają hipotezę, że białko ATRX odgrywa ważną rolę w prawidłowym formowaniu się drzewek dendrytycznych, a co za tym idzie prawidłowym formowaniu pamięci. Kluczowym jednak pozostaje pytanie – czy dzieje się tak dlatego, iż ATRX kontroluje transkrypcję genów odpowiedzialnych za prawidłowe formowanie drzewek? Czy dzieje się tak jedynie poprzez regulację organizacji chromatyny? Jakie inne mechanizmy mogą być w to zaangażowane?

Właściwe formowanie drzewek dendrytycznych jest procesem złożonym i zależnym od wielu czynników. W pracy Skupień i współ. dowiedziono, iż jednym z czynników kluczowych dla prawidłowej morfologii drzewek jest białko CD44, receptor hialuronianu. CD44 aktywując kinazę Src wpływa na funkcje aparatu Golgiego, co w konsekwencji wpływa na organizację drzewka dendrytycznego (Skupień i in., 2014). W tym miejscu należy zadać kolejne pytanie – czy w takim razie białko ATRX może pełnić swoje funkcje poprzez regulację syntezy rybosomów w jąderku? Czy ma to związek z obecnością ciałek ATRX, o których enigmatycznej roli spekulowałam powyżej. A może ATRX, w sposób pośredni/lub bezpośredni oddziałuje z białkami regulującymi organizację cytoszkieletu neuronów? W tym kontekście na pewno warto przeprowadzić analizy cytoszkieletu aktynowego i mikrotubularnego, który jest kluczowy dla funkcjonowania neuronów, w tym dla rozwoju drzewka dendrytycznego (Urbanska i in., 2012). Ta sugestia jest istotna, zważywszy na fakt, że wspomniane powyżej białko CD44 reguluje aktywność małych GTPaz z rodziny Rho, które kontrolują organizację cytoszkieletu aktynowego (Roszkowska i in., 2016). Powiązaniem zagadnieniem jest również kwestia analizy, czy i jak białko ATRX wpływa na morfologię kolców dendrytycznych, struktur bezpośrednio zaangażowanych w przekazywanie sygnałów wskutek pobudzenia synaptycznego (Renner i Rasia-Filho, 2023).

Podsumowując, morfologia drzewka dendrytycznego ma znaczący wpływ na wyzwalamie impulsów i przetwarzanie informacji w neuronach. Zmiany w wielkości i topologii dendrytów mogą prowadzić do zmian we wzorcach przewodzenia impulsów, a zmiany te zaobserwowano w różnych stanach patologicznych. Zrozumienie i poznanie nowych mechanizmów (także tych z udziałem białka ATRX) leżących u podstaw związku między morfologią dendrytów, a wzorcami wzbudzenia neuronów ma kluczowe znaczenie dla odkrycia kognitywnych implikacji, jakie niosą ze sobą zaburzenia morfologii drzew dendrytycznych.

6.5 Podsumowanie

Uzyskane przeze mnie wyniki wskazują, że białko ATRX jest zaangażowane w organizację chromatyny w jądrach neuronów, a w stanie pobudzenia synaptycznego (cLTP) w dynamiczną jej przebudowę. Obniżenie poziomu tego białka skutkuje nadmierną kondensacją chromatyny, co przekłada się na zubożenie drzewka dendrytycznego. Intrygującą obserwacją jest tworzenie przez to białko (najprawdopodobniej *in concerto* z innymi białkami i/lub rDNA) dynamicznych struktur - ciałek jąderkowych (nazwanych przeze mnie ciałkami ATRX), których obecność ma związek nie tylko z białkiem ATRX, ale również z pobudzeniem synaptycznym i stresem jąderkowym. Wciąż enigmatyczne pozostają mechanizmy zaangażowania białka ATRX w organizację chromatyny w jądrze neuronów. Moje badania wskazujące, że poza jąderkiem białko współwystępuje zarówno z nieaktywną heterochromatyną oraz z aktywną euchromatyną, implikują jego wielofunkcyjność, co być może warunkuje jego zaangażowanie w dynamiczną przebudowę chromatyny w odpowiedzi na pobudzenie.

7. Podsumowanie i wnioski

Opisane w przedstawionej rozprawie wyniki badań, dotyczące roli białka ATRX w przestrzennej organizacji struktury chromatyny wykazały, iż:

1. Białko ATRX w jądrze neuronów w stanie spoczynkowym współwystępuje z heterochromatyną, natomiast po pobudzeniu neuronów cLTP towarzyszy przestrzennym zmianom chromatyny kolokalizując również z euchromatyną.
2. Obniżenie poziomu białka ATRX w neuronach skutkuje zmianami w strukturze chromatyny, która tworzy liczne skupienia świadczące o wysokim stopniu jej skondensowania.
3. Obniżenie poziomu białka ATRX w neuronach skutkuje zmianami w strukturze drzewka dendrytycznego, co wskazuje, że jest ono zaangażowane w regulację rozwoju drzewka.
4. W jąderku neuronów występują ciała zawierające białko ATRX, które jest niezbędne do ich utworzenia; dlatego też nadałam im nazwę ciałek ATRX.
5. Jąderkowe ciała ATRX to dynamiczne struktury, ich obecność, liczba i położenie w jąderku jest zależna od pobudzenia cLTP oraz warunków stresu jąderkowego, co wskazuje, że mogą one brać udział w odpowiedzi na pobudzenie i stres.

Powyższe dane wskazują na ważną rolę białka ATRX w organizacji struktury chromatyny w jądrze neuronów zarówno w stanie spoczynkowym, jak i po pobudzeniu, a zaburzenia w regulacji organizacji chromatyny skutkują nieprawidłową morfologią drzewek dendrytycznych.

8. Bibliografia

- Abidi, F. E., Cardoso, C., Lossi, A. M., Lowry, R. B., Depetris, D., Mattéi, M. G., Lubs, H. A., Stevenson, R. E., Fontes, M., Chudley, A. E., & Schwartz, C. E. (2005). Mutation in the 5' alternatively spliced region of the XNP/ATR-X gene causes Chudley-Lowry syndrome. *European Journal of Human Genetics*, *13*(2), 176–183. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201303>
- Alcamí, P., & Pereda, A. E. (2019). Beyond plasticity: the dynamic impact of electrical synapses on neural circuits. *Nature Reviews Neuroscience*, *20*(5), 253–271. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0133-5>
- Allen, K. D., Gourov, A. V., Harte, C., Gao, P., Lee, C., Sylvain, D., Splett, J. M., Oxberry, W. C., van de Nes, P. S., Troy-Regier, M. J., Wolk, J., Alarcon, J. M., & Hernández, A. I. (2014). Nucleolar Integrity Is Required for the Maintenance of Long-Term Synaptic Plasticity. *PLoS ONE*, *9*(8), e104364. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104364>
- Baumann, C., & De La Fuente, R. (2009). ATRX marks the inactive X chromosome (Xi) in somatic cells and during imprinted X chromosome inactivation in trophoblast stem cells. *Chromosoma*, *118*(2), 209–222. <https://doi.org/10.1007/s00412-008-0189-x>
- Benito, E., & Barco, A. (2015). The neuronal activity-driven transcriptome. *Molecular neurobiology*, *51*(3), 1071–1088. <https://doi.org/10.1007/S12035-014-8772-Z>
- Bérubé, N. G., Mangelsdorf, M., Jagla, M., Vanderluit, J., Garrick, D., Gibbons, R. J., Higgs, D. R., Slack, R. S., & Picketts, D. J. (2005). The chromatin-remodeling protein ATRX is critical for neuronal survival during corticogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, *115*(2), 258–267. <https://doi.org/10.1172/JCI200522329>
- Bérubé, N. G., Smeenk, C. A., & Picketts, D. J. (2000). Cell cycle-dependent phosphorylation of the ATRX protein correlates with changes in nuclear matrix and chromatin association. *Human Molecular Genetics*, *9*(4), 539–547. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.4.539>
- Biała, G. (2007). Pamięć a uzależnienia lekowe : rola kalcyneuryny i hipokampa. *Postepy Hig Med Dosw (online)*, *61*, 199–203. http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_61/10358.pdf
- Birnstiel, M. L., Hyde, B. B. (1963). Protein synthesis by isolated pea nucleoli. *The Journal of cell biology*, *18*(18), 41–50. <https://doi.org/10.1083/jcb.18.1.41>
- Bliss, T. V. P., & Gardner-Medwin, A. R. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology*, *232*(2), 357–374. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1973.sp010274>
- Bokota, G., Sroka, J., Basu, S., Das, N., Trzaskoma, P., Yushkevich, Y., Grabowska, A., Magalska, A., & Plewczynski, D. (2021). PartSeg: a tool for quantitative feature extraction from 3D microscopy images for dummies. *BMC Bioinformatics*, *22*(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12859-021-03984-1>
- Botchkarev, V. A., Gdula, M. R., Mardaryev, A. N., Sharov, A. A., & Fessing, M. Y. (2012). Epigenetic regulation of gene expression in keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, *132*(11), 2505–2521. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.182>
- Boulon, S., Westman, B. J., Hutten, S., Boisvert, F. M., & Lamond, A. I. (2010). The Nucleolus under Stress. *W Molecular Cell* (T. 40, Numer 2, ss. 216–227). *Mol Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.024>
- Bramham, C. R. (2010). LTP ≠ learning: Lessons from short-term plasticity. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *4*(FEB), 3–4. <https://doi.org/10.3389/neuro.08.003.2010>

