

Katarzyna Karolina Pels

**Analiza zmian architektonicznych jądra komórkowego
neuronów i astrocytów w eksperymentalnych modelach stresu
i depresji**

Praca doktorska
wykonana w Pracowni Neuromorfologii
Molekularnej i Systemowej
Instytutu Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN

PROMOTORZY:

prof. dr hab. Grzegorz M. Wilczyński †
dr hab. Joanna Dzwonek prof. IBD

drugi promotor: prof. dr hab. Ryszard Przewłocki
promotor pomocniczy: dr Błażej Ruszczycki

Warszawa, rok 2022



Pragnę serdecznie podziękować moim promotorom:

*śp. prof. dr hab. **Grzegorzowi Wilczyńskiemu** za opiekę naukową, nieocenioną pomoc, ogrom przekazanej wiedzy, dyskusje i wsparcie w trakcie realizacji projektu doktorskiego*

*dr hab. **Joannie Dzwonek** za podjęcie się roli promotora i opiekę naukową po śmierci prof. Wilczyńskiego, a także cenne wskazówki przy finalizacji pracy doktorskiej*

*prof. dr hab. **Ryszardowi Przewłockiemu** za nieocenioną pomoc, dyskusje i cenne uwagi w trakcie realizacji projektu i przygotowywania rozprawy doktorskiej*

*dr **Błażewi Ruszczyckiemu** za nieocenioną pomoc w tworzeniu narzędzi do analizy obrazu, dyskusje i wsparcie w trakcie realizacji projektu i przygotowywania rozprawy*

oraz

*dr **Wernerowi Zuschratterowi** za możliwość wykorzystania mikroskopu superrozdzielczego STED, nieocenioną pomoc i wsparcie,*

*prof. dr hab. **Jakubowi Włodarczykowi** za użyczenie zwierząt (model depresji wywoływanej przewlekłym stresem) oraz cenne uwagi w trakcie realizacji projektu i przygotowywania rozprawy,*

*prof. **Yijunowi Ruanowi**, prof. **Chia-Lin Wei** i prof. **Charlesowi Lee** za możliwość nauki i wykorzystania techniki ChIA-PET, nieocenioną pomoc i wsparcie w trakcie wykonywania doświadczeń i dyskusji wyników,*

*dr hab. **Michałowi Dąbrowskiemu** i mgr **Aleksandrze Cabaj** za przeprowadzenie analiz wyników sekwencjonowania RNA, dyskusje i cenne rady,*

*prof. dr hab. **Jackowi Jaworskiemu** i dr. **Małgorzacie Urbańskiej** za nieocenioną pomoc w przygotowaniu hodowli komórkowych.*

*Chcę również gorąco podziękować wszystkim osobom pomagającym mi w wykonaniu doświadczeń, służących radą i wskazówkami: **Ewie Bączyńskiej**, **Hubertowi Doleżyczkowi**, **Evie Gega**, **Kwondo Kim**, **Minji Kim**, **Oliverowi Koblerowi**, **Katarzynie Krawczyk**, **Adamowi Krzystyniakowi**, **Byoungkoo Lee**, **Agnieszce Łabanowskiej**, **Ericowi Loucks**, **Monice Malinowskiej**, **Urszuli Skupio**, **Andrzejowi Szczepankiewiczowi**, **Ping Wang**,*

a także

wszystkim koleżankom i kolegom z Pracowni prof. Wilczyńskiego, prof. Przewłockiego, prof. Włodarczyka, dr Szymańskiego, prof. Jaworskiego, dr Zuschrattera, prof. Ruana, prof. Lee i prof. Wei za życzliwą atmosferę pracy i wszelką inną pomoc.

*Nie mniej gorąco pragnę podziękować mojej Rodzinie: **Mamie**, **Siostrze** i **Bratu**, bez których nieustannego wsparcia i wiary we mnie ta praca nie miałaby szans powstać.*

Wykaz stosowanych skrótów.....	6
Streszczenie	8
Abstract.....	9
1. Wstęp.....	10
1.1. Depresja – charakterystyka problemu, diagnostyka, demografia	10
1.2. Zmiany molekularne oraz morfologiczne makroskopowej i mikroskopowej struktury mózgu w depresji.....	12
1.3. Etiologia depresji	15
1.3.1. Stres a depresja	16
1.3.2. Oś podwzgórze – przysadka - nadnercza.....	18
1.3.3. Receptor glukokortykoidowy – funkcja i udział w patogenezie depresji.	18
1.3.4. Czynniki epigenetyczne w patogenezie depresji	21
1.4. Organizacja i metody badania genomu	23
1.4.1. Metody morfologiczne połączone z obrazowaniem mikroskopowym	25
1.4.2. Metody biochemiczne	27
2. Cele pracy	30
3. Materiały i metody	31
3.1. Pierwotne hodowle komórkowe.....	31
3.1.1 Zakładanie i warunki prowadzenia hodowli.....	31
3.1.2 Przygotowanie komórek do hybrydyzacji	33
3.1.3 Przygotowanie komórek do analiz ekspresji genów	33
3.1.4 Przygotowanie komórek do analiz oddziaływań międzychromatynowych ...	33
3.2. Mysie modele stresu i depresji	34
3.2.1 Model silnego stresu	34
3.2.2 Model depresji indukowanej farmakologicznie	35
3.2.3 Model depresji wywołany chronicznym stresem	37
3.2.4 Uśmiercanie zwierząt i przygotowywanie materiału tkankowego	37
3.3. Analiza zmian ekspresji genu <i>Nr3c1</i>	38
3.4. Analiza statystyczna.....	40

3.5. Przygotowanie sond powstałych na bazie sztucznych chromosomów bakteryjnych.....	41
3.5.1 Reakcja GenomiPhi	41
3.5.2 Reakcja przemieszczenia pęknięć	42
3.6. Przygotowanie i hybrydyzacja komórek neuronalnych i astrocytarnych do mikroskopii superrozdzielczej STED	43
3.7. Przygotowanie i hybrydyzacja tkanki do mikroskopii konfokalnej.....	45
3.8. Zbieranie obrazów mikroskopowych.....	46
3.9. Analiza obrazów.....	47
3.10. Analizy transkryptomyczne metodą sekwencjonowania RNA	49
3.11. Analiza bioinformatyczna wyników sekwencjonowania RNA.....	49
3.12. Analiza interakcji międzychromatynowych za pomocą metody ChIA-PET w neuronalnych i astrocytarnych hodowlach pierwotnych.....	51
3.12.1 Liza komórek, permeabilizacja jąder komórkowych i trawienie restrykcyjne	51
3.12.2 Znakowanie i ligacja fragmentów DNA.....	53
3.12.3 Sonikacja komórek	54
3.12.4 Immunoprecypitacja chromatyny	55
3.12.5 Płukanie DNA związanego do złoża i rozbijanie kompleksów DNA-białko powstałych podczas sieciowania	55
3.12.6 Ocena wzbogacenia	56
3.12.7 Przygotowanie biblioteki Illumina	57
3.13. Analiza bioinformatyczna bibliotek ChIA-PET	60
3.14. Odczynniki i bufony.....	61
4. Wyniki	71
4.1. Analiza zmian ekspresji genu <i>Nr3c1</i> wywołanych działaniem deksametazonu (model <i>in vitro</i>)	71
4.2. Analiza zmian ekspresji genu <i>Nr3c1</i> po jednorazowym podaniu deksametazonu – zwierzęcy model silnego stresu.....	73

4.3.	Analiza zmian morfometrycznych w obrębie jądra komórkowego po jednorazowym podaniu deksametazonu – zwierzęcy model silnego stresu.	75
4.4.	Analiza zmian kolokalizacji alleli genu <i>Nr3c1</i> z markerami chromatyny aktywnej i nieaktywnej transkrypcyjnie, wywołanych przez jednorazowe podanie deksametazonu (model <i>in vitro</i>).	82
4.5.	Weryfikacja zachowań depresyjnych u myszy – farmakologiczny model depresji	87
4.6.	Analiza zmian poziomu ekspresji genu <i>Nr3c1</i> oraz zmian morfometrycznych w obrębie jądra komórkowego – farmakologiczny model depresji.	93
4.7.	Analiza zmian morfometrycznych w obrębie jądra komórkowego – model chronicznego, nieprzewidywalnego stresu.	97
4.8.	Globalna analiza zmian ekspresji genów, indukowanych w skutek jednorazowego podania deksametazonu, metodą sekwencjonowania RNA.	100
4.9.	Globalna analiza zmian organizacji chromatyny, wynikających z jednorazowego podania deksametazonu, metodą ChIA-PET.	109
5.	Dyskusja	116
5.1.	Analiza zmian ekspresji i zmian morfometrycznych dotyczących genu <i>Nr3c1</i> , będących skutkiem silnego stresu.	116
5.2.	Porównanie zmian morfometrycznych dotyczących genu <i>Nr3c1</i> u zwierząt, na skutek przewlekłego stresu i farmakologicznie.	126
5.3.	Analiza funkcjonalna genów, których ekspresja ulegała zmianie pod wpływem działania deksametazonu – badania z wykorzystaniem metody sekwencjonowania RNA.	129
5.4.	Analiza zmian organizacji chromatyny w efekcie podania deksametazonu – badania metodą ChIA-PET	134
6.	Podsumowanie i wnioski końcowe	138
7.	Piśmiennictwo	139
8.	Spis własnych publikacji	158
8.1.	Publikacje	158
8.2.	Patenty	159

Wykaz stosowanych skrótów

BAC (*ang. Bacterial Artificial Chromosome*) - sztuczny chromosom bakteryjny

cDNA (*ang. complementary DNA*) - komplementarny DNA

ChIA-PET (*ang. Chromatin Interaction Analysis by Paired-End Tag sequencing*) – metoda biochemiczna pozwalająca na badanie oddziaływań międzychromatynowych

ChIP (*ang. Chromatin Immunoprecipitation*) – immunoprecypitacja chromatyny

CRH (*ang. Corticotropin-Releasing Hormone*) - kortykoliberyna

CTCF (*ang. CCCTC-binding factor*) – czynnik wiążący CCCTC

DEX (*ang. DEXamethasone*) - deksametazon, syntetyczny hormon steroidowy, agonista receptorów glukokortykoidowych,

FISH (*ang. fluorescence in situ hybridization*) - fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*, pozwala na wizualizację specyficznych odcinków RNA lub DNA

FST (*ang. Forced Swimming Test*) – test wymuszonego pływania, test behawioralny służący do oceny poziomu bezsilności u zwierząt

GFAP (*ang. Glial Fibrillary Acidic Protein*) - kwaśne białko włókienkowe, występujące w komórkach glejowych

GR (*ang. Glucocorticoid Receptor*) – receptor glukokortykoidowy

GRE (*ang. Glucocorticoid Response Element*) – miejsce wiązania GR do sekwencji regulowanego przez niego genu

Hi-C (*ang. High-throughput Chromosome Conformation Capture*) - metoda biochemiczna pozwalająca na badanie oddziaływań międzychromatynowych

HPA axis (*ang. Hypothalamic – Pituitary - Adrenal axis*) - oś podwzgórze – przysadka –nadnercza

HPRT1 (*ang. Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1*) – fosforybotransferaza hypoksantyny 1, gen stosowany jako wewnętrzna kontrola w reakcji

L/D box (*ang. Light/ Dark box*) – test jasnego/ ciemnego pola, test behawioralny służący do oceny poziomu lęku

MDD (*ang. Major Depressive Disorder*) – depresja

NeuN (*ang. Neuronal Nuclear protein*) – neuronalne białko jądrowe, często stosowane jako znacznik neuronów

Nr3c1 (*ang. Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1*) – gen kodujący GR

PCR (*ang. Polymerase Chain Reaction*) - reakcja łańcuchowa polimerazy

PTSD (*ang. Posttraumatic Stress Disorder*) – zespół stresu pourazowego

pz – par zasad

RNA Pol II (*ang. RNA Polymerase II*) - polimeraza RNA II

RNAseq (*ang. RNA sequencing*) – sekwencjonowanie RNA, metoda profilowania transkryptomu

STED (*ang. STimulated Emission Depletion*) – mikroskopia wymuszonego wygaszania emisji, rodzaj mikroskopii superrozdzielczej

TAD (*ang. Topologically Associating Domain*) – domena topologiczna

TSS (*ang. Transcription Start Site*) – miejsce startu transkrypcji

WHO (*ang. World Health Organization*) – Światowa Organizacja Zdrowia

Streszczenie

Depresja, zgodnie z danymi Światowej Organizacji Zdrowia, jest wiodącą przyczyną niepełnosprawności. Dotyka niemal 270 milionów ludzi na całym świecie. Patogeneza tej wieloczynnikowej choroby jest wciąż nieznana. Niestety współczesne terapie z użyciem leków przeciwdepresyjnych nie są wystarczająco skuteczne, a ich efekt terapeutyczny jest zwykle znacznie opóźniony. To ostatnie sugeruje, iż ich działanie terapeutyczne odbywa się poprzez wpływ na plastyczność mózgu, związaną ze zmianami w ekspresji genów i kodowanych przez nie białek.

