

Natalia Chwin

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

Praca doktorska wykonana

w Pracowni Modeli Zwierzęcych

Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego

Polskiej Akademii Nauk

PROMOTOR:

dr hab. Witold Konopka

PROMOTOR POMOCNICZY:

dr Anna Kiryk-Jaśkiewicz

Warszawa, 2024

Podziękowania:

Pragnę wyrazić najgłębszą wdzięczność mojemu promotorowi, dr hab. Witoldowi Konopce, za merytoryczne wsparcie, nieocenione wskazówki oraz nieustanną motywację w trakcie realizacji tej pracy. Dziękuję również za zaufanie i możliwość samodzielnej pracy. Ta swoboda pozwoliła mi rozwinąć skrzydła i w pełni wykorzystać umiejętności, jednocześnie ucząc się odpowiedzialności za podejmowane decyzje. Dzięki Twojej otwartości mogłam być 'Zosią Samosią', którą z natury jestem, ale jednocześnie wiedziałam, że zawsze mogę liczyć na Twoją pomoc i wsparcie.

Dziękuję również mojej promotorce pomocniczej, dr Ani Kiryk, za cierpliwość, profesjonalizm i cenne rady, które pozwoliły mi rozwijać się naukowo na każdym etapie tego doktoratu. To właśnie dzięki Tobie nauczyłam się podstaw analiz behawioralnych, które stały się fundamentem mojej pracy badawczej. Dziękuję także za Twoje zaufanie i odwagę w powierzeniu mi swoich eksperymentów, co dało mi szansę zdobycia cennego doświadczenia i rozwoju. Twoja wiara we mnie i wsparcie miały ogromne znaczenie.

Szczególne podziękowania kieruję do Pani Profesor dr hab. Urszuli Wojdy, której ogromne zaangażowanie, życzliwość i wsparcie były kluczowe w dopięciu tej pracy do końca. Pani Profesor, bez Pani pomocy i wiary we mnie ta rozprawa nie mogłaby powstać w takiej formie.

Z całego serca dziękuję również dr hab. Adamowi Hamedowi, którego przyjaźń, otwartość i gotowość do pomocy w każdej sprawie były dla mnie niezwykle ważne w trakcie całego tego procesu. Twoje wsparcie i niezachwiany optymizm odegrały kluczową rolę w moim rozwoju naukowym i realizacji tego projektu.

Serdecznie dziękuję wszystkim członkom Pracowni Modeli Zwierzęcych za stworzenie rodzinnej atmosfery, za ciepłe przyjęcie mnie do swojego grona oraz za doping, który nieustannie przypominał mi, że ten doktorat można i trzeba ukończyć.

Szczególne wyrazy wdzięczności kieruję do Joanny Przybyś, która razem ze mną przechodziła przez podobny etap naukowy. Asiu, dziękuję za Twoje wsparcie podczas przygotowań do egzaminów, motywację do pisania oraz wzajemne pokrzepienie w chwilach wątplenia. Twoja obecność była nieoceniona.

Nie mogłabym zapomnieć o moim chłopaku Adrianie, który przez wiele miesięcy niestrudzenie znosił moją mentalną nieobecność, wspierał mnie we wszystkich potrzebach i cierpliwie znosił moje humory. Adrianie, dziękuję Ci za Twoją miłość, wyrozumiałość i nieustanną opiekę – Twoje wsparcie było dla mnie nieocenionym filarem w trakcie tego wymagającego czasu.

Na końcu, ale z najgłębszym uczuciem, dedykuję tę pracę moim rodzicom, a szczególnie mojemu Tacie, którego niestety nie ma już z nami. Tato, zawsze pozwalałeś mi na realizację własnych marzeń i wspierałeś mnie w drodze ku samorealizacji. Twoje oczekiwanie na ten moment było dla mnie największą motywacją. Choć nie doczekałeś obrony, wiem, że byłbyś dumny. Dziękuję za wszystko, co mi dałeś.

Źródła finansowania pracy:

Foundation for Polish Science (FNP) – Team Tech Core Facility Plus

ANIMOD - Integrated platform for generation and analysis of animal models for biomedical applications

Główny badacz - Witold Konopka

SPIS TREŚCI

SPIS TREŚCI	4
Spis tabel 6	
Spis rycin 7	
WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW.....	9
STRESZCZENIE.....	13
ABSTRACT	15
1. WSTĘP.....	17
1.1. Rola hipokampa w kodowaniu pamięci	17
1.1.1. Anatomia hipokampa (DG, CA3, CA1, CA2)	19
1.1.2. Podział grzbietowo-brzuszy hipokampa – zróżnicowane funkcje	20
1.1.3. Obwody neuronalne hipokampa i struktury towarzyszące	21
1.1.4. Połączenia pobudzające w obwodzie hipokampalno-korowym.....	22
1.1.5. Połączenia hamujące w obwodzie hipokampalno-korowym	23
1.2. Rodzaje pamięci zależnej od aktywności hipokampa.....	24
1.2.1. Pamięć epizodyczna.....	24
1.2.2. Pamięć przestrzenna i tworzenie map kognitywnych.....	25
1.2.3. Pamięć socjalna (rozpoznawanie osobników i interakcje społeczne)	31
1.3. Znaczenie i ogólna charakterystyka <i>PTEN</i>	33
1.3.1. Budowa i lokalizacja <i>PTEN</i>	34
1.3.2. Wewnątrzkomórkowa kaskada sygnałowa <i>Pten/PI3K-AKT-mTOR</i>	37
1.3.3. Rola <i>PTEN</i> w rozwoju i funkcjonowaniu mózgu.....	40
1.4. Metody inżynierii genetycznej w badaniach funkcji genów.....	44
1.4.1. Modele zwierzęce w badaniach neurobiologicznych	44
1.4.2. System Cre-loxP	45
1.4.3. Rekombinowane wektory wirusowe AAV	46
2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY	47
3. MATERIAŁY I METODY	49
3.1. Warunki utrzymywania zwierząt w eksperymencie	49
3.2. Linie myszy transgenicznych wykorzystywane w doświadczeniach	49
3.3. Izolacja materiału genetycznego i genotypowanie zwierząt	50
3.4. Przygotowanie rekombinowanych wektorów wirusowych AAV	52
3.4.1. System wykorzystany do produkcji wektorów rAAV	52

3.4.2.	Izolacja plazmidowego DNA metodą lizy alkalicznej	55
3.4.3.	Hodowla komórkowa <i>in vitro</i>	55
3.4.4.	Transfekcja komórek linii AAV-293.....	56
3.4.5.	Izolacja i oczyszczanie rekombinowanych wektorów AAV	56
3.4.6.	Oznaczenie miana wektorów AAV za pomocą ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym	58
3.5.	Metody indukcji mutacji badanego genu.....	59
3.5.1.	Indukcja mutacji za pomocą środka farmakologicznego Tamoksyfen.....	59
3.5.2.	Indukcja mutacji za pomocą wektorów wirusowych AAV	59
3.6.	Fenotypowanie behawioralne zwierząt.....	61
3.6.1.	Testy funkcji poznawczych – uczenie się i pamięć w IntelliCage	62
3.6.2.	Badanie zachowań eksploracyjnych – test otwartego pola.....	64
3.6.3.	Badanie zachowań emocjonalnych związanych z odczuciem lęku – test wzniesionego labiryntu krzyżowego	65
3.6.4.	Test budowania gniazda.....	66
3.6.5.	Test socjalny i nowości społecznej (pamięć społeczna).....	67
3.6.6.	Wokalizacji ultradźwiękowa (USV) indukowana interakcją socjalną	70
3.7.	Pomiar aktywności elektrofizjologicznej neuronów hipokampa	74
3.8.	Barwienie immunohistochemiczne skrawków mózgu	76
3.8.1.	Znakowanie immunohistochemiczne z użyciem DAB.....	76
3.9.	Analiza poziomu białek metodą Western Blot.....	77
3.10.	Analiza statystyczna danych	79
4.	WYNIKI.....	81
4.1.	Uzyskanie modeli utraty aktywności genu <i>PTEN</i> w neuronach pobudzających u dorosłej myszy	81
4.2.	Ocena zdolności poznawczych mutantów z usuniętym genem <i>PTEN</i>	84
4.2.1.	Wpływ usunięcia genu <i>Pten</i> na uczenie się i pamięć u samic <i>Pten-iCKO</i>	85
4.2.2.	Oszacowanie wpływu mutacji <i>Pten</i> na przeżywalność zwierząt	88
4.2.3.	Analiza immunohistochemiczna rekombinazy Cre i ufosforylowanego rybosomalnego S6	90
4.2.4.	Wpływ usunięcia genu <i>Pten</i> na uczenie się i pamięć myszy <i>Pten-AAV-KO</i>	92
4.3.	Analiza ogólnej aktywności i poziomu lęku u myszy <i>Pten-AAV-KO</i>	97
4.3.1.	Test otwartego pola (OF)	97
4.3.2.	Test podwyższonego labiryntu krzyżowego (EPM).....	99

4.4.	Wpływ mutacji <i>pten</i> u myszy <i>pten-aav-ko</i> na pamięć rozpoznawczą, interakcje socjalne i zachowania powiązane z asd	102
4.4.1.	Test budowania gniazda u myszy <i>Pten-AAV-KO</i>	102
4.4.2.	Analiza zachowań socjalnych i pamięci socjalnej.....	104
4.4.3.	Analiza bezpośrednich interakcji społecznych i parametrów wokalizacji myszy <i>Pten-AAV-KO</i>	106
4.5.	Analiza aktywności elektrofizjologicznej neuronów hipokampa w podregionie CA1.....	115
4.5.1.	Pobudliwość neuronów	115
4.5.2.	Miniaturowe EPSC (mEPSC)	120
4.6.	Analiza poziomu białka <i>pten</i> z homogenizatami hipokampa	123
5.	DYSKUSJA	124
5.1.	Znaczenie genu <i>Pten</i> w uczeniu się i pamięci zależnej od hipokampa	124
5.2.	Wpływ delecji genu <i>Pten</i> na ogólną aktywność i komunikację oraz interakcje socjalne zwierząt	129
5.2.1.	Heterogeniczny i zależny od płci fenotyp mutantów <i>Pten</i>	129
5.2.2.	Komunikacja, interakcje socjalne oraz zachowania eksploracyjne.....	133
6.	PODSUMOWANIE I WNIOSKI.....	140
7.	BIBLIOGRAFIA	142
8.	INFORMACJE DODATKOWE	151

SPIS TABEL

Tabela 1. Rodzaje neuronów zaangażowanych w pamięć przestrzenną oraz tworzenie mapy kognitywnej.....	27
Tabela 2. Parametry użytych par primerów do amplifikacji sekwencji genu <i>Cre</i> oraz genu <i>Pten</i> z okalającymi ekson 5 sekwencjami <i>loxP</i>	51
Tabela 3. Warunki reakcji i składniki mieszaniny reakcyjnej PCR	51
Tabela 4. Plazmidy wykorzystywane do produkcji wektorów wirusowych AAV.....	53
Tabela 5. Skład roztworów przeznaczonych do izolacji AAV z kolumny heparynowej.....	57
Tabela 6. Warunki reakcji qPCR oraz skład mieszaniny reakcyjnej	58
Tabela 7. Koordynaty iniekcji stereotaktycznych do hipokampa i zakrętu zębatego..	60

SPIS RYCIN

Rycina 1. Strukturalny podział hipokampa i zakrętu zębatego	20
Rycina 2. Schemat przedstawiający obwody neuronalne pobudzające i hamujące, biegnące pomiędzy hipokampem a korą śródwęczową	22
Rycina 3. Budowa poszczególnych elementów automatycznej klatki IntelliCage	31
Rycina 4. Schemat struktury kanonicznego genu <i>PTEN</i> (górny panel) oraz struktury białka (dolny panel).....	35
Rycina 5. Izoformy białka PTEN	36
Rycina 6. Lokalizacja i rola PTEN w neuronach	37
Rycina 7. Szlak sygnałowy PI3K-AKT-mTOR	38
Rycina 8. Mapy plazmidów wykorzystanych do produkcji rekombinowanych wektorów wirusowych AAV	54
Rycina 9. Wybrane koordynaty na podstawie atlasu mózgu (Allen Brain Atlas).....	61
Rycina 10. Schemat aparatu testu otwartego pola	65
Rycina 11. Schemat aparatu testu wzniesionego labiryntu krzyżowego	66
Rycina 12. Test budowania gniazda	67
Rycina 13. Schemat aparatu do testu trójkomorowego.....	69
Rycina 14. Schemat aparatu użytego podczas testu SIT połączonego z nagrywaniem USV	71
Rycina 15. Struktura wokalizacji ultradźwiękowych u myszy	73
Rycina 16. Przykładowy fragment spektrogramu z zaznaczonymi epizodami USV ..	74
Rycina 17. Schemat eksperymentu przeprowadzony na transgenicznej linii Pten-iCKO.....	81
Rycina 18. Schemat eksperymentu przeprowadzony na transgenicznej linii Pten-flox/flox	82
Rycina 19. Schemat doświadczeń behawioralnych, przedstawionych na osi czasu....	84
Rycina 20. Dynamika uczenia się i rozwoju pamięci zależnej od hipokampa w teście preferencji miejsca (PL) w IntelliCage.....	86
Rycina 21. Dwudziestodniowy test preferencji nowego miejsca (revPL) w IntelliCage	87
Rycina 22. Długość życia samic Pten-iCKO i Pten-AAV-KO w porównaniu do grup kontrolnych	89
Rycina 23. Mikroskopowy obraz niewybarwionych skrawków mózgow Pten-AAV-CTRL (po lewej) i Pten-AAV-KO (po prawej) z widocznym ubytkiem hipokampa w 24 tygodniu od indukcji mutacji.....	89
Rycina 24. Barwienie immunohistochemiczne w hipokampie wykonane w 5, 7, 9, 17 i 19 tygodniu od indukcji mutacji u Pten-AAV-KO w celu wizualizacji ekspresji rekombinazy Cre oraz FRS6	91

Rycina 25. Porównanie motywacji zwierząt w fazie adaptacji do picia w zwykłej wody (SA) oraz do 10-procentowego roztworu sacharozy (NPA)	93
Rycina 26. Dynamika uczenia się myszy Pten-AAV-KO w teście preferencji miejsca (PL) i preferencji nowego miejsca (revPL) w automatycznej klatce IntelliCage.....	94
Rycina 27. Dynamika uczenia się i przeuczania się myszy Pten-AAV-KO w złożonym teście patrolowania.....	96
Rycina 28. Analiza aktywności lokomotorycznej samców i samic Pten-AAV-KO i kontroli mierzonej w teście otwartego pola (OF).....	99
Rycina 29. Analiza poziomu lęku u mutantów Pten-AAV-KO w teście podwyższonego labiryntu krzyżowego (EPM).....	101
Rycina 30. Test budowania gniazda przeprowadzony dla samic Pten-AAV-KO w 7 I 15 tygodniu od indukcji mutacji	103
Rycina 31. Analiza socjalności w aparacie trójkomorowym u myszy Pten-AAV-KO	105
Rycina 32. Analiza nowości społecznej w aparacie trójkomorowym u myszy Pten-AAV-KO.....	106
Rycina 33 Zachowania eksploracyjne i interakcje socjalne zaobserwowane w grupie kontrolnej i Pten-AAV-KO w poszczególnych punktach czasowych, bez uwzględnienia stratyfikacji na i grupę wokalizującą i niewokalizującą.	108
Rycina 34. Liczba interakcji socjalnych (A) i stójek (B) zaobserwowana w grupie kontrolnej i Pten-AAV-KO ze stratyfikacją na myszy wokalizujące i niewokalizujące.....	110
Rycina 35. Wokalizacje ultradźwiękowe myszy Pten-AAV-KO mierzone w 3 punktach czasowych od indukcji mutacji	112
Rycina 36. Parametry USV myszy Pten-AAV-KO mierzone w 3 punktach czasowych od indukcji mutacji.....	115
Rycina 37. Spoczynkowy potencjał błonowy nagrany w 4 typach komórek.....	117
Rycina 38. Pobudliwość neuronów postsynaptycznych CA1 wyrażona w ilości powstałych potencjałów czynnościowych przy stymulacji prądem w zakresie 50-600 pA.....	118
Rycina 39. Parametry elektrofizjologiczne komórek zebrane podczas analizy pobudliwości komórek w CA1.....	120
Rycina 40. Miniaturowe EPSC.....	122
Rycina 41. Ocena ilościowa białka Pten w porównaniu do białka kontrolnego wszechobecnie występującego w komórkach białka Tubuliny alfa techniką Western Blot.....	123

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

Skrót lub termin	Definicja
4EBP	(ang. Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E-Binding Protein) – białko wiążące czynnik inicjacji translacji 4E
AAV	(ang. Adeno-associated virus) – wektory wirusowe towarzyszące adenowirusom
ACSF	(ang. Artificial cerebrospinal fluid) – sztuczny płyn mózgowo-rdzeniowy
AD	(ang. Alzheimer's disease) – choroba Alzheimera
AIM2	(ang. Absent in melanoma 2) – gen kodujący białko nieobecne w czerniaku sklasyfikowanym jako typ II
AKT	(ang. Protein kinase B) – kinaza białkowa B
AMPA	(ang. α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) – kwas α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy
AMPA	(ang. AMPA receptor) – receptor AMPA
ANOVA	(ang. Analysis of variance) – analiza wariancji
APA	(ang. Active Place Avoidance) – aktywne unikanie miejsca
ArcN	(ang. Arcuate nucleus) – jądro łukowate
ASD	(ang. Autism Spectrum Disorder) – zaburzenia ze spektrum autyzmu
ATP	(ang. Adenosine triphosphate) – adenzynotrójfosforan
ATPase	(ang. Adenosine triphosphatase) – ATPaza
AUG	(ang. Start codon AUG) – kodon startowy AUG
AUU	(ang. Start codon AUU) – kodon startowy AUU
AVP	(ang. Arginine vasopressin) – argininowa wazopresyna
AVPR	(ang. Arginine vasopressin receptor) – receptor wazopresyny
BCA	(ang. Bicinchoninic acid) – kwas bicyncholiny
BL	(ang. Baseline) – wartość początkowa
BLA	(ang. Basolateral Amygdala) – podstawno-boczny kompleks ciała migdałowego
BP1	(ang. Binding protein 1) – białko wiążące 1
C2	(ang. C2 domain) – domena C2
CA	(ang. Cornu Ammonis) – róg Amona
CCW	(ang. Counter Clockwise) – kierunek przeciwny do ruchu wskazówek zegara w odniesieniu do testu patrolowania w IntelliCage
c-FOS	(ang. c-Fos proto-oncogene) – protoonkogen c-Fos
CaMKII α	(ang. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II) – kinaza białkowa zależna od wapnia/kalmoduliny II (podjednostka alfa)
CNS/OUN	(ang. Central Nervous System) – ośrodkowy układ nerwowy
CRISPR	(ang. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) – grupowane regularnie rozmieszczone krótkie powtórzenia palindromiczne (system immunologiczny bakterii do edycji genomu)
CS	(ang. Conditioned Stimulus) – bodziec warunkowy w klasycznym warunkowaniu
CTRL	(ang. Control) – grupa kontrola

CW	(ang. Clockwise) – kierunek zgodny z ruchem wskazówek zegara, w odniesieniu do testu patrolowania w IntelliCage
DAB	(ang. Diaminobenzidine) – diaminobenzydina
DG	(ang. Dentate gyrus) – zakręt zębaty
dHCP	(ang. Dorsal hippocampus) –hipokamp grzbietowy
DMEM	(ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium) – zmodyfikowane Dulbecco pożywki hodowlanej Eagle'a
dsDNA	(ang. double-stranded DNA) – podwójna nić DNA
DTW	(ang. Dynamic Time Warping) – dynamiczne dopasowanie czasowe
EC	(ang. Entorhinal Cortex) – kora śródwęchowa
EDTA	(ang. Ethylenediaminetetraacetic acid) – kwas etylenodiaminotetraoctowy
EPM	(ang. Elevated plus maze) – test podwyższonego labiryntu krzyżowego
EPSC	(ang. Excitatory postsynaptic current) – prąd postsynaptyczny pobudzający
ER	(ang. Estrogen receptor) - receptor estrogenowy
ERT2	(ang. Estrogen ligand-binding domain) - domena wiążąca ligand estrogenowy
EYFP	(ang. Enhanced yellow fluorescent protein) - wzmocnione białko żółtej fluorescencji
fAHP	(ang. Fast Afterhyperpolarization) – szybka hiperpolaryzacja następująca po potencjale czynnościowy
FBS	(ang. Fetal bovine serum) - płodowa surowica bydlęca
H	(ang. Hilus) – obszar strukturalny w mózgu, szczególnie w zakręcie zębatym (część hipokampa), który leży między warstwą ziarnistą a korytem hipokampa i zawiera różne typy komórek, takie jak komórki ziarniste i interneurony
GFAP	(ang. Glial fibrillary acidic protein) – kwaśne włókienkowe białko glejowe
GABA	(ang. γ -Aminobutyric acid) – kwas γ -aminomasłowy
HEK293	(ang. Human Embryonic Kidney 293 Cells) - ludzkie embrionalne komórki nerki 293
HGH	(ang. Human Growth Hormone) – ludzki hormon wzrostu
HRP	(ang. Horseradish peroxidase) – peroksydaza chrzanowa
hGH PolyA	(ang. Human growth hormone polyadenylation signal) – sygnał poliadenylacji ludzkiego hormonu wzrostu
IHC	(ang. Immunohistochemistry) – barwienie immuohistochemiczne
ITR	(ang. Inverted terminal repeats) - odwrócone powtórzenia końcowe
LB	(ang. Luria-Bertani) – podłoże hodowlane stosowane w mikrobiologii
LEC (II, III)	(ang. Lateral entorhinal cortex – Layer II, Layer III) – boczna kora śródwęchowa (warstwa II, III)
loxP	(ang. Locus of Crossing-over in P1) – specyficzna sekwencja DNA wykorzystywana w systemie rekombinacji Cre-lox
LTD	(ang. Long-term depression) – długotrwałe osłabienie synaptyczne
LTP	(ang. Long-term potentiation) – długotrwałe wzmocnienie synaptyczne
KO	(ang. Knock out) -grupa mutantów u której nastąpiło usunięcie genu metodą 'knock out'
KV1.1	(ang. Voltage-Gated Potassium Channel Subunit Kv1.1) – podjednostka kanału potasowego bramkowanego napięciem
MEC	(ang. Medial entorhinal cortex) – przyśrodkowa kora śródwęchowa

mEPSC	(ang. miniature excitatory postsynaptic current) – mianiaturowy postsynaptyczny prąd pobudzający
mPFC	(ang. medial prefrontal cortex) – przyśrodkowa kora przedczołowa
MOE	(ang. Main olfactory epithelium) – główny nabłonek węchowy
mRNA	(ang. Messenger RNA) – matrycowy RNA
miRNA	(ang. microRNA) - mikroRNA
mTOR	(ang. Mechanistic target of rapamycin) – kinaza mTOR
NAc	(ang. Nucleus Accumbens) – jądro półleżące
NES	(ang. Nestin) – Nestyna – białko markerowe komórek progenitorowych układu nerwowego
NLS	(ang. Nuclear localisation signal) – sygnał lokalizacji jądrowej
NMDG	(ang. N-Methyl-D-Glucamine) – N-Metylo-D-glukamina, związek stosowany jako substytut jonów sodu w roztworach buforowych (minimalizuje przewodnictwo sodowe w elektrofizjologii)
NOR	(ang. Novel Object Recognition) – test rozpoznawania nowych obiektów
NPA	(ang. Nosepoke approach) – podejście do detektora nosem
NSE	(ang. Neuron Specific Enolase) – enolaza specyficzna dla neuronów
NSC	(ang. Neural stem cells) – komórki macierzyste układu nerwowego
NS	(ang. neuron specific) – neuronowo specyficzny oznacza procesy, cechy lub manipulacje eksperymentalne, które dotyczą wyłącznie neuronów, bez udziału innych typów komórek, takich jak glia
OF	(ang. Open Field test) – test otwartego pola
OXTR	(ang. Oxytocin Receptor) – receptor oksytocyny
PAGE	(ang. Polyacrylamide gel electrophoresis) – elektroforeza w żelu poliakrylamidowym
PBD	(ang. Phosphatidylinositol-binding domain) – domena wiążąca fosfatydyloinozytol
PBS	(ang. Phosphate buffered saline) – buforowany roztwór soli fosforanowych (potocznie zwana sól fizjologiczna)
PBST	(ang. Phosphate buffered saline Triton-X-100) - buforowany roztwór soli fosforanowych z dodatkiem Triton-X
PCR	(ang. Polymerase chain reaction) – reakcja łańcuchowa polimerazy
PDZ	(ang. PSD95, Dlg1, ZO-1 domain) – domena PDZ
PEI	(ang. Polyethyleneimine) – polietylenoimina
PEST	(ang. Proline, Glutamic acid, Serine, Threonine-rich sequence) – sekwencja bogata w prolinę, kwas glutaminowy, serynę i treoninę
PFA	(ang. Paraformaldehyde) – paraformaldehyd
PHTS	(ang. PTEN Hamartoma Tumor Syndrome) – zespół nowotworowy związany z mutacjami w genie PTEN
PI3K	(ang. Phosphoinositide 3-kinase) – kinaza fosfatydyloinozytolu 3
PIP2	(ang. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) – fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan
PIP3	(ang. Phosphatidylinositol 3,4,5-bisphosphate) – fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trisfosforan
PKD1	(ang. Protein kinase D1) – kinaza białkowa D1
polyA	(ang. Polyadenylation Signal) – sygnał poliadenylacji w mRNA

pp	(ang. Postpartum) – okres po porodzie
PRAS40	(ang. Proline-rich AKT substrate 40 kDa) – substrat białka AKT o masie 40 kDa
PSD	(ang. Postsynaptic density) – gęstość postsynaptyczna
PSD95	(ang. Postsynaptic Density Protein 95) – białko synaptyczne obecne w obszarze postsynaptycznym
PTEN	(ang. Phosphatase and tensin homolog located on chromosome 10)
PVDF	(ang. Polyvinylidene fluoride) – polifluorek winylidenu
PVN	(ang. Paraventricular nucleus) – jądro przykomorowe
qPCR	(ang. Real time polymerase chain reaction) - reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym
RFID	(ang. Radio-Frequency Identification) – technologia identyfikacji za pomocą fal radiowych używana do identyfikacji osobników w IntelliCage
RFP	(ang. Red Fluorescent Protein) – białko czerwonej fluorescencji
RT-PCR	(ang. Real time polymerase chain reaction) - reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym
S6K1	(ang. Ribosomal Protein S6 Kinase 1) – kinaza białkowa uczestnicząca w regulacji translacji
SEM	(ang. Standard error of the mean) – błąd standardowy średniej
ssDNA	(ang. single strand DNA) - pojedynczoniciowe DNA
SD	(ang. Standard deviation) - odchylenie standardowe
SGZ	(ang. Subgranular zone) – strefa granularna
SG	(ang. Supragranular Layer) – warstwa nadziarnista kory mózgowej
SLM	(ang. Stratum Lacunosum-Moleculare) – warstwa lacunosum-moleculare hipokampa
SM	(ang. Stratum Moleculare) – warstwa molekularna kory mózgowej lub hipokampa
SO	(ang. Stratum Oriens) – warstwa oriens hipokampa
SP	(ang. Stratum Pyramidale) – warstwa piramidowa hipokampa
SPF	(ang. Specific Pathogen Free) – wolne od specyficznych patogenów (dotyczy zwierząt laboratoryjnych)
SR	(ang. Stratum Radiatum) – warstwa radiatum, jedna z warstw hipokampa, położona nad warstwą piramidową, zawiera głównie włókna apikalne komórek piramidowych
SuM	(ang. Supramammillary nucleus) – jądro nadwzgórzowe
SVZ	(ang. Subventricular zone) – strefa podkomorowa
TEMED	(ang. Tetramethylethylenediamine) – tetrametyloetylenodiamina
USV	(ang. Ultrasonic vocalization) – wokalizacja ultradźwiękowa
US	(ang. Unconditioned Stimulus) – bodziec bezwarunkowy, bodziec wywołujący automatyczną reakcję w klasycznym warunkowaniu
UTR	(ang. Untranslated Region) – region nieulegający translacji w mRNA
vHCP	(ang. ventral hippocampus) – brzuszna część hipokampa
VNO	(ang. Vomeronasal organ) – narząd lemieszowo-nosowy
VZ	(ang. Ventricular Zone) – strefa przykomorowa, region proliferacyjny w rozwijającym się mózgu
WPRE	(ang. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element)-potranslacyjny element regulatorowy wirusa zapalenia wątroby

STRESZCZENIE

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

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

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

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

The first stage of the study used a mouse model of *Pten*-CaMKII α -CreER^{T2} with conditional tamoxifen-inducible deletion of the *Pten* gene in differentiated forebrain excitatory neurons in adult animals (*Pten*-iCKO). It was observed that the mutants showed enhanced spatial memory in tests performed in IntelliCage cages. However, increased mortality was observed in these animals between 7 and 13 weeks after mutation activation.

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

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

1. WSTĘP

1.1. ROLA HIPOKAMPA W KODOWANIU PAMIĘCI

W neurobiologii termin „uczenie się” i „pamięć” określa dynamiczne procesy zachodzące między neuronami, zaangażowane w kodowanie, przechowywanie i ponowne przetwarzanie (ang. recoding) informacji w systemie poznawczym: ośrodkowym układzie nerwowym (OUN). Procesy pamięciowe mają na celu przetwarzanie i modyfikowanie wiedzy o otoczeniu, z uwzględnieniem doświadczenia powstałego w wyniku przechowywania uprzednio nabytych wspomnień, na temat różnych zdarzeń-informacji służącej do adaptacji i odpowiedzi na zmieniające się środowisko. Neurobiolodzy głównie skupiają się na scharakteryzowaniu zachodzących procesów fizjologicznych w obwodach neuronalnych zlokalizowanych w danych strukturach mózgu oraz mechanizmów komórkowych odpowiedzialnych za dane zjawiska i procesy pamięciowe (Zlotnik i Vansintjan, 2019). W psychologii pamięć definiowana jest jako umiejętność kodowania, przechowywania i pobierania informacji (Squire, 2009b). Pamięć została podzielona na 3 etapy (stany): sensoryczna, krótkotrwała i długotrwała, bazując na długości czasu, w którym informacja pozostaje dostępna i nie ulega zapomnieniu (Atkinson, 1968; Baddeley, 1970; Milner, 2019). Przetwarzanie informacji rozpoczyna się w pamięci sensorycznej, gdzie informacja na temat otoczenia zostaje odebrana przez receptory zmysłów. Bodźce dochodzące do poszczególnych narządów zmysłów są konwertowane oraz filtrowane. Pamięć sensoryczna jest buforem pamięciowym, która utrzymuje się bardzo krótko i tylko niewielka część zarejestrowanych danych (na które została zwrócona uwaga) jest zapamiętywana i przekazywana dalej do pamięci krótkotrwałej. W powstawaniu pamięci krótkotrwałej istotną rolę odgrywiają impulsy elektryczne przewodzone przez neuron i impulsy chemiczne – neuroprzekaźniki aktywujące/hamujące przenoszenie sygnału pomiędzy neuronami w synapsach. Pamięć krótkotrwała ma ograniczoną pojemność (ilość informacji, które mogą być przechowywane i odzyskiwane) i krótkotrwały rozkład czasowy, zwykle określany w przedziale od kilku sekund do jednej minuty. Niektórzy badacze używają terminu pamięć robocza (z ang. working memory) i odróżniają go od pamięci krótkotrwałej, choć te dwa elementy nakładają się na siebie. Pamięć roboczą można zdefiniować jako zdolność mózgu do przechowywania ograniczonej ilości informacji na tyle długo, aby móc z niej korzystać. Typowym przykładem determinującym pamięć roboczą jest zapamiętanie informacji, w którym momencie skończyliśmy czytać książkę chwilę przed odebraniem telefonu, który wytrącił nas z danej czynności. Pamięć robocza jest związana z przetwarzaniem myśli i planów, a także pomaga

w podjęciu decyzji i realizowania pomysłów (Aben i wsp., 2012). Część informacji chwilowo przechowywanej w pamięci krótkotrwałej może zostać przeniesiona do pamięci długotrwałej poprzez proces zwany konsolidacją, natomiast informacje, które nie zostaną poddane temu procesowi ulegają wygaszeniu z sieci neuronalnej (Dudai, 2004; Wang i Morris, 2010).

Pierwsze doniesienia i hipotezy opisujące zaangażowania hipokampa w uczenie się i-tworzenie pamięci sięga lat 70-tych (np. „Teoria Mapy Poznawczej”) (O’Keefe, 1978). Następnie serię eksperymentów na zwierzętach skupiających się na celowym bądź nie intencyjnym uszkodzeniu sieci komórkowych w hipokampie (leżycie hipokampalne), doprowadziły do odkrycia zaburzeń w obrębie pamięci roboczej (Stanton i wsp., 1984), epizodycznej (Li i Chao, 2008), socjalnej (Kogan i wsp., 2000; Maaswinkel i wsp., 1996), zadań pamięciowych (Scoville i Milner, 1957) i nawigacji w przestrzeni (Hollup i wsp., 2001). Podobne wnioski wyciągnięto w wyniku obserwacji pacjentów pooperacyjnych (po wykonanym zabiegu lobotomii) oraz z powypadkowymi uszkodzeniami hipokampa bądź w wyniku przebytych infekcji (Corkin i wsp., 1997; Squire, 2009a; Teng i Squire, 1999; Zola-Morgan i wsp., 1986). Ponadto, nowe technologie 21-wieku wykorzystywane w inżynierii genetycznej umożliwiają precyzyjne badanie aktywności sieci neuronalnych, czy nawet poszczególnych neuronów. Kolejne lata doświadczeń pozwoliły przybliżyć dokładniejszą rolę hipokampa w procesach poznawczych oraz stawiać śmielsze hipotezy na temat budowy i roli poszczególnych populacji neuronów odpowiadających za konkretne etapy gromadzenia, przetwarzania i kodowania nowej informacji czy odtwarzania i modyfikowania informacji uprzednio zakodowanej. Za pomocą technologii optogenetycznej, czy modyfikacji poszczególnych sieci i populacji neuronów przy użyciu wektorów wirusowych jesteśmy coraz bliżej zrozumienia funkcji danych struktur mózgowych oraz ich wzajemnego zaangażowania w procesy kognitywne (Kapur i Brooks, 1999; Nectow i Nestler, 2020; Roth i Ding, 2020). W literaturze opisano trzy kluczowe funkcje hipokampa związane z modulowaniem procesów pamięciowych. Pierwszą z nich jest bezpośrednio zaangażowanie w proces konsolidacji śladów pamięciowych. Jest to proces polegający na utrwaleniu danego/wybranego wspomnienia w wyniku zachodzących procesów biochemicznych wewnątrz neuronów, które umożliwiają kodowanie tej informacji w postaci engramu i przechowywana w późniejszym czasie w różnych strukturach korowych (Kapur i Brooks, 1999; Smith i Squire, 2009). Po drugie, hipokamp otrzymując informacje z różnych struktur mózgu jest zaangażowany w tworzenie pamięci epizodycznej, w tym tworzenie pamięci socjalnej. Uczestniczy w kodowaniu nowości społecznej i rozpoznawania poznanych osobników (Oliva, 2022). Hipokamp moduluje pamięć

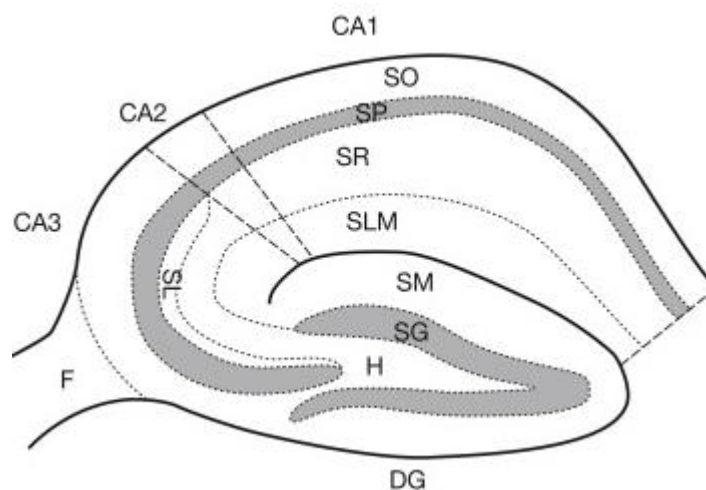
epizodyczną poprzez nadpisywanie nowych wspomnień czy informacji na już istniejące w pamięci, poprzez procesy ponownego kodowania i wygaszania poprzedniej nieaktualnej informacji (Li i Chao, 2008). Po trzecie, badania dowodzą, że hipokamp odgrywa ważną funkcję podczas nawigacji przestrzennej i tworzenia mapy kognitywnej (O'Keefe, 1978).

1.1.1. Anatomia hipokampa (DG, CA3, CA1, CA2)

Hipokamp zwany również rogiem Ammona (CA, z łac. Cornu Ammonis) jest strukturą filogenetycznie starszą należącą do kory mózgu i zróżnicowaną pod kątem morfologicznym. Kształtem przypomina literę C, która powstała poprzez uwypuklenie się warstw korowych do wnętrza komory bocznej mózgu w okolicy rogu skroniowego (Schultz i Engelhardt, 2014). Pod względem morfologicznym hipokamp można podzielić na dwie części: grzbietową leżącą bliżej przegrody (z łac. Septum) oraz brzuszną zlokalizowaną w bliskiej odległości od kory skroniowej (z łac. Cortex Temporalis). Analizując dominującą populację neuronów oraz specyfikę połączeń neuronalnych i kierunek rozgałęzień dendrytów, można wyróżnić w hipokampie właściwym pięć warstw (z łac. stratum): lacunosum-moleculare, radialna, piramidowa, oriens oraz lucidum (Rycina 1) (Cappaert, 2015).

W hipokampie dominuje warstwa piramidalna (z łac. stratum pyramidale), w której ulokowane neurony różnią się pod względem wielkości ciała komórki, długości aksonów oraz ich kierunku. Dendryty szczytowe neuronów piramidalnych skierowane są ku wnętrzu hipokampa, a ich wtórne rozgałęzienia wnikają w warstwę radialną i lacunosum-moleculare, a dendryty podstawowe rozciągają się do warstwy oriens. W warstwie piramidalnej wyróżnia się pola CA1, CA2, CA3 wyodrębnione pod kątem różnic w organizacji neuronalnej i funkcji. Ponadto, podregiony CA1 i CA3 podzielono są odpowiednio na trzy główne domeny molekularne: grzbietową (dCA1, dCA3), pośrednią (iCA1, i iCA3) oraz brzuszną (vCA1, vCA3) (Fanselow i Dong, 2010). Niektórzy badacze wyodrębniają także dodatkowy podregion CA4 w hipokampie, który jest określany także jako wnęka (z ang. hilus). Podregion CA4 jest końcową częścią hipokampa o polimorficznym charakterze neuronów, bardziej przypominających komórki ziarniste występujące w zakręcie zębatym (DG, łac. Gyrus Dentatus) niż piramidalne (Dalton i wsp., 2017). Kora zakrętu zębatego składa się z trzech warstw: ziarnistej, polimorficznej (wielopostaciowa) oraz molekularnej. W DG dominuje warstwa ziarnista (z ang. granular layer) złożona z gęsto upakowanych drobnych neuronów, których dendryty wychodzą w stronę powierzchni zakrętu, tworząc warstwę drobinową (Amaral i wsp., 2007; Amaral i Witter, 1989). Ponadto, aksony neuronów ziarnistych zwane włóknami mszystymi (z ang. mossy fibers) tworzą synapsy z dendrytami szczytowymi

hipokampa. DG ma kształt półksiężyca, którego wypukłość skierowana jest w stronę warstwy molekularnej (Amaral i wsp., 2007). Warstwa molekularna usytuowana jest po zewnętrznej stronie warstwy granularnej stykając się z regionem parahipokampalnym oraz warstwą lacunosum-moleculare hipokampa. W tej warstwie zlokalizowane są dendryty komórek ziarnistych, interneurony oraz włókna ścieżki perforacyjnej. Natomiast warstwa polimorficzna znajduje się po wewnętrznej stronie warstwy granularnej, oddzielając ją w ten sposób od podregionu CA hipokampa (Amaral i wsp., 2007).



Rycina 1. Strukturalny podział hipokampa i zakrętu zębatego

Hipokamp składa się z 3 głównych podregionów, w których zlokalizowane są neurony, zwanych rogami Ammona: CA1, CA2, CA3 oraz pięciu wyodrębnionych warstw: SLM-*stratum lacunosum-moleculare*, SR-*stratum radiale* (łac. *stratum radiatum*), SP-*stratum pyramidale*, SO-*stratum oriens*, SL-*stratum lucidum*. W zakręcie zębatym wyodrębniono 3 warstwy: SM-*stratum moleculare*, SG-*stratum granulosum* oraz warstwa polimorficzna (nie przedstawiona na schemacie), H-wnęka (łac: *hilus*) (źródło: Noguchi, 2020).

1.1.2. Podział grzbietowo-brzuszy hipokampa – zróżnicowane funkcje

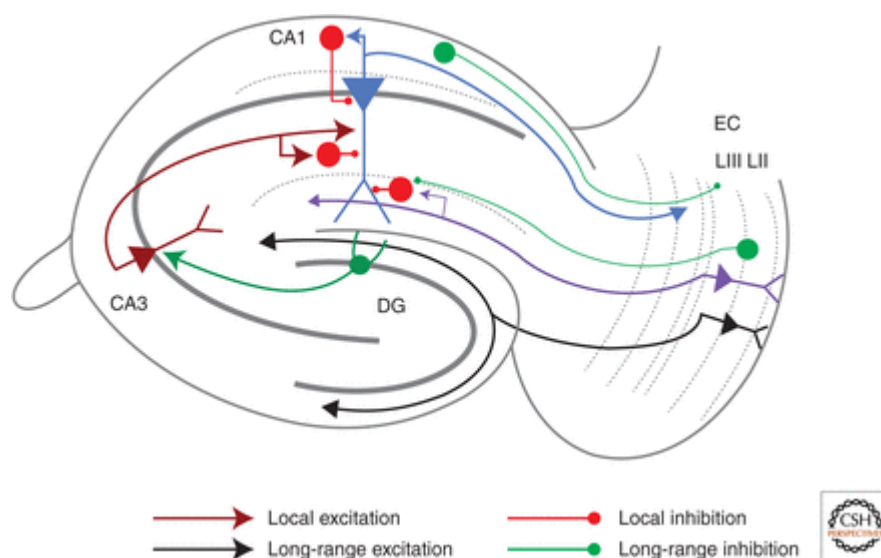
Hipokamp dzieli się umownie na część grzbietową oraz brzuszłą, pod kątem funkcjonalnym, na podstawie dowodów naukowych potwierdzających zaangażowanie różnych subpopulacji hipokampa (opisanych powyżej), aktywowanych podczas procesów pamięciowych (Hock i Bunsey, 1998; Moser i Moser, 1998). Kodowanie informacji przestrzennej oraz czasowej jest przetwarzane głównie w części grzbietowej hipokampa (z łac. DH, dorsal hippocampus) u gryzoni (Fanselow i Dong, 2010; Jung i wsp., 1994; Moser i wsp., 1993; Moser i wsp., 1995), a u ludzi i naczelnych w części tylnej hipokampa (z łac. PH, posterior hippocampus) (Colombo i wsp., 1998; Gabrieli i wsp., 1997). Projekcje wychodzące z brzuszego hipokampa (z łac. VH, ventral hippocampus) u gryzoni (u ludzi i naczelnych z przedniego hipokampa) uczestniczą w modulacji stanów lękowych w odpowiedzi na kontekst (Adhikari i wsp., 2010), natomiast poszczególne populacje neuronów z części grzbietowej

mogą wchodzić w wzajemne interakcję z populacjami w części brzusznej hipokampa i odpowiadać za modulację pamięci socjalnej rozpoznawczej (z ang. social recognition memory) i zachowanie pamięci społecznej (z ang. social memory retention) (Meira i wsp., 2018; Tsai i wsp., 2022).

1.1.3. Obwody neuronalne hipokampa i struktury towarzyszące

Hipokamp właściwy jest częścią formacji hipokampalnej obejmującej istotne obszary korowe takie jak zakręt zębaty, kompleks podkładki (Sub, z łac. Subiculum) oraz kory śródkęchowej (EC, z łac. Cortex Entorhinali), które są ze sobą połączone poprzez funkcjonalne sieci neuronalne (Schultz i Engelhardt, 2014). Jednym z głównych obwodów neuronalnych zaangażowanych w modulację pamięci jest kanoniczny obwód hipokampalno-korowy. Przepływ informacji w obiegu EC-hipokamp jest regulowany poprzez wzmocnienie synaptyczne (plastyczność synaptyczną) prowadzące do pobudzenia lub hamowania aktywności konkretnych populacji neuronów. Dotychczasowa wiedza na temat aktywności sieci neuronalnych i ich roli w formacji hipokampa nie jest do końca poznana i wciąż w tym obszarze prowadzone są intensywne badania. Podczas tworzenia się pamięci epizodycznej, hipokamp przetwarza i łączy w całość docierające informacje sensoryczne, przestrzenne i czasowe z obwodów lokalnych i dalekich (Basu i Siegelbaum, 2015). W formacji hipokampa wyróżnia się trzy główne systemy połączeń neuronalnych (Rycina 2):

- Projekcje dalekie przychodzące do hipokampa z innych struktur korowych tj. kora okołowęchowa, śródwęchowa, zawęchowa (nazwane też regionem parahipokampalnym), a także ze struktur podkorowych mózgu (Basu i Siegelbaum, 2015; Burwell, 2000).
- Projekcje lokalne (wewnętrzne) pomiędzy strukturami w formacji hipokampa (mini obwody) (Basu i Siegelbaum, 2015; Geiller i wsp., 2023; Senzai, 2019).
- Projekcje dalekie wychodzące z hipokampa do powyżej opisanych struktur korowych i podkorowych mózgu (Basu i Siegelbaum, 2015; Butola i wsp., 2023).



Rycina 2. Schemat przedstawiający obwody neuronalne pobudzające i hamujące, biegnące pomiędzy hipokampem a korą śródwęczową

Obwód korowo-hipokampalny obejmuje glutaminergiczne wejścia z powierzchniowych warstw kory śródwęczowej (EC) (warstwa II i III) do neuronów piramidowych w podregionie CA1, za pośrednictwem ścieżek trójsynaptycznej i monosynaptycznej a projekcje zwrotne hipokampa do głębokich warstw EC (warstwa V) zamykają obwód. Sygnały sensoryczne napędzają przepływ informacji z ścieżki perforującej (PP, fioletowa) z neuronów piramidowych warstwy LIII EC do dendrytów neuronów piramidowych CA1 (jasnoniebieskie). Aktywowane neurony piramidowe warstwy LII EC wysyłają sygnały do zakrętu zębatego (DG, czarny), gdzie aktywowane są włókna mszyste (ciemnozielony) przesyłające informacje do CA3, a następnie CA3 przekazuje sygnały do neuronów CA1 przez pobudzające wejścia kolaterali Schaffera (SC, ciemnoczerwone). Istnieje opóźnienie czasowe wynoszące 15-20 ms w transmisji informacji z warstwy LII EC do CA1 przez ścieżkę trójsynaptyczną. W regionie CA1 znajduje się kilka lokalnych interneuronów GABA-ergicznymi (czerwone) zlokalizowanych w okolicy somy, aksonów i dendrytów neuronów piramidowych CA1, modulując ich aktywność w sposób specyficzny dla danego obszaru. Długozasięgowe projekcje hamujące (zielone) z EC zapewniają bezpośrednie hamowanie, preferencyjnie kierowane do lokalnych interneuronów w CA1. Opisano również długozasięgowe projekcje neuronów GABA-ergicznymi ze stratum oriens (SO) hipokampa do warstw LII/LIII kory śródwęczowej (źródło: [Basu i Siegelbaum, 2015](#)).

1.1.4. Połączenia pobudzające w obwodzie hipokampalno-korowym

W mózgu gryzoni, głównym źródłem wejść pobudzających do hipokampa są neurony glutaminergiczne docierające z kory śródwęczowej ([Rycina 2](#)) ([Basu i Siegelbaum, 2015](#)). Pamięć epizodyczna jak i przestrzenna bazują na tej samej populacji neuronów korowo-hipokampalnych (mają wspólne podłoże neuronalne) ([Robin i wsp., 2015](#)). Początkowo dane percepcyjne przetwarzane są przez obszary korowe takie jak region potyliczno-skroniowy (dla informacji nie przestrzennej), z którego informacje są dalej kierowane do kory około oczodołowej oraz regiony tylnociemieniowe (dla informacji przestrzennej), z których informacja biegnie projekcjami do kory parahipokampalnej (w dolnym regionie płata skroniowego). Następnie informacje są przekazywane do kory śródwęczowej, będącej polimodalnym obszarem skojarzeń sensorycznych. Informacja o charakterze nie przestrzennym przetwarzana przez obszar boczny kory śródwęczowej (LEC, z łac. lateral enthorinal cortex) a informacja przestrzenna jest przetwarzana przez obszar przyśrodkowy kory

śródwęchowej (MEC, z łac. medial ethorinal cortex), a następnie docierają do hipokampa gdzie odbywa się rzeczywiste kodowanie. Informacja jest przetwarzana w hipokampie poprzez kilka równoległych obwodów. Do tej pory dobrze scharakteryzowano dwa obwody zaangażowane w przesyłanie informacji do CA1 hipokampa. Szybszy obwód monosynaptyczny, w którym informacje z pobudzonych neuronów glutaminergicznych zlokalizowanych w powierzchniowej warstwie III EC dociera bezpośrednio do CA1 poprzez ścieżkę perforacyjną (z ang. PP = perforant pathway) (Basu i Siegelbaum, 2015; Cappaert, 2015; Zemla i Basu, 2017). Wolniejszy szlak pośredni tzw. obwód trójsynaptyczny, w którym informacje sensoryczne (węchowe, wzrokowe, słuchowe) z kory przynosowej (z łac. perirhinal cortex) jak i kory śródwęchowej (warstwy powierzchniowej II z LEC i MEC) przechodzą przez kilka etapów przetwarzania. Początkowo aksony tych neuronów wędrują ścieżką perforacyjną i tworzą synapsy z dendrytami komórek ziarnistych w zakręcie zębatym (Basu i Siegelbaum, 2015; Lin i wsp., 2021; Zemla i Basu, 2017). Następnie, aksony komórek ziarnistych zwane włóknami mszystymi tworzą synapsy z dendrytami komórek piramidowych zlokalizowanych w polu CA3, które z kolei pobudzają komórki piramidowe w polu CA1 poprzez ścieżkę kolateralną Schaffera (EC LII → DG → CA3 → CA1). Następnie informacja przetworzona w polu CA1 opuszcza ostatecznie hipokamp drogą bezpośrednią lub pośrednią przez podkładkę. Projekcje docierają do warstwy głębokiej V położonej w EC i z kolei dalej do docelowych obszarów korowych i podkorowych (Basu i Siegelbaum, 2015; Butola i wsp., 2023; Senzai, 2019; van Strien i wsp., 2009). Synapsy pobudzające powstałe pomiędzy neuronami z CA3 a CA1 zlokalizowane są w warstwie promienistej (łac. stratum radiatum) a synapsy powstałe pomiędzy neuronami z EC a CA1 w regionie dystalnym zwanym warstwą molekularną dziurkowatą (z łac. stratum lacunosum-moleculare) (Basu i Siegelbaum, 2015).

1.1.5. Połączenia hamujące w obwodzie hippokampalno-korowym

Istnieją także synapsy hamujące, które utrzymują homeostatyczną równowagę (balans) pomiędzy pobudzeniem a hamowaniem aktywności obwodów neuronalnych w hipokampie. Synapsy tworzone są pomiędzy zakończeniami interneuronów a neuronami piramidowymi w polu CA1 (Rycina 2). Mogą występować w rejonach w pobliżu dendrytów, ciał komórkowych i aksonu neuronów z pola CA1 (Pelkey i wsp., 2017). Głównym neuroprzekaźnikiem zaangażowanym w hamowaniu układów jest kwas GABA-aminomasłowy, uwalniany przez zakończenia interneuronów do przestrzeni synaptycznych. Do tej pory zostały dobrze opisane dwa obwody GABA-ergiczne różniące się zasięgiem. Obwód lokalny, czyli interneurony np. zlokalizowane pomiędzy polem CA2 i CA1 oraz obwód

daleki, którego projekcie biegną np. do pola CA1 z kory śródwęchowej oraz kory przedczołowej (Basu i wsp., 2016). Projekcje hamujące GABA-ergiczne w obwodzie dalekim wysyłane są zarówno przez LEC jak i MEC do CA1. Oddziałują poprzez aktywizację lokalnego obwodu interneuronów hamujących neurony piramidowe pola CA1 w regionie synaps utworzonych z dendrytami, zlokalizowanych w odcinku dystalnym. Hamowanie zachodzi w wyniku obniżenia pobudzenia synaptycznego i w wyniku zredukowanego uwalniania jonów Ca^{2+} z retikulum endoplazmatycznego do cytoplazmy neuronów (Pelkey i wsp., 2017).

1.2. RODZAJE PAMIĘCI ZALEŻNEJ OD AKTYWNOŚCI HIPOKAMPA

Hipokamp umożliwia kodowanie zintegrowanej informacji-wspomnienia o poznanych osobnikach podczas danego wydarzenia (pamięć socjalna), miejscu zdarzenia-kontekst (pamięć przestrzenna) oraz oszacowaniu ram czasowych tego zarejestrowanego zdarzenia (pamięć porządku czasowego/kontekst przestrzenno-czasowy (ang. temporal order memory). Ponadto funkcja hipokampa nie kończy się na kodowaniu nowej informacji, ale także uczestniczy podczas odtwarzania/przypominania epizodycznych wspomnień bogatych w szczegóły sensoryczne (Danieli i wsp., 2023; Squire i wsp., 1990).

1.2.1. Pamięć epizodyczna

Pamięć epizodyczna jest częścią pamięci deklaratywnej (jawnej). Tworzenie pamięci deklaratywnej w decydującym stopniu zależy od aktywności hipokampa i szeregu połączonych ze sobą struktur zlokalizowanych w przysiódkowym płacie skroniowym mózgu ssaków (Bayley, 2003). Pamięć jawna u ludzi obejmuje świadome przypominanie faktów i zdarzeń, które zostały uprzednio kodowane w przeszłości i przetrzymywane są w strukturach mózgu (Anderson, 2013; Squire i wsp., 1990). Natomiast, pamięć epizodyczna odnosi się do zapamiętywania faktów i zdarzeń autobiograficznych, czyli osobistych doświadczeń (Dickerson i Eichenbaum, 2010). Pamięć epizodyczna jest rozumiana w kategoriach dwóch niezależnych procesów takich jak wspomnianie (z ang. recollection) oraz znajomość/obeznanie (z ang. familiarity) w odniesieniu do danego zakodowanego zdarzenia (Dickerson i Eichenbaum, 2010). Powiązanie ze sobą wszystkich komponentów pamięci epizodycznej takiej jak 'Co?' 'Gdzie?' i 'Kiedy?' jest domeną hipokampa, ze względu na kluczową rolę w łączeniu informacji pochodzących z wielu strumieni korowych.

U gryzoni eksperymentalna ocena zintegrowanych komponentów pamięci epizodycznej w warunkach laboratoryjnych nie jest do końca mierzalna, ze względu na brak komunikacji werbalnej zwierząt, która byłaby zrozumiana przez eksperymentatora oraz możliwości

zbadań subiektywnej świadomości zwierząt. Można oszacować pamięć epizodyczną u gryzoni (z ang. episodic-like memory), badając poszczególne komponenty pamięci pod kątem zapamiętywania danego przedmiotu czy miejsca (co), jego położenia (gdzie) i okazji (kiedy) a następnie wyciągając wnioski o zachodzących procesach kognitywnych na podstawie scharakteryzowanych typowych zachowań zwierząt ([Bunsey i Eichenbaum, 1996](#); [Ergorul i Eichenbaum, 2004](#); [Huston i Chao, 2023](#)).

1.2.2. Pamięć przestrzenna i tworzenie map kognitywnych

Jak już wspomniano, pamięć przestrzenna u ludzi jest częścią pamięci deklaratywnej i jest odpowiedzialna za kodowanie (ang. encoding) i pobieranie informacji (ang. retrieval) dotyczącej otoczenia i orientacji w przestrzeni ([Burgess i wsp., 2002](#); [Cohen i Squire, 1980](#)). Ta forma pamięci jest testowana u zwierząt laboratoryjnych na wiele sposobów, w konwencjonalnych testach takich jak labirynt T ([Wenk, 2001](#)), czy promienisty ([Kohler i wsp., 2022](#)), labirynt wodny Morrisa ([Vorhees i Williams, 2006](#)) oraz ich zautomatyzowanych odpowiednikach ([Balcerek i wsp., 2024](#); [Kiryk i wsp., 2020](#); [Kohler i wsp., 2022](#)). Bezpieczne manewrowanie i odnajdywanie się w środowisku poprzez uczenie się i zapamiętywanie lokalizacji jest kluczowe dla przetrwania prawie wszystkich gatunków. Uczenie się przestrzenne jest złożoną formą uczenia się asocjacyjnego, w której zwierzę nabywa informację bazując na dostępnych wskazówkach w przestrzeni. Ssaki (w tym ludzie i gryznie) w celu odnalezienia właściwej drogi, wykorzystują różne strategie nawigacyjne, które mogą aktywować zupełnie inne grupy neuronów oraz odmienne struktury i obszary mózgu, w tym hipokamp, prążkowie i korę przedczołową ([Parrini i wsp., 2024](#)). Jedną ze strategii procesowania przestrzennego jest nawigacja ukierunkowana na cel: egocentryczna i alocentryczna ([Banta Lavenex i wsp., 2014](#); [Parrini i wsp., 2024](#)). W strategii egocentrycznej (niezależnej od aktywności hipokampa) sposób przetwarzania informacji przestrzennej zachodzi z perspektywy jednostki, gdzie obiekty są umiejscowione względem obserwatora (orientacja względem osi ciała). Zwierzę koduje lokalizację celu (np. platformy lub nagrody) w odniesieniu do swojej bieżącej pozycji i kierunku (np. „na prawo ode mnie”) i wykorzystuje charakterystyczne punkty środowiska, które są widoczne z konkretnej perspektywy (w kontekście swojej aktualnej lokalizacji) ([Banta Lavenex i wsp., 2014](#); [Parrini i wsp., 2024](#); [Vorhees i Williams, 2014](#)). Strategia alocentryczna zależna od aktywności hipokampa, odnosi się do reprezentacji przestrzeni z perspektywy globalnej, gdzie obiekty są kodowane względem siebie, niezależnie od pozycji obserwatora. Hipokamp integruje informacje o punktach orientacyjnych i relacjach przestrzennych tworząc mentalną mapę środowiska, co umożliwia

skuteczne poruszanie się nawet w przypadku zmiany punktu wyjścia (np. gdy mysz rozpocznie test z innego miejsca). Zwierzę wykorzystuje stałe punkty orientacyjne (np. ściany labiryntu, charakterystyczne wzory, lub zapachy) jako odniesienie, aby określić relacje przestrzenne. (Banta Lavenex i wsp., 2014; Rinaldi i wsp., 2020). Zdolność hipokampa do generowania mapy kognitywnej zachodzi w wyniku pobudzenia specjalnej grupy komórek o charakterystycznym wzorze aktywacji. W 1971 odkryto jako pierwsze komórki miejsca (z ang. place cells). Są to neurony piramidowe, które są pobudzane podczas zadań przestrzennych np. gdy zwierzę znajduje się w różnych dwóch kontekstach (środowiskach), wówczas inny zestaw neuronów może być aktywowany tworząc unikalne reprezentacje kontekstowe (O'Keefe i Dostrovsky, 1971). Następnie w ciągu dekady odkryto kolejne typy neuronów o unikalnej specyfikacji, które razem z komórkami miejsca są modulowane w zależności od położenia zwierzęcia na testowanej arenie. Wszystkie te typy komórek (Tabela 1) wspomagają tworzenie poznawczej mapy przestrzennej na obwodzie EC-hipokamp i wspierają system kodowania przestrzennego (Moser i wsp., 2015).