- Brangwynne, C. P., Mitchison, T. J., & Hyman, A. A. (2011). Active liquid-like behavior of nucleoli determines their size and shape in *Xenopus laevis* oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(11), 4334–4339. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017150108>
- Bunina, D., Abazova, N., Diaz, N., Noh, K. M., Krijgsveld, J., & Zaugg, J. B. (2020). Genomic Rewiring of SOX2 Chromatin Interaction Network during Differentiation of ESCs to Postmitotic Neurons. *Cell Systems*, *10*(6), 480-494.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2020.05.003>
- Burke, B., & Stewart, C. L. (2013). The nuclear lamins: Flexibility in function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *14*(1), 13–24. <https://doi.org/10.1038/nrm3488>
- Cheung, T. H. C., & Cardinal, R. N. (2005). Hippocampal lesions facilitate instrumental learning with delayed reinforcement but induce impulsive choice in rats. *BMC Neuroscience*, *6*, 1–24. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-6-36>
- Clynes, D., Higgs, D. R., & Gibbons, R. J. (2013). The chromatin remodeller ATRX: A repeat offender in human disease. *Trends in Biochemical Sciences*, *38*(9), 461–466. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.06.011>
- Cremer. (2015). *FEBS Letters - 2015 - Cremer - The 4D nucleome Evidence for a dynamic nuclear landscape based on co-aligned active and.pdf.*
- Dai, M.-S., Zeng, S. X., Jin, Y., Sun, X.-X., David, L., & Lu, H. (2004). Ribosomal Protein L23 Activates p53 by Inhibiting MDM2 Function in Response to Ribosomal Perturbation but Not to Translation Inhibition. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(17), 7654–7668. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.17.7654-7668.2004>
- Desnoyers, S., Kaufmann, S. H., & Poirier, G. G. (1996). Alteration of the nucleolar localization of poly(ADP-ribose) polymerase upon treatment with transcription inhibitors. *Experimental Cell Research*, *227*(1), 146–153. <https://doi.org/10.1006/excr.1996.0259>
- Dyer, M. A., Qadeer, Z. A., Valle-Garcia, D., & Bernstein, E. (2017). ATRX and DAXX: Mechanisms and mutations. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *7*(3), 1–16. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026567>
- Elsaesser, S. J., Goldberg, A. D., & Allis, C. D. (2011). New functions for an old variant no substitute for histone H3.3. *Curr Opin Genet Dev*. *20*(2):110–117. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2010.01.003>
- Feric, M., Vaidya, N., Harmon, T. S., Mitrea, D. M., Zhu, L., Richardson, T. M., Kriwacki, R. W., Pappu, R. V., & Brangwynne, C. P. (2016). Coexisting Liquid Phases Underlie Nucleolar Subcompartments. *Cell*, *165*(7), 1686–1697. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.047>
- Fussner, E., Strauss, M., Djuric, U., Li, R., Ahmed, K., Hart, M., Ellis, J., & Bazett-Jones, D. P. (2012). Open and closed domains in the mouse genome are configured as 10-nm chromatin fibres. *EMBO Reports*, *13*(11), 992–996. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.139>
- Galganski, L., Urbanek, M. O., & Krzyzosiak, W. J. (2017). Nuclear speckles: Molecular organization, biological function and role in disease. *Nucleic Acids Research*, *45*(18), 10350–10368. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx759>
- Gapp, K., Jawaid, A., Sarkies, P., Bohacek, J., Pelczar, P., Farinelli, L., Miska, E., & Mansuy, I. M. (2014). Feeding the Next Generation of Corn Ethanol Byproducts To. *Nature Neuroscience*, *17*(5), 667–669. <https://doi.org/10.1038/nn.3695>. Implication
- Garrick, D., Samara, V., McDowell, T. L., Smith, A. J. H., Dobbie, L., Higgs, D. R., &

- Gibbons, R. J. (2004). A conserved truncated isoform of the ATR-X syndrome protein lacking the SWI/SNF-homology domain. *Gene*, 326(1–2), 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2003.10.026>
- Gibbons, R. J., & Higgs, D. R. (2000). *Molecular – Clinical Spectrum of the ATR-X Syndrome*. 212, 204–212.
- Gibbons, R. J., Wilkie, A. O. M., Weatherall, D. J., & Higgs, D. R. (1991). A newly defined X linked mental retardation syndrome associated with α thalassaemia. *Journal of Medical Genetics*, 28(11), 729–733. <https://doi.org/10.1136/jmg.28.11.729>
- Goldberg, A. D., Banaszynski, L. A., Noh, K., Lewis, P. W., Elsaesser, J., Stadler, S., Dewell, S., Law, M., Guo, X., Li, X., Wen, D., Chapgier, A., Dekelver, R. C., Miller, J. C., Boydston, E. A., Holmes, M. C., Gregory, P. D., John, M., Rafii, S., ... Urnov, F. D. (2011). *NIH Public Access*. 140(5), 678–691. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.003>.Distinct
- Grummt, I., & Ladurner, A. G. (2008). A Metabolic Throttle Regulates the Epigenetic State of rDNA. *W Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.04.026>
- Gugustea, R., Tamming, R. J., Martin-Kenny, N., Bérubé, N. G., & Leung, L. S. (2020). Inactivation of ATRX in forebrain excitatory neurons affects hippocampal synaptic plasticity. *Hippocampus*, 30(6), 565–581. <https://doi.org/10.1002/hipo.23174>
- Hashimoto, H., Vertino, P. M., & Cheng, X. (2010). Molecular coupling of DNA methylation and histone methylation. *Epigenomics*, 2(5), 657–669. <https://doi.org/10.2217/epi.10.44>
- Hergeth, S. P., & Schneider, R. (2015). “Histones and Chromatin” Review series The H1 linker histones: multifunctional proteins beyond the nucleosomal core particle. *EMBO reports*, 16(11), 1439–1453. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4641498/pdf/embr0016-1439.pdf>
- Herre, M., & Korb, E. (2019). The chromatin landscape of neuronal plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, 59, 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2019.04.006>
- Hetman, M., & Pietrzak, M. (2012). Emerging roles of the neuronal nucleolus. *Trends in Neurosciences*, 35(5), 305–314. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.01.002>
- Hetman, M., & Slomnicki, L. P. (2019). Ribosomal biogenesis as an emerging target of neurodevelopmental pathologies. *Journal of Neurochemistry*, 148(3), 325–347. <https://doi.org/10.1111/jnc.14576>
- Higgs DR, Garrick D, Anguita E, De Gobbi M, Hughes J, Muers M, et al. (2005). *Understanding alpha- globin gene regulation: Aiming to improve the management of thalassemia*.
- Horch, H. W., & Katz, L. C. (2002). BDNF release from single cells elicits local dendritic growth in nearby neurons. *Nature Neuroscience*, 5(11), 1177–1184. <https://doi.org/10.1038/nn927>
- Ishov, A. M., Sotnikov, A. G., Negorev, D., Vladimirova, O. V., Neff, N., Kamitani, T., Yeh, E. T. H., Strauss, J. F., & Maul, G. G. (1999). PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein Daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *Journal of Cell Biology*, 147(2), 221–233. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.2.221>
- James, A., Wang, Y., Raje, H., Rosby, R., & DiMario, P. (2014). Nucleolar stress with and without p53. *Nucleus*, 5(5), 402–426. <https://doi.org/10.4161/nucl.32235>
- Jin, B., & Robertson, K. D. (2013). DNA methyltransferases, DNA damage repair, and cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 754, 3–29. <https://doi.org/10.1007/978->

- Kaczmarek, L. (1992). Expression of c-fos and other genes encoding transcription factors in long-term potentiation. *Behavioral and Neural Biology*, *57*(3), 263–266. [https://doi.org/10.1016/0163-1047\(92\)90276-A](https://doi.org/10.1016/0163-1047(92)90276-A)
- Kalita, K., Makonchuk, D., Gomes, C., Zheng, J. J., & Hetman, M. (2008). Inhibition of nucleolar transcription as a trigger for neuronal apoptosis. *Journal of Neurochemistry*, *105*(6), 2286–2299. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05316.x>
- Kaufmann, W. E., & Moser, H. W. (2000). Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cerebral Cortex*, *10*(10), 981–991. <https://doi.org/10.1093/cercor/10.10.981>
- Kernohan, K. D., Vernimmen, D., Gloor, G. B., & Bérubé, N. G. (2014). Analysis of neonatal brain lacking ATRX or MeCP2 reveals changes in nucleosome density, CTCF binding and chromatin looping. *Nucleic Acids Research*, *42*(13), 8356–8368. <https://doi.org/10.1093/nar/gku564>
- Khatau, S. B., Hale, C. M., Stewart-Hutchinson, P. J., Patel, M. S., Stewart, C. L., Searson, P. C., Hodzic, D., & Wirtz, D. (2009). A perinuclear actin cap regulates nuclear shape. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(45), 19017–19022. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908686106>
- Kim, S., Yu, N. K., & Kaang, B. K. (2015). CTCF as a multifunctional protein in genome regulation and gene expression. *Experimental and Molecular Medicine*, *47*(6). <https://doi.org/10.1038/EMM.2015.33>
- Kobayashi, T. (2008). A new role of the rDNA and nucleolus in the nucleus - RDNA instability maintains genome integrity. *BioEssays*, *30*(3), 267–272. <https://doi.org/10.1002/bies.20723>
- Kornberg, R. (1974). Chromatin Structure : A Repeating Unit of Histones and DNA Chromatin structure is based on a repeating unit of eight. *Science*, *184*, 868–871.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*, *128*(4), 693–705. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>
- Lafontaine, D. L. J., Riback, J. A., Bascetin, R., & Brangwynne, C. P. (2020). The nucleolus as a multiphase liquid condensate. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (T. 22, Numer 3, ss. 165–182). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0272-6>
- Lewis, P. W., Elsaesser, S. J., Noh, K. M., Stadler, S. C., & Allis, C. D. (2010). Daxx is an H3.3-specific histone chaperone and cooperates with ATRX in replication-independent chromatin assembly at telomeres. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(32), 14075–14080. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008850107>
- Lindström, M. S., Jurada, D., Bursac, S., Orsolich, I., Bartek, J., & Volarevic, S. (2018). Nucleolus as an emerging hub in maintenance of genome stability and cancer pathogenesis. *Oncogene*, *37*(18), 2351–2366. <https://doi.org/10.1038/s41388-017-0121-z>
- Lisa Eiland^{1,2}, Johnny Ramroop², Matthew N. Hill², Jasmine Manley², and B. S. M. (2012). 基因的改变 NIH Public Access. *Psychoneuroendocrinology*, *32*(6), 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2011.04.015>.Chronic
- Liu, Y., Liang, S., & Tartakoff, A. M. (1996). Heat shock disassembles the nucleolus and inhibits nuclear protein import and poly(A)⁺ RNA export. *EMBO Journal*, *15*(23), 6750–6757. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb01064.x>

- Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., & Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648), 251–260. <https://doi.org/10.1038/38444>
- Maggi, L. B., Kuchenruether, M., Dadey, D. Y. A., Schwoppe, R. M., Grisendi, S., Townsend, R. R., Pandolfi, P. P., & Weber, J. D. (2008). Nucleophosmin Serves as a Rate-Limiting Nuclear Export Chaperone for the Mammalian Ribosome. *Molecular and Cellular Biology*, 28(23), 7050–7065. <https://doi.org/10.1128/mcb.01548-07>
- Majewski, L., Nowak, J., Sobczak, M., Karatsai, O., Havrylov, S., Lenartowski, R., Suszek, M., Lenartowska, M., & Redowicz, M. J. (2018). Myosin VI in the nucleus of neurosecretory PC12 cells: Stimulation-dependent nuclear translocation and interaction with nuclear proteins. *Nucleus*, 9(1), 125–141. <https://doi.org/10.1080/19491034.2017.1421881>
- Marano, D., Fioriniello, S., Fiorillo, F., Gibbons, R. J., D'posito, M., & Ragione, F. Della. (2019). ATRX contributes to MECP2-mediated pericentric heterochromatin organization during neural differentiation. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21), 1–28. <https://doi.org/10.3390/ijms20215371>
- Marquez-Lona, E. M., Tan, Z., & Schreiber, S. S. (2012). Nucleolar stress characterized by downregulation of nucleophosmin: A novel cause of neuronal degeneration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 417(1), 514–520. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.11.152>
- Matthews, D. A. (2001). Adenovirus Protein V Induces Redistribution of Nucleolin and B23 from Nucleolus to Cytoplasm. *Journal of Virology*, 75(2), 1031–1038. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.2.1031-1038.2001>
- Maze, I., Wenderski, W., Noh, K. M., Bagot, R. C., Tzavaras, N., Purushothaman, I., Elsässer, S. J., Guo, Y., Ionete, C., Hurd, Y. L., Tamminga, C. A., Halene, T., Farrelly, L., Soshnev, A. A., Wen, D., Rafii, S., Birtwistle, M. R., Akbarian, S., Buchholz, B. A., ... Allis, C. D. (2015). Critical Role of Histone Turnover in Neuronal Transcription and Plasticity. *Neuron*, 87(1), 77–94. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.06.014>
- McDowell, T. L., Gibbons, R. J., Sutherland, H., O'Rourke, D. M., Bickmore, W. A., Pombo, A., Turley, H., Gatter, K., Picketts, D. J., Buckle, V. J., Chapman, L., Rhodes, D., & Higgs, D. R. (1999). Localization of a putative transcriptional regulator (ATRX) at pericentromeric heterochromatin and the short arms of acrocentric chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(24), 13983–13988. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.13983>
- McStay, B., & Grummt, I. (2008). The epigenetics of rRNA genes: From molecular to chromosome biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 24, 131–157. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175259>
- Medrano-Fernández, A., & Barco, A. (2016). Nuclear organization and 3D chromatin architecture in cognition and neuropsychiatric disorders. *Molecular Brain*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13041-016-0263-x>
- Mélèse, T., & Xue, Z. (1995). The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome. *Current Opinion in Cell Biology*, 7(3), 319–324. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(95\)80085-9](https://doi.org/10.1016/0955-0674(95)80085-9)
- Mifsud, B., Tavares-Cadete, F., Young, A. N., Sugar, R., Schoenfelder, S., Ferreira, L., Wingett, S. W., Andrews, S., Grey, W., Ewels, P. A., Herman, B., Happe, S., Higgs, A., Leproust, E., Follows, G. A., Fraser, P., Luscombe, N. M., & Osborne, C. S. (2015). Mapping long-range promoter contacts in human cells with high-resolution capture Hi-C. *Nature Genetics*, 47(6), 598–606. <https://doi.org/10.1038/ng.3286>

- Miller, O. L., & Beatty, B. R. (1969). Visualization of nucleolar genes. *Science*, *164*(3882), 955–957. <https://doi.org/10.1126/science.164.3882.955>
- Montgomery, T. H. (1898). Comparative cytological studies, with especial regard to the morphology of the nucleolus. *Journal of Morphology*.
- Morgan, A., Gandin, I., Belcaro, C., Palumbo, P., Palumbo, O., Biamino, E., Dal Col, V., Laurini, E., Pricl, S., Bosco, P., Carella, M., Ferrero, G. B., Romano, C., d'Adamo, A. P., Faletra, F., & Vozzi, D. (2015). Target sequencing approach intended to discover new mutations in non-syndromic intellectual disability. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *781*, 32–36. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2015.09.002>
- Nazer, E. (2022). To be or not be (in the LAD): emerging roles of lamin proteins in transcriptional regulation. *Biochemical Society Transactions*, *50*(2), 1035–1044. <https://doi.org/10.1042/BST20210858>
- Noh, K. M., Maze, I., Zhao, D., Xiang, B., Wenderski, W., Lewis, P. W., Shen, L., Li, H., & Allis, C. D. (2015). ATRX tolerates activity-dependent histone H3 methyl/phos switching to maintain repetitive element silencing in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(22), 6820–6827. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411258112>
- Núñez Villacís, L., Wong, M. S., Ferguson, L. L., Hein, N., George, A. J., & Hannan, K. M. (2018). New Roles for the Nucleolus in Health and Disease. *BioEssays*, *40*(5), 8–10. <https://doi.org/10.1002/bies.201700233>
- Olausson, K. H., Nistér, M., & Lindström, M. S. (2012). P53 -Dependent and -Independent Nucleolar Stress Responses. *Cells*, *1*(4), 774–798. <https://doi.org/10.3390/cells1040774>
- Otmakhov, N., Khibnik, L., Otmakhova, N., Carpenter, S., Riahi, S., Asrican, B., & Lisman, J. (2004). Forskolin-Induced LTP in the CA1 Hippocampal Region Is NMDA Receptor Dependent. *Journal of Neurophysiology*, *91*(5), 1955–1962. <https://doi.org/10.1152/jn.00941.2003>
- Pang, Y., Chen, X., Ji, T., Cheng, M., Wang, R., Zhang, C., Liu, M., Zhang, J., & Zhong, C. (2023). The Chromatin Remodeler ATRX: Role and Mechanism in Biology and Cancer. *Cancers*, *15*(8). <https://doi.org/10.3390/cancers15082228>
- Percy, A. K., Neul, J. L., Benke, T. A., Marsh, E. D., & Glaze, D. G. (2023). A review of the Rett Syndrome Behaviour Questionnaire and its utilization in the assessment of symptoms associated with Rett syndrome. *Frontiers in Pediatrics*, *11*(July), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fped.2023.1229553>
- Perry, R. P. (1967). The Nucleolus and the Synthesis of Ribosomes. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, *6*(C), 219–257. [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(08\)60528-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(08)60528-0)
- Picketts, D. J., Higgs, D. R., Bachoo, S., Blake, D. J., Quarrell, O. W. J., & Gibbons, R. J. (1996). ATRX encodes a novel member of the SNF2 family of proteins: Mutations point to a common mechanism underlying the ATR-X syndrome. *Human Molecular Genetics*, *5*(12), 1899–1907. <https://doi.org/10.1093/hmg/5.12.1899>
- Picketts, D. J., Tastan, A. O., Higgs, D. R., & Gibbons, R. J. (1998). Comparison of the human and murine ATRX gene identifies highly conserved, functionally important domains. *Mammalian Genome*, *9*(5), 400–403. <https://doi.org/10.1007/s003359900781>
- Placek, B. J., & Gloss, L. M. (2002). The N-terminal tails of the H2A-H2B histones affect dimer structure and stability. *Biochemistry*, *41*(50), 14960–14968. <https://doi.org/10.1021/bi026283k>

- Ratnakumar, K., & Bernstein, E. (2013). ATRX: The case of a peculiar chromatin remodeler. *Epigenetics*, 8(1), 3–9. <https://doi.org/10.4161/epi.23271>
- Reymann, K. G., & Frey, J. U. (2007). The late maintenance of hippocampal LTP: Requirements, phases, „synaptic tagging”, „late-associativity” and implications. *Neuropharmacology*, 52(1), 24–40. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.07.026>
- Richter, J. D., & Klann, E. (2009). Making synaptic plasticity and memory last: Mechanisms of translational regulation. *Genes and Development*, 23(1), 1–11. <https://doi.org/10.1101/gad.1735809>
- Rodrigues, S. M., Schafe, G. E., & Ledoux, J. E. (2004). Molecular mechanisms underlying emotional learning and memory in the lateral amygdala. *Neuron*, 44(1), 75–91. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.09.014>
- Rorbach-Dolata, A., Kubis, A., & Piwowar, A. (2017). Epigenetic modifications: An important mechanism in diabetic disturbances. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 71(0), 0–0. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.6156>
- Roszkowska, M., Skupien, A., Wójtowicz, T., Konopka, A., Gorlewicz, A., Kisiel, M., Bekisz, M., Ruszczycycki, B., Dolezyczek, H., Rejmak, E., Knapska, E., Mozrzymas, J. W., Włodarczyk, J., Wilczynski, G. M., & Dzwonek, J. (2016). CD44: A novel synaptic cell adhesion molecule regulating structural and functional plasticity of dendritic spines. *Molecular Biology of the Cell*, 27(25), 4055–4066. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-06-0423>
- Rubbi, C. P., & Milner, J. (2003). Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses. *The EMBO Journal*, 22(22), 6068–6077.
- Ryan, D. P., & Owen-hughes, T. (2014). *Europe PMC Funders Group Snf2-family proteins : chromatin remodellers for any occasion*. 15(5), 649–656. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.07.022.Snf2-family>
- Sacharowski, S. P. (2019). Mechanizmy kontrolujące strukturę chromatyny. *Postępy Biochem*, 65(1), 9–20. [file:///C:/Users/dholm/Downloads/mbasaj,+%7B\\$userGroup%7D,+2221_Sacharowski\(1\).pdf](file:///C:/Users/dholm/Downloads/mbasaj,+%7B$userGroup%7D,+2221_Sacharowski(1).pdf)
- Seah, C., Levy, M. A., Jiang, Y., Mokhtarzada, S., Higgs, D. R., Gibbons, R. J., & Bérubé, N. G. (2008). Neuronal death resulting from targeted disruption of the Snf2 protein ATRX is mediated by p53. *Journal of Neuroscience*, 28(47), 12570–12580. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4048-08.2008>
- Selakovic, D., Joksimovic, J., Jovicic, N., Mitrovic, S., Mihailovic, V., Katanic, J., Milovanovic, D., Pantovic, S., Mijailovic, N., & Rosic, G. (2019). The impact of hippocampal sex hormones receptors in modulation of depressive-like behavior following chronic anabolic androgenic steroids and exercise protocols in rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 13(February), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00019>
- Stoppini, L., Buchs, P. A., & Muller, D. (1991). A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *Journal of Neuroscience Methods*, 37(2), 173–182. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(91\)90128-M](https://doi.org/10.1016/0165-0270(91)90128-M)
- Talbert, P. B., & Henikoff, S. (2010). Histone variants ancient wrap artists of the epigenome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(4), 264–275. <https://doi.org/10.1038/nrm2861>
- Thielmann, H. W., Popanda, O., & Staab, H. J. (1999). Subnuclear distribution of DNA topoisomerase I and Bax protein in normal and xeroderma pigmentosum fibroblasts after irradiation with UV light and γ rays or treatment with topotecan. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 125(3–4), 193–208.