Jedną z najlepiej poznanych zmian patogenetycznych w depresji są zaburzenia osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (HPA) regulującej uwalnianie kortyzolu. Kortyzol, w warunkach fizjologicznych, wywiera efekt plejotropowy na różne narządy, w tym mózg, które dzięki temu przygotowują organizm do „walki lub ucieczki” przed zagrożeniem. Niemniej jednak silny, ostry stres lub długotrwały stres powodują zaburzenia w działaniu osi HPA, czego konsekwencją są nieprawidłowości morfologiczne i behawioralne. Uważa się obecnie, iż zaburzenia działania osi HPA związane są z nieprawidłową funkcją receptora dla glukokortykoidów (GR), który jako czynnik transkrypcyjny reguluje ekspresję wielu genów, w tym (negatywnie) genu *Nr3c1*, kodującego właśnie GR. Prowadzone do tej pory badania, w tym zakresie, dotyczyły głównie komórek proliferujących i/ lub ulegających różnicowaniu. Niewiele natomiast jest danych dotyczących komórek terminalnie zróżnicowanych, w tym neuronów i komórek glejowych. Dlatego prezentowana rozprawa jest próbą zbadania zmian organizacji chromatyny wywołanych aktywacją GR w komórkach mózgu. Eksperymenty przedstawione w pracy wskazały na ścisły związek między zmianami ekspresji genu *Nr3c1* a jego umiejscowieniem w jądrach komórkowych komórek mózgu, w warunkach stresowych, w trzech strukturach mózgu związanych z patogenezą depresji. Zastosowanie mikroskopii superrozdzielczej STED potwierdziło, że zmiany w lokalizacji genu *Nr3c1* wynikają z jego wiązania z aktywną lub nieaktywną chromatiną, a analiza ChIA-PET wyraźnie wykazała reorganizację architektury chromatyny spowodowaną aktywacją GR.

Niniejsza praca po raz pierwszy pokazuje, iż masywna stymulacja GR w komórkach mózgu prowadzi do zmian organizacji chromatyny nie tylko w obrębie tego konkretnego genu, ale także na poziomie globalnym. Dodatkowo, obserwowane zmiany różniły się znacząco pomiędzy neuronami i astrocytami.

Abstract

The depression, according to World Health Organization is a leading cause of disability worldwide, affecting more than 270 million people. This is a multifactorial disease of still unknown pathogenesis. Unfortunately, contemporary therapies using antidepressants are not effective enough, and their therapeutic effect is usually significantly delayed. The latter fact suggests that antidepressants work by affecting long-term brain plasticity, probably associated with changes in gene activity orchestrated by reorganization of the chromatin architecture.

One of the best-known pathogenic changes in depression are disturbances of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis regulating the release of cortisol. Cortisol, under physiological conditions, exerts a pleiotropic effect on various organs, including brain, and prepares us to "fight or flight" from danger. Nevertheless, severe stress causes disturbances in the HPA axis, which results in morphological and behavioral abnormalities. It is believed that such disruption is associated with abnormal glucocorticoid receptor (GR) function. GR regulates the activity of many genes, including the negative-feedback autoregulation of *Nr3c1* gene encoding GR. Although structural changes involved in GR autoregulation on DNA level, were studied in proliferating cell, not much is known about its function in cells terminally differentiated, including neurons and astrocytes. Therefore, the presented dissertation is an attempt to investigate the architectural changes induced by GR activation in brain cells. Experiments presented in this thesis have indicated, a close relationship between activity changes of the *Nr3c1* gene and its location within the cell nuclei of brain cells, under stress conditions, in three brain structures associated with the pathogenesis of depression. Application of STED super-resolution microscopy confirmed that changes in the location of the *Nr3c1* gene result from its binding to active or inactive chromatin and ChIA-PET analysis clearly shown reorganization of the chromatin architecture caused by GR activation.

The presented data show for a first time, that GR stimulation in brain cells leads to changes of the chromatin organization not only within this particular gene but also at the global level. And that those changes differ between neurons and astrocytes.

1. Wstęp

1.1. Depresja – charakterystyka problemu, diagnostyka, demografia

Amerykańskie Towarzystwo Psychiatryczne w opublikowanym w 2013 roku przewodniku leczenia depresji (*ang. Major Depressive Disorder, MDD*) określiło depresję jako chorobę częstą i poważną, mającą negatywny wpływ na uczucia, sposób myślenia i działania jednostki (American Psychiatric Association, 2013; A). Definicja ta, choć z pewnymi zmianami obowiązującą do dnia dzisiejszego. Obecnie choroba, a zwłaszcza jej negatywny wpływ jest rozważany nie tylko w kategorii jednostki, ale również całych społeczeństw.

Z punktu widzenia klinicznego, depresja klasyfikowana jest jako choroba psychiczna, a jej przebieg charakteryzuje się współwystępowaniem objawów zaliczanych do (i) zaburzeń afektywno-poznawczych, (ii) zaburzeń neurovegetatywnych, i (iii) zaburzeń behawioralnych. Do pierwszej kategorii zalicza się występowanie tzw. nastroju depresyjnego objawiającego się nadmiernym poczuciem winy i bezwartościowości. Osoby z zaburzeniami tego typu mogą przejawiać nawet myśli samobójcze. Druga kategoria to zaburzenia związane z funkcjami wegetatywnymi, np. snem i wynikających z nich m.in. brakiem energii czy osłabieniem koncentracji. Do ostatniej kategorii zalicza się poczucie braku celu, chęć odizolowania się od społeczeństwa lub nawet niezdolność do normalnego w nim funkcjonowania. Często wiąże się to z występowaniem anhedonii, definiowanej jako obniżona zdolność/ niezdolność do odczuwania przyjemności z czynności uważanych wcześniej za przyjemne. Należy jednak zaznaczyć, iż wszystkie opisane powyżej objawy mogą występować ze zmiennym nasileniem i dużą różnorodnością pomiędzy poszczególnymi osobami, co stanowi znaczne utrudnienie dla prawidłowej diagnozy depresji.

Obecnie podstawą diagnostyki depresji jest przeprowadzenie wywiadu lekarskiego, którego dokładne kryteria zostały określone przez Amerykańskie Towarzystwo Psychiatryczne (American Psychiatric Association, 2013; B). Depresję diagnozuje się na podstawie współwystępowania, w ciągu minimum 2 tygodni, pięciu lub więcej objawów spośród wymienionych powyżej. Istotne jest, aby występujące objawy w znacznym stopniu wpływały negatywnie na życie pacjenta. Wśród rozpoznanych objawów konieczne jest występowanie anhedonii lub nastroju depresyjnego. Należy także wykluczyć możliwość, iż obserwowane objawy wynikają z przyjmowanych przez

pacjenta leków lub są powiązane z innymi zaburzeniami psychicznymi, np. schizofrenią, lub zaburzeniami somatycznymi.

Postawienie prawidłowej diagnozy jest zatem trudne, niemniej jednak to leczenie stanowi prawdziwe wyzwanie, głównie ze względu na wieloczynnikowość depresji, nie do końca jasną patogenezę, a co najważniejsze - brak skutecznego i uniwersalnego leku. Wybór sposobu leczenia w przypadku konkretnego pacjenta, często jedynie na podstawie obserwowanych u niego objawów, może okazać się katastrofalne w skutkach. Leczenie, przy zastosowaniu antydepresantów wiąże się z opóźnioną odpowiedzią kliniczną, zwykle od 4 do 6 tygodni od wdrożenia leku. Dodatkowo, zwiększona aktywność pacjenta obserwowana w pierwszej fazie leczenia, z jednoczesnym brakiem poprawy przyczynia się do podejmowania prób samobójczych, z czego niemal 15% jest skutecznych. Z tego względu depresję często rozważa się w kategoriach choroby śmiertelnej (Sobocki i wsp., 2006). Opóźniona odpowiedź na leczenie antydepresantami może być związana z ich pośredniczeniem w długoterminowych procesach, takich jak efekty epigenetyczne (Tsankova i wsp., 2007). Wykazano, iż mogą one działać poprzez obniżenie poziomu metylacji DNA czy też modyfikacje histonów (Menke i wsp., 2012). Warto także zaznaczyć, iż wdrożone leki często okazują się nieskuteczne w przypadku konkretnego pacjenta (Cipriani i wsp., 2018). Badania wykazały, że zaledwie u 1/3 pacjentów dochodzi do pełnej remisji choroby po jednej serii leczenia, a u blisko 30% nie wykazano żadnej poprawy w wyniku zastosowanego leczenia (Rush i wsp., 2006).

Depresja często traktowana jest jako choroba dotycząca pojedyncze jednostki, jednak nic bardziej mylnego - depresja to choroba wpływająca na życie całych społeczeństw. Dane Światowej Organizacji Zdrowia (*ang. World Health Organization, WHO*) mówią już o prawdziwej „epidemii”, jeśli chodzi o zachorowalność na depresję. Obecnie, liczba potwierdzonych zachorowań wynosi blisko 270 milionów (Institute of Health Metrics and Evaluation, 2022) w skali całego globu (w tym ponad półtora miliona ludzi w Polsce), a według szacunków co trzecia osoba na świecie doświadczy co najmniej jednego epizodu depresji w ciągu życia. Czyni to depresję jedną z wiodących przyczyn niepełnosprawności (Friedrich, 2017). Ze względu na to, iż depresja wpływa negatywnie na funkcjonowanie chorego, bardzo często uniemożliwia to wykonywanie przez niego pracy zawodowej. Biorąc pod uwagę przewidywania WHO, iż depresja do roku 2030 stanowić będzie główną przyczynę niepełnosprawności na świecie, nietrudno wyobrazić sobie jak olbrzymie obciążenie dla rozwoju ekonomicznego państw stanowić będzie tak

duża liczba osób niezdolnych do pracy. Już teraz szacunkowe dane w skali świata mówią o ponad trzech trylionach dolarów rocznego obciążenia budżetu państw, wynikających z kosztów leczenia depresji, a także strat związanych z niezdolnością do pracy osób chorych (Sobocki i wsp., 2006).

1.2.Zmiany molekularne oraz morfologiczne makroskopowej i mikroskopowej struktury mózgu w depresji.

Depresja objawia się nie tylko zmianami w zachowaniu, jak np. występowaniem nastroju depresyjnego, czy anhedonii (Naranjo i wsp., 2001), ale także zmianami molekularnymi i morfologicznymi zachodzącymi w obrębie struktur mózgu. W korze przedczołowej i hipokampie obserwowane są nieprawidłowości w kształcie drzew dendrytycznych i synaps neuronów (Harrison, 2002), stanowiące jedną z przyczyn zmniejszenia objętości tych obszarów mózgu. Innym efektem jest niezdolność do odczuwania przyjemności, wynikająca z zaburzeń w obrębie jądra półleżącego (*lat. nucleus accumbens*) wchodzącego w skład układu nagrody (Naranjo i wsp., 2001).

Dodatkowo, coraz więcej badań podkreśla rolę astrocytów w depresji. Obserwowana w korze przedczołowej i hipokampie atrofia morfologiczna i funkcjonalna tych komórek oraz zmniejszenie ilości markerów astrocytarnych (np. GFAP) są silnie powiązane z zaburzeniami depresyjnymi (Rajkowska i Stockmeier, 2013; Skupio i wsp., 2015).

Wiedza na temat zaburzeń budowy mózgu związanych z depresją pochodzi z badań tkanek ludzkich: autopsyjnych (wykonywanych metodami makro- i mikroanatomicznymi) i przyżyciowych (metodami obrazowymi), a także z badań na modelach zwierzęcych. W materiale pobranym po śmierci pacjenta można dokładnie zmierzyć i zważyć poszczególne części mózgu oraz precyzyjnie zdiagnozować ewentualne nieprawidłowości ich połączeń. Ponadto, dzięki zastosowaniu barwienia histologicznego czy reakcji immunohistochemicznych odpowiednich dla metod mikroskopowych, możliwe jest określenie wielkości poszczególnych neuronów i komórek glejowych oraz ich zagęszczenia. Niestety praca z tkankami ludzkimi jest trudna, głównie ze względu na degradację subtelnych elementów ultrastrukturalnych post mortem, co znacznie utrudnia lub wręcz uniemożliwia prawidłową interpretację wyników.

Nieliczne badania wykonane w krótkim czasie po śmierci pacjenta ujawniły pewne zaburzenia struktury komórek nerwowych, np. długości i stopnia rozgałęzienia dendrytów, a także gęstości tzw. kolców dendrytycznych, czyli drobnych wypustek pnia dendrytu o długości do 2 μm (Peters i wsp. 1991; MANJI i wsp., 2001; Nimchinsky i wsp., 2002). U części pacjentów zaobserwowano zmniejszenie objętości hipokampa i kory przedczołowej. Wymienione struktury uważane są za istotne z punktu widzenia patogenezы depresji. Hipokamp (*łac. hippocampus*) odgrywa ważną rolę w przenoszeniu (konsolidacji) informacji z pamięci krótkotrwałej do pamięci długotrwałej oraz w orientacji przestrzennej. Kora przedczołowa (*łac. cortex prefrontalis*) pełni funkcję w działaniu pamięci roboczej, planowaniu ruchów i działaniach oraz rozważaniu ich konsekwencji, a także hamuje spontaniczne i często gwałtowne reakcje emocjonalne. Uważa się, że ta struktura jest najbardziej narażoną na skutki stresu, poprzez działanie glukokortykoidów (Cerqueira i wsp., 2007). Ponadto obserwowane zaburzenia strukturalne i funkcjonalne w obrębie kory przedczołowej są skorelowane z zaburzeniami emocjonalnymi obserwowanymi, zarówno u ludzi (Drevets, 2007)), jak i gryzoni (Liston i wsp., 2006). W szczególności atrofia dendrytów i kolców dendrytycznych, a w rezultacie również synaps, w hipokampie i korze przedczołowej, koreluje z pseudootępieniem występującym u osób cierpiących na depresję. Zmiany atroficzne dendrytów i kolców dendrytycznych występowały głównie w polach rogu Amona (regiony CA1 i CA3; *łac. cornu ammonis 1 i cornu ammonis 3*), w zakręcie zębatym hipokampa (*łac. gyrus dentatus*) oraz w warstwach II/III kory przedczołowej (Drevets i Furey 2009). Interesującym jest, iż u części osób chorych poddanych leczeniu, dochodziło do odwrócenia (częściowego lub całkowitego) zmian zachodzących w hipokampie, w tym zwiększenia jego objętości do rozmiarów fizjologicznych (Sapolsky 2000). Sugeruje to zaangażowanie procesów plastycznych w patogenezę depresji.