Tabela 1. Rodzaje neuronów zaangażowanych w pamięć przestrzenną oraz tworzenie mapy kognitywnej

Typ Komórki	Lokalizacja	Funkcja
Miejsca	CA1, CA3	Mapują specyficzne lokalizacje przestrzenne, kodują doświadczenie w nowym środowisku (Dong i wsp., 2021 ; Moser i wsp., 2015)
Siatki	MEC LII	Dostarczają metryki przestrzenne tworząc siatkową reprezentację (Bjerknes i wsp., 2014 ; Moser i wsp., 2015)
Kierunku głowy	MEC, subiculum	Kodują kierunek wspomagając orientację (Bjerknes i wsp., 2014 ; Bonnievie i wsp., 2013)
Graniczne	MEC, subiculum	Definiują granicę kształtując ograniczenie przestrzenne (Bjerknes i wsp., 2014 ; Lever i wsp., 2009)
Czasowe	CA1	Kodują sekwencję zdarzeń wspierając pamięć epizodyczną (Eichenbaum, 2014)

CA1; CA3 = podregiony w hipokampie; MEC = przyśrodkowa część kory śródwęczowej

Zakręt zębaty ma fundamentalne znaczenie dla pamięci przestrzennej poprzez generowanie poznawczych map środowisk. Jego połączenia z komórkami siatki, komórkami granicznymi oraz komórkami kierunku głowy (zlokalizowanych w MEC) wspierają orientację przestrzenną i kodowanie lokalizacji w złożonym środowisku oraz aktualizację stworzonej mapy poznawczej ([Zemla i Basu, 2017](#)). Aktywowany jest także podczas rozróżniania podobnych układów przestrzennych tzw. proces separacji/rozdzielania wzorców (z ang. pattern separation) co ma kluczowe znaczenie w dokładnej nawigacji przestrzennej ([Neunuebel i Knierim, 2014](#); [Yassa i Stark, 2011](#)). DG uczestniczy także w kodowaniu wspomnień związane z warunkowaniem strachu na kontekst ([Bernier i wsp., 2017](#)). Ponadto, uszkodzenia DG podczas neurogenezy postnatalnej (w czasie, w którym dochodzi do dojrzewania i migracji komórek ziarnistych) silnie oddziałują na zaburzenia pamięciowe. Z kolei lezje lub inaktywację dojrzałych neuronów w DG wywołują bardziej subtelne zmiany w procesach pamięciowych niż zaburzenia w polu CA1 ([Dong i wsp., 2009](#)). W procesie odzyskiwania (ang. retrieval) i przypominania (ang. recall) pamięci zaangażowany jest obwód DG-CA3. Informacja do CA3 dociera poprzez włókna mszyste ([Basu i Siegelbaum, 2015](#)). Natomiast istnieją jeszcze rekurencyjne sieci neuronowe w CA3 (lokalne) zaangażowane w proces uzupełniania wzorców (z ang. pattern completion), które charakteryzują się wykonaniem bardziej złożonych obliczeń i przywołania pełnej pamięci o zdarzeniu (np. przywołaniu wspomnień przestrzennych) na podstawie otrzymanych częściowych wskazówek ze środowiska. CA3 łączy informację

przesłaną otrzymaną z DG z własnymi wejściami rekurencyjnymi, aby odzyskać/ odnaleźć uprzednio zapamiętane zapisane wspomnienie w procesie przypominania (Gold i Kesner, 2005; Rolls, 2013). Informacje z CA3 do CA1 docierają kolateralami Schaffera. Dowody naukowe wskazują, że aktywność CA1 jest niezbędna do powstawania hipokampo-zależnych form pamięci, szczególnie opisano przypadki pacjentów, u których amnezja wsteczna jak i przedwczesna skorelowana jest z uszkodzeniem pola CA1 (Bartsch i wsp., 2011). Jednakże, nie do końca poznana jest rola CA1 podczas procesu przypominania zdarzeń (przywoływania pamięci). Istnieją przesłanki wskazujące na aktywację hipokampa, szczególnie CA1 (Rugg i Vilberg, 2013) oraz dowody z eksperymentów optogenetycznych wykazujące, że przejściowa inaktywacja neuronów piramidowych z pola dCA1 znacznie upośledza proces przypominania (Goshen, 2011). CA1 jest ważny w procesie nabywania i przypominania nowych zdarzeń, które zostały zakodowane w ciągu 24 godzin, natomiast uszkodzenie CA1 nie wpływa na zaburzenia odległych wspomnień (Squire, 2004). Istnieją przesłanki naukowe pokazujące zaangażowanie dalekich projekcji hamujących z LEC do CA1 w rozróżnianie kontekstu (z ang. contextual discrimination) oraz detekcji nowości (Zemla i Basu, 2017).

1.2.2.1. Metody behawioralnej analizy pamięci przestrzennej zależnej od hipokampa

W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat zostało zaprojektowanych wiele testów dla gryzoni w celu oszacowania uczenia się i pamięci przestrzennej. Testy dzieli się w zależności od typu stosowanego bodźca wpływającego na motywację zwierząt. Doświadczenia oparte na wzmocnieniu pozytywnym skupiają się na nagrodzeniu zwierzęcia za wykonanie zadania czy znalezienie poprawnej drogi. Istnieją także testy bazujące na wzmocnieniu negatywnym poprzez karanie zwierzęcia za złe wybory i warunkujące zapamiętanie kontekstu o nieprzyjemnym zdarzeniu m.in. ekspozycja na napięcie elektryczne, czy podmuch sprężonego powietrza w pyszczek w testach unikania miejsca (Ali i wsp., 2024; Winslow i wsp., 2021). Większość tekstów także wymaga uprzedniego przygotowania zwierzęcia w postaci restrykcji pokarmowych mających na celu zwiększenie motywacji do wykonywania zadań. Ponadto testy mogą wykorzystywać wskazówki wizualne w celu ułatwienia nawigacji zwierząt w przestrzeni (Hamilton i wsp., 2009).

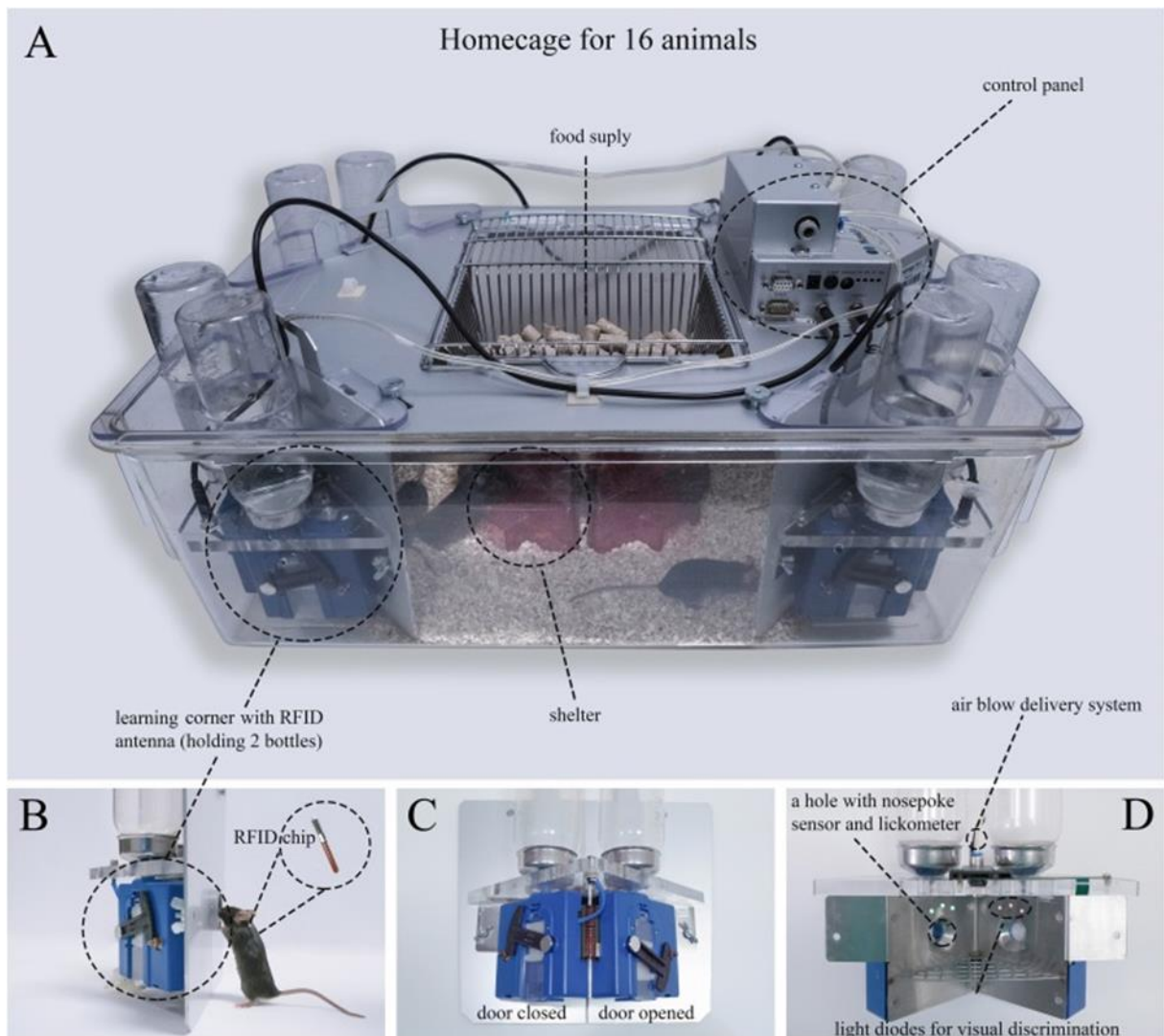
Część zmodyfikowanych myszy posiada wbudowane geny ludzkie w celu modelowania chorób związanych z zaburzeniami w mózgu (Baglietto-Vargas i wsp., 2021; Dash i wsp., 2021; Yoo i wsp., 2019). W związku z tym pojawiło się zapotrzebowanie na wysokowydajne, dobrze wystandaryzowane i walidowane metody badań behawioralnych. Początkowo zachowanie

myszy było najczęściej oceniane przy użyciu testów, które zostały opracowane dla szczurów. W przeciwieństwie do szczurów, myszy charakteryzują się częściowo odmiennym wzorcem zachowań oraz większą trudnością w przyzwyczajaniu do eksperymentatora. Wprowadzanie myszy do komór badawczych, do których zostały uprzednio habituowane (oswajane), wciąż może wywoływać znaczny stres, który może maskować właściwe wyniki. Ponadto, długotrwała izolacja także jest potencjalnym stresorem wywołującym zmianę zachowania (Kiryk i wsp., 2020).

IntelliCage jest zautomatyzowaną, dużą klatką połączoną ze stacją monitorującą aktywność swobodnie poruszających się zwierząt, stworzoną na potrzeby analizy zachowania i optymalizacji testów dla mysich modeli zwierzęcych w środowisku możliwie jak najlepiej zbliżonym do naturalnych warunków jakie można uzyskać w laboratorium. Głównym konceptem klatki IntelliCage jest jednoczesna analiza grupy zwierząt (limit do 16 osobników) z wyeliminowaniem stresora zewnętrznego jakim jest obecność eksperymentatora, ekspozycja na nieznane komory testowe, izolacja społeczna, czy habituacja zwierząt przed testami oraz przenoszenie ich w klatkach przed i po eksperymencie (Kiryk i wsp., 2020). Ponadto przed konwencjonalnymi testami takimi jak labirynty o różnych kształtach takich jak T, Y, czy promienistym (ang. T-maze, Y-maze, radial maze), niezbędne jest przeprowadzenie głódówki zwierząt, aby zmotywować je do wykonywania zadań (Innis i Macgillivray, 1987; Jang i wsp., 2013). Natomiast, podczas wodnego labiryntu Morrisa, który został głównie opracowany dla szczurów, myszy są poddawane warunkom silnie stresogennym, poprzez umieszczenie je w zimnej wodzie i zmuszanie do pływania oraz odnalezienia ukrytej platformy (Harrison i wsp., 2009). Istnieją niepodważalne dowody na to, że silny stres pogarsza racjonalne myślenie i wydajność podczas uczenia się zależnego od aktywności hipokampa (Jung i wsp., 2017; Kim i wsp., 2015). Długoletnie obserwacje zachowań myszy dzikiego typu, a także zwierząt z defektami genetycznymi umożliwiło optymalizację i przygotowanie protokołów badawczych do analizy uczenia się preferencyjnego i dyskryminacyjnego, pamięci przestrzennej, czy warunkowania instrumentalnego (Jastrzebska i wsp., 2016; Knapska i wsp., 2013; Konopka i wsp., 2010). IntelliCage zostało wykorzystane do fenotypowania różnych modeli myszy, co zostało opisane w wielu pracach badawczych. Między innymi oprócz uczenia się i pamięci, przeprowadzono badania nad długoterminową aktywnością okołodobową, czy badania nad aspektami emocjonalnymi tj. reakcja na nowe środowisko, preferencja nowego obiektu, test reakcji na nowe zapachy, czy test reakcji na światło (Codita i wsp., 2010; Kobayashi i wsp., 2013; Too i wsp., 2016; Ujita i wsp., 2018). IntelliCage została również

wykorzystana do oszacowania uzależnień (np. od spożycia alkoholu), zaburzeń w mózgu (tj. ASD, schizofrenia, choroba Alzheimera), czy analizy aktywności i zachowań myszy pod wpływem różnych substancji farmakologicznych (Ajonijebu i wsp., 2018; Kiryk i wsp., 2011; Peltola i wsp., 2016; Puscian i wsp., 2014; Radwanska i Kaczmarek, 2012).

System IntelliCage składa się z standardowej szczurzej klatki, w której znajdują się cztery trójkątne komory zlokalizowane w rogach (Rycina 3). W każdym rogu znajdują się 2 butelki z wodą. Dostęp do butelek umożliwia zewnętrzny korytarz prowadzący do wewnętrznego pomieszczenia, w którym znajdują się 2 pary automatycznych drzwi. Otwarte drzwi umożliwiają dostęp do poidła, a zamknięte ograniczają. Do każdej komory prowadzi jedno wejście pozwalające tylko jednej myszy przebywać w rogu. Pokarm znajduje się w specjalnym karmniku, znajdującym się w górnej części klatki i dostęp do jedzenia jest nieorganiczny. Indywidualna analiza zachowań danego zwierzęcia, żyjącego w grupie, jest monitorowana przy użyciu mikroczipów wykorzystujących fale radiowe (RFID, ang. radio-frequency identification) wszczepionych podskórnie na grzbiecie. Każde zwierzę posiada swój unikalny numer, a w monitorowanie aktywności zaangażowane są 3 sensory wbudowane w klatkę. Unikalny numer myszy jest możliwy do odczytania za pomocą podręcznego skanującego czytnika (ręcznie) oraz sensorów zamontowanych w rogach klatki, które przesyłają dane do komputera w czasie rzeczywistym o zwierzętach aktualnie znajdujących się w rogu. Aktywności wykonywane w rogach mierzone są m.in. za pomocą sensora ciepła zliczającego liczbę wizyt i czas ich trwania od momentu wejścia do wyjścia. Pomiar czasu trwania picia oraz ilości liźnięć (z ang. licks) mierzona jest za pomocą lickometru. Natomiast liczbę dotknięć drzwi przy użyciu nosa (z ang. nosepoke) oraz czas trwania za pomocą sensora, którego obwód zamyka się w momencie wciśnięcia mysiego pyszczka w otwór. Dodatkowo w każdej klatce znajdują się diody LED o trzech dowolnych kolorach, które służą do przeprowadzenia testów warunkowania instrumentalnego bądź służą jako wskazówka podczas uczenia się (Kiryk i wsp., 2020).



Rycina 3. Budowa poszczególnych elementów automatycznej klatki IntelliCage

Klatka połączona jest z komputerem przez panel sterujący (A); Pojedynczy róg klatki ze ścianą oddzielającą wewnętrzną część od zewnętrznej oraz wejście do rogu odczytujące numer transpondera u każdej myszy (B); Mechanizm zamykania (po lewej) i otwierania drzwi (po prawej) znajdujący się w każdym rogu ograniczający dostęp do butelek z wodą (C); Lokalizacja sensorów: lickometr, czujnik temperatury, obwód zamykający dostęp do światła w wyniku przyłożenia mysiego pyszczka oraz diody świetlne wykorzystywane np. przy testach warunkowania instrumentalnego (D) (źródło: [Kiryk i wsp., 2020](#)).

1.2.3. Pamięć socjalna (rozpoznawanie osobników i interakcje społeczne)

Pamięć społeczna obejmuje zdolność do świadomego rozpoznawania i przywoływania informacji o konkretnych osobach lub interakcjach społecznych, co wpisuje się w cechy pamięci deklaratywnej. U gryzoni sygnały społeczne są odbierane głównie przez układ węchowy. Sygnały chemiczne o danym osobniku zbierane są z nabłonka węchowego (MOE, ang. main olfactory epithelium) i narządu womeronowego (VNO, ang. vomeronasal organ) i następnie przekazywane do ośrodków korowych ([Sanchez-Andrade i Kendrick, 2009](#)). Do tej pory wiadomo, że w tworzenie się pamięci socjalnej zaangażowane są podregiony

hipokampa grzbietowego CA2 (dCA2, z łac. dorsal CA2) (Tzakis i Holahan, 2019) oraz brzuszego CA1 (vCA1, z łac. ventral CA1) (Okuyama i wsp., 2016). Ponadto, nie są jednoznacznie scharakteryzowane obwody neuronalne (drogi), z których dociera bodziec pobudzający do podregionu dCA2. Istnieją przesłanki wskazujące na zaangażowanie LEC (warstwa II), który wysyła bezpośrednie projekcje pobudzające do podregionu dCA2 (Lopez-Rojas i wsp., 2022; Tzakis i Holahan, 2019). Z kolei istnieje także prawdopodobieństwo pośredniego pobudzenia dCA2 poprzez aktywację neuronów obwodu vCA3-dCA2. Wykazano, że wyciszenie aktywności neuronów w podregionie vCA3 jak i utrata receptorów NMDA w tym samym podregionie zaburza kodowanie pamięci socjalnej zaangażowanej w rozpoznawanie danych osobników, natomiast nie uczestniczy w przywoływaniu tej informacji socjalnej (z ang. social recall) podczas rozpoznawania nowości społecznej (z ang. social novelty) i identyfikacji poznanych osobników (z ang. social discrimination) (Chiang i wsp., 2018). W badaniach na aspektem interakcji społecznych, dużą uwagę poświęcono receptorom wazopresynowym (AVPR) oraz oksytocynowym (OXTR) zlokalizowanych w podregionie dCA2 hipokampa, do których projekcje docierają między innymi z jądra przykomorowego podwzgórza (PVN, z ang. PVN = paraventricular nucleus) (Oliva, 2022; Tsai i wsp., 2022). Wykazano, że całkowite selektywne usunięcie receptorów AVPR in vivo, upośledza pamięć rozpoznawania społecznego (rozdzielania pomiędzy znanym a nowym osobnikiem) i motywacji do interakcji społecznych (Stevenson i Caldwell, 2011). Udowodniono, także, że optogenetyczna aktywacja neuronów z ekspresją AVPR1b - projekcji docierających do dCA2 z PVN, a także domózgowe podanie wazopresyny (AVP) pobudza nabywanie/tworzenie/wzmocnienie pamięci socjalnej (Cymerblit-Sabba i wsp., 2023; Dantzer i wsp., 1988; Oliva, 2022). Natomiast, eksperyment, w którym zastosowano farmakologiczną inhibicję podtypu receptora AVPR1b w hipokampie, również wskazał istotne upośledzenie pamięci socjalnej, jak i przestrzennej (Smith i wsp., 2016). Istnieje także wiele badań wskazujących, że dCA2 zaangażowany jest w rozpoznawanie społeczne w wyniku kodowania i konsolidacji informacji socjalnej, a także skojarzenia i odtworzenia tej zakodowanej informacji, w momencie powtórnego napotkania osobnika. Pobudzone neurony z dCA2 przesyłają sygnał dalej do podregionu brzuszego vCA1, który prawdopodobnie zaangażowany jest w przechowywanie wspomnień społecznych, czy tworzeniu engramu pamięci społecznej (Meira i wsp., 2018). Dowody na obecność „engramu” pamięci społecznej w części brzusznej CA1 pochodzą z badań optogenetycznych na gryzoniach. Optogenetyczna inhibicja neuronów piramidowych vCA1 oraz dCA1 wskazała, że tylko inaktywowane neurony z pola vCA1 upośledzały pamięć podczas testów socjalnych (Okuyama i wsp., 2016).

Zaburzenie rozpoznawania osobników, zarówno podczas kodowania tej informacji (zapamiętywanie konkretnego osobnika) jak i podczas procesów przypominania (rozdzielanie indywidualnego osobnika). Następnie projekcje z vCA1 wysyłają bezpośrednią informację zwrotną z hipokampa do powłoki NAc jądra półleżącego (Nac, z łaciny nucleus acumbens), który jest zaangażowany w obwód nagrody i wspiera integrację wspomnień społecznych z zachowaniami motywacyjnymi, ułatwiając stymulację odpowiednich zachowań pomiędzy zwierzętami w oparciu o kontekst społeczny (Okuyama i wsp., 2016). Ponadto, odkryto, że także połączenia dCa2 z innymi strukturami tj. jądro nadsuteczkowe (SuM) zlokalizowane w tylnym podwzgórzu, jest aktywowane podczas procesów rozpoznawania nowości społecznej (Chen i wsp., 2020). Dodatkowe struktury zaangażowane w tworzenie pamięci społecznej i rozpoznawania osobników to ciało migdałowate (integracja treści emocjonalnych z pamięcią społeczną), przyśrodkowa kora przedczołowa (podejmowanie decyzji na podstawie wspomnień i kontekstu społecznego) oraz podwzgórzowy układ oksytocynowy (promowanie plastyczności synaptycznej w odpowiedzi na bodźce społeczne w wyniku uwalniania oksytocyny) (Shivakumar i wsp., 2024; Tzakis i Holahan, 2019). Mechanizmy molekularne, w tym geny odgrywające kluczową rolę w kształtowaniu pamięci, takie jak *PTEN*, są istotnym elementem w zrozumieniu procesów neuronalnych regulujących pamięć społeczną a także poznawczą.

1.3. ZNACZENIE I OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA *PTEN*

Odpowiednie funkcjonowanie neuronów tworzących sieć neuronalną, kodującą procesy pamięciowe opisane w poprzednich rozdziałach jest elementem krytycznym z punktu widzenia przeżycia organizmu i adaptacji do zmieniających się warunków. Aby utrzymać ich odpowiednią pobudliwość i umożliwić kształtowanie połączeń synaptycznych między nimi, uruchamiane są właściwe zestawy genów. Wyniki wieloletnich badań wskazują, że ekspresja genów, takich jak kodujących czynniki transkrypcyjne np. c-fos czy białka szlaków sygnałowych są niezbędne, aby utrzymać aktywność i responsywność neuronu podczas kodowania engramu pamięciowego. Jednym z takich genów jest gen *PTEN* kodujący podstawowy element regulatorowy kluczowej ścieżki sygnałowej wielu komórek.

PTEN (z ang. phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) jest kluczowym białkiem regulującym szlak sygnalizacyjny PI3K-AKT-mTOR. Szlak ten pełni fundamentalną rolę w wielu procesach komórkowych, takich jak wzrost, różnicowanie, przeżycie, metabolizm oraz synteza białek (Brandmaier i wsp., 2017). W układzie nerwowym, szlak PI3K-AKT-mTOR reguluje rozwój neuronów, funkcje synaptyczne oraz plastyczność neuronalna. Funkcja białka *PTEN* polega na negatywnej regulacji szlaku PI3K-AKT-mTOR. Białko *PTEN* odgrywa

kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy komórkowej i zapobieganiu niekontrolowanemu wzrostowi komórek.

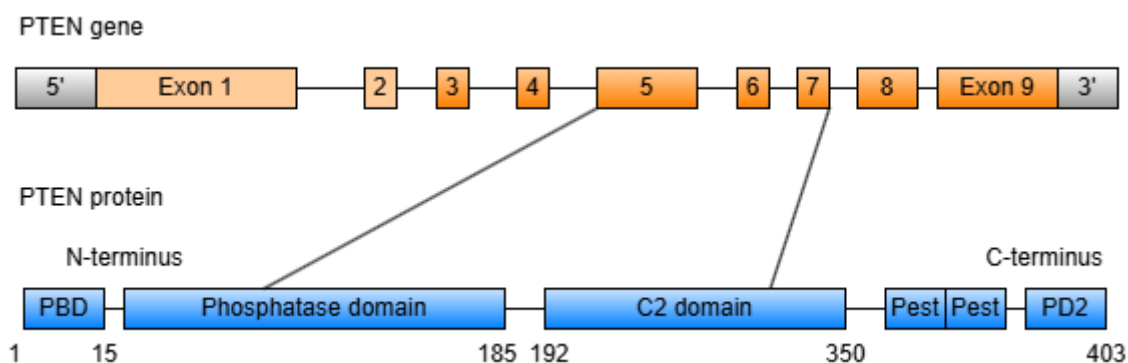
W rozwijającym się mózgu PTEN jest wysoce ekspresjonowany w neuronach, a jego rola w embriogenezie mózgu jest dobrze udokumentowana i obejmuje:

- Regulację proliferacji progenitorów neuronalnych,
- Kontrolę migracji neuronów, szczególnie w korze mózgowej,
- Ustalanie polarności i wzrostu aksonów oraz dendrytów,
- Stabilizację cytoszkieletu.

Badania na modelach zwierzęcych, w tym na myszach z delecją *Pten* w rozwijającym się mózgu, wykazały, że brak ekspresji tego białka prowadzi do nieprawidłowej organizacji kory mózgowej i połączeń synaptycznych oraz nadmiernego wzrostu neuronów. Są to zmiany związane z nadmierną aktywacją szlaku PI3K-AKT-mTOR powodującą niekontrolowaną syntezę białek i wzrost komórek.

1.3.1. Budowa i lokalizacja PTEN

Gen *PTEN* zlokalizowany jest w genomie myszy (*Mus Musculus*) na chromosomie 19, a w genomie człowieka (*Homo Sapiens*) na chromosomie 10. *PTEN* jest wysoce konserwatywnym genem z dwiema opisanymi izoformami α i β (Taylor i Abdel-Wahab, 2019). Gen *PTEN* zawiera 9 eksonów, a jego główny (kanoniczny) transkrypt koduje peptyd o masie około 50 kDa, składający się z 403 reszt aminokwasowych. Gen *PTEN* koduje dwie funkcjonalne domeny: pierwsza to zlokalizowana na końcu N (aminowym) w eksonie 5 domena katalityczna o aktywności fosfatazy oraz druga to domena zlokalizowana na końcu C (karboksylowym) w eksonie 7 (zwana C2) o powinowactwie do błony fosfolipidowej (Rycina 4). Dodatkowo gen *PTEN* zawiera 4 domeny strukturalne, to jest PEST, PDZ i PBD, z których trzy zlokalizowane są na końcu karboksylowym. Dwie domeny PEST regulują stabilność białka, a domena PDZ wiąże się z białkami (np. PSD-95) i odgrywa kluczową rolę podczas transdukcji sygnału komórkowego. Zlokalizowana na końcu aminowym domena PBD ma właściwości wiążące fosfatydyloinozytol-4,5-bifosforanu (PIP2) (Hopkins i wsp., 2014; Waite i Eng, 2002).

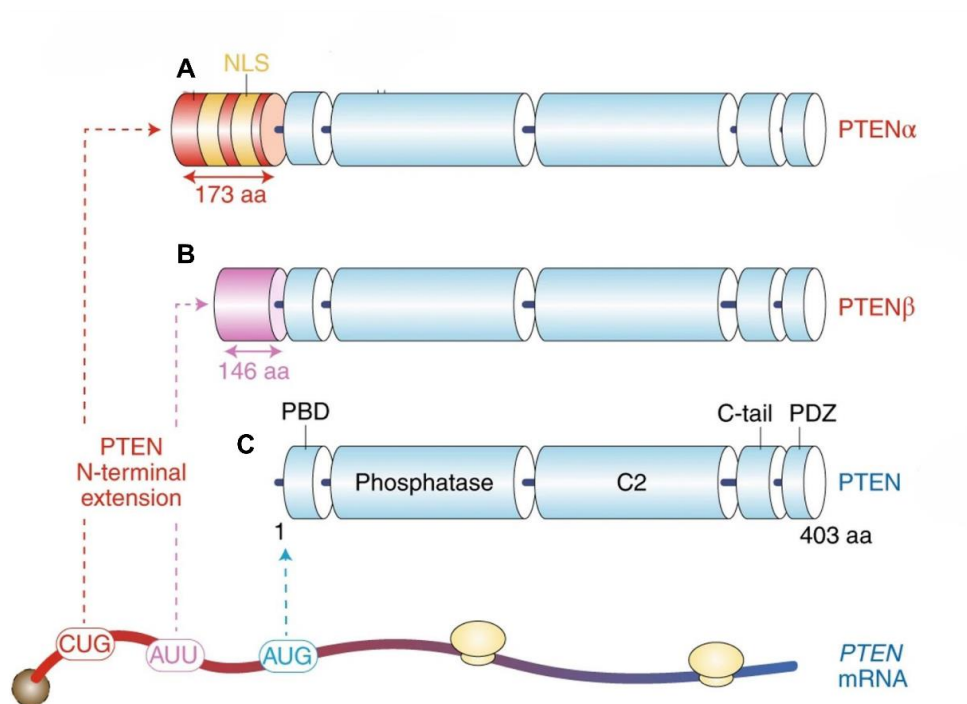


Rycina 4. Schemat struktury kanonicznego genu *PTEN* (górny panel) oraz struktury białka (dolny panel)

C2=domena C2; PBD=domena wiążąca fosfatydyloinozytol; PDZ=domena PDZ (ang. PSD95, Dlg1, ZO-1 domain); PEST=domena bogata w prolinę (P) glutaminę(E), serynę(S) i treoninę (T)

W warunkach fizjologicznych białko PTEN znajduje się w jądrze komórkowym i otocze a także w cytoplazmie. W strukturze białka występują motywy NLS (z ang. nuclear signal localisation) zwane sygnałem lokalizacji jądrowej oraz jądrowy sygnał eksportu NES (z ang. nuclear export signal). W cytoplazmie, po syntezy białka PTEN, motywy NLS rozpoznawane są przez specyficzne białka transportujące PTEN do jądra komórkowego, z kolei motywy NES związane są z procesem eksportu w przeciwną stronę, z jądra do cytoplazmy (Ho i wsp., 2020).

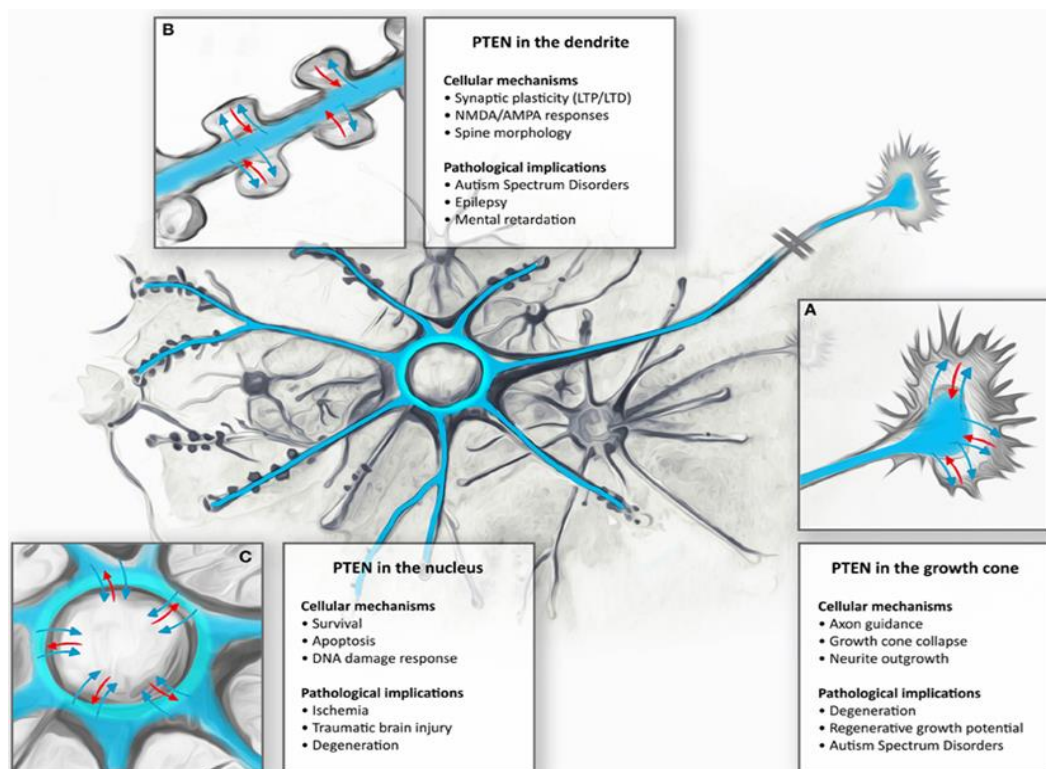
W przypadku izoformy alfa i beta translacja rozpoczyna się od alternatywnych kodonów inicjacji procesu zlokalizowanych w regionie nieulegającym translacji 5'UTR (Rycina 5). Powstałe peptydy są dłuższe o dodatkowe 146 i 173 reszty aminokwasowe odpowiednio dla białka PTEN alfa i beta. Istnieją przesłanki, że alternatywne izoformy białka PTEN mogą pełnić rolę onkogenu, ale jego dokładna funkcja nie została jeszcze poznana (Taylor i Abdel-Wahab, 2019).



Rycina 5. Izoformy białka PTEN

Różnice pomiędzy izoformami białka PTEN α (A) oraz PTEN β (B) a formą kanoniczną białka PTEN (C) wynikającą z odrębnych kodonów inicjacji translacji. Aa-reszty aminokwasowe (ang. amino acid), kodony (AUG=metionina, AUU=izoleucyna, CUG=leucyna), NLS-sygnal lokalizacji jądrowej (ang. nuclear signal localisation), PDB-domena wiążąca PIP2, PDZ-domena o funkcji wiążącej się z białkami (źródło: [Taylor i Abdel-Wahab, 2019](#))

W warunkach fizjologicznych PTEN jest dynamicznym białkiem o silnych interakcjach wewnątrzcząsteczkowych i zmianach konformacyjnych, które wynikają z modyfikacji potranslacyjnych ([Bassi i wsp., 2013](#); [Song i wsp., 2012](#)). Zmiany konformacyjne zachodzą także podczas interakcji z substratami. W neuronach, białko PTEN zlokalizowane jest w jądrze komórkowym oraz w cytoplazmie kolców dendrytycznych i zakończeniach aksonu ([Rycina 6](#)). Podczas neurogenезy prenatalnej funkcja PTEN w jądrze związana jest z różnicowaniem i przeżywalnością rozwijających się neuronów ([Bassi i wsp., 2013](#); [Kreis i wsp., 2014](#); [Lachyankar i wsp., 2000](#)). Pokazano, że w dojrzałych neuronach PTEN zaangażowany jest w procesy neuroplastyczne ([Kreis i wsp., 2014](#)). Jego stężenie wzrasta w jądrze w czasie urazowego uszkodzenia mózgu i podczas cytotoksyczności aktywowanej przez receptory NMDA ([Goh i wsp., 2014](#); [Lai i wsp., 2014](#)). PTEN ma więc zasadnicze znaczenie dla rozwoju ośrodkowego układu nerwowego (OUN), a w tym samym neuronów hipokampalnych podczas neurogenезy embrionalnej jak i postnatalnej ([Amiri i wsp., 2012](#); [Kwon i wsp., 2006](#); [Perandones i wsp., 2004](#)).

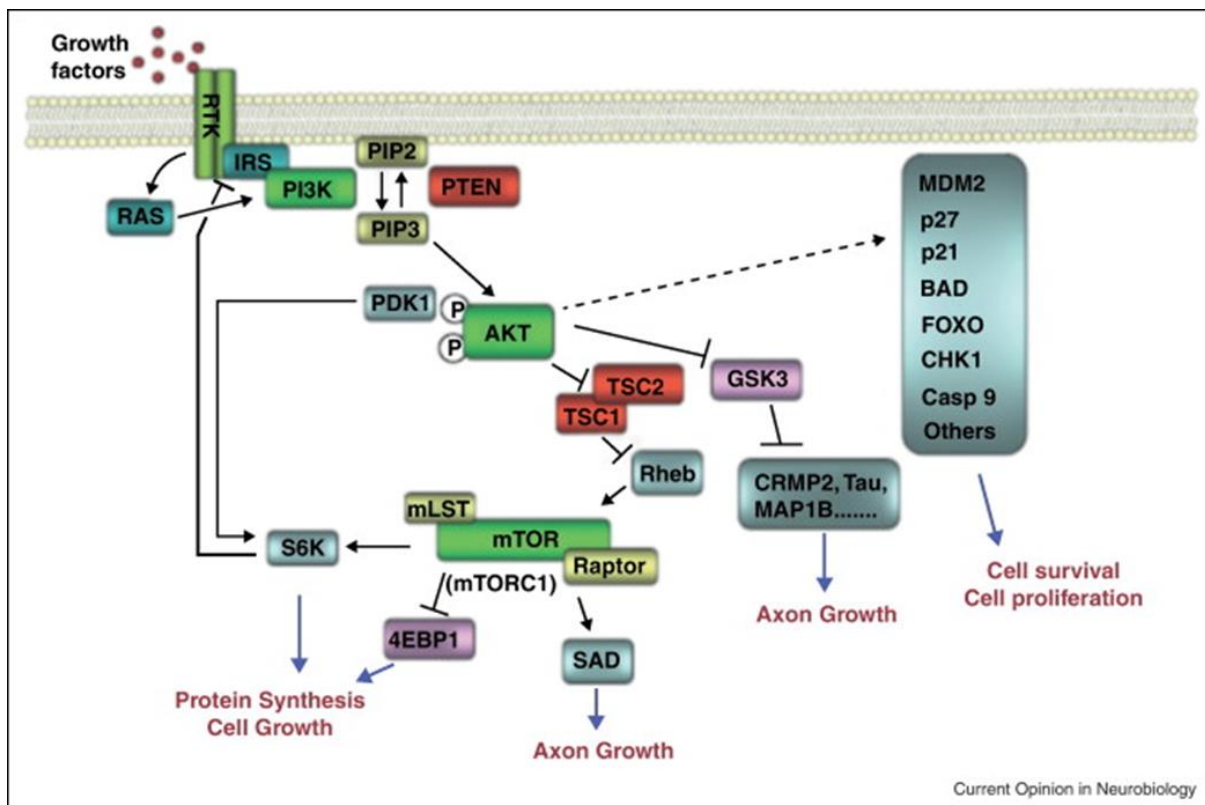


Rycina 6. Lokalizacja i rola PTEN w neuronach

Fizjologiczne i patologiczne mechanizmy komórkowe zależne od ekspresji PTEN w stożku wzrostu (A), w dendrytach i kolcach dendrytycznych (B), w jądrze komórkowym neuronu (C) (źródło: [Kreis i wsp., 2012](#)).

1.3.2. Wewnątrzkomórkowa kaskada sygnałowa Pten/PI3K-AKT-mTOR

Białko PTEN (forma kanoniczna) jest fosfatazą o dwojakiej aktywności: wchodzi w interakcję zarówno z białkowymi substratami poprzez defosforylację reszt tyrozynowych i serynowych, jak i z substratami fosfolipidowymi poprzez defosforylację reszty fosforanowej (Tu i wsp., 2020). Głównym celem fosfatazy PTEN jest przekaźnik drugorzędowy – fosfatydyloinozytol-3,4,5-trifosforanu (PIP₃), który pośredniczy w aktywacji ścieżki sygnalizacyjnej PI3K-AKT-mTOR (Rycina 7).



Rycina 7. Szlak sygnałowy PI3K-AKT-mTOR

PTEN jest negatywnym regulatorem szlaku PI3K/AKT poprzez defosforylację PIP₃. Inaktywacja *PTEN* prowadzi do nadmiernej aktywacji AKT, co wpływa na wiele procesów komórkowych w neuronach, w tym na wzrost komórek, ich przeżycie i migrację (źródło: Zhou J. i Parada L., 2012).

PTEN hamuje działanie szlaku PI3K-AKT-mTOR poprzez defosforylację substratu PIP₃ i powstanie PIP₂ (4,5-bisfosforan fosfatydyloinozytolu) w cytoplazmie. PTEN jest antagonistą dla działania kinazy lipidowej - 3-fosfatydyloinozytolu (ang. PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase), której aktywna forma fosforyluje pierścień inozytolowy fosfatydyloinozytolu w pozycji 3-hydroksylowej substratu PIP₂ wchodzącego w skład błony komórkowej (Stambolic i wsp., 1998; Stocker i wsp., 2002). W wyniku tej reakcji powstaje produkt PIP₃, który rekrutuje do błony szeroką grupę innych białek sygnałowych (Rycina 7). Zwiększenie ilości PIP₃ w komórce wynikające z aktywności PI3K, prowadzi do aktywacji białek sygnałowych zawierających domenę PH, odpowiedzialną za wiązanie PIP₃ do błony. Jednym z głównych efektorów PI3K jest kinaza AKT inaczej zwana kinazą białkową B (z ang. PKB, protein kinase B). Aktywacja kinazy AKT następuje w wyniku jej rekrutacji do błony cytoplazmatycznej i fosforylacji treoniny w pozycji 308 przez kinazę 1 zależną od fosfatydyloinozytolu (PKD1) oraz fosforylacji seryny w pozycji 473 przez kompleks mTORC2 (Manning i Toker, 2017; Sarbassov i wsp., 2005). Następnie aktywowana kinaza AKT fosforyluje szereg innych białek, zaangażowanych w kontekście komórek nerwowych w procesy takie jak wzrost neuronów,

proliferacja, przeżywalność, a także plastyczność synaptyczna będąca molekularnym podłożem uczenia się (Graber i wsp., 2013; Saxton i Sabatini, 2017). Jednym z docelowych substratów jest kinaza serynowo-treoninowa mTOR (z ang. mammalian target of rapamycin kinase). mTOR jest białkiem konserwowanym ewolucyjnie we wszystkich typach komórek ssaków, ale zajmuje unikalną niszę w neuronach (Saxton i Sabatini, 2017). Kinaza mTOR działa w dwóch kompleksach białkowych, charakteryzujących się inną wrażliwością na obecność rapamycyny i jej pochodnych: mTORC1 oraz mTORC2 (Hay i Sonenberg, 2004; Wullschleger i wsp., 2006). Biochemicznie, mTORC1 i mTORC2 różnią się składem białkowym. Wspólnymi elementami kompleksu są Deptor i mLST8, natomiast Raptor i PRAS40 są białkami unikatowymi dla mTORC1, podczas gdy Rictor, Protor i Sin1 wchodzi w skład mTORC2. Funkcja kompleksu mTORC1 jest znacznie lepiej poznana niż mTORC2. Kompleks mTORC1 reguluje wzrost i proliferację neuronów poprzez fosforylację dwóch substratów: S6 (S6Ks) oraz 4E-BPs (Hoeffler i Klann, 2010). Po aktywacji, mTORC1 wysyła sygnały hamujące szlak poprzez pętlę ujemnego sprzężenia zwrotnego, w wyniku fosforylacji białka IRS-1 przez S6K1 (Rycina 7) (Shah i Hunter, 2006). Zarówno mTORC1 jak i mTORC2 są aktywowane podczas formowania synaps oraz modulują plastyczność synaptyczną poprzez regulację odpowiedzi neuronów postsynaptycznych i presynaptycznych na uwalnianie do przestrzeni synaptycznej typu neuroprzekaźników (Henry i wsp., 2012; Li i wsp., 2010; McCabe i wsp., 2020; Seo i wsp., 2020; Sun i wsp., 2016; Weston i wsp., 2014). Badania wskazują, że mTORC1 jest bezpośrednio zaangażowany w syntezę białek, które są niezbędne do formowania się połączeń synaptycznych i ich stabilizacji, szczególnie podczas procesu długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (z ang. LTP = long-term potentiation) (Fingar i wsp., 2004; Magri i wsp., 2013). Kompleks białkowy mTORC2 jest zaangażowany w regulację cytoszkieletu aktynowego (polimeryzacja aktyny i stabilizacja), który ma zasadnicze znaczenie dla utrzymania struktury i plastyczności kolców dendrytycznych niezbędnej zarówno podczas LTP jak i długotrwałego osłabienia synaptycznego (z ang. LTD = long-term depression) (Huang I wsp., 2013; Lasarge i Danzer, 2014). Rola poszczególnych kompleksów mTOR w transmisji glutaminergicznej podczas uczenia się jest wciąż obiektem badań ośrodków na całym świecie. W oparciu o badania na hodowlach mysich neuronów hipokampalnych, wysunięto hipotezę, że kompleks mTORC1 moduluje transmisję synaptyczną w zakończeniach postsynaptycznych, a mTORC2 kontroluje uwalnianie pęcherzyków z neurotransmiterem w zakończeniach neuronów glutaminergicznych poprzez sygnały wsteczne (ang. retrograde signals) modulujące aktywność neuronu presynaptycznego (McCabe i wsp., 2020). Kompleksy mTORC1/mTORC2 mają przeciwstawny efekt na uwolnienie indukowane lub spontaniczne fuzje pęcherzyków

synaptycznych z błoną komórkową. Aktywny mTORC2 zwiększa uwolnienie do przestrzeni synaptycznej, a aktywowany mTORC1 redukuje ilość uwalnianych pęcherzyków. mTOR regulacja wielkości komórki, wielkości dendrytów prawdopodobnie przez oba kompleksy (Urbanska i wsp., 2012). Podsumowując, fosfataza PTEN pełni funkcję strażnika utrzymującego homeostazę komórkową poprzez hamowanie szlaku PI3K-AKT-mTOR.

1.3.3. Rola *PTEN* w rozwoju i funkcjonowaniu mózgu

W wyniku mutacji w genie *PTEN* następuje rozregulowanie szlaku PI3K-AKT, a także pozostałych szlaków kontrolowanych przez kinazę AKT prowadząc do zmian na poziomie molekularnym. Zmiany molekularne wpływają także na zmiany strukturalne w rozwijających się i dojrzałych neuronach, co prowadzi do zaburzeń funkcjonalnych (Guo i wsp., 2024; Rashid i wsp., 2018; Singh i Singh, 2020).

1.3.3.1. Neurogeneza pre- i postnatalna

Badania na gryzoniach wykazały, że *Pten* odgrywa kluczową rolę zarówno w neurogeniezie prenatalnej (embrionalnej) jak i postnatalnej. Delecja genu *Pten* na obu allelach prowadzi do śmierci myszy w dniu E7. Heterozygotyczne myszy pod względem mutacji w genie *Pten*, wykazują zmienioną morfologię tkanki mózgowej, w tym przerost kory mózgowej oraz hipokampa, wynikające ze wzmożonej proliferacji komórek progenitorowych oraz niekontrolowanej proliferacji i przekształcania komórek somatycznych w nowotworowe (Clipperton-Allen i Page, 2014; Page i wsp., 2009). W rozwoju embrionalnym szczyt neurogenezy mysiej w hipokampie myszy przypada na okres między 14 dniem okresu embrionalnego (E14) a dniem 7 okresu postnatalnego (P7), w czasie, w którym rozpoczyna się kształtowanie mózgu i różnicowanie komórek macierzystych (NSC, ang. neural stem cells) w linię neuronalną. Obniżona aktywność jądrowego *Pten*, prawdopodobnie do dnia P0, jest kluczowa do proliferacji NSC, natomiast wzmożona ekspresja *Pten* została skorelowana z etapem dojrzewania młodych neuronów. Następnie *Pten* uczestniczy w prawidłowej laminacji struktur korowych i hipokampa, a także kieruje migracją neuroblastów i niedojrzałych neuronów (Kang i wsp., 2020; Lachyankar i wsp., 2000; Li i wsp., 2024). Migracja neuronów piramidowych i interneuronów zaczyna się około E12 i kończy w dniu E18, natomiast jako ostatnie, dniu E16 zaczynają przemieszczać się progenitorowe komórki ziarniste do DG i ostatecznie docierają około dnia 14 po urodzeniu osesków (dzień postnatalny, P14) (Bond i wsp., 2022; Bond i wsp., 2020; Kitazawa i wsp., 2014). Natomiast, około 28 dnia postnatalnego komórki są morfologicznie i funkcjonalnie dojrzałe (Cossart i Khazipov, 2022). Neurony piramidowe wywodzą się ze strefy komorowej (ang. VZ, = ventricular zone)

rozwijającego się mózgu, położonej w pobliżu komórek bocznych i wędrują szlakiem migracyjnym promieniście wzdłuż włókien glejowych, które działają jako rusztowanie prowadząc je do podregionów hipokampa, gdzie integrują się w sieci neuronalne. Natomiast prekursorzy komórek granulanych wędrują poprzez fimbrię do DG, a interneurony GABA-ergiczne charakteryzują się jeszcze inną drogą migracji (Galceran i wsp., 2000; Xu i wsp., 2015). Tworzą się w przyśrodkowej wyniosłości przodomózgowia i migrują stycznie przez rozwijającą się korę i następnie docierając do hipokampa integrują się z lokalnymi obwodami (Pleasure i wsp., 2000). Wykazano, że po osiedleniu się neuronów w formacji hipokampa, *Pten* moduluje dynamikę cytoszkieletu, zapewniając kontrolowany rozrost dendrytów i ukierunkowanie aksonów. Neurony pozbawione ekspresji *Pten* wykazują nadmierne rozgałęzienie dendrytów oraz błędnie skierowane aksony co prowadzi do upośledzenia łączności tkanki mózgowej (Kath i wsp., 2018; Kreis i wsp., 2014). Opisane właściwości zaobserwowano u większości mysich modeli z konstytutywnym usunięciem *Pten* na wczesnych etapach neurogenezy bądź w okresie postnatalnym, gdy nie jest jeszcze zakończony proces synaptogenezy umożliwiający tworzenie funkcjonalnych połączeń w sieci korowo-hipokampalnej. Ponadto, w tych samych modelach mysich zaobserwowano podobny fenotyp neuronów, charakteryzujący się hipertrofią, zwiększoną grubością aksonów z przerośniętymi drzewami dendrytycznymi oraz makrocefalie. Zwierzęta wykazywały epizody epileptyczne, ataksje, upośledzone funkcje kognitywne oraz zachowania zbliżone do spektrum zaburzeń autystycznych u ludzi (Backman i wsp., 2001; Kwon i wsp., 2006; Kwon i wsp., 2003; Luan i wsp., 2023; Lugo i wsp., 2014).

Podczas neurogenezy w dojrzałym mózgu, *Pten* utrzymuje prawidłową proliferację komórek ziarnistych w strefie podkomorowej (ang. SVZ = subventricular zone), wpływając także na powstawanie interneuronów migrujących do opuszki węchowej (Zhu i wsp., 2012). W hipokampie *PTEN* kontroluje neurogenezę w strefie podziarnistej (z ang. SGZ = subgranular zone) zakrętu zębatego zapewniając integrację nowo powstałych komórek ziarnistych z obwodami hipokampa (Latchney i wsp. 2023). Usunięcie *Pten* z komórek macierzystych lub progenitorowych w SVZ lub SGZ prowadzi do opóźnionego dojrzewania komórek w niszach, hipertrofii neuronów w warstwie SGZ, czy ektopowego rozmieszczenia włókien mszystych, co może prowadzić do zaburzeń funkcjonalności sieci trójsynaptycznej (Amiri i wsp., 2012; LaSarge i wsp., 2015).

1.3.3.2. Wpływ *PTEN* na funkcjonalność neuronów (plastyczność synaptyczna)

W ośrodkowym układzie nerwowym aktywność przeciwdziałająca PTEN/PI3K odgrywa kluczową rolę w modulowaniu siły pobudzenia i plastyczności synaptycznej (Barrows i wsp., 2017). Plastyczność synaptyczna to zdolność mózgu do modyfikowania siły synaptycznej i efektywności połączeń synaptycznych między neuronami w odpowiedzi na zmieniające się środowisko. Kluczowymi mechanizmami molekularnymi leżącymi u podstaw uczenia się i tworzenia pamięci jest długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (LTP) oraz długotrwałe osłabienie synaptyczne (LTD) (Stacho i Manahan-Vaughan, 2022). U ludzi i w modelach zwierzęcych mutacje *PTEN* na wczesnym etapie są silnie związane z modyfikacjami w morfologii neuronów, których konsekwencją są zmiany funkcjonalne mające swoje odzwierciedlenie w zachowaniu i funkcjach kognitywnych. Jednakże nie istnieją jednoznaczne i dobrze opisane dowody na to, że *PTEN* jest zaangażowany w specyficzne formy plastyczności synaptycznej w dorosłym mózgu (Knafo i wsp., 2016). Przeciwnie aktywność PTEN/PI3K prawdopodobnie odgrywa istotną rolę jako mediator mechanizmów plastyczności synaptycznej. Podczas farmakologicznego blokowania *PTEN* na skrawkach hipokampalnych, wykazano zaburzenia LTD zależnego od aktywności receptorów NMDA, podczas gdy podstawowa transmisja synaptyczna, LTP i LTD zależne od receptorów mGluR były na fizjologicznym poziomie (Jurado i wsp., 2010). Prawdopodobnie do wywołania LTD niezbędna jest interakcja białka *PTEN* (domeny PDZ znajdującej się na zakończeniu karboksylowym) z białkiem PDS-95 o zdolnościach do organizacji i grupowania kompleksów w obszarze gęstości synaptycznej, zlokalizowanej w postsynaptycznych zakończeniach neuronów pobudzających. PDS-95 reguluje proces przemieszczania się (cyrkulacji) receptorów kwasu alfa-amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowego (AMPA) pomiędzy cytoplazmą a błoną komórkową. W kontekście dokładnej funkcji *Pten*, mechanizm działania na LTD nie jest do końca poznany. Do tej pory ustalono, że aktywacja receptorów NMDA umożliwia rekrutację kompleksu *PTEN*-PDS-95 do membrany postsynaptycznej, a następnie defosforylacja substratu PIP3 aktywuje bądź pośredniczy w zainicjowaniu internalizacji receptorów AMPA z błony postsynaptycznej co prowadzi do osłabienia transmisji synaptycznej (Knafo i Esteban, 2017). Zmiany synaptyczne oraz pobudliwość neuronów zaobserwowana w modelach myszy z delecją *Pten* różniły się i zależały od czynników takich jak obszar, w którym doszło do mutacji, populacja neuronów oraz wiek zwierząt. W modelu z indukowaną mutacją *Pten* na niewielkim obszarze (w DG) przy użyciu wektorów wirusowych, zaobserwowano zwiększoną gęstość synaptyczną, powiększone synapsy pobudzające oraz zwiększoną aktywność receptorów AMPA, które są kluczowe dla plastyczności

synaptycznej. Niestety nie przeprowadzono analizy behawioralnej w kontekście uczenia się i formowania pamięci (Williams i wsp., 2015). Ponadto, badania in vitro także z indukowaną delecją *Pten* ograniczoną do danej populacji neuronów, wykazują zwiększone prądy pobudzające i częstotliwość pobudzenia (miniaturowych i spontanicznych EPSC) (Luikart i wsp., 2011). Z kolei w modelach z warunkowym usunięciem *Pten* w linii CaMKII α -Cre, usunięcie *Pten* nie wpływa na architekturę neuronów hipokampa lub synaps. Parametry szerokości, długości, gęstości i grubości dendrytów oraz aksonów pozostawały w normie. Jednakże zauważono obniżoną wydajność w zadaniach wymagających wykorzystania pamięci przestrzennej i w testach rozpoznawania obiektów. Ponadto, zaobserwowano zmniejszoną plastyczność synaptyczną (LTP i LTD) oraz upośledzone pamięci w paradygmatach warunkowania strachu na kontekst oraz wskazówkę (Sperow i wsp., 2012; Wang i wsp., 2017). W warunkowych modelach z delecją genu *Pten* typu 'knock out' w różnicujących się neuronach (GFAP-Cre), zaobserwowano występowanie napadów padaczkowych, postępującej makrocefalii oraz skróconej długości życia (Backman i wsp., 2001; Kwon i wsp., 2003; Kwon i wsp., 2001). Ponadto, myszy wykazywały zachowanie hiperaktywne i upośledzone funkcje poznawcze spowodowane deficytami strukturalnymi i funkcjonalnymi (Hodges i wsp., 2018; Lugo i wsp., 2014).

1.3.3.3. Mutacje *PTEN* a zaburzenia neurologiczne i neurorozwojowe

Mutacje w genie *PTEN* są powiązane z wieloma jednostkami chorobowymi u człowieka, takimi jak różne warianty nowotworów, czy zespoły guzów hamartomatycznych (z ang. PHTS = PTEN-hartoma tumor syndrome) powstającymi w wyniku dziedzicznej dominującej mutacji genu *PTEN* (Steck i wsp., 1997). Zidentyfikowano także mutacje w genie *PTEN* we frakcji pacjentów z zaburzeniami neurorozwojowymi/ neurologicznymi takimi jak opóźnienie umysłowe, epilepsja czy ASD z współwystępowaniem makrocefalii (Bubien i wsp., 2013; Butler i wsp., 2005; Buxbaum i wsp., 2007; Yonan i wsp., 2024). Dodatkowo eksperymenty na transgenicznym modelach zwierzęcych z delecją *Pten* wykazały, że różnorodność funkcjonalna mutacji i podłoże genetyczne mają znaczący wpływ na spektrum odmiennych fenotypów (Kwon i wsp., 2006; Wang i wsp., 2010; Takeuchi i wsp., 2013; Erdmann i wsp., 2007). Badania nad mutacjami genu *PTEN* na wczesnym etapie rozwoju mózgu i ich wpływem na zaburzenia neurologiczne i neurorozwojowe podkreślają znaczenie wykorzystania zaawansowanych metod inżynierii genetycznej w celu dokładnego zrozumienia funkcji tego genu oraz mechanizmów leżących u podstaw zaburzeń poznawczych i behawioralnych,

szczególnie w kontekście mutacji *PTEN* i wpływu na funkcjonalność dojrzałych neuronów w hipokampie.