<https://doi.org/10.1007/s004320050263>

- Trovato, M., Patil, V., Gehre, M., & Noh, K. M. (2020). Histone Variant H3.3 Mutations in Defining the Chromatin Function in Mammals. *Cells*, *9*(12).
<https://doi.org/10.3390/cells9122716>
- Truch, J., Downes, D. J., Scott, C., Gür, E. R., Telenius, J. M., Repapi, E., Schwessinger, R., Gosden, M., Brown, J. M., Taylor, S., Cheong, P. L., Hughes, J. R., Higgs, D. R., & Gibbons, R. J. (2022). The chromatin remodeller ATRX facilitates diverse nuclear processes, in a stochastic manner, in both heterochromatin and euchromatin. *Nature Communications*, *13*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31194-7>
- Tsankova N, Renthal W, Kumar A, Nestler EJ.(2007) Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci*. 2007 May;8(5):355-67. doi: 10.1038/nrn2132.
- Tsekrekou, M., Stratigi, K., & Chatzinikolaou, G. (2017). The nucleolus: In genome maintenance and repair. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(7).
<https://doi.org/10.3390/ijms18071411>
- Urbanska M, Blazejczyk M, Jaworski J.(2008) Molecular basis of dendritic arborization. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 68(2):264-88. doi: 10.55782/ane-2008-1695.
- Urbanska M, Swiech L, Jaworski J.(2012) Developmental plasticity of the dendritic compartment: focus on the cytoskeleton. *Adv Exp Med Biol*. 970:265-84. doi: 10.1007/978-3-7091-0932-8_12.
- Vargas, J. P., Rodríguez, F., López, J. C., Arias, J. L., & Salas, C. (2000). Spatial learning-induced increase in the argyrophilic nucleolar organizer region of dorsolateral telencephalic neurons in goldfish. *Brain Research*, *865*(1), 77–84.
[https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02220-4](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02220-4)
- Villard, L., Lossi, A. M., Cardoso, C., Proud, V., Chiaroni, P., Colleaux, L., Schwartz, C., & Fontés, M. (1997). Determination of the genomic structure of the XNP/ATRX gene encoding a potential zinc finger helicase. *Genomics*, *43*(2), 149–155.
<https://doi.org/10.1006/geno.1997.4793>
- Vincent, J. A., Kwong, T. J., & Tsukiyama, T. (2008). ATP-dependent chromatin remodeling shapes the DNA replication landscape. *Nature Structural and Molecular Biology*, *15*(5), 477–484. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1419>
- Walczak, A., Szczepankiewicz, A. A., Ruszczycki, B., Magalska, A., Zamlinska, K., Dzwonek, J., Wilczek, E., Zybura-Broda, K., Rylski, M., Malinowska, M., Dabrowski, M., Szczepinska, T., Pawlowski, K., Pyskaty, M., Wlodarczyk, J., Szczerbal, I., Switonski, M., Cremer, M., & Wilczynski, G. M. (2013). Novel higher-order epigenetic regulation of the Bdnf gene upon seizures. *Journal of Neuroscience*, *33*(6), 2507–2511.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1085-12.2013>
- Warmerdam, D. O., & Wolthuis, R. M. F. (2019). Keeping ribosomal DNA intact: a repeating challenge. *Chromosome Research*, *27*(1–2), 57–72. <https://doi.org/10.1007/s10577-018-9594-z>
- Wilczynski, G. M. (2014). Significance of higher-order chromatin architecture for neuronal function and dysfunction. *Neuropharmacology*, *80*, 28–33.
<https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2014.01.016>
- Wong, L. H., McGhie, J. D., Sim, M., Anderson, M. A., Ahn, S., Hannan, R. D., George, A. J., Morgan, K. A., Mann, J. R., & Choo, K. H. A. (2010). ATRX interacts with H3.3 in maintaining telomere structural integrity in pluripotent embryonic stem cells. *Genome Research*, *20*(3), 351–360. <https://doi.org/10.1101/gr.101477.109>

- Wu, H., & Zhang, Y. (2014). Reversing DNA methylation: Mechanisms, genomics, and biological functions. *Cell*, *156*(1–2), 45–68. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.019>
- Xue, Y., Gibbons, R., Yan, Z., Yang, D., McDowell, T. L., Sechi, S., Qin, J., Zhou, S., Higgs, D., & Wang, W. (2003). The ATRX syndrome protein forms a chromatin-remodeling complex with Daxx and localizes in promyelocytic leukemia nuclear bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(19), 10635–10640. <https://doi.org/10.1073/pnas.1937626100>
- Yamada, S., & Nelson, W. J. (2007). Synapses: Sites of Cell Recognition, Adhesion, and Functional Specification *Annu Rev Biochem.*, *76*(1), 267–294. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142811.Synapses>
- Yang, K., Wang, M., Zhao, Y., Sun, X., Yang, Y., Li, X., Zhou, A., Chu, H., Zhou, H., Xu, J., Wu, M., Yang, J., & Yi, J. (2016). A redox mechanism underlying nucleolar stress sensing by nucleophosmin. *Nature Communications*, *7*, 1–16. <https://doi.org/10.1038/ncomms13599>
- Yap, E. L., & Greenberg, M. E. (2018). Activity-regulated transcription: Bridging the gap between neural activity and behavior. *Neuron*, *100*(2), 330. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2018.10.013>
- Yasuzumi, G., Sawada, T., Sugihara, R., Kiriya, M., & Sugioka, M. (1958). Electron microscope researches on the ultrastructure of nucleoli in animal tissues. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, *48*(1), 10–23. <https://doi.org/10.1007/BF00496710>
- Yogev, O., Saadon, K., Anzi, S., Inoue, K., & Shaulian, E. (2008). DNA damage-dependent translocation of B23 and p19ARF is regulated by the Jun N-terminal kinase pathway. *Cancer Research*, *68*(5), 1398–1406. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2865>
- Yung, B. Y. M., Busch, H., & Chan, P. K. (1985). Translocation of nucleolar phosphoprotein B23 (37kDa pI 5.1) induced by selective inhibitors of ribosome synthesis. *BBA - Gene Structure and Expression*, *826*(4), 167–173. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(85\)90002-8](https://doi.org/10.1016/0167-4781(85)90002-8)

Spis publikacji doktorantki i doniesienia zjazdowe

Publikacje naukowe:

Grabowska A., Sas-Nowosielska H., Wojtas B., **Holm-Kaczmarek D.**, Januszewicz E., Yushkevich Y., Czaban I., Trzaskoma P., Krawczyk K., Gielniewski B., Martin-Gonzalez A., Filipkowski R.K., Olszynski K.H., Bernas T., Szczepankiewicz A.A., Sliwinska M.A., Kanhema T., Bramham C.R., Bokota G., Plewczynski D., Wilczynski G.M., Magalska A. 2022. *Activation-induced chromatin reorganization in neurons depends on HDAC1 activity*. Cell Rep. 38(7): 110352.

Doniesienia zjazdowe:

2022 r. 6th PhD Student Conference, Warszawa, Polska

speed talk: *ATRX loss alters nuclear architecture of hippocampal neurons*

2021 r. EMBL Conference: Chromatin and Epigenetics, virtual

plakat: *The role of ATRX chromatin remodeler in neuronal nuclear architecture and histone modifications*

współautorka plakatu: *Changes of nuclear landscape upon stimulation of neuronal cells*

2020 r. 12th FENS Forum of Neuroscience – virtual forum,

plakat: *The role of ARTX in neuronal nucleolus and nuclear chromatin architecture*

2018 r. Mini-Symposium Neuroscience meets genome biology, Serock, Polska

prezentacja w formie wykładu: *ATRX – particular chromatin remodeler*

2018 r. Keystone Conference: Chromatin Architecture and Chromosome Organization (X5), Whistler, Kanada

współautorka plakatu: *Activity-driven chromatin remodeling in neurons is dependent on HDAC1 deacetylase*

2018 r. 11th FENS Forum of Neuroscience, Berlin, Niemcy

współautorka plakatu: *Activity-dependent chromatin architecture remodeling*

2018 r. EMBL Conference: Principles of Chromosome Structure and Function, Heidelberg, Niemcy

współautorka plakatu: *Activity-induced chromatin remodeling in neurons is dependent of HDAC1 histone deacetylase*

2017 r. 4D Nucleome: The Cell Nucleus in Space and Time, Kraków, Polska

współautorka plakatu: *Activity driven chromatin condensation in neurons*

**Errata do rozprawy doktorskiej pt.
“Rola białka ATRX w organizacji chromatyny neuronów hipokampa
mózgu szczura” autorstwa Dagmary Holm-Kaczmarek
w odpowiedzi na recenzję dr Agnieszki Girstun**

8. Bibliografia

- Abidi, F. E., Cardoso, C., Lossi, A. M., Lowry, R. B., Depetris, D., Mattéi, M. G., Lubs, H. A., Stevenson, R. E., Fontes, M., Chudley, A. E., & Schwartz, C. E. (2005). Mutation in the 5' alternatively spliced region of the XNP/ATR-X gene causes Chudley-Lowry syndrome. *European Journal of Human Genetics*, *13*(2), 176–183. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201303>
- Aguilera, P. & López-Contreras, A. J. ATRX, a guardian of chromatin. (2023). *Trends Genet.* *39*(6):505-519. doi: 10.1016/j.tig.2023.02.009. Epub 2023 Mar 7. PMID: 36894374.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell* (5th ed.). New York: *Garland Science*.
- Alcamí, P. & Pereda, A. E. (2019). Beyond plasticity: the dynamic impact of electrical synapses on neural circuits. *Nature Reviews Neuroscience*, *20*(5), 253–271. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0133-5>
- Allen, K. D., Gourov, A. V., Harte, C., Gao, P., Lee, C., Sylvain, D., Splett, J. M., Oxberry, W. C., van de Nes, P. S., Troy-Regier, M. J., Wolk, J., Alarcon, J. M., & Hernández, A. I. (2014). Nucleolar Integrity Is Required for the Maintenance of Long-Term Synaptic Plasticity. *PLoS ONE*, *9*(8), e104364. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104364>
- Argilli, E., Sibley, D.R., Malenka, R.C., England, P.M., Bonci, A. (2008). Mechanism and time course of cocaine-induced long-term potentiation in the ventral tegmental area. *J Neurosci.* 2008 Sep 10;28(37):9092-100. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1001-08.2008. PMID: 18784289; PMCID: PMC2586328.
- Banker, G.A. & Cowan, W.M. (1977) Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res.* 1977 May 13;126(3):397-42. doi: 10.1016/0006-8993(77)90594-7. PMID: 861729.
- Barr, M. & Bertram, E. A Morphological Distinction between Neurones of the Male and Female, and the Behaviour of the Nucleolar Satellite during Accelerated Nucleoprotein Synthesis. (1949). *Nature* 163, 676–677. <https://doi.org/10.1038/163676a0>
- Baumann, C., & De La Fuente, R. (2009). ATRX marks the inactive X chromosome (Xi) in somatic cells and during imprinted X chromosome inactivation in trophoblast stem cells. *Chromosoma*, *118*(2), 209–222. <https://doi.org/10.1007/s00412-008-0189-x>
- Beaudoin, G. M. 3rd, Seung-Hye L., Dipika, S., Yang, Y., Yu-Gie, N., Louis, F. R., Jyothi, A. (2012) Culturing pyramidal neurons from the early postnatal mouse hippocampus and cortex. *Nat Protoc.* 2012 Sep;7(9):1741-54. doi: 10.1038/nprot.2012.099. Epub 2012 Aug 30. PMID: 22936216.
- Benito, E., & Barco, A. (2015). The neuronal activity-driven transcriptome. *Molecular neurobiology*, *51*(3), 1071–1088. <https://doi.org/10.1007/S12035-014-8772-Z>