Zmniejszenie objętości w wyniku depresji obserwuje się także w przypadku jądra półleżącego (Francis i Lobo, 2017). Struktura ta zlokalizowana jest w prążkowie, a co istotne wchodzi w skład układu nagrody. Układ ten odpowiada za skojarzenie ze sobą zachowań nagradzających, jak np. poczucie szczęścia (hedonia) czy motywacja, z czynnościami, które z reguły są korzystne, zarówno z punktu widzenia jednostki, np. te związane z jej przetrwaniem (apetyt), ale również z punktu widzenia gatunku (funkcja rozrodcza). Uważa się, iż to właśnie układ nagrody pełni kluczową rolę w kształtowaniu

zachowań, w tym także odpowiada za zachowania określane jako depresyjne (Francis i wsp., 2015). Samo jądro półleżące pełni rolę centralną, odbierając i przesyłając bodźce pomiędzy wieloma strukturami mózgu, m.in. hipokampem, ciałem migdałowatym czy korą przedczołową. Badania wykazały, iż w modelu stresu pourazowego (*ang. Posttraumatic Stress Disorder, PTSD*), w wyniku zadziałania pojedynczego stresora o przedłużonym działaniu, dochodzi do nadaktywności kory przedczołowej i związanych z nią zaburzeń w obrębie części rdzenia „core” jądra półleżącego, podczas gdy w części „shell” nie obserwowano żadnych zmian (Piao i wsp., 2017).

Przyczyny zróżnicowania zmian w różnych regionach mózgu nie są jeszcze poznane. Ze względu na trudności w stosowaniu mikroskopii elektronowej w tkance mózgu ludzkiego post-mortem znaczna część wiedzy na temat wyżej wymienionych zmian cytologicznych stanowi ekstrapolację wyników uzyskanych w modelach zwierzęcych. Przyżyciowe obserwacje dynamiki zmian objętości struktur mózgu zachodzących u ludzi z depresją (także ich odwracalności pod wpływem leczenia), możliwe są tylko dzięki zastosowaniu nieinwazyjnych metod obrazowania, takich jak tomografia komputerowa lub rezonans magnetyczny (Drevets i Furey 2009). Choć wyniki uzyskane przy użyciu tych technik dostarczają niezwykle cennych informacji, metody te charakteryzują się znacznie mniejszą rozdzielczością niż mikroskopia.

Pomoc w zrozumieniu patogenezy depresji i zachodzących pod jej wpływem zmian morfologicznych stanowią badania z wykorzystaniem modeli zwierzęcych. Umożliwiają one większą kontrolę nad pozyskiwanym materiałem tkankowym, m.in. pewność, iż obserwowane zmiany są wynikiem przeprowadzonych procedur, czy zaaplikowanych substancji, a nie, jak w przypadku materiału pochodzącego od ludzi – innych chorób towarzyszących, przyjmowanych leków, wieku pacjenta, czy nawet warunków życia. Dodatkowo, wiele procedur, jak np. badania farmakologiczne, czy edycja genomu, ze względów etycznych możliwe jest jedynie w badaniach na zwierzętach. Co ważne, modele zwierzęce odzwierciedlają najważniejsze anomalie behawioralne występujące u ludzi, tzn. lęk, anhedonię oraz rozpacz (*ang. despair*) a także, jak wykazano, podobne zmiany cytologiczne neuronów, np. zanik/wzrost dendrytów, kolców dendrytycznych i synaps, zależnie od regionu mózgu (Kang i wsp., 2012). Wśród modeli zwierzęcych, jednymi z najczęściej wykorzystywanych są modele mysie. Większość stanowią modele tzw. behawioralne, gdzie zachowania depresyjne indukowane są m.in. poprzez czasową aplikację wielu czynników stresowych takich jak:

stosowane naprzemiennie unieruchomienie, podwieszanie za ogon i przebywanie w tej samej klatce z agresywnym osobnikiem (model chronicznego, nieprzewidywalnego stresu; *ang. chronic unpredictable stress*), oddzielenie młodych od matki (stres związany z wczesnym okresem życia; *ang. early life stress*). Wykorzystywane są także modele farmakologiczne, gdzie do rozwoju zachowań depresyjnych u zwierząt dochodzi wskutek podawania kortykosteronu, nazywanego także hormonem stresu (Wang i wsp., 2017), lub substancji o analogicznym i znacznie silniejszym działaniu – deksametazonu (*ang. dexamethasone, DEX*).

Co niezwykle interesujące, w tkance mózgu pobranej post-mortem od ludzi cierpiących na depresję oraz w preparatach mózgu zwierząt poddanych eksperymentom wywołującym behawioralne zmiany depresyjne zaobserwowano zmniejszenie liczby astrocytów (Wang i wsp., 2017). Komórki te do niedawna były uważane za „podporowe” dla neuronów, bez udziału w zjawiskach związanych z plastycznością synaptyczną. Współczesne poglądy wskazują na aktywną rolę astrocytów w neurotransmisji i plastyczności (Steinhäuser i Kettenmann 2009, Volterra, 2009), a w szczególności w wychwycie neuroprzekazników, utrzymaniu homeostazy synaptycznej, regulacji rozwoju synaps (dojrzwaniu i ich eliminacji), a także utrzymaniu bariery krew-mózg (Chung i wsp., 2015).. Rośnie także liczba publikacji opisujących badania komórkowe i molekularne, wskazujące na zaburzone funkcjonowanie astrocytów w depresji (Lee i wsp., 2007, Rajkowska i Stockmeier 2013, Sanacora i Banasr 2013). U pacjentów z depresją dochodzi do atrofii morfologicznej i funkcjonalnej astrocytów, a także zmniejszonej ekspresji markerów astrocytarnych, np. GFAP, s100B, EAAT1, EAAT2 (Rajkowska i Stockmeier 2013, Skupio i wsp., 2015). Eksperymenty przeprowadzane na szczurach sugerują, że blokowanie wychwytu glutaminianu przez astroglej jest wystarczające do wywołania zachowań depresyjnych i lękowych (Bechtholt-Gompf i wsp., 2010, Cui i wsp., 2014).

1.3.Etiologia depresji

W patogenezę depresji zaangażowane są zmiany na wielu poziomach, zarówno w obrębie całych szlaków sygnałowych, tworzących je białek, jak również genów kodujących konkretne białka, czy wreszcie zmian epigenetycznych wpływających na regulację ekspresji genów. Każdy z tych czynników stanowi małą część składającą się

na podłoże depresji. Obecnie wiemy, że depresja może być dziedziczona. Badania bliźniąt pozwoliły na oszacowanie dziedziczności tej choroby na poziomie 30-37%, w zależności od parametrów branych pod uwagę podczas analiz (McGuffin i wsp., 2007, Menke i wsp., 2012). Pomimo tego, do dzisiaj nie znamy genetycznych uwarunkowań depresji. Nie potrafimy wskazać z całkowitą pewnością, które ze zmian genetycznych predysponują do zwiększonego ryzyka zachorowalności (Krishnan i Nestler 2008). Częściowo może to wynikać z faktu, iż na patogenezę depresji mają wpływ nie tylko czynniki genetyczne, ale także epigenetyczne oraz środowiskowe (Mann i Currier 2006, Hayley i Littlejohn 2013). To właśnie sprawia, że zrozumienie molekularnych podstaw depresji jest znacznie trudniejsze w porównaniu z innymi wieloczynnikowymi chorobami, jak np. cukrzyca czy rak (Krishnan i Nestler 2010).

1.3.1. Stres a depresja

Pytanie, czy stres może powodować depresję, z jednej strony wydaje się być pytaniem trywialnym, z drugiej zaś, ma fundamentalne znaczenie dla naszego poznania patogenezы MDD. Jeśli na tak postawione pytanie odpowiemy twierdząco, to wówczas główny nacisk powinien być kładziony nie na leczenie depresji jako takiej, ale na zapobieganie jej powstawaniu przez terapię zaburzeń związanych ze stresem. Z jednej strony umiarkowany stres pomaga w mobilizacji organizmu do zareagowania na zagrożenie, a także w ewentualnej rekonwalescencji, m.in. poprzez gwałtowny wyrzut hormonów do krwi, aktywację współczulnego układu nerwowego, a wreszcie wydzielania katecholamin: adrenaliny i noradrenaliny. Reakcja ta określana jest mianem „walki lub ucieczki”, z angielskiego „fight or flight response”. Co ciekawe, u osób ze zdiagnozowaną depresją dochodzi do zablokowania tej reakcji (Gilbert i Gilbert, 2003). Badania naukowe wykazały ścisłe powiązanie depresji z zaburzeniami lękowymi. W badaniach ankietowych z 2009 roku wykazano, iż zarówno stres ostry, jak i przewlekły w znaczący sposób wpływają na występowanie epizodów depresyjnych i ich nasilenie w badanej grupie kobiet. Stres przewlekły związany, np. wykonywaną pracą, czy stanem zdrowia osoby ankietowanej lub członka rodziny prowadził do zwielokrotnienia efektu jednorazowego stresu oraz wystąpienia epizodu depresji (Hammen i wsp., 2009). Inne badania przeprowadzone na grupie pracowników służb ratunkowych pracujących na miejscu ataku terrorystycznego na wieże World Trade Center pokazały, iż pojedynczy,

ale bardzo silny bodziec stresowy był czynnikiem predysponującym do rozwoju ostrej reakcji na stres (*ang. Acute Stress Disorder, ASD*), PTSD, a także depresji. Porównanie z odsetkiem ofiar wypadków drogowych, u których rozwinęły się podobne zaburzenia psychiczne wskazuje, iż siła czynnika stresowego odgrywa w tym procesie dużą rolę (Fullerton i wsp., 2004). Także ostatnie wydarzenia, związane z pandemią koronawirusa SARS-CoV-2 i związane z nią niepewność i chaos informacyjny w znacznym stopniu przyczyniły się do zwiększenia liczby osób, u których wystąpiły zaburzenia lękowe i depresja (Salari i wsp., 2020).

Stres wywołuje również zmiany na poziomie strukturalnym i molekularnym w obszarach mózgu związanych z patogenezą depresji. W modelu szczurzym wykazano, iż pojedynczy silny bodziec stresowy poprzez GR, powoduje długotrwałe pobudzenie synaptyczne neuronów piramidowych kory przedczołowej połączone ze zwiększoną ekspresją powierzchniowych podjednostek receptorów: NMDA i AMPA (Yuen i wsp., 2009). Inna obserwacja dotyczyła zmniejszenia objętości hipokampa w wyniku stresu, m.in. poprzez atrofię apikalnych drzewek dendrytycznych neuronów piramidowych obszaru CA3 (Papagni i wsp., 2011, Eiland i McEwen, 2012), co w dalszych badaniach okazało się mieć związek z poziomem endogennych glukokortykoidów (Brown i wsp., 2014 B). Jednym z proponowanych mechanizmów łączących stres z rozwojem depresji jest indukowane stresem zaburzenie w procesie neurogenezy w obrębie wspomnianego już hipokampa (Glover i wsp., 2017). Pewne zmiany na poziomie molekularnym mogą mieć nawet charakter dziedziczny. Przewlekły stres, jakiemu poddawane były dorosłe samce myszy skutkowało zaburzeniami wydzielania glukokortykoidów u potomstwa, globalną zmianą transkrypcji oraz zmianami w poziomie microRNA związanego z regulacją metylacji oraz modyfikacji chromatyny (Rodgers i wsp., 2013). Wspomniane zaburzenia wydzielania glukokortykoidów są nierozłącznie związane z działaniem osi podwzgórze – przysadka – nadnercza (*ang. hypothalamic–pituitary–adrenal axis, HPA*), co zostało opisane w kolejnym rozdziale.

1.3.2. Oś podwzgórze – przysadka - nadnercza

Jednym z najlepiej udokumentowanych zjawisk, jest związek depresji z zaburzeniami działania osi HPA (O'Keane i wsp., 2012). Oś HPA reguluje uwalnianie hormonów glukokortykoidowych z kory nadnerczy. W normalnych warunkach, wchodzące w skład osi HPA podwzgórze syntetyzuje i wydziela kortykoliberynę (*ang. corticotropin-releasing hormone, CRH*). CRH transportowana jest do przedniego płata przysadki, co prowadzi do uwalniania adrenokortykotropiny (*ang. adrenocorticotropic hormone, ACTH*). Ta z kolei transportowana jest przez krew do kory nadnerczy, skąd wydzielany jest kortyzol, hormon zaliczany do glukokortykoidów (Stephens i Wand 2012).