1.4. METODY INŻYNIERII GENETYCZNEJ W BADANIACH FUNKCJI GENÓW

1.4.1. Modele zwierzęce w badaniach neurobiologicznych

Modyfikacja genów jest procesem, w którym sekwencja DNA poddawana jest zmodyfikowaniu bądź usunięciu w celu uzyskania pożądanego efektu i poszerzenia wiedzy na temat roli poszczególnego genu. Modele zwierzęce umożliwiają zrozumienie funkcji badanych genów m.in. sposobu w jaki regulują mechanizmy sygnalizacji komórkowej w OUN, zarówno w fizjologicznych jak i patologicznych warunkach, w stanach takich jak zaburzenia w uczeniu się, choroby neurodegeneracyjne, neurorozwojowe, czy psychiczne. Modele zwierzęce umożliwiają pogłębianie wiedzy na temat mechanizmów tworzenia się pamięci na różnych poziomach, od ekspresji genów (na poziomie komórkowym) do obserwacji zachowania zwierząt w wyniku przeprowadzonych modyfikacji genetycznych (na poziomie fizjologicznym i behawioralnym). W ciągu ostatnich dziesięcioleci wygenerowano ogromną liczbę genetycznie zmodyfikowanych zwierząt, głównie wykorzystano do tego celu gryzonie. Mysz domowa (*Mus musculus*) jest szeroko wykorzystywana w badaniach neurobiologicznych ze względu na swoje genetyczne podobieństwo do ludzi – około 90% genów ma swoje odpowiedniki u człowieka (Breschi i wsp., 2017). To podobieństwo genetyczne umożliwia tworzenie modeli transgenicznych do badania ludzkich chorób neurologicznych. Dodatkowo, ich niewielki rozmiar, szybki cykl rozrodczy oraz dobrze zmapowany genom czynią je efektywnymi kosztowo i praktycznymi obiektami badawczymi. W zależności od wybranej metodologii, najczęściej przeprowadzonymi modyfikacjami w genomie myszy domowej jest utrata funkcji danego genu (ang. loss of function) lub wzmocniona aktywność genu docelowego (ang. gain of function). Modyfikacja genów umożliwia oszacowanie zależności aktywności/inaktywacji danego gen na przekładające się zachowanie się zwierząt takie jak aktywność, lęk, agresja, komunikacja socjalna, czy uczenie się i pamięć. W ciągu kilkudziesięciu lat opracowano szereg precyzyjnych metod inżynierii genetycznej takich jak delecja bądź inaktywacja konkretnego genu tzw. ‘knockout’, dodanie wstawki z transgenu do modyfikowanego organizmu tzw. ‘knock in’ w wybranym miejscu genomu, a także mutacje na mniejszą skalę umożliwiające zmodyfikowanie pojedynczej pary zasad (mutacje punktowe) bądź zmodyfikowanie sekwencji nukleotydów (mutacje podstawienia, substytucje czy usunięcia fragmentu).

1.4.2. System Cre-loxP

Modele zwierzęce można podzielić ze względu na użyte systemy modyfikacji genetycznej na: konstytutywne oraz indukowane. Sekwencja DNA może zostać zintegrowana z genomem gospodarza w sposób przypadkowy bądź w sposób celowany, w specyficzne wybrany locus poprzez zastosowanie rekombinacji homologicznej. Proces rekombinacji homologicznej został odkryty u bakteriofaga P1 i został opracowany pierwotnie do tworzenia warunkowych modeli zwierzęcych (z ang. conditional models), a następnie w późniejszym czasie do indukowanych modeli zwierzęcych (z ang. inducible models). Techniki modyfikacji genomu z wykorzystaniem systemu Cre-loxP umożliwiają modyfikację w określonych tkankach lub stadiach rozwoju. Do tego celu wykorzystywane jest białko zwane rekombinazą Cre, która rozpoznaje specyficzne sekwencje loxP, składające się z 34 pz (składających się z dwóch powtórzeń odwróconych i palindromowych o 13 pz oraz sekwencji rdzeniowych o 8pz), które wykorzystywane są do oflankowania celowanego genu bądź fragmentu genu. W zależności od rozmieszczenia sekwencji loxP, rekombinaza Cre może wyciąć, wprowadzić lub spowodować inwersję sekwencji DNA leżącej pomiędzy sekwencjami loxP (z ang. locus of x-over, P1) (Bouabe i Okkenhaug, 2013; Kim i wsp., 2018). Do wytworzenia mysich modeli z warunkową delecją genu (ang. conditional knockout) potrzebny jest szczep myszy transgenicznej, która jest nośnikiem genu Cre, czyli zawiera w swoim genomie wbudowany konstrukt z genem kodującym rekombinazę Cre, która ulega ekspresji pod wybranym specyficznie-tkankowo promotorem oraz kolejne utworzone zwierzę transgeniczne, które będzie miało wprowadzony transgen z docelowym genem oflankowanym sekwencjami loxP. Następnie myszy są generowane poprzez skrzyżowanie szczepu promotor-Cre ze szczepem Gen X-loxP. Powstałe heterozygoty będące nosicielami genu X-loxP są ponownie wsobnie krzyżowane z nosicielami zarówno genu loxP-X jak i Cre rekombinazy. Osobniki, które odziedziczyły gen Cre i jednocześnie oba allele zawierają gen X-loxP są następnie wykorzystywane do badań. Specyfika i czas rekombinacji są kontrolowane poprzez użyty typ promotora a mutacja zachodzi w określonym czasie w trakcie rozwoju. U zwierząt transgenicznych z indukowaną delecją wybranego genu za pomocą zmodyfikowanego systemu Cre-loxP, ekspresja rekombinazy Cre w wybranej tkance jest kontrolowana poprzez elementy regulacyjne (promotor i wzmacniacz podczas transkrypcji). Natomiast indukcja mutacji jest kontrolowana w wybranym czasie przy wykorzystaniu egzogenego induktora tj. tetracyklina, czy tamoksyfen. Pierwotny konstrukt wbudowany do genomu zwierząt zawiera zmodyfikowane białko Cre związane z receptorem estrogenowym zawierającym zmutowaną domenę wiążącą ligand ER-LBD, która reaguje tylko na syntetyczne ligandy tj. tamoksyfen

(selektywny modulator receptorów estrogenowych). Cre pozostaje nieaktywne i związane w cytoplazmie komórki do momentu podania ligandu, a następnie po przyłączeniu ligandu do receptora, Cre oddysocjowuje i następuje translokacja Cre do jądra komórkowego. Po wejściu do jądra, Cre może katalizować rekombinację między miejscami loxP umożliwiającymi wycięcie wybranej sekwencji DNA (Kim i wsp., 2018; Kos, 2004). Techniki modyfikacji genomu, takie jak system Cre-loxP, w połączeniu z wektorami wirusowymi AAV, stanowią zaawansowane narzędzia umożliwiające precyzyjne badania funkcji genów np. genu *PTEN* w określonych populacjach komórek nerwowych, co pozwala na lepsze zrozumienie ich roli w regulacji procesów neuronalnych i zaburzeń neurologicznych.

1.4.3. Rekombinowane wektory wirusowe AAV

Rekombinowane wektory wirusowe towarzyszące adenowirusom, w skrócie AAV (z ang. adeno-associated viruses) to małe wirusy z rodziny Parvoviridae o średnicy około 26 nm, uważane za niepatogenne dla ludzi. Zbudowane są z jednoniciowego DNA o wielkości około 4,7 kbp, który koduje geny rep (odpowiedzialne za replikację) i cap (kodujące białka kapsydu), a także z krótkich, odwróconych sekwencji powtórzeniowych ITR (z ang. inverted terminal repeats), które są niezbędne do replikacji i pakowania wirusa. AAV są wykorzystywane głównie jako nośniki genów terapeutycznych, bądź mogą być wykorzystywane do generowania zwierząt transgenicznych w połączeniu z systemem Cre-loxP lub CRISPR-Cas9 (Hanlon, 2019; Kaspar i wsp., 2002; Wang i wsp., 2019). W celu przeprowadzenia infekcji komórek i indukcji mutacji, najpierw niezbędne jest stworzenie konstruktów plazmidowych, który będzie zawierał sklonowane, niezbędne geny do składania wirusa oraz kasetę z wybranym genem wbudowaną pomiędzy sekwencjami ITR. Sekwencje ITR są niezbędne do kierowania replikacją genomu i pakowania transgenów wewnątrz kapsydu podczas produkcji wektorów opisanych w rozdziale 3.4. Istotnym czynnikiem warunkującym wydajność transdukcji jest wybór serotypu z odpowiednim tropizmem, czyli zdolnością do infekowania odpowiednich typów tkanek, i komórek. Serotyp AAV2 jest bardziej ograniczony i wybiórczy dla neuronów, podczas gdy serotypy AAV1, AAV5, AAV8, czy AAV9 również infekują astrocyty i oligodendrocyty. Kolejnym krokiem jest wybór drogi wprowadzenia wirusów np. poprzez wstrzyknięcie dożylnie bądź stereotaktyczne podanie domózgowe w przypadku modyfikacji populacji neuronów. Dodatkowym istotnym aspektem jest wybór promotora specyficznego dla danej populacji neuronów, aby zmodyfikowany gen ulegał ekspresji bądź wyciszeniu w wybranym miejscu (Haery i wsp., 2019; Wang i wsp., 2019).

2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

Wieloletnie badania, prowadzone w kilku laboratoriach europejskich, z wykorzystaniem mysiego modelu $Dicer^{CaMKCreERT2}$ (*Dicer-iCKO*), gdzie w neuronach przodomózgowie osobników dorosłych usunięto gen *Dicer1*, przyniosły szereg obserwacji dotyczących funkcjonowania neuronów w kontekście ich pobudliwości jak i plastyczności synaptycznej (Konopka i wsp., 2010; Vinnikov i wsp., 2014; Fiorenza i wsp., 2015; Mang i wsp. 2015). Jako że, endonukleaza *Dicer* jest kluczowym enzymem w biogenezie mikroRNA wykazano w ten sposób funkcję tych cząsteczek RNA w neuronach. U mutantów *Dicer-iCKO* zdefiniowano kilkutygodniowe okno czasowe po indukcji mutacji (między 9 a 14 tygodniem), w którym obserwowano wzmocnienie kilku rodzajów pamięci: przestrzennej (warunkowanie miejsca) czy emocjonalnej (warunkowanie strachu). Jednocześnie mutacja genu *Dicer1* powodowała indukcję hiperfagicznej otyłości, która była zależna od neuronów zlokalizowanych w jądrze łukowatym (*ArcN*, ang. arcuate nucleus). Usunięcie mikroRNA w tej strukturze spowodowało wzrost aktywności ścieżki sygnałowej PI3K-AKT-mTOR. Manipulacje aktywnością tej ścieżki z wykorzystaniem inhibitora mTOR – rapamycyny oraz z wykorzystaniem modelu genetycznego $Pten^{CaMKCreERT2}$ wykazały jej kluczową rolę w rozwoju fenotypu otyłości u myszy, w sposób zależny od neuronów w jądrze łukowatym podwzgórza. Genetyczny model z usunięciem genu *Pten* zastosowano ze względu na przeciwstawną aktywność tej fosfatazy w stosunku do kinazy PI3K, której usunięcie przesuwa równowagę w kierunku nadaktywności ścieżki sygnałowej PI3K-AKT-mTOR.

Połączenie tych dwóch obserwacji: zależne od hipokampa wzmocnienie pamięci u mutantów *Dicer* oraz rozwój fenotypu otyłości z kluczową rolą ścieżki PI3K-AKT-mTOR w neuronach *ArcN*, skłoniły do sformułowania podstawowego celu niniejszej rozprawy doktorskiej:

1. Określenie czy wzmoczona aktywacja szlaku PI3K-AKT-mTOR spowodowana usunięciem funkcjonalnego białka *Pten* w neuronach pobudzających formacji hipokampa ma wpływ na zdolności poznawcze myszy dorosłych.

Ponadto, ze względu na fakt, że jednym z genów powiązanych z zespołem zaburzeń związanych ze spektrum autyzmu (ASD) jest gen *Pten* (Winden i wsp, 2018; Zhou i Parada, 2012) określono dodatkowe cele prac badawczych polegające na:

2. Porównaniu fenotypu myszy mutantów *Pten* w formacji hipokampa u osobników dorosłych z danymi uzyskanymi w pracach z modelami neurorozwojowymi spektrum autyzmu.
3. Zdefiniowaniu funkcji genu *Pten* unikatowych dla dojrzałych, zróżnicowanych neuronów hipokampa.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. WARUNKI UTRZYMYWANIA ZWIERZĄT W EKSPERYMENCIE

Zwierzęta hodowane były w strefie hodowlanej zwierzętarni Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN znajdującej się za barierą sanitarną o wysokim standardzie czystości mikrobiologicznej (SPF, ang. Specific Pathogen Free), a następnie w trakcie procedur doświadczalnych przebywały w dedykowanych pomieszczeniach doświadczalnych Pracowni Modeli Zwierzęcych. W pokojach doświadczalnych zwierzętom zapewniono standardowe warunki bytowania, z odwróconym 24-godzinnym cyklem dobowym (światło od 21.00 do 9.00) o temperaturze $21\pm 2^{\circ}\text{C}$, 10-15 wymian powietrza na godzinę oraz wilgotności na poziomie 50-60%. Myszy przetrzymywane były w klatkach o wzbogaconym środowisku z nieograniczonym dostępem do wody i paszy. W badaniach wykorzystano dorosłe samice w wieku około 6–9 tygodni. Doświadczenia wykonano w fazie aktywnej cyklu okołodobowego zwierząt. Eksperymenty przeprowadzono za zgodą I Lokalnej Komisji Etycznej ds. doświadczeń na zwierzętach w Warszawie (uchwała nr. 156/2016; 1133/2020).

3.2. LINIE MYSZY TRANSGENICZNYCH WYKORZYSTYWANE W DOŚWIADCZENIACH

Doświadczenia wykonano na dorosłych, myszach transgenicznym o tle genetycznym C57BL/6J. Do doświadczeń wykorzystano dwie linie myszy transgenicznym:

- 1) **Linia Pten^{flox/flox}**, otrzymana z The Jackson Laboratory, numer katalogowy #006440, B6.129S4-Ptentm1Hwu/J, stanowi kongeniczną linię zwierząt, u której ekson 5 genu Pten kodujący funkcję fosfatazy, jest oflankowany miejscami loxP. Konstrukcja ta została wykorzystana w celu indukowanej, tkankowo specyficznej delekcji genu Pten poprzez zastosowanie rekombinazy Cre wprowadzonych za pomocą różnych narzędzi inżynierii genetycznej, opisanych poniżej.
- 2) **Linia Pten^{CaMKCreERT2}**, została wytworzona w grupie badawczej Profesora Gunthera Schutza w German Cancer Research Center w Heidelbergu (Erdmann i wsp., 2007). Linia ta zawiera gen indukowalnej rekombinazy CreER^{T2}. Aktywność rekombinazy CreER^{T2} jest warunkowana dwoma czynnikami:
 - Specyficzność neuronalna: Ekspresja Cre jest ograniczona do neuronów przodomózgowia, w których aktywny jest promotor podjednostki α kinazy CaMKII (ang. calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha).

- Indukcja farmakologiczna: Rekombinaza Cre jest sprzężona ze zmodyfikowaną domeną receptora estrogenowego, a jej aktywacja następuje po dootrzewnym podaniu tamoksyfenu (TAM), co umożliwia przestrzenną i czasową kontrolę nad usuwaniem genu *Pten*. Mechanizm działania tego systemu opisano w podrozdziale [1.4.2](#).

3.3. IZOLACJA MATERIAŁU GENETYCZNEGO I GENOTYPOWANIE ZWIERZĄT

Genotypy zwierząt transgenicznych wykorzystanych w badaniu determinowały przynależność do grupy (kontrolnej lub eksperymentalnej) podczas przeprowadzanych eksperymentów. Genotypowanie zwierząt było przeprowadzane za pomocą reakcji PCR (ang. Polymerase Chain Reaction), zarówno po narodzinach, jak i po zakończeniu ostatecznych procedur eksperymentalnych.

Proces genotypowania rozpoczynał się izolacją materiału genetycznego, pobranego z fragmentu ogona każdej myszy, który następnie wykorzystywano jako matrycę do reakcji PCR. Izolację DNA przeprowadzano z użyciem komercyjnego zestawu Genomic Mini (A&A Biotechnology) zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Fragment ogona umieszczano w probówce, gdzie zawieszano go w mieszaninie do homogenizacji (100 µl roztworu Tris, 50 µl roztworu lizującego, 20 µl proteiny K) i inkubowano przez noc w temperaturze 50°C. Następnego dnia próbki mieszano na wirówce vortex przez kilka sekund, a następnie odwirowywano (1 min, 1000 rpm, temperatura pokojowa), aby umożliwić opadnięcie niestrawionych fragmentów sierści i tkanek na dno próbki. Uzyskany supernatant, zawierający DNA, nanoszono na kolumnę wiążącą DNA. Izolacja DNA obejmowała następnie szereg etapów przepłukiwania i odwirowywania z użyciem odpowiednich roztworów płuczających. Końcowym krokiem była elucja DNA w roztworze Tris, co pozwalało na uzyskanie czystego materiału genetycznego. Do reakcji PCR stosowano wcześniej zaprojektowane startery, wyprodukowane przez firmę Genomed S.A., których szczegóły zamieszczono w tabeli poniżej ([Tabela 2](#)). Reakcję PCR prowadzono z użyciem zestawu Gold Taq DNA Polymerase Plus (Syngen), a warunki reakcji oraz skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w tabeli poniżej ([Tabela 3](#)).

Tabela 2. Parametry użytych par primerów do amplifikacji sekwencji genu Cre oraz genu Pten z okalającymi ekson 5 sekwencjami loxP

Nazwa Amp. Sekwencji	Sekwencja Startera (5' → 3')	Długość Startera [Pz]	Wielkość Produktu PCR [Pz]
Cre	F: GGCTGGTGTGTCCATCCCTGAA	22	mutant: 405 WT: brak
	R: GGTCAAATCCACAAAGCCTGGCA	23	
Pten-flox (egzon 5)	F: CAAGCACTCTGCGAACTGAG	20	mutant: 715 WT: 656
	R: GCATTGTGCTCTTCACTCCA	20	

loxP/flox=sekwencje rozpoznawane przez rekombinazę Cre (ang.locus of crossing (X) over of P1); Pz=para zasad; WT=sekwencja fragmentu amplifikowanego genu typu dzikiego (niezmieniona genetycznie); mutant=sekwencja fragmentu amplifikowanego genu zmieniona genetycznie

Tabela 3. Warunki reakcji i składniki mieszaniny reakcyjnej PCR

Warunki Reakcji PCR	Etap	Temperatura [°C]	Czas Trwania Etapu [mm:ss]	Liczba Cykli	
Cre/Pten*	1.wstępna denaturacja	95	03:00	1	
	2.denaturacja	95	00:30		
	3.przylączenie starterów	58	01:00	35	
	4.elongacja	72	01:30		
	5.elongacja końcowa	72	05:00	1	
	6.schłodzenie	4	∞	1	
	Skład mieszaniny reakcyjnej		Stężenie końcowe reakcji		
	Gold Taq		1 U		
	10x Bufor Gold		1 x		
	25 mM MgCl ₂		2,5 mM		
	10 μM mM dNTP		200 μM		
	10 μM starter F		0,3 μM		
	10 μM starter R		0,3 μM		
	Matrycowe DNA		<10ng/ μl		
Woda dejonizowana		dopełnić do 20 μl			
Objętość końcowa reakcji		20 μl			

*Zarówno amplifikacja genu *Pten* jak i Cre podlega tym samym warunkom reakcji.

Po amplifikacji produktów, przeprowadzono rozdzielanie mieszaniny poreakcyjnej za pomocą elektroforezy w 1,5%-wym żelu agarozowym prowadzonej przez 30 minut warunkach stałego napięcia (100V). Do wizualizacji DNA użyto bromku etydy (Sigma Aldrich), Kontrolą pozytywną reakcji był materiał genetyczny od referencyjnego osobnika homozygotycznego pod względem genu *Pten* i heterozygotycznego założyciela pod względem

genu Cre. Jako kontrola negatywna posłużyła próbka zawierająca DNA osobnika o genotypie niezmienionym oraz dodatkowa próbka (blank) pozbawiona matrycy DNA w mieszaninie reakcyjnej. Do oceny wielkości otrzymanych prążków wykorzystano marker wielkości (tzw. drabinka) GeneRuler 1KB DNA Ladder z Thermo Scientific.

3.4. PRZYGOTOWANIE REKOMBINOWANYCH WEKTORÓW WIRUSOWYCH AAV

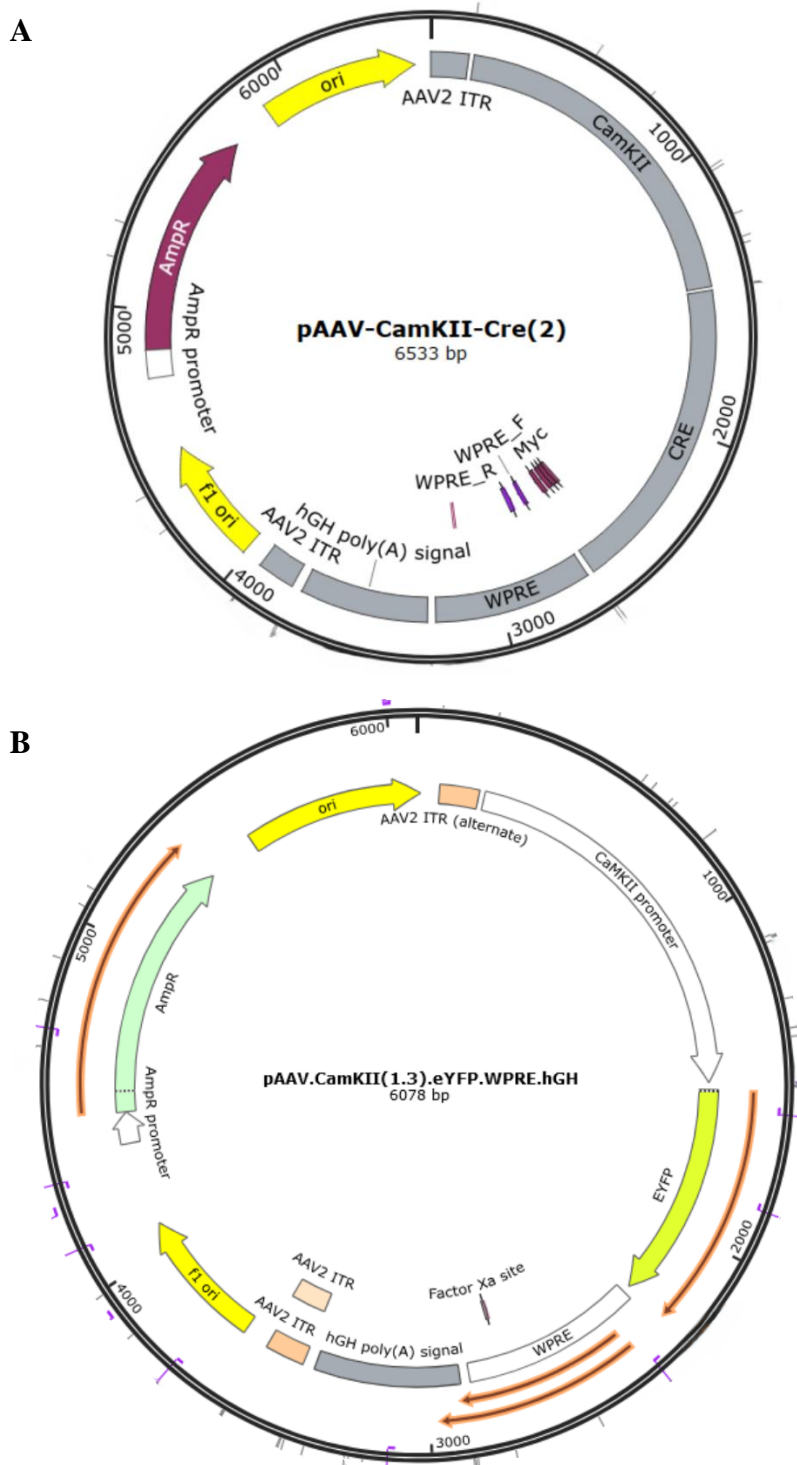
3.4.1. System wykorzystany do produkcji wektorów rAAV

Do wyprodukowania rekombinowanych wektorów towarzyszącym adenowirusom (rAAV, ang. Adeno-associated virus) o mozaikowym serotypie 1/2 infekującym neurony, wykorzystano komercyjny zestaw AAV Helper-Free System (Agilent, nr kat. 240071). W skład zestawu wchodzi zmodyfikowana linia ludzkich, embrionalnych komórek nerki HEK-AAV-293 (ang. Human Embryonic Kidney 293 Cells) z stabilną ekspresją genu adenowirusa (E1) oraz plazmidy pomocnicze: pRC oraz pDP1rs kodujące geny funkcjonalne i strukturalne AAV ([Rycina 8](#)). Potrójna transfekcja komórek HEK293 zestawem plazmidów jest niezbędna do efektywnej replikacji, składania wirusów oraz pakowania transgeny do kapsydu wirusa. Inicjację replikacji i integrację transgeny umożliwiają zlokalizowane pomiędzy docelową sekwencją odwrócone sekwencje powtórzeniowe (ITR, ang. Inverted Terminal Repeats). Przeniesiony materiał genetyczny z transgeny, zintegrowany z genomem gospodarza jest przechowywany w powstałym wektorze AAV w formie pojedynczej nici DNA (ssDNA, ang. single stranded DNA). Proces produkcji rekombinowanych wektorów AAV jest procesem złożonym, składającym się z etapów opisanych w dalszych podrozdziałach. Do produkcji wektorów AAV wykorzystano konstrukty przedstawione w poniżej ([Tabela 4](#)).

Tabela 4. Plazmidy wykorzystywane do produkcji wektorów wirusowych AAV

	Nazwa Plazmidu	Wielkość [Pz]	Opis
Plazmidy pomocnicze:	pAAV-RC	7300	Zawiera geny kodujące białka funkcjonalne Rep AAV-2 i białka strukturalne Cap AAV-2 (białka kapsydu o serotypie 2) oraz gen oporności na ampicylinę.
	pAAV-DP1rs	23705	Zawiera geny adenowirusa (VA, E3, E4), geny kodujące białka strukturalne Cap AAV-1 (serotyp 1) i funkcjonalne Rep AAV-1, gen oporności na ampicylinę oraz geny RSV-RFP kodujące ludzki syncytialny wirus układu oddechowego z białkiem czerwonej fluorescencji (ang. Human Respiratory Syncytial Virus with red fluorescent protein).
Transgen*:	pCaMKII α Cre	6533	Pomiędzy sekwencje ITR wbudowany jest gen kodujący rekombinazę Cre, którego ekspresja jest zależna od promotora CaMKII α (kinaza białkowa II zależna od Ca ²⁺ /kalmoduliny), podjednostki alfa aktywnej w mózgu, a także sekwencje regulatorowe WPRE i hGH polyA znajdujące się za sekwencją Cre. Plazmid przygotowany przez dr hab. Katarzynę Kalitę (IBD im. Nenckiego PAN).
	pCaMKII α -EYFP	6078	Pomiędzy sekwencje ITR wbudowany jest gen reporterowy kodujący wzmocnione białko żółtej fluorescencji (ang. enhanced yellow fluorescent protein), którego transkrypcja sterowana jest przez promotor CaMKII α . Za białkiem EYFP znajdują się sekwencje regulatorowe WPRE i poly A.

*Transgeny są to plazmidy, których sekwencja znajdująca się pomiędzy elementami ITR (odwrócone powtórzenia terminalne) będzie wprowadzana do kapsydu powstających wektorów wirusowych AAV i ekspresjonowana w komórkach gospodarza po iniekcji domózgowej; AAV=wektory wirusowe towarzyszące adenowirusom; hGH=ludzki hormon wzrostu; CaMKII α = kinaza białkowa zależna od wapnia/kalmoduliny II (podjednostka alfa); polyA=ogon poliadenylowy; pz=par zasad; WPRE= potranslacyjny element regulatorowy wirusa zapalenia wątroby.



Rycina 8. Mapy plazmidów wykorzystanych do produkcji rekombinowanych wektorów wirusowych AAV

Plazmid o wielkości 6533 pz zawierający pomiędzy sekwencjami ITR transgen $CaMKII\alpha$ -Cre, posttranslacyjny element regulacyjny wzmacniający ekspresję WPRE oraz sygnał poly A, pochodzący od ludzkiego hormonu wzrostu, ważny dla stabilizacji i zapobiegający degradacji powstałego mRNA (A). Plazmid o wielkości 6078 pz zawierający pomiędzy sekwencjami ITR transgen: $CaMKII\alpha$ -eYFP (zielone/żółte białko fluorescencji) oraz WPRE (potranslacyjny element regulatorowy wirusa zapalenia wątroby) i poly A (ogon poliadenylowy) (B).

3.4.2. Izolacja plazmidowego DNA metodą lizy alkalicznej

Plazmidy przechowywano w kulturach bakteryjnych *E. Coli* w temperaturze -80°C , zawieszonych w 1-2 ml płynnej pożywki LB z dodatkiem glicerolu w celu zabezpieczenia komórek przed uszkodzeniem. Następnie w sterylnych warunkach zaszczerpiono kultury bakteryjne do kolb hodowlanych zawierających 250 ml sterylnej, płynnej pożywki LB (Miller) z dodatkiem antybiotyku (ampicylina $100\mu\text{g/ml}$) i hodowano przez ok. 12h w temp 37°C przy 250 obr/min. Następnie odwirowano hodowlę przez 15min z siłą 6000xg , w celu oddzielenia osadu bakteryjnego od pożywki płynnej. Komórki bakteryjne zostały poddane procesowi lizy alkalicznej zgodnie z protokołem załączonym do gotowego zestawu Syngen Endofree Plasmid MAXI Kit (Syngen, nr kat. SY101032), który przeznaczony jest do izolacji plazmidów w wysokim standardzie czystości, wolnych od endotoksyn. Wykorzystanie metody lizy alkalicznej umożliwia wyodrębnienie DNA plazmidowego od „DNA bakteryjnego” z jednej hodowli bakteryjnej uzyskano od 150-300 μl plazmidowego DNA zawieszonego w ultraczystej wodzie o stężeniu w granicach 1-5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, zmierzonym na spektrofotometrze UV-Vis NanoDrop (Thermo Scientific).

3.4.3. Hodowla komórkowa *in vitro*

Produkcja jednej porcji rekombinowanego wektora AAV (jednego rodzaju) zajmowała około 2-3 tyg. od momentu rozpoczęcia hodowli *in vitro* do momentu określenia miana rAAV. Komórki AAV-293 hodowano na butelkach w inkubatorze (Binder) utrzymującym stałą temperaturę 37°C , 95% wilgotność powietrza oraz 5%-ową zawartość CO_2 . Do wzrostu komórek wykorzystano medium hodowlane DMEM (ang. Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma Aldrich, nr kat. D6424) z wysoką zawartością glukozy (4500 mg/L), z dodatkiem 10% (obj/obj) płodowej surowicy bydlęcej (FBS, ang. Fetal bovine serum, Biowest, nr kat. S1810-50) oraz 2% (obj./obj.) roztworem 200mM L-glutaminy (Gibco, nr kat. A29168-01). Zgodnie z protokołem pasażowania, komórki przesiewano w momencie osiągnięcia konfluencji nie przekraczającej 50% powierzchni butelki (w zależności od szybkości wzrostu po upływie ok. 2-3 dni). W początkowym etapie, po rozmrożeniu, komórki hodowano w mniejszej butelce o powierzchni 75cm^3 (Cell Star, nr kat. 658175) a następnie pasażowano do butelki o powierzchni 175cm^3 (Cell Star, nr kat. 660175) po uprzednim potraktowaniu trypsyną (Trypsin-EDTA, Biowest, L0940) i odwirowaniu (5min, 1000rpm) zawieszonych komórek.

3.4.4. Transfekcja komórek linii AAV-293

Do wyprodukowania około 50µl zawiesiny rekombinowanego AAV o mianie powyżej 108 gc/µl niezbędne było przesianie komórek na 10 płytek o średnicy 15cm (Falcon, nr kat. 353025). Komórki o konfluencji 70-80% powierzchni płytki były gotowe do potrójnej transfekcji mieszaną plazmidów z dodatkiem polimeru kationowego – polietylenoiminy (PEI, 1mg/ml, Sigma Aldrich, nr kat 919012) tworzącego stabilne kompleksy z DNA i powszechnie wykorzystywanego do przenoszenia genów. Na podstawie wielkości wprowadzanych plazmidów (pRC, pDP1rs oraz wybrany transgen oflankowany/otoczony sekwencjami ITR) oraz ich stężenia, wyliczono w równo molowym stosunku (1:1:1) ilość podania na jedną płytkę z uwzględnieniem założenia, że maksymalne stężenie wprowadzanego DNA nie powinno przekraczać 50µg. Następnie wartość przemnożono na 10 szalek z uwzględnieniem 10% zapasu. Do pożywki DMEM bez dodatkowej suplementacji dodano najpierw odpowiednią ilość plazmidów i następnie powoli dodano kropelki PEI. Mieszaninę inkubowano w temperaturze 37°C przez 20min. Przed transfekcją zmieniono pożywkę i dodano do hodowli komórkowej nową z obniżoną zawartością FBS (DMEM, 2% (obj. / obj.) FBS, 2% (obj. / obj.) 200mM L-glutamina). Po zakończonej inkubacji mieszaninę plazmidów związanych z PEI równomiernie rozprowadzono dodając 1ml na płytkę. Obniżona zawartość surowicy jest czynnikiem stresogennym dla komórek i jednocześnie idealnym środowiskiem do namnażania się AAV w komórkach. Po około 5-6 godzinach do hodowli dodawana jest kolejna pożywka w stosunku 1:1 (DMEM, 18% (obj. / obj.) FBS, 2% (obj. / obj.) L-glutamina) w celu uzupełnienia ilości surowicy FBS do pierwotnej wartości 10% (obj. / obj.). Po 72h weryfikowano wydajność transfekcji poprzez sprawdzenie zmiany morfologii komórek na kulistą. Następnie, pod mikroskopem fluorescencyjnym sprawdzono intensywność świecenia komórek, w których uległo ekspresji białko reporterowe RFP pochodzące z plazmidu pDP1rs.

3.4.5. Izolacja i oczyszczanie rekombinowanych wektorów AAV

Pierwszym etapem izolacji rAAV z komórek jest proces dezintegracji błony komórkowej (liza). W tym celu komórki pozbawiono pożywki DMEM i zeskrobano sterylną szpatułką z szalek z dodatkiem ciepłego 1x PBS, utrzymanego w temp. 37°C (ang. Phosphate buffered saline, BioShop, nr kat. L0615), a następnie przeniesiono osad komórkowy do falkonu o objętości 50 ml (osad komórkowy z 5 szalek/falkon) i odwirowano (8 min, 1000 rpm). Następnie wyizolowany osad komórkowy potraktowano buforem do lizy (25ml/falkon), którego skład przedstawiono w tabeli. Następnie pipetowano do momentu uzyskania homogenicznego roztworu i dodano do każdego falkonu benzonazę (50U/ml, Sigma Aldrich,

E1014-25KU) oraz 10% roztwór deoksycholenu sodu (0,5% (obj./ obj), Sigma Aldrich, nr kat. D6750). Uprzednio jednorodny lizat poddano 30-minutowej inkubacji w łaźni wodnej, w temp. 37°C a następnie odwirowano lizat komórkowy od supernatantu zawierającego cząsteczki rAAV (20 min, 3000 xg). Drugim etapem był proces oczyszczania supernatantu z pozostałości komórkowych poprzez manualną trójstopniową filtrację roztworu przy użyciu strzykawki 50 ml i filtrów o zmniejszającej się średnicy porów (0,8 µm, 0,45 µm, 0,22 µm, Roth, nr kat. P820.1, KH55.1, KH54.1). W trzecim etapie, oczyszczony roztwór wirusowy przepuszczono przez uprzednio zneutralizowaną buforem do lizy (10ml) kolumnę chromatograficzną ze złożem składającym się z heparyny o zdolnościach wiążących się z serotypem 2 cząsteczek AAV (HiTrap Heparin HP 1ml, GE Healthcare, nr kat. 17-0406-01). Przepływ płynu przez kolumnę był napędzany przy użyciu pompy perystaltycznej. Po przepłynięciu ok. 45-50 ml roztworu z cząsteczkami AAV przez kolumnę chromatograficzną i związania białka kapsydu z heparyną, następował etap przepłukiwania kolumny roztworami o rosnącym stężeniu soli (roztwory nr. 2-7 opisane w tabeli poniżej [Tabela 5]). Roztwory od numeru 5 do 7 posiadały odpowiednie stężenie do elucji cząsteczek AAV. Ostatnim etapem było zagęszczenie eluatu przy użyciu kolumn przeznaczonych do filtracji membranowej (Amicon Ultra-4, Millipore, nr kat. UFC805024) i kilkukrotnym odwirowaniu (2min, 3000 xg) momentu uzyskania 50µl. Eluat rozpipetowano po 3-4µl do mini probówek PCR i przechowywano w -80°C. W takiej formie odpowiednio rozcieńczony roztworem soli fizjologicznej był wykorzystywany do iniekcji stereotaktycznych.

Tabela 5. Skład roztworów przeznaczonych do izolacji AAV z kolumny heparynowej.

Numer roztworu	Przeznaczenie
1	roztwór lizujący: 150 mM NaCL, 20 mM TRIS
2	roztwór płuczący: 100 mM NaCL, 20 mM TRIS
3	roztwór płuczący: 200 mM NaCL, 20 mM TRIS
4	roztwór płuczący: 300 mM NaCL, 20 mM TRIS
5	roztwór do elucji: 400 mM NaCL, 20 mM TRIS
6	roztwór do elucji: 450 mM NaCL, 20 mM TRIS
7	roztwór do elucji: 500 mM NaCL, 20 mM TRIS

3.4.6. Oznaczenie miana wektorów AAV za pomocą ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym

W końcowym etapie, pobrano 1 µl eluatu wirusowego, który został wykorzystany do oceny ilościowej cząsteczek AAV przy wykorzystaniu techniki PCR w czasie rzeczywistym (z ang. real time PCR/ quantitative PCR) (Tabela 6). Oszacowanie miana AAV odbyło się w oparciu o krzywą standardową sporządzoną poprzez kolejne rozcieńczenia plazmidu referencyjnego (wykorzystanego do produkcji) metodą kolejnych rozcieńczeń dziesięciokrotnych. Każdy punkt z krzywej reprezentował ściśle określoną liczbę cząsteczek, która została ustalona w oparciu o wielkość i stężenie plazmidowego DNA przy pomocy kalkulatora on-line: <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>. W obliczeniach uwzględniono, że cząsteczka wektora wirusowego składa się z jednej nici DNA (ssDNA) w przeciwieństwie do dwuniciowego plazmidu referencyjnego (dsDNA). Miano zostało oszacowane w wyniku uśrednienia otrzymanych wartości przeliczonych z trzech przygotowanych rozcieńczeń eluatu wirusowego (1:100, 1:1000, 1:10000). Reakcję każdorazowo przygotowano na płytce 96-dółkowej (Applied Biosystems), którą wirowano (2 min, 2000rpm, 4°C) przed przystąpieniem do umieszczenia w aparacie StepOne Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems) i rozpoczęcia reakcji amplifikacji.

Tabela 6. Warunki reakcji qPCR oraz skład mieszaniny reakcyjnej

Etap	Temperatura [°C]	Czas Trwania Etapu [mm:ss]	Liczba Cykli
1. wstępna denaturacja	50	02:00	1
2. wstępna denaturacja	95	05:00	
3. denaturacja	95	00:20	40
3. przyłączanie starterów	60	00:40	
3. elongacja	72	01:00	
4. dysocjacja i generowanie krzywej topnienia	95	00:15	1
4. dysocjacja i generowanie krzywej topnienia	60	01:00	1
4. dysocjacja i generowanie krzywej topnienia	95	00:15	1

Składniki reakcyjnej	mieszaniny	Objętość w reakcji
SYBRGreen Master Mix		10 μ l
10 μ M starter F WPRE		1 μ l
10 μ M starter F WPRE		1 μ l
Woda dejonizowana		7 μ l
Matrycowe DNA		1 μ l
Objętość końcowa		20 μ l

3.5. METODY INDUKCJI MUTACJI BADANEGO GENU

3.5.1. Indukcja mutacji za pomocą środka farmakologicznego Tamoksyfen

Celem wywołania mutacji u zwierząt transgenicznych z indukowalnym systemem Cre/loxP zwierzęta poddano 5-dniowemu schematowi dootrzewnowego podawania tamoksyfenu (Sigma Aldrich, nr kat. T5648), w dawkach aplikowanych dwa razy dziennie w odstępach około 10 godzin. Roztwór tamoksyfenu (10 mg/ml) przygotowywano poprzez rozpuszczenie substancji w 100 μ l 99,8% etanolu (Polskie Odczynniki Chemiczne), a następnie dodanie 900 μ l oleju słonecznikowego (Sigma Aldrich). Mieszaninę przechowywano w lodówce, w temperaturze 4°C, a przed każdym użyciem ogrzewano do temperatury pokojowej.

3.5.2. Indukcja mutacji za pomocą wektorów wirusowych AAV

Wektory wirusowe AAV wprowadzano do mózgu zwierząt doświadczalnych za pomocą aparatu do podań stereotaktycznych (Stoelting) i szklanej kapilary (Blaubrand intraMark, nr kat. 7087-07). Rekombinowane wektory wprowadzano w roztworze NaCl do obu półkul hipokampa ([Lowery i Majewska, 2010](#)).

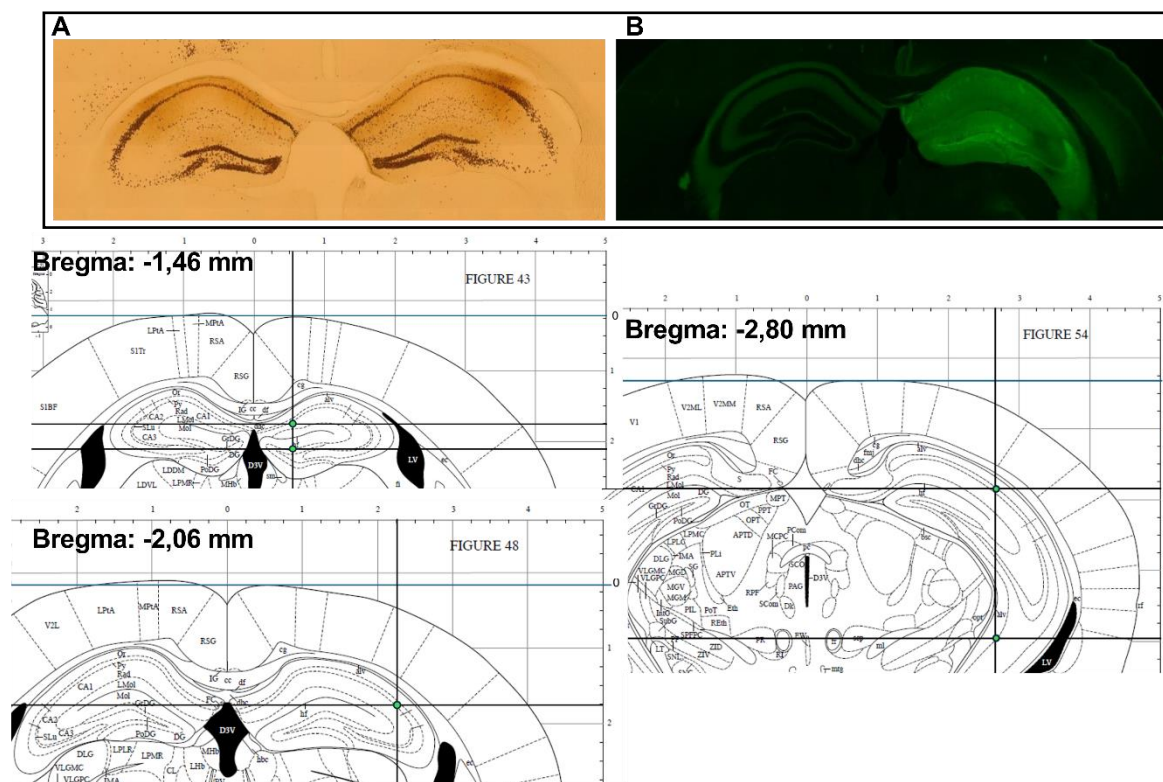
Przed rozpoczęciem procedury zwierzęta poddano anestezji poprzez dootrzewnowe podanie mieszaniny ketaminy (Ketamidol, 65 mg/kg) i wodorotlenku medetomidyny (Cepetor, 0.9 mg/kg). Dodatkowo podano podskórnie środek znieczulający butorfanol winianu, (Butamidol, 3,3mg/kg) oraz środek przeciwzapalny kwas tolfenamowy (Tolfedine, 2.0 mg/kg) i osłonowo antybiotyk enrofloksacyna (Baytril, 2,5 mg.kg). Po weryfikacji braku odruchów i reakcji bólowych, sierść z okolicy głowy została ogolona a zwierzę umieszczono w aparacie stereotaktycznym. Skórę zdezynfekowano roztworem jodyny i miejscowo znieczulono

lidokainą (Polfa). Oczy zabezpieczono przed wyschnięciem maścią Vita-Pos (Ursapharm). Po wykonaniu nacięcia skóry głowy i odsłonięciu czaszki za pomocą wiertła dentystycznego (JOTA AG, głowica 006) wywiercono sześć otworów w czaszce (po trzy na każdą półkulę), zgodnie z koordynatami ustalonymi na podstawie atlasu mózgu (Allen Brain Atlas) oraz punktów odniesienia na czaszce (Bregma i Lambda). Średnica otworów wynosiła ok 1mm. Przygotowaną na wyciągarce do minipipet (Sutter P-87) szklaną kapilarę wprowadzono do hipokampa w dziesięciu miejscach (5 iniekcji na półkulę). W każdym miejscu wstrzyknięto około 125 nl roztworu rAAV. Po każdym podaniu kapilarę pozostawiono na 10 minut w celu uniknięcia cofnięcia roztworu, a następnie ostrożnie ją usunięto i kontynuowano procedurę dla kolejnych otworów. Dokładne koordynaty wstrzyknięć zostały ustalone na podstawie pilotażowych badań przeprowadzonych na osobnej grupie zwierząt (Rycina 9) i zawarte w tabeli poniżej (Tabela 7). Powyższa procedura zapewniła precyzyjne i powtarzalne dostarczenie wektorów wirusowych do wyznaczonych struktur hipokampa.

Tabela 7. Koordynaty iniekcji stereotaktycznych do hipokampa i zakrętu zębatego

Płaszczyzna (Mm)			
Region	Przód/Tył (AP)*	Lewo/Prawo	Brzuszną/Grzbietową (DV)
DG	-1,46	±0,56	-1,90
CA1	-1,46	±0,56	-1,54
dCA1/CA2	-2,06	±2,25	-1,59
posterior dCA1/vCA3	-2,80	±2,70	-1,60; -3,70

*mierzone od bregmy, AP- anterior/posterior, ML-medio lateral, DV- dorsal/ventral



Rycina 9. Wybrane koordynaty na podstawie atlasu mózgu (Allen Brain Atlas)

Pilotażowa dwustronna iniekcja AAV-CaMKII α -Cre do hipokampa i DG (A) oraz jednostronna iniekcja kontrolnego AAV-CaMKII α -eYFP do hipokampa i DG (B).

W trakcie zabiegu zwierzętom wstrzyknięto podskórnie roztwór podgrzanej do 37°C soli fizjologicznej, w celu uniknięcia odwodnienia i wychłodzenia zwierząt podczas operacji stereotaktycznej. Po operacji założono wchłaniające szwy chirurgiczne Safil 4/0 (B. Barun, nr kat. C1048029) oraz ponownie podano na ranę lidokainę. Następnie, zwierzęta zostały wybudzone z uśpienia poprzez dootrzewnowe podanie chlorowodoru atypamezolu (Revertor, 0,5-1 mg/kg), substancji znoszącej działanie wodorotlenku medetomidyny. Po zabiegu, klatki, w których wybudzały się pojedynczo trzymane myszy były ustawione na płytce grzewczej.

3.6. FENOTYPOWANIE BEHAVIORALNE ZWIERZĄT

Wszystkie testy behawioralne (z wyjątkiem IntelliCage oraz analizy budowania gniazda) były rejestrowane przy użyciu kamery (Basler AG) zawieszanej nad aparaturą w taki sposób, aby była niewidoczna dla zwierząt. Obserwator i sprzęt do nagrywania znajdowali się w osobnym pomieszczeniu, co minimalizowało potencjalne czynniki zakłócające wyniki eksperymentów.

3.6.1. Testy funkcji poznawczych – uczenie się i pamięć w IntelliCage

Przed właściwą serią doświadczeń zwierzęta laboratoryjne poddane zostały testom sensomotorycznym mające na celu wyselekcjonowanie zwierząt zdrowych oraz wyeliminowanie z doświadczenia myszy z wrodzonymi nieprawidłowościami związanymi z brakiem węchu, wzroku lub zaburzeniami motorycznymi. Następnie, 2 tygodnie przed rozpoczęciem serii testów w IntelliCage zwierzęta przyzwyczajono do odwróconego cyklu dobowego panującego w pokoju z klatkami IntelliCage. 3 dni przed rozpoczęciem, myszy zostały uspione wziewnie za pomocą izofluranu, a następnie wprowadzono pod skórę na grzbiecie mikrotransponder (11.5 mm długość, 2.2 mm średnica; Trovan, ID-100). Wszczepiane podskórnice transpondery RFID służyły indywidualnemu rozpoznaniu zwierząt w grupie. Unikalny numer myszy jest możliwy do odczytania za pomocą podręcznego skanującego czytnika oraz sensorów zamontowanych w rogach klatki, przesyłających dane do komputera. Bez microchipów nie jest możliwa analiza podstawowych parametrów, takich jak pomiar ilości pobranej wody, liczba wizyt w rogach oraz ilość dotknięć drzwi przy użyciu nosa (ang. nosepoke).

W projekcie wykorzystano proste i złożone testy mierzące funkcje poznawcze u myszy. Prosta adaptacja do klatki (ang. simple adaptation, w skrócie SA) oraz uczenia zwierząt do otwierania drzwi za pomocą nosa (ang. nosepoke adaptation, w skrócie NPA) są etapami poprzedzającymi, każdy test kognitywny. Swobodna eksploracja klatki podczas SA (2-3 dni), umożliwia zbieranie danych o aktywności każdego zwierzęcia, liczbie i częstotliwości odwiedzanych rogów z wodą, do których myszy mają swobodny dostęp (wszystkie drzwi w rogach są otwarte). System pozwala także określić poziom neofobii na nowe środowisko. Podczas fazy NPA (3-6 dni) można było zaobserwować z jaką szybkością myszy uczą się schematu otwierania drzwi poprzez włożenie nosa w detektor, by uzyskać dostęp do butelki z zwykłą wodą / 10% roztworem sacharozy. Gdy w butelkach umieszczonych w rogach znajdowała się roztwór sacharozy, to wówczas zwykła woda była dostępna ad libitum, w górnej części klatki. Kluczowym kryterium było nauczenie zwierząt schematu picia w reżimie 7 sekundowego otwierania się drzwi po włożeniu nosa w detektor oraz wychodzenia z rogów w celu ponownego otworzenia drzwi i napicia się w niezmiennym schemacie. Następnie, myszy były gotowe na wprowadzenie testów sprawdzających poziom uczenia się i pamięci przestrzennej, opartych na warunkowaniu instrumentalnym z pozytywnym wzmocnieniem jakim jest uprzednio użyty w fazie NPA 10% roztwór sacharozy.

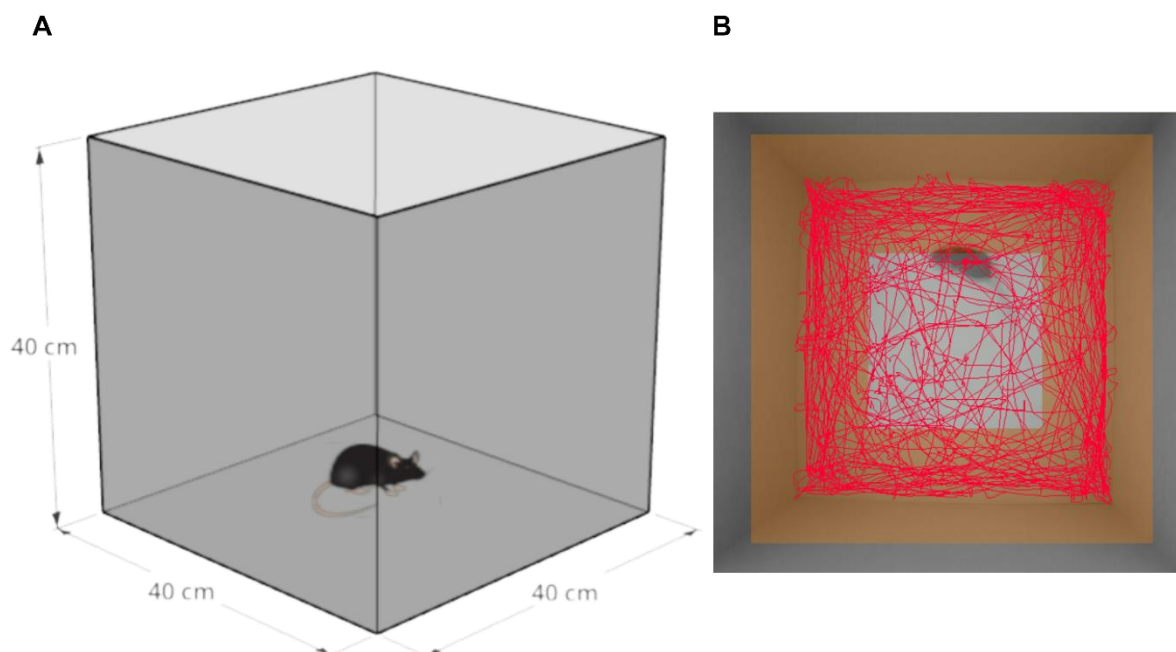
Do grupy prostych testów zaliczał się także test preferencji miejsca (ang. place learning preference, w skrócie PL) oraz test odwróconej preferencji miejsca (ang. reversal place preference learning, w skrócie revPL). W zadaniu PL myszy musiały znaleźć i nauczyć się pozycji jednego rogu, w którym picie było możliwe (4-5 dni). Każda mysz miała indywidualnie dobrany róg, na podstawie kryterium o najniższym procencie odwiedzin w czasie ostatniej doby NPA. W kolejnym teście revPL (4-5 dni), prawidłowy róg ponownie ulegał zamianie na najmniej preferowany przez daną mysz w ciągu ostatniej doby w teście PL. Uczenie się pozycji rogu definiowano jako zdolność do uczenia się przestrzennego nowej lokalizacji nagrody i wygaszania pamięci starej lokalizacji. Krzywą uczenia się przedstawiono jako dzienny stosunek liczby wizyt zakończonych dotknięciem drzwi za pomocą nosa w zdefiniowanym rogu jako prawidłowy do wszystkich wizyt zakończonych dotknięciem drzwi za pomocą nosa, wykonanych w fazie aktywnej zwierząt. Schemat otwierania się drzwi na 7 sekund jest niezmienny dla każdego testu przeprowadzonego w IntelliCage.

Aby zaobserwować kinetykę uczenia się myszy w bardziej dynamicznym środowisku, zaprojektowano złożony test uczenia się w oparciu o istniejący test patrolowania. Podobnie jak w przypadku PL i revPL, zwierzęta najpierw zaczynały od etapów adaptacji do klatki - SA i NPA. Podczas fazy NPA, 10% roztwór sacharozy został zastąpiony zwykłą wodą a dodatkowe butelki znajdujące się w górnej części klatki zostały usunięte. W ten sposób jedynym źródłem wody były butelki znajdujące się w narożnikach klatki, do których dostęp był ograniczony w czasie testów patrolowania. Analizowano szybkość uczenia się poprzez zapamiętywanie wzorca dostępności poprawnych rogów, których pozycja zmieniała się zgodnie z ruchem wskazówek zegara (ang. clockwise, w skrócie test CW), za każdym razem po napiciu się myszy we właściwym rogu. Dostęp do wody rozpoczyna się dla wszystkich myszy od 1 narożnika zgodnie ze schematem (1>2>3>4>1). Stopień przyswojenia wiedzy przez zwierzęta był różny i po krótkim czasie każda mysz odwiedza rogi według własnego schematu. Po 10 dniach sekwencja rogów zmienia się na przeciwną do ruchu wskazówek zegara (ang. counter clockwise, w skrócie test CCW), a myszy muszą zapomnieć o starym wzorcu i przyswoić sobie nowy w ciągu 7 dni. Test CCW mierzy elastyczność poznawczą (ang. cognitive flexibility) i zdolność dostosowania zachowania do nowej sytuacji, w tym wypadku nowego wzorca. Przez cały czas CW i CCW, gdy mysz wchodzi do narożników z dostępem do wody (bodziec bezwarunkowy, ang. unconditioned stimulus, US), miejscu nagradzania towarzyszy za każdym razem przewodnik świetlny (bodziec warunkowy, ang. conditioned stimulus, CS). W obu testach policzono odpowiedzi prawidłowe, nieprawidłowe i neutralne. Prawidłowe odpowiedzi

obejmują wszystkie wizyty zakończone włożeniem nosa w sensor w prawidłowym narożniku (z piciem lub bez), podczas gdy nieprawidłowe zachowania obejmują wszystkie wizyty zakończone włożeniem nosa w sensor w narożnikach innych niż aktualnie nagradzany i poprzednio nagrodzony. Z kolei odpowiedzi neutralne klasyfikują pierwszą zakończoną wizytę w narożniku poprzednio nagradzanym. Kolejne wizyty w poprzednio nagrodzonym narożniku są liczone jako odpowiedzi nieprawidłowe. Neutralne wizyty nie są liczone jako zdarzenia powodujące straty, ponieważ myszy mają tendencję do powrotu i sprawdzania, czy nadal można pić z ostatniego dostępnego miejsca. Wynik uczenia się został przedstawiony jako stosunek frakcji poprawnych wizyt zakończonych włożeniem nosa w sensor do wszystkich wizyt zakończonych włożeniem nosa w sensor (z wyłączeniem wizyt neutralnych), pokazany jako procent dla każdego dnia.

3.6.2. Badanie zachowań eksploracyjnych – test otwartego pola

Test otwartego pola jest standardowym testem behawioralnym mierzącym aktywność lokomotoryczną oraz reakcje emocjonalne gryzonia w konfrontacji z otwartą przestrzenią i oświetleniem. Z natury myszy mają tendencje do unikania otwartej przestrzeni i chowania się w zacienionych miejscach. Każda mysz była umieszczona na środkowej części szarej, kwadratowej areny o wymiarach 40 x 40 cm i nagrywana przez 15 min (Rycina 10). Po każdej sesji podłogę aparatu czyszczono 70% roztworem etanolu. Kamerę wraz z lampą oświetlającą centralną część pudełka umieszczono nad areną. Do analizy uwzględniono zmienne takie jak prędkość poruszania się zwierzęcia, dystans przebyty w ciągu trwania testu, całkowity czas spędzony w centralnej oraz peryferyjnej części pudła (strefa tigmotaksji). Nagrania przeanalizowano przy użyciu automatycznego systemu EthoVision (wersja XT14, Noldus) do wideotrackingu. Aktywność w otwartym i zamkniętym ramieniu liczona w jednostce czasu (czas trwania liczony w sekundach) za pomocą automatycznego systemu śledzenia EthoVision (wersja XT14, Noldus). Została nałożona manualna korekta w punktach czasowych nie wychwytywana przez system i nie rozpoznająca ruchu zwierzęcia.



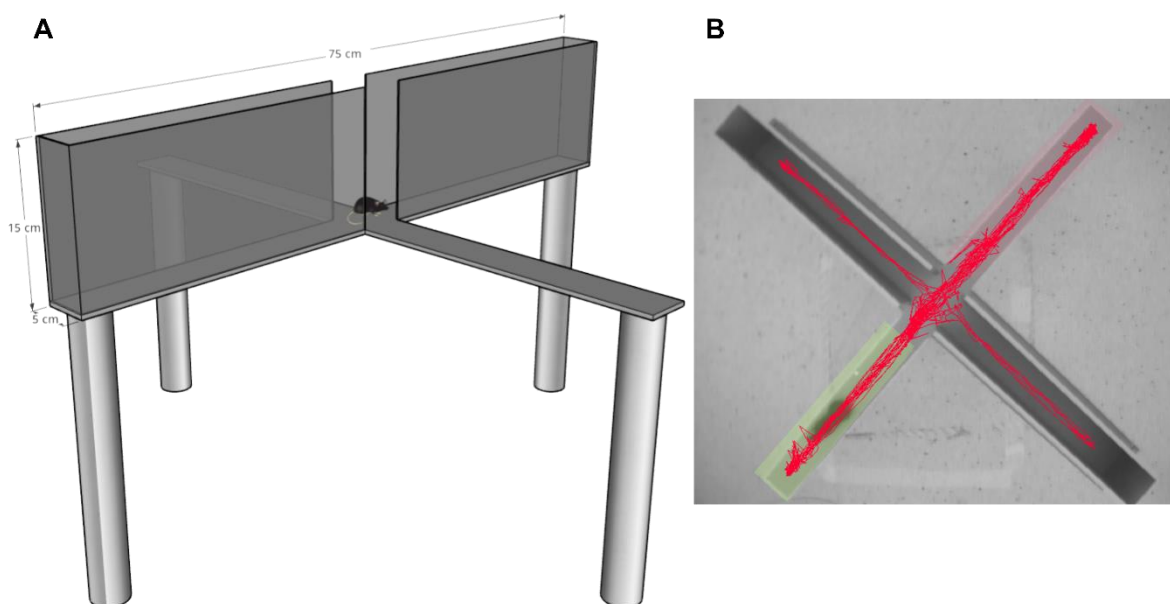
Rycina 10. Schemat aparatu testu otwartego pola

Wymiary aparatu użytego w teście (A). Widok z kamery zawieszony nad sprzętem oraz trajektoria przebytej trasy przez przykładową mysz w czasie 15 minutowej sesji (B).