- Bérubé, N. G., Mangelsdorf, M., Jagla, M., Vanderluit, J., Garrick, D., Gibbons, R. J., Higgs, D. R., Slack, R. S., & Picketts, D. J. (2005). The chromatin-remodeling protein ATRX is critical for neuronal survival during corticogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, *115*(2), 258–267. <https://doi.org/10.1172/JCI200522329>
- Bérubé, N. G., Smeenk, C. A., & Picketts, D. J. (2000). Cell cycle-dependent phosphorylation of the ATRX protein correlates with changes in nuclear matrix and chromatin association. *Human Molecular Genetics*, *9*(4), 539–547. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.4.539>
- Biała, G. (2007). Pamięć a uzależnienia lekowe : rola kalcyneuryny i hipokampa. *Postepy Hig Med Dosw (online)*, *61*, 199–203. http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_61/10358.pdf
- Billia, F., Baskys, A., Carlen, P.L., De Boni, U. (1992). Rearrangement of centromeric satellite DNA in hippocampal neurons exhibiting long-term potentiation. *Molecular Brain Research*. Volume 14, Issues 1-2. [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(92\)90016-5](https://doi.org/10.1016/0169-328X(92)90016-5).
- Birnstiel, M. L. & Hyde, B. B. (1963). Protein synthesis by isolated pea nucleoli. *The Journal of cell biology*, *18*(18), 41–50. <https://doi.org/10.1083/jcb.18.1.41>
- Bliss, T.V. & Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*. Jul;232(2):331-56. doi: 10.1113/jphysiol.1973.sp010273.
- Bokota, G., Sroka, J., Basu, S., Das, N., Trzaskoma, P., Yushkevich, Y., Grabowska, A., Magalska, A., & Plewczynski, D. (2021). PartSeg: a tool for quantitative feature extraction from 3D microscopy images for dummies. *BMC Bioinformatics*, *22*(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12859-021-03984-1>
- Botchkarev, V. A., Gdula, M. R., Mardaryev, A. N., Sharov, A. A., & Fessing, M. Y. (2012). Epigenetic regulation of gene expression in keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, *132*(11), 2505–2521. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.182>
- Boulon, S., Westman, B. J., Hutten, S., Boisvert, F. M., & Lamond, A. I. (2010). The Nucleolus under Stress. *Molecular Cell* (T. 40, Numer 2, ss. 216–227). *Mol Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.024>
- Bramham, C. R. (2010). LTP ≠ learning: Lessons from short-term plasticity. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *4*(FEB), 3–4. <https://doi.org/10.3389/neuro.08.003.2010>
- Brangwynne, C. P., Mitchison, T. J., & Hyman, A. A. (2011). Active liquid-like behavior of nucleoli determines their size and shape in *Xenopus laevis* oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(11), 4334–4339. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017150108>
- Bunina, D., Abazova, N., Diaz, N., Noh, K. M., Krijgsveld, J., & Zaugg, J. B. (2020). Genomic Rewiring of SOX2 Chromatin Interaction Network during Differentiation of ESCs to Postmitotic Neurons. *Cell Systems*, *10*(6), 480-494.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2020.05.003>
- Burke, B., & Stewart, C. L. (2013). The nuclear lamins: Flexibility in function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *14*(1), 13–24. <https://doi.org/10.1038/nrm3488>
- Byrne, M.J., Putkey, J.A., Neal Waxham, M. et al. (2009). Dissecting cooperative calmodulin binding to CaM kinase II: a detailed stochastic model. *J Comput Neurosci* *27*, 621–638. <https://doi.org/10.1007/s10827-009-0173-3>
- Cabral JM, Oh HS, Knipe DM. ATRX promotes maintenance of herpes simplex virus heterochromatin during chromatin stress. (2018). *Elife*. 2018 Nov 22;7:e40228. doi: 10.7554/eLife.40228. PMID:

30465651; PMID: PMC6307862.

- Chaurasia, A., Park, S.H., Seo, J.W., Park, C.K. (2016). Immunohistochemical Analysis of ATRX, IDH1 and p53 in Glioblastoma and Their Correlations with Patient Survival. *J Korean Med Sci.* 2016 Aug;31(8):1208-14. doi: 10.3346/jkms.2016.31.8.1208. Epub 2016 May 30. PMID: 27478330; PMID: PMC4951549.
- Cheung, T. H. C., & Cardinal, R. N. (2005). Hippocampal lesions facilitate instrumental learning with delayed reinforcement but induce impulsive choice in rats. *BMC Neuroscience*, 6, 1–24. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-6-36>
- Clynes, D., Higgs, D. R., & Gibbons, R. J. (2013). The chromatin remodeller ATRX: A repeat offender in human disease. *Trends in Biochemical Sciences*, 38(9), 461–466. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.06.011>
- Clynes, D., Jelinska, C., Xella, B., Ayyub, H., Taylor, S., Mitson, M., Bachrati, CZ., Higgs, D. R., Gibbons, R. J. (2014). ATRX dysfunction induces replication defects in primary mouse cells. *PLoS One*. 2014 Mar 20;9(3):e92915. doi: 10.1371/journal.pone.0092915. PMID: 24651726; PMID: PMC3961441.
- Cremer, T., Cremer, M., Hübner, B., Strickfaden, H., Smeets, D., Popken, J., Sterr, M., Markaki, Y., Rippe, K., Cremer, C. (2015). The 4D nucleome: Evidence for a dynamic nuclear landscape based on co-aligned active and inactive nuclear compartments. *FEBS Lett.* 7;589(20 Pt A):2931-43. doi: 10.1016/j.febslet.2015.05.037. Epub 2015 May 28. PMID: 26028501.
- Dai, M.-S., Zeng, S. X., Jin, Y., Sun, X.-X., David, L., & Lu, H. (2004). Ribosomal Protein L23 Activates p53 by Inhibiting MDM2 Function in Response to Ribosomal Perturbation but Not to Translation Inhibition. *Molecular and Cellular Biology*, 24(17), 7654–7668. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.17.7654-7668.2004>
- De Carlos, J. A., & Borrell, J. (2007). A historical reflection of the contributions of Cajal and Golgi to the foundations of neuroscience. *Brain Research Reviews*, 55(1), 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.03.010>
- De Castro, F., López-Mascaraque, L., & De Carlos, J. A. (2007). Cajal: Lessons on brain development. *Brain Research Reviews*, 55(2 SPEC. ISS.), 481–489. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.01.011>
- Dekker, J., Rippe, K., Dekker, M., Kleckner, N.. Capturing chromosome conformation. (2002). *Science*. Feb 15;295(5558):1306-11. doi: 10.1126/science.1067799. PMID: 11847345.
- Desnoyers, S., Kaufmann, S. H., & Poirier, G. G. (1996). Alteration of the nucleolar localization of poly(ADP-ribose) polymerase upon treatment with transcription inhibitors. *Experimental Cell Research*, 227(1), 146–153. <https://doi.org/10.1006/excr.1996.0259>
- Duvernoy, H. M. (2005). The Human Hippocampus: Functional Anatomy, Vascularization and Serial Sections. *Springer*. ISBN: 978-3540209817.
- Dyer, M. A., Qadeer, Z. A., Valle-Garcia, D., & Bernstein, E. (2017). ATRX and DAXX: Mechanisms and mutations. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(3), 1–16. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026567>
- Eiland, L., Ramroop, J., Hill, M. N., Manley, J., McEwen, B. S. (2012). Chronic juvenile stress produces corticolimbic dendritic architectural remodeling and modulates emotional behavior in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology*. Jan;37(1):39-47. doi: 10.1016/j.psyneuen.2011.04.015.

- Elsaesser, S. J., Goldberg, A. D., & Allis, C. D. (2011). *Elsaesser S J (2010) New functions for an old variant no substitute for histone H3.3*. 20(2), 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2010.01.003>
- Felsenfeld, G. & Groudine, M.. Controlling the double helix. (2003). *Nature*. Jan 23;421(6921):448-53. doi: 10.1038/nature01411. PMID: 12540921.
- Feric, M., Vaidya, N., Harmon, T. S., Mitrea, D. M., Zhu, L., Richardson, T. M., Kriwacki, R. W., Pappu, R. V., & Brangwynne, C. P. (2016). Coexisting Liquid Phases Underlie Nucleolar Subcompartments. *Cell*, 165(7), 1686–1697. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.047>
- Fussner, E., Strauss, M., Djuric, U., Li, R., Ahmed, K., Hart, M., Ellis, J., & Bazett-Jones, D. P. (2012). Open and closed domains in the mouse genome are configured as 10-nm chromatin fibres. *EMBO Reports*, 13(11), 992–996. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.139>
- Freed, E.F., Bleichert, F., Dutca, L.M., Baserga, S.J. (2010). When ribosomes go bad: diseases of ribosome biogenesis. *Mol Biosyst*. 2010 Mar;6(3):481-93. doi: 10.1039/b919670f. Epub 2010 Jan 11. PMID: 20174677; PMCID: PMC2965583.
- Galganski, L., Urbanek, M. O., & Krzyzosiak, W. J. (2017). Nuclear speckles: Molecular organization, biological function and role in disease. *Nucleic Acids Research*, 45(18), 10350–10368. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx759>
- Gapp, K., Jawaid, A., Sarkies, P., Bohacek, J., Pelczar, P., Farinelli, L., Miska, E., & Mansuy, I. M. (2014). Feeding the Next Generation of Corn Ethanol Byproducts To. *Nature Neuroscience*, 17(5), 667–669. <https://doi.org/10.1038/nn.3695.Implication>
- Garrick, D., Samara, V., McDowell, T. L., Smith, A. J. H., Dobbie, L., Higgs, D. R., & Gibbons, R. J. (2004). A conserved truncated isoform of the ATR-X syndrome protein lacking the SWI/SNF-homology domain. *Gene*, 326(1–2), 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2003.10.026>
- Gibbons, R. J., & Higgs, D. R. (2000). *Molecular – Clinical Spectrum of the ATR-X Syndrome*. 212, 204–212.
- Gibbons, R. J., Wilkie, A. O. M., Weatherall, D. J., & Higgs, D. R. (1991). A newly defined X linked mental retardation syndrome associated with α thalassaemia. *Journal of Medical Genetics*, 28(11), 729–733. <https://doi.org/10.1136/jmg.28.11.729>
- Gluck, M. A., & Myers, C. E. (1997). Psychobiological models of hippocampal function in learning and memory. *Annual Review of Psychology*, 48, 481–514. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.48.1.481>
- Goldberg, A. D., Banaszynski, L. A., Noh, K., Lewis, P. W., Elsaesser, J., Stadler, S., Dewell, S., Law, M., Guo, X., Li, X., Wen, D., Chappier, A., Dekelver, R. C., Miller, J. C., Boydston, E. A., Holmes, M. C., Gregory, P. D., John, M., Rafii, S., Urnov, F. D., Zheng D., Allis C. D. (2011). Distinct Factors Control Histone Variant H3.3 Localization at Specific Genomic Regions. *Cell*. 140(5), 678–691. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.003>.
- Gorlewicz, A., Krawczyk, K., Szczepankiewicz, A. A., Trzaskoma, P., Mülle, C., & Wilczynski, G. M. (2020). Colocalization Colormap -an ImageJ Plugin for the Quantification and Visualization of Colocalized Signals. *Neuroinformatics*, 18(4), 661–664. <https://doi.org/10.1007/s12021-020-09465-9>
- Grabowska, A., Sas-Nowosielska, H., Wojtas, B., Holm-Kaczmarek, D., Januszewicz, E., Yushkevich, Y., Czaban, I., Trzaskoma, P., Krawczyk, K., Gielniewski, B., Martin-Gonzalez, A., Filipkowski, R. K., Olszynski, K. H., Bernas, T., Szczepankiewicz, A. A., Sliwinska, M. A., Kanhema, T., Bramham, C. R., Bokota, G., Plewczynski, D., Wilczynski, G. M., Magalska, A. (2022).