W warunkach fizjologicznego stresu, takiego jak sytuacja „walki lub ucieczki”, wydzielane glukokortykoidy wspierają organizm wywierając efekt plejotropowy na różne narządy. W mózgu efekt ten charakteryzuje m.in. zahamowanie wydzielania CRH przez podwzgórze i w konsekwencji zahamowanie wydzielania kortyzolu przez korę nadnerczy. Taką odpowiedź organizmu na stres określamy regulacją przez ujemne sprzężenie zwrotne. Ma ona na celu zapobieganie efektom zbyt długiego narażenia organizmu na szkodliwy, podwyższony poziom glukokortykoidów (Oray i wsp., 2016). Niestety, długotrwały stres lub stres ostry o dużym nasileniu, może prowadzić do zaburzenia normalnej pętli sprzężenia zwrotnego, co prowadzi do niekontrolowanego uwalniania glukokortykoidów (De Kloet i wsp., 1998).

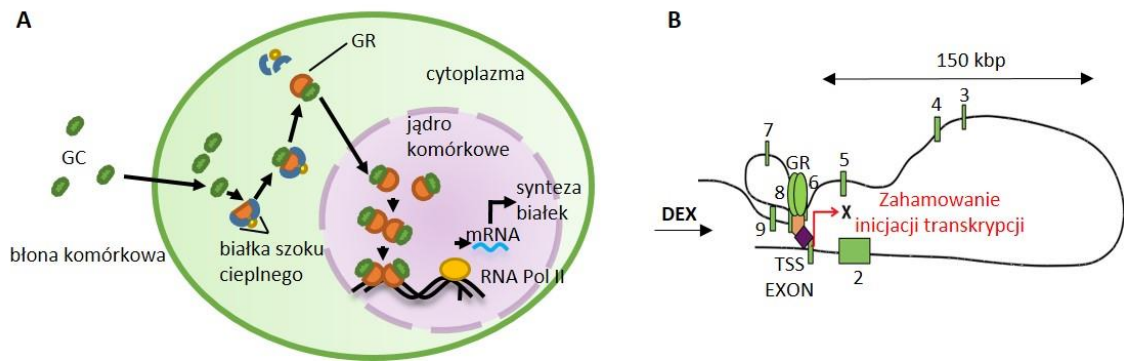
1.3.3. Receptor glukokortykoidowy – funkcja i udział w patogenezie depresji

Receptor typu II, glukokortykoidowy (*ang. glucocorticoid receptors, GR*) należy do grupy czynników transkrypcyjnych, których działanie regulowane jest poprzez związanie z ligandem. Cząsteczka GR zbudowana jest z trzech zasadniczych domen funkcjonalnych: części N-końcowej (*ang. N-terminal domain, NTD*), domeny wiążącej DNA (*ang. DNA binding domain, DBD*) i domeny wiążącej ligand (*ang. ligand binding domain, LBD*). Domena NTD wykazuje największą zmienność pod względem ilości par zasad. Ponadto zawiera region AF1/tau1/enh2 odpowiedzialny za aktywację transkrypcji. DBD jest z kolei domeną najbardziej konserwatywną. Zbudowana z dwóch motywów

palca cynkowego odpowiada za specyficzne wiązanie z DNA w obrębie specyficznych sekwencji, a także za dimeryzację GR. Ostatnia z domen, LBD wiąże GR z cząsteczką hormonu glukokortykoidowego. W jej obrębie zlokalizowane są również miejsca wiązania GR z białkami szoku cieplnego.

Na poziomie molekularnym, GR wraz z receptorem typu I, mineralokortykoidowym (*ang. mineralocorticoid receptors, MR*) są zaangażowane w regulację działania osi HPA. Co ciekawe, kortyzol w warunkach fizjologicznych wykazuje ok. 10-krotnie wyższe powinowactwo do MR niż GR (Fuller i wsp., 2000), natomiast zwiększone stężenie kortyzolu we krwi, będące skutkiem stresu, powoduje jego wiązanie do GR i regulację odpowiedzi stresowej (Herman i wsp., 2016).

Uważa się, iż zaburzenia negatywnego sprzężenia zwrotnego osi HPA, prowadzące do depresji, wynikają z nieprawidłowej funkcji GR w mózgu (O'Keane i wsp., 2012). Według hipotezy ilość GR w komórce jest głównym czynnikiem determinującym jej odpowiedź na glukokortykoidy, a tym samym na bodziec stresowy. Jednak mechanizmy komórkowe odpowiedzialne za działanie pętli ujemnego sprzężenia zwrotnego regulującej ekspresję genu *Nr3c1* kodującego GR wciąż nie są jasne. GR jest czynnikiem transkrypcyjnym, który może zarówno zwiększać, jak i zmniejszać ekspresję setek genów. Znajdujący się w cytoplazmie GR w formie nieaktywnej tworzy kompleks z białkami szoku cieplnego (Anacker i wsp., 2011). Po związaniu liganda, czyli pojawiającej się w komórce na skutek stresu cząsteczki hormonu glukokortykoidowego, receptor oddysocjowuje z kompleksu (Ryc.1.1 A). Następnie, przy pomocy białek translokacji jądrowej, ulega przemieszczeniu do jądra komórkowego (Smoak i Cidlowski 2004). Tam po utworzeniu dimerów wiąże się bezpośrednio lub pośrednio ze specyficznymi, zachowanymi ewolucyjnie sekwencjami (*ang. glucocorticoid response elements, GREs*) zlokalizowanymi w regionach regulatorowych genów. Tak zwane dodatnie sekwencje GREs, po przyłączeniu się GR odpowiadają za zwiększenie transkrypcji danego genu, a tzw. ujemne GREs, odpowiadają za hamowanie transkrypcji (Farrell i O'Keane 2016). Regulacja za pośrednictwem GR jest procesem bardzo szybkim – zmiany w transkrypcji genów regulowanych bezpośrednio przez GR widoczne są już po kilku sekundach/ minutach od aktywacji receptora.



Ryc.1.1. A: Glukokortykoidy pełnią ważną funkcję w regulowaniu odpowiedzi organizmu na stres, m.in. poprzez wpływ na ekspresję wielu genów. Po wnikięciu do komórki wiążą się z GR, aktywując go poprzez odłączenie kompleksu inaktywującego (złożonego z białek szoku cieplnego: hsp90 i hsp70). Następnie aktywowany GR transportowany jest do jądra komórkowego, gdzie działa jako czynnik transkrypcyjny. Reguluje ekspresję wielu genów, zarówno dodatnio – zwiększając ich ekspresję, jak i ujemnie (Pels, 2019, zmienione). B: Autoregulacja genu *Nr3c1* poprzez tworzenie pętli chromatynowej (Ramamoorthy i Cidlowski 2013, zmienione).

Co ciekawe, sam gen *Nr3c1*, kodujący GR, ma ujemny GRE, co powoduje, że translokacja GR do jądra wywołuje zahamowanie ekspresji tegoż genu. W komórkach nieneuronalnych wykazano, że związanie GR z ujemnym GRE, umiejscowionym w eksonie 9 *Nr3c1*, prowadzi do rozległego zapętlenia genu, czego efektem jest przeniesienie ujemnego GRE w pobliże promotora. Rozpoczyna to proces tworzenia kompleksu hamującego, w skład którego wchodzi: GR związany z eksonem 6 oraz białka NcoR1 i HDAC3 zlokalizowane w miejscu startu transkrypcji genu kodującego GR. Zjawisko to prowadzi do zahamowania transkrypcji *Nr3c1* (Ryc.1.1 B) (Ramamoorthy i Cidlowski 2013). Jest to przykład mechanizmu epigenetycznego obejmującego zmianę architektury jądra komórkowego, którego dysfunkcja może mieć ogromny wpływ na powstawanie depresji.

Aktywacja GR ma istotny wpływ na regulację odpowiedzi organizmu na stres. Już w latach 40-tych XX wieku pojawiły się pierwsze doniesienia literaturowe wiążące zaburzenia nastroju z przyjmowaniem przez pacjentów syntetycznych glukokortykosteroidów (Borman i Schmallenberg, 1951). Ze względu na skalę zjawiska Amerykańskie Towarzystwo Psychiatryczne sklasyfikowało te zaburzenia jako zaburzenia nastroju wywołane lekami (*ang. substance-induced mood disorders*). Dlatego też w celu wywołania silnego stresu lub stresu przewlekłego/ depresji podaje się

zwierzętom DEX. Substancja ta jest syntetycznym glukokortykosteroidem, o działaniu podobnym do kortyzolu. Co istotne jednak, działa niemal 80 razy silniej i znacznie dłużej niż kortyzol, ponadto wykazuje niemal stuprocentową specyficzność względem GR. Choć DEX jest powszechnie stosowanym lekiem o działaniu przeciwzapalnym, przeciwalergicznym i immunosupresyjnym, stosowanym m.in. w celu obniżenia ciśnienia wewnątrzczaszkowego u pacjentów z guzem mózgu, udowodniono, iż wykazuje również działanie prodepresyjne. Już jednorazowa dawka wywoływała znaczące wydłużenie czasu bezruchu u myszy w teście wymuszonego pływania (*ang. forced swimming test, FST*) oraz niwelowała antydepresyjne działanie m.in. imipraminy, amitryptyliny i tianeptyny mierzone tym samym testem (Wróbel i wsp., 2013). Przewlekłe podawanie DEX (21 kolejnych dni) wywoływało zachowania depresyjne: wydłużenie czasu bezruchu i drastyczne zmniejszenie podejmowanych przez zwierzęta prób ucieczki (*ang. climbing time*) mierzonych testem FST, anhedonię mierzoną testem preferencji sacharyny, strach wyrażony poprzez preferencyjne przebywanie w ciemnym kompartmencie i zmniejszoną ogólną ruchliwość mierzone testem jasnego/ ciemnego pola (*ang. light/ dark box, L/D box*). U zwierząt traktowanych dochodziło także do licznych zmian molekularnych i morfologicznych w obrębie kory przedczołowej, hipokampa i prążkowie (Skupio i wsp., 2015). Dodatkowo przewlekłe podawanie DEX (5 dni) u dorosłych osobników, spowodowało globalną zmianę wzoru metylacji w komórkach rozrodczych, co więcej obserwowano zmiany ekspresji mRNA i zaburzenia metylacji w komórkach hipokampa u potomstwa (Petropoulos i wsp., 2014).

1.3.4. Czynniki epigenetyczne w patogenezie depresji

Epigenetyczna regulacja ekspresji genów polega na zmianach w strukturze chromatyny nie związanych z modyfikacjami sekwencji DNA. Wśród zmian epigenetycznych najlepiej poznane są modyfikacje kowalencyjne nukleotydów DNA (np. metylacja), histonów (jak metylacja, czy acetylacja) oraz działanie niekodujących cząsteczek RNA (Lolak i wsp., 2014). Wykazano, iż na skutek stresu dochodzi do metylacji w obrębie genów: *Nr3c1*, *BDNF*, (Roth i wsp., 2009) czy *FKBP5*, kodującego białko biorące udział w regulacji działania glukokortykoidów i osi HPA (Binder 2009). Metylacja genów zachodzi głównie w obszarach promotorowych i skutkuje hamowaniem ich transkrypcji.

Traumatyczne wydarzenia z dzieciństwa mogą odcisnąć swoje piętno na dorosłym życiu danej osoby właśnie przez powstawanie zmian epigenetycznych, a także stanowią czynnik ryzyka dla rozwoju depresji (Maniglio 2009). Wykazano m.in. zwiększone ryzyko depresji u kobiet, które jako dzieci były wykorzystywane seksualnie (Alt i wsp., 2010, Bale i wsp., 2010, Heim i wsp., 2010). U takich osób dochodzi do zmian neuroendokrynych (np. niewrażliwość na glukokortykoidy) i anatomicznych (zmniejszenie objętości hipokampa) (Heim i wsp., 2008, Hornung i Heim 2014).

Inny przykład stanowią dzieci pozbawione opieki rodziców i maltretowane. Ciężkie dzieciństwo skutkuje u nich zwiększoną aktywnością osi HPA, zmniejszoną ekspresją GR oraz silną metylacją w obrębie promotora 1f genu *Nr3c1*. Wymienione objawy są typowe dla depresji i niestety skutkują zwiększonym ryzykiem popełnienia samobójstwa w późniejszym wieku (Fergusson i wsp., 1996, Widom i wsp., 2007). Badania prowadzone na mózgach samobójców, którzy byli maltretowani w dzieciństwie, wykazały metylację i zmniejszoną ekspresję genu *Nr3c1* w obrębie hipokampa. Dla porównania, u przypadkowych ofiar wypadków, niemaltretowanych, takich zmian nie obserwowano (Mcgowan i wsp., 2009). Można zatem przypuszczać, iż obecność metylacji i zmniejszona ekspresja genu *Nr3c1* stanowią marker depresji oraz informują o predyspozycji danej osoby do popełnienia samobójstwa.