3.6.3. Badanie zachowań emocjonalnych związanych z odczuciem lęku – test wzniesionego labiryntu krzyżowego

Test wzniesionego labiryntu krzyżowego (ang. Elevated Plus Maze, w skrócie EPM) został zaprojektowany do neurobiologicznych badań lęku u gryzoni w warunkach laboratoryjnych. Podobnie jak test „otwartego pola” mierzy spontaniczne wzorce zachowań zwierząt w nowym środowisku i reakcje emocjonalne w odpowiedzi na konfrontację z otwartą przestrzenią znajdujących się na podwyższeniu. Szary labirynt umieszczono 50 cm nad podłogą. Składa się on ze skrzyżowanych ramion, w tym z dwóch przeciwległych otwartych ramion i dwóch przeciwległych ramion o tej samej wielkości osłoniętych ścianami), rozpoznawanych przez gryzonie jako bezpieczne schronienie (Rycina 11). Na początku każdego testu, myszy umieszczono pojedynczo w części centralnej, pomiędzy ramionami i pozwolono na swobodną eksplorację areny w czasie 5 minut. Po każdej sesji podłogę aparatu czyszczono 70% roztworem etanolu. Reakcje zwierzęcia zarejestrowane przez kamerę umieszczoną ponad labiryntem. Do analizy uwzględniono zmienne takie jak: całkowity czas spędzony w dwóch różnych środowiskach takich jak ramiona oświetlone (strefa otwarta) oraz ramiona zacienione (strefa zamknięta). Dodatkowo uwzględniono parametry jak: czas eksploracji w strefie centralnej oraz liczbę wychyleń głowy poza strefę centralną oraz w strefie otwartych ramion. Nagrania przeanalizowano przy użyciu automatycznego systemu EthoVision (wersja XT14, Noldus, Holandia) do wideo trackingu. Na podstawie czasu spędzonego w ramionach

zamkniętych do czasu spędzonego w ramionach otwartych, określono stan zwierzęcia, poziom łęku wywołany wysokością i otwartą przestrzenią. Podczas 5-minutowej sesji mierzono stosunek czasu spędzonego w otwartych ramionach do czasu spędzonego w zamkniętych ramionach i obszarze centralnym i przedstawiono jako ich stosunek.



Rycina 11. Schemat aparatu testu wzniesionego labiryntu krzyżowego

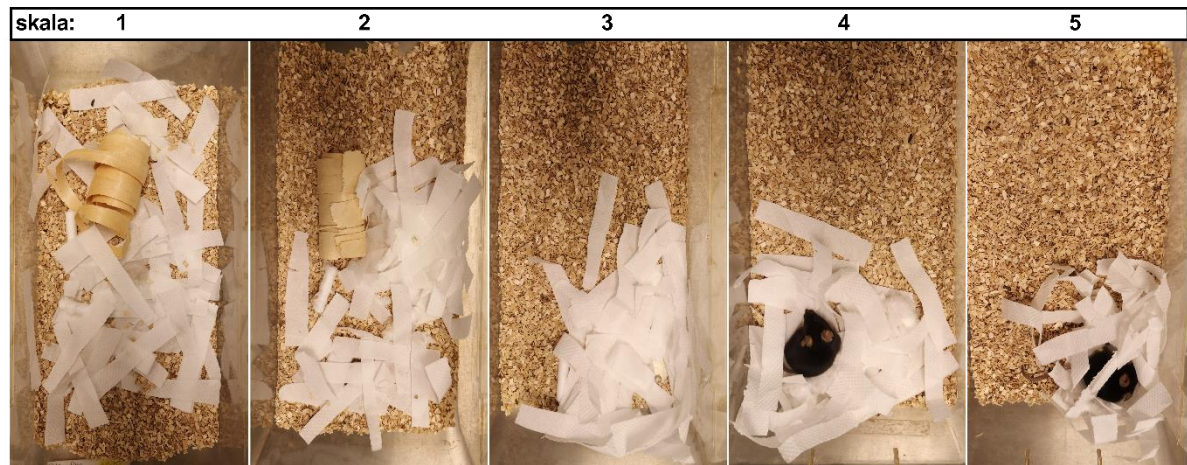
Wymiary aparatu użytego w teście (A). Widok z kamery zawieszanej nad sprzętem oraz trajektorie trasy przebytej przebytej przez przykładowego osobnika w czasie 5-minutowej sesji (B).

3.6.4. Test budowania gniazda

Test budowania gniazda jest szeroko stosowanym testem behawioralnym, który mierzy wrodzoną lub wyuczoną zdolność do budowania gniazda, co jest kluczowym zachowaniem przetrwania u tych zwierząt. Test ten jest często używany jako wskaźnik: chorób neurodegeneracyjnych, neurorozwojowych np. spektrum autyzmu ASD, zmian w zachowaniu i aktywności oraz do szacowania stopnia zaburzeń pracy mózgu u mutantów z modyfikacjami genetycznymi. Eksperyment rozpoczynał się od zmiany klatki z czystym nowym podłożem przed rozpoczęciem fazy aktywnej. Każda mysz otrzymała jednakową ilość materiału do budowy (2 bawełniane bibułki i pocięte chusteczki o łącznej wadze 3g). Materiał został rozproszony po całej powierzchni podłogi klatki. Dodatkowo dla wzbogacenia środowiska, każdy osobnik otrzymał drewnianą serpentynę w kształcie cylindra. Ocenę wizualną przeprowadzono po 6 i 24 godzinach (w 6 tygodniu) i dodatkowo po 48h (w 15 tygodniu), za pomocą zdjęć i 5-stopniowej skali opisującej postęp w budowaniu gniazda (Rycina 12) (Deacon, 2006).

Skala pomiaru:

1. Materiał nietknięty $\geq 90\%$
2. Materiał nietknięty w 50-90%
3. Materiał poszatkowany i skumulowany, natomiast brak zidentyfikowanego gniazda
4. Zidentyfikowane płaskie gniazdo
5. Zidentyfikowane wypukłe gniazdo o kształcie krateru



Rycina 12. Test budowania gniazda

Przykładowe zdjęcia doświadczenia przedstawiające poziomy budowania gniazda w zastosowanej 5-stopniowej skali, gdzie 1 oznacza 90% materiału nietkniętego, a 5 gniazdo wypukłe o kształcie krateru.

3.6.5. Test socjalny i nowości społecznej (pamięć społeczna)

Test trójkomorowy (ang. three-chamber paradigm, social approach test) jest testem stosowanym do oceny społecznych funkcji poznawczych (ang. social cognition) oraz wykrywania aspołecznych zachowań związanych z różnymi typami zaburzeń neurologicznych, w szczególności w oszacowaniu spektrum autystycznego u zwierząt (ASD). Zadania preferencji społecznych i rozpoznawania (ang. recognition memory) oceniano w trójkomorowym aparacie (Rycina 13) podczas trzech sesji: habituacji, testu socjalnego (ang. sociability test) i testu nowości społecznej (ang. social novelty test, social recognition test), przeprowadzanych w ciągu 3 kolejnych dni. Aparat podzielony jest na 3 równe areny, przedzielone przegrodą, w której znajduje się wejście umożliwiające zwierzęciu swobodne przejście z jednego pomieszczenia do drugiego. Doświadczenie zostało wykonane przy użyciu lamp na podczerwień. Każda próba trwała 10 minut, w czasie których mysz mogła swobodnie eksplorować wszystkie strefy aparatu. W tym czasie zachowanie zwierzęcia jest nagrywane przez kamerę znajdującą się nad pudełkiem. Po każdej sesji podłogę areny oraz ściany czyszczono 70% roztworem etanolu. Na samym początku zwierzęta z grupy eksperymentalnej i kontrolnej były izolowane minimum 7 dni, pozostawione pojedynczo w klatce domowej.

Równocześnie, w ciągu 7 dni zwierzęta typu ‘dzikiego’ pełniące funkcje demonstratorów są przyuczane do pozostawiania pod cylindrem (średnica nie mniejsza niż 10 cm) na 20 min. Przyzwyczajanie do cylindra miało celu zminimalizowanie zachowania agresywnego oraz redukcję stresu związanego z przebywaniem w małym zamkniętym pomieszczeniu w czasie właściwego eksperymentu. Cylinder składa się z siateczki pozwalającej na kontakt węchowy, słuchowy i wzrokowy z osobnikami będącymi w eksperymencie. Po eksperymencie zwierzęta - demonstratorzy wracło do swoich klatek domowych i trzymane były w grupie. Dla każdej grupy i płci wykorzystano po 5 demonstratorów w trakcie trwania doświadczenia, które były wykorzystywane w sposób rotacyjny, aby pozwolić im na odpoczynek pomiędzy sesjami. Jeden demonstrator przypadał na dwie myszy badane (jedną kontrolną i jedną ze zmodyfikowanym genotypem) tej samej płci. Jeżeli demonstrator nr 1 był wykorzystany w trakcie trwania sesji dla myszy kontrolnej i następnie dla myszy eksperymentalnej nr 1 to następnie został ponownie wprowadzony na arenę dla myszy kontrolnej jak i badanej nr 6. Podczas habituacji myszy z grup analizowanych, przyzwyczajały się do pustych pomieszczeń i cylindrów (faza aktywnej eksploracji). Następnie, podczas sesji socjalizacji, badane osobniki były poddawane działaniu nowej myszy - demonstratora nr. 1 (dopasowanej pod względem płci, wagi i wieku) umieszczonej pod cylindrem w jednej komorze bocznej w porównaniu z nowym obiektem umieszczonym w przeciwległej komorze zewnętrznej. Preferencje w teście socjalizacji zostały zdefiniowane jako naturalne dla gryzoni zainteresowanie interakcją społeczną z innym zwierzęciem niż obiektem nieożywionym. Podczas testu nowości społecznej, badane osobniki były poddane działaniu uprzednio poznanej myszy – demonstrator nr.1, która znajdowała się w tej samej strefie pudełka, natomiast uprzednio użyty obiekt zastępowany był nową, nieznaną myszą – demonstrator nr. 2. Naturalną tendencją myszy w teście nowości społecznej jest wykazanie większego zainteresowania do nowych osobników pojawiających się w znanym środowisku niż do uprzednio poznanych. W przypadku testu socjalizacji, analizowano całkowity czas bezpośredniego kontaktu badanej myszy z demonstratorem nr 1 oraz z obiektem (wąchanie w bliskiej okolicy cylindra). Natomiast w teście nowości społecznej analizowano całkowity czas bezpośredniego kontaktu z osobnika badanego z demonstratorem nr 1 (znana mysz) oraz z demonstratorem nr 2 i wyrażony w sekundach. Dodatkowo przedstawiono wskaźnik socjalności i nowości społecznej według wzoru:

$$\text{Indeks socjalności} = \frac{T_{\text{społeczne}} - T_{\text{niespołeczne}}}{T_{\text{społeczne}} + T_{\text{niespołeczne}}}$$

gdzie:

$T_{\text{społeczne}}$ =czas spędzony na interakcji z bodźcem społecznym (np. innym zwierzęciem)

$T_{\text{niespołeczne}}$ =czas spędzony na interakcji z bodźcem niespołecznym (np. obiektem lub pustym obszarem)

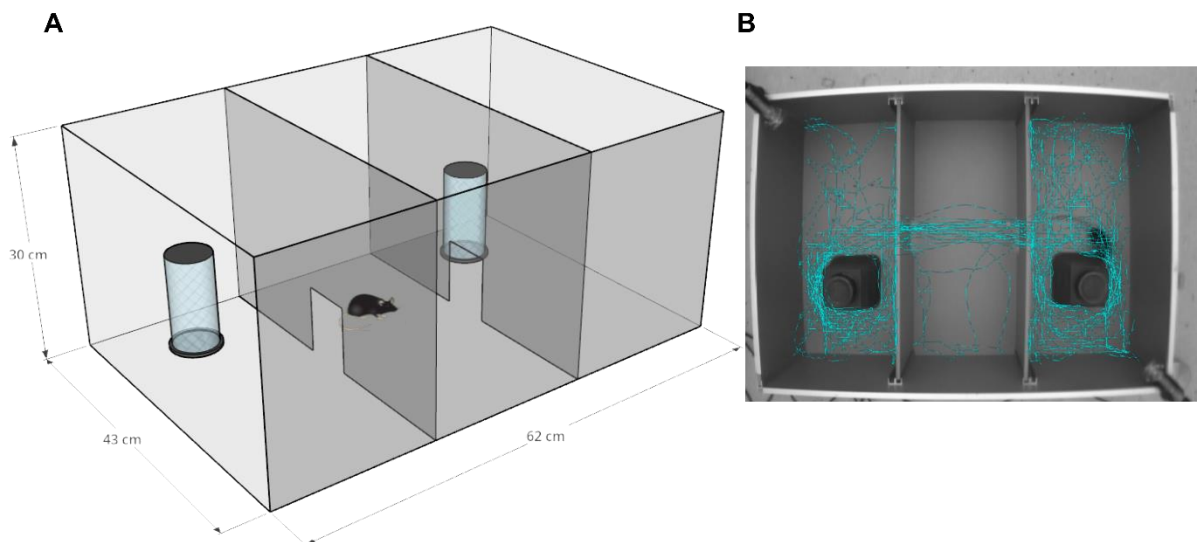
$$\text{Wskaźnik nowości społecznej} = \frac{T_{\text{nowa}} - T_{\text{znajoma}}}{T_{\text{nowa}} + T_{\text{znajoma}}$$

gdzie:

T_{nowa} =czas spędzony na interakcji z nowym bodźcem społecznym (np. nowym zwierzęciem).

T_{znajoma} =czas spędzony na interakcji ze znajomym bodźcem społecznym (np. znanym zwierzęciem).

Nagrania przeanalizowano przy użyciu funkcji manualnego wideotrackingu w oprogramowaniu EthoVision (wersja XT14, Noldus, Holandia).

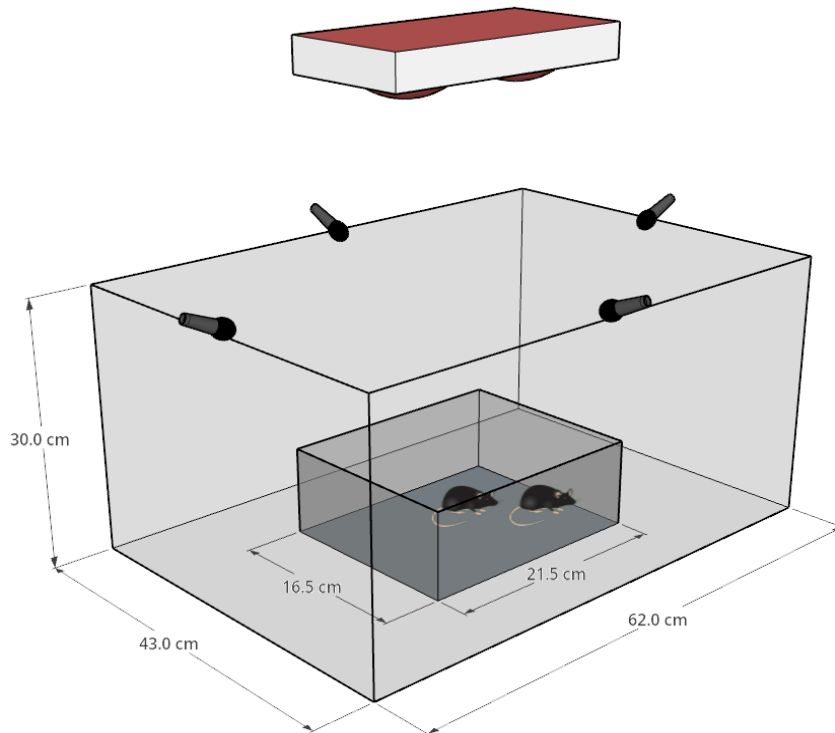


Rycina 13. Schemat aparatu do testu trójkomorowego

Wymiary aparatu użytego w teście (A). Widok z kamery zawieszony nad sprzętem oraz trajektoria przebytej przez przykładowego osobnika podczas 10 minutowej sesji (B).

3.6.6. Wokalizacji ultradźwiękowa (USV) indukowana interakcją socjalną

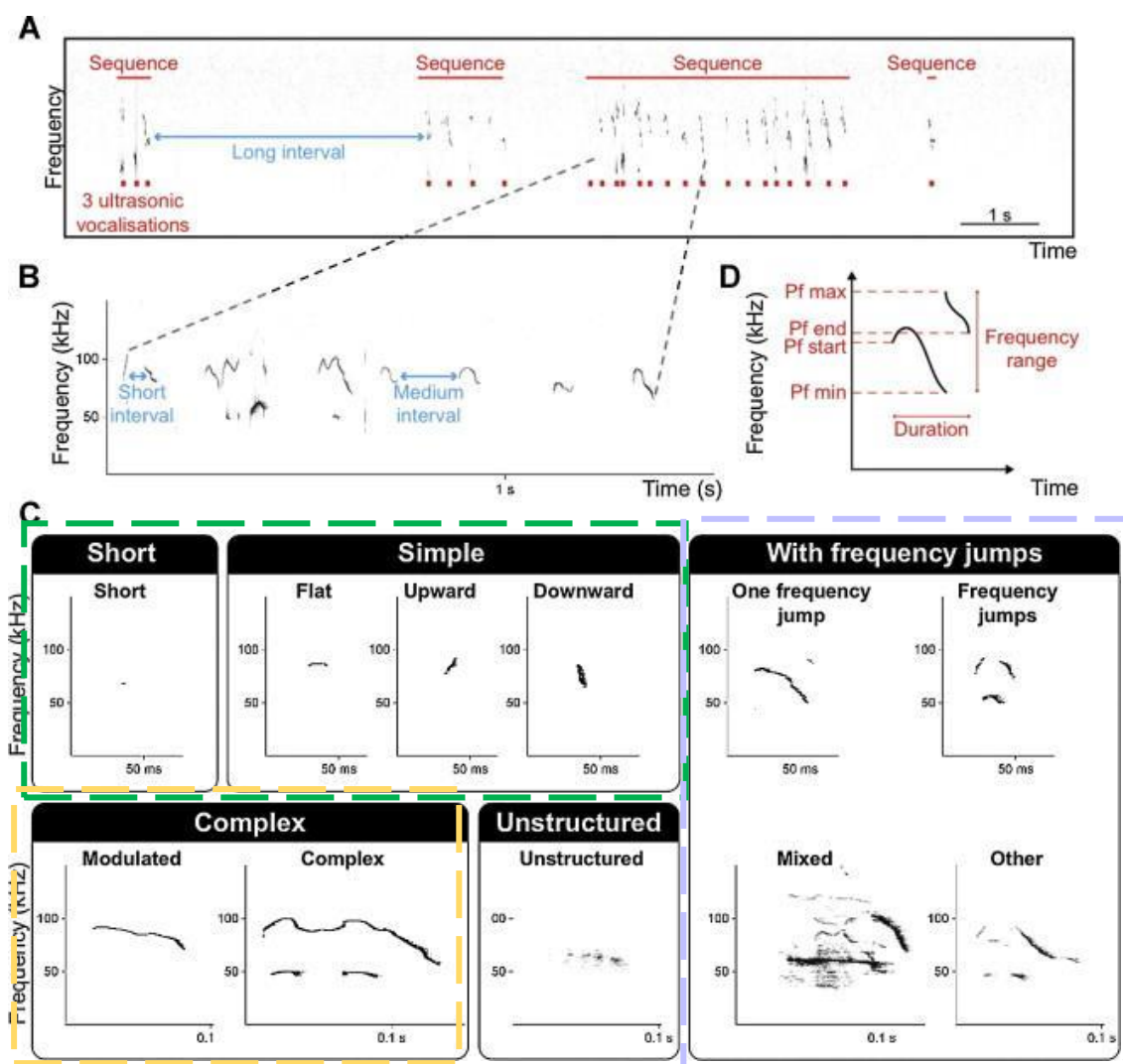
Test interakcji społecznych (ang. social interaction test, w skrócie SIT) i nagrania wokalizacji ultradźwiękowej przeprowadzono w przezroczystej klatce (21,5 cm x 16,5 cm), która została umieszczona w większym szarym pudełku (62 cm x 43 cm x 30 cm) z 4 mikrofonami (jeden na ściankę pudełka) umieszczonymi 21 cm nad podłogą (Rycina 14). Zwierzęta nagrano w ich fazie aktywnej, w pomieszczeniu z wyłączonym oświetleniem (lampa na podczerwień), aby zapewnić możliwie naturalne warunki sprzyjające wokalizacji w wyniku minimalizacji lęku związanego z nowymi oświetlonymi przestrzeniami (arena pudełka). Ze względu na charakter eksperymentu i brak narzędzi umożliwiających lateralizację dźwięku i przyporządkowanie wzoru wokalizacji dla każdego osobnika z pary, podjęto decyzję o modyfikacji protokołu. W eksperymencie nie użyto zwierząt-demonstratorów tak zwanych intruzów, ani klatek domowych rezydentów. Podczas jednego nagrania losowo sparowano dwie myszy tej samej płci oraz identycznym genotypie (zestawienie mutant-mutant vs kontrola-kontrola), aby łatwiej można było odróżnić wzór wokalizacji pod względem genotypu. Przed eksperymentem myszy były izolowane minimum 3 tygodnie. Dla każdej pary została użyta nowa, czysta klatka przetarta 70% roztworem etanolu.



Rycina 14. Schemat aparatu użytego podczas testu SIT połączonego z nagrywaniem USV

Przed właściwym testem każda mysz z pary miała możliwość eksploracji nowej areny przez 5 minut. Następnie, obie myszy z pary włożono równocześnie do pudełka w celu nagrania zachowań socjalnych w neutralnym dla nich środowisku. Przeanalizowano pierwsze 8 minut interakcji społecznych dla każdej myszy z pary za pomocą funkcji manualnego videotrackingu w oprogramowaniu EthoVision (wersja XT14, Noldus, Holandia). Do analizy uwzględniono zmienne takie jak: całkowitą liczbę i czas trwania zachowań społecznych oraz eksploracyjnych. Interakcje społeczne definiowano jako wszystkie zachowania afiliacyjne obserwowane w bliskim kontakcie (interakcje nos-nos, nos-ciało, obwąchiwanie obszaru anogenitalnego, pełzanie pod i nad osobnikiem, wzajemna pielęgnacja), zachowania dominujące takie jak śledzenie (podążanie za osobnikiem z jednoczesnym obwąchiwaniem obszaru anogenitalnego, (ang. fallowing), czy próba zdominowania drugiego osobnika poprzez skakanie bądź przytrzymywanie tułowia partnera i podgryzanie (ang. mounting behavior). Do zachowań eksploracyjnych zaliczono kopanie w podłożu (ang. digging) oraz stójki definiowane jako podnoszenie się myszy na tylnych łapkach do pozycji pionowej z możliwością podparcia przednich łapek o ścianę klatki (ang. rearing). Sprawdzone także ilość występujących epizodów czyszczenia futerka (ang. self-grooming).

Myszy do komunikacji socjalnej posługują się ultradźwiękami w zakresie częstotliwości pomiędzy 30-110 kHz (Holy and Guo, 2005). W literaturze wokalizacje ultradźwiękowe mogą być klasyfikowane na ponad 10 różnych kategorii. Najczęściej wybierane czynniki to podział wokalizacji ze względu na częstotliwość i czas trwania dźwięków oraz kształt spektrogramów (Rycina 15 i Rycina 16). Wokalizacje ultradźwiękowe były rejestrowane przez 20 min przy użyciu UltraSoundGate Condenser Microphone CM16 (Avisoft Bioacoustics, Berlin, Niemcy). Mikrofon był czuły na 15 - 180 kHz z płaską odpowiedzią częstotliwościową (± 6 dB) od 25 do 140 kHz. Podłączono je do wykonanego na zamówienie wzmacniacza zgodnie z następującymi parametrami technicznymi: wzmocnienie napięciowe 16 V/V (12 dB), odpowiedź częstotliwościowa $\pm 0,1$ dB, zakres 30 Hz - 10 kHz, impedancja wejściowa 600 Ω . Zmierzony sygnał był przetwarzany za pomocą wykonanego na zamówienie filtra antyaliasingowego o częstotliwości 120 kHz. Przefiltrowane dźwięki przesyłane były do płytki akwizycji danych PCI-703-16A (Eagle Technology, USA). Płyta była 14-bitową płytą wejść i wyjść analogowych 400 kHz dla systemów opartych na PCI. Zarejestrowane dane analizowano za pomocą wykonanego na zamówienie oprogramowania Ratrec PRO 7.0.

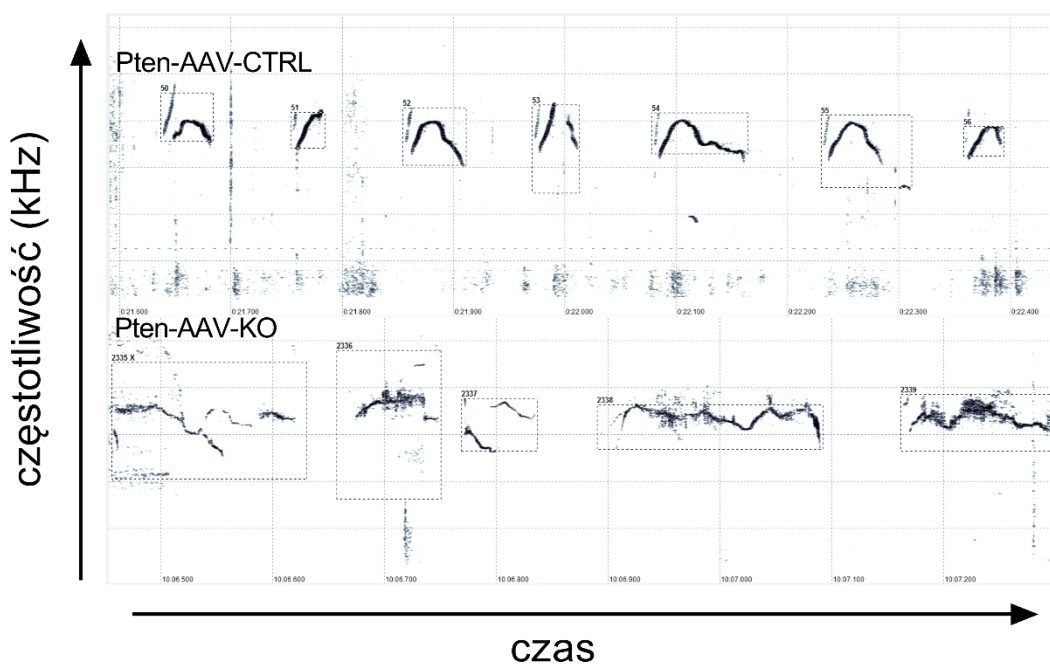


Rycina 15. Struktura wokalizacji ultradźwiękowych u myszy

Spektrogram przedstawiający przykładowe 4 sekwencje wokalizacji ultradźwiękowych u 4-dniowych osesków (A). Obraz pokazujący przybliżoną sekwencję i interwały pomiędzy dźwiękami (B). Kategorie ultradźwięków zaobserwowanych u gryzoni (C). Na potrzeby naszej analizy na zielono zaznaczone typy dźwięków, które sklasyfikowano do kategorii ‘krótkich’, na żółto epizody skategoryzowane jako ‘kompleksowe’ oraz epizody kompozytowe zaznaczone w fioletowej ramce. Zmienne akustyczne wykorzystywane do określenia struktury akustycznej każdego, zaobserwowanego epizodu tj. czas trwania, częstotliwość początkowa epizodu (PF Start) i końcowa (PF End), maksymalny (PF Max) i minimalny (PF Min) zakres częstotliwości dla jednego epizodu (D) (na podstawie [Elodie i wsp., 2013](#)).

Zmierzono typ i liczbę dźwięków, długość trwania, częstotliwość oraz amplituda dźwięku. Wszystkie sygnały dźwiękowe poddawano transformacji Fouriera w 1024-próbkowym ruchomym oknie Hamminga i wyświetlano w postaci spektrogramów ([Rycina 16](#)). Każdy sygnał został ręcznie oznaczony i następnie przeprowadzono analizę danych w oprogramowaniu R (w. 4.1.2) oraz RatRec Pro (w. 7.5). Do analizy uwzględniono zmienne takie jak: liczba wokalizacji ultradźwiękowych, typy epizodów sklasyfikowane według struktury na trzy kategorie: epizody krótkie (ang. short, jednoskładnikowe o czasie trwania

<100ms), epizody złożone (ang. complex, długie pojedyncze dźwięki o czasie trwania >100ms, przypominające w kształcie literę U lub odwróconą literę U i epizody kompozytowe (ang. composite, krótkie i długie dźwięki układające się w złożone wzory, o różnej częstotliwości powyżej 20kHz). Dodatkowo zmierzono parametry takie jak: entropia spektralna dźwięków (stopień nieuporządkowania dźwięków) i DTW mierzący podobieństwo dźwięków znajdujących się w bliskiej odległości od siebie.



Rycina 16. Przykładowy fragment spektrogramu z zaznaczonymi epizodami USV

Dźwięki krótkie, nagrane podczas socjalnej interakcji pomiędzy kontrolami (górny spektrogram) oraz dźwięki złożone nagrane podczas wokalizacji mutantów (dolny spektrogram). W kwadratach zaznaczony pojedyncze epizody.

3.7. POMIAR AKTYWNOŚCI ELEKTROFIZJOLOGICZNEJ NEURONÓW HIPOKAMPA

Skrawki hipokampa przygotowano zgodnie z wcześniej opisanym protokołem (Koza i wsp., 2019; Ting i wsp., 2014). Zwierzęta zostały znieczulone izofluranem i poddane perfuzji wewnątrzsercowej przy użyciu sztucznego płynu mózgowo-rdzeniowego ACSF (skład: 92 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 1 mM NaH₂PO₄; 1,3 mM MgCl₂; 26 mM NaHCO₃; 2,5 mM glukozy; 0,5 mM CaCl₂) w temperaturze 6 °C, wzbogaconego o 3 mM kwasu kynureninowego i 5 mM askorbinianu sodu (zmodyfikowany protokół z Ting i wsp., 2014) przez 3 minuty. Myszy zostały poddane dekapitacji, a mózgi ekstrahowano i pocięto w płaszczyźnie czołowej na skrawki o grubości 250 μm za pomocą wibratomu Leica VT 1200S. Podczas cięcia skrawki znajdowały się w specjalistycznej waniencie wypełnionej lodowatym roztworem NMDG (135

mM N-metylo-D-glukamina; 1,2 mM; KH₂PO₄; 1 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,5 mM CaCl₂, 20 mM wodorowęglanu choliny; 10 mM D-glukozy) i nadtlenowanego karbogenem (mieszanina 95% O₂ i 5% CO₂). Kolejnym etapem było przeniesienie pociętych skrawków mózgu do komory inkubacyjnej wypełnionej roztworem sztucznego płynu mózgowo-rdzeniowego ACSF (skład: 119 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1 mM NaH₂PO₄, 1,3 mM MgCl₂, 26 mM NaHCO₃, 20 mM glukozy, 2,5 mM CaCl₂) i inkubowanie przez 12 minut w 31°C, a następnie przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po tym czasie, skrawki umieszczono pod mikroskopem w komorze rejestracyjnej ze stałym przepływem roztworu ACSF ogrzanym do 31°C i wzbogaconym o 50 µM pikrotoksyny (Abcam). Za pomocą harfy do elektrofizjologii unieruchomiono skrawki i następnie zidentyfikowano docelowy obszar CA1 w hipokampie. Do rejestracji aktywności komórek wykorzystano technikę patch-clamp przy użyciu elektrody szklanej z borokrzemianu (opór 4–6 MΩ) używane do rejestracji całokomórkowej. Elektrody wypełniono roztworem elektrodowym potasowym (120 mM glukonian potasu, 10 mM; HEPES; 0,4 mM EGTA; 2 mM TEA-Cl; 2,5 mM; Na₂-ATP; 0,25 mM Na₃-GTP; 0,1 mM CaCl₂; osmolarność: 285–290 mOsm, pH = 7,0–7,1). W trakcie procesu monitorowano opór wejściowy (z ang. input resistance) i szeregowy (z ang. series resistance). Prądy zarejestrowano przy użyciu systemu Wavemetrics z wzmacniaczem (ELC-03XS npi) i przy wykorzystaniu przetwornika analogowo-cyfrowego (InstruTECH/HEKA), przetwarzając sygnał w 10 kHz i zastosowanym filtrowaniu przy 2 kHz. Rejestracje prowadzono w trybie ustalonego napięcia (z ang. current-clamp) przy potencje błonowym ustawianym na -60 mV. Pobudliwość neuronów została zarejestrowana z wykorzystaniem potasowego płynu elektrodowego. Potencjały czynnościowe zależne od aktywacji AMPAR wywoływano przez depolaryzacyjne prądy o rosnących amplitudach (0-600 pA, ze skokiem co 50 pA). Interwał międzyzdarzeniowy potencjałów czynnościowych (z ang. inter-event interval of action potentials), amplitudę szczytową, czas trwania potencjału czynnościowego przy połowie jego maksymalnej amplitudy (half-width), parametr szybkiej hiperpolaryzacji (fAHP, z ang. fast afterhyperpolarization) drugiego potencjału czynnościowego, wywołanego prądem 200 pA analizowano za pomocą oprogramowania Clampfit. Do pomiaru miniaturowych postsynaptycznych prądów pobudzających (mEPSCs) do roztworu ACSF dodano tetrodotoksynę w stężeniu 0,5 µM. Nagrania trwające od 10 do 25 minut zbierano w trybie ustalonego napięcia (z ang. voltage-clamp), aby zarejestrować co najmniej 200 zdarzeń mEPSCs. Amplitudę i częstotliwość miniaturowych zdarzeń analizowano za pomocą oprogramowania Clampfit. Pomiarów elektrofizjologicznych zebrano do analizy z fluorescencyjnych neuronów piramidowych z ekspresją eYFP. Badania elektrofizjologiczne

powstały we współpracy z Pracownią Plastyczności Neuronalnej (Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN).

3.8. BARWIENIE IMMUNOHISTOCHEMICZNE SKRAWKÓW MÓZGU

Myszy wprowadzono w stan głębokiej narkozy po dootrzewnowym podaniu mieszanki substancji takich jak ketamina i wodorotlenek medetomidyny. Następnie wprowadzono Morbital (Pentobarbital sodowy 133,3 mg/ml, Pentobarbital 26,7 mg/ml, 1-2 ml/kg) poprzez dootrzewnową iniekcję. Po sprawdzeniu braku reakcji odruchowych i zatrzymaniu akcji oddechowej, zwierzęta poddano procedurze utrwalenia tkanek do późniejszych barwień immunohistochemicznych i analiz mikroskopowych. Nacięto klatkę piersiową, w sposób ułatwiający łatwy dostęp do serca. Do lewej komory serca wprowadzono igłę, podłączoną do systemu wężyków wypełnionych roztworem 1 x PBS (tabletki PBS, BioShop, nr kat. PBS404.100). Następnie przecięto prawy przedsionek serca i wtłoczono do krwioobiegu 1 x PBS przy użyciu pompy perystaltycznej, w celu wypłukania z naczyń krwionośnych płynów ustrojowych. Następnie do krwioobiegu wprowadzono 4% roztwór paraformaldehydu o pH 7,4 (PFA, Chempur, 114321729). Wyizolowane mózgi przechowywano przez 24h w 4% paraformaldehydzie. Następnego dnia mózgi zanurzone w 0,04% roztworze paraformaldehydu i przechowywano w temperaturze 4°C, aż do momentu krojenia tkanki mózgowej. Mózgi pocięto na skrawki poprzeczne o grubości 50 µm na wibratomie Leica VT1000S w temperaturze pokojowej. Zebrane skrawki mózgu przechowywano w 1 x PBS z dodatkiem azydki sodu (0,001%, Sigma Aldrich, nr kat. 71289), w temperaturze 4°C.

3.8.1. Znakowanie immunohistochemiczne z użyciem DAB

Protokół barwienia przy użyciu 3'3- Diaminobenzyny DAB (Sigma Aldrich, nr kat. D4293-50SET) obejmował dwudniowe czynności wykonywane w temperaturze pokojowej (z wyjątkiem inkubacji z przeciwciałem I-rzędowym). Pierwszego dnia inkubowano przez 15 minut wybrane skrawki mózgu w mieszaninie 1xPBS/Metanol/30% H₂O₂, w stosunku 1:1:0,01, w celu zablokowania aktywności endogennych peroksydaz. Następnie skrawki przepłukano (po 2 x 5 min) w roztworze 1x PBS z dodatkiem 0,1% detergentu – Triton-X-100 (obj./obj.). Na etapie blokowania niespecyficznego wiązania się przeciwciał, użyto 5% surowicy świńskiej NSS/1xTBST (ang. normal swine serum, Vector Laboratories, nr kat. S4000), w której zanurzone skrawki na 30 minut. Do wykrycia białka Cre użyto I-rzędowe przeciwciało królicze (wyprodukowane w Zakładzie Biologii Molekularnej Komórki I, DKFZ, Heidelberg), które rozcieńczono (1:3000) w roztworze 1 x PBST

z dodatkiem 5% NSS i pozostawiono na kołysce, na nocną inkubację w 4°C. Do oznakowania ufosforylowanej pozycji S235/236 kinazy rybosomalnej S6 w użyto I-rzędowe przeciwciało królicze (nr kat. #2211; Cell Signaling Technology), które rozcieńczono w stosunku 1:1000 w 1x PBST z dodatkiem 5% NSS i także pozostawiono na nocną inkubację w 4°C. Drugiego dnia płytki z skrawkami płukano w 1 x PBST (3 x 15min), a następnie inkubowano z II-rzędowym biotynylowanym przeciwciałem, skierowanym przeciwko antygenom króliczym (nr kat. BA-1000, Vector Laboratories), które rozcieńczono w stosunku 1:400 i inkubowano przez 30 min. Po etapie płukania w 1 x PBST (3 x 5min), skrawki mózgu inkubowano przez 30 min w roztworze ABC przygotowanym zgodnie z zaleceniami producenta (nr kat. PK-4000, Vector Laboratories). Po kolejnym etapie płukania w roztworze 1x PBST (1 x 5min) i 1x PBS (2 x 5 min) skrawki mózgu były gotowe do barwienia przy użyciu roztworu DAB. Czas inkubacji dobrano indywidualnie do szybkości zachodzącej reakcji barwnej. Reakcję zablokowano poprzez dodanie wody z kranu, a następnie szybkim ściągnięciem całego roztworu z dołków i powtórnego zalania wodą z kranu. Skrawki mózgu nakładano na szkiełka podstawowe (nr kat. 631-0848, SuperFrost Plus, Thermo Scientific) i pozostawiono do wyschnięcia. Po kilku godzinach zatopiono skrawki w Entellan (nr kat. 107960, Sigma Aldrich) zakrywając je szkiełkiem nakrywkowym (nr kat. B-1220, Menzel Glaser, Thermo Scientific). Preparaty przechowywano w nieprzepuszczalnym dla promieni słonecznych pudełku w temperaturze pokojowej.

3.9. ANALIZA POZIOMU BIAŁEK METODĄ WESTERN BLOT

Myszy wprowadzono w stan głębokiej narkozy po dootrzewnowym podaniu mieszanki substancji takich jak ketamina i wodorotlenek medetomidyny (zgodnie z opisem w podrozdziale 3.5.2). Następnie zaaplikowano Morbital (Pentobarbital sodowy 133,3 mg/ml, Pentobarbital 26,7 mg/ml, 1-2 ml/kg) dootrzewnowo. Po potwierdzeniu braku reakcji odruchowych oraz zatrzymaniu akcji oddechowej, izolowano mózg, który następnie przepłukano zimnym roztworem PBS. Każdy wyizolowany mózg został ręcznie homogenizowany za pomocą homogenizatora w 1 ml buforu RIPA, zawierającego inhibitory proteaz w stosunku 1:100 (zgodnie z zaleceniami producenta). Po homogenizacji próbki inkubowano na lodzie przez 15 minut, a następnie wirowano przez 20 minut przy 12 000 rpm w temperaturze 4°C. Otrzymany nadsącz z natywnymi białkami przeniesiono do świeżych próbek i zamrożono w -80°C. Przed przystąpieniem do analizy, stężenie całkowitego białka zostało zmierzone metodą BCA (kwas bicynchoninowy i siarczan miedzi) z użyciem urządzenia Qubit. Przed przystąpieniem do analizy metodą Western Blot, próbki rozmrożono

i białka poddano procedurze denaturacji poprzez dodanie 4-krotnie stężonego buforu Laemmli (240mM Tris-HCL pH 6,8, 6% SDS, 30% glicerol, 0,04% błękit bromofenolowy, 16% β -merkaptotanol) a następnie mieszano przy użyciu vortexu i podgrzano przez 5 min w temp 98°C.

Przygotowane homogenizaty białkowe o stężeniu 10 μ g nałożono do każdej studzienki w aparacie przeznaczonym do elektroforezy. Do rozdziału białek wykorzystano protokół i zestaw odczynników od Mini-PROTEAN Tetra Cell. Początkowy etap migracji lizatów następuje na 8% żelu akrylamidowym zagęszczającym (0,1M Tris-HCL pH 6,8, 30% Akrylamid/Bis-akrylamid, 0,2% TEMED, 0,06% APS) prowadzony przy 80V, około 15 min, a w momencie wejścia lizatów w 12,5% żel akrylamidowy rozdzielający (0,5 M Tris-HCL, pH 8,8, 12,5%, 30% akrylamid/Bis, 0,2% TEMED, 0,06% APS) zwiększono napięcie do 150V. Rozdział prowadzono w temperaturze pokojowej przez około 1,5h, w buforze do elektroforezy białek (25mM Tris, 192 mM glicyny, 0,1% SDS).

Początkowo przygotowano membranę PVDF (0,45 μ m, Milipor) i aktywowano ją w metanolu (100% metanol przez 15s i następnie płukanie w ultraczystej wodzie przez 2 min), a następnie przed transferem inkubowano na szelkerze w 1x buforze do transferu (48mM Tris, 39mM glicyna, 0,0375% SDS, 20% metanol) na 5 minut. Żel SDS-PAGE z rozdzielonymi białkami przyłożono do membrany i odseparowano od elektrod warstwami bibuły filtracyjnej. Przeniesienie frakcji białek z żelu na membranę PVDF nastąpiło metodą transferu półsuchego w aparacie Trans-Blot SD (Bio-Rad) i prowadzono przez 1h przy stałym napięciu 20V

Membrany blokowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej w buforze blokującym (10% odtłuszczone mleko w TBS z 0,1% Tween-20), a następnie inkubowano z przeciwciałem pierwszorzędowym anti-Pten (Cell Signaling, nr kat. #9188) w buforze blokującym, przez noc w temperaturze 4°C na kołyszce laboratoryjnej. Przeciwciało rozcieńczone w stosunku 1:1000. Kolejnego dnia membrany przepłukiwano 3 x 10min w buforze TBS z dodatkiem 0,1% Tween-20. Po tym czasie membrany inkubowano w roztworze odpowiednich drugorzędowych przeciwciał anti-królicze skoniugowane z peroksydazą chrzanową (HRP, ang. horseradish peroxidase, Cell Signaling, nr kat. 7076S) rozpuszczonych w buforze blokującym w stosunku 1:10000 (10% odtłuszczone mleko w TBS z 0,1% Tween-20). Niezwiązane przeciwciała przepłukano 3-krotnie (po 10 min) w buforze TBS+0,1% Tween-20 (TBST). Chemiluminescentna detekcja sygnału była przeprowadzana po 2 minutowej inkubacji z wymieszanymi substratami HRP Immobilon Western (Sigma Aldrich, nr kat. WBKLSO100)

w stosunku 1:1, zobrażowana przy pomocy systemu ChemiDoc (Bio-Rad) w aparacie Syngene G:box F3 Fluorescence Imaging System. Następnie membrany poddano chemicznemu oderwaniu związanych przeciwciał (ang. stripping) poprzez 2-krotne wypłukanie w buforze do strippingu (0,2M glicyna, 0,1% SDS, 1% Tween 20, pH 2,2) przez 10 minut, następnie poddane 2-krotnej 10 min inkubacji w PBS i 2-krotnej 5 minutowej inkubacji w buforze TBST. Po tym etapie membrany były gotowe do ponownego blokowania (przez 1h) a następnie inkubowano z przeciwciałem pierwszorzędowym monoklonalnym anti-alfa Tubulina (DSHB, nr kat 12G10) rozcieńczonym w stosunku 1:1000. Wykrywanie i wizualizację alfa Tubuliny przeprowadzono analogicznie do powyżej opisanych procedur.

Analiza densytometryczna była przeprowadzana z użyciem oprogramowania ImageLab. Porównano wartości densytometrycznej danego prążka do odpowiadającej mu kontroli ilościowej według wzoru:

$$W_{\text{śr}} = \frac{W_{\text{badane}}}{W_{\text{kontrola}}}$$

gdzie $W_{\text{śr}}$ to średnia wartość densytometryczna, W_{badane} wartość densytometryczna badanego białka, a W_{kontrola} wartość densytometryczna kontroli.

W przypadku białek fosforylowanych, najpierw wartość densytometryczna formy fosforylowanej jak i całkowitej zostały przyrównane do odpowiedniej kontroli ilościowej, a następnie uzyskane średnie wartości densytometryczne formy fosforylowanej do formy całkowitej według wzoru:

$$W_{\text{śr}} = \frac{\left(\frac{W_{\text{fosforylowane}}}{W_{\text{kontrola}}} \right)}{\left(\frac{W_{\text{całkowite}}}{W_{\text{kontrola}}} \right)}$$

3.10. ANALIZA STATYSTYCZNA DANYCH

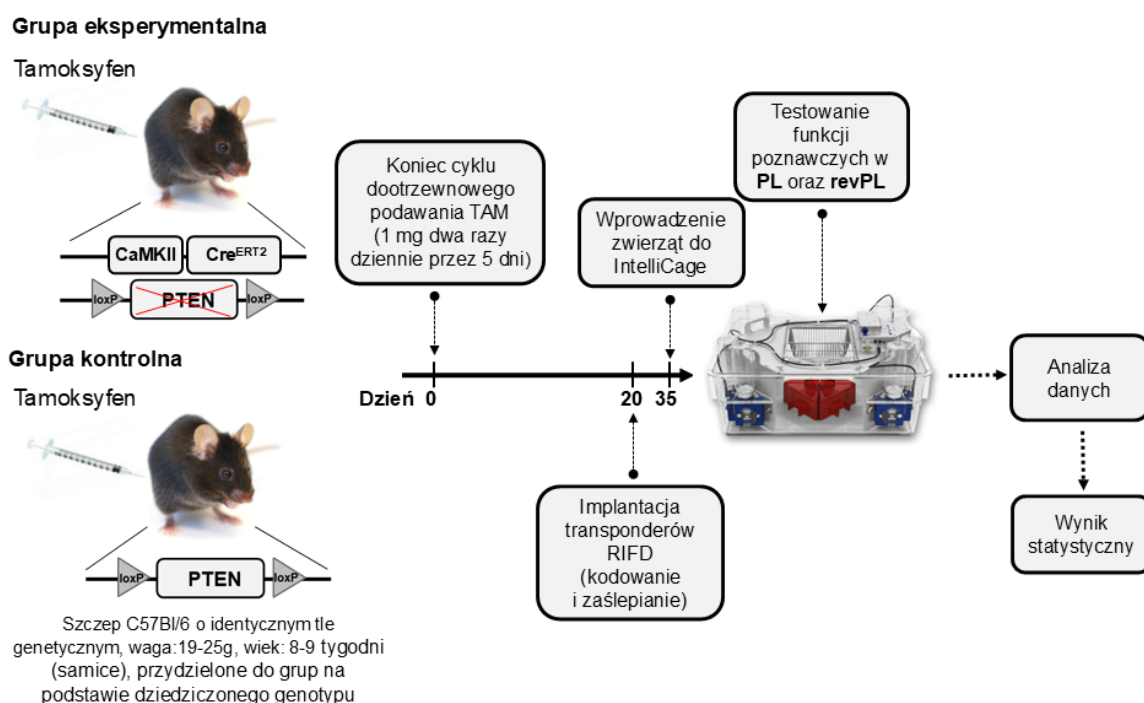
Parametry behawioralne poddano analizie statystycznej przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism 9 (wersja 9.3.1). Badane grupy eksperymentalne (samice i samce) były analizowane oddzielnie i porównane do swoich grup kontrolnych. Analiza wariancji (ANOVA) dla powtarzanych pomiarów została użyta do porównania wydajności uczenia się w czasie (czynnik zależny) pomiędzy dwoma niezależnymi grupami (CTRL vs. KO) w IntelliCage. Dwuczynnikowa ANOVA została użyta do porównania interakcji socjalnych i sprawdzono parametr genotyp i czas spędzony z analizowanym obiektem lub partnerem/ami

socjalnym/i (socjalności i nowości społecznej przy założeniu, że dane miały rozkład normalny). mierzonych w 3 pomiarach czasowych (oszacowania wpływu mutacji postępujący w czasie na aktywność neuronów hipokampa) i komunikacji socjalnej mierzonej na podstawie ilości zarejestrowanych ultradźwięków, jak również pozostałe parametry społeczne i eksploracyjne w grupach niezależnych (samice CTRL vs. KO). Niesparowany dwuogonowy test t został użyty do porównania średnich dwóch niezależnych grup w celu określenia istotnych różnic pomiędzy parametrami uzyskanymi w teście otwartego pola, w teście wzniesionego labiryntu krzyżowego, w teście bezpośrednich interakcji socjalnych (uwzględnione odrębnie dla każdego punktu czasowego). Dla zmiennych, które nie charakteryzują się rozkładem normalnym zastosowano testy nieparametryczne, takie jak test sumy rang Manna-Whitneya (odpowiednik dla testu t Studenta) lub test Kruskala-Wallisa (odpowiednik dla ANOVA). Jeżeli jedna z analizowanych grup nie spełnia założeń równości wariancji, zastosowano testy nieparametryczne takie jak niesparowany test t Studenta z poprawką Welcha lub testy Welch ANOVA. Dodatkowo zastosowano testy typu post-hoc do porównań wielokrotnych z korektą Bonferroniego, najmniejszą istotną różnicę Fishera lub nieparametryczny test Dunna. Poziom istotności ustalono na $p < 0,05$ (95% przedział ufności).

4. WYNIKI

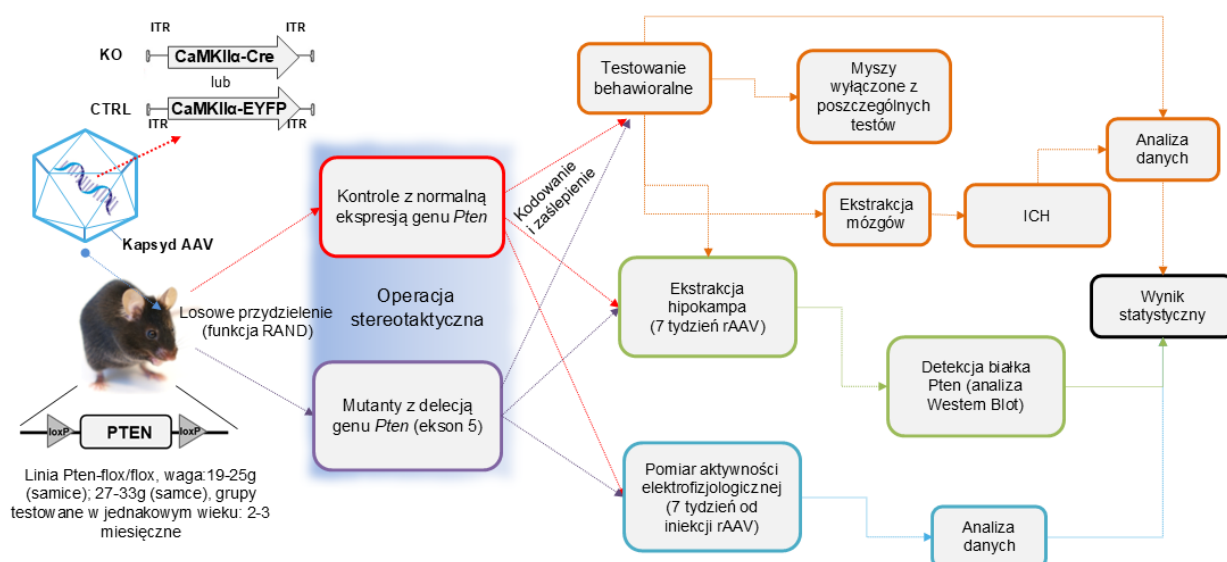
4.1. UZYSKANIE MODELI UTRATY AKTYWNOŚCI GENU *PTEN* W NEURONACH POBUDZAJĄCYCH U DOROSLEJ MYSZY

Pierwszy model myszy wykorzystany na potrzeby tego projektu jest linia *Pten-flox/flox*, *CaMKII α -CreER^{T2}* (opisany jako *Pten-iCKO*). Grupę doświadczalną (n=8) stanowiły homozygotyczne samice pod względem zmodyfikowanego genu *Pten* (ekson 5) oraz heterozygotyczne pod względem genu *CreER^{T2}*. Delecja genu *Pten* ograniczona była do neuronów pobudzających przodomózgowia (Erdmann i wsp., 2007). Grupę kontrolną (n=8) tworzyły samice homozygotyczne pod względem zmodyfikowanego genu *Pten-flox/flox*, które nie posiadały w swoim genomie allelu z wariantem *CreER^{T2}*. Dwudziestego dnia po zakończeniu cyklu podawania tamoksyfenu zwierzęta uśpiono za pomocą izofluranu, a następnie podskórnie wszczepiono transpondery w okolicy górnej części grzbietu (Rycina 17). Transpondery umożliwiały identyfikację zwierząt w systemie IntelliCage. Po zakończonym zabiegu, klatki domowe ze zwierzętami umieszczono w pokoju z systemem IntelliCage, gdzie myszy przyzwyczajano do odwróconego cyklu dobowego. Eksperyment w IntelliCage przeprowadzono zgodnie z protokołem opisanym w rozdziale 3.6.1.



Rycina 17. Schemat eksperymentu przeprowadzonego na transgenicznej linii *Pten-iCKO*
PL-test preferencji miejsca, revPL- odwrócony test preferencji miejsce (przyuczania do nowego rogu)

Natomiast w celu stworzenia modelu z usunięciem genu *Pten* w neuronach pobudzających wyłącznie w strukturze hipokampa i DG, u dorosłych myszy, wykorzystano rAAV. Grupę badaną i kontrolną stanowiła homozygotyczna linia *Pten-flox/flox*. Zarówno samicom i samcom podano domózkowo odpowiednie rekombinowane wektory wirusowe. Do generacji mutacji w genie *Pten* zastosowano plazmid wykorzystywany do produkcji rAAV, zawierający gen *Cre*, ulegający transkrypcji pod promotorem *CaMKII α* (mutanty *Pten-AAV-KO*). W grupie kontrolnej wykorzystano plazmid zawierający gen reporterowy – białko żółtej fluorescencji, które także ulega transkrypcji pod promotorem *CaMKII α* (*Pten-AAV-CTRL*) opisane w podrozdziale 3.4. Wszystkie testy przeprowadzone na tym modelu zostały przedstawione poniżej (Rycina 18) i (Rycina 19).



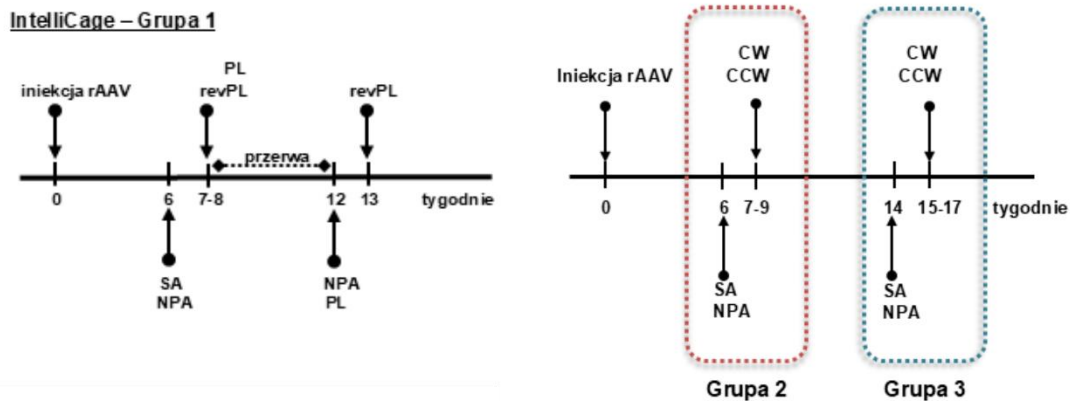
Rycina 18. Schemat eksperymentu przeprowadzony na transgenicznej linii *Pten-flox/flox*
CTRL=grupa kontrolna; ICH=barwienie immunohistochemiczne; KO=grupa eksperymentalna z delecją genu *Pten*

Funkcje poznawcze przeanalizowano w IntelliCage na trzech kohortach samic linii *Pten fl/fl* po iniekcji domózkowej. W pierwszej kohorcie (CTRL $n=7$, KO $n=7$) samic przeprowadzono test preferencji miejsca (PL) oraz ponowne uczenie do nowego miejsca (revPL) w 7 i 13 tygodniu po indukcji mutacji. Druga kohorta (CTRL $n=15$, KO $n=$) została poddana analizie budowania gniazda pod kątem zachowań autystycznych na początku 6 tygodnia (na dwa dni przed umieszczeniem w IntelliCage) oraz ponownie w 15 tygodniu. W IntelliCage przeprowadzono na tych samicach test patrolowania (CW i CCW) w 7 tygodniu po iniekcji rAAV. Trzecia kohorta samic (CTRL $n=9$, KO $n=12$) była analizowana pod kątem patrolowania (CW i CCW) w 15. tygodniu po iniekcji (Rycina 19).