- Activation-induced chromatin reorganization in neurons depends on HDAC1 activity. *Cell Rep.* 2022 Feb 15;38(7):110352. doi: 10.1016/j.celrep.2022.110352.
- Grummt, I., & Ladurner, A. G. (2008). A Metabolic Throttle Regulates the Epigenetic State of rDNA. *W Cell.* <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.04.026>
- Gugustea, R., Tamming, R. J., Martin-Kenny, N., Bérubé, N. G., & Leung, L. S. (2020). Inactivation of ATRX in forebrain excitatory neurons affects hippocampal synaptic plasticity. *Hippocampus*, 30(6), 565–581. <https://doi.org/10.1002/hipo.23174>
- Hashimoto, H., Vertino, P. M., & Cheng, X. (2010). Molecular coupling of DNA methylation and histone methylation. *Epigenomics*, 2(5), 657–669. <https://doi.org/10.2217/epi.10.44>
- Hergeth, S. P., Schneider, R. (2015). The H1 linker histones: multifunctional proteins beyond the nucleosomal core particle. *EMBO Rep.* 2015 Nov;16(11):1439-53. doi: 10.15252/embr.201540749. Epub 2015 Oct 15. PMID: 26474902; PMCID: PMC4641498.
- Herre, M., & Korb, E. (2019). The chromatin landscape of neuronal plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, 59, 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2019.04.006>
- Hetman, M., & Pietrzak, M. (2012). Emerging roles of the neuronal nucleolus. *Trends in Neurosciences*, 35(5), 305–314. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.01.002>
- Hetman, M., & Slomnicki, L. P. (2019). Ribosomal biogenesis as an emerging target of neurodevelopmental pathologies. *Journal of Neurochemistry*, 148(3), 325–347. <https://doi.org/10.1111/jnc.14576>
- Higgs, D. R., Garrick, D., Anguita, E., De Gobbi, M., Hughes, J., Muers, M., Vernimmen, D., Lower, K., Law, M., Argentaro, A., Deville, M. A., Gibbons, R. (2005). Understanding alpha-globin gene regulation: Aiming to improve the management of thalassemia. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1054:92-102. doi: 10.1196/annals.1345.012. PMID: 16339655.
- Horch, H. W., & Katz, L. C. (2002). BDNF release from single cells elicits local dendritic growth in nearby neurons. *Nature Neuroscience*, 5(11), 1177–1184. <https://doi.org/10.1038/nn927>
- Ishov, A. M., Sotnikov, A. G., Negorev, D., Vladimirova, O. V., Neff, N., Kamitani, T., Yeh, E. T. H., Strauss, J. F., & Maul, G. G. (1999). PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein Daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *Journal of Cell Biology*, 147(2), 221–233. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.2.221>
- James, A., Wang, Y., Raje, H., Rosby, R., & DiMario, P. (2014). Nucleolar stress with and without p53. *Nucleus*, 5(5), 402–426. <https://doi.org/10.4161/nucl.32235>
- Janiszewski, L., Barbacka-Surowiak, G., Surowiak, J. (1993). Neurofizjologia porównawcza. Warszawa: *Wydawnictwo Naukowe PWN*.
- Jaworski, J., Kalita, K., Knapska, E. (2018) c-Fos and neuronal plasticity: the aftermath of Kaczmarek's theory. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2018;78(4):287-296. PMID: 30624427.
- Jin, B., & Robertson, K. D. (2013). DNA methyltransferases, DNA damage repair, and cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 754, 3–29. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9967-2_1
- Kaczmarek, L. (1992). Expression of c-fos and other genes encoding transcription factors in long-term potentiation. *Behavioral and Neural Biology*, 57(3), 263–266. [https://doi.org/10.1016/0163-1047\(92\)90276-A](https://doi.org/10.1016/0163-1047(92)90276-A)

- Kaczmarek, L. & Chaudhuri, A. (1997). Sensory regulation of immediate-early gene expression in mammalian visual cortex: implications for functional mapping and neural plasticity. *Brain Res Brain Res Rev.* 1997 Apr;23(3):237-56. doi: 10.1016/s0165-0173(97)00005-2. PMID: 9164673.
- Kalita, K., Makonchuk, D., Gomes, C., Zheng, J. J., & Hetman, M. (2008). Inhibition of nucleolar transcription as a trigger for neuronal apoptosis. *Journal of Neurochemistry*, 105(6), 2286–2299. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05316.x>
- Kaufmann, W. E., & Moser, H. W. (2000). Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cerebral Cortex*, 10(10), 981–991. <https://doi.org/10.1093/cercor/10.10.981>
- Kernohan, K. D., Vernimmen, D., Gloor, G. B., & Bérubé, N. G. (2014). Analysis of neonatal brain lacking ATRX or MeCP2 reveals changes in nucleosome density, CTCF binding and chromatin looping. *Nucleic Acids Research*, 42(13), 8356–8368. <https://doi.org/10.1093/nar/gku564>
- Khatau, S. B., Hale, C. M., Stewart-Hutchinson, P. J., Patel, M. S., Stewart, C. L., Searson, P. C., Hodzic, D., & Wirtz, D. (2009). A perinuclear actin cap regulates nuclear shape. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(45), 19017–19022. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908686106>
- Kim, S., Yu, N. K., & Kaang, B. K. (2015). CTCF as a multifunctional protein in genome regulation and gene expression. *Experimental and Molecular Medicine*, 47(6). <https://doi.org/10.1038/EMM.2015.33>
- Kobayashi, T. (2008). A new role of the rDNA and nucleolus in the nucleus - RDNA instability maintains genome integrity. *BioEssays*, 30(3), 267–272. <https://doi.org/10.1002/bies.20723>
- Konturek, S. (1993). Fizjologia człowieka. Tom IV - Neurofizjologia. *Wydawnictwo Lekarskie PZWL*. Warszawa.
- Konorski, J. (1948). Conditioned reflexes and neuron organization. *Cambridge University Press*.
- Kornberg, R. (1974). Chromatin Structure : A Repeating Unit of Histones and DNA Chromatin structure is based on a repeating unit of eight. *Science*, 184, 868–871.
- Kossut, M. (2019). Basic mechanism of neuroplasticity. *Neuropsychiatria i Neuropsychologia*. 14(1), 1-8. <https://doi.org/10.5114/nan.2019.87727>
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*, 128(4), 693–705. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>
- Lafontaine, D. L. J., Riback, J. A., Bascetin, R., & Brangwynne, C. P. (2020). The nucleolus as a multiphase liquid condensate. *W Nature Reviews Molecular Cell Biology* (T. 22, Numer 3, ss. 165–182). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0272-6>
- Lewis, P. W., Elsaesser, S. J., Noh, K. M., Stadler, S. C., & Allis, C. D. (2010). Daxx is an H3.3-specific histone chaperone and cooperates with ATRX in replication-independent chromatin assembly at telomeres. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(32), 14075–14080. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008850107>
- Lindström, M. S., Jurada, D., Bursac, S., Orsolich, I., Bartek, J., & Volarevic, S. (2018). Nucleolus as an emerging hub in maintenance of genome stability and cancer pathogenesis. *Oncogene*, 37(18), 2351–2366. <https://doi.org/10.1038/s41388-017-0121-z>
- Liu, Y., Liang, S., & Tartakoff, A. M. (1996). Heat shock disassembles the nucleolus and inhibits nuclear protein import and poly(A)+ RNA export. *EMBO Journal*, 15(23), 6750–6757. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb01064.>

- Longstaff A. (2011) Krótkie wykłady. Neurobiologia. Warszawa: *Wydawnictwo Naukowe PWN*.
- Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., & Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648), 251–260. <https://doi.org/10.1038/38444>
- Maggi, L. B., Kuchenruether, M., Dadey, D. Y. A., Schwoppe, R. M., Grisendi, S., Townsend, R. R., Pandolfi, P. P., & Weber, J. D. (2008). Nucleophosmin Serves as a Rate-Limiting Nuclear Export Chaperone for the Mammalian Ribosome. *Molecular and Cellular Biology*, 28(23), 7050–7065. <https://doi.org/10.1128/mcb.01548-07>
- Majewski, L., Nowak, J., Sobczak, M., Karatsai, O., Havrylov, S., Lenartowski, R., Suszek, M., Lenartowska, M., & Redowicz, M. J. (2018). Myosin VI in the nucleus of neurosecretory PC12 cells: Stimulation-dependent nuclear translocation and interaction with nuclear proteins. *Nucleus*, 9(1), 125–141. <https://doi.org/10.1080/19491034.2017.1421881>
- Malgulwar, P. B., Danussi, C., Dharmiah, S., Johnson, W., Singh, A., Rai, K., Rao, A., Huse, J. T. (2024). Sirtuin 2 inhibition modulates chromatin landscapes genome-wide to induce senescence in ATRX-deficient malignant glioma. *Neuro Oncol.* Jan 5;26(1):55-67. doi: 10.1093/neuonc/noad155. PMID: 37625115; PMCID: PMC10769000.
- Marano, D., Fioriniello, S., Fiorillo, F., Gibbons, R. J., D'esposito, M., & Ragione, F. Della. (2019). ATRX contributes to MECP2-mediated pericentric heterochromatin organization during neural differentiation. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21), 1–28. <https://doi.org/10.3390/ijms20215371>
- Marquez-Lona, E. M., Tan, Z., & Schreiber, S. S. (2012). Nucleolar stress characterized by downregulation of nucleophosmin: A novel cause of neuronal degeneration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 417(1), 514–520. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.11.152>
- Matthews, D. A. (2001). Adenovirus Protein V Induces Redistribution of Nucleolin and B23 from Nucleolus to Cytoplasm. *Journal of Virology*, 75(2), 1031–1038. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.2.1031-1038.2001>
- Maze, I., Wenderski, W., Noh, K. M., Bagot, R. C., Tzavaras, N., Purushothaman, I., Elsässer, S. J., Guo, Y., Ionete, C., Hurd, Y. L., Tamminga, C. A., Halene, T., Farrelly, L., Soshnev, A. A., Wen, D., Rafii, S., Birtwistle, M. R., Akbarian, S., Buchholz, B. A., Allis, C. D. (2015). Critical Role of Histone Turnover in Neuronal Transcription and Plasticity. *Neuron*, 87(1), 77–94. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.06.014>
- McDowell, T. L., Gibbons, R. J., Sutherland, H., O'Rourke, D. M., Bickmore, W. A., Pombo, A., Turley, H., Gatter, K., Picketts, D. J., Buckle, V. J., Chapman, L., Rhodes, D., & Higgs, D. R. (1999). Localization of a putative transcriptional regulator (ATRX) at pericentromeric heterochromatin and the short arms of acrocentric chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(24), 13983–13988. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.13983>
- McStay, B., & Grummt, I. (2008). The epigenetics of rRNA genes: From molecular to chromosome biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 24, 131–157. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175259>
- Medrano-Fernández, A., & Barco, A. (2016). Nuclear organization and 3D chromatin architecture in cognition and neuropsychiatric disorders. *Molecular Brain*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13041-016-0263-x>