Także u gryzoni, które przez kilka miesięcy po urodzeniu były rozdzielone z matką wykazano fenotyp typowy dla depresji (Murgatroyd i wsp., 2009). Dochodziło u nich do zaburzeń funkcjonowania osi HPA (Archer i wsp., 2013), a także zwiększonej metylacji w obrębie promotora 17 genu *Nr3c1* (odpowiednik promotora 1f u ludzi). Co istotne, zmiany w metylacji utrzymywały się u nich przez całe życie (Smart i wsp., 2015).

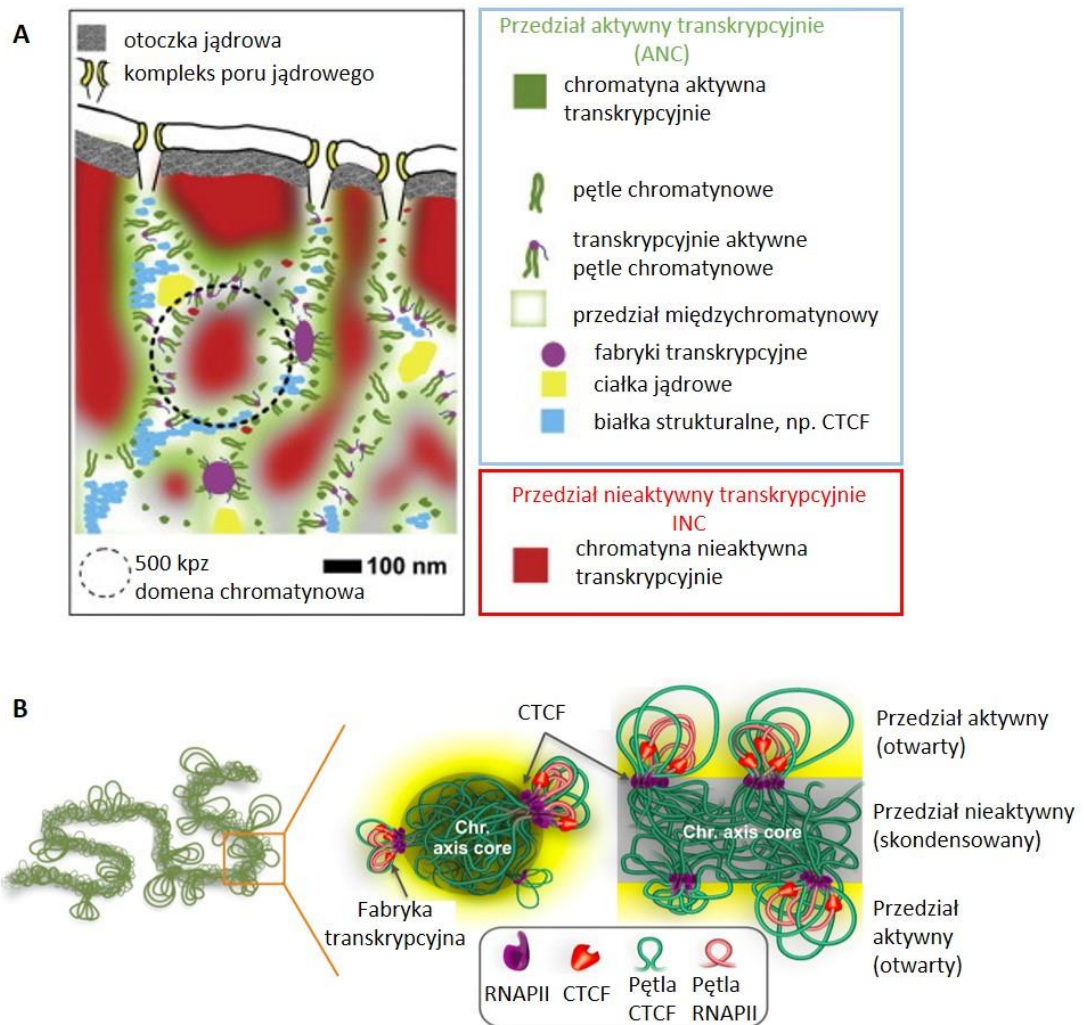
Innym, ważnym, choć wciąż mało poznanym, mechanizmem epigenetycznym są wielkoskalowe zmiany architektury jądra komórkowego. Do najważniejszych elementów struktury jądra należą terytoria chromosomowe, które są zdekondensowaną, lecz z zachowującą integralność, formą chromosomów mitotycznych. Mniejsze jednostki wchodzące w skład terytoriów chromosomowych to tzw. domeny topologiczne (*ang. Topologically Associating Domains, TADs*), obejmujące odcinki DNA o długości rzędu miliona par zasad. Wewnątrz domen topologicznych zachodzą liczne przestrzenne interakcje między odcinkami DNA, związane z wypętłaniem się nici chromatynowych. Prowadzi to do przemieszczania się sekwencji regulatorowych, np. wzmacniaczy, lub

sekwencji wyciszających w pobliże regulowanych przez nie genów, które często występują w znacznej odległości od siebie wzdłuż liniowej cząsteczki DNA (Wilczyński 2014, Tang i wsp., 2015). Prowadzone do tej pory badania, w kontekście zmian organizacji chromatyny wewnątrz jądra komórkowego, dotyczyły głównie komórek proliferujących i/lub ulegających różnicowaniu (Szczerbal i wsp., 2009). Niewiele natomiast jest danych dotyczących komórek terminalnie zróżnicowanych, w tym neuronów i komórek glejowych (Wilczyński 2014). Opublikowane dotychczas badania zawierają opis morfologiczny przemieszczania się genów na odległości rzędu setek nanometrów (Crepaldi i wsp., 2013, Walczak i wsp., 2013) i analizę molekularną tworzenia się pętli wpływających na ekspresję opisywanych genów (Rajarajan i wsp., 2016). Obecnie wiadomo również, iż wielkoskalowe zmiany struktury chromatyny, przez wpływ na ekspresję genów, mogą mieć duże znaczenie patogenetyczne w chorobach neurologicznych, np. w padaczce (Walczak i wsp., 2013), czy chorobach psychicznych, np. w schizofrenii (Rajarajan i wsp., 2018) i depresji.

1.4. Organizacja i metody badania genomu

Genom ludzki składa się z blisko 6.2 miliarda par zasad, upakowanych w 46 chromosomach (22 parach chromosomach autosomalnych i dwóch chromosomach płci). Genom myszy domowej z kolei jest większy niż człowieka - 6.6 miliarda par zasad upakowanych jest w 20 par chromosomów. Biorąc pod uwagę przeciętną długość jednej pary zasad (0,34nm) w interfazowym jądrze komórkowym, o średnicy ok. 10 μ m, znajduje się nić DNA o długości dwóch metrów. DNA wraz z białkami (histonami) tworzy kompleks zwany chromatyną. Ta z kolei, wykazuje specyficzną organizację, m.in. tworzy wspomniane już domeny topologiczne wchodzące w skład terytoriów chromosomowych. Wiadomo obecnie iż struktura i organizacja chromatyny wewnątrz jądra komórkowego ma znaczenie funkcjonalne, m.in. poprzez wpływ na transkrypcję. W 2015 roku, Christoph, Marion i Thomas Cremerowie przedstawili model podziału jądra na obszary aktywne (*ang. Active Nuclear Compartment, ANC*) i nieaktywne transkrypcyjnie (*ang. Inactive Nuclear Compartment, INC*). W obrębie ANC wyróżnili przestrzeń międzychromatynową (*ang. Interchromatin Compartment, IC*). Znajdująca się tam zdekondensowana chromatyna na swoich obrzeżach posiada aktywne transkrypcyjnie regiony perichromatynowe (*ang. Perichromatin Regions, PR*) (Ryc.1.2

A) (Cremer i wsp., 2015). W tym samym roku grupa Yijuna Ruana przedstawiła podobny model, w którym terytoria chromosomowe to obszary zbudowane z nieaktywnej chromatyny, z których DNA wypęła się do przedziału aktywnego (Ryc.1.2 B) (Tang i wsp., 2015)



Ryc.1.2 Organizacja chromatyny w interfazowym jądrze komórkowym, wg modelu opartego na badaniach morfologicznych (A) (Cremer i wsp, 2015, zmienione) i biochemicznych (B) (Tang i wsp., 2015, zmienione).

Podsumowując, badania genomu mają istotne znaczenie dla lepszego poznania patogenezы zaburzeń lękowych i depresji. Do najbardziej rozpowszechnionych metod wykorzystywanych w badaniach nad genomem należą metody morfologiczne, polegające na hybrydyzacji oraz barwieniach immunocytochemicznych połączonych

z obrazowaniem mikroskopowym, a także metody biochemiczne. Poniżej przedstawiono krótką charakterystykę tych metod.

1.4.1. Metody morfologiczne połączone z obrazowaniem mikroskopowym

Spośród metod morfologicznych, powszechnie stosowaną jest fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (*ang. fluorescence in situ hybridization*, FISH) (Cremer i wsp., 2008). Ta opracowana w latach 60-tych XX wieku metoda pozwala na znakowanie zarówno niewielkich fragmentów DNA lub RNA, jak również całych chromosomów (Cremer i Cremer, 2001).

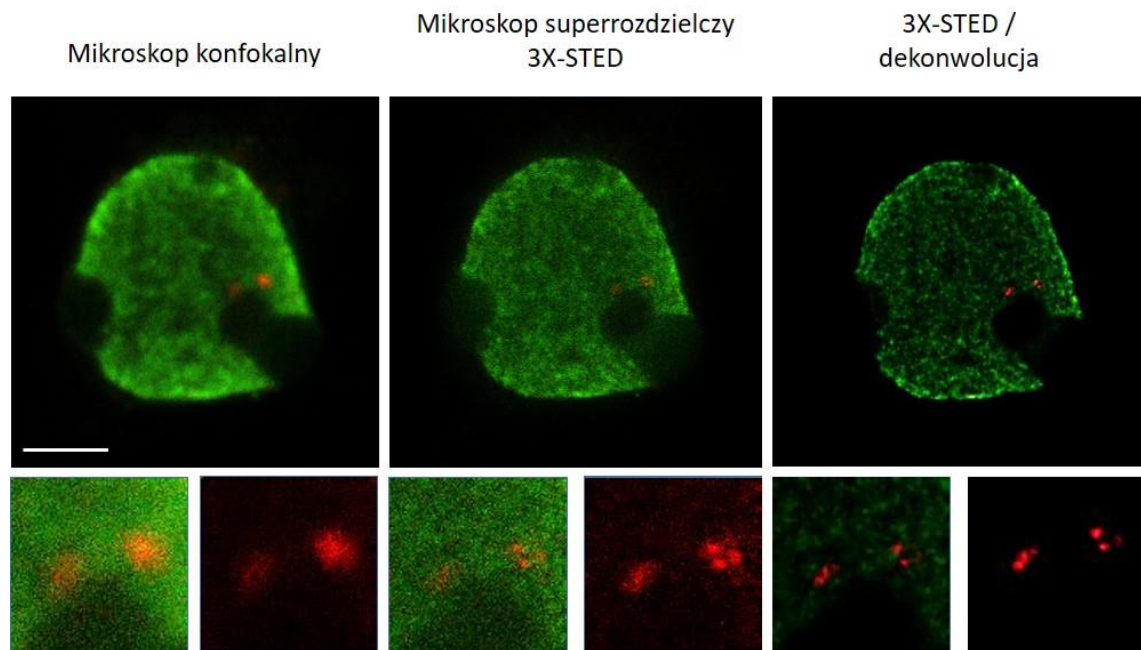
Podstawową zasadą techniki FISH jest zastosowanie znakowanej, np. fluorescencyjnie, sondy komplementarnej do konkretnego fragmentu genomu. Możliwość wykorzystania sond znakowanych różnymi fluoroforami oraz dodatkowe połączenie hybrydyzacji FISH z barwieniami immunocytochemicznymi pozwala na określenie, z dużą dokładnością, położenia nawet trzech różnych fragmentów DNA względem określonego białka/ białek. Technika ta, podobnie jak metody biochemiczne, umożliwia realistyczną wizualizację struktury i organizacji genomu poprzez obrazowanie pojedynczych interakcji wewnątrz jądra komórkowego, ale co ważne uzyskiwane informacje nie są wartościami uśrednionymi, lecz pochodzą z konkretnej komórki.

Hybrydyzacja FISH łączona jest zazwyczaj z obrazowaniem przy użyciu mikroskopii konfokalnej, pozwalającej na seryjne skanowanie obiektów lub struktur znakowanych fluorescencyjnie. Skanowanie odbywa się metodą „punkt po punkcie”, co oznacza, że wiązka lasera jest ogniskowana na konkretnym punkcie płaszczyzny ogniskowej, a następnie przesuwana. Uzyskiwany obraz pochodzi jedynie z płaszczyzny ogniskowej, ponieważ tylko te promienie po przejściu przez obiektyw, przecinają się w miejscu, gdzie umieszczona została specjalna przesłona konfokalna z niewielkim otworem, przez który promienie docierają do detektora. Umożliwia to uzyskanie ostrych trójwymiarowych obrazów, o stosunkowo dużej rozdzielczości: ok. 250nm w osiach x-y i 550nm w osi z (Ryc.1.3 mikroskop konfokalny).