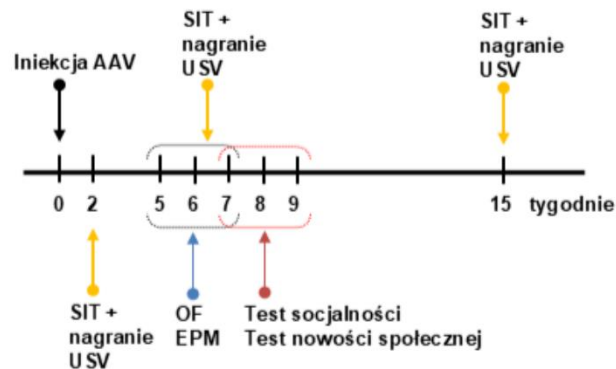
Zarówno samice, jak i samce Pten-AAV-KO oraz ich grupy kontrolne były poddane standardowym paradygmatom behawioralnym, obejmującym ocenę ogólnej aktywności, poziomu lęku, pamięci społecznej i interakcji społecznych. Testy przeprowadzono między 5 a 10 tygodniem po iniekcji rAAV w następującej kolejności: testy sensomotoryczne, test otwartego pola (OF), test poziomu lęku w podwyższonym labiryncie krzyżowym (EPM) oraz badanie interakcji społecznych i nowości społecznej w aparacie trójkomorowym (Rycina 19). W przypadku trzeciej kohorty test OF i EPM przeprowadzono na końcu serii. Zwierzęta podzielono na osobne kohorty (samice CTRL n=34, KO n=32; samce CTRL n=31, KO n=27). Jedna grupa samców (CTRL n=9, KO n=12) została wykluczona z analizy interakcji społecznych i nowości społecznej z powodu agresywnego zachowania myszy pełniących funkcję demonstratorów, co odnotowano podczas analizy nagrań. Ponadto, tylko dwie kohorty samic były poddane testowi EPM (CTRL n=23, KO n=23) z powodu remontu pokoju behawioralnego i zamknięcia laboratorium. Dodatkowo, kilka osobników wykluczono z analizy behawioralnej ze względu na wystąpienie epilepsji.

Analiza interakcji społecznych (SIT) z jednoczesną rejestracją wokalizacji ultradźwiękowej została przeprowadzona zarówno na samicach, jak i samcach. Jednakże samce nie wykazywały wokalizacji i nie zostały uwzględnione w tej części analizy. Samice (CTRL n=16, KO n=16) były testowane w trzech punktach czasowych: 2, 6 i 15 tygodniu od iniekcji rAAV. Przed rozpoczęciem serii testów behawioralnych myszy poddano tygodniowemu oswajaniu (ang. handling), co pozwoliło na zmniejszenie poziomu lęku u zwierząt, minimalizując jego negatywny wpływ na wyniki behawioralne.

A



B



Rycina 19. Schemat doświadczeń behawioralnych, przedstawionych na osi czasu

Trzy kohorty samic *Pten*-AAV-KO i kontrole zostały poddane testowaniu w automatycznych IntelliCage (A). Samice i samce przetestowano w konwencjonalnych testach w określonym czasie od iniekcji rAAV (B).

4.2. OCENA ZDOLNOŚCI POZNAWCZYCH MUTANTÓW Z USUNIĘTYM GENEM *PTEN*

Na podstawie poznanej wiedzy na temat modulatorów mechanizmów wewnątrzkomórkowych regulujących aktywność ścieżki sygnalizacyjnej PI3K-AKT-mTOR wybrano na cel mutacji gen *Pten*. Jednym z głównych celów niniejszej pracy doktorskiej było określenie, w jaki sposób delecja genu *Pten* w dojrzałych neuronach przodomózgowie wpływa na procesy uczenia się i pamięci. Wcześniejsze doniesienia sugerowały, że podwyższona aktywność szlaku PI3K-AKT-mTOR może być skorelowana z efektywniejszym uczeniem się (Konopka i wsp., 2010). Aby zweryfikować tę hipotezę, wykorzystano transgeniczną linię myszy *Pten^{fl/fl}*, *CaMKII α Cre-ER^{T2}* (w skrócie *Pten-iCKO*, opisana w podrozdziale 3.2, 3.5.1 i 4.1), na której wykonano szereg testów kognitywnych w klatkach IntelliCage.

4.2.1. Wpływ usunięcia genu *Pten* na uczenie się i pamięć u samic Pten-iCKO

Mutację aktywowano poprzez dootrzewnowe podanie tamoksyfenu (TAM) 8–9-tygodniowym samicom szczepu C57Bl/6. Grupa badana ($Pten^{fl/fl}$, CaMKII α Cre-ER^{T2}; n=8) oraz grupa kontrolna ($Pten^{fl/fl}$; n=8) zostały następnie poddane analizie w klatkach IntelliCage w 5 tygodniu po podaniu TAM.

4.2.1.1. Test preferencji miejsca (PL)

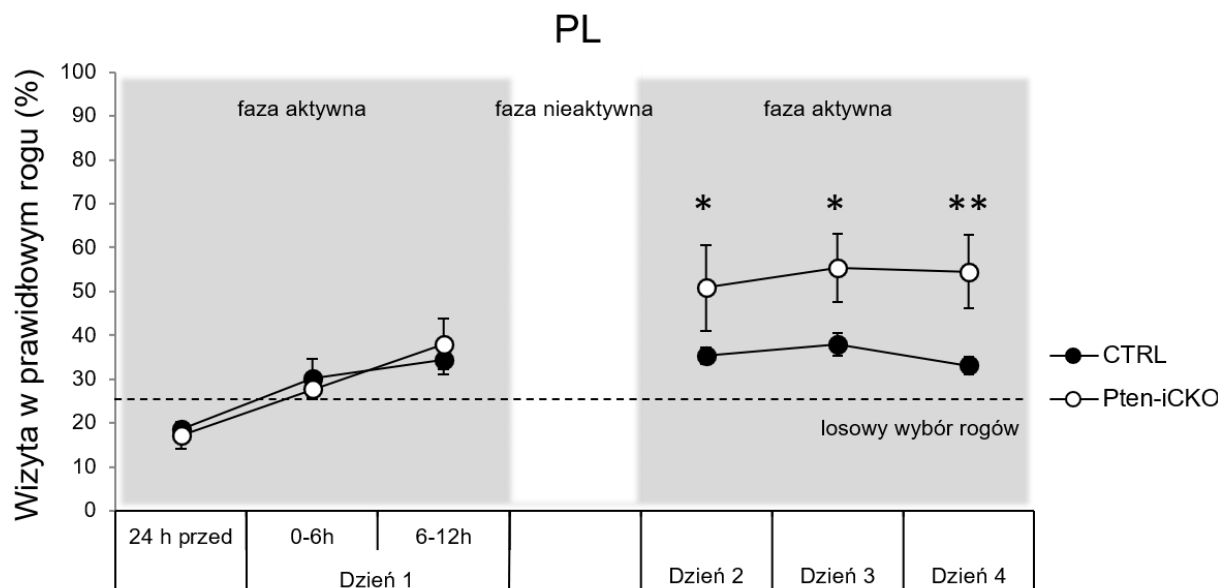
Podczas adaptacji do klatki IntelliCage (materiały i metody 3.6.1.) zastosowano 10% roztwór sacharozy jako bodziec apetytywny. Następnie wykonano test preferencji miejsca (PL, ang. place learning preference), służący ocenie pamięci przestrzennej zależnej od hipokampa (Konopka i wsp., 2010). W ramach tego testu zwierzęta uczyły się lokalizacji „poprawnego” rogu, jednego z czterech w klatce IntelliCage, kojarzonej z możliwością picia słodkiej wody. Każda mysz miała przypisany „poprawny” róg (z dostępem do słodzonej wody), wybrany tak, by wyeliminować efekt grupowego uczenia się (Kiryk i wsp., 2011). Podczas ostatniej doby testu w NPA zidentyfikowano róg o minimalnej liczbie wizyt (co wskazywało, że dana mysz nie preferuje tego rogu) i ustalono go jako „poprawny”. Dodatkowo wprowadzono zasadę, aby co najmniej dwóm zwierzętom przypisać ten sam róg w celu wyeliminowania efektu „podążania” za innymi osobnikami (Kiryk i wsp., 2011).

Następnie analizowano wyniki testu PL (4 kolejne dni). Dla każdego osobnika obliczono stosunek wizyt zakończonych włożeniem nosa w sensor (ang. nosepoke) w „poprawnym” rogu do łącznej liczby wizyt w ciągu 12-godzinnej fazy aktywnej (9:30–21:30). Ponieważ myszy mają naturalną tendencję do eksploracji ciasnych przestrzeni takich jak rogi w klatce, do obliczeń włączono tylko te wizyty, które były zakończone włożeniem nosa w sensor, sygnalizując chęć napicia się w danym rogu. Liczbę poprawnych odpowiedzi wyrażono w procentach dla każdego zwierzęcia, a następnie obliczono średnią wartość dla grupy wraz z SEM (Rycina 20).

Zarówno osobniki kontrolne, jak i mutanty Pten-iCKO nauczyły się pozycji prawidłowego narożnika, przekraczając próg losowości, który wynosił 25%. Analiza wariancji w układzie powtarzalnych pomiarów (ANOVA) ujawniła statystycznie zmienne różnice w uczeniu się zwierząt między badanymi grupami w teście PL [$F(1, 14) = 4,976$, $p = 0,04$]. Analiza post-hoc Fishera NIR wykazała statystycznie znamienne różnice pomiędzy genotypami w zapamiętywaniu pozycji poprawnego rogu. W porównaniu z kontrolą, Pten-iCKO miały

lepsze wyniki o około 15,5% podczas drugiego ($p = 0.02$), 17,3% podczas trzeciego ($p = 0.03$) i 21,4% podczas czwartego ($p = 0.001$) dnia uczenia się w teście PL.

Wyniki wskazują, że usunięcie genu *Pten* w dojrzałych neuronach hipokampa może przekładać się na poprawę pamięci przestrzennej. Obserwowany fenotyp był wyraźny już od drugiego dnia testu, co sugeruje szybsze tempo uczenia się u *Pten*-iCKO w porównaniu do grupy kontrolnej.



Rycina 20. Dynamika uczenia się i rozwoju pamięci zależnej od hipokampa w teście preferencji miejsca (PL) w IntelliCage

Samice *Pten*-iCKO ($n=8$) wykazywały ~15–21% lepszą pamięć przestrzenną niż kontrolne ($n=8$) od drugiego do czwartego dnia testu ($p < 0.05$). Wykres przedstawia średnią \pm SEM (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

CTRL = grupa kontrolna *Pten*^{fl/fl}; *Pten*-iCKO = *Pten*^{fl/fl}, CaMKII α Cre-ER^{T2}

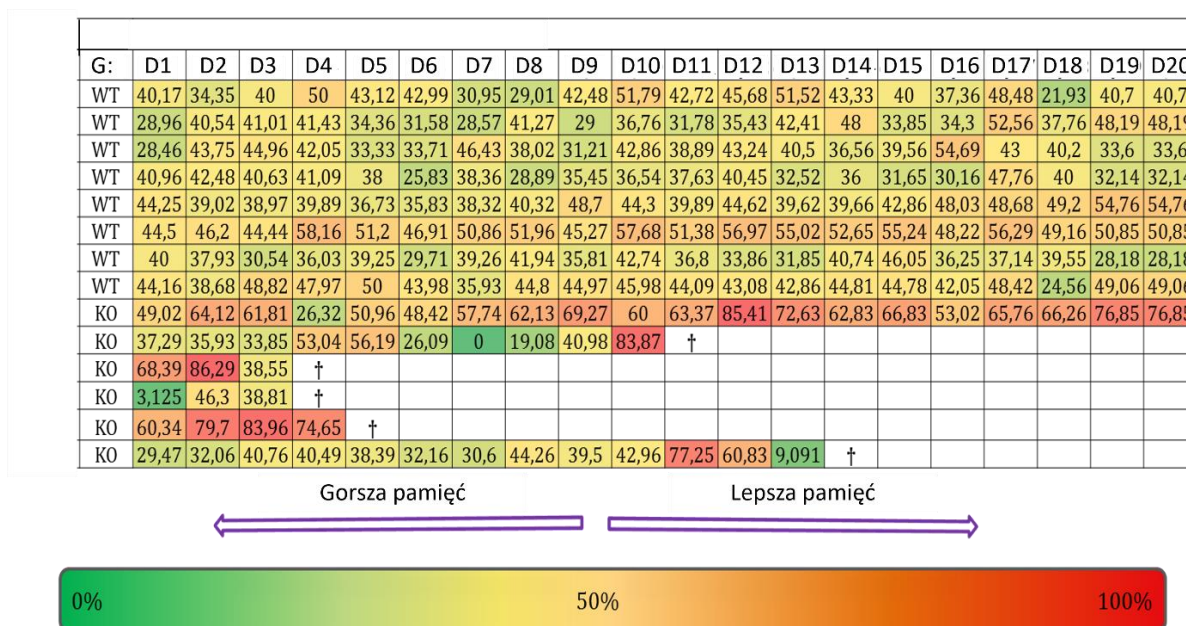
4.2.1.2. Test preferencji nowego miejsca (revPL)

W celu oceny zdolności przeuczania się przeprowadzono test preferencji nowego miejsca (revPL, ang. reversal place learning preference). Dotychczas „poprawny” róg zastąpiono „najmniej preferowanym” z fazy PL.

Test revPL miał na celu ocenę dynamiki kodowania informacji o nowym położeniu nagrody (ang. memory recoding) oraz zdolności myszy do wygaszenia pamięci o poprzednim położeniu nagrody (ang. memory extinction). Zarówno w badaniach pilotażowych, jak i w trakcie właściwego etapu eksperymentu revPL, zaobserwowano przedwczesną śmierć myszy *Pten*-iCKO między 7 a 13 tygodniem po indukcji mutacji. Wymusiło to wprowadzenie modyfikacji protokołu, polegających na wydłużeniu czasu trwania testu do 20 dni, aby umożliwić obserwację zachowań tych mutantów mimo ich pogarszającej się kondycji fizycznej.

U zwierząt stwierdzono utratę masy ciała, co najprawdopodobniej wynikało z niechęci do przyjmowania pokarmu. Fenotyp ten mógł być związany z usunięciem genu *Pten* w strukturach odpowiedzialnych za regulację głodu i sytości. Dalsza analiza tego zjawiska nie była jednak przedmiotem badań w ramach niniejszej rozprawy. Z uwagi na przedwczesną śmierć zwierząt nie było możliwe przeprowadzenie pełnej analizy statystycznej wyników eksperymentu revPL; uzyskane dane mają zatem wyłącznie charakter opisowy.

W ramach testu revPL, u pięciu z sześciu myszy *Pten*-iCKO, które padły w trakcie trwania testu, zaobserwowano poprawę pamięci przestrzennej w ciągu 24–48 godzin poprzedzających śmierć. Z kolei jedna samica *Pten*-iCKO, która przeżyła, uzyskała jeden z najlepszych wyników w zapamiętywaniu nowej poprawnej lokalizacji rogu, osiągając ponad 76% prawidłowych wizyt. Dla porównania, żadna z myszy kontrolnych monitorowanych przez 20 dni trwania testu nie przekroczyła progu 60% poprawnych wizyt (Rycina 21).



Rycina 21. Dwudziestodniowy test preferencji nowego miejsca (revPL) w IntelliCage

U samic *Pten*-iCKO zaobserwowano wyraźny wzrost skuteczności w rozpoznawaniu lokalizacji nowego rogu (do ~84%) tuż przed zgonem (oznaczonym krzyżykiem †). G- genotyp, D-dzień, WT – typ dziki *Pten*fl/fl bez modyfikacji, KO- *Pten*-iCKO injected with TAM.

Dane opisowe wskazują, że *Pten*-iCKO mogą wykazywać bardzo dobrą umiejętność rekodowania informacji przestrzennej nawet w pogarszającym się stanie fizycznym. Jednocześnie wysoka śmiertelność ogranicza możliwość pełnej analizy zdolności kognitywnych.

4.2.2. Oszacowanie wpływu mutacji *Pten* na przeżywalność zwierząt

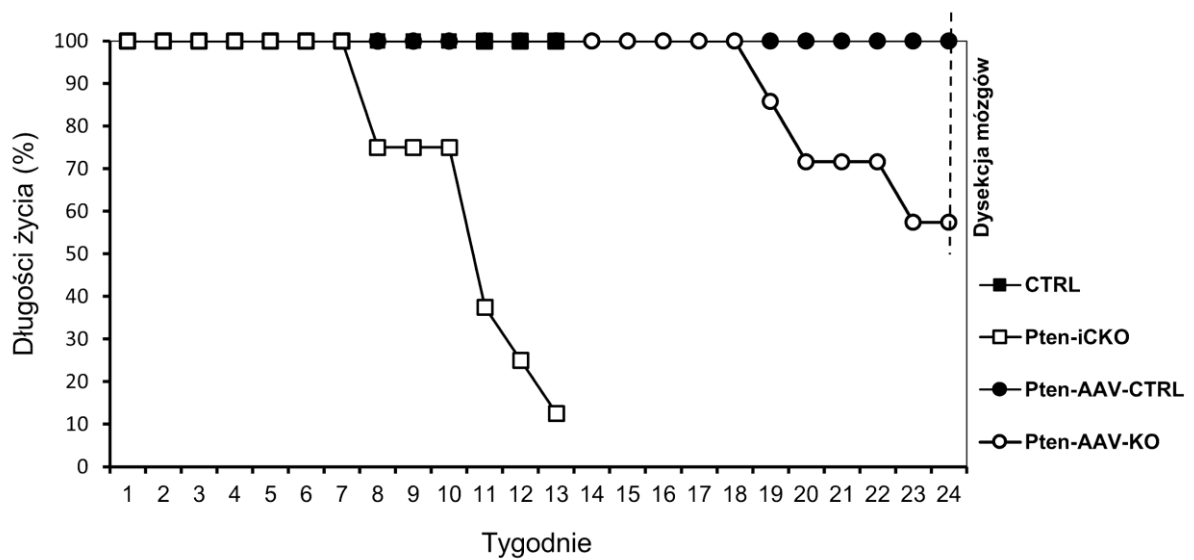
Jak wykazano w pierwszych etapie prac eksperymentalnych, inaktywacja genu *Pten* w dojrzałych neuronach przodomózgowia z ekspresją CaMKII α istotnie skraca czas przeżycia transgenicznych myszy *Pten*-iCKO. W kolejnym kroku zawężono zakres mutacji wyłącznie do hipokampa oraz zakrętu zębatego (DG) za pomocą wektorów wirusowych AAV (opisanych w podrozdziale 3.4). W ten sposób rekombinacja genu *Pten* została ograniczona do dojrzałych i w pełni zróżnicowanych neuronów pobudzających. Długość życia myszy *Pten*-AAV-KO porównano z modelem *Pten*-iCKO (Rycina 22).

Ogólny wskaźnik przeżycia określano osobno dla każdej grupy. W przypadku samic *Pten*-iCKO czas obserwacji rozpoczynał się w dniu 0 (po zakończeniu cyklu podawania TAM) i trwał do momentu śmierci zwierząt, przypadającej zwykle około 13 tygodnia. Natomiast w grupie *Pten*-AAV-KO czas liczono od dnia 0 (podania wektorów wirusowych) do 24 tygodnia od indukcji mutacji.

W porównaniu z grupą kontrolną, u osobników *Pten*-iCKO zaobserwowano logarytmiczny spadek przeżywalności od 7 tygodnia (po podaniu TAM) do 13. tygodnia przeżyła jedynie jedna samica, która osiągała wysokie wyniki w teście revPL.

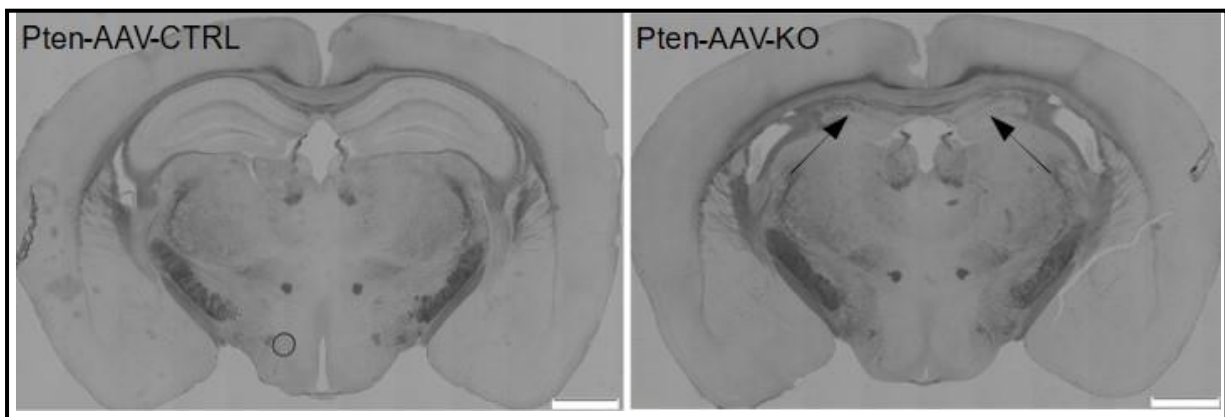
W przypadku myszy *Pten*-AAV-KO wskaźnik przeżycia był znacznie wyższy niż u *Pten*-iCKO: w porównaniu z grupą kontrolną utrzymywał się na poziomie powyżej 50% po 24 tygodniach (w momencie pobierania mózgow do analizy).

Krzywe przeżywalności wykazały, że linie myszy *Pten* KO indukowane za pomocą AAV żyły dłużej niż *Pten*-iCKO. Jednak u osobników *Pten*-AAV-KO zaobserwowano ubytek tkanki nerwowej (neurodegenerację) w obrębie hipokampa w 24 tygodniu od indukcji mutacji (Rycina 23).



Rycina 22. Długość życia samic Pten-iCKO i Pten-AAV-KO w porównaniu do grup kontrolnych

W analizie uwzględniono pierwszą grupę samic Pten-iCKO (n=8) wraz z grupą kontrolną (n=8) oraz Pten-AAV-KO (n=7) wraz z grupą kontrolną (n=7), które były testowane w systemie IntelliCage. CTRL = grupa kontrolna dla Pten-iCKO; Pten-iCKO = mutanty genu *Pten* w neuronach przodomózgowia; Pten-AAV-CTRL = grupa kontrolna dla Pten-AAV-KO, której podano AAV-CaMKII α -eYFP; Pten-AAV-KO = mutanty genu *Pten* w neuronach hipokampa w wyniku podania AAV-CaMKII α -Cre.



Rycina 23. Mikroskopowy obraz niewybarwionych skrawków mózgow Pten-AAV-CTRL (po lewej) i Pten-AAV-KO (po prawej) z widocznym ubytkiem hipokampa w 24 tygodniu od indukcji mutacji.

Powiększenie 10x, skala 1mm.

Eliminacja genu *Pten* w szerokim obszarze przodomózgowia (Pten-iCKO) powoduje gwałtowną śmiertelność zwierząt. Ograniczenie mutacji do hipokampa (Pten-AAV-KO) wydłuża życie, ale skutkuje degeneracją tego regionu w dłuższej perspektywie.

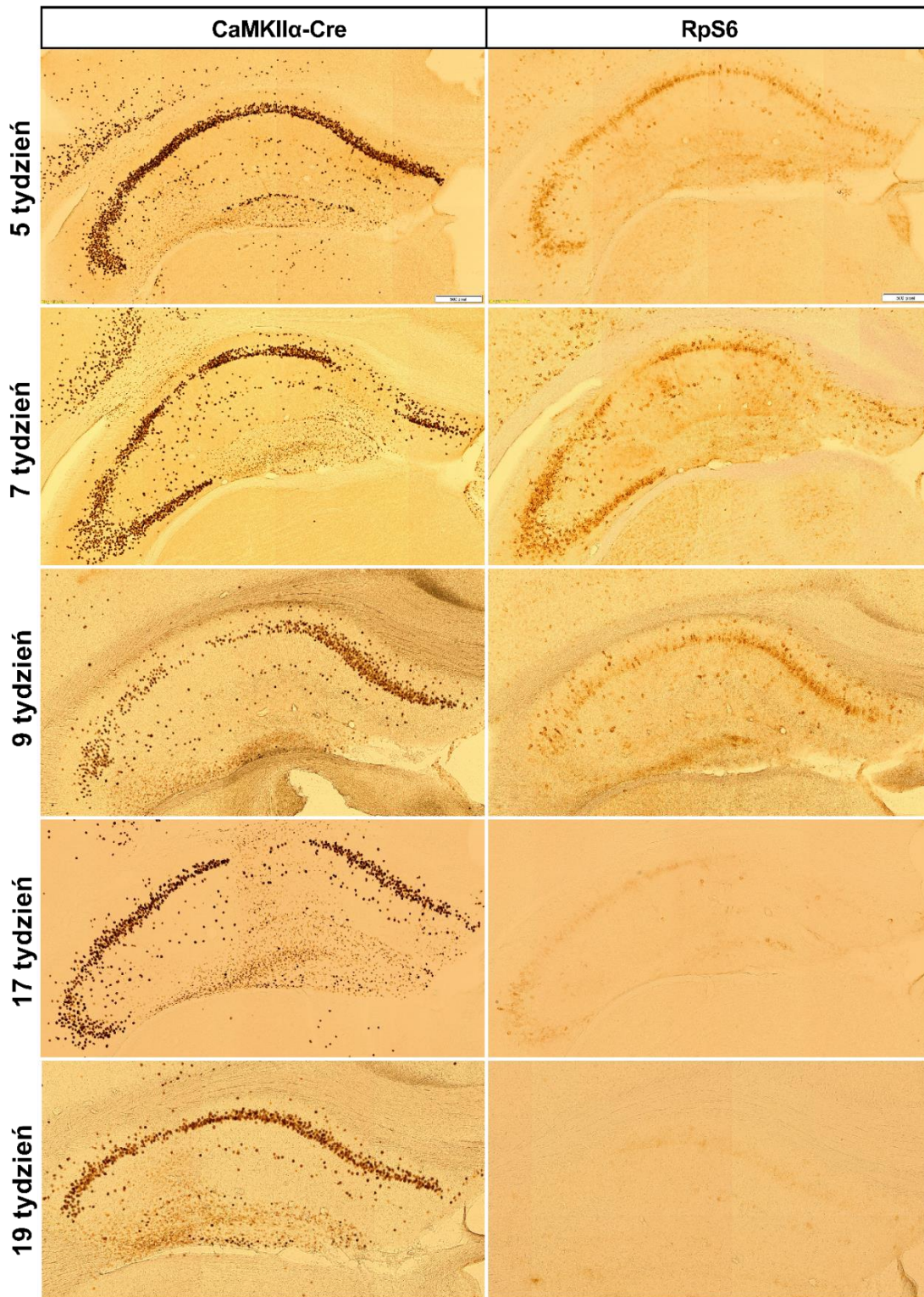
4.2.3. Analiza immunohistochemiczna rekombinazy Cre i ufosforylowanego rybosomalnego S6

Aby określić moment rozpoczęcia neurodegeneracji, w następnym etapie badań przeprowadzono analizę immunohistochemiczną zmian morfologicznych pojawiających się u myszy Pten-AAV-KO. Zbadano także stopień rekombinacji homologicznej w zmodyfikowanych neuronach hipokampa i zakrętu zębatego (DG) oraz poziom ekspresji fosforylowanego białka rybosomalnego S6 (phospho-S6, fRS6), stanowiącego marker aktywności szlaku mTOR.

W tym celu z nowej kohorty zmodyfikowanych zwierząt, u których podano stereotaktycznie wektory rAAV, pobrano mózgi w 5, 7, 9, 17 i 19 tygodniu po iniekcji. Następnie przygotowano preparaty histologiczne (zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 3.7). Skrawki mózgow inkubowano z przeciwciałami anty-Cre oraz anty-fRS6.

Stwierdzono podwyższoną aktywność szlaku PI3K-AKT-mTOR, ocenioną na podstawie poziomu ekspresji fosforylowanego białka rybosomalnego S6 (fRS6). Zwiększona aktywność mTOR utrzymywała się do 15 tygodnia po iniekcji rAAV. Obecność rekombinazy Cre, świadcząca o skuteczności rekombinacji homologicznej, była wykrywalna w neuronach nawet w 19 tygodniu od indukcji mutacji.

Ponadto odnotowano wyraźne zmiany morfologiczne, przejawiające się zmniejszeniem objętości hipokampa i zaburzeniem organizacji komórek w jego poszczególnych warstwach, w tym w obrębie zakrętu zębatego (DG). Szczególnie widoczna była dyspersja komórek ziarnistych w DG. Zaobserwowane zmiany sugerują powoli postępującą degenerację neuronów, która ostatecznie doprowadziła do niemal całkowitego zaniku znacznej części przedniego hipokampa w 24 tygodniu po iniekcji stereotaktycznej ([Rycina 24](#)).



Rycina 24. Barwienie immunohistochemiczne w hipokampie wykonane w 5, 7, 9, 17 i 19 tygodniu od indukcji mutacji u Pten-AAV-KO w celu wizualizacji ekspresji rekombinazy Cre oraz pRS6

CaMKII α -Cre=rekombinaza Cre, która ulega ekspresji pod promotorem kinazy białkowej zależnej od wapnia/kalmoduliny II (podjednostka alfa); pRS6=fosforylowane rybosomalne białko S6 (marker aktywności TOR)

Wysoki poziom Cre i fRS6 wskazuje na skuteczną rekombinację genu *Pten* oraz zwiększoną aktywność mTOR, czemu towarzyszą narastające w czasie zmiany morfologiczne w hipokampie – zwłaszcza w zakręcie zębatym. Wyniki te sugerują długotrwały proces degeneracyjny, który znacząco wpływa na strukturę oraz funkcję tego regionu mózgu.

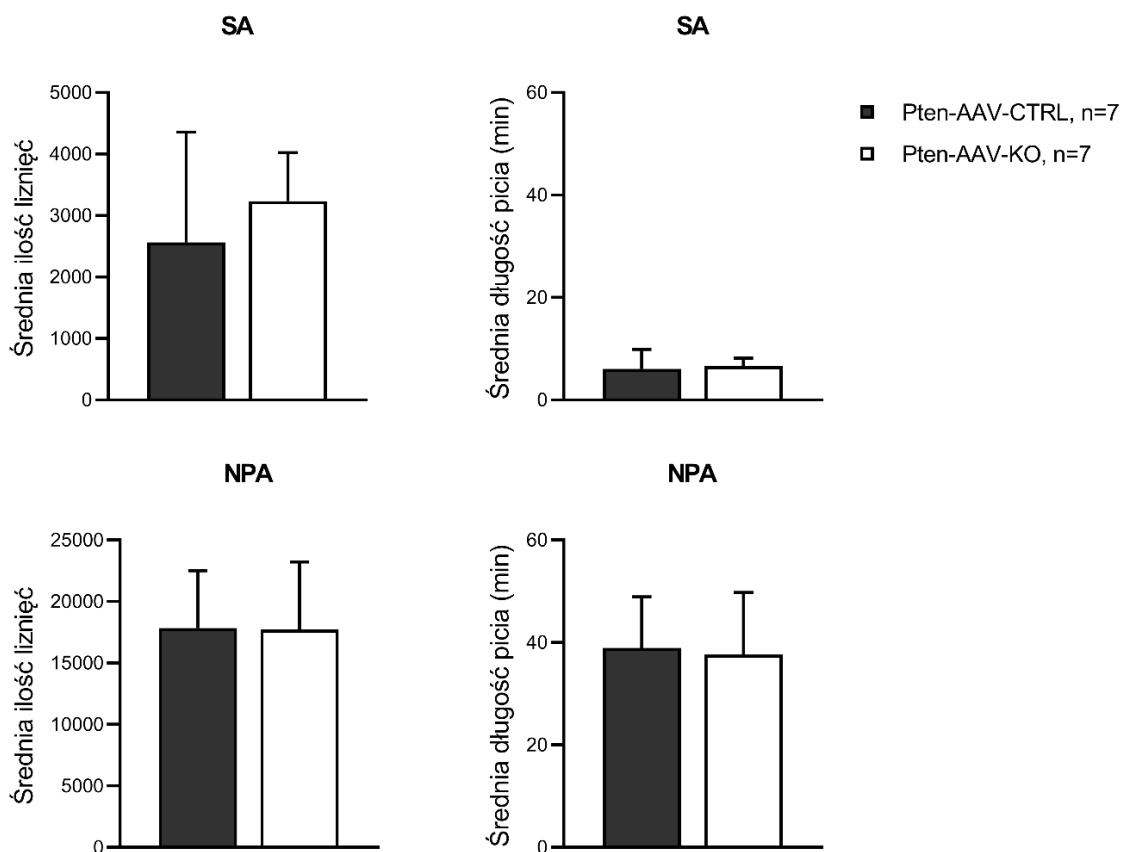
4.2.4. Wpływ usunięcia genu *Pten* na uczenie się i pamięć myszy Pten-AAV-KO

Na podstawie wcześniejszych obserwacji dotyczących wysokiej śmiertelności w modelu Pten-iCKO, wybrano dwa punkty czasowe – 7 i 13 tydzień po wstrzyknięciu zrekombinowanych wektorów AAV (rAAV) – w których oceniano zdolności kognitywne. Pierwsza grupa samic Pten-AAV-KO (n=7) oraz grupa kontrolna (n=7) zostały poddane podobnym testom do zastosowanych w modelu Pten-iCKO, to jest motywacji do picia (faza SA, NPA), a następnie testowi preferencji miejsca (PL) i preferencji nowego miejsca (revPL).

4.2.4.1. Etapy adaptacji (SA i NPA)

- SA: W trakcie dwudniowej adaptacji do klatki, parametryczny test t Studenta dla prób niezależnych nie wykazał statystycznie istotnych różnic w zachowaniu zwierząt między badanymi grupami. Analizowane parametry – średnia liczba liźnięć wody [t=0,9080; p=0,382] oraz całkowita częstotliwość picia [t=0,355; p=0,729] – pozostawały na zbliżonym poziomie w obu grupach.
- NPA: W trakcie trzydniowej adaptacji do 10% roztworu sacharozy, parametryczny test t Studenta dla prób niezależnych nie wykazał statystycznie istotnych różnic w zachowaniu pomiędzy grupami. Analizie poddano te same parametry: średnią liczbę liźnięć wody [t=0,515; p=0,959] oraz całkowitą częstotliwość picia [t=0,217; p=0,831], które w obu grupach przyjmowały zbliżone wartości.

Zarówno mutanty, jak i zwierzęta kontrolne wykazywały podobny poziom motywacji, a w żadnej z grup nie stwierdzono tendencji do uzależnienia od sacharozy. Zarówno w grupie badanej, jak i kontrolnej odnotowano natomiast wyraźny wzrost ilości i długości picia pomiędzy fazą podstawowej adaptacji SA oraz NPA ([Rycina 25](#)).



Rycina 25. Porównanie motywacji zwierząt w fazie adaptacji do picia w zwykłej wody (SA) oraz do 10-procentowego roztworu sacharozy (NPA)

Pten-AAV-KO (n=7) i grupa kontrolna (n=7) wykazały podobną preferencję picia wody zwykłej podczas fazy adaptacji do klatki (SA) oraz podobny poziom motywacji i preferencję picia wody słodzonej (10% roztworem sacharozy) podczas fazy adaptacji do otwierania drzwi nosem (NPA). Pten-AAV-CTRL = grupa kontrolna, której podano AAV-CaMKII α -eYFP; Pten-AAV-KO = mutanty genu Pten w neuronach hipokampa w wyniku podania AAV.

4.2.4.2. Etapy uczenia i przeuczania (PL i revPL)

Testy uczenia się i przeuczania zostały wykonane dwukrotnie od indukcji mutacji:

a) PL i revPL w 7. tygodniu od indukcji mutacji

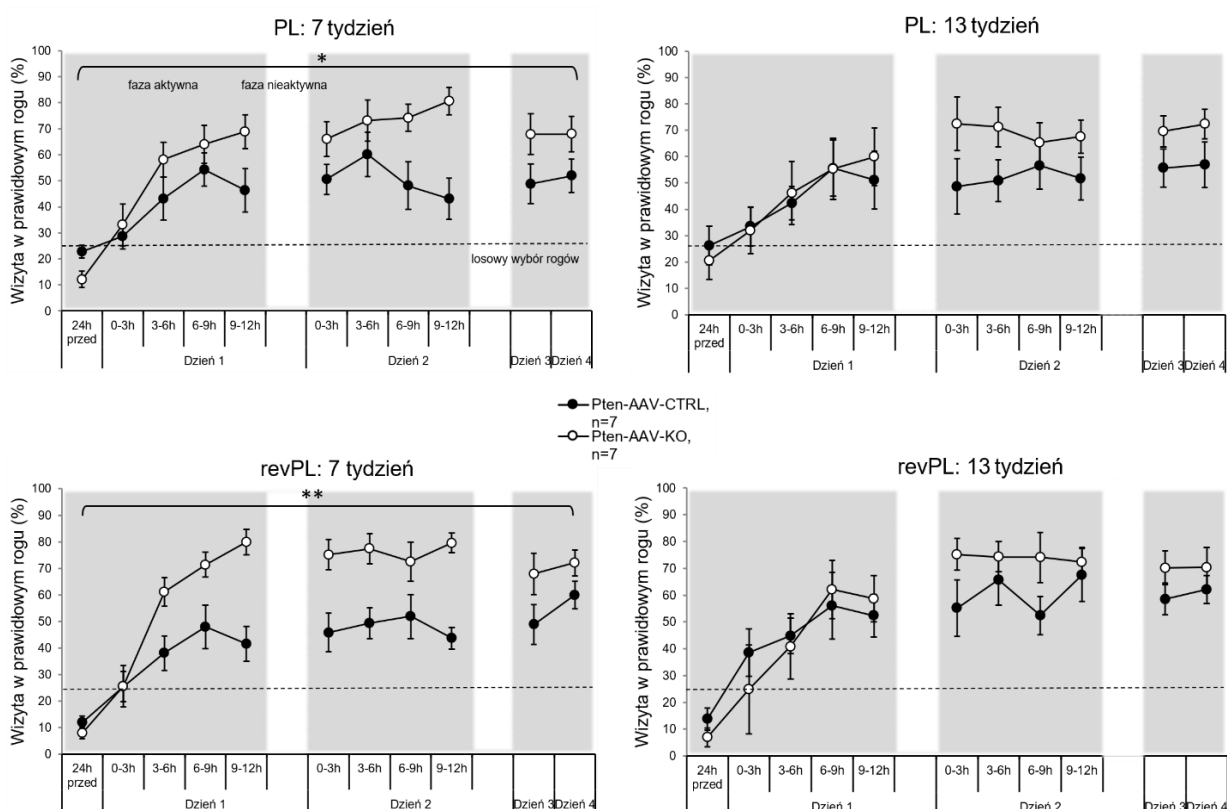
Po ustaleniu poziomu motywacji przystąpiono do czterodniowego testu PL, a następnie do testu revPL. Zarówno w teście PL, jak i revPL obie grupy przekroczyły próg 25% poprawnych wizyt, świadczący o rozwoju preferencji rogu ze słodzona wodą. Różnice statystyczne pomiędzy grupami ujawniły się w 7 tygodniu od podania rAAV.

W obu zadaniach (PL i revPL) Pten-AAV-KO wykazywały lepsze uczenie się i pamięć zależną od hipokampa niż myszy kontrolne (Rycina 26 A, B). ANOVA dla pomiarów powtarzanych w

PL [F(1,12)=5,823; p=0,03] wykazała istotnie wyższy procent poprawnych wizyt w grupie Pten-AAV-KO niż w grupie kontrolnej. Post-hoc Fishera ujawnił różnice między grupami już podczas pierwszego dnia: po 12h (p = 0.01) oraz drugiego dnia: po 9h (p = 0.006) i 12h (p = 0.0002). Podobny efekt zaobserwowano w revPL [F(1,12)=12,09; p=0,004], gdzie samice Pten-AAV-KO szybciej kodowały nową pozycję rogu już podczas pierwszego dnia: po 6h testu (p = 0.008); 9h (p=0.008); 12h (p = 0.0005); a także drugiego dnia: po 3h (p= 0.001); 6h (p = 0,001); 9h (p = 0.01) oraz 12h (p = 0.0001).

b) PL i revPL PL i revPL w 13. tygodniu od indukcji mutacji

W drugim punkcie czasowym, przypadającym na około 13 tydzień od indukcji mutacji, ponownie przeprowadzono PL i revPL z nowo wybranymi rogami. Na tym etapie nie stwierdzono już statystycznie istotnych różnic w dynamice uczenia się między badanymi mutantami Pten-AAV-KO a myszami kontrolnymi.



Rycina 26. Dynamika uczenia się myszy Pten-AAV-KO w teście preferencji miejsca (PL) i preferencji nowego miejsca (revPL) w automatycznej klatce IntelliCage

Pten-AAV-KO w 7 tygodniu od podania rAAV osiągały wyższe wyniki (p<0,05) w porównaniu do kontroli, natomiast w 13. tygodniu różnice nie były znamienne statystycznie. Dane zostały zebrane w 12-godzinnej fazie aktywnej zwierząt. Wykresy przedstawiają średnią ± SEM (* p < 0.05; ** p < 0.01). Pten-AAV-CTRL = grupa kontrolna, której podano AAV-CaMKIIα-eYFP; Pten-AAV-KO = mutanty genu Pten w neuronach hipokampa w wyniku podania AAV—CaMKIIα-Cre. Wyniki sugerują, że mutacja Pten wywołana przez iniekcję wirusów

w obrębie hipokampa może przejściowo nasilać zdolności uczenia przestrzennego (7 tydzień), jednak w 13. tygodniu, wraz z postępującą degeneracją, efekt ten zanika.

Wyniki sugerują, że mutacja *Pten* wywołana przez iniekcję wirusów w obrębie hipokampa może przejściowo nasilać zdolności uczenia przestrzennego (7 tydzień), jednak w 13 tygodniu, wraz z postępującą degeneracją, efekt ten zanika.

4.2.4.3. Ocena pamięci przestrzennej, proceduralnej i operacyjnej w złożonym teście uczenia się w IntelliCage

Aby rozszerzyć analizę kognitywną modelu *Pten*-AAV-KO o pamięć roboczą, proceduralną i przestrzenną, przeprowadzono złożone testy uczenia się w IntelliCage na dwóch kolejnych grupach samic w dwóch punktach czasowych od iniekcji wektorów rAAV:

- 7 tygodniu: *Pten*-AAV-KO (n=12), *Pten*-AAV-CTRL (n=10);
- 15 tygodniu (na podstawie wyników immunohistochemicznych): *Pten*-AAV-KO (n=12), *Pten*-AAV-CTRL (n=9).

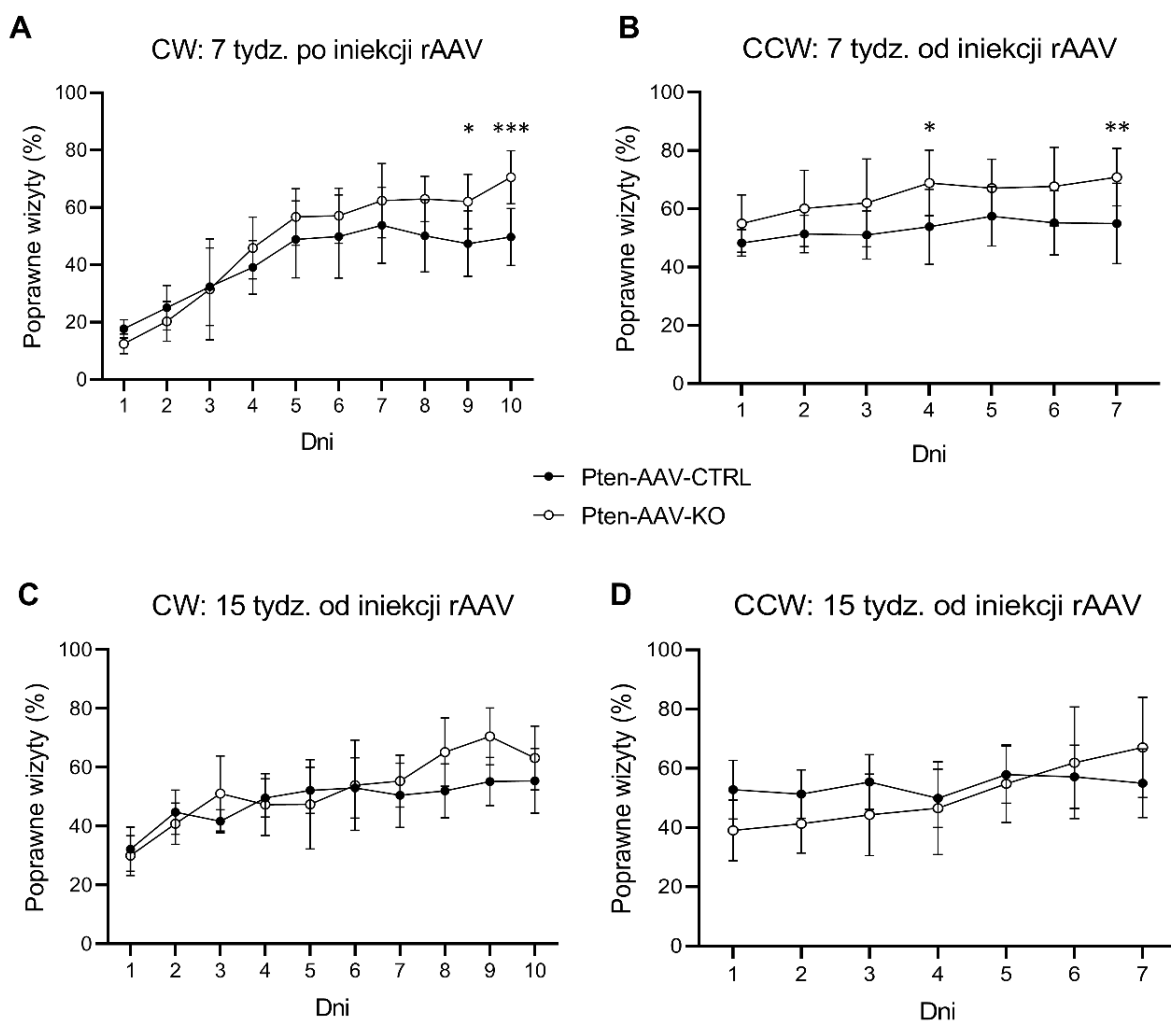
Myszy poddano analizie uczenia się i zapamiętywania w zmodyfikowanej wersji testu patrolowania (Kobayashi i wsp., 2013; Fischer i wsp., 2017). Sprawdzano, czy myszy zapamiętują sekwencję „poprawnych” rogów, które zmieniały się zgodnie z ruchem wskazówek zegara (CW, ang. clockwise) lub w kierunku przeciwnym (CCW, ang. counter clockwise).

Pojedynczy cykl testowy trwał około trzy tygodnie i zakładał całodobowe zbieranie danych. Wyniki przedstawiano jako dzienny stosunek liczby poprawnych wizyt (zakończonych dotknięciem nosa w drzwi) do łącznej liczby wszystkich wizyt (błędnych i poprawnych, z wyłączeniem wizyt neutralnych opisanych w rozdziale 3.6.1).

W 7 tygodniu od iniekcji rAAV analiza wariancji dla pomiarów powtarzanych (ANOVA) ujawniła istotne różnice w uczeniu się zwierząt, zarówno w teście CW (genotyp: F [1, 20] =4,64, p=0,04), jak i CCW (genotyp: F [1, 20]=9,660, p=0,005). W analizie post-hoc (wielokrotnych porównań Bonferroniego) wykazano, że w porównaniu do grupy kontrolnej, myszy *Pten*-AAV-KO osiągały lepsze wyniki w 9 i 10 dniu nauki w teście CW (dzień 9: p=0,01; dzień 10: p=0,0001), a także w 4 i 7 dniu nauki w teście CCW (dzień 4: p=0,01; dzień 7: p=0,007).

W grupie testowanej w 15 tygodniu (trzecia grupa eksperymentalna) nie odnotowano statystycznie istotnych różnic między genotypami. Ogółem jednak *Pten*-AAV-KO

prezentowały wyższe zdolności w zapominaniu poprzedniego położenia nagrody i uczeniu się nowego wzorca w porównaniu z kontrolami (Rycina 27).



Rycina 27. Dynamika uczenia się i przeuczania się myszy Pten-AAV-KO w złożonym teście patrolowania

W 7 tygodniu (A, B) samice Pten-AAV-KO (n=12) wykazywały wyższe zdolności uczenia w testach CW i CCW ($p < 0,05$), podczas gdy w 15 tygodniu (C, D) różnice nie były znamienne. CW = test patrolowania, w którym sekwencja poprawnych rogów zmienia się zgodnie z kierunkiem wskazówek zegara; CCW = test patrolowania, w którym poprawne rogi zmieniają się w odwrotnym kierunku do wskazówek zegara. Dane przedstawiono jako średnią \pm odchylenie standardowe (SD) (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$) Pten-AAV-CTRL = grupa kontrolna, której podano AAV-CaMKII α -eYFP; Pten-AAV-KO = mutanty genu Pten w neuronach hipokampa w wyniku podania AAV-CaMKII α -Cre; rAAV = rekombinowane wektory wirusowe towarzyszące adenowirusom.

Potwierdzono, że Pten-AAV-KO w 7 tygodniu charakteryzują się lepszą niż myszy kontrolne pamięcią proceduralną, operacyjną i przestrzenną, co w 15 tygodniu nie jest już obserwowane prawdopodobnie na skutek progresji uszkodzeń hipokampa.

4.3. ANALIZA OGÓLNEJ AKTYWNOŚCI I POZIOMU LĘKU U MYSZY PTEN-AAV-KO

Badania w klatkach IntelliCage dostarczyły informacji nie tylko o funkcjach poznawczych, lecz również o dobowej aktywności myszy, rozumianej jako czas i liczba wizyt w rogach klatki. Na tej podstawie zaobserwowano, że samice Pten-AAV-KO podczas testów PL i revPL przejawiają wzmożoną aktywność (reaktywność eksploracyjną), wyrażoną intensywniejszą eksploracją rogów oraz większą liczbą wizyt niezakończonych włożeniem nosa w sensor. Aby zweryfikować te spostrzeżenia przeprowadzono dwa standardowe testy behawioralne: test otwartego pola (OF) oraz podwyższony labirynt krzyżowy (EPM). Oba eksperymenty miały na celu ocenę spontanicznej aktywności, tendencji lękowych oraz zachowań eksploracyjnych w nowym, nieznanym środowisku.

4.3.1. Test otwartego pola (OF)

W teście OF przeanalizowano trzy kohorty samic i samców (Pten-AAV-KO vs. kontrola), oceniając parametry lokomotoryczne, takie jak prędkość poruszania się myszy, całkowity dystans pokonany w ciągu 15 minut, a także czas spędzony w strefie centralnej i peryferyjnej aparatu.

4.3.1.1. Czas spędzony w centrum i strefie peryferyjnej

Nieparametryczny test Kruskala-Wallisa (zastosowany z powodu braku normalnego rozkładu danych) wykazał istotne różnice w uśrednionym czasie przebywania w centrum i w strefie peryferyjnej pomiędzy grupami ($p < 0,0001$) (Rycina 28A B). Test Dunna z wielokrotnymi porównaniami wskazał, że myszy Pten-AAV-KO (zarówno samce, jak i samice) spędziły mniej czasu w centrum aparatu niż grupy kontrolne (samice CTRL vs KO: $p < 0,0001$; samce: CTRL vs KO $p < 0,0001$), a więcej w strefie peryferyjnej (samice CTRL vs KO: $p < 0,0001$; samce: CTRL vs KO $p = 0,0012$).

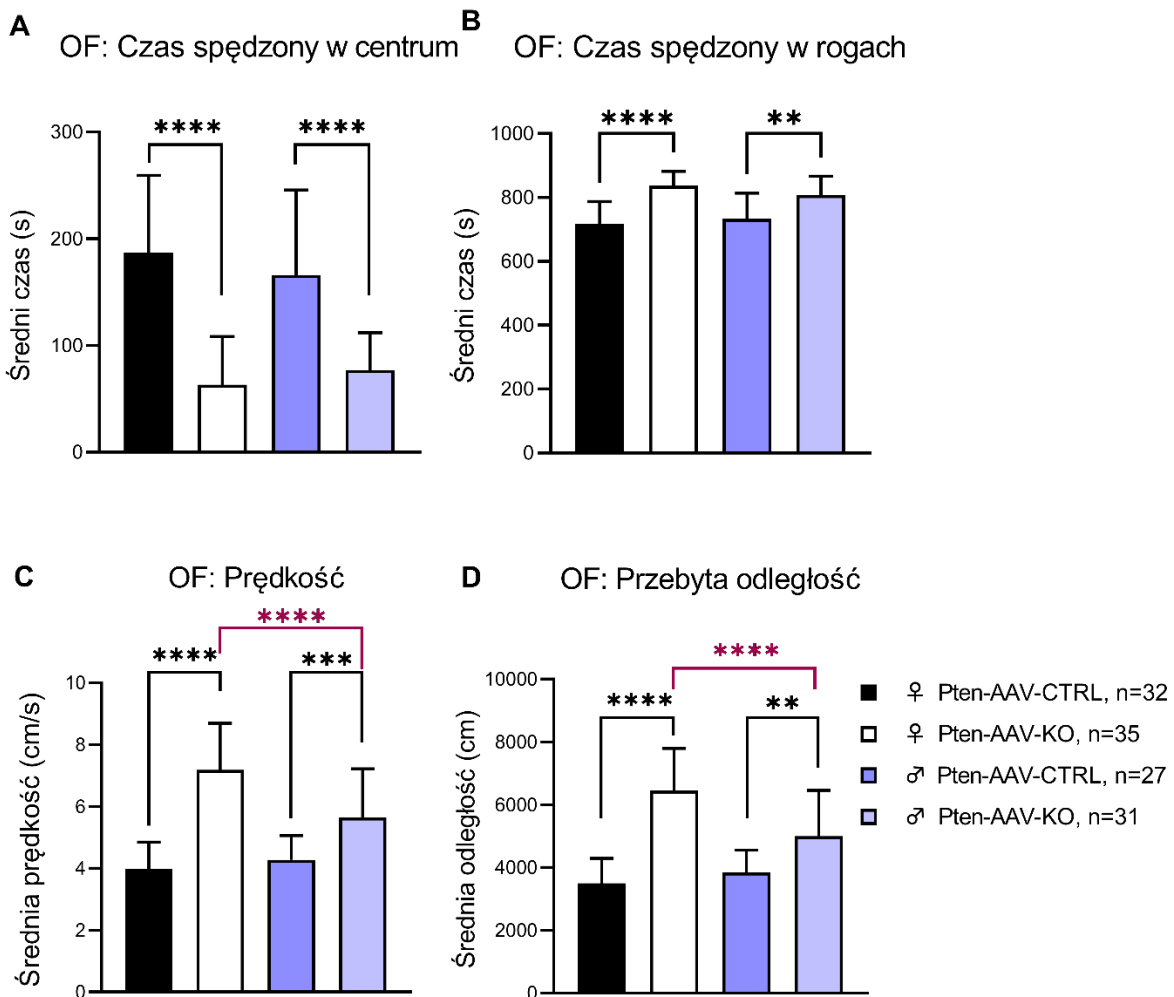
4.3.1.2. Prędkość poruszania się i dystans

Dwuczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) wykazała znamienne różnice pomiędzy genotypami i płcią, zarówno dla prędkości poruszania się, jak i przebytego dystansu:

- efekt genotypu: dla prędkości: $F(1, 120) = 102,4$, $p < 0,0001$; dla przebytego dystansu: $F(1, 120) = 100,1$, $p < 0,0001$
- efekt płci: dla prędkości: $F(1, 120) = 7,560$, $p = 0,0069$; dla przebytego dystansu: $F(1, 120) = 7,155$, $p = 0,0085$ (Rycina 28C D).

Analiza post-hoc z poprawką Bonferroniego wykazała, że:

- Samice Pten-AAV-KO poruszały się najszybciej spośród wszystkich badanych grup; w porównaniu z samicami kontrolnymi różnica wyniosła 3,2 cm/s ($p < 0,0001$).
- Między samicami a samcami Pten-AAV-KO również odnotowano znamiennej różnicę, to jest samice Pten-AAV-KO poruszały się o 1,5 cm/s szybciej niż samce Pten-AAV-KO ($p < 0,0001$).
- Samce Pten-AAV-KO były szybsze od samców kontrolnych średnio o 1,4 cm/s ($p = 0,0004$).
- Analogiczne zależności dotyczyły całkowitego dystansu przebytego podczas 15-minutowego testu; samice Pten-AAV-KO przebywały aż o 29,6 m więcej niż samice kontrolne ($p < 0,0001$) i o 14,5 m więcej niż samce Pten-AAV-KO ($p < 0,0001$). Samce Pten-AAV-KO również pokonały dystans większy o 11,6 m w porównaniu z samcami kontrolnymi ($p = 0,0011$).



Rycina 28. Analiza aktywności lokomotorycznej samców i samic Pten-AAV-KO i kontroli mierzonej w teście otwartego pola (OF).

Czas spędzony w części centralnej i rogach aparatu (A i B); prędkość poruszania się (C); dystans w ciągu 15-minutowego testu (D). Słupki błędów oznaczają odchylenie standardowe (SD). Kolorem bordowym zaznaczono istotne różnice pomiędzy płciami, kolorem czarnym – pomiędzy genotypami (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; p*** < 0.001 ; p**** < 0.0001). Pten-AAV-CTRL = grupa kontrolna, której podano AAV-CaMKII α -eYFP; Pten-AAV-KO = mutanty genu Pten w neuronach hipokampa w wyniku podania AAV—CaMKII α -Cre

Uzyskane dane wskazują, że myszy Pten-AAV-KO przejawiają wyraźnie wyższy poziom aktywności lokomotorycznej niż myszy kontrolne. Efekt ten jest najbardziej widoczny u samic, co koresponduje z wcześniejszymi obserwacjami (nadpobudliwość i wzmożona eksploracja w IntelliCage). Sugeruje to, że mutacja w genie Pten może w istotny sposób wpływać na układy neuronalne odpowiedzialne za zachowania eksploracyjne i ruchowe.

4.3.2. Test podwyższonego labiryntu krzyżowego (EPM)

Aby bardziej precyzyjnie określić sposób reakcji na awersyjną (otwartą i podniesioną) przestrzeń, przeprowadzono testy EPM na samcach (3 kohorty) i samicach (2 kohorty) (Pten-AAV-KO vs. kontrola). Pomiar uwzględniał całkowity czas spędzony w części centralnej, otwartych i zamkniętych ramionach labiryntu, a także liczbę wychyleń głowy (ang. head-dips) poza krawędzie strefy centralnej i otwartych ramion podczas 5 minut testu.

4.3.2.1. Czas spędzony w otwartych i zamkniętych ramionach oraz strefie centralnej aparatu

W grupie samic test t Studenta dla prób niezależnych wykazał istotne różnice w czasie przebywania w ramionach otwartych [$t=3.079$, $p=0.0036$] i zamkniętych [$t=2.472$, $p=0,0175$]. Samice Pten-AAV-KO spędzały więcej czasu w ramionach otwartych niż samice kontrolne. Natomiast w grupie samców test T studenta nie wykazała znamienne różnice w czasie spędzonym w otwartym [$t=0.0814$, $p=0,3306$] ani zamkniętym ramieniu [$t=1.273$, $p=0.2082$].

Dwuczynnikowa ANOVA wykazała wpływ płci [$F(1, 99) = 50,81$, $p < 0,0001$] i genotypu [$F(1, 99) = 12,00$, $p=0,0008$] oraz ich interakcji [$F(1, 99) = 6,750$, $p=0,0108$] na czas spędzony w ramionach otwartych. Dla ramion zamkniętych ANOVA również ujawniła istotny efekt płci [$F(1, 99) = 37,83$, $p < 0,0001$] i genotypu [$F(1, 99) = 8,029$, $p=0,0056$]. Nie zaobserwowano istotnych różnic dla średniego czasu spędzonego w centralnej części aparatu zarówno u samic, jak i u samców.