- Mélèse, T., & Xue, Z. (1995). The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome. *Current Opinion in Cell Biology*, 7(3), 319–324. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(95\)80085-9](https://doi.org/10.1016/0955-0674(95)80085-9)
- Michaluk, P., Wawrzyniak, M., A lot, P., Szczot, M., Wyrembek, P., Mercik, K., Medvedev, N., Wilczek, E., De Roo, M., Zuschratter, W., Muller, D., Wilczynski, G.M., Mozrzymas, J.W., Stewart, M.G., Kaczmarek, L., Włodarczyk, J. (2011). Influence of matrix metalloproteinase MMP-9 on dendritic spine morphology. *J Cell Sci*. 2011 Oct 1;124(Pt 19):3369-80. doi: 10.1242/jcs.090852. Epub 2011 Sep 6. PMID: 21896646.
- Mierzejewski, P., & Kostowski, W. (2002). Rola hipokampa w patogenezie uzależnień i działaniu pozytywnie wzmacniającym substancji psychoaktywnych. *Alkoholizm i Narkomania*, 15(2), 207-219.
- Mifsud, B., Tavares-Cadete, F., Young, A. N., Sugar, R., Schoenfelder, S., Ferreira, L., Wingett, S. W., Andrews, S., Grey, W., Ewels, P. A., Herman, B., Happe, S., Higgs, A., Leproust, E., Follows, G. A., Fraser, P., Luscombe, N. M., & Osborne, C. S. (2015). Mapping long-range promoter contacts in human cells with high-resolution capture Hi-C. *Nature Genetics*, 47(6), 598–606. <https://doi.org/10.1038/ng.3286>
- Miller, O. L., & Beatty, B. R. (1969). Visualization of nucleolar genes. *Science*, 164(3882), 955–957. <https://doi.org/10.1126/science.164.3882.955>
- Misteli, T. (2020) The Self-Organizing Genome: Principles of Genome Architecture and Function. *Cell*. 2020 Oct 1;183(1):28-45. doi: 10.1016/j.cell.2020.09.014. Epub 2020 Sep 24. PMID: 32976797; PMCID: PMC7541718.
- Monneron, A., Bernhard, W. (1969). Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. *J Ultrastruct Res*. May;27(3):266-88. doi: 10.1016/s0022-5320(69)80017-1. PMID: 5813971.
- Montgomery, T. H. (1898). Comparative cytological studies, with especial regard to the morphology of the nucleolus. *Journal of Morphology*.
- Morgan, A., Gandin, I., Belcaro, C., Palumbo, P., Palumbo, O., Biamino, E., Dal Col, V., Laurini, E., Pricl, S., Bosco, P., Carella, M., Ferrero, G. B., Romano, C., d’Adamo, A. P., Faletta, F., & Vozzi, D. (2015). Target sequencing approach intended to discover new mutations in non-syndromic intellectual disability. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 781, 32–36. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2015.09.002>
- Nazer, E. (2022). To be or not be (in the LAD): emerging roles of lamin proteins in transcriptional regulation. *Biochemical Society Transactions*, 50(2), 1035–1044. <https://doi.org/10.1042/BST20210858>
- Noh, K. M., Maze, I., Zhao, D., Xiang, B., Wenderski, W., Lewis, P. W., Shen, L., Li, H., & Allis, C. D. (2015). ATRX tolerates activity-dependent histone H3 methyl/phos switching to maintain repetitive element silencing in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(22), 6820–6827. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411258112>
- Núñez Villacís, L., Wong, M. S., Ferguson, L. L., Hein, N., George, A. J., & Hannan, K. M. (2018). New Roles for the Nucleolus in Health and Disease. *BioEssays*, 40(5), 8–10. <https://doi.org/10.1002/bies.201700233>
- Olausson, K. H., Nistér, M., & Lindström, M. S. (2012). P53 -Dependent and -Independent Nucleolar Stress Responses. *Cells*, 1(4), 774–798. <https://doi.org/10.3390/cells1040774>
- Otmakhov, N., Khibnik, L., Otmakhova, N., Carpenter, S., Riahi, S., Asrican, B., & Lisman, J. (2004).

- Forskolin-Induced LTP in the CA1 Hippocampal Region Is NMDA Receptor Dependent. *Journal of Neurophysiology*, 91(5), 1955–1962. <https://doi.org/10.1152/jn.00941.2003>
- Pang, Y., Chen, X., Ji, T., Cheng, M., Wang, R., Zhang, C., Liu, M., Zhang, J., & Zhong, C. (2023). The Chromatin Remodeler ATRX: Role and Mechanism in Biology and Cancer. *Cancers*, 15(8). <https://doi.org/10.3390/cancers15082228>
- Percy, A. K., Neul, J. L., Benke, T. A., Marsh, E. D., & Glaze, D. G. (2023). A review of the Rett Syndrome Behaviour Questionnaire and its utilization in the assessment of symptoms associated with Rett syndrome. *Frontiers in Pediatrics*, 11(July), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fped.2023.1229553>
- Perry, R. P. (1967). The Nucleolus and the Synthesis of Ribosomes. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 6(C), 219–257. [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(08\)60528-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(08)60528-0)
- Picketts, D. J., Higgs, D. R., Bachoo, S., Blake, D. J., Quarrell, O. W. J., & Gibbons, R. J. (1996). ATRX encodes a novel member of the SNF2 family of proteins: Mutations point to a common mechanism underlying the ATR-X syndrome. *Human Molecular Genetics*, 5(12), 1899–1907. <https://doi.org/10.1093/hmg/5.12.1899>
- Picketts, D. J., Tastan, A. O., Higgs, D. R., & Gibbons, R. J. (1998). Comparison of the human and murine ATRX gene identifies highly conserved, functionally important domains. *Mammalian Genome*, 9(5), 400–403. <https://doi.org/10.1007/s003359900781>
- Placek, B. J., & Gloss, L. M. (2002). The N-terminal tails of the H2A-H2B histones affect dimer structure and stability. *Biochemistry*, 41(50), 14960–14968. <https://doi.org/10.1021/bi026283k>
- Ratnakumar, K., & Bernstein, E. (2013). ATRX: The case of a peculiar chromatin remodeler. *Epigenetics*, 8(1), 3–9. <https://doi.org/10.4161/epi.23271>
- Renner, J. & Rasia-Filho, A. A. (2023). Morphological Features of Human Dendritic Spines. *Adv Neurobiol.* 2023;34:367-496. doi: 10.1007/978-3-031-36159-3_9. PMID: 37962801.
- Reymann, K. G., & Frey, J. U. (2007). The late maintenance of hippocampal LTP: Requirements, phases, „synaptic tagging”, „late-associativity” and implications. *Neuropharmacology*, 52(1), 24–40. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.07.026>
- Richter, J. D., & Klann, E. (2009). Making synaptic plasticity and memory last: Mechanisms of translational regulation. *Genes and Development*, 23(1), 1–11. <https://doi.org/10.1101/gad.1735809>
- Rodrigues, S. M., Schafe, G. E., & Ledoux, J. E. (2004). Molecular mechanisms underlying emotional learning and memory in the lateral amygdala. *Neuron*, 44(1), 75–91. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.09.014>
- Rorbach-Dolata, A., Kubis, A., & Piwowar, A. (2017). Epigenetic modifications: An important mechanism in diabetic disturbances. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 71(0), 0–0. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.6156>
- Roszkowska, M., Skupien, A., Wójtowicz, T., Konopka, A., Gorlewicz, A., Kisiel, M., Bekisz, M., Ruszczycki, B., Dolezyczek, H., Rejmak, E., Knapska, E., Mozrzymas, J. W., Włodarczyk, J., Wilczynski, G. M., & Dzwonek, J. (2016). CD44: A novel synaptic cell adhesion molecule regulating structural and functional plasticity of dendritic spines. *Molecular Biology of the Cell*, 27(25), 4055–4066. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-06-0423>
- Rubbi, C. P., & Milner, J. (2003). Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response