Rozwój technik mikroskopii umożliwił znaczną poprawę rozdzielczości. Mikroskopia wymuszonego wygaszania emisji (*ang. Stimulated Emission Depletion*, STED) należąca do technik superrozdzielczych została opracowana przez nagrodzonego

nagrodą Nobla, Stefana Hella (Hell, 2015). Metoda ta pozwala na uzyskanie rozdzielczości: 20-70nm w osiach x-y i 40-150nm w osi z. Jest to możliwe dzięki zastosowaniu dwóch koncentrycznych wiązek laserów: wiązki wzbudzającej i wiązki wygaszającej w kształcie pierścienia. Manewrując grubością pierścienia wiązki, wygasza się fluorescencję wokół punktu/ fluoroforu, który uległ wzbudzeniu, co bezpośrednio przekłada się na zmniejszenie rozmiaru plamki Airy’ego i poprawę rozdzielczości. Mikroskopia STED pozwala obecnie na skanowanie do trzech fluoroforów ze zwiększoną rozdzielczością, niemniej jednak muszą być one kompatybilne z tym rodzajem mikroskopii.

Na rycinie poniżej (Ryc.1.3) przedstawiono porównanie rozdzielczości tego samego obrazu skanowanego przy użyciu mikroskopu konfokalnego i superrozdzielczego 3X-STED. Dodatkową poprawę rozdzielczości można uzyskać poprzez dodatkowe zabiegi, m.in. dekonwolucję przy użyciu narzędzia Huygens.



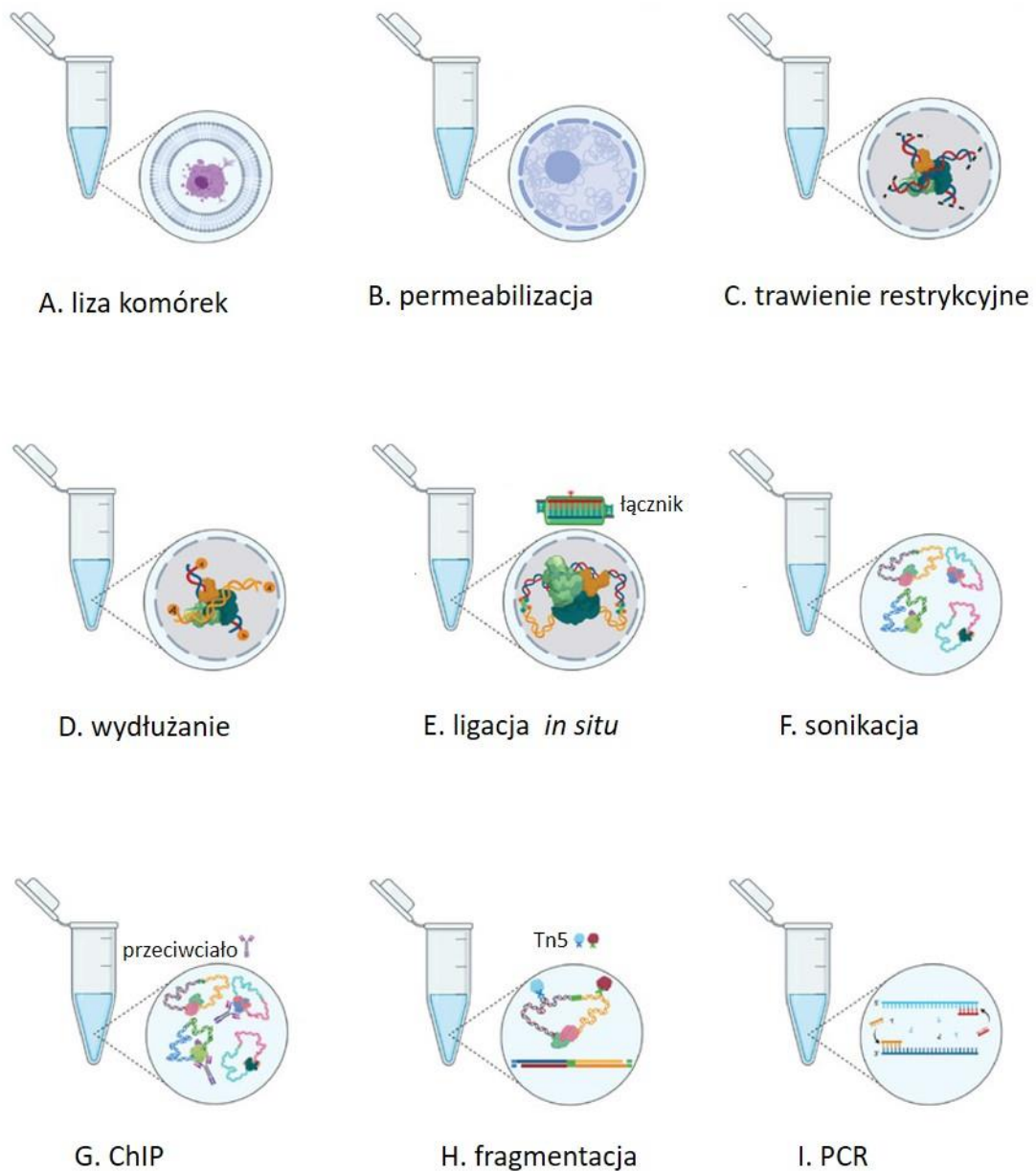
Ryc.1.3 Porównanie rozdzielczości tego samego obrazu uzyskanej przy użyciu mikroskopu konfokalnego, superrozdzielczego 3X-STED oraz dodatkowej dekolwolucji w programie Huygens. Na zielono wybarwiona chromatyka aktywna, na czerwono – allele genu *Nr3c1* (zdjęcia wykonane przez autorkę pracy).

1.4.2. Metody biochemiczne

W ostatnich dwudziestu latach nastąpił gwałtowny rozwój biochemicznych metod badania genomu, rozpoczynając od roku 2002, kiedy opublikowano pracę na temat metody 3C (*ang. Chromosome Conformation Capture*) (Dekker i wsp., 2002). Metoda ta pozwala na określenie interakcji pomiędzy dwoma dowolnymi fragmentami genomu. Dzięki niej wykazano, iż sekwencje regulatorowe, poprzez tworzenie pętli chromatynowych, są zdolne do regulowania transkrypcji genów oddalonych od nich o setki tysięcy par zasad w liniowej cząsteczce DNA (Tolhuis i wsp., 2002; Drissen i wsp., 2004; Vakoc i wsp., 2005), a także, iż wspomniane pętle podlegają zmianom w trakcie rozwoju i różnicowania komórek (Palstra i wsp., 2003). Dalszy rozwój metod badania genomu wiązał się z możliwością jednoczesnej analizy większej liczby oddziaływań. Metody: Hi-C (*ang. High-throughput Chromosome Conformation Capture*) (Lieberman-Aiden i wsp., 2009) i ChIA-PET (*ang. Chromatin Interaction Analysis by Paired-End Tag sequencing*) (Fullwood i wsp., 2009) pozwoliły na jednoczesną analizę wszystkich oddziaływań pomiędzy fragmentami DNA, jakie zachodzą wewnątrz jądra komórkowego. Metodologia obu technik jest bardzo zbliżona, jednak ze względu na uzyskiwane wyniki, ich zastosowanie jest nieco inne. Hi-C pozwala na wykrycie wszystkich interakcji, jakie występują w jądrze komórkowym. Dzięki temu określono strukturalną organizację genomu, m.in. poprzez zidentyfikowanie chromatynowych domen topologicznych (Dixon i wsp., 2012). ChIA-PET, z kolei umożliwia uzyskanie informacji nie tylko strukturalnych, ale także funkcjonalnych, o znacznie większej rozdzielczości, rzędu ok. 100pb. Wynika to z uwzględnienia, w trakcie przygotowania biblioteki dodatkowego etapu immunoprecypitacji chromatyny związanej z konkretnym białkiem, najczęściej CTCF (*ang. CCCTC-binding factor*) lub polimerazą RNA II (*ang. RNA polymerase II, RNA Pol II*). CTCF, wysoce konserwatywne wśród eukariontów białko, poprzez udział w stabilizacji pętli chromatynowych, pełni kluczową rolę w wyznaczeniu granic domen topologicznych oraz w aktywacji bądź inhibicji transkrypcji. Nie bez znaczenia jest tutaj orientacja motywu wiążącego CTCF, który determinuje zarówno kierunek, jak i topologię powstających pętli. RNA Pol II jest ściśle związana z ekspresją genów, dlatego tworzone przez nią pętle charakteryzują obszary aktywne transkrypcyjne, w danym typie komórek, w danym czasie.

Obecnie istnieją liczne modyfikacje powyższych technik pozwalające m.in. na ograniczenie wyjściowej liczby komórek - single cell Hi-C (Fraser i wsp., 2013), ChIA-

Drop (Zheng i wsp., 2019) i *in situ* ChIA-PET (Wang i wsp., 2020). Ostatnia z wymienionych technik obejmuje szereg etapów (Ryc.1.4).



Ryc.1.4. Kolejne etapy przygotowania biblioteki metodą *in situ* ChIA-PET (Wang i wsp., 2020; zmienione). Biblioteki, po przygotowaniu podlegają selekcji rozmiaru, a dokładnie długości cząsteczek DNA tworzących bibliotekę. Końcowym etapem jest sekwencjonowanie i analiza bioinformatyczna.

Najpierw komórki traktowane są formaldehydem, który utrzuca naturalnie występujące w jądrze komórkowym, połączenia pomiędzy DNA i białkami. Następnie komórki są lizowane (Ryc.1.4. A) i permeabilizowane (Ryc.1.4. B), aby umożliwić lepszą

penetrację jądra komórkowego przez enzym restrykcyjny (Alu I), w kolejnym etapie (Ryc.1.4 C). Uzyskane fragmenty DNA wydłużane są o adeninę na końcu 3' (Ryc.1.4 D), dzięki czemu możliwa jest ligacja sąsiadujących fragmentów ze specjalnie zaprojektowanym oligonukleotydowym łącznikiem (Ryc.1.4 E). Podczas sonikacji DNA jest fragmentowane (Ryc.1.4. F). W trakcie immunoprecypitacji chromatyny (*ang. Chromatin Immunoprecipitation, CHIP*), wzbogaca się analizowaną pulę o DNA związane z interesującym nas białkiem (Ryc.1.4 G). Enzym używany do fragmentacji enzymatycznej (*ang. tagmentation*) tnie DNA na mniejsze fragmenty (Ryc.1.4 H), które następnie namnażane są w reakcji PCR, z zastosowaniem starterów zawierających znaczniki (Ryc.1.4 I) pozwalające rozróżnić DNA pochodzące z poszczególnych bibliotek wśród wyników sekwencjonowania. W końcowym etapie uzyskane wyniki sekwencjonowania poddawane są analizie, poprzez porównanie ich z genomem referencyjnym, dzięki czemu pozwalają one na identyfikację regionów chromatyny, które pozostają ze sobą w fizycznym kontakcie w trójwymiarowej przestrzeni jądra komórkowego, nawet jeśli w sekwencji liniowej są umieszczone w dużej odległości od siebie.

Metody morfologiczne i mikroskopowe pozwalają nie tylko na określenie lokalizacji badanego regionu w pojedynczej komórce, ale także na ocenę odległości pomiędzy dwoma fragmentami DNA. W przypadku metod biochemicznych, natomiast, uzyskiwana informacja dotyczy częstości występowania danej interakcji. Zatem, jedynie połączenie, tych komplementarnych w stosunku do siebie metod pozwala na lepsze zrozumienie organizacji chromatyny w jądrze komórkowym.

Podsumowując, rozwój depresji jest ściśle powiązany ze stresem i zaburzeniami osi HPA. Te ostatnie wywoływane są poprzez nadmierne wydzielanie glukokortykoidów i aktywację GR, który z kolei działa jako czynnik transkrypcyjny. Wiedząc, iż zmiany w ekspresji genów są nierozłącznie związane ze zmianami w organizacji chromatyny w jądrze komórkowym, w niniejszej dysertacji przedstawiono szereg wyników obrazujących zmiany morfologiczne i biochemiczne dotyczące GR, a zachodzące w neuronach i astrocytach struktur mózgu związanych z depresją pod wpływem jednorazowego i przewlekłego działania czynnika stresowego.

2. Cele pracy

Celem badań opisanych w niniejszej dysertacji było:

1. Określenie zmian ekspresji genu *Nr3c1*, kodującego GR, w neuronach i astrocytach trzech struktur mózgu (kory przedczołowej, hipokampa i jądra półleżącego), w mysich modelach stresu i depresji.
2. Określenie zmian epigenetycznych wyższego rzędu dotyczących genu *Nr3c1* techniką trójwymiarowej fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (3D-FISH) połączonej z obrazowaniem za pomocą mikroskopii konfokalnej i superrodzielczej STED, w neuronach i astrocytach trzech struktur mózgu (kory przedczołowej, hipokampa i jądra półleżącego), w mysich modelach stresu i depresji (farmakologiczny model silnego stresu, farmakologiczny model depresji, model depresji indukowany chronicznym stresem).
3. Zidentyfikowanie oraz analiza funkcjonalna genów zmienionych pod wpływem silnego stresu w neuronach i astrocytach kory przedczołowej metodą sekwencjonowania RNA.
4. Określenie globalnych zmian w organizacji chromatyny w neuronach i astrocytach kory przedczołowej zachodzących w efekcie silnego stresu metodą ChIA-PET.