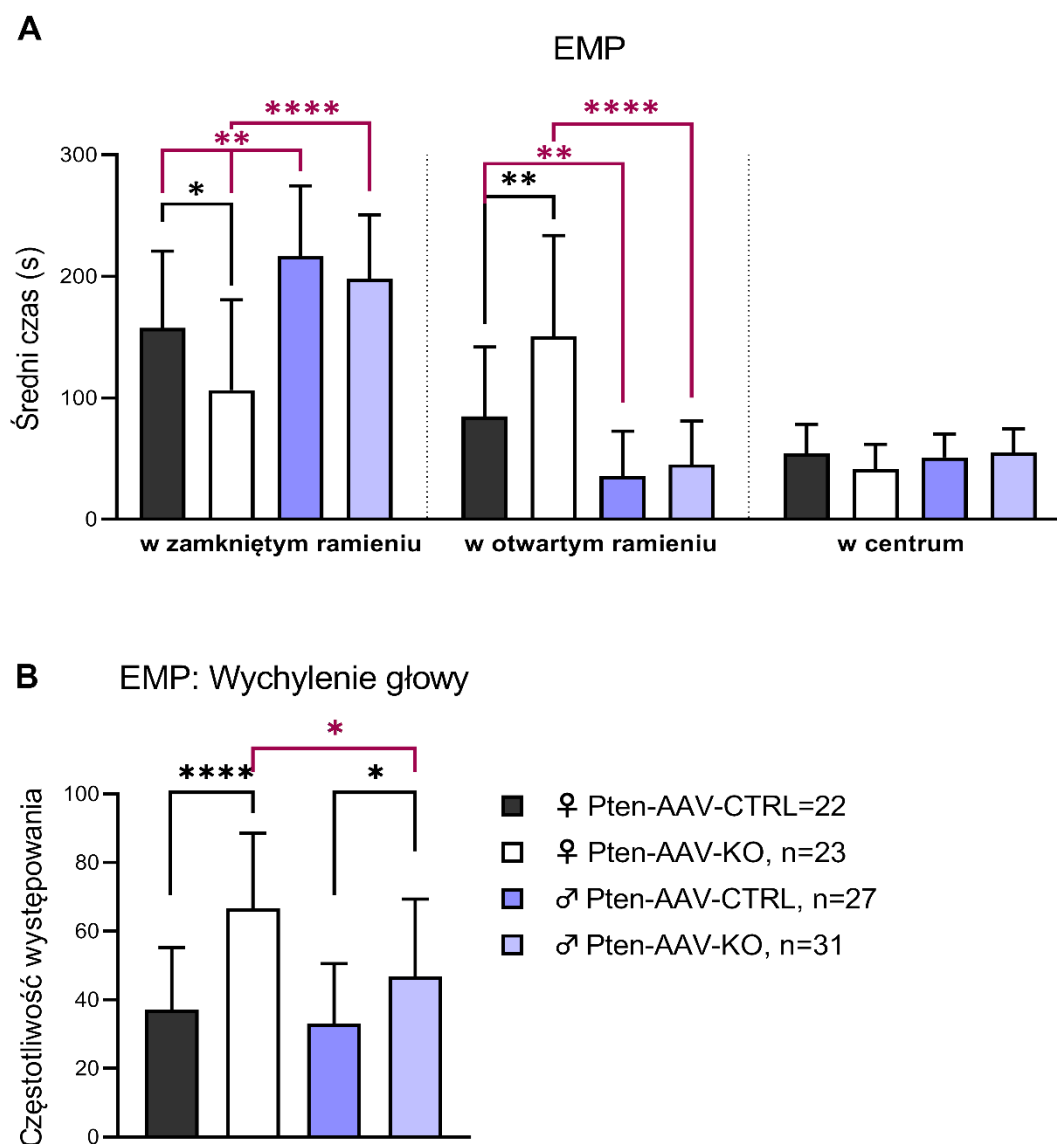
Post-hoc Bonferroniego pokazał, że samice Pten-AAV-KO przebywały w ramionach otwartych średnio o 65 s dłużej niż samice kontroli ($p=0,0045$) oraz o 105 s dłużej niż samce Pten-AAV-KO ($p < 0,0001$). Podobną zależność zaobserwowano w czasie spędzonym

w ramionach zamkniętych: samice z obu genotypów pozostawały tam krócej niż samce kontrolne ($p < 0,01$).

4.3.2.2. Liczba wychyleń głowy

Analiza t Studenta dla prób niezależnych wykazała istotne różnice w aktywności eksploracyjnej samic, takiego jak liczba wychyleń głowy w części centralnej i poza krawędzie otwartych ramion (różnica między genotypami: $t=4.894$, $p < 0,0001$). Różnicę tę potwierdził test post-hoc wielokrotnego porównania Dunna, który wskazał, że samice Pten-AAV-KO w porównaniu samic kontrolnych [$p=0,0002$] oraz samców Pten-AAV-KO [$p=0,0127$], miały najwyższą liczbę wychyleń (KO_{samice} ok 67 razy vs $CTRL_{samice}$ 37 razy; KO_{samce} 47 razy vs $CTRL_{samce}$ 33 razy) ([Rycina 29](#)).

Analiza nieparametryczna Mann-Witney wykazała statystycznie istotne różnice w liczbie wychyleń głowy pomiędzy genotypami w grupie samców [$p=0,0122$]. Analiza nieparametryczna Kruskal-Wallis wykazała statystycznie istotne różnice w liczbie wychyleń głowy pomiędzy grupami [$p < 0,0001$]. Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic pomiędzy płcią u osobników kontrolnych [$p > 0.999$].



Rycina 29. Analiza poziomu lęku u mutantów Pten-AAV-KO w teście podwyższonego labiryntu krzyżowego (EPM)

Średni czas spędzony w centrum, ramionach zamkniętych i otwartych (A); liczba wychyleń głowy (B). Słupki błędów oznaczają odchylenie standardowe (SD). Kolorem bordowym zaznaczono istotne różnice pomiędzy płciami, kolorem czarnym – pomiędzy genotypami (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Pten-AAV-CTRL = grupa kontrolna, której podano AAV-CaMKII α -eYFP; Pten-AAV-KO = mutanty genu Pten w neuronach hipokampa w wyniku podania AAV—CaMKII α -Cre.

Podsumowując, samice Pten-AAV-KO cechowały się statystycznie istotnie niższym poziomem zachowań lękowych w porównaniu zarówno z samicami kontrolnymi, jak i z samcami Pten-AAV-KO. W teście podwyższonego labiryntu krzyżowego odnotowano ponadto wyraźne różnice zależne od płci – samce, niezależnie od genotypu, przejawiały wyższy poziom lęku niż samice. Nie zaobserwowano jednak istotnych odchyżeń w zachowaniu pomiędzy samcami Pten-AAV-KO a samcami kontrolnymi. Wyniki te są spójne

z wcześniejszymi obserwacjami zebranymi w IntelliCage (dotyczącymi samic) oraz w teście otwartego pola (dotyczącym obu płci). Wydaje się, że mutacja w genie *Pten* w różnym stopniu wpływa na regulację zachowań eksploracyjnych i lękowych w zależności od płci.

4.4. WPLYW MUTACJI *PTEN* U MYSZY *PTEN-AAV-KO* NA PAMIĘĆ ROZPOZNAWCZĄ, INTERAKCJE SOCJALNE I ZACHOWANIA POWIĄZANE Z ASD

4.4.1. Test budowania gniazda u myszy *Pten-AAV-KO*

Test budowania gniazda jest szeroko stosowanym narzędziem behawioralnym, umożliwiającym ocenę wrodzonej lub wyuczonej zdolności myszy do tworzenia gniazd, co stanowi istotny element przetrwania i dbałości o potomstwo. Test ten bywa także wykorzystywany w badaniach nad chorobami neurodegeneracyjnymi, urazami mózgu lub mutacjami genetycznymi, jak również do oceny zachowań społecznych i preferencji środowiskowych. W niniejszym eksperymencie zastosowano 5-stopniową skalę oceny (rozdział 3.6.4).

Zmierzono stan i ułożenie gniazda u samic *Pten-AAV-KO* jak i kontroli w następujących punktach czasowych:

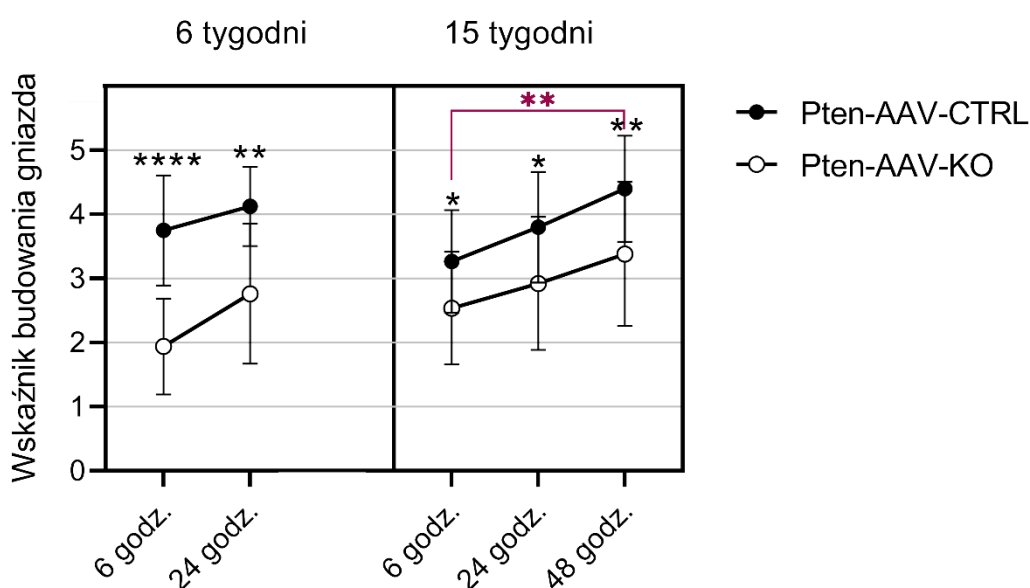
- 6 tygodni od indukcji mutacji (dzień przed testowaniem w IntelliCage), pomiar po 8 i 24 godzinach od zmiany na czystą klatkę z materiałami do budowy gniazda,
- 15 tygodni od iniekcji wektorów wirusowych pomiar po 8, 24 i 48 godzinach od zmiany na czystą klatkę z materiałami do budowy gniazda (Rycina 30).

W 7. tygodniu od indukcji mutacji myszy *Pten-AAV-KO* przejawiały wyraźnie niższe zaangażowanie w budowanie gniazda w porównaniu z grupą kontrolną – zarówno po 6 godzinach ($p < 0,0001$), jak i po 24 godzinach ($p = 0,003$). Podobne wyniki uzyskano w 15. tygodniu od mutacji: *Pten-AAV-KO* wykazywały mniejsze zainteresowanie budowaniem gniazda po 6 ($p = 0,039$), 24 ($p = 0,025$) oraz 48 godzinach ($p = 0,0086$) niż zwierzęta kontrolne jak wykazała analiza testem Manna-Whitneya. W obu grupach zaobserwowano jednak tendencję do ulepszania gniazd wraz z upływem czasu.

W grupie kontrolnej odnotowano wyraźną zmianę w poziomie zaangażowania w budowanie gniazda na przestrzeni czasu, co potwierdził test Friedmana ($p = 0,0026$). Analiza post-hoc Dunna wskazała, że najbardziej istotne różnice dotyczyły porównania 8 i 24 godziny w 15 tygodniu ($p = 0,0049$). U myszy *Pten-AAV-KO* również zaobserwowano ogólną tendencję

do zmiany (test Friedmana: $p=0,0089$), jednak w analizie post-hoc nie osiągnięto istotności w konkretnych punktach czasowych.

Brak istotności w analizie post-hoc może wynikać z dużej zmienności wewnątrzgrupowej, małej liczby prób lub konserwatywnego charakteru korekcji wielokrotnych porównań. Na wynik analizy mogła wpłynąć także heterogeniczność w zachowaniu mutantów, ponieważ zaobserwowano u mniejszości możliwość występowania drgawek, bądź zmienione zachowanie mogące sugerować, że myszy mogły mieć drgawki, lecz nie udało się ich zaobserwować. U tych podejrzanych osobników jakość budowania gniazda była na bardzo niskim poziomie lub w ogóle nie podejmowały się budowania.



Rycina 30. Test budowania gniazda przeprowadzony dla samic Pten-AAV-KO w 7 i 15 tygodniu od indukcji mutacji

Pten-AAV-CTRL = grupa kontrolna, której podano AAV-CaMKII α -eYFP (n=15 w 7 tygodniu; n=15 w 15 tygodniu); Pten-AAV-KO = mutanty genu Pten w neuronach hipokampa w wyniku podania AAV—CaMKII α -Cre. (n=17 w 7 tygodniu; n=13 w 15 tygodniu).

Uzyskane wyniki wskazują, że myszy Pten-AAV-KO przejawiają słabsze zaangażowanie w budowanie gniazda niż myszy kontrolne – zarówno w 6, jak i w 15 tygodniu od indukcji mutacji. Istotną trudnością w interpretacji wyników grupy Pten-AAV-KO jest duża zmienność indywidualna, potencjalnie związana z epizodami drgawkowymi, które mogły obniżać zdolność lub chęć do budowania gniazda. Z kolei w grupie kontrolnej zauważono poprawę jakości gniazd w dłuższej perspektywie czasowej, co może wskazywać na prawidłową adaptację i proces uczenia się związanego z kształtowaniem zachowań gniazdotwórczych.

4.4.2. Analiza zachowań socjalnych i pamięci socjalnej

W teście trójkomorowym oceniano zachowania socjalne myszy, mierząc czas poświęcony na obwąchiwanie osobnika vs. obiektu nieożywionego (test socjalności) oraz na porównaniu myszy znanej z nowo poznaną (test nowości społecznej). Każdą sesję prowadzono w ciągu 10 minut, a uzyskane wartości wyrażano w sekundach.

4.4.2.1. Test socjalności

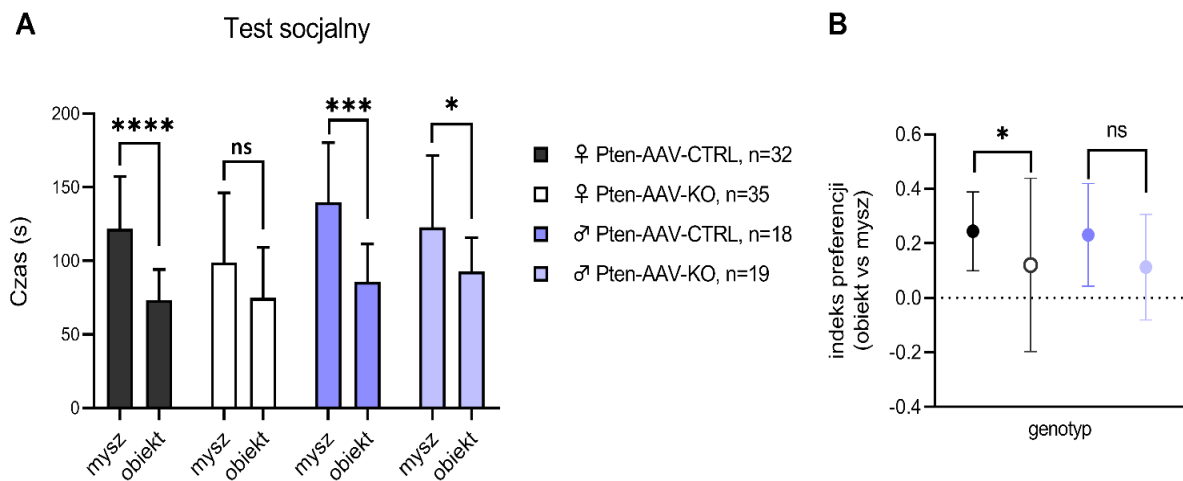
Samice kontrolne Pten-AAV-CTRL spędziły znacznie dłuższy czas na obwąchiwaniu myszy niż obiektu ($t=8,352$, $df=31$, $p<0,0001$), jak wykazano testem T studenta dla grup sparowanych (analiza wewnątrzgrupowa). Samice kontrolne wyraźnie preferowały kontakt z żywym osobnikiem, natomiast samice Pten-AAV-KO nie wykazały istotnych różnic w długości trwania obwąchiwania myszy w porównaniu z obiektem. Analiza nieparametryczna przy użyciu testu Wilcoxon dla grup sparowanych wykazała brak istotnych różnic pomiędzy czasem spędzonym na obwąchiwaniu myszy w porównaniu z obiektem ($p=0,0579$) u samic Pten-AAV-KO, co może sugerować nieznacznie słabszą preferencję interakcji społecznej. W przypadku samców Pten-AAV-KO analiza nieparametryczna przy użyciu testu Wilcoxon dla grup sparowanych wykazała statystycznie istotne różnice między czasem obwąchiwania myszy a obiektem ($p=0,0001$). Podobnie test t Studenta (dla części wyników w obrębie tej grupy) potwierdził znamienne różnicę ($t=2,795$, $df=18$, $p=0,0120$), co sugeruje, że samce mutantów przejawiały wyraźną preferencję interakcji społecznej. Analiza wskaźnika socjalności przy użyciu testu t studenta dla prób niezależnych, wykazała różnice pomiędzy samicami Pten-AAV-KO vs mioty kontrolne ($t=2,014$, $df=65$, $p=0,048$) wskazując na istotną preferencję w stronę bodźca niespołecznego. Dla grupy samców Pten-AAV-KO vs kontrole nie wykazano istotnych różnic ($t=1,882$, $df=35$, $p=0,068$), co świadczy, że obie grupy mają tendencję do częstszego przebywania z bodźcem społecznym. (Rycina 31).

4.4.2.2. Test nowości społecznej

Zwierzęta kontrolne wyraźnie odróżniały nową mysz od osobnika już znanego i poświęcały więcej czasu na kontakt z nową myszą. Zastosowano test t Studenta dla prób sparowanych, który wykazał znacznie dłuższy czas obwąchiwania nowej myszy niż osobnika już znanego u samic kontrolnych ($t=6,603$, $df=31$, $p<0,0001$) oraz samców kontrolnych ($t=3,640$, $df=17$, $p=0,002$).

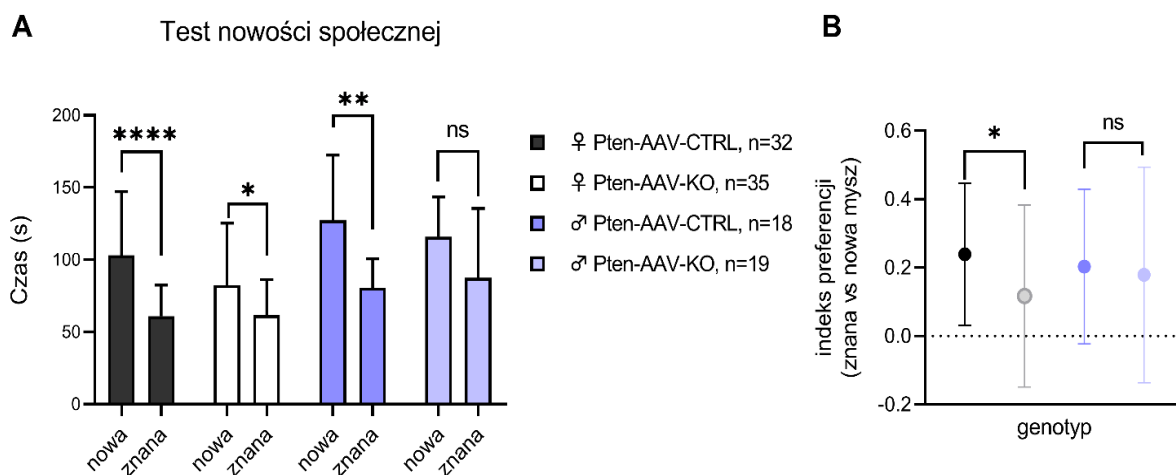
W grupie Pten-AAV-KO również wystąpiła istotna różnica między czasem obwąchiwania nowej i znanej myszy u samic (test t Studenta: $t=2,653$, $df=34$, $p=0,0120$). W przypadku grupy

samców Pten-AAV-KO nieparametryczna analiza Wilcoxon dla grup sparowanych nie wykazała statystycznie istotnych różnic ($p=0,156$). Może to sugerować ograniczoną zdolność lub motywację do rozróżniania nowej myszy od już znanej, w porównaniu do innych badanych grup. Analiza wskaźnika nowości społecznej przy użyciu testu t studenta dla prób niezależnych, wykazała różnice pomiędzy samicami Pten-AAV-KO vs mioty kontrolne ($t=2,073$, $df=65$, $p=0,042$) wskazując, że pomimo statystycznie istotnej preferencji do nowego partnera socjalnego, myszy kontrolne wykazują wyższy indeks niż mutanty Pten-AAV-KO. W przypadku grupy samców Pten-AAV-KO vs kontrolne nie wykazano istotnych różnic ($t=0,2655$, $df=35$, $p=0,79$), co może świadczyć o tym, że znalazło się kilka osobników w grupie kontrolnej, którzy zaniżyli indeks w wyniku silniejszej preferencji do znanego partnera socjalnego. (Rycina 32).



Rycina 31. Analiza socjalności w aparacie trójkomorowym u myszy Pten-AAV-KO

Test socjalności (A) ocenia czas obwąchiwania osobnika i obiektu nieożywionego a indeks preferencji socjalnej (B) został wyliczony na podstawie czasu, jaki badany osobnik spędza na interakcjach z partnerem społecznym w porównaniu z czasem spędzonym na interakcjach z bodźcem niespołecznym. Wskaźnik ten dostarcza znormalizowanej wartości mieszczącej się w przedziale od -1 do +1, gdzie: wartości dodatnie (>0) wskazują na preferencję interakcji społecznych, wartości ujemne (<0) wskazują na preferencję bodźca niespołecznego. A wartość 0 oznacza brak preferencji między obiema opcjami. Dane przedstawiono jako średnią \pm odchylenie standardowe (SD) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). N = liczba myszy w grupie; Pten-AAV-CTRL grupa kontrolna, której podano AAV-CaMKII α -eYFP (samice: n=32, samce: n= 18); Pten-AAV-KO = mutanty genu Pten w neuronach hipokampa w wyniku podania AAV—CaMKII α -Cre (samice: n=35, samce: n= 18); s = sekunda.



Rycina 32. Analiza nowości społecznej w aparacie trójkomorowym u myszy Pten-AAV-KO

Test nowości społecznej (A) porównuje czas obwąchiwania znanej myszy i myszy nowo poznanej a wskaźnik preferencji do nowości społecznej (B) obliczany jest na podstawie czasu, jaki badany osobnik spędza na interakcjach z nowym osobnikiem społecznym w porównaniu z czasem interakcji z osobnikiem już znanym. Wskaźnik ten dostarcza znormalizowanej wartości mieszczącej się w przedziale od -1 do +1, gdzie: wartości dodatnie (>0) wskazują na preferencję wobec nowego partnera społecznego, wartości ujemne (<0) wskazują na preferencję wobec znanego partnera społecznego. A wartość 0 oznacza brak preferencji między nowym a znanym osobnikiem społecznym. Dane przedstawiono jako średnią \pm odchylenie standardowe (SD) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). N = liczba myszy w grupie; Pten-AAV-CTRL grupa kontrolna, której podano AAV-CaMKII α -eYFP (samice: n=32, samce: n= 18); Pten-AAV-KO = mutanty genu Pten w neuronach hipokampa w wyniku podania AAV—CaMKII α -Cre (samice: n=35, samce: n= 18); s = sekunda

Test trójkomorowy wykazał tendencje do interakcji społecznych u samic i samców kontrolnych oraz umiejętność rozróżniania nowo napotkanych osobników od już znanych. Większa zmienność w zakresie zachowań socjalnych wystąpiła u myszy Pten-AAV-KO. U samic Pten-AAV-KO nie zaobserwowano jednoznacznej preferencji kontaktu z inną myszą, co może wskazywać na obniżoną motywację lub trudności w inicjowaniu interakcji. Natomiast samce Pten-AAV-KO nie wykazywały zdolności rozróżniania nowego osobnika od znanego. Taki wzorec zachowań może wskazywać na pewne deficyty w obszarze interakcji społecznych bądź motywacji do kontaktów socjalnych powiązanych z mutacją genu *Pten*.

4.4.3. Analiza bezpośrednich interakcji społecznych i parametrów wokalizacji myszy Pten-AAV-KO

W badaniach wykorzystano zmodyfikowany test bezpośrednich interakcji socjalnych (SIT), w którym – zamiast „demonstratora” z populacji dzikiej – zestawiano pary zwierząt o tym samym genotypie (Pten-AAV-KO lub kontrola) według protokołu opisanego w rozdziale 3.6.5.

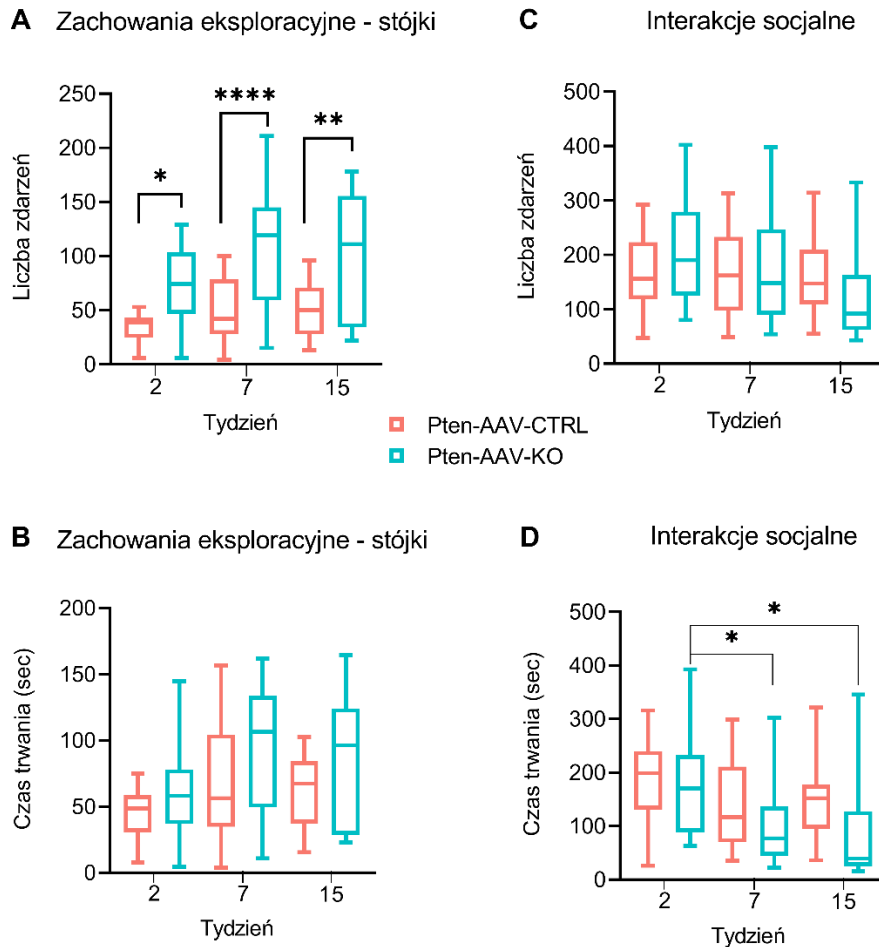
4.4.3.1. Interakcje socjalne i zachowania eksploracyjne

Całkowita liczba i długość interakcji socjalnych oraz zachowań eksploracyjnych w poszczególnych punktach czasowych (2,7 i 15 tygodniu) została przeanalizowana w czasie pierwszych 8 minut od wprowadzenia osobników na arenę. Interakcje socjalne i zachowania eksploracyjne analizowano osobno dla każdej myszy w grupie (n=1 osobnik).

Liczba zaobserwowanych stójek (zachowania eksploracyjne): analiza przy wykorzystaniu testu t studenta mierzona pomiędzy genotypami dla poszczególnych punktów czasowych, wykazała statystycznie istotne różnice pomiędzy samicami Pten-AAV-KO a miotami kontrolnymi w 2 (t=3,765, df=32; p=0,0007), w 7 (t=4,024, df=33; p=0,0003) oraz w 15(t=2,998, df=25; p=0,0061) tygodniu od indukcji mutacji ([Rycina 33](#)).

Całkowity czas trwania wszystkich zaobserwowanych stójek: test t studenta mierzony pomiędzy genotypami dla poszczególnych punktów czasowych nie wykazał statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami ([Rycina 33](#)).

Liczba socjalnych podejść (kontaktów z drugą myszą z pary) mierzona w trzech różnych punktach czasowych (2, 7 i 15 tydzień od indukcji mutacji) nie wykazała statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami, natomiast analiza Kruskal-Wallisa wykazała statystycznie istotne różnice w grupie Pten-AAV-KO (p=0,0029). Analiza post-hoc Dunna wykazała te różnice pomiędzy 2 vs 15 (p=0,02) tygodniem od indukcji mutacji ([Rycina 33](#)).



Rycina 33 Zachowania eksploracyjne i interakcje socjalne zaobserwowane w grupie kontrolnej i Pten-AAV-KO w poszczególnych punktach czasowych, bez uwzględnienia stratyfikacji na i grupę wokalizującą i niewokalizującą.

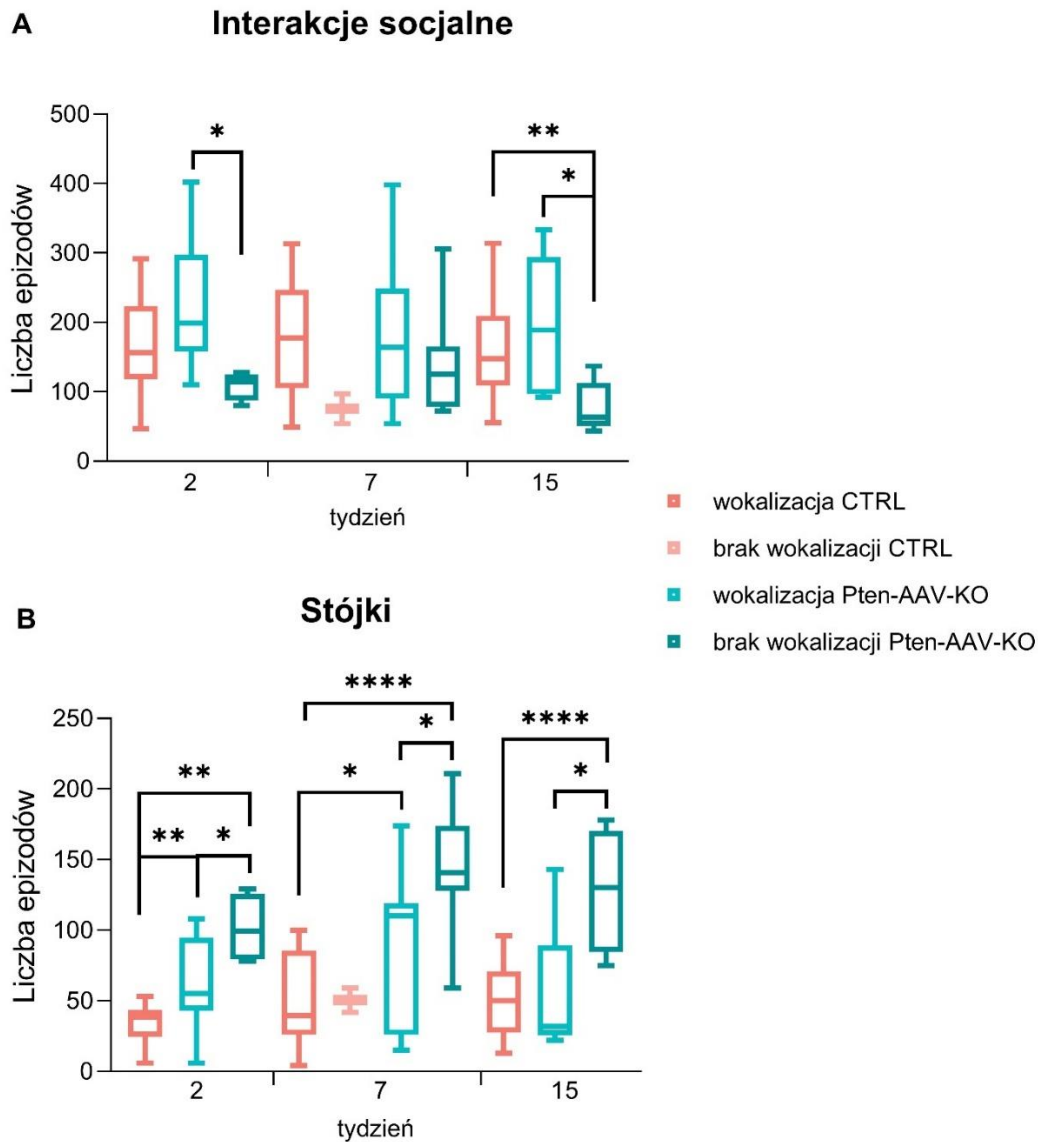
Liczba (A) i całkowity czas trwania stójek (B) oraz ilość zaobserwowanych interakcji socjalnych (C) i całkowity czas trwania(D) zaobserwowany w 2,7 i 15 tygodniu od indukcji mutacji. Dane przedstawiono jako średnią ± odchylenie standardowe (SD) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). N = liczba myszy w grupie; Pten-AAV-CTRL (samice: n=16); Pten-AAV-KO (samice: n=16)

Następnie podzielono nagrania odpowiednio na genotyp i występowanie wokalizacji i jeszcze raz przedstawiono liczbę interakcji socjalnych i zachowań eksploracyjnych (Rycina 34). Jednoczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) wykazała istotne różnice w liczbie występowania interakcji socjalnych, pomiędzy mierzonymi 3 grupami samic: CTRL wokalizujące vs KO wokalizujące vs KO niewokalizujące w 2 tygodniu od indukcji mutacji ($F(2, 31) = 4,578, p=0,018$). Analiza post hoc Bonfferoniego wykazała, że statystyczna istotność występuje pomiędzy mutantami Pten-AAV-KO wokalizującymi vs niewokalizującymi ($p=0,029$). W 7 tygodniu nie zaobserwowano zmian pomiędzy grupami. Następnie w 15 tygodniu, analiza Kruskala-Wallisa wykazała statystycznie istotne różnice pomiędzy

wymienionymi powyżej grupami ($p=0,035$). Analiza post hoc Dunna wykazała istotność statystyczną pomiędzy CTRL wokalizującymi vs KO niewokalizującymi ($p=0,018$), oraz pomiędzy KO wokalizującymi vs KO niewokalizującymi ($p=0,035$).

W przypadku liczb stójek, jednoczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) wykazała istotne różnice w 2 tygodniu ($F(2, 31) = 12,81, p < 0,0001$) od indukcji mutacji pomiędzy 3 grupami samic: CTRL wokalizujące vs KO wokalizujące vs KO niewokalizujące (Rycina 34). Analiza post hoc Bonfferoniego wykazała, że statystyczna istotność występuje pomiędzy CTRL wokalizującymi vs KO wokalizującymi ($p=0,019$), pomiędzy CTRL wokalizującymi vs KO niewokalizującymi ($p=0,0001$) oraz pomiędzy KO wokalizującymi vs KO niewokalizującymi ($p=0,022$). W 7 tygodniu, jednoczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) wykazała istotność statystyczną w liczbie zrobionych stójek pomiędzy grupami ($F(2, 30) = 12,10, p=0,0001$). Analiza post hoc Bonfferoniego wykazała, że różnice występują pomiędzy CTRL wokalizujące vs KO niewokalizujące ($p < 0,0001$) grupami oraz pomiędzy KO wokalizujące vs KO niewokalizujące ($p=0,036$). Następnie w 15 tygodniu, analiza Kruskala-Wallisa wykazała statystycznie istotne różnice w ilości zaobserwowanych stójek pomiędzy grupami ($p=0,0025$). Analiza post hoc Dunna wykazała istotność statystyczną pomiędzy CTRL wokalizującymi vs KO niewokalizującymi ($p=0,0042$), oraz pomiędzy KO wokalizującymi vs KO niewokalizującymi ($p=0,018$).

Podsumowując, zarówno w grupie mutantów *Pten*-AAV-KO z uwzględnieniem jak i bez stratyfikacji danych, zaobserwowano znaczącą ilość zachowań eksploracyjnych – stójek w porównaniu do grupy kontrolnej. W analizie suplowanej nie zaobserwowano różnic pomiędzy genotypami w ilości interakcji socjalnych, jednak zaobserwowano tendencję spadkową do czasu trwania tych kontaktów w grupie mutantów, wraz z upływem czasu od indukcji mutacji i prawdopodobnie, zmiany w zachowaniu mogą być powiązane z postępującą neurodegeneracją. W analizie uwzględniającej stratyfikację na obecność wokalizacji, zaobserwowano wzrastającą liczbę osobników niewokalizujących skorelowaną wraz z upływem czasu od usunięcia genu *Pten*. Ponadto widoczna jest korelacja, że osobniki niewokalizujące wykonują więcej stójek i mniej kontaktów socjalnych w porównaniu do osobników wokalizujących.



Rycina 34. Liczba interakcji socjalnych (A) i stójek (B) zaobserwowana w grupie kontrolnej i Pten-AAV-KO ze stratyfikacją na myszy wokalizujące i niewokalizujące.

Dane przedstawiono jako średnią \pm odchylenie standardowe (SD) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Pten-AAV-CTRL (2 tydzień: samice wokalizujące: $n=16$; 7 tydzień: samice wokalizujące $n=14$; samice niewokalizujące: $n=2$; 15 tydzień: samice wokalizujące: $n=16$); Pten-AAV-KO (2 tydzień: samice wokalizujące: $n=14$, samice niewokalizujące: $n=4$; 7 tydzień: samice wokalizujące $n=12$; samice niewokalizujące: $n=4$; 15 tydzień: samice wokalizujące: $n=8$, samice niewokalizujące $n=8$).

4.4.3.2. Wokalizacje ultradźwiękowe

Wokalizacje ultradźwiękowe (USV) mierzono w trzech przedziałach czasowych (2, 7 i 15 tydzień od indukcji mutacji), za każdym razem stosując inne pary osobników, które nie wchodziły w interakcję wcześniej, aby utrzymać paradygmat nowości społecznej i większe szanse na wokalizację zwierząt. Jednostką analizy był jeden 20-minutowy zapis ($n=1$) pochodzący od konkretnej pary zwierząt o tym samym genotypie. Analizowano następujące parametry: całkowitą liczbę epizodów; ilość i typ emitowanych epizodów (z podziałem na

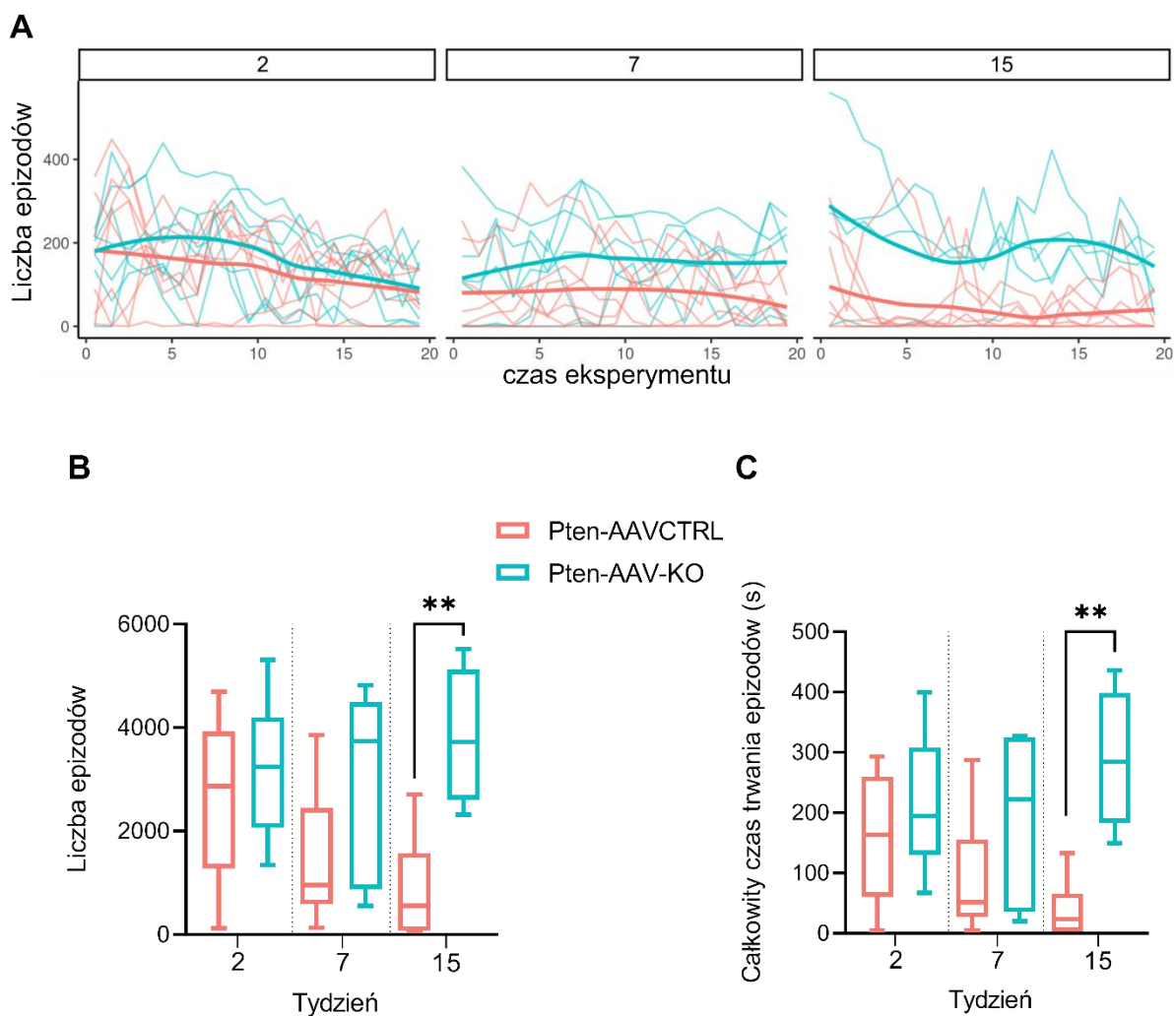
krótkie, złożone i kompleksowe); całkowity czas trwania epizodów, częstotliwość i amplituda dźwięku (średnia częstotliwość, uśredniona szerokość pasma częstotliwości, częstotliwość maksymalna i minimalna) oraz entropia spektralna dźwięków i DTW. Samce Pten-AAV-KO nie zostały uwzględnione do analizy z powodu braku uchwyconych wokalizacji pomiędzy zestawieniem samiec-samiec oraz samiec-zapach ściółki pobrany od samicy stymulowanej do fazy estrus. Wokalizację jedynie udało się zaobserwować w przypadku pilotażowego zestawienia samic i samców, w celu sprawdzenia czy mutanty samców w ogóle wokalizują i udało się zaobserwować dużą liczbę epizodów podczas nawoływania do kopulacji, jednakże nie przeprowadzono eksperymentu w tym zakresie.

Całkowita liczba epizodów mierzona w trzech różnych punktach czasowych (2, 7 i 15 tydzień od indukcji mutacji) utrzymywała się na wyższym poziomie u wokalizujących Pten-AAV-KO w porównaniu do wokalizujących kontroli, co było szczególnie widoczne w 15 tygodniu ([Rycina 35](#)).

Dwuczynnikowa ANOVA (genotyp \times czas) wykazała istotną różnicę między grupami ($F [1, 33] = 13,06, p=0,0010$). Analiza post-hoc Bonferroniego potwierdziła znamienne odmienności w 15 tygodniu ($p=0,0064$), gdzie myszy Pten-AAV-KO wykazywały większą liczbę epizodów w porównaniu z myszami kontrolnymi.

Czas trwania epizodów był również dłuższy u mutantów w porównaniu z grupą kontrolną, zwłaszcza w 15 tygodniu ([Rycina 35](#)). Dwuczynnikowa ANOVA również ujawniła znaczącą różnicę między genotypami ($F [1, 33] = 14,88, p= 0,0005$). Post-hoc Bonferroniego wskazał, że w 15 tygodniu ($p=0,0017$) myszy Pten-AAV-KO miały łączny czas wokalizacji wyższy niż grupa kontrolna.

Dla grupy Pten-AAV-CTRL widoczna była tendencja spadkowa w zarówno w liczbie zarejestrowanych epizodów jak i całkowitym czasie trwania wokalizacji ultradźwiękowej w porównaniu do grupy Pten-AAV-KO.



Rycina 35. Wokalizacje ultradźwiękowe myszy Pten-AAV-KO mierzone w 3 punktach czasowych od indukcji mutacji

Rozkład epizodów w 20-minutowym teście (A); całkowita liczba epizodów (B); C: czas trwania epizodów (C). Pten-AAV-CTRL grupa kontrolna, której podano AAV-CaMKII α -eYFP; Pten-AAV-KO = mutanty genu Pten w neuronach hipokampa w wyniku podania AAV—CaMKII α -Cre. Liczba nagrań z wokalizacją: tydzień 2: CTRL n=8, KO n=7; tydzień 7: CTRL n=7, KO n=6; tydzień 15: CTRL n=7, KO n=4. Dane przedstawiono jako średnią \pm odchylenie standardowe (SD) (*p < 0.05; **p < 0.01).

4.4.3.2.1. Typy epizodów

Wokalizacje zaklasyfikowano jako złożone, krótkie lub kompozytowe zgodnie z opisem w rozdziale 3.6.5:

- **Epizody złożone** były częściej emitowane przez myszy Pten-AAV-KO niż myszy kontrolne. Dwuczynnikowa ANOVA wykazała statystycznie istotne różnice pomiędzy genotypami ($F [1, 33] = 15,59, p=0,0004$). Analiza post-hoc Bonferroniego wykazała statystycznie istotne różnice pomiędzy grupami w 15. tygodniu ($p=0,0015$) (Rycina 36A).

- **Epizody krótkie:** Pten-AAV-KO również emitowały je częściej w 15. tygodniu niż kontrola. Dwuczynnikowa ANOVA wykazała statystycznie istotne różnice pomiędzy genotypami ($F [1, 33] = 7,135, p=0,0116$) oraz pomiędzy punktami czasowymi ($F [2, 33] = 4,847, p=0,0143$). Analiza post-hoc Bonferroniego wykazała statystycznie istotne różnice pomiędzy grupami w 15 tygodniu ($p=0,0447$), podobnie jak w przypadku epizodów złożonych oraz statystycznie istotne różnice wewnątrzgrupowo dla samic Pten-AAV-CTRL, pomiędzy 2 i 7 ($p=0,0306$) tygodniem oraz pomiędzy 2 i 15 tygodniem ($p=0,0024$) ([Rycina 36B](#)).
- **Epizody kompozytowe:** Pten-AAV-KO miały wyższą liczebność epizodów w 15. Tygodniu w porównaniu do myszy kontrolnych. Dwuczynnikowa ANOVA wykazała statystycznie istotne różnice pomiędzy genotypami [$F (1, 33) = 13,70, p=0,0008$]. Analiza post-hoc Bonferroniego wykazała statystycznie istotne różnice pomiędzy grupami w 15 tygodniu [$p=0,0004$], podobnie jak w przypadku epizodów krótkich i złożonych ([Rycina 36C](#)).

4.4.3.3. Parametr DTW

DTW odzwierciedla podobieństwo i przewidywalność wzorców dźwiękowych. Obniżony DTW wskazuje na bardziej spójne, przewidywalne i podobne wokalizacje, często związane z normalnymi lub stabilnymi stanami. Wyższy DTW odzwierciedla większą zmienność lub rozbieżność w wokalizacjach, potencjalnie związane ze stresem, chorobą lub zmienionymi stanami emocjonalnymi/behawioralnymi.

W 15. tygodniu kontrolne myszy obniżyły DTW, podczas gdy u Pten-AAV-KO współczynnik ten pozostał na wyższym, bardziej stałym poziomie. Dwuczynnikowa ANOVA przeprowadzona dla DTW odległości pomiędzy dźwiękami wykazała statystycznie istotne różnice pomiędzy genotypami [$F (1, 33) = 5,032, p=0,0317$], punktami czasowymi [$F (2, 33) = 4,599, p=0,0173$] oraz pomiędzy interakcją czas vs genotyp [$F (2, 33) = 5,923, p= 0,0063$]. Analiza post-hoc Bonferroniego wykazała statystycznie istotne różnice pomiędzy grupami w tygodniu 15 [$p=0,0040$] oraz statystycznie istotne różnice wewnątrzgrupowo dla samic Pten-AAV-CTRL, pomiędzy 2 i 15 [$p=0,0017$] tygodniem oraz pomiędzy 7 i 15 tygodniem [$p=0,0004$] ([Rycina 36D](#)).

4.4.3.4. Entropia widmowa dźwięków

Następnie sprawdzono entropię spektralną (widmowa) dźwięków (stopień nieuporządkowania dźwięków) dla obu grup. Entropia spektralna w kontekście USV

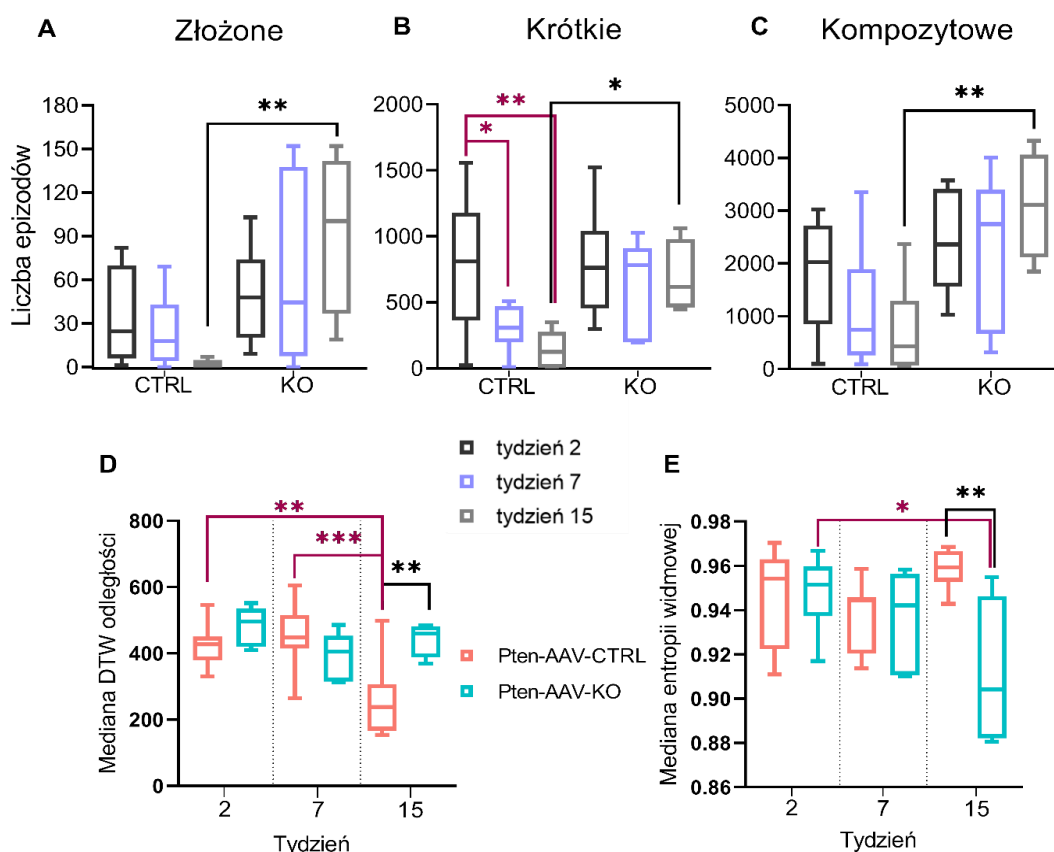
jest parametrem oceniającym, jak równomiernie energia jest rozłożona w widmie częstotliwości USV. Wyższe wartości mogą wskazywać na większą nieuporządkowaną wokalizację, niższe – na bardziej jednolity i przewidywalny sygnał.

W 15. tygodniu mutanty wykazywały obniżoną entropię w porównaniu do kontroli, co może wskazywać na spadek zróżnicowania wokalizacji u Pten-AAV-KO. Dwuczynnikowa ANOVA wykazała statystycznie istotne różnice pomiędzy genotypem [$F(1, 33) = 5,593$, $p=0,0241$] oraz pomiędzy interakcją czas vs genotyp [$F(2, 33) = 5,334$, $p=0,0098$]. Analiza post-hoc Bonferroni wykazała statystycznie istotne różnice pomiędzy grupami w dniu 15 [$p=0,0019$] oraz wewnątrzgrupowo dla samic Pten-AAV-KO pomiędzy 2 a 15 tygodniem od indukcji mutacji (0,0197).

Podsumowując, u myszy Pten-AAV-CTRL zaobserwowano stopniowe obniżenie zarówno liczby, jak i długości epizodów USV w kolejnych punktach czasowych, przy czym w 15. tygodniu spadek tych parametrów był istotny statystycznie. U Pten-AAV-KO intensywność wokalizacji utrzymywała się na podobnym poziomie, co w 2. i 7. tygodniu od indukcji mutacji.

W zakresie typów dźwięków myszy kontrolne zredukowały liczbę krótkich epizodów, podczas gdy mutanty konsekwentnie emitowały ten sam zestaw form wokalizacji. U kontroli dodatkowo zaobserwowano istotny trend do obniżenia DTW w czasie, szczególnie wyraźny w 15. tygodniu i potwierdzający istotne różnice między grupami. U Pten-AAV-KO DTW utrzymywało się na stałym poziomie, natomiast w przypadku entropii spektralnej u mutantów występował znaczący spadek pomiędzy 2. a 15. tygodniem, osiągając wartości niższe niż w grupie kontrolnej.

W 15. tygodniu różnice między genotypami były najbardziej wyraźne, wskazując na odmienne wzorce wokalizacji u Pten-AAV-KO w porównaniu do kontroli.



Rycina 36. Parametry USV myszy Pten-AAV-KO mierzone w 3 punktach czasowych od indukcji mutacji.

Parametry USV: typy epizodów (A, B, C), DTW (D) i entropia widmowa (E). Dane przedstawiono jako średnią \pm odchylenie standardowe (SD). Kolorem bordowym zaznaczono istotne różnice pomiędzy płaciami, kolorem czarnym – pomiędzy genotypami; (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Liczba nagrań z wokalizacją: tydzień 2: CTRL $n=8$, KO $n=7$; tydzień 7: CTRL $n=7$, KO $n=6$; tydzień 15: CTRL $n=7$, KO $n=4$. Pten-AAV-CTRL grupa kontrolna, której podano AAV-CaMKII α -eYFP; Pten-AAV-KO = mutanty genu Pten w neuronach hipokampa w wyniku podania AAV—CaMKII α -Cre.

4.5. ANALIZA AKTYWNOŚCI ELEKTROFIZJOLOGICZNEJ NEURONÓW HIPOKAMPA W PODREGIONIE CA1

4.5.1. Pobudliwość neuronów

Oddzielna grupa zwierząt została przygotowana do eksperymentów elektrofizjologicznych. Homozygotyczne myszy Pten^{fl/fl} (samice: $n = 5$, samce: $n = 5$) zostały wstrzyknięte mieszaniną rAAV-CaMKII-Cre /rAAV-CaMKII-eYFP w stosunku 3:1, w celu zapewnienia odpowiedniej wizualizacji komórek podczas rejestracji aktywności. Rekombinowany AAV-CaMKII-Cre rozcieńczono 5-krotnie przy finalnym stężeniu $1,1 \cdot 10^{10}$ kopii wirusowych (ang. viral copies) na $1 \mu\text{l}$ (vc/ μl), natomiast rAAV-CaMKII-eYFP rozcieńczono 2-krotnie przy końcowym stężeniu $5 \cdot 10^9$ vc/ μl . W grupie kontrolnej myszy Pten^{fl/fl} wstrzyknięto jedynie wektor rAAV-

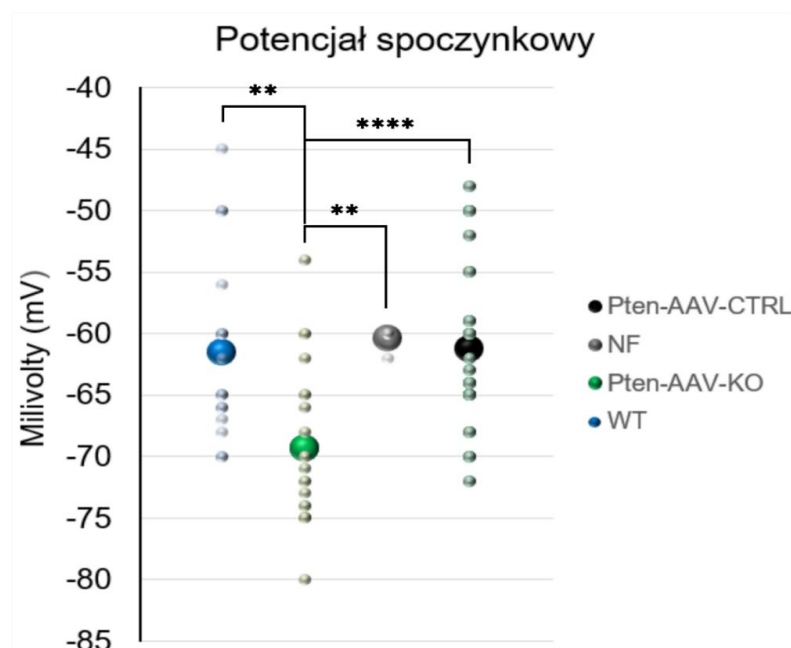
CaMKII-eYFP (samice: n = 5; samce: n = 2). Następnie po 7 tygodniach od indukcji mutacji przeprowadzono analizę opisaną w rozdziale 3.7. Zmierzone parametry pobudliwości komórek i miniaturowe postsynaptyczne prądy pobudzające (mEPSC) w neuronach piramidowych CA1.

4.5.1.1. Potencjał spoczynkowy komórek

Na początku zmierzono i porównano potencjał spoczynkowy błony komórkowej z komórek fluorescencyjnych zebranych od mutantów (n=23) i kontroli (n=33) jak i komórek nieświecących. Zaobserwowano, że neurony dzikiego typu (bez ekspresji eYFP, n=25), neurony fluorescencyjne (z ekspresją eYFP) u kontroli jak i neurony nie-fluorescencyjne (bez ekspresji eYFP, n=5) mają podobny potencjał spoczynkowy błony (w granicach -60/-62 mV). Natomiast fluorescencyjne neurony pochodzące od Pten-AAV-KO (z eYFP i Cre) wykazywały obniżony potencjał (~-70 mV).

Analiza nieparametryczna Kruskal-Wallis dla grup niesparowanych, dla parametru spoczynkowego potencjału błonowego wykazała statystycznie istotne różnice pomiędzy badanymi grupami [$p < 0,0001$]. Test wielokrotnych porównań Dunna wykazał, że fluorescencyjne komórki pochodzące od mutantów (z ekspresją eYFP i Cre) mają statystycznie znamienne obniżony potencjał błonowy do około -70 mV w porównaniu do: a) komórek nie-fluorescencyjnych pobranych od mutantów [$p = 0,0098$], b) komórek dzikiego typu [$p = 0,0016$], c) komórek fluorescencyjnych kontroli [$p < 0,0001$] (Rycina 37).

Neurony Pten-AAV-KO z ekspresją eYFP i Cre mają bardziej ujemny potencjał spoczynkowy niż wszystkie pozostałe typy komórek, co może wskazywać na zmiany w podstawowej aktywności błonowej wywołane mutacją Pten (Rycina 37).



Rycina 37. Spoczynkowy potencjał błonowy nagrany w 4 typach komórek.