- to DNA damage and other stresses. *The EMBO Journal*, 22(22), 6068–6077.
- Ryan, D. P., & Owen-hughes, T. (2014). *Europe PMC Funders Group Snf2-family proteins : chromatin remodellers for any occasion*. 15(5), 649–656. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.07.022>.Snf2-family
- Sacharowski, S. P. & Sarnowski, T. J. (2019). Mechanizmy kontrolujące strukturę chromatyny. *Postepy Biochem.* Mar 22;65(1):9-20. doi: 10.18388/pb.2019_252.
- Seah, C., Levy, M. A., Jiang, Y., Mokhtarzada, S., Higgs, D. R., Gibbons, R. J., & Bérubé, N. G. (2008). Neuronal death resulting from targeted disruption of the Snf2 protein ATRX is mediated by p53. *Journal of Neuroscience*, 28(47), 12570–12580. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4048-08.2008>
- Selakovic, D., Joksimovic, J., Jovicic, N., Mitrovic, S., Mihailovic, V., Katanic, J., Milovanovic, D., Pantovic, S., Mijailovic, N., & Rosic, G. (2019). The impact of hippocampal sex hormones receptors in modulation of depressive-like behavior following chronic anabolic androgenic steroids and exercise protocols in rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 13(February), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00019>
- Sharifi, S. & Bierhoff H. (2018). Regulation of RNA Polymerase I Transcription in Development, Disease, and Aging. *Annu Rev Biochem.* 2018 Jun 20;87:51-73. doi: 10.1146/annurev-biochem-062917-012612. Epub 2018 Mar 28. PMID: 29589958.
- Shioda, N., Yabuki, Y., Yamaguchi, K., Onozato, M., Li, Y., Kurosawa, K., Tanabe, H., Okamoto, N., Era, T., Sugiyama, H., Wada, T., Fukunaga K. (2018). Targeting G-quadruplex DNA as cognitive function therapy for ATR-X syndrome. *Nat Med.* 2018 Jun;24(6):802-813. doi: 10.1038/s41591-018-0018-6.
- Sirri, V., Urcuqui-Inchima, S., Roussel, P., Hernandez-Verdun, D. Nucleolus: the fascinating nuclear body. (2208). *Histochem Cell Biol.* 2008 Jan;129(1):13-31. doi: 10.1007/s00418-007-0359-6. Epub 2007 Nov 29. PMID: 18046571; PMCID: PMC2137947.
- Skupien, A., Konopka, A., Trzaskoma, P., Labus, J., Gorlewicz, A., Swiech, L., Babraj, M., Dolezyczek, H., Figiel, I., Ponimaskin, E., Wlodarczyk, J., Jaworski, J., Wilczynski, G. M., Dzwonek, J. (2014). CD44 regulates dendrite morphogenesis through Src tyrosine kinase-dependent positioning of the Golgi. *J Cell Sci.* 2014 Dec 1;127(Pt 23):5038-51. doi: 10.1242/jcs.154542. Epub 2014 Oct 9. PMID: 25300795.
- Skupien-Jaroszek, A., Walczak, A., Czaban, I., Pels, K. K., Szczepankiewicz, A. A., Krawczyk, K., Ruszczycki, B., Wilczynski, G. M., Dzwonek, J., Magalska, A. (2021). The interplay of seizures-induced axonal sprouting and transcription-dependent Bdnf repositioning in the model of temporal lobe epilepsy. *PLoS One.* 2021 Jun 4;16(6):e0239111. doi: 10.1371/journal.pone.0239111. PMID: 34086671; PMCID: PMC8177504.
- Spector, D. L. Nuclear domains. (2001) *J Cell Sci.* Aug;114(Pt 16):2891-3. doi:10.1242/jcs.114.16.2891.
- Stoppini, L., Buchs, P. A., & Muller, D. (1991). A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *Journal of Neuroscience Methods*, 37(2), 173–182. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(91\)90128-M](https://doi.org/10.1016/0165-0270(91)90128-M)
- Talbert, P. B., & Henikoff, S. (2010). Histone variants ancient wrap artists of the epigenome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(4), 264–275. <https://doi.org/10.1038/nrm2861>
- Tao-Cheng, J. H.(2019) Stimulation induces gradual increases in the thickness and curvature of

- postsynaptic density of hippocampal CA1 neurons in slice cultures. *Mol Brain*. 12, 44. <https://doi.org/10.1186/s13041-019-0468-x>
- Thielmann, H. W., Popanda, O., & Staab, H. J. (1999). Subnuclear distribution of DNA topoisomerase I and Bax protein in normal and xeroderma pigmentosum fibroblasts after irradiation with UV light and γ rays or treatment with topotecan. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 125(3–4), 193–208. <https://doi.org/10.1007/s004320050263>
- Trovato, M., Patil, V., Gehre, M., & Noh, K. M. (2020). Histone Variant H3.3 Mutations in Defining the Chromatin Function in Mammals. *Cells*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/cells9122716>
- Truch, J., Downes, D. J., Scott, C., Gür, E. R., Telenius, J. M., Repapi, E., Schwessinger, R., Gosden, M., Brown, J. M., Taylor, S., Cheong, P. L., Hughes, J. R., Higgs, D. R., & Gibbons, R. J. (2022). The chromatin remodeller ATRX facilitates diverse nuclear processes, in a stochastic manner, in both heterochromatin and euchromatin. *Nature Communications*, 13(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31194-7>
- Tsekrekou, M., Stratigi, K., & Chatzinikolaou, G. (2017). The nucleolus: In genome maintenance and repair. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7). <https://doi.org/10.3390/ijms18071411>
- Udugama, M., Sanij, E., Voon, H. P. J., Son, J., Hii, L., Henson, J. D., Chan, F. L., Chang, F. T. M., Liu, Y., Pearson, R. B., Kalitsis, P., Mann, J. R., Collas, P., Hannan, R. D., Wong, L. H. (2018). Ribosomal DNA copy loss and repeat instability in ATRX-mutated cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 May 1;115(18):4737-4742. doi: 10.1073/pnas.1720391115. Epub 2018 Apr 18. PMID: 29669917; PMCID: PMC5939086.
- Urbanska, M., Blazejczyk, M., Jaworski, J. (2008). Molecular basis of dendritic arborization. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2008;68(2):264-88. doi: 10.55782/ane-2008-1695. PMID: 18511961.
- Urbanska, M., Swiech, L., Jaworski, J. (2012). Developmental plasticity of the dendritic compartment: focus on the cytoskeleton. *Adv Exp Med Biol*. 2012;970:265-84. doi: 10.1007/978-3-7091-0932-8_12. PMID: 22351060.
- Vargas, J. P., Rodríguez, F., López, J. C., Arias, J. L., & Salas, C. (2000). Spatial learning-induced increase in the argyrophilic nucleolar organizer region of dorsolateral telencephalic neurons in goldfish. *Brain Research*, 865(1), 77–84. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02220-4](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02220-4)
- Villard, L., Lossi, A. M., Cardoso, C., Proud, V., Chiaroni, P., Colleaux, L., Schwartz, C., & Fontés, M. (1997). Determination of the genomic structure of the XNP/ATRX gene encoding a potential zinc finger helicase. *Genomics*, 43(2), 149–155. <https://doi.org/10.1006/geno.1997.4793>
- Vincent, J. A., Kwong, T. J., & Tsukiyama, T. (2008). ATP-dependent chromatin remodeling shapes the DNA replication landscape. *Nature Structural and Molecular Biology*, 15(5), 477–484. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1419>
- Wada, T., Ban, H., Matsufuji, M., Okamoto, N., Enomoto, K., Kurosawa, K., Aida, N. (2013). Neuroradiologic features in X-linked α -thalassemia/mental retardation syndrome. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2013 Oct;34(10):2034-8. doi: 10.3174/ajnr.A3560.
- Walczak, A., Szczepankiewicz, A. A., Ruszczycki, B., Magalska, A., Zamlynska, K., Dzwonek, J., Wilczek, E., Zybura-Broda, K., Rylski, M., Malinowska, M., Dabrowski, M., Szczepinska, T., Pawlowski, K., Pyskaty, M., Włodarczyk, J., Szczerbal, I., Switonski, M., Cremer, M., & Wilczynski, G. M. (2013). Novel higher-order epigenetic regulation of the Bdnf gene upon seizures. *Journal of Neuroscience*, 33(6), 2507–2511. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1085-12.2013>

- Warmerdam, D. O., & Wolthuis, R. M. F. (2019). Keeping ribosomal DNA intact: a repeating challenge. *Chromosome Research*, 27(1–2), 57–72. <https://doi.org/10.1007/s10577-018-9594-z>
- Wenderski, W. & Maze, I. (2016). Histone turnover and chromatin accessibility: Critical mediators of neurological development, plasticity, and disease. *Bioessays*. 2016 May;38(5):410-9. doi: 10.1002/bies.201500171. Epub 2016 Mar 15. PMID: 26990528; PMCID: PMC4968875.
- Wilczynski, G. M. (2014). Significance of higher-order chromatin architecture for neuronal function and dysfunction. *Neuropharmacology*, 80, 28–33. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2014.01.016>
- Wong, L. H., McGhie, J. D., Sim, M., Anderson, M. A., Ahn, S., Hannan, R. D., George, A. J., Morgan, K. A., Mann, J. R., & Choo, K. H. A. (2010). ATRX interacts with H3.3 in maintaining telomere structural integrity in pluripotent embryonic stem cells. *Genome Research*, 20(3), 351–360. <https://doi.org/10.1101/gr.101477.109>
- Wu, H., & Zhang, Y. (2014). Reversing DNA methylation: Mechanisms, genomics, and biological functions. *Cell*, 156(1–2), 45–68. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.019>
- Xue, Y., Gibbons, R., Yan, Z., Yang, D., McDowell, T. L., Sechi, S., Qin, J., Zhou, S., Higgs, D., & Wang, W. (2003). The ATRX syndrome protein forms a chromatin-remodeling complex with Daxx and localizes in promyelocytic leukemia nuclear bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(19), 10635–10640. <https://doi.org/10.1073/pnas.1937626100>
- Yamada, S. & Nelson, W. J. (2007). Synapses: sites of cell recognition, adhesion, and functional specification. *Annu Rev Biochem*. 2007;76:267-94. doi: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142811. PMID: 17506641; PMCID: PMC3368613.
- Yang, K., Wang, M., Zhao, Y., Sun, X., Yang, Y., Li, X., Zhou, A., Chu, H., Zhou, H., Xu, J., Wu, M., Yang, J., & Yi, J. (2016). A redox mechanism underlying nucleolar stress sensing by nucleophosmin. *Nature Communications*, 7, 1–16. <https://doi.org/10.1038/ncomms13599>
- Yang, X., Khosravi-Far, R., Chang, H. Y., Baltimore, D. (1997). Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell*. Jun 27;89(7):1067-76. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80294-9. PMID: 9215629; PMCID: PMC2989411.
- Yap, E. L., & Greenberg, M. E. (2018). Activity-regulated transcription: Bridging the gap between neural activity and behavior. *Neuron*, 100(2), 330. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2018.10.013>
- Yasuzumi, G., Sawada, T., Sugihara, R., Kiriya, M., & Sugioka, M. (1958). Electron microscope researches on the ultrastructure of nucleoli in animal tissues. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 48(1), 10–23. <https://doi.org/10.1007/BF00496710>
- Yogev, O., Saadon, K., Anzi, S., Inoue, K., & Shaulian, E. (2008). DNA damage-dependent translocation of B23 and p19ARF is regulated by the Jun N-terminal kinase pathway. *Cancer Research*, 68(5), 1398–1406. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2865>
- Yung, B. Y. M., Busch, H., & Chan, P. K. (1985). Translocation of nucleolar phosphoprotein B23 (37kDa pI 5.1) induced by selective inhibitors of ribosome synthesis. *BBA - Gene Structure and Expression*, 826(4), 167–173. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(85\)90002-8](https://doi.org/10.1016/0167-4781(85)90002-8)