3. Materiały i metody

Doświadczenia przedstawione w niniejszej pracy zostały przeprowadzone na (i) materiale pobranym (hodowle pierwotne) lub (ii) osobnikach myszy (*lac. Mus musculus*) szczepu C57BL/6J.

3.1. Pierwotne hodowle komórkowe

3.1.1 Zakładanie i warunki prowadzenia hodowli

W badaniach z użyciem mikroskopii superrozdzielczej 3X-STED, wstępnej analizie ekspresji genu GR oraz doświadczeniach RNA-seq i ChIA-PET wykorzystano pierwotne hodowle komórkowe kory mózgowej: neuronalne i astrocytarne. Komórki pobierano z obszaru kory czołowej embrionów (E16, *ang. embryonic day 16*) myszy szczepu C57BL/6J. W tym celu ciężarną samicę uśmiercano w sposób humanitarny, poprzez przerwanie rdzenia kręgowego. Następnie rozcinano powłoki brzuszne i wydobywano embriony, które z kolei, po schłodzeniu ciała, uśmiercane były przez dekapitację. Kolejno preparowano mózgi zwierząt i umieszczano je w schłodzonym buforze HBSS, na szalce Petriego. Wyizolowane fragmenty kory czołowej zawierające korę przedczołową umieszczano w probówce i płukano 3-krotnie 10ml buforu HBSS. Następnie tkankę inkubowano w roztworze trypsyny (Gibco; 15µl trypsyny/ 1 fragment kory) przez 20-25min, od czasu do czasu delikatnie mieszając. Wstępnie strawiona tkanka była płukana 3-krotnie 10ml buforu HBSS. Następnie komórki, w objętości 10ml buforu HBSS, były dysocjowane poprzez 30-krotne pipetowanie pipetą o objętości 1ml, liczone w komorze Bürkera i wysiewane na szalki hodowlane w ilości 1ml komórek/ 1 naczynie hodowlane (hodowle neuronalne) lub, w przypadku hodowli astrocytarnych: komórki bez liczenia zawieszano w buforze HBSS w objętości 1ml/ 2 fragmenty kory, a następnie 1 ml zawiesiny komórek umieszczano w butelce hodowlanej zawierającej 10ml podłoża hodowlanego. Do doświadczeń wymagających barwienia komórek (FISH połączony z immunocytochemią) komórki wysiewano na szkiełka umieszczone na 24-dołkowych szalkach hodowlanych, w ilości około 75 000 komórek/ szkiełko. Opis prowadzenia hodowli umieszczono poniżej. Po upływie 2 tygodni, od dnia założenia, do części hodowli neuronalnych i astrocytarnych dodawano roztwór deksametazonu (Sigma, końcowe stężenie DEX w podłożu hodowlanym 100nM). Komórki inkubowano z DEX przez 4 godziny, a następnie 2-krotnie płukano buforem DPBS.

Pierwotne hodowle neuronalne. Komórki hodowano w podłożu hodowlanym Neurobasal (Gibco) z dodatkiem glutaminy (Sigma, końcowe stężenie w podłożu hodowlanym 0.5mM), kwasu glutaminowego (Sigma, końcowe stężenie 12,5 μ M), B27 (Gibco, końcowe stężenie 1x) i antybiotyków: penicyliny i streptomycyny (Sigma, końcowe stężenie 1%). 2 godziny po wysianiu komórek, podłoże hodowlane zmieniano na świeże. Komórki hodowano w inkubatorze, w warunkach: 5% CO₂, 37°C, przez 2 tygodnie. W tym czasie nie zmieniano podłoża hodowlanego.

Pierwotne hodowle astrocytarne. Komórki hodowano w podłożu hodowlanym DMEM (*ang. Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; Sigma) z dodatkiem płodowej surowicy bydlęcej (Gibco, końcowe stężenie w pożywce 10%) i antybiotyków: penicyliny i streptomycyny (Sigma, końcowe stężenie 1%).

Komórki wysiewano do butelek hodowlanych, uprzednio opłaszczonych polilizyną (PLL, Sigma). Pokrywanie dna butelek PLL wykonywano dzień przed założeniem hodowli. Polegało ono na inkubacji z roztworem PLL (1 μ g/ ml wody MiliQ) przez noc, a następnie 1-krotnym płukaniu butelek sterylną wodą MiliQ i buforem PBS. Trzeciego dnia po założeniu hodowli, komórki płukano 3-krotnie 10ml buforu PBS, a następnie dodawano 10ml świeżo przygotowanego podłoża hodowlanego. W siódmym dniu hodowli, w celu pozbycia się osadu martwych komórek, astrocyty przenoszono do nowych butelek hodowlanych, pokrytych uprzednio PLL. W tym celu komórki trypsynizowano (trypsyna, Gibco) i wirowano z prędkością 1000rpm, przez 10min, w temperaturze pokojowej. Osady komórek zawieszano w 5ml świeżego podłoża hodowlanego i przekładano do nowych butelek hodowlanych zawierających 5ml pożywki. W 10 dniu hodowli sprawdzano stopień pokrycia dna butelek hodowlanych przez komórki. Jeśli nie wynosił on min 80%, komórki pozostawiano w hodowli na kolejne 2 dni, po czym ponownie sprawdzano stan konfluencji. Jeśli stan pokrycia był wystarczający, ponownie usuwano martwe komórki, tym razem poprzez wytrząsanie. W tym celu wymieniano połowę podłoża hodowlanego na świeże (5ml / butelkę), następnie butelki wytrząsano z prędkością 100rpm, w temperaturze 37°C, przez noc. Następnego dnia zmieniano całość pożywki na świeżą. Komórki hodowano w inkubatorze, w warunkach: 5% CO₂, 37°C.

3.1.2 Przygotowanie komórek do hybrydyzacji

Do hybrydyzacji wykorzystano hodowle neuronalne i astrocytarne prowadzone na szkiełkach nakrywkowych umieszczonych na szalce hodowlanej. Po 2-tygodniowej hodowli, część komórek inkubowano z DEX (Sigma) przez 4 godziny. Przed utwaleniem komórki płukano 2-krotnie sterylnym, ciepłym (37°C) buforem PBS (1x). Komórki utrwalano roztworem 4% PFA/ 4% sacharozy, dodawanym w ilości ok. 300µl na dołek i inkubowano przez 10 min, a następnie płukano 3-krotnie 500µl buforu PBS (1x). Po ostatnim płukaniu szkiełka pozostawiano w 500µl buforu PBS (1x). Tak przygotowane komórki wykorzystywano do dalszych doświadczeń, W przypadku, gdy komórki przechowywane były dłużej niż siedem dni, aby zapobiec rozwojowi mikroorganizmów, do buforu PBS dodawano 0,05% azydek sodu.

3.1.3 Przygotowanie komórek do analiz ekspresji genów

Do doświadczeń mających na celu zbadanie zmian w ekspresji genów z zastosowaniem metod Real Time PCR i RNAseq wykorzystano pierwotne hodowle neuronalne i astrocytarne. Komórki traktowano DEX (Sigma) w stężeniu 100nM (jest to stężenie końcowe w podłożu hodowlanym). W zależności od eksperymentu komórki inkubowano z DEX przez różny okres. W przypadku sprawdzania zmian ekspresji genu *Nr3c1* w czasie, komórki (zarówno astrocyty, jak i neurony) inkubowano z DEX przez 15min., 30min., 2godz., 4godz., 8godz. i 48godz. W pozostałych eksperymentach czas inkubacji wynosił 4 godziny. Po zakończonej inkubacji usuwano podłoże z DEX i dodawano bufor RLT (Qiagen). Komórki przechowywano w temperaturze -80°C do czasu eksperymentu.

3.1.4 Przygotowanie komórek do analiz oddziaływań międzychromatynowych

Analizę oddziaływań międzychromatynowych wykonano z zastosowaniem metody ChIA-PET. Komórki, po 4 godzinach inkubacji z DEX (Sigma) płukano 2-ktornie 4ml buforu DPBS (Gibco). Następnie do komórek dodawano 36% roztwór formaldehydu (Sigma, końcowe stężenie 1%) w buforze DPBS. Naczynia hodowlane wytrząsano 20min, na wytrząsarce orbitalnej, z prędkością 90rpm, pod wyciągiem,

w temperaturze pokojowej. Następnie zatrzymywano działanie formaldehydu przez dodanie glicyny (Sigma, końcowe stężenie 0,2M) i wytrząsano przez 10 min, w tych samych warunkach. Następnie usuwano mieszaninę sieciującą z nad komórek i płukano je 2-krotnie 4ml buforu DPBS. Po dodaniu 4ml buforu DPBS komórki przechowywano w 4°C przez noc. Następnego dnia usuwano bufor z nad komórek i dodawano 670µl schłodzonego buforu DPBS. Komórki zdrapywano z naczynia hodowlanego i umieszczano na lodzie w 50ml probówce typu falcon. Zdrapywanie komórek powtarzano 2-krotnie. Zebrane komórki wirowano z prędkością 2000rpm, przez 10 min, w temperaturze 4°C. Osad komórek przechowywano w temperaturze minus 80°C.

3.2. Mysie modele stresu i depresji

Myszy (wykorzystane w modelu silnego stresu i modelu depresji indukowanej farmakologicznie) pochodziły z hodowli Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego, PAN w Warszawie.

Do doświadczeń wykorzystywano 9-10 tygodniowe samce myszy szczepu C57BL/6J. Zwierzęta trzymano po 4-5 osobników w klatce, w fotoperiodzie: 12 godzin światła (włączane o godz. 24), w pokoju zwierzętarni Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, z kontrolowaną temperaturą i wilgotnością. Myszy miały swobodny dostęp do jedzenia i wody. Części zwierząt (grupy traktowane, model silnego stresu, model depresji indukowanej farmakologicznie) podawano dootrzewnowe zastrzyki z Dexavenu (Bausch Health, roztwór do wstrzykiwań, zawierający DEX w stężeniu 4mg/ml), w dawce równej 4mg/kg masy ciała (Skupio i wsp., 2015). Doświadczenia były prowadzone wg. wytycznych Komisji Etycznej nr 1 w Warszawie: nr zgody 300/2017 – model silnego stresu i model depresji indukowanej farmakologicznie oraz nr zgody 132/2016 - model depresji indukowanej behawioralnie.

3.2.1 Model silnego stresu

Wszystkie, dwadzieścia dziewięć zwierząt przed rozpoczęciem eksperymentu podlegało habituacji przez 7 dni. Silny stres wywoływano u 14 osobników, poprzez pojedyncze podanie zastrzyku z Deksavenu (Bausch Health), w dawce 4mg/ kg masy ciała. Zwierzęta kontrolne (15 osobników) otrzymywały zastrzyk z soli fizjologicznej.

Następnie 4 godziny po podaniu zastrzyku myszy były uśmiercane w sposób humanitarny, zależnie od typu dalszych badań: (i) analiza ekspresji genu, po 10 osobników kontrolnych i traktowanych DEX lub (ii) analizy morfologiczne (pozostałe zwierzęta). Dokładny protokół uśmiercania zwierząt podano w punkcie 3.2.4.

3.2.2 Model depresji indukowanej farmakologicznie

Przewlekły stres/ depresję indukowano poprzez podawanie myszom dootrzewnowych zastrzyków z Dexavenu (Bausch Health), przez kolejne 21 dni (Skupio i wsp., 2015). Zastrzyki podawano w fazie jasnej, ok. 1godz. po włączeniu światła. Dawka leku (4mg/kg masy ciała), dostosowana była do wagi zwierzęcia, sprawdzanej każdego dnia trwania eksperymentu. W przypadku, gdy waga zwierzęcia wynosiła mniej niż 20g, w danym dniu zastrzyku nie podawano. Kontrolę stanowiły myszy nastrzykiwane roztworem soli fizjologicznej. Przed rozpoczęciem eksperymentu wszystkie myszy podlegały habituacji (7 dni). Plan eksperymentu zamieszczono na rycinie poniżej, Występowanie objawów depresji oznaczano za pomocą testów behawioralnych oraz na podstawie poziomu kortykosteronu we krwi zwierząt.



Ryc.3.1 Graficzne przedstawienie eksperymentu farmakologicznego indukowania depresji u myszy.

Analiza behawioralna i oznaczanie poziomu kortykosteronu we krwi

Na czas trwającego 24 godz. testu preferencji sacharyny myszy rozdzielano pojedynczo do klatek, ze swobodnym dostępem do picia z 2 butelek (w jednej znajdował się 1% roztwór sacharyny (Sigma-Aldrich), a w drugiej woda). Po 12 godz. butelki zamieniano miejscami, aby wyeliminować błąd wynikający z preferencji strony. Na

zakończenie sprawdzano poziom wypitego płynu i wyznaczano preferencję sacharyny u każdej z badanych myszy. Test ten wykonywany jest standardowo w badaniach nad depresją, w celu wykrycia anhedonii, czyli niezdolności do odczuwania przyjemności.