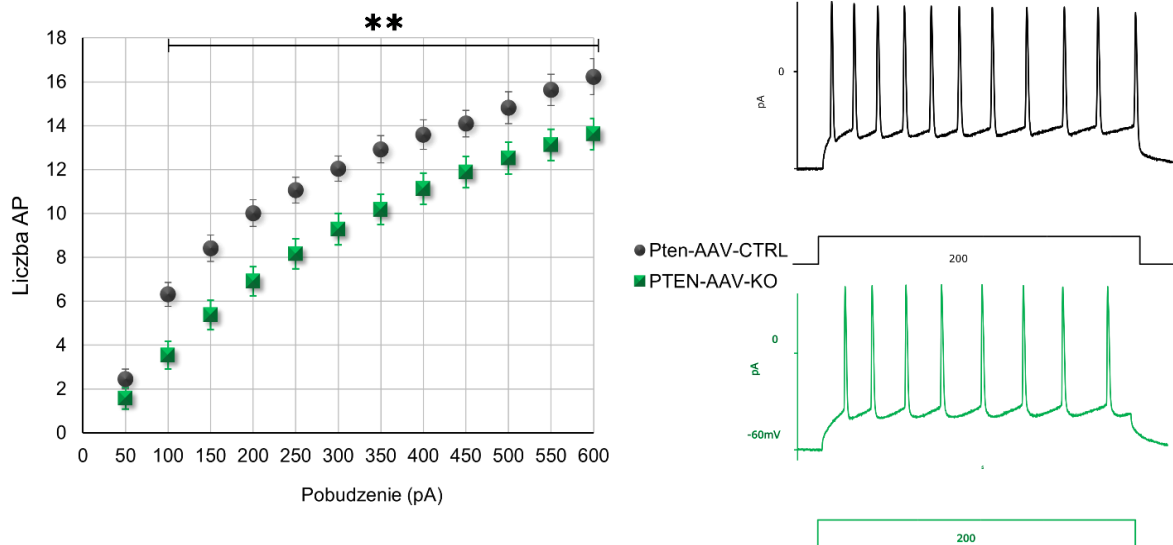
NF- komórki bez ekspresji eYFP (niefluorescencyjne) pochodzące od mutantów, WT – komórki dzikiego typu bez ekspresji eYFP (niefluorescencyjne) pochodzące od kontroli. Dane przedstawiają średnią \pm SEM (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

4.5.1.2. Właściwości potencjałów czynnościowych

Jedną z form neuroplastyczności jakiej podlegają neurony jest zmiana ich pobudliwości, która wynika z modyfikacji napięciowo-zależnych kanałów na powierzchni błony komórkowej. Przeprowadzono pomiar pobudliwość komórek (ang. excitability), a także zmierzono amplitudę i częstotliwość występowania miniaturowych EPSC w komórkach fluorescencyjnych należących do Pten-AAV-KO (z ekspresją eYFP i Cre) jak i kontroli (z ekspresją eYFP).

Komórki Pten-AAV-KO charakteryzowały się mniejszą liczbą ciągu potencjałów czynnościowych wywołanych przez prądy depolaryzacyjne o natężeniu w zakresie 100-600 pA w porównaniu z kontrolą. Na przykład, przy prądzie 200 pA liczba potencjałów czynnościowych spadła ok. 1,4-krotnie. Na przykładzie potencjałów czynnościowych wywołanych przez prąd o natężeniu 200 pA, zaobserwowano istotnie zmniejszona o około 1,4 krotnie w komórkach Pten-AAV-KO ($n = 24$) w porównaniu z kontrolami ($n = 29$).

Dwuczynnikowa ANOVA dla powtarzanych pomiarów dla częstotliwości występowania potencjałów czynnościowych w komórkach, wykazała statystycznie istotną różnicę pomiędzy genotypami [$F(1, 51) = 10,29, p=0,0023$] (Rycina 38).



Rycina 38. Pobudliwość neuronów postsynaptycznych CA1 wyrażona w ilości powstałych potencjałów czynnościowych przy stymulacji prądem w zakresie 50-600 pA.

AP = potencjał czynnościowy. Skala: 15 pA i 20 ms. Dane przedstawiają średnią \pm SEM (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)

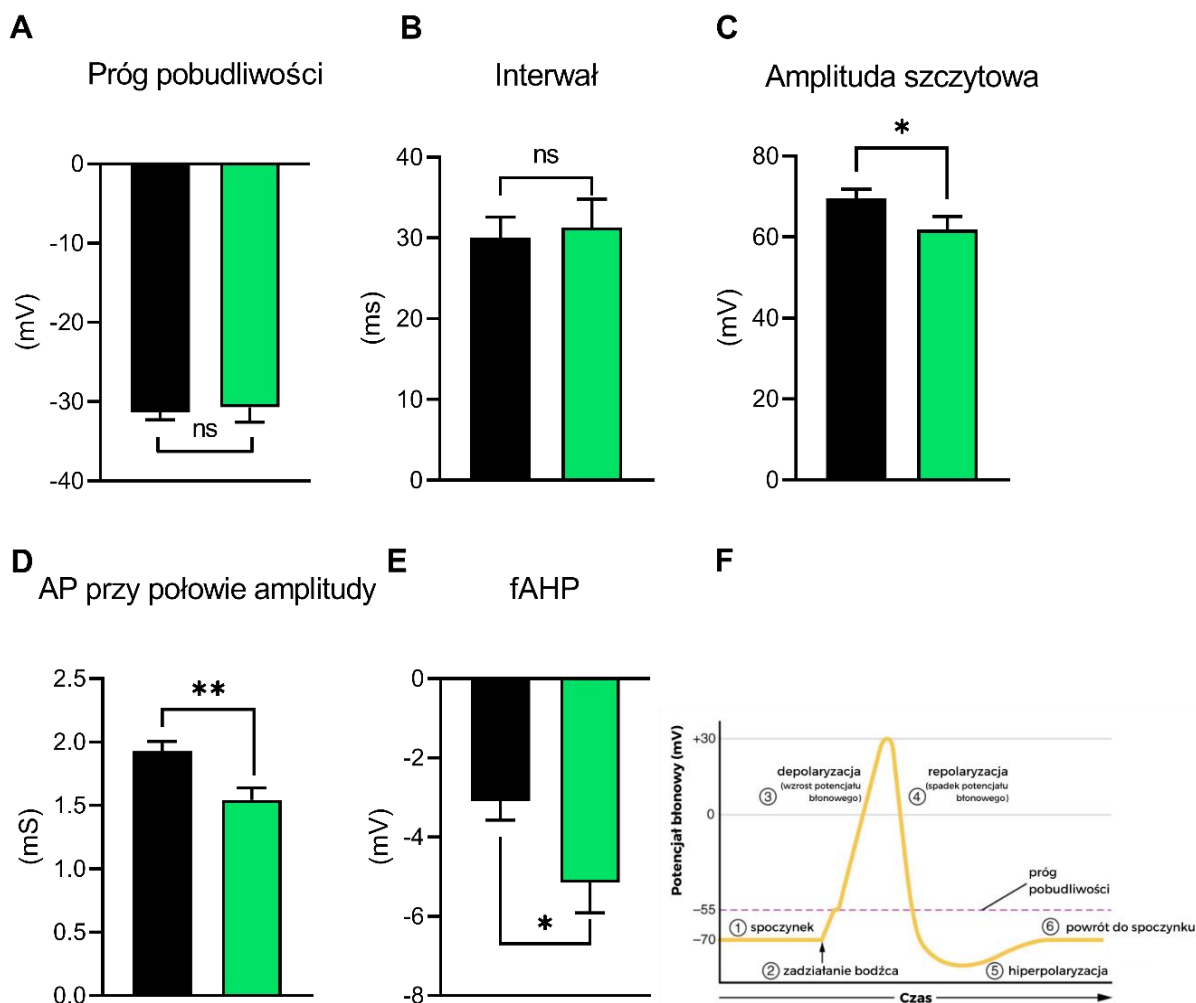
4.5.1.3. Dodatkowe parametry potencjałów czynnościowych:

Podczas analizy pobudliwości komórek uwzględniono dodatkowe parametry tj.: minimalny potencjał błonowy (próg pobudliwości), który musi zostać osiągnięty, aby wywołać potencjał czynnościowy; interwał między zdarzeniowy potencjałów czynnościowych (z ang. inter-event interval of action potentials), amplitudę szczytową, czas trwania potencjału czynnościowego przy połowie jego maksymalnej amplitudy (z ang. half-width), parametr szybkiej hiperpolaryzacji (fAHP, z ang. fast afterhyperpolarization) zarejestrowany dla drugiego potencjału czynnościowego, wywołanego prądem o natężeniu 200 pA.

- Minimalny potencjał błonowy (próg pobudliwości) i interwał między zdarzeniami AP nie różniły się znacząco między mutantami a kontrolą. Test t studenta dla prób niezależnych nie wykazał znaczących różnic w progu pobudliwości (CTRL: $n=37$, KO: $n=23$) komórki pomiędzy genotypami, dodatkowo analiza parametryczna Mann-Whitney również nie wykazała istotnych różnic dla interwału między zdarzeniowego potencjałów czynnościowych (CTRL: $n=35$, KO: $n=21$), co świadczy o tym, że zarówno mutanty jak i kontrole miały jednakowy próg pobudzeniowy potencjałów czynnościowych o podobnych 30 ± 1 mili sekundowych interwałach czasowych pomiędzy kolejną depolaryzacją błony (Rycina 39A i B).

- Amplituda szczytowa: Mutanty charakteryzowały się obniżonym maksymalnym poziomem depolaryzacji potencjału błony podczas potencjału czynnościowego średnio około 7,6 mV w porównaniu do kontroli. Test t studenta dla prób niezależnych wykazał statystycznie istotne różnice pomiędzy genotypami [CTRL: n=37, KO: n=27, t=2,027, df=59, p=0,047] dla amplitudy szczytowej ([Rycina 39C](#)).
- Czas trwania potencjału czynnościowego (half-width) był krótszy u Pten-AAV-KO o ~0,38 ms w porównaniu do kontroli. Analiza testu t z korektą Welcha wykazała statystycznie istotne różnice pomiędzy grupami [CTRL: n=37, KO: n=23; t=3,172, df=48,62, p=0,0026] ([Rycina 39D](#)).
- Parametr szybkiej polaryzacji: Mutanty charakteryzują się podwyższoną hiperpolaryzacją do -5,14 mV w porównaniu do -3,1 mV u kontroli. Analiza nieparametryczna Mann-Whitney wykazuje statystycznie istotne różnice pomiędzy grupami dla szybkiej hiperpolaryzacji [CTRL: n=27, KO: n=21, p=0,0117] ([Rycina 39E](#)).

Zmniejszony czas trwania potencjału czynnościowego przy połowie jego maksymalnej amplitudy oraz podwyższony fAHP u mutantów, sugeruje szybką repolaryzację i silniejszą hiperpolaryzację następczą, prawdopodobnie związaną z zwiększoną aktywnością kanałów potasowych (K⁺). Ta kombinacja może ograniczyć zdolność neuronu do wielokrotnego wyładowania poprzez wydłużenie okresu refrakcji pomimo szybszego resetowania potencjału błonowego i wskazuje za zmniejszoną wewnętrzną pobudliwość u mutantów.



Rycina 39. Parametry elektrofizjologiczne komórek zebrane podczas analizy pobudliwości komórek w CA1.

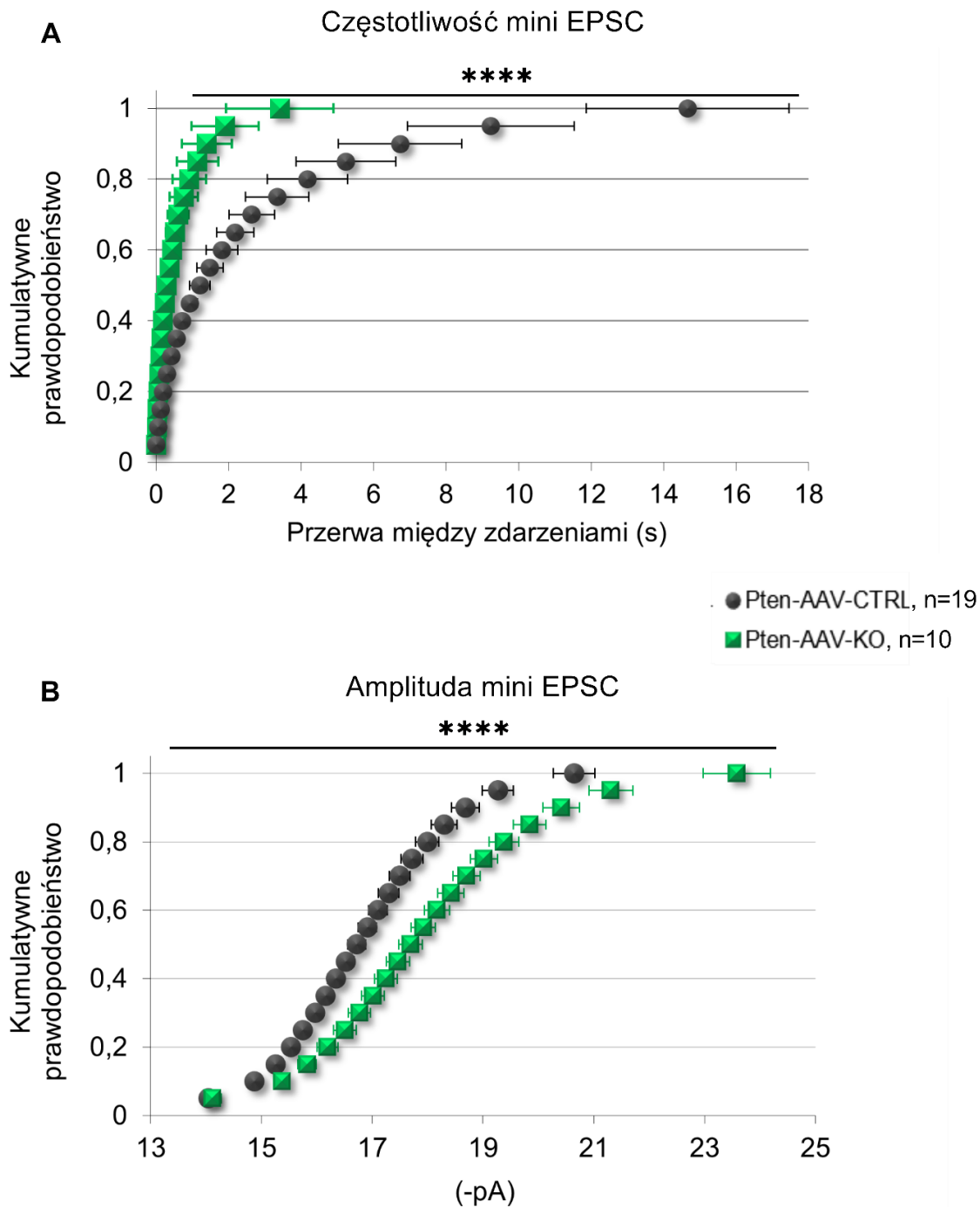
Próg pobudliwości błony (A), interwał między zdarzeniowy potencjałów czynnościowych (B), amplitudę szczytową (C), czas trwania potencjału czynnościowego przy połowie jego maksymalnej amplitudy (D), parametr szybkiej hiperpolaryzacji (fAHP, D) zarejestrowany dla drugiego potencjału czynnościowego wywołanego prądem o 200 pA oraz przebieg pojedynczego potencjału czynnościowego i jego poszczególnych faz (F). Dane przedstawiają średnią \pm SD (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

4.5.2. Miniaturowe EPSC (mEPSC)

Skumulowane prawdopodobieństwo (z ang. cumulative probability) jest parametrem umożliwiającym oszacowanie miniaturowych pobudzających potencjałów czynnościowych (mEPSC, z ang. miniature excitatory postsynaptic currents), które są wynikiem spontanicznego uwalniania pojedynczych pęcherzyków z neurotransmiterem w synapsie. W wyniku sumowania prawdopodobieństwa wystąpienia zdarzeń w określonym przedziale czasu i amplitudzie zdarzeń (maksymalna wartość prądu postsynaptycznego generowanego przez aktywację receptorów/maksymalna amplituda zdarzeń) umożliwiają określenie zmian w dynamice neurotransmisji. Wykres kumulatywnego prawdopodobieństwa jest to krzywa,

która przedstawia dane w formie frakcji (lub w procentach) od wartości 0 do 1, gdzie 0 oznacza brak zdarzeń a 1 oznacza wszystkie zdarzenia. Zmierzone zostały dwa główne parametry: amplituda oraz częstotliwość występowania zdarzeń (mEPSC). Częstotliwość została obliczona na podstawie analizy przerwy między zdarzeniami - czasu upływającego między końcem jednego mini EPSC a początkiem kolejnego.

- Częstotliwość zdarzeń: Częstotliwość zdarzeń była większa (spontaniczna aktywność komórek) u Pten-AAV-KO i dla 100% prawdopodobieństwa wynosiło 3,4 sekund, w porównaniu do 14,7 sekund u kontroli. Odstępy czasowe między kolejnymi spontanicznymi zdarzeniami były ponad 4-krotnie krótsze u mutantów w porównaniu do kontroli, co świadczy o podwyższonej aktywności synapsy u Pten-AAV-KO i uwalniania większej ilości uwalnianego neurotransmitera ([Rycina 40A](#)). Analiza Kolmogorov-Smirnov dla częstotliwości zdarzeń mEPSC wykazała statystycznie istotne różnice pomiędzy genotypami [CTRL: n = 19, KO: n = 10, p = 0.0001].
- Amplituda mEPSC: W porównaniu do kontroli, amplituda – wielkość prądu mierzonego w odpowiedzi na spontaniczne uwolnienie jednego pęcherzyka była znacząco wyższa u mutantów. Przy prawdopodobieństwie na poziomie 100% zdarzeń świadczy o tym, że mutanty miały amplitudy mniejsze bądź równe 23.6 pA, podczas gdy u kontroli zaobserwowano na tym samym poziomie zdarzeń większe bądź równe 20,6 pA. Mutanty charakteryzowały się amplitudą wyższą o 3 pA, co może świadczyć o wzmocnieniu funkcji synapsy poprzez większą ilość aktywnych receptorów w błonie postsynaptycznych przez neurotransmitter uwalniany z jednego pęcherzyka synaptycznego i większej liczbie receptorów AMPA zintegrowanych z błoną ([Rycina 40](#)). Analiza Kolmogorov-Smirnov dla amplitudy miniaturowych EPSC wykazała statystycznie istotne różnice pomiędzy genotypami [CTRL: n = 19, KO: n = 10, p <0.0001].



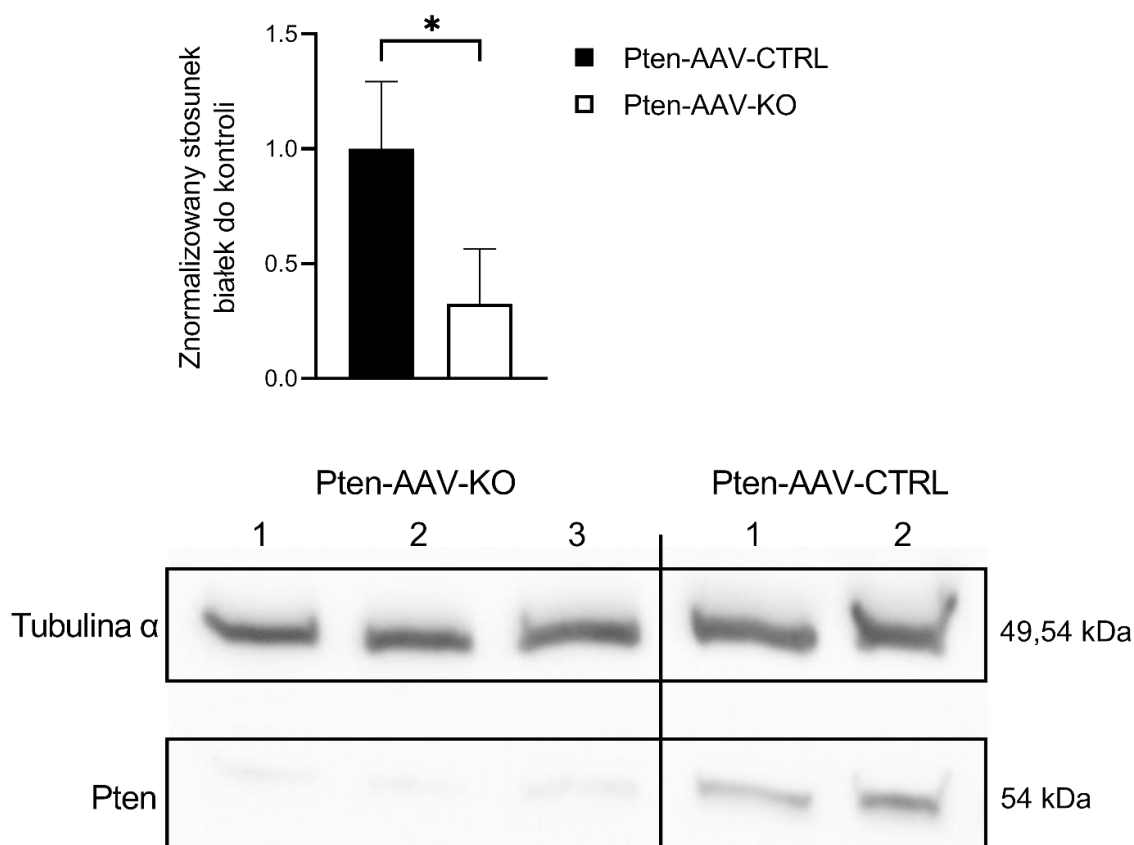
Rycina 40. Miniaturowe EPSC

Częstotliwości (A) i maksymalnej amplitudy zdarzeń (B) w fluorescencyjnych neuronach piramidowych CA1, pobranych od mutantów Pten-AAV-KO i kontroli w 7 tygodniu od indukcji mutacji. s-sekundy, pA-pikoamper. Dane przedstawiają średnią \pm SEM (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

Zwiększona częstotliwość i większa amplituda mEPSC u mutantów sugerują bardziej aktywną synaptycznie populację neuronów, co może wynikać z silniejszej odpowiedzi postsynaptycznej bądź większej liczby receptorów AMPA w błonie neuronów Pten-AAV-KO.

4.6. ANALIZA POZIOMU BIAŁKA PTEN Z HOMOGENIZATACH HIPOKAMPA

W 7 tygodniu od indukcji mutacji w hipokampie stwierdzono obniżoną zawartość białka Pten w próbkach lizatu komórkowego myszy Pten-AAV-KO w porównaniu z kontrolą, przy użyciu Tubuliny α jako białka referencyjnego (Rycina 41).



Rycina 41. Ocena ilościowa białka Pten w porównaniu do białka kontrolnego wszechobecnie występującego w komórkach białka Tubuliny alfa techniką Western Blot.

Naniesiono do dołków po 10 μ g lizatu białkowego pochodzącego z hipokampa Pten-AAV-KO (n=3) i Pten-AAV-CTRL (n=2) wyizolowanego w 7 tygodniu po indukcji mutacji. Analiza Western Blot potwierdza działanie systemu AAV-Cre-loxP w modelu Pten-AAV-KO na podstawie zaobserwowanego obniżonego poziomu białka Pten w porównaniu do ekspresji białka referencyjnego alfa Tubuliny – zaliczanego do grupy białek kodowanych przez geny metabolizmu podstawowego w komórkach (ang. housekeeping genes).

Badania elektrofizjologiczne oraz analiza Western Blot w 7 tygodniu od indukcji mutacji wskazują na wielokierunkowe zmiany w homeostazie neuronalnej, mogące tłumaczyć fenotyp obserwowany w zachowaniu myszy z delecją genu Pten.

5. DYSKUSJA

5.1. ZNACZENIE GENU *Pten* W UCZENIU SIĘ I PAMIĘCI ZALEŻNEJ OD HIPOKAMPA

Fenotyp modeli zwierzęcych z delecją genu *Pten* w dużej mierze zależy od użytych genetycznych konstruktów do ich wytworzenia. Szczególnie istotny jest wybór promotora, który inicjuje i kieruje ekspresją rekombinazy Cre w wybranych strukturach mózgu. Pierwsze doniesienia związane z uczeniem się i formowaniem pamięci zależnej od hipokampa, pochodzą z analizy mysich modeli *Pten*GFAP-Cre z warunkową delecją *Pten* w neuronach korowych, hipokampa oraz mózdzku (Bajenaru i wsp., 2002; Kwon i wsp., 2001; Marino i wsp., 2000). U dorosłych myszy aktywność promotora GFAP jest ograniczona głównie do astrocytów, podczas gdy w okresie embrionalnym ekspresja obejmuje komórki prekursorowe układu nerwowego w strefie komorowej oraz w rdzeniu kręgowym (Fraser i wsp., 2004). Dodatkowo, wykazano, że ekspresja GFAP zachodzi w podzbiorze komórek glejowych zlokalizowanych w strefie podkomorowej (SVZ) mózgu oraz w komórkach macierzystych układu nerwowego, zdolnych do różnicowania w astrocyty, oligodendrocyty i neurony (Casper i McCarthy, 2006; Chow i wsp., 2008; Doetsch, 1997). W związku z tym, w modelach zwierzęcych *Pten*GFAP-Cre, delecja genu *Pten* wywołuje znaczące zmiany strukturalne i funkcjonalne w dojrzewających neuronach, prowadząc do deficytów w procesach uczenia się, zmian w zachowaniu oraz do skróconego życia zwierząt. Według Lugo i wsp., 2013 utrata *Pten* w modelu neurorozwojowym *Pten*GFAP-Cre związana jest z deficytem w pamięci kontekstowej (pamięć strachu), ponieważ mutanty spędziły statystycznie istotnie mniej czasu w bezruchu w porównaniu do osobników kontrolnych i heterozygotycznych odpowiedników. Ponadto, w badaniu przeprowadzonym przez Hodges i wsp., 2018 zbadano wpływ delecji genu *Pten* na funkcjonowanie poznawcze myszy. Aby ocenić pamięć rozpoznawczą obiektów, zastosowano test nowości obiektu (NOR, ang. Novel Object Recognition), a do oceny pamięci przestrzennej wykorzystano labirynt Lashleya. W teście NOR myszy z delecją *Pten* wykazały upośledzoną zdolność do rozróżniania nowego obiektu od znanego, co sugeruje deficyty w pamięci rozpoznawczej. W labiryncie Lashleya mutanty potrzebowały znacząco więcej czasu na ukończenie zadania w porównaniu z grupą kontrolną, wskazując na osłabienie pamięci przestrzennej. W podobnym modelu *Pten*Nse-Cre, wykorzystano transgeniczną linię, gdzie rekombinaza Cre była pod kontrolą promotora specyficznego dla enolazy neuronowej (ang. Neuron specific enolase-Cre), co prowadziło do delecji genu *Pten* w obszarze CA3, warstwie polimorficznej hipokampa oraz w zakręcie zębatym. Delecja obejmowała warstwy III–V kory

mózgowej, warstwę ziarnistą zakrętu zębatego (GL) oraz warstwę polimorficzną (PML) formacji hipokampa. U mutantów w P14 zaobserwowano komórki pozbawione ekspresji *Pten* w PML oraz zewnętrznej warstwie ziarnistej (GL) zakrętu zębatego. Autorzy wskazali, że u mutantów zaobserwowano deficyt w uczeniu się w labiryncie wodnym Morrisa (MWM, ang. Morris Water Maze). Jednakże zaobserwowano także u tych zwierząt nadmierny lęk podczas habituacji w basenie, co skutkowało wydłużeniem przyuczania z widoczną platformą do 4 dni (Kwon i wsp., 2006). Należy jednak pamiętać, że silny stres i lęk może znacząco wpływać na wyniki w teście MWM, szeroko stosowanym do oceny uczenia się przestrzennego i pamięci u gryzoni. Podwyższony poziom lęku (skorelowany z podwyższonym poziomem kortykosteronu w MWM) może prowadzić do zachowań takich jak tigmotaksja, czyli pływania głównie wzdłuż krawędzi labiryntu, co zaobserwowano w modelu Kwon i wsp., 2006. Może to potencjalnie zaburzać wyniki i ocenę funkcji poznawczych w hipokampie (Harrison i wsp., 2009; Higaki i wsp., 2018; Jung i wsp., 2017; Kim i wsp., 2015).

W kontraście, usunięcie genu *Pten* w modelach, gdzie promotor *CaMKII α* warunkuje rekombinację Cre ograniczoną do neuronów pobudzających daje zupełnie inny fenotyp, cechujący się niezmienną morfologią neuronów w hipokampie. Jednakże do tej pory uczenie się i pamięć zbadano w globalnym modelu lub gdy usunięcie *Pten* zachodzi w okresie postnatalnym, gdy neurony nie tworzą jeszcze funkcjonalnych hipokampalno-korowych połączeń. Pod kontrolą promotora *CaMKII α* , indukowanie mutacji punktowych w sekwencji kodującej izoformę alfa białka *Pten* (w modelach konstytutywnych) oraz mutacji w eksonie 5 na wczesnym etapie postnatalnym (w modelach warunkowej delecji) wykazano wpływ na deficyty w nabywaniu pamięci przestrzennej, mierzonej w teście labiryntu wodnego Morrisa, oraz zaburzenia w przypominaniu nieprzyjemnych zdarzeń w warunkowaniu strachu na kontekst (CFC, ang. contextual fear conditioning) (Sperow i wsp., 2012; Wang i wsp., 2017).

Dotychczas brakowało szczegółowych danych dotyczących wpływu delecji genu *Pten* na dojrzałe i w pełni zróżnicowane neurony pobudzające. W niniejszej rozprawie doktorskiej wykorzystano dwa modele mysie, celujące w tego typu zróżnicowane neurony. W modelu z indukowaną za pomocą tamoksyfenu (TAM) delecją genu *Pten* w dorosłych neuronach pobudzających, ograniczoną do struktur przodomózgowia (linia *Pten*-iCKO), wykazano podwyższoną zdolność uczenia przestrzennego oraz efektywność ponownego kodowania informacji w testach uczenia się miejsca (PL, ang. place learning), przeprowadzonych w systemie poznawczym IntelliCage. Pomimo tych poznawczych korzyści, zaobserwowano przedwczesną śmierć zwierząt w okresie od 7 do 13 tygodni po indukcji mutacji.

Co zaskakujące, nawet 24–48 godzin przed śmiercią myszy wciąż wykazywały wyraźne preferencje względem poprawnego rogu w teście revPL. Podobną przedwczesną śmiertelność odnotowano w innych modelach, takich jak *Pten*GFAP-Cre; *Pten*CaMKII α -Cre oraz *Pten*Nse-Cre, gdzie delecja *Pten* obejmowała większe obszary i struktury mózgu, w tym kluczowe obszary zaangażowane w regulację procesów neurofizjologicznych (Backman i wsp., 2001; Fraser i wsp., 2004; Kwon i wsp., 2006; Kwon i wsp., 2003; Sperow i wsp., 2012). Zgodnie z dotychczasową wiedzą, szlak mTOR, na który ma wpływ mutacja *Pten*, reguluje równowagę energetyczną i kontrolę apetytu w podwzgórzu. Postawiono hipotezę, że długotrwała aktywacja tego szlaku w kluczowych regionach mózgu może prowadzić do zmniejszenia uczucia łaknienia, co w konsekwencji skutkuje znaczną utratą masy ciała i śmiercią z powodu niedożywienia (Cota i wsp., 2006). Niemniej jednak zmiany metaboliczne w tym modelu nie były bezpośrednio badane i wymagają dalszej, pogłębionej analizy. W dalszej kolejności zastosowano bardziej specyficzny i precyzyjny model (*Pten*-AAV-KO), w którym delecja genu *Pten* była generowana za pomocą stereotaktycznego wstrzyknięcia rekombinowanych wektorów AAV i ograniczona do dojrzałych neuronów pobudzających w hipokampie. Podczas analizy typu ‘Western blot’ wykazano 68% spadek ilości białka *Pten* w porównaniu do kontroli oraz wzrost ekspresji markera mTOR – białka pS6 podczas analizy ICH, potwierdzając, że usunięcie genu *Pten* zwiększa aktywację szlaku PI3K-AKT-mTOR, w sposób opisywany wcześniej w literaturze (Domanskyi i wsp., 2011; Pun i wsp., 2012; Shi i wsp., 2011). Zwierzęta przetestowano w prostych testach preferencji miejsca oraz w złożonych tekstach patrolowania i zaobserwowano podobny efekt na funkcje poznawcze jak w przypadku modelu *Pten*-iCKO. W porównaniu do grupy zwierząt kontrolnych, samice *Pten*-AAV-KO osiągały lepsze wyniki w uczeniu się w 7 tygodniu po indukcji mutacji, aż do momentu pojawienia się postępującej neurodegeneracji.

Inni badacze zaobserwowali podobny efekt na zdolność uczenia się w modelu myszy z delecją genu *AIM2*. Wykazano, że wprowadzona mutacja promuje neuroplastyczność i poprawia pamięć przestrzenną myszy mierzoną w labiryncie wodnym Morrisa. Białko *AIM2* prawdopodobnie promuje ekspresję *Pten*, a tym samym negatywnie reguluje szlak PI3K/AKT. Delecja *AIM2* obniża poziom mRNA *Pten* i zwiększa ekspresję AKT oraz *Homer1a* (Chen i wsp., 2019). Gen *Homer1a* należy do rodziny białek obecnych w gęstości postsynaptycznej i odgrywa ważną rolę w plastyczności synaptycznej i tworzeniu śladu pamięciowego (Brakeman i wsp., 1997; Chen i wsp., 2019; Thomas, 2002). Badania te wykazały, że inhibicja aktywności *Pten* wspiera uczenie się i pamięć.

Ponadto, badanie mechanizmu przeciwnego (hamującego aktywność neuronów pobudzających) wykazały, że inhibicja układu GABA-ergicznego w hipokampie wspiera promuje uczenie się przestrzenne i polepsza pamięć myszy w modelu z delecją genu *Gabra4*. Zwiększoną pamięć zaobserwowano w klasycznych testach tj. test aktywnego unikania (z ang. active avoidance tasks), labirynt wodny Morrisa, labirynt Y i warunkowanie strachu na kontekst (Fan i wsp., 2020; Moore i wsp., 2010; Shen i wsp., 2010; Shen i wsp., 2017). Gen *Gabra4* koduje podjednostkę alfa4, która wraz z podjednostką delta wspólnie ulega ekspresji, a ich produkty białkowe znajdujące się w miejscach okołosynaptycznych i poza synapsami. Receptory GABA(A) złożone z podjednostek $\alpha 4\beta\delta$ są często obecne w interneuronach w warstwie molekularnej zakrętu zębatego hipokampa oraz w dendrytach i kolcach neuronów piramidowych w obszarze CA1 (Sabaliauskas i wsp., 2012; Shen i wsp., 2010). Ekspresja podjednostki Alfa4 i jej włączenie do pentameru aktywuje receptor GABA(A) i generuje toniczny prąd hamujący, który osłabia aktywność napięciowo zależną NMDAR i w konsekwencji hamuje transmisję synaptyczną między neuronami (Herron i wsp., 1986). Wpływ podwyższonej aktywności ścieżki sygnałowej na właściwości elektrofizjologiczne komórek pozbawionych ekspresji *Pten*

W Wyniki analizy elektrofizjologicznej, zarejestrowanej w 7 tygodniu po indukcji mutacji, podkreśliły istotne zmiany w pobudliwości komórek *Pten-AAV-KO*, jak i transmisji synaptycznej w wyniku uwalnianego pojedynczego, pobudzającego neurotransmitera do przestrzeni synaptycznej. Podczas analizy wewnętrznej pobudliwości neuronów piramidowych CA1 zaobserwowano u mutantów znaczący spadek pobudliwości w postaci zmniejszonej liczby potencjałów czynnościowych w porównaniu do neuronów myszy kontrolnych. Początkowy etap wywoływania potencjału synaptycznego nie był zaburzony (próg pobudliwości), a także interwały między poszczególnymi potencjałami czynnościowymi wydają się być takie same pomiędzy grupami. Po tych parametrach można wywnioskować, że początkowa aktywacja kanałów sodowych bramkowanych napięciem nie jest zaburzona. Jednakże komórki analizowane u mutantów *Pten-AAV-KO* charakteryzowały się obniżonym potencjałem spoczynkowym błony, który wskazuje na bardziej hiperpolaryzowany potencjał błonowy (ujemny), prawdopodobnie wynikający ze zwiększonej aktywności kanałów potasowych bądź zaburzeniach w funkcji pompy ATPazy Na^+/K^+ (Aggarwal i wsp., 2021; Proskurina, 2023). Zwiększona wartość szybkiej hiperpolaryzacji następczej u mutantów wpływa na zmniejszenie pobudliwości neuronów poprzez wydłużenie okresu refrakcji i ograniczenie zdolności do wielokrotnego wyładowania co jest odzwierciedlone w liczbie

potencjałów czynnościowych stymulowanych w zakresie 100-600 pA. Dodatkowo u mutantów zaobserwowano zmniejszoną amplitudę szczytową i szerokość połowiczną potencjału czynnościowego, co prawdopodobnie wskazuje na zwiększoną i zaobserwowaną repolaryzację błony. Zmniejszona amplituda szczytowa może być związana z prawdopodobieństwem obniżonego przewodnictwa kanałów Na⁺ lub ich szybszą inaktywacją i internalizacją do wnętrza komórki. Obniżony czas trwania potencjału czynnościowego przy połowie jego maksymalnej amplitudy oraz podwyższona fAHP może świadczyć o prawdopodobieństwie zwiększonej aktywności kanałów jonowych K⁺ co prowadzi do szybszej repolaryzacji (zaburzenia pomiędzy stosunkiem fazy depolaryzacji do repolaryzacji). W literaturze opisano funkcje mTOR jako regulatora progów potencjałów czynnościowych i częstotliwości wyładowań poprzez syntezę odpowiednich białek zaangażowanych w proces. Inhibicja aktywności mTOR wpływa na proces syntezy podjednostki Kv1.1 napięciowo zależnych kanałów potasowych w dendrytach. Aktywność tej podjednostki obniża potencjał błonowy. Ta informacja sugeruje, że zaobserwowano u mutantów *Pten*-AAV-KO pewien mechanizm kompensacyjny, który pomimo aktywności szlaku PI3K-AKT-mTOR znalazł sposób na obniżenie pobudliwości komórek, aby chronić przed ciągłą aktywacją w wyniku pobudzenia pochodzącego z nadmiernej aktywacji transmisji synaptycznej (Nguyen i Anderson, 2018; Pernice i wsp., 2016; Raab-Graham i wsp., 2006).

Modele mysie z warunkową delecją genu *Pten* na wczesnym etapie rozwoju lub w komórkach progenitorowych, opisane w rozdziale 5.1, wykazały różne cechy wynikające z mutacji genu *Pten* na pobudliwość komórkową i podstawową transmisję pobudzającą w neuronach (Fraser i wsp., 2008; Sperow i wsp., 2012; Takeuchi i wsp., 2013; Wang i wsp., 2017). Bardziej spójne wyniki uzyskano w modelach z indukowaną delecją genu *Pten*. Generalnie, w neuronach usunięcie genu *Pten* za pomocą wektorów lentiwirusowych w hodowli komórkowej, zakręcie zębatym (P7), korze słuchowej (P18-21) oraz w ciele migdałowatym (dorosłe osobniki) zaobserwowano zwiększoną pobudliwość lub częstotliwość, bądź oba parametry jednocześnie (amplituda i częstotliwość) miniaturowych EPSC (Haws i wsp., 2014; Luikart i wsp., 2011; Weston i wsp., 2014; Williams i wsp., 2015; Xiong i wsp., 2012). Co istotne, zwiększone parametry mEPSC u noworodków i dorosłych myszy były skorelowane ze zwiększonym rozgałęzieniem dendrytów oraz gęstością kolców dendrytycznych w odległych obszarach mózgu myszy (Luikart i wsp., 2011; Williams i wsp., 2015; Xiong i wsp., 2012). Zgodnie z wcześniejszymi badaniami dotyczącymi indukowanego usunięcia genu *Pten*, także w naszych badaniach zaobserwowaliśmy wzrost parametrów

mEPSC w neuronach CA1 w hipokampie u myszy *Pten*-AAV-KO. Zarówno częstotliwość, jak i amplituda były podwyższone, co wskazuje na wzmocniony sygnał pobudzający (zwiększenie transmisji synaptycznej lub liczby synaps na złączu) do tych neuronów w 7 tygodniu po transdukcji AAV. Przeciwnostawne adaptacje błony komórkowej i plastyczności synaptycznej mogą wynikać z mechanizmów specyficznych dla utrzymania homeostazy w sieci neuronalnej. Jedną z możliwych hipotez zakłada, że zmniejszona pobudliwość występuje w nadmiernie pobudzonych neuronach, co potencjalnie zapobiega ekscytotoksyczności ([Armada-Moreira i wsp., 2020](#)). Inne wyjaśnienie sugeruje, że zmniejszona pobudliwość komórek jest pierwotnym czynnikiem odpowiedzialnym za późniejsze zwiększenie parametrów mEPSC. W tym scenariuszu mniej pobudliwe komórki *Pten*-AAV-KO wymagałyby silniejszego sygnału wejściowego, aby przekroczyć próg wyzwolenia potencjału czynnościowego, przez co byłyby bardziej podatne na zmiany plastyczne. Hipoteza ta znajduje poparcie w danych wskazujących, że wraz z upływem czasu po mutacji wzrasta pojemność błony, a opór wejściowy maleje. W związku z tym neurony z deficytem *Pten* wykazują zmienioną częstotliwość wyładowań, wymagającą wyższej dawki prądu, aby przekroczyć próg potencjału czynnościowego ([Williams i wsp., 2015](#)). Kompleks mTORC1 wykazuje podwójną funkcję w kontrolowaniu zarówno plastyczności synaptycznej, jak i wewnętrznej, regulując ekspresję podjednostki alfa kanału potasowego zależnego od napięcia oraz podjednostki 1 receptora glutaminowego typu NMDA ([Raab-Graham i wsp., 2006](#)). Niemniej jednak mEPSC pozostaje kluczowym parametrem w utrzymaniu funkcjonalnych połączeń neuronalnych i skuteczności synaps. Zwiększona amplituda i/lub częstotliwość mEPSC opisuje postsynaptyczną odpowiedź na spontaniczną egzocytozę pojedynczego pęcherzyka presynaptycznego i uwalnianie neuroprzekaźnika do szczeliny synaptycznej. Biorąc to pod uwagę, wydaje się prawdopodobne, że zwiększone parametry mEPSC mogą odpowiadać za obserwowany fenotyp poprawionej zdolności uczenia się i pamięci w modelu *Pten*-AAV-KO zaobserwowanym w 7 tygodniu od transdukcji rAAV.

5.2. WPLYW DELECJI GENU *Pten* NA OGÓLNA AKTYWNOŚĆ I KOMUNIKACJĘ ORAZ INTERAKCJE SOCJALNE ZWIERZĄT

5.2.1. Heterogeniczny i zależny od płci fenotyp mutantów *Pten*

W badanym modelu zwierzęcym *Pten*-AAV-KO z delecją genu *Pten* w dojrzałych neuronach pobudzających hipokampa, zaobserwowano podwyższoną aktywność eksploracyjną i lokomotoryczną mierzoną w teście OF i przejawiającą się pokonaniem znacznie większego dystansu w aparacie z istotnie wyższą średnią prędkością niż mioty kontrolne. W naszym

modelu hiperaktywność lokomotoryczna jest zależna od płci, istotnie statystycznie zwiększona u samic. Ponadto, wyniki testu otwartego pola są zgodne z nadaktywnością obserwowaną podczas PL w IntelliCage. Jednakże czas spędzony w obszarze centralnym był znacząco zmniejszony, a czas spędzony w narożnikach był odpowiednio zwiększony dla zmutowanych samic i samców w porównaniu do grup kontrolnych. Obniżona eksploracja w centralnej części aparatu prawdopodobnie nie jest skorelowana z podwyższonym lękiem w przypadku samic mutantów *Pten*, ponieważ wykazały one w teście EPM obniżony poziom lęku na podstawie dłuższej eksploracji otwartych ramion w stosunku do zamkniętych oraz zwiększoną liczbą wychyleń głowy poza aparat. W przypadku samców kontrolnych jak i mutantów zaobserwowano minimalną tendencję do eksploracji otwartych ramion w porównaniu do grupy samic kontrolnej *Pten-AAV-CTRL*, jak i eksperymentalnej *Pten-AAV*. Pomimo krótszego czasu przebywania w otwartych ramionach, samce *Pten-AAV-KO* podobnie jak samice wykazywały zwiększoną liczbę wychyleń głowy poza aparat z pozycji centralnej w porównaniu z grupą kontrolną. Fenotyp zaobserwowany u samic, i częściowo u samców, *Pten-AAV-KO* jest bardzo zbliżony do wyników uzyskanych w OF jak i EPM przez Kwon i wsp., 2006 oraz Lugo i wsp., 2014 na myszach *PtenloxP/loxP*, *Nse-Cre* oraz *PtenloxP/loxP*, *GFAP-Cre*. Dodatkowo hiperaktywność lokomotoryczna była raportowana także w modelu *Pten-Nestyna-CreERT2*, w których *Pten* został usunięty z komórek macierzystych i progenitorowych proliferujących do linii neuronalnej w SGZ (Amiri i wsp., 2012). Badania pokazują, że hiperaktywność lokomotoryczna u zwierząt jest prawdopodobnie skorelowana z podwyższoną aktywnością szlaku PI3K-AKT-mTOR. Neurony z delecją *Pten* charakteryzują się podwyższonymi poziomami fosforylowanego P-S6 (tak jak w naszym modelu) oraz pozostałych kinaz P-AKT i P-GSK3 β , będących markerami odpowiednio aktywacji szlaków sygnałowych AKT i mTOR, oraz inaktywacji szlaku sygnałowego GSK3 β (Amiri i wsp., 2012; Kwon i wsp., 2003, Lugo i wsp., 2014). Natomiast nie istnieją dostateczne dowody wskazujące na możliwość całkowitego odwrócenia zaobserwowanych fenotypów poprzez inhibicję kinazy mTOR za pomocą rapamycyny (Narvaiz i wsp., 2023). Badania wskazują, podobnie do naszych wyników, że bez względu na czas mutacji *Pten*, podwyższona aktywność mTOR prawdopodobnie uruchamia inne szlaki sygnalizacyjne odpowiedzialne za wzmożoną lokomotoryczność zwierząt. Możliwe, że w proces ten zaangażowane są także inne struktury związane z regulacją funkcji motorycznych tj. ciało migdałowe, kora przedczołowa czy jądro półleżące. Istnieją dowody wskazujące, że infuzja NMDA do brzusznej części hipokampa (vHPC, ang. ventral hippocampus) ma przeciwstawny efekt i wpływa na aktywność lokomotoryczną u szczurów. Wzmożona aktywność vHPC stymuluje wyrzut dopaminy przez

jądro połączone i zwiększenie aktywności lokomotorycznej w teście OF, podczas gdy infuzja NMDA do dHPC nie zaburzyła aktywności lokomotorycznej (Zhang i wsp., 2002). Ponieważ w naszym modelu stymulowano usunięcie genu *Pten* także w części brzusznej hipokampa, hipotetycznie nadmierna aktywność tych neuronów pobudzających mogłaby być powiązana z zaobserwowanym fenotypem u mutantów. Ponadto Mei L. i wsp., 2020 wykazał, że region vHPC zaangażowany jest także w regulację lęku. Z drugiej strony istnieją badania na gryzoniach wskazujące, że zachowania lękowe angażują brzuszną część hipokampa (vHPC), przyśrodkową korę przedczołową (mPFC) oraz ciało migdałowate w części podstawno-bocznej (BLA) (Maren i wsp., 2004; Shah i wsp., 2003; Sierra-Mercado i wsp., 2011; Tye i wsp., 2011). Optogenetyczne zahamowanie projekcji z BLA do vHPC działa przeciwlękowo (Felix-Ortiz i wsp., 2016) natomiast optogenetyczne hamowanie zakończeń synaptycznych z vHPC do mPFC za pomocą AAV- CamKII α -eArch3.0-eYFP, bezpośrednio wpływa na zmniejszenie stanów lękowych i większą eksplorację otwartych ramion w EPM. Co więcej, obustronne, ale nie jednostronne hamowanie, zmieniało fizjologiczne korelaty lęku w BLA, imitując stan podobny do odczucia bezpieczeństwa (Padilla-Coreano i wsp., 2016). Aby określić dokładne podłoże fizjologiczne (mechanizm działania) zaobserwowanej wzmożonej aktywności i obniżonego lęku u samic *Pten*-AAV-KO niezbędne są dalsze badania w tym kierunku.

Jednym z dodatkowych cech fenotypu zaobserwowanych u mutantów *Pten*-AAV-KO była obecność spontanicznych drgawek, które pojawiały się w miarę upływu czasu od indukcji mutacji za pomocą wektorów wirusowych AAV. Należy podkreślić, że w ramach badań nie przeprowadzono analiz elektroencefalograficznych (EEG). Najwcześniejszy epizod drgawkowy zaobserwowano w około szóstym tygodniu po indukcji mutacji (n=1). Fenotyp ten ujawniał się jednak w różnych ramach czasowych od operacji stereotaktycznych i dotyczył stosunkowo niewielkiej grupy zwierząt obu płci (~20-30%). Spontaniczne drgawki obserwowano w różnych sytuacjach, takich jak stresujące testy behawioralne, zmiany faz aktywności dobowej (np. zapalenie światła w pokoju hodowlanym) czy podanie ketaminy przed wykonaniem perfuzji dosercowej. Dodatkowo analiza w teście budowania gniazda pozwoliła na zidentyfikowanie heterogeniczności behawioralnej w grupie eksperymentalnej, umożliwiając wytypowanie samic, które nie budowały gniazd. Na początku zwierzęta te nie wykazywały zmienionego profilu behawioralnego, następnie w teście zaobserwowano podwyższony poziom lęku w stosunku do ręki eksperymentatora oraz zastyganie w bezruchu, także można przypuszczać, że gwałtowna zmiana w zachowaniu zwierząt mogła być skorelowana z momentem wystąpienia drgawek. Podobne obserwacje raportowano

u dorosłych i młodych samców myszy należących do linii Nestin-CreERT2;Ptenloxp/loxp (indukowanej TAM) u których usunięcie *Pten* nastąpiło w neuronalnych komórkach macierzystych (NSCs) w okresie postnatalnym/wczesnej dorosłości. Stwierdzono, że myszy rozwijają makrocefalię z powiększonym zakrętem zębatym i zdezorganizowaną warstwą komórek ziarnistych. Dodatkowo u tych myszy zaobserwowano zmienioną neurogenezę i wystąpienie hiperaktywności lokomotorycznej oraz drgawek po okresie około 4-5 miesiąca życia z trudnościami w oswojaniu zwierząt do eksperymentów. Częstość spontanicznych drgawek u samców Nestin-CreERT2/Ptenloxp/loxp była bardzo niska, a wielokrotne próby wywołania drgawek za pomocą egzogennych bodźców dźwiękowych lub wizualnych zakończyły się niepowodzeniem (Amiri i wsp., 2012). Dalsza obserwacja samic Pten-AAV-KO wykazujących nietypowe zachowania w teście budowania gniazda umożliwiła zidentyfikowanie trzech osobników z epizodami drgawkowymi (n=2 w 6 tygodniu i n=1 w ~15 tygodniu). Co ciekawe u jednej samicy z grupy testowanej w IntelliCage, w późniejszym okresie zaobserwowano drgawki około 15 tygodnia od indukcji mutacji. Mysz ta została wcześniej poddana testom patrołowania (zaczynając w 7 tygodniu test CW i następnie CCW) w systemie IntelliCage. Dziesiątego dnia testu CW zakończyła doświadczenie, osiągając 83,5% wizyt w poprawnych rogach, podczas gdy średnia dla grupy eksperymentalnej wynosiła 70,5% poprawnych wizyt. Natomiast w pierwszym dniu fazy przyuczania w teście CCW odnotowano 53% wizyt w poprawnych rogach. Ostatecznie, test zakończono wynikiem 62,7% poprawnych wizyt, przy średniej grupowej wynoszącej 70,8% siódmego dnia testu CCW. Fenomen ten stanowi interesujący obszar badawczy, który warto eksplorować w przyszłych pracach badawczych. Fenotyp padaczkowy był często obserwowany w kilku modelach mysich z usunięciem genu *Pten*, szczególnie w przypadkach, gdy mutacja *Pten* jest obecna w obszarze zakrętu zębatego (Pun i wsp., 2012; Nicole i wsp., 2011). Ponadto, w modelu Pten-AAV-KO zaobserwowano zmiany morfologiczne (barwienie ICH), przejawiające się zmniejszeniem objętością hipokampa, a szczególnie zmianami w organizacji warstw w obszarze zakrętu zębatego, które mogą mieć wpływ na powstające w późniejszym czasie epizody drgawkowe. W literaturze wykazano, że usunięcie genu *Pten* przy użyciu promotorów aktywnych w okresie embrionalnym i wczesnoporodowym prowadzi do hipertrofii neuronów, nadpobudliwej aktywności sieci neuronowych oraz rozwoju spontanicznych drgawek w wieku dorosłym. Na przykład, gdy usunięcie *Pten* jest kierowane przez promotor GFAP w astrocytach i neuronach w wielu obszarach mózgu podczas rozwoju embrionalnego. W takich przypadkach obserwuje się znaczącą hipertrofię mózgu, której towarzyszy postępujący rozwój spontanicznych drgawek i wczesna śmiertelność (Backman i wsp., 2001; Fraser i wsp., 2008; Fraser i wsp., 2004; Kwon

i wsp., 2003; Kwon i wsp., 2001). Kolejne badania oceniały konsekwencje usunięcia *PTEN* w okresie wczesnoporodowym selektywnie w nowopowstałych komórkach ziarnistych zakrętu zębatego poprzez wywołanie ekspresji Cre pod kontrolą promotora Gli1 lub poprzez iniekcję retrowirusową do zakrętu zębatego. Te badania również wykazały znaczną hipertrofię neuronów w zakręcie zębatym, w tym powiększone ciała komórek ziarnistych, zwiększoną złożoność dendrytów oraz nieprawidłowe rozszerzenie połączeń aksonów i włókien mszystych (Arafa i wsp., 2019; LaSarge i wsp., 2015; Pun i wsp., 2012; Williams i wsp., 2015). Fizjologiczne konsekwencje tych zmian morfologicznych obejmowały rozwój spontanicznych drgawek oraz powstawanie nadpobudliwych, proepileptycznych sieci neuronowych w hipokampie (LaSarge i wsp., 2016; Pun i wsp., 2012; Santos i wsp., 2017; Williams i wsp., 2015). W kolejnym modelu spontaniczne drgawki pojawiły się po ogniskowym usunięciu *PTEN* w komórkach ziarnistych zakrętu zębatego u dorosłych myszy po około dwóch miesiącach. Wskazuje to na istnienie okresu utajonego, w którym dochodzi do progresywnych zmian w sieciach neuronalnych. Ponadto, drgawki występowały u większości myszy z jednostronnym lub obustronnym usunięciem *PTEN* i w kilku przypadkach prowadziły do śmierci (Yonan i wsp., 2024).

5.2.2. Komunikacja, interakcje socjalne oraz zachowania eksploracyjne

Mutacje i delecje genu *Pten* będącego jednym z istotnych regulatorów szlaku PI3K-AKT-mTOR zostały powiązane z ASD oraz wystąpieniem makrocefalii u ludzi. (Butler i wsp., 2005; Varga i wsp., 2009). Aby wyjaśnić związek pomiędzy rolą *Pten* a rozwijającym się układem nerwowym i występowaniem spektrum autystycznego, naukowcy stworzyli kilka mysich modeli neurorozwojowych z konstytutywnym lub warunkowym usunięciem genu *Pten*. Ponadto, w większości modeli zwierzęcych związanych z usunięciem genów, których aktywność powiązana jest z gęstością postsynaptyczną np. Shank 2 i 3, (Choi i wsp., 2022; Garrido i wsp., 2022; Won i wsp., 2012) czy *Cntnap2* (Penagarikano i wsp., 2015) scharakteryzowano zespół zachowań zbliżonych do spektrum autyzmu. Dodatkowo do modeli powstałych metodami inżynierii genetycznej, stosunkowo dobrze opisano autystyczny szczep myszy wsobnej BTBR o charakterze idiopatycznym, która wykazuje podstawowe cechy autystyczne analogiczne do obserwowanych u ludzi (McFarlane i wsp., 2008). Na podstawie porównania do myszy typu dzikiego, linia BTBR pozwoliła na ustanowienie wzorców-odniesienia (ang. baseline) do profilowania behawioralnego innych modeli zwierzęcych z podejrzeniami zaburzeń autystycznych, które powstały w wyniku modyfikacji genetycznych

naśladujących mutacje odkryte u ludzi (Delorme i wsp., 2013). Określanie zachowań przypominających zaburzenia ze spektrum autyzmu u gryzoni obejmuje ocenę różnych aspektów behawioralnych (wpływ mutacji genetycznych na zachowanie), neurochemicznych oraz neurobiologicznych (zmiany w układach neuroprzekaźników oraz w synapsach i łączności neuronalnej), fizjologicznych (wzorce aktywności mózgu) oraz wpływ środowiska (ekspozycje prenatalne lub na wczesnym etapie życia). Główna uwaga kierowana jest na cechy odzwierciedlające kluczowe objawy ASD u ludzi, takie jak deficyty społeczne, deficyty poznawcze, zachowania repetetywne (powtarzające się) oraz ograniczone zainteresowanie interakcją socjalną, które są stosunkowo łatwe do zmierzenia w modelach zwierzęcych (Chang i wsp., 2017). Wzorując się na linii mysiej BTBR charakteryzującej się deficytem socjalnym, objawiającym się zmniejszoną skłonnością do nawiązywania interakcji społecznych, w porównaniu do innych szczepów, brakiem preferencji do nowości społecznej co oznacza brak zainteresowania nową myszą w porównaniu do znanej (McFarlane i wsp., 2008). Dodatkowo, myszy te cechują się ograniczonym zaangażowaniem w wzajemne zachowania społeczne typowe dla gatunku myszy domowej tj. wążanie czy podążanie za osobnikiem (ang. following). Myszy BTBR wykazują wzmożone zachowania repetetywne tj. nadmierne pielęgnowanie futerka, często prowadzące do samookaleczeń, zwiększoną eksplorację i kopanie w ściółce czy stereotypowe ruchy motoryczne (Amodeo i wsp., 2012; McFarlane i wsp., 2008). Ponadto zaobserwowano w tym szczepie zmiany w wzorze wokalizacji ultradźwiękowej u osesków, charakteryzujące się częstszą liczbą nawoływań oraz głośniejszą wokalizacją w porównaniu do powszechnie używanego szczepu C57BL/6J. Wokalizacja osesków BTBR charakteryzowała się wysokim poziomem harmonicznych, dwusylabowych i złożonych epizodów oraz minimalną liczbą epizodów krótkich (Scattoni i wsp., 2008). U dorosłych myszy wokalizacja BTBR została zmierzona podczas różnych interakcji społecznych, w tym samiec-samica, samiec-samiec (rezydent-intruz) oraz samica-samica. Badanie wykazało, że dorosłe myszy BTBR wykazywały niższy poziom wokalizacji i mniejszą aktywność społeczną we wszystkich kontekstach społecznych w porównaniu do szczepu myszy B16 (Scattoni i wsp., 2008). Zaobserwowano także deficyty poznawcze, a w szczególności zmniejszoną elastyczność w uczeniu się (Amodeo i wsp., 2012), która może wynikać ze zmian neurobiologicznych w mózgu (zmiany w łączności synaptycznej i plastyczności w hipokampie oraz zaburzenia równowagi w neuroprzekaźnictwie glutaminianu, GABA, serotoniny i dopaminy w korze mózgowej) (Bove i wsp., 2024; McTighe i wsp., 2013; Squillace i wsp., 2014; Stephenson i wsp., 2011; Wei i wsp., 2016).

W porównaniu do autystycznych myszy BTBR, w modelu neurorozwojowym *Pten*GFAP-Cre, w którym usunięcie *Pten* nastąpiło w 5 dniu postnatalnym, także widoczny jest deficyt w zachowaniach społecznych, natomiast obserwuje się zmniejszoną liczbę zachowań repetytywnych. W testach oceniających interakcje społeczne, takich jak test trójkomorowy i test oddzielenia społecznego (ang. social partition assay), myszy *Pten*GFAP-Cre/*Pten* wykazywały ograniczone interakcje społeczne oraz preferencję wobec obiektów w porównaniu do partnerów społecznych. W przeciwieństwie do myszy typu dzikiego, które preferowały spędzanie czasu w pobliżu nieznanych osobników, myszy z delecją *Pten* nie wykazywały takiej preferencji, co wskazuje na upośledzoną zdolność do rozpoznawania nowości społecznej. Ponadto, charakteryzowały się one zmniejszonym nasileniem zachowań repetytywnych, w tym rzadszym zakopywaniem kulek w teście zakopywania (ang. murble burying). Wyniki te sugerują nietypowy wzorzec zachowań repetytywnych, potencjalnie różny od stereotypowych zachowań tradycyjnie związanych z ASD. Niemniej jednak, w teście otwartego pola zaobserwowano zwiększoną lokomocję, obejmującą częstsze zachowania rotacyjne i wspinanie się (zwiększoną liczbę stójek) świadcząca o wzmożonej eksploracji środowiska (Lugo i wsp., 2014).

W przypadku modelu *Pten*Nse-Cre, badania przeprowadzone na młodych osobnikach wykazały istotne zaburzenia interakcji społecznych w teście trójkomorowym – myszy mutanty wykazywały obniżony poziom interakcji społecznych, przy jednoczesnym braku zmian w eksploracji nowych obiektów oraz preferencji wobec nowości społecznej. W teście budowania gniazda zaobserwowano zmniejszoną aktywność u mutantów, przy czym analiza obejmowała jedynie pierwsze 90 minut od rozpoczęcia testu. Ponadto zaobserwowano zwiększoną śmiertelność osesków w 5 dniu postnatalnym, co prawdopodobnie wynikało z ograniczonych interakcji matki z młodymi (Kwon i wsp., 2006).

W naszym modelu zaobserwowano subtelne zmiany w teście trójkomorowym, wskazujące na tendencję do obniżonej socjalności u mutantów, jednak zmiany te nie są tak wyraźne jak w modelach neurorozwojowych z delecją genu *Pten*. W teście socjalności odnotowano różnice zależne od płci w grupie mutantów. Samice *Pten*-AAV-KO wykazały zmniejszoną preferencję wobec bodźca społecznego, a wskaźnik preferencji wykazał istotną statystycznie różnicę między samicami mutantów a grupą kontrolną. Samce *Pten*-AAV-KO, podobnie jak grupa kontrolna, wykazywały preferencję wobec myszy, przy czym wskaźnik preferencji nie różnił się istotnie między grupami. W teście nowości społecznej również zaobserwowano różnice zależne od płci u mutantów *Pten*-AAV-KO. W porównaniu z grupą kontrolną, samice

mutantów wykazywały istotnie większą preferencję wobec nowego osobnika, choć wskaźnik preferencji wskazywał na silniejszą preferencję u grupy kontrolnej. Samce mutantów Pten-AAV-KO nie wykazały istotnej statystycznie preferencji wobec nowego partnera socjalnego, a wskaźnik preferencji do nowości socjalnej nie różnił się znacząco pomiędzy mutantami a grupą kontrolną, co może sugerować, że grupa kontrolna samców wykazuje nieznacznie większe zainteresowanie nowym osobnikiem.

Aby lepiej zrozumieć otrzymane wyniki, przeprowadzono zmodyfikowany, bezpośredni test interakcji społecznych w neutralnym środowisku dla par zwierząt z tego samego genotypu. Test wykonano w trzech punktach czasowych: 2, 7 i 15 tygodni od indukcji mutacji. Mysiom pozwolono na 5-minutową eksplorację nowego środowiska przed właściwym testem, a następnie wprowadzono zwierzęta w tym samym czasie do nowego środowiska, jednocześnie rejestrując wokalizacje ultradźwiękowe (USV). Analizowano liczbę i skumulowany czas trwania różnych interakcji społecznych (np. obwąchiwanie w różnych pozycjach ciała, podążanie, podgryzanie, wspinanie się na drugiego osobnika, turlanie się). Dodatkowo oceniano zachowania eksploracyjne i repetytywne, w tym liczbę i czas trwania stójek, czyszczenia futerka (ang. self-grooming) oraz kopania w podłożu. W miarę upływu czasu od indukcji mutacji zaobserwowano heterogeniczność zachowań u samic Pten-AAV-KO oraz korelację pomiędzy występowaniem USV a wyższą skłonnością do interakcji społecznych i zmniejszoną aktywnością eksploracyjną zależną od czasu mutacji. W porównaniu z grupą kontrolną, mutanty samic nie wykazywały różnic w liczbie interakcji społecznych, ale odnotowano istotne statystycznie różnice w długości trwania interakcji, które zmniejszyły się w 7 i 15 tygodniu w porównaniu do drugiego tygodnia od indukcji mutacji. W przypadku stójek zaobserwowano odwrotną korelację – liczba stójek była znacząco wyższa u mutantów niż w grupie kontrolnej, szczególnie w 2 i 7 tygodniu od indukcji mutacji, osiągając szczyt w 7 tygodniu. Wzmożona liczba stójek była prawdopodobnie skorelowana z hiperaktywnością lokomotoryczną samic mutantów. Stratyfikacja mutantów na grupy wokalizujące i niewokalizujące wykazała, że wokalizujące osobniki charakteryzowały się wyższą liczbą interakcji społecznych w 2 i 15 tygodniu od indukcji mutacji, z istotnymi różnicami wewnątrzgrupowymi. W 7 tygodniu różnice nie były statystycznie wyraźne. Pod względem liczby stójek, zaobserwowano różnice wewnątrzgrupowe w każdym punkcie czasowym. Zarówno wokalizujące, jak i niewokalizujące samice mutantów wykazywały zwiększoną liczbę stójek w 2 i 7 tygodniu, ale w 15 tygodniu różnice dotyczyły jedynie niewokalizujących mutantów względem grupy kontrolnej. Zaobserwowane zmiany u mutantów prawdopodobnie

wynikają z postępującej neurodegeneracji, co potwierdzają dane z 15 tygodnia, gdzie zmniejszona długość interakcji społecznych korelowała z brakiem poprawy w testach uczenia się. Wyniki behawioralne sugerują istotne zmiany molekularne oraz na poziomie sieci neuronalnych, które wymagają dalszych badań.

Wyniki behawioralne uzyskane w modelu *Pten*-AAV-KO wskazują na istotne zmiany w zachowaniach społecznych oraz eksploracyjnych, które mogą być związane z zaburzeniami bądź kompensacją funkcji sieci neuronalnych i informacji wychodzących ze zmodyfikowanego hipokampa do innych struktur zaangażowanych w przetwarzanie aspektów socjalnych i eksploracyjnych, bądź mieć podłoże w neurodegeneracji w tym obszarze. Jednym z istotnych połączeń, które mogą być zaburzone w wyniku usunięcia genu *Pten*, są projekcje między ciałem migdałowatym a hipokampem. Istotnym kontekstem dla tych wyników jest badanie przeprowadzone przez [Felix-Ortiz i wsp., 2014](#), które wykazało kluczową rolę projekcji z kompleksu podstawno-bocznego ciała migdałowatego (BLA) do brzuszego hipokampa (vHPC) w modulacji zachowań społecznych. W badaniu tym, za pomocą metod optogenetycznych oraz farmakologicznych, analizowano aktywność projekcji wysyłanych z BLA do vHPC oraz ich wpływ na interakcje społeczne mierzone w teście trójkomorowym i bezpośrednich interakcjach w klatce domowej pomiędzy rezydentem a intruzem. Do optogenetycznej aktywacji użyto rodopsynę (ChR2), a do inhibicji halorodopsynę (eNpHR), które eksprymowano pod kontrolą promotora *CaMKII α* . Wyniki eksperymentów wykazały, że inhibicja projekcji z BLA do vHPC zwiększała interakcje społeczne oraz aktywność eksploracyjną, podczas gdy stymulacja tych projekcji prowadziła do ich obniżenia. Co istotne, inhibicja nie wpływała na nasilenie zachowań repetetywnych, takich jak czyszczenie futerka (ang. self-grooming), natomiast optogenetyczna aktywacja z użyciem ChR2 powodowała zmniejszenie interakcji społecznych zarówno w teście rezydent-intruder, jak i w teście trójkomorowym, jednocześnie zwiększając zachowania repetetywne, takie jak czyszczenie futerka (ang. self-grooming). Te wyniki podkreślają kluczową rolę sieci neuronalnych obejmujących BLA i vHPC w regulacji zachowań społecznych oraz zachowań eksploracyjnych. W kontekście modelu *Pten*-AAV-KO sugerują one, że obserwowane deficyty w interakcjach społecznych i zmiany w eksploracji mogą wynikać z dysfunkcji podobnych obwodów neuronalnych. Dalsze badania w tym kierunku, z wykorzystaniem technik optogenetycznych w modelu *Pten*-AAV-KO, mogłyby dostarczyć dodatkowych informacji na temat mechanizmów molekularnych i neuronalnych leżących u podstaw zaobserwowanych zmian behawioralnych.

Większość jakościowych i ilościowych analiz wokalizacji ultradźwiękowych (USV) u myszy z warunkową delecją genu *Pten* (*Pten*GFAP-Cre) przeprowadzono na oseskach (Binder i wsp., 2017). Wykazano, że emitują one krótsze dźwięki o niższej maksymalnej amplitudzie oraz wyższej częstotliwości podstawowej i maksymalnej w modelu separacji od matki. W tym samym modelu odpowiedź wokalizacji ultradźwiękowych na zapach moczu samicy nie wykazała różnic w liczbie epizodów wokalizacji, lecz w ich charakterystykach spektralnych. Myszy mutanty emitowały USV o niższej maksymalnej częstotliwości, krótszym czasie trwania i wyższej maksymalnej amplitudzie w porównaniu do myszy typu dzikiego (Binder i wsp., 2017). Jednocześnie samce z delecją genu *Pten* generowały bardziej złożone i krótkie dźwięki, emitując mniej innych typów dźwięków w porównaniu do grupy kontrolnej. Badanie to określało prospołeczną/motywacyjną odpowiedź na zapach moczu. Emitowanie USV u dorosłych myszy z mutacją *Pten* w trakcie interakcji społecznych nie zostało dotychczas opisane w literaturze. W naszym badaniu analizowaliśmy emisje USV podczas interakcji społecznych samic. Wykazaliśmy różnice między grupą *Pten*-AAV-KO a grupą kontrolną w jakości emitowanych dźwięków, szczególnie w zwiększonej liczbie krótkich, złożonych i złożono-kompozytowych epizodów USV w 15 tygodniu po indukcji mutacji. Wokalizacja ultradźwiękowa jest formą komunikacji u gryzoni (Fischer i wsp., 2011). W kontekście rozwijającej się teorii synchronizacji mózgu podczas interakcji społecznych (Kinreich i wsp., 2017) oraz faktu, że sygnały społeczne są przekazywane również za pomocą USV, postulujemy, że obecność bardziej złożonych dźwięków u samic *Pten*-AAV-KO jest próbą inicjacji interakcji społecznych oraz sposobem synchronizacji aktywności mózgowej podczas takich interakcji. Aby ilościowo określić zjawisko synchronizacji wokalizacji w serie wybuchów dźwięków o podobnej strukturze spektralnej, przeanalizowaliśmy medianę różnic między kolejnymi dźwiękami, stosując metodę dynamicznego dopasowania czasowego (DTW, ang. Dynamic Time Warping) do czasowego przebiegu dominującej częstotliwości dźwięku. Synchronizacja wzrasta po 15 tygodniach, ale tylko w grupie kontrolnej, podczas gdy myszy mutanty zachowują taki sam poziom różnic wewnętrznych przez cały czas trwania doświadczenia. Z kolei złożoność spektralna dźwięków, mierzona za pomocą entropii spektralnej, wykazuje istotną różnicę dopiero po 15 tygodniach, kiedy to myszy kontrolne zaczynają emitować bardziej złożone dźwięki spektralnie. Ogólnie można stwierdzić, że po 15 tygodniach wokalizacje myszy kontrolnych stają się mniej liczne, ale bardziej złożone spektralnie i zorganizowane w zsynchronizowane wybuchy, podczas gdy ten trend nie występuje u myszy mutantów *Pten*-AAV-KO. Przeciwnie, w tej grupie zaobserwowano większą heterogeniczność między osobnikami oraz tendencję do emitowania mniej złożonych

dźwięków. Wszystkie te obserwacje są zgodne z wcześniej wspomnianą hipotezą mechanizmu "synchronizacji umysłów", który wydaje się być zaburzony u myszy z delecją *Pten*.

Postuluje się, że zwierzęta z delecją *Pten* w dojrzewających neuronach, charakteryzują się fenotypem przypominającym autyzm, opartym na deficytach społecznych obserwowanych w ograniczonych kontaktach społecznych z osobnikami tego samego gatunku w testach socjalności i nowości społecznej (paradygmat trójkomorowy) (Lugo i wsp., 2014). W dobrze scharakteryzowanych modelach mysich przypominających ASD, takich jak linia BTBR, wykazano brak motywacji społecznej, zarówno w paradygmacie trójkomorowym, jak i w bezpośrednich testach interakcji społecznych, takich jak zadanie rezydent-intruz. Co więcej, w tych modelach deficyt społeczny towarzyszył redukcji wokalizacji ultradźwiękowych zarówno w aspekcie ilościowym, jak i jakościowym (Jamain i wsp., 2008). W badanym modelu *Pten*-AAV-KO, bezpośrednie kontakty między osobnikami o identycznym genotypie w 7 tygodniu od indukcji mutacji nie wskazują na obecność zaburzeń społecznych związanych z ASD. Jednak z czasem obserwuje się narastającą heterogeniczność w grupie, obejmującą zmniejszającą się liczbę wokalizujących mutantów oraz zmieniającą się częstotliwość interakcji socjalnych. Zjawiska te mogą być powiązane z postępującą neurodegeneracją oraz zaburzeniem stosunku E/I w sieci neuronalnej hipokampa, co potencjalnie wpływa na pojawienie się zaburzeń behawioralnych w późniejszym czasie po usunięciu genu *Pten*.

6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

W niniejszej rozprawie doktorskiej przedstawiono wyniki doświadczeń mających na celu zbadanie funkcji genu *Pten* w zróżnicowanych neuronach hipokampa dorosłych myszy. Inaktywacja *Pten* prowadzi do krótkotrwałej poprawy uczenia się i pamięci, co związane jest z nasiloną aktywacją szlaku PI3K-AKT-mTOR. Efekt ten jest jednak przejściowy i w dłuższej perspektywie inicjuje procesy neurodegeneracyjne, co wskazuje na kluczową rolę *Pten* w utrzymaniu długoterminowej homeostazy neuronalnej. Elektrofizjologiczne konsekwencje mutacji *Pten* obejmują modyfikację pobudliwości neuronów i parametrów transmisji synaptycznej, co może stanowić mechanizm kompensacyjny. Obserwowane zmiany behawioralne i komunikacyjne u mutantów *Pten* nie korelują bezpośrednio z fenotypem ASD, lecz odzwierciedlają postępującą neurodegenerację, kwestionując tym samym uproszczone interpretacje roli genów w funkcjonowaniu mózgu.

Uzyskano podobne wyniki wpływu na uczenie się i pamięć niezależnie od zastosowanego modelu: 1) *Pten*-iCKO – mutacja w wielu populacjach neuronów przedmózgowia oraz 2) *Pten*-AAV-KO – mutacja ograniczona do neuronów hipokampa za pomocą wektorów AAV. Głównym osiągnięciem tej pracy było wykazanie nieintuicyjnej roli genu i białka *Pten*, polegającej na hamowaniu zmian plastycznych, które dążą do bardziej efektywnego procesu tworzenia engramu pamięciowego. Nieoczywistość tej funkcji wynika z faktu, że dotychczasowe dane literaturowe, uzyskane głównie z użyciem mutantów genu *Pten* na etapie embriogenezy lub formowania się niedojrzałych neuronów, wskazywały na zaburzenia funkcji poznawczych. Ponadto istnieje, często błędne, przekonanie wśród badaczy, że utrata genu prowadzi do zaburzeń funkcjonowania organizmu, a nie polepszenia jego funkcji. Poprzez użycie mutantów *Pten* wykazano związek przyczynowo skutkowy pomiędzy ścieżką sygnałową PI3K-AKT-mTOR a rolą mikroRNA ją regulującą, wykazaną wcześniej (Konopka i wsp., 2010; Vinnikov i wsp., 2014) w kontroli procesów poznawczych. Powyższe, zaprezentowane dane pozwalają na wyciągnięcie kilku wniosków szczegółowych:

1. Utrata funkcji genu *Pten* w neuronach pobudzających hipokampa polepsza uczenie się i pamięć myszy. Zjawisko to koreluje czasowo (około 9 tygodni po mutacji) z podwyższeniem fosforylacji białka S6 (potwierdzenie skuteczności mutacji *Pten*).
2. Zjawisko to jest krótkotrwałe, gdyż w jego następstwie indukowane są procesy neurodegeneracyjne.
3. Dwie powyższe obserwacje wskazują na istotność obecności czynnika hamującego takiego jak *Pten* w długotrwałej (często kilkuletniej) aktywności neuronów.

4. Potwierdzono, że mutanty *Pten* w 7. tygodniu charakteryzują się lepszą niż myszy kontrolne pamięcią proceduralną, operacyjną i przestrzenną.
5. Eliminacja genu *Pten* w wielu regionach przodomózgowia (iCKO) powoduje gwałtowną śmiertelność zwierząt. Ograniczenie mutacji do hipokampa (AAV-KO) wydłuża życie, ale skutkuje degeneracją tego regionu w dłuższej perspektywie.
6. Podwyższona aktywacja szlaku sygnałowego PI3K-AKT-mTOR w wyniku mutacji genu *Pten* prowadzi do obniżenia pobudliwości wewnętrznej neuronów oraz podwyższenia amplitudy i częstotliwości generowanych miniaturowych EPSC. Mogą to być mechanizmy kompensacyjne lub obronne indukowane przez zmutowane neurony.
7. W modelu mysim z indukowaną, warunkową delecją genu *Pten* można zaobserwować zmiany w ogólnej aktywności zwierząt oraz lekkie zmiany w zachowaniu i interakcji społecznych, które nie są bezpośrednio skorelowane z typowymi cechami zauważalnymi u zwierząt z ASD, lecz prawdopodobnie z postępującą neurodegeneracyjną i zaobserwowaną u nielicznych epilepsją (pojawiającą się w późniejszym czasie od indukcji mutacji).
8. Pomiary komunikacji (wokalizacja) pomiędzy mutantami wskazują na to, że obserwowane skutki mutacji genu *Pten*, uniemożliwiają 'porozumienie' czyli uzyskanie z czasem synchronicznej komunikacji. Stoi to w kontraście do komunikacji dwóch osobników kontrolnych.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Aben, B., Stapert, S., & Blokland, A. (2012). About the Distinction between Working Memory and Short-Term Memory. *Front Psychol*, 3, 301. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2012.00301>
2. Adhikari, A., M. A. Topiwala, and J. A. Gordon. (2010). Synchronized activity between the ventral hippocampus and the medial prefrontal cortex during anxiety, *Neuron*, 65: 257-69.
3. Aggarwal, P., Singh, S., & Ravichandiran, V. (2021). Two-Pore Domain Potassium Channel in Neurological Disorders. *J Membr Biol*, 254(4), 367-380. <https://doi.org/10.1007/s00232-021-00189-8>
4. Ajonijebu, D. C., Abboussi, O., Mabandla, M. V., & Daniels, W. M. U. (2018). Differential epigenetic changes in the hippocampus and prefrontal cortex of female mice that had free access to cocaine. *Metab Brain Dis*, 33(2), 411-420. <https://doi.org/10.1007/s11011-017-0116-z>
5. Ali, A. A., T. L. Walker, and D. G. Blackmore. (2024). The Active Place Avoidance (APA) Test, an Effective, Versatile and Repeatable Spatial Learning Task for Mice, *J Vis Exp. Issue 204*. <https://doi.org/10.3791/65935>
6. Amaral, D. G., Scharfman, H. E., & Lavenex, P. (2007). The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res*, 163, 3-22. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)63001-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)63001-5)
7. Amaral, D. G., & Witter, M. P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*, 31(3), 571-591. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(89\)90424-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(89)90424-7)
8. Anderson, J. R. (2013). *Language, Memory, and Thought* (Psychology Press ed.). <https://doi.org/10.4324/9780203780954>
9. Armada-Moreira, A., Gomes, J. I., Pina, C. C., Savchak, O. K., Goncalves-Ribeiro, J., Rei, N., Pinto, S., Morais, T. P., Martins, R. S., Ribeiro, F. F., Sebastiao, A. M., Crunelli, V., & Vaz, S. H. (2020). Going the Extra (Synaptic) Mile: Excitotoxicity as the Road Toward Neurodegenerative Diseases. *Front Cell Neurosci*, 14, 90. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00090>
10. Atkinson, R. C. S., R. M. (1968). Human Memory: A Proposed System and its Control Processes. *Psychology of Learning and Motivation*, vol 2, 89-195. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0079-7421\(08\)60422-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0079-7421(08)60422-3)
11. Backman, S. A., Stambolic, V., Suzuki, A., Haight, J., Elia, A., Pretorius, J., Tsao, M. S., Shannon, P., Bolon, B., Ivy, G. O., & Mak, T. W. (2001). Deletion of Pten in mouse brain causes seizures, ataxia and defects in soma size resembling Lhermitte-Duclos disease. *Nat Genet*, 29(4), 396-403. <https://doi.org/10.1038/ng782>
12. Baddeley, A. D. W. E. K. (1970). Amnesia and the distinction between long- and short-term memory. *Journal of Verbal Learning and Verbal Behavior*, 9(2), 176-189. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-5371\(70\)80048-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-5371(70)80048-2)
13. Baglietto-Vargas, D., Forner, S., Cai, L., Martini, A. C., Trujillo-Estrada, L., Swarup, V., Nguyen, M. M. T., Do Huynh, K., Javonillo, D. I., Tran, K. M., Phan, J., Jiang, S., Kramar, E. A., Nunez-Diaz, C., Balderrama-Gutierrez, G., Garcia, F., Childs, J., Rodriguez-Ortiz, C. J., Garcia-Leon, J. A.,...LaFerla, F. M. (2021). Generation of a humanized Abeta expressing mouse demonstrating aspects of Alzheimer's disease-like pathology. *Nat Commun*, 12(1), 2421. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22624-z>
14. Bajenaru, M. L., Zhu, Y., Hedrick, N. M., Donahoe, J., Parada, L. F., & Gutmann, D. H. (2002). Astrocyte-specific inactivation of the neurofibromatosis 1 gene (NF1) is insufficient for astrocytoma formation. *Mol Cell Biol*, 22(14), 5100-5113. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.14.5100-5113.2002>
15. Balcerek, E., Wlodkowska, U., & Czajkowski, R. (2024). FOS mapping reveals two complementary circuits for spatial navigation in mouse. *Sci Rep*, 14(1), 21252. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-72272-8>
16. Banta Lavenex, P. A., Colombo, F., Ribordy Lambert, F., & Lavenex, P. (2014). The human hippocampus beyond the cognitive map: evidence from a densely amnesic patient. *Front Hum Neurosci*, 8, 711. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2014.00711>
17. Bartsch, T., Dohring, J., Rohr, A., Jansen, O., & Deuschl, G. (2011). CA1 neurons in the human hippocampus are critical for autobiographical memory, mental time travel, and autoethic

- consciousness. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(42), 17562-17567. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110266108>
18. Basu, J., & Siegelbaum, S. A. (2015). The Corticohippocampal Circuit, Synaptic Plasticity, and Memory. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021733>
 19. Basu, J., Zaremba, J. D., Cheung, S. K., Hitti, F. L., Zemelman, B. V., Losonczy, A., & Siegelbaum, S. A. (2016). Gating of hippocampal activity, plasticity, and memory by entorhinal cortex long-range inhibition. *Science*, 351(6269), aaa5694. <https://doi.org/10.1126/science.aaa5694>
 20. Bayley, P. J. S., L. R.. (2003). The medial temporal lobe and declarative memory. *International Congress Series*, 1250, 245-259. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0531-5131\(03\)00192-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0531-5131(03)00192-4)
 21. Bernier, B. E., Lacagnina, A. F., Ayoub, A., Shue, F., Zemelman, B. V., Krasne, F. B., & Drew, M. R. (2017). Dentate Gyrus Contributes to Retrieval as well as Encoding: Evidence from Context Fear Conditioning, Recall, and Extinction. *J Neurosci*, 37(26), 6359-6371. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3029-16.2017>
 22. Binder, M. S. and J. N. Lugo (2017). "NS-Pten knockout mice show sex- and age-specific differences in ultrasonic vocalizations." *Brain Behav* 7(11): e00857.
 23. Bjerknes, T. L., Moser, E. I., & Moser, M. B. (2014). Representation of geometric borders in the developing rat. *Neuron*, 82(1), 71-78. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.014>
 24. Bonnevie, T., Dunn, B., Fyhn, M., Hafting, T., Derdikman, D., Kubie, J. L., Roudi, Y., Moser, E. I., & Moser, M. B. (2013). Grid cells require excitatory drive from the hippocampus. *Nat Neurosci*, 16(3), 309-317. <https://doi.org/10.1038/nn.3311>
 25. Bouabe, H., & Okkenhaug, K. (2013). Gene targeting in mice: a review. *Methods Mol Biol*, 1064, 315-336. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-601-6_23
 26. Brakeman, P. R., Lanahan, A. A., O'Brien, R., Roche, K., Barnes, C. A., Huganir, R. L., & Worley, P. F. (1997). Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. *Nature*, 386(6622), 284-288. <https://doi.org/10.1038/386284a0>
 27. Brandmaier, A., S. Q. Hou, and W. H. Shen. (2017). Cell Cycle Control by PTEN, *J Mol Biol*, 429: 2265-77. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.06.004>
 28. Breschi, A., T. R. Gingeras and R. Guigo (2017). Comparative transcriptomics in human and mouse. *Nat Rev Genet* 18(7): 425-440.
 29. Bunsey, M., & Eichenbaum, H. (1996). Conservation of hippocampal memory function in rats and humans. *Nature*, 379(6562), 255-257. <https://doi.org/10.1038/379255a0>
 30. Burgess, N., Maguire, E. A., & O'Keefe, J. (2002). The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron*, 35(4), 625-641. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)00830-9](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)00830-9)
 31. Burwell, R. D. (2000). The parahippocampal region: corticocortical connectivity. *Ann N Y Acad Sci*, 911, 25-42. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06717.x>
 32. Butola, T., Hernandez Frausto, M., Blankvoort, S., Flatset, M. S., Peng, L., Elmaleh, M., Hairston, A., Hussain, F., Clopath, C., Kentros, C., & Basu, J. (2023). Hippocampus shapes cortical sensory output and novelty coding through a direct feedback circuit. *Res Sq*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3270016/v1>
 33. Cappaert, N. L. M. (2015). Chapter 20 - Hippocampal Formation. In (fourth edition ed., pp. 511-573). *The Rat Nervous System*. [https://doi.org/ https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374245-2.00020-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374245-2.00020-6)
 34. Casper, K. B., & McCarthy, K. D. (2006). GFAP-positive progenitor cells produce neurons and oligodendrocytes throughout the CNS. *Mol Cell Neurosci*, 31(4), 676-684. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2005.12.006>
 35. Chen, J., Shu, S., Chen, Y., Liu, Z., Yu, L., Yang, L., Xu, Y., & Zhang, M. (2019). AIM2 deletion promotes neuroplasticity and spatial memory of mice. *Brain Res Bull*, 152, 85-94. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.07.011>
 36. Chen, S., He, L., Huang, A. J. Y., Boehringer, R., Robert, V., Wintzer, M. E., Polygalov, D., Weitemier, A. Z., Tao, Y., Gu, M., Middleton, S. J., Namiki, K., Hama, H., Therreau, L., Chevaleyre, V., Hioki, H., Miyawaki, A., Piskorowski, R. A., & McHugh, T. J. (2020). A hypothalamic novelty signal modulates hippocampal memory. *Nature*, 586(7828), 270-274. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2771-1>

37. Chiang, M. C., Huang, A. J. Y., Wintzer, M. E., Ohshima, T., & McHugh, T. J. (2018). A role for CA3 in social recognition memory. *Behav Brain Res*, 354, 22-30. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.01.019>
38. Chow, L. M., Zhang, J., & Baker, S. J. (2008). Inducible Cre recombinase activity in mouse mature astrocytes and adult neural precursor cells. *Transgenic Res*, 17(5), 919-928. <https://doi.org/10.1007/s11248-008-9185-4>
39. Codita, A., Gumucio, A., Lannfelt, L., Gellerfors, P., Winblad, B., Mohammed, A. H., & Nilsson, L. N. (2010). Impaired behavior of female tg-ArcSwe APP mice in the IntelliCage: A longitudinal study. *Behav Brain Res*, 215(1), 83-94. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.06.034>
40. Cohen, N. J., & Squire, L. R. (1980). Preserved learning and retention of pattern-analyzing skill in amnesia: dissociation of knowing how and knowing that. *Science*, 210(4466), 207-210. <https://doi.org/10.1126/science.7414331>
41. Colombo, M., Fernandez, T., Nakamura, K., & Gross, C. G. (1998). Functional differentiation along the anterior-posterior axis of the hippocampus in monkeys. *J Neurophysiol*, 80(2), 1002-1005. <https://doi.org/10.1152/jn.1998.80.2.1002>
42. Corkin, S., Amaral, D. G., Gonzalez, R. G., Johnson, K. A., & Hyman, B. T. (1997). H. M.'s medial temporal lobe lesion: findings from magnetic resonance imaging. *J Neurosci*, 17(10), 3964-3979. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-10-03964.1997>
43. Cossart, R., & Khazipov, R. (2022). How development sculpts hippocampal circuits and function. *Physiol Rev*, 102(1), 343-378. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2020>
44. Cota, D., Proulx, K., Smith, K. A., Kozma, S. C., Thomas, G., Woods, S. C., & Seeley, R. J. (2006). Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science*, 312(5775), 927-930. <https://doi.org/10.1126/science.1124147>
45. Cymerblit-Sabba, A., Walsh, C., Duan, K. Z., Song, J., Holmes, O., & Young, W. S. (2023). Simultaneous Knockouts of the Oxytocin and Vasopressin 1b Receptors in Hippocampal CA2 Impair Social Memory. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2023.01.30.526271>
46. Dalton, M. A., Zeidman, P., Barry, D. N., Williams, E. and Maguire, E. A. (2017). Segmenting subregions of the human hippocampus on structural magnetic resonance image scans: An illustrated tutorial. *Brain Neurosci Adv* 2017 Vol. 1 Pages 2398212817701448. <https://doi.org/10.1177/2398212817701448>
47. Danieli, K., Guyon, A., & Bethus, I. (2023). Episodic Memory formation: A review of complex Hippocampus input pathways. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 126, 110757. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2023.110757>
48. Dantzer, R., Koob, G. F., Bluthé, R. M., & Le Moal, M. (1988). Septal vasopressin modulates social memory in male rats. *Brain Res*, 457(1), 143-147. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(88\)90066-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)90066-2)
49. Dash, P. K., Gorantla, S., Poluektova, L., Hasan, M., Waight, E., Zhang, C., Markovic, M., Edagwa, B., Machhi, J., Olson, K. E., Wang, X., Mosley, R. L., Kevadiya, B., & Gendelman, H. E. (2021). Humanized Mice for Infectious and Neurodegenerative disorders. *Retrovirology*, 18(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s12977-021-00557-1>
50. Dickerson, B. C., & Eichenbaum, H. (2010). The episodic memory system: neurocircuitry and disorders. *Neuropsychopharmacology*, 35(1), 86-104. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.126>
51. Doetsch, G. S. (1997). Progressive changes in cutaneous trigger zones for sensation referred to a phantom hand: a case report and review with implications for cortical reorganization. *Somatosens Mot Res*, 14(1), 6-16. <https://doi.org/10.1080/08990229771178>
52. Domanskyi, A., Geissler, C., Vinnikov, I. A., Alter, H., Schober, A., Vogt, M. A., Gass, P., Parlato, R., & Schutz, G. (2011). Pten ablation in adult dopaminergic neurons is neuroprotective in Parkinson's disease models. *FASEB J*, 25(9), 2898-2910. <https://doi.org/10.1096/fj.11-181958>
53. Dong, C., Madar, A. D., & Sheffield, M. E. J. (2021). Distinct place cell dynamics in CA1 and CA3 encode experience in new environments. *Nat Commun*, 12(1), 2977. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23260-3>
54. Dudai, Y. (2004). The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol*, 55, 51-86. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.55.090902.142050>
55. Eichenbaum, H. (2014). Time cells in the hippocampus: a new dimension for mapping memories. *Nat Rev Neurosci*, 15(11), 732-744. <https://doi.org/10.1038/nrn3827>

56. Ergorul, C., & Eichenbaum, H. (2004). The hippocampus and memory for "what," "where," and "when". *Learn Mem*, 11(4), 397-405. <https://doi.org/10.1101/lm.73304>
57. Fan, C., Gao, Y., Liang, G., Huang, L., Wang, J., Yang, X., Shi, Y., Drager, U. C., Zhong, M., Gao, T. M., & Yang, X. (2020). Transcriptomics of Gabra4 knockout mice reveals common NMDAR pathways underlying autism, memory, and epilepsy. *Mol Autism*, 11(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s13229-020-0318-9>
58. Fanselow, M. S., & Dong, H. W. (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*, 65(1), 7-19. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.11.031>
59. Fraser, M. M., Zhu, X., Kwon, C. H., Uhlmann, E. J., Gutmann, D. H., & Baker, S. J. (2004). Pten loss causes hypertrophy and increased proliferation of astrocytes in vivo. *Cancer Res*, 64(21), 7773-7779. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2487>
60. Gabrieli, J. D., Brewer, J. B., Desmond, J. E., & Glover, G. H. (1997). Separate neural bases of two fundamental memory processes in the human medial temporal lobe. *Science*, 276(5310), 264-266. <https://doi.org/10.1126/science.276.5310.264>
61. Geiller, T., Priestley, J. B., & Losonczy, A. (2023). A local circuit-basis for spatial navigation and memory processes in hippocampal area CA1. *Curr Opin Neurobiol*, 79, 102701. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2023.102701>
62. Gold, A. E., & Kesner, R. P. (2005). The role of the CA3 subregion of the dorsal hippocampus in spatial pattern completion in the rat. *Hippocampus*, 15(6), 808-814. <https://doi.org/10.1002/hipo.20103>
63. Goshen, I., Brodsky, M., Prakash, R., Wallace, J., Gradinaru, V., Ramakrishnan, C., & Deisseroth, K. (2011). Dynamics of retrieval strategies for remote memories. *Cell*, 147(3), 678-689. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.033>
64. Haery, L., Deverman, B. E., Matho, K. S., Cetin, A., Woodard, K., Cepko, C., Guerin, K. I., Rego, M. A., Ersing, I., Bachle, S. M., Kamens, J., & Fan, M. (2019). Adeno-Associated Virus Technologies and Methods for Targeted Neuronal Manipulation. *Front Neuroanat*, 13, 93. <https://doi.org/10.3389/fnana.2019.00093>
65. Hamilton, D. A., T. E. Johnson, E. S. Redhead, and S. P. Verney. (2009). Control of rodent and human spatial navigation by room and apparatus cues, *Behav Processes*, 81: 154-69. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2008.12.003>
66. Hanlon, K. S. e. a. (2019). High levels of AAV vector integration into CRISPR-induced DNA breaks. *Nat Commun*, 10, 4439 <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41467-019-12449-2>
67. Harrison, F. E., Hosseini, A. H., & McDonald, M. P. (2009). Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. *Behav Brain Res*, 198(1), 247-251. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.10.015>
68. Herron, C. E., Lester, R. A., Coan, E. J., & Collingridge, G. L. (1986). Frequency-dependent involvement of NMDA receptors in the hippocampus: a novel synaptic mechanism. *Nature*, 322(6076), 265-268. <https://doi.org/10.1038/322265a0>
69. Hock, B. J., Jr., & Bunsey, M. D. (1998). Differential effects of dorsal and ventral hippocampal lesions. *J Neurosci*, 18(17), 7027-7032. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-17-07027.1998>
70. Hodges, S. L., Reynolds, C. D., Smith, G. D., Jefferson, T. S., Gao, N., Morrison, J. B., White, J., Nolan, S. O., & Lugo, J. N. (2018). Neuronal subset-specific deletion of Pten results in aberrant Wnt signaling and memory impairments. *Brain Res*, 1699, 100-106. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.08.007>
71. Hollup, S. A., Kjelstrup, K. G., Hoff, J., Moser, M. B., & Moser, E. I. (2001). Impaired recognition of the goal location during spatial navigation in rats with hippocampal lesions. *J Neurosci*, 21(12), 4505-4513. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-12-04505.2001>
72. Huston, J. P., & Chao, O. Y. (2023). Probing the nature of episodic memory in rodents. *Neurosci Biobehav Rev*, 144, 104930. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2022.104930>
73. Innis, N. K., & Macgillivray, M. (1987). Radial maze performance under food and water deprivation. *Behav Processes*, 15(2-3), 167-179. [https://doi.org/10.1016/0376-6357\(87\)90005-2](https://doi.org/10.1016/0376-6357(87)90005-2)
74. Jang, E. H., Ahn, S. H., Lee, Y. S., Lee, H. R., & Kaang, B. K. (2013). Effect of Food Deprivation on a Delayed Nonmatch-to-place T-maze Task. *Exp Neurobiol*, 22(2), 124-127. <https://doi.org/10.5607/en.2013.22.2.124>

75. Jastrzebska, K., Walczak, M., Cieslak, P. E., Szumiec, L., Turbasa, M., Engblom, D., Blasiak, T., & Parkitna, J. R. (2016). Loss of NMDA receptors in dopamine neurons leads to the development of affective disorder-like symptoms in mice. *Sci Rep*, 6, 37171. <https://doi.org/10.1038/srep37171>
76. Jung, S. H., Brownlow, M. L., Pellegrini, M., & Jankord, R. (2017). Divergence in Morris Water Maze-Based Cognitive Performance under Chronic Stress Is Associated with the Hippocampal Whole Transcriptomic Modification in Mice. *Front Mol Neurosci*, 10, 275. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00275>
77. Kapur, N., & Brooks, D. J. (1999). Temporally-specific retrograde amnesia in two cases of discrete bilateral hippocampal pathology. *Hippocampus*, 9(3), 247-254. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1999\)9:3<247::AID-HIPO5>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1999)9:3<247::AID-HIPO5>3.0.CO;2-W)
78. Kaspar, B. K., Vissel, B., Bengoechea, T., Crone, S., Randolph-Moore, L., Muller, R., Brandon, E. P., Schaffer, D., Verma, I. M., Lee, K. F., Heinemann, S. F., & Gage, F. H. (2002). Adeno-associated virus effectively mediates conditional gene modification in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(4), 2320-2325. <https://doi.org/10.1073/pnas.042678699>
79. Kim, E. J., Pellman, B., & Kim, J. J. (2015). Stress effects on the hippocampus: a critical review. *Learn Mem*, 22(9), 411-416. <https://doi.org/10.1101/lm.037291.114>
80. Kim, H., Kim, M., Im, S. K., & Fang, S. (2018). Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Lab Anim Res*, 34(4), 147-159. <https://doi.org/10.5625/lar.2018.34.4.147>
81. Kiryk, A., Janusz, A., Zglinicki, B., Turkes, E., Knapska, E., Konopka, W., Lipp, H. P., & Kaczmarek, L. (2020). IntelliCage as a tool for measuring mouse behavior - 20 years perspective. *Behav Brain Res*, 388, 112620. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112620>
82. Kiryk, A., Mochol, G., Filipkowski, R. K., Wawrzyniak, M., Liudyno, V., Knapska, E., Gorkiewicz, T., Balcerzyk, M., Leski, S., Leuven, F. V., Lipp, H. P., Wojcik, D. K., & Kaczmarek, L. (2011). Cognitive abilities of Alzheimer's disease transgenic mice are modulated by social context and circadian rhythm. *Curr Alzheimer Res*, 8(8), 883-892. <https://doi.org/10.2174/156720511798192745>
83. Knapska, E., Liudyno, V., Kiryk, A., Mikosz, M., Gorkiewicz, T., Michaluk, P., Gawlak, M., Chaturvedi, M., Mochol, G., Balcerzyk, M., Wojcik, D. K., Wilczynski, G. M., & Kaczmarek, L. (2013). Reward learning requires activity of matrix metalloproteinase-9 in the central amygdala. *J Neurosci*, 33(36), 14591-14600. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5239-12.2013>
84. Kobayashi, Y., Sano, Y., Vannoni, E., Goto, H., Suzuki, H., Oba, A., Kawasaki, H., Kanba, S., Lipp, H. P., Murphy, N. P., Wolfer, D. P., & Itohara, S. (2013). Genetic dissection of medial habenula-interpeduncular nucleus pathway function in mice. *Front Behav Neurosci*, 7, 17. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00017>
85. Kogan, J. H., Frankland, P. W., & Silva, A. J. (2000). Long-term memory underlying hippocampus-dependent social recognition in mice. *Hippocampus*, 10(1), 47-56. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(2000\)10:1<47::AID-HIPO5>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(2000)10:1<47::AID-HIPO5>3.0.CO;2-6)
86. Kohler, J., Mei, J., Banneke, S., Winter, Y., Endres, M., & Emmrich, J. V. (2022). Assessing spatial learning and memory in mice: Classic radial maze versus a new animal-friendly automated radial maze allowing free access and not requiring food deprivation. *Front Behav Neurosci*, 16, 1013624. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.1013624>
87. Konopka, W., Kiryk, A., Novak, M., Herwerth, M., Parkitna, J. R., Wawrzyniak, M., Kowarsch, A., Michaluk, P., Dzwonek, J., Arnsperger, T., Wilczynski, G., Merckenschlager, M., Theis, F. J., Kohr, G., Kaczmarek, L., & Schutz, G. (2010). MicroRNA loss enhances learning and memory in mice. *J Neurosci*, 30(44), 14835-14842. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3030-10.2010>
88. Kos, C. H. (2004). Cre/loxP system for generating tissue-specific knockout mouse models. *Nutr Rev*, 62(6 Pt 1), 243-246. <https://doi.org/10.1301/nr2004.jun243-246>
89. Kwon, C. H., Luikart, B. W., Powell, C. M., Zhou, J., Matheny, S. A., Zhang, W., Li, Y., Baker, S. J., & Parada, L. F. (2006). Pten regulates neuronal arborization and social interaction in mice. *Neuron*, 50(3), 377-388. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.03.023>
90. Kwon, C. H., Zhu, X., Zhang, J., & Baker, S. J. (2003). mTor is required for hypertrophy of Pten-deficient neuronal soma in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(22), 12923-12928. <https://doi.org/10.1073/pnas.2132711100>

91. Kwon, C. H., Zhu, X., Zhang, J., Knoop, L. L., Tharp, R., Smeyne, R. J., Eberhart, C. G., Burger, P. C., & Baker, S. J. (2001). Pten regulates neuronal soma size: a mouse model of Lhermitte-Duclos disease. *Nat Genet*, 29(4), 404-411. <https://doi.org/10.1038/ng781>
92. Lever, C., Burton, S., Jeewajee, A., O'Keefe, J., & Burgess, N. (2009). Boundary vector cells in the subiculum of the hippocampal formation. *J Neurosci*, 29(31), 9771-9777. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1319-09.2009>
93. Li, J. S., & Chao, Y. S. (2008). Electrolytic lesions of dorsal CA3 impair episodic-like memory in rats. *Neurobiol Learn Mem*, 89(2), 192-198. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2007.06.006>
94. Lin, X., Amalraj, M., Blanton, C., Avila, B., Holmes, T. C., Nitz, D. A., & Xu, X. (2021). Noncanonical projections to the hippocampal CA3 regulate spatial learning and memory by modulating the feedforward hippocampal trisynaptic pathway. *PLoS Biol*, 19(12), e3001127. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001127>
95. Lopez-Rojas, J., de Solis, C. A., Leroy, F., Kandel, E. R., & Siegelbaum, S. A. (2022). A direct lateral entorhinal cortex to hippocampal CA2 circuit conveys social information required for social memory. *Neuron*, 110(9), 1559-1572 e1554. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.01.028>
96. Lugo, J. N., Smith, G. D., Morrison, J. B., & White, J. (2013). Deletion of PTEN produces deficits in conditioned fear and increases fragile X mental retardation protein. *Learn Mem*, 20(12), 670-673. <https://doi.org/10.1101/lm.032839.113>
97. Maaswinkel, H., Baars, A. M., Gispen, W. H., & Spruijt, B. M. (1996). Roles of the basolateral amygdala and hippocampus in social recognition in rats. *Physiol Behav*, 60(1), 55-63. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(95\)02233-3](https://doi.org/10.1016/0031-9384(95)02233-3)
98. Marino, S., Vooijs, M., van Der Gulden, H., Jonkers, J., & Berns, A. (2000). Induction of medulloblastomas in p53-null mutant mice by somatic inactivation of Rb in the external granular layer cells of the cerebellum. *Genes Dev*, 14(8), 994-1004. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10783170>
99. Meira, T., Leroy, F., Buss, E. W., Oliva, A., Park, J., & Siegelbaum, S. A. (2018). A hippocampal circuit linking dorsal CA2 to ventral CA1 critical for social memory dynamics. *Nat Commun*, 9(1), 4163. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06501-w>
100. Milner, B. (1972). Disorders of learning and memory after temporal lobe lesions in man. *Clin Neurosurg*, 19, 421-446. https://doi.org/10.1093/neurosurgery/19.cn_suppl_1.421
101. Moore, M. D., Cushman, J., Chandra, D., Homanics, G. E., Olsen, R. W., & Fanselow, M. S. (2010). Trace and contextual fear conditioning is enhanced in mice lacking the alpha4 subunit of the GABA(A) receptor. *Neurobiol Learn Mem*, 93(3), 383-387. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2009.12.004>
102. Moser, M. B., & Moser, E. I. (1998). Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus*, 8(6), 608-619. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1998\)8:6<608::AID-HIPO3>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1998)8:6<608::AID-HIPO3>3.0.CO;2-7)
103. Moser, E., M. B. Moser, and P. Andersen. (1993). Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions, *J Neurosci*, 13: 3916-25.
104. Moser, M. B., E. I. Moser, E. Forrester, P. Andersen, and R. G. Morris. (1995). Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 9697-701.
105. Moser, M. B., Rowland, D. C., & Moser, E. I. (2015). Place cells, grid cells, and memory. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(2), a021808. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021808>
106. Nectow, A. R., & Nestler, E. J. (2020). Viral tools for neuroscience. *Nat Rev Neurosci*, 21(12), 669-681. <https://doi.org/10.1038/s41583-020-00382-z>
107. Neunuebel, J. P., & Knierim, J. J. (2014). CA3 retrieves coherent representations from degraded input: direct evidence for CA3 pattern completion and dentate gyrus pattern separation. *Neuron*, 81(2), 416-427. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.11.017>
108. Nguyen, L. H., & Anderson, A. E. (2018). mTOR-dependent alterations of Kv1.1 subunit expression in the neuronal subset-specific Pten knockout mouse model of cortical dysplasia with epilepsy. *Sci Rep*, 8(1), 3568. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21656-8>
109. O'Keefe, J. N., L. (1978). *The hippocampus as a cognitive map*. Oxford University Press. <https://doi.org/ISBN-0-19-857206-9>
110. Okuyama, T., Kitamura, T., Roy, D. S., Itohara, S., & Tonegawa, S. (2016). Ventral CA1 neurons store social memory. *Science*, 353(6307), 1536-1541. <https://doi.org/10.1126/science.aaf7003>

111. Oliva, A. (2022). CA2 physiology underlying social memory. *Curr Opin Neurobiol*, 77, 102642. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2022.102642>
112. Parrini, M., Tricot, G., Caroni, P., & Spolidoro, M. (2024). Circuit mechanisms of navigation strategy learning in mice. *Curr Biol*, 34(1), 79-91 e74. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2023.11.047>
113. Pelkey, K. A., Chittajallu, R., Craig, M. T., Tricoire, L., Wester, J. C., & McBain, C. J. (2017). Hippocampal GABAergic Inhibitory Interneurons. *Physiol Rev*, 97(4), 1619-1747. <https://doi.org/10.1152/physrev.00007.2017>
114. Peltola, M. A., Kuja-Panula, J., Liuhanen, J., Voikar, V., Piepponen, P., Hiekkalinna, T., Taira, T., Lauri, S. E., Suvisaari, J., Kuleshkaya, N., Paunio, T., & Rauvala, H. (2016). AMIGO-Kv2.1 Potassium Channel Complex Is Associated With Schizophrenia-Related Phenotypes. *Schizophr Bull*, 42(1), 191-201. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbv105>
115. Pernice, H. F., Schieweck, R., Kiebler, M. A., & Popper, B. (2016). mTOR and MAPK: from localized translation control to epilepsy. *BMC Neurosci*, 17(1), 73. <https://doi.org/10.1186/s12868-016-0308-1>
116. Proskurina, E. Y., Sinyak, D.S. & Zaitsev, A.V. (2023). The Na⁺/K⁺-ATPase Inhibitor Ouabain Has Different Effects on the Electrophysiological Properties of Excitatory and Inhibitory Neurons in the Entorhinal Cortex. *J Evol Biochem Phys*, 1672–1682 <https://doi.org/https://doi.org/10.1134/S0022093023050174>
117. Pun, R. Y., Rolle, I. J., Lasarge, C. L., Hosford, B. E., Rosen, J. M., Uhl, J. D., Schmeltzer, S. N., Faulkner, C., Bronson, S. L., Murphy, B. L., Richards, D. A., Holland, K. D., & Danzer, S. C. (2012). Excessive activation of mTOR in postnatally generated granule cells is sufficient to cause epilepsy. *Neuron*, 75(6), 1022-1034. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.002>
118. Puscian, A., Leski, S., Gorkiewicz, T., Meyza, K., Lipp, H. P., & Knapska, E. (2014). A novel automated behavioral test battery assessing cognitive rigidity in two genetic mouse models of autism. *Front Behav Neurosci*, 8, 140. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00140>
119. Raab-Graham, K. F., Haddick, P. C., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (2006). Activity- and mTOR-dependent suppression of Kv1.1 channel mRNA translation in dendrites. *Science*, 314(5796), 144-148. <https://doi.org/10.1126/science.1131693>
120. Radwanska, K., & Kaczmarek, L. (2012). Characterization of an alcohol addiction-prone phenotype in mice. *Addict Biol*, 17(3), 601-612. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2011.00394.x>
121. Rinaldi, A., De Leonibus, E., Cifra, A., Torromino, G., Minicocci, E., De Sanctis, E., Lopez-Pedrajas, R. M., Oliverio, A., & Mele, A. (2020). Flexible use of allocentric and egocentric spatial memories activates differential neural networks in mice. *Sci Rep*, 10(1), 11338. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68025-y>
122. Robin, J., Hirshhorn, M., Rosenbaum, R. S., Winocur, G., Moscovitch, M., & Grady, C. L. (2015). Functional connectivity of hippocampal and prefrontal networks during episodic and spatial memory based on real-world environments. *Hippocampus*, 25(1), 81-93. <https://doi.org/10.1002/hipo.22352>
123. Rolls, E. T. (2013). The mechanisms for pattern completion and pattern separation in the hippocampus. *Front Syst Neurosci*, 7, 74. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2013.00074>
124. Roth, R. H., & Ding, J. B. (2020). From Neurons to Cognition: Technologies for Precise Recording of Neural Activity Underlying Behavior. *BME Front*, 2020, 7190517. <https://doi.org/10.34133/2020/7190517>
125. Rugg, M. D., & Vilberg, K. L. (2013). Brain networks underlying episodic memory retrieval. *Curr Opin Neurobiol*, 23(2), 255-260. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2012.11.005>
126. Sabaliauskas, N., Shen, H., Homanics, G. E., Smith, S. S., & Aoki, C. (2012). Knockout of the gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha4 reduces functional delta-containing extrasynaptic receptors in hippocampal pyramidal cells at the onset of puberty. *Brain Res*, 1450, 11-23. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.02.035>
127. Sanchez-Andrade, G., & Kendrick, K. M. (2009). The main olfactory system and social learning in mammals. *Behav Brain Res*, 200(2), 323-335. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.12.021>
128. Schultz, C., & Engelhardt, M. (2014). Anatomy of the hippocampal formation. *Front Neurol Neurosci*, 34, 6-17. <https://doi.org/10.1159/000360925>
129. Scoville, W. B., & Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 20(1), 11-21. <https://doi.org/10.1136/jnnp.20.1.11>

130. Senzai, Y. (2019). Function of local circuits in the hippocampal dentate gyrus-CA3 system. *Neurosci Res*, 140, 43-52. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2018.11.003>
131. Shen, H., Sabaliauskas, N., Sherpa, A., Fenton, A. A., Stelzer, A., Aoki, C., & Smith, S. S. (2010). A critical role for alpha4betadelta GABAA receptors in shaping learning deficits at puberty in mice. *Science*, 327(5972), 1515-1518. <https://doi.org/10.1126/science.1184245>
132. Shen, H., Sabaliauskas, N., Yang, L., Aoki, C., & Smith, S. S. (2017). Role of alpha4-containing GABA(A) receptors in limiting synaptic plasticity and spatial learning of female mice during the pubertal period. *Brain Res*, 1654(Pt B), 116-122. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.01.020>
133. Shi, G. D., OuYang, Y. P., Shi, J. G., Liu, Y., Yuan, W., & Jia, L. S. (2011). PTEN deletion prevents ischemic brain injury by activating the mTOR signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 404(4), 941-945. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.12.085>
134. Shivakumar, A. B., Mehak, S. F., Jijimon, F., & Gangadharan, G. (2024). Extrahippocampal Contributions to Social Memory: The Role of Septal Nuclei. *Biol Psychiatry*, 96(11), 835-847. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2024.04.018>
135. Smith, A. S., Williams Avram, S. K., Cymerblit-Sabba, A., Song, J., & Young, W. S. (2016). Targeted activation of the hippocampal CA2 area strongly enhances social memory. *Mol Psychiatry*, 21(8), 1137-1144. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.189>
136. Smith, C. N., & Squire, L. R. (2009). Medial temporal lobe activity during retrieval of semantic memory is related to the age of the memory. *J Neurosci*, 29(4), 930-938. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4545-08.2009>
137. Sperow, M., Berry, R. B., Bayazitov, I. T., Zhu, G., Baker, S. J., & Zakharenko, S. S. (2012). Phosphatase and tensin homologue (PTEN) regulates synaptic plasticity independently of its effect on neuronal morphology and migration. *J Physiol*, 590(4), 777-792. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.220236>
138. Squire, L. R. (2009a). The legacy of patient H.M. for neuroscience. *Neuron*, 61(1), 6-9. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.12.023>
139. Squire, L. R. (2009b). Memory and brain systems: 1969-2009. *J Neurosci*, 29(41), 12711-12716. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3575-09.2009>
140. Squire, L. R. (2004). "Memory systems of the brain: a brief history and current perspective." *Neurobiol Learn Mem* 82(3): 171-177.
141. Squire, L. R., Zola-Morgan, S., Cave, C. B., Haist, F., Musen, G., & Suzuki, W. A. (1990). Memory: organization of brain systems and cognition. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 55, 1007-1023. <https://doi.org/10.1101/sqb.1990.055.01.096>
142. Stanton, M. E., Thomas, G. J., & Brito, G. N. (1984). Posterodorsal septal lesions impair performance on both shift and stay working memory tasks. *Behav Neurosci*, 98(3), 405-415. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.98.3.405>
143. Teng, E., & Squire, L. R. (1999). Memory for places learned long ago is intact after hippocampal damage. *Nature*, 400(6745), 675-677. <https://doi.org/10.1038/23276>
144. Thomas, U. (2002). Modulation of synaptic signalling complexes by Homer proteins. *J Neurochem*, 81(3), 407-413. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00869.x>
145. Too, L. K., Li, K. M., Suarna, C., Maghzal, G. J., Stocker, R., McGregor, I. S., & Hunt, N. H. (2016). Deletion of TDO2, IDO-1 and IDO-2 differentially affects mouse behavior and cognitive function. *Behav Brain Res*, 312, 102-117. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.06.018>
146. Tsai, T. C., Y. S. Fang, Y. C. Hung, L. C. Hung, and K. S. Hsu. (2022). A dorsal CA2 to ventral CA1 circuit contributes to oxytocinergic modulation of long-term social recognition memory, *J Biomed Sci*, 29: 50.
147. Tzakis, N., & Holahan, M. R. (2019). Social Memory and the Role of the Hippocampal CA2 Region. *Front Behav Neurosci*, 13, 233. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00233>
148. Ujita, W., Kohyama-Koganeya, A., Endo, N., Saito, T., & Oyama, H. (2018). Mice lacking a functional NMDA receptor exhibit social subordination in a group-housed environment. *FEBS J*, 285(1), 188-196. <https://doi.org/10.1111/febs.14334>
149. van Strien, N. M., Cappaert, N. L., & Witter, M. P. (2009). The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat Rev Neurosci*, 10(4), 272-282. <https://doi.org/10.1038/nrn2614>

150. Vorhees, C. V., & Williams, M. T. (2006). Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc*, 1(2), 848-858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.116>
151. Vorhees, C. V., & Williams, M. T. (2014). Assessing spatial learning and memory in rodents. *ILAR J*, 55(2), 310-332. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilu013>
152. Wang, D. e. a. (2019). Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nature Reviews Drug Discovery* 18, 358–378. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/>
153. Wang, P., Mei, F., Hu, J., Zhu, M., Qi, H., Chen, X., Li, R., McNutt, M. A., & Yin, Y. (2017). PTENalpha Modulates CaMKII Signaling and Controls Contextual Fear Memory and Spatial Learning. *Cell Rep*, 19(12), 2627-2641. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.088>
154. Wang, S. H., & Morris, R. G. (2010). Hippocampal-neocortical interactions in memory formation, consolidation, and reconsolidation. *Annu Rev Psychol*, 61, 49-79, C41-44. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.093008.100523>
155. Wenk, G. L. (2001). Assessment of spatial memory using the T-maze. *Curr Protoc Neurosci*, Chapter 8, Unit 8 5B. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0805bs04>
156. Williams, M. R., DeSpenza, T., Jr., Li, M., Gullledge, A. T., & Luikart, B. W. (2015). Hyperactivity of newborn Pten knock-out neurons results from increased excitatory synaptic drive. *J Neurosci*, 35(3), 943-959. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3144-14.2015>
157. Winslow, W., I. McDonough, S. Tallino, A. Decker, A. S. Vural, and R. Velazquez. (2021). IntelliCage Automated Behavioral Phenotyping Reveals Behavior Deficits in the 3xTg-AD Mouse Model of Alzheimer's Disease Associated With Brain Weight, *Front Aging Neurosci*, 13: 720214. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.720214>
158. Yassa, M. A., & Stark, C. E. (2011). Pattern separation in the hippocampus. *Trends Neurosci*, 34(10), 515-525. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.06.006>
159. Yoo, Y. E., Yoo, T., Lee, S., Lee, J., Kim, D., Han, H. M., Bae, Y. C., & Kim, E. (2019). Shank3 Mice Carrying the Human Q321R Mutation Display Enhanced Self-Grooming, Abnormal Electroencephalogram Patterns, and Suppressed Neuronal Excitability and Seizure Susceptibility. *Front Mol Neurosci*, 12, 155. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00155>
160. Zemla, R., & Basu, J. (2017). Hippocampal function in rodents. *Curr Opin Neurobiol*, 43, 187-197. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.04.005>
161. Zlotnik, G., & Vansintjan, A. (2019). Memory: An Extended Definition. *Front Psychol*, 10, 2523. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2019.02523>
162. Zola-Morgan, S., Squire, L. R., & Amaral, D. G. (1986). Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J Neurosci*, 6(10), 2950-2967. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.06-10-02950.1986>

8. INFORMACJE DODATKOWE

Publikacje przeglądowe:

Chwin N., Kiryk A., (2024) The integral role of PTEN in brain function: from neurogenesis to synaptic plasticity and social behavior. *Acta Neurobiol Exp*, 84. <https://doi.org/10.55782/ane-2024-2657>.