Test jasnego/ ciemnego pola (L/D box) mierzy poziom lęku zwierząt, wykorzystując naturalną dla myszy awersję do przebywania w otwartych, jasno oświetlonych przestrzeniach. Test przeprowadzany był w fazie jasnej cyklu dobowego. Myszy habituowano do nowego otoczenia przez 2 godziny przed testem. Test wykonywano w prostokątnym pojemniku przedzielonym przegrodą na 2 przedziały: jasny (natężenie światła 200 lx) oraz ciemny (ok. 3 lx). W przegrodzie oddzielającej przedziały znajdował się otwór, przez który mysz mogła swobodnie przechodzić z jednej części do drugiej. Mysz na początku trwającego 10 minut testu umieszczano w ciemnej części, następnie jej aktywność nagrywano przez kamerę na podczerwień. Mierzono czas przebywania zwierzęcia w każdym z przedziałów oraz ilość przejść pomiędzy nimi.

Test wymuszonego pływania (FST) przeprowadzano w fazie jasnej. W czasie testu mysz umieszczano w cylindrycznym przezroczystym pojemniku wypełnionym do 2/3 objętości wodą o temperaturze 24-28°C. Podczas trwającego 6 minut testu, ruchy myszy rejestrowano za pomocą kamery. Długość czasu bezruchu w wodzie stanowi parametr rezygnacji z prób wydostania się z niebezpieczeństwa, będący komponentem depresji.

Krew do **oznaczania poziomu kortykosteronu** pobierano z ogona, w czasie unieruchomienia zwierzęcia, przed i po zakończeniu iniekcji Dexavenem (Bausch Health). Kortykosteron oznaczano w osoczu, za pomocą testu ELISA (Enzo Life Sciences), wg protokołu producenta.

Cztery godziny po podaniu ostatniego z zastrzyków zwierzęta uśmiercano humanitarnie, w sposób analogiczny, jak w przypadku myszy, u których wywoływano silny stres (p.3.2.1). Również tutaj zwierzęta dzielono na dwie grupy: (i) takie, których wypreparowane struktury mózgu poddawano oznaczeniom z zakresu biologii molekularnej, jak również (ii) te poddawane analizie morfologicznej.

Całość doświadczenia powtórzono 2-krotnie. W pierwszym powtórzeniu, zastrzyki z Dexavenem (Bausch Health) podawano 10 osobnikom, kontrolę stanowiło 6 zwierząt. Drugie powtórzenie eksperymentu przeprowadzono na 38 zwierzętach – po 19 zwierząt traktowanych i kontrolnych, którym podawano zastrzyki z soli fizjologicznej.

3.2.3 Model depresji wywołany chronicznym stresem

Zachowania depresyjne u myszy, wywoływano za pomocą modelu chronicznego, nieprzewidywalnego stresu (*ang. chronic unpredictable stress*) (Krzystyniak i wsp., 2019). Na dwa tygodnie przed rozpoczęciem doświadczeń zwierzęta podlegały habituacji. Następnie były ważone, oceniano ich zachowania społeczne oraz wyjściowy poziom preferencji sacharozy. Pobierano także krew do pomiaru stężenia kortykosteronu. Właściwy protokół składał się z trzech etapów: unieruchomienia (*ang. restraint stress*) przez 2 godziny, podwieszania za ogon (*ang. tail suspension stress*) przez 40 minut i przebywania w jednej klatce z agresywnym osobnikiem (*ang. social defeat stress*) przez 30 minut. Każdy z nich odbywał się w fazie ciemnej, przy świetle czerwonym. Minimalny czas pomiędzy kolejnymi stresorami wynosił 4 godziny. Dodatkowo, w takcie trwania fazy jasnej, myszy umieszczano w wentylowanym pojemniku znajdującym się w klatce, w której znajdował się szczur. Zachowania depresyjne zwierząt oceniane były za pomocą testów behawioralnych (test preferencji sacharozy, test FST).

Doświadczenia opisane w niniejszym punkcie (3.2.3) mające na celu wywołanie u myszy zachowań depresyjnych zostały wykonane przez Zespół prof. Jakuba Włodarczyka, w Pracowni Biofizyki Komórki Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN w Warszawie.

Zwierzęta, zarówno te, u których potwierdzono występowanie zachowań depresyjnych (poprzez testy behawioralne), jak i zwierzęta kontrolne uśmiercono w sposób humanitarny i poddano perfuzji, z przeznaczeniem na badania morfologiczne.

3.2.4 Uśmiercanie zwierząt i przygotowywanie materiału tkankowego

Po zakończeniu eksperymentów mających na celu wywołanie silnego stresu / depresji, zwierzęta były uśmiercane w sposób humanitarny, w sposób zależny od typu dalszych badań: (i) analiza ekspresji genu lub (ii) analizy morfologiczne.

W przypadku (i) zwierzęta usypiano wziewnie anestetykiem Aerrane (Baxter Polska) zawierającym izofluran, a następnie uśmiercano przez przerwanie ciągłości rdzenia kręgowego. Kolejno, z wypreparowanego mózgu pobierano fragmenty

odpowiadające strukturom: korze przedczołowej i jądra półleżącego. Z mózgow wycinano dwa „plasterki” o grubości ok. 1mm, przecinając organ w płaszczyźnie koronalnej, wzdłuż bregmy 2.96 i 1.70 – fragment zawierający korę przedczołową oraz bregmy 1.70 i 0,74 – fragment zawierający jądro półleżące. Następnie odpowiednie struktury wycinano za pomocą specjalnego przyrządu, o kształcie pustej w środku rurki, o średnicy wewnętrznej 1.2mm (dla kory przedczołowej) i 1.5mm (dla jądra półleżącego). Preparowano także hipokampy. Tkanki po pobraniu umieszczano w probówkach 1.5ml typu Eppendorf zawierających schłodzony odczynnik RNAlater (ThermoFisher Scientific) i przechowywano przez noc w temperaturze 4°C. Następnego dnia usuwano odczynnik, a tkankę mrożono w temperaturze -80°C, gdzie przechowywana była do czasu eksperymentu.

Drugą grupę zwierząt (ii), przeznaczoną na badania morfologiczne poddawano perfuzji. Zwierzęta usypiano przez dootrzewnowe podanie Morbitalu (Biowet Puławy) w dawce ok. 1,5ml/kg masy ciała. Po zaniku odruchów: rogówkowego i cofania kończyn, przeprowadzano perfuzję transkardialną, przez lewą komorę serca, najpierw buforem PBS z dodatkiem heparyny (10U/ml), a następnie 4% roztworem PFA w PBS. Wypreparowany mózg utrwalało dodatkowo przez ok. 12 godz. w buforze do perfuzji (4% PFA w PBS), płukano 3-krotnie buforem PBS i wysycano 30% roztworem sacharozy w PBS, aż do momentu opadnięcia mózgu na dno naczynka. Utrwalony mózg zamrażano w schłodzonym do -80°C heptanie i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu krojenia. Mózg cięto w płaszczyźnie koronalnej na skrawki o grubości 40µm, które przechowywano w temperaturze -20°C, w niezamarzającym buforze (*ang. anti-freeze*).

3.3. Analiza zmian ekspresji genu *Nr3c1*

Analizę ekspresji genu *Nr3c1* przeprowadzono na korowych, astrocytarnych i neuronalnych hodowlach pierwotnych oraz na wypreparowanych strukturach mózgu zwierząt (korze przedczołowej, hipokampie i jądrze półleżącym).

W przypadku hodowli komórkowych, po rozmrożeniu na lodzie, komórki odklejano od dna płytki hodowlanej przez silne przepłukanie buforem z nad komórek. Następnie z zebranych komórek izolowano RNA.

W przypadku wyizolowanych struktur mózgu, tkankę rozmrażano na lodzie. Ze względu na niewielką ilość materiału, łączono tkankę pochodzącą od 4 – 6 osobników. Następnie rozcierano ją w homogenizatorze, w buforze RLT (Qiagen).

W obu przypadkach izolację RNA przeprowadzano za pomocą zestawu RNeasy Mini Kit (Qiagen), według protokołu producenta, z dodatkowym etapem trawienia DNazą I. Po izolacji mierzono stężenie otrzymanego RNA, a jego jakość oceniano na podstawie obrazu prążków na żelu agarozowych, po rozdziale elektroforetycznym. Wyizolowane RNA „przepisywano” na cDNA w reakcji odwrotnej transkrypcji przy użyciu zestawu firmy Invitrogen. Reakcję wykonano według następującego protokołu:

1. Przygotowanie mieszaniny I: 0,5µl oligo(dT), 0,5µl losowych starterów 6-cio nukleotydowych, 1µl dNTP (ThermoFisher Scientific, 10mM), 1µg wyizolowanego RNA uzupełnionego do objętości 10µl sterylną wodą MiliQ
2. Inkubacja - 65°, 5min.
3. Schłodzenie próbki na lodzie (minimum 1min.)
4. Dodanie do próbki odczynników: 4µl buforu (*ang. First-Strand buffer, 5x*), 0,5µl inhibitora RNaz (*ang. RNaseOUT*) i 0,5µl odwrotnej transkryptazy
5. Inkubacja - 25°, 5min.
6. Inkubacja - 50°, 60min.
7. Zatrzymanie reakcji - 70°, 15min.

W ostatnim kroku wykonywano ilościowe oznaczenia transkryptu w reakcji Real-Time PCR. Do analizy genu *Nr3c1* użyto następujących starterów:

starter wiodący 5' CCTTACTGCTTCTCTCCTCAGT,

starter odwrotny 5' CAGTTGATAAAACCGCTGCCA.

Jako genu referencyjnego użyto genu *HPRT1*, wykazującego stałą ekspresję w badanych hodowlach komórkowych/ komórkach badanych struktur.

Starter wiodący 5'CTTTGCTGACCTGCTGGATT,

Starter odwrotny 5'CTTTTATGTCCCCCGTTGACT.

Skład mieszaniny reakcyjnej oraz program PCR zamieszczono w tabeli poniżej.

Skład mieszaniny reakcyjnej dla jednej reakcji	Program PCR
5µl mieszaniny reakcyjnej SybrGreen (Roche)	95°C – 20sec
0,4µl startera wiodącego (10µM)	95°C – 3sec
0,4µl startera odwrotnego (10µM)	60°C – 30sec
3,2µl wody	95°C – 15sec
1µl cDNA	60°C – 1min
	95°C – 15sec

Tab.3.1 Skład mieszaniny reakcyjnej dla jednej reakcji oraz program PCR używany do wyznaczenia poziomu ekspresji genu *Nr3c1*.

Reakcję PCR, dla każdej z próbek wykonywano w 3-5 powtórzeniach technicznych oraz 2-3 powtórzeniach biologicznych. Do wykonania reakcji i analizy danych użyto sprzętu i oprogramowania LightCycler®480.

3.4. Analiza statystyczna

Wyniki ekspresji przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej (Ryc.4.1), ze wszystkich pomiarów zebranych dla danego wariantu lub krotności zmian względem kontroli, które zawsze wynosiła 1 (Ryc.4.2, Ryc.4.14). Na wykresach zaznaczono także odchylenia w postaci błędu standardowego średniej. Istotność statystyczną oceniano za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA wraz z post-testem t Welcha lub tylko testem t Welcha dla dwóch zbiorów danych.

W przypadku testów behawioralnych wyniki przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej (Ryc.4.9 – Ryc.4.11 oraz Ryc.4.13), ze wszystkich pomiarów zebranych dla danego wariantu. Na wykresach zaznaczono także odchylenia w postaci błędu standardowego średniej. Istotność statystyczną oceniano za pomocą testu t Welcha, dla dwóch zbiorów danych lub testu Wicoxona dla par obserwacji.

Poziom istotności oznaczano następująco: *- $p < 0,05$, **- $p < 0,01$, ***- $p < 0,001$. Dodatkowo, w opisie rycin zamieszczono wyznaczoną wartość p. Opisane powyżej analizy statystyczne wykonano w środowisku R (R Core Team, 2020).

3.5. Przygotowanie sond powstałych na bazie sztucznych chromosomów bakteryjnych

Do hybrydyzacji *in situ* wykorzystano sondy powstałe na bazie sztucznych chromosomów bakteryjnych (*ang. Bacterial Artificial Chromosomes, BACs*) z biblioteki CHORI (The Children's Hospital Oakland Research Institute). Sonda dla mysiego genu kodującego GR (*Nr3c1*) zaprojektowana została w oparciu o BAC CH29_532F20 pokrywający region chromosomu 18:39372527-39563017.

Po otrzymaniu bakterii *E.coli* zawierających wybrany BAC wykonywano posiew redukcyjny na podłożu LB z dodatkiem chloramfenikolu (Sigma, 12,5µg/ml). Następnie pojedyncze kolonie bakterii namnażano w całonocnej hodowli płynnej LB z dodatkiem chloramfenikolu (Sigma, 12,5µg/ml). Sztuczne chromosomy bakteryjne izolowano metodą lizy alkalicznej według protokołu producenta (CHORI). Następnie za pomocą reakcji PCR weryfikowano czy wyizolowane chromosomy bakteryjne zawierają pożądaną sekwencję. W tabeli poniżej zamieszczono sekwencje starterów wykorzystanych w reakcji PCR.

BAC CH29_532F20	
Starter wiodący	5'ACCCCAGCTGTCTTCTCTGA
Starter odwrotny	5' TGACAGTATGCTGCCAGAGG

Tab.3.2 Sekwencje starterów używane do weryfikacji obecności sekwencji genu w BACu.

Po reakcji PCR weryfikowano obecność produktu za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym. Jeśli BAC zawierał żadaną sekwencję DNA, poddawany był reakcji niespecyficznego namnażania z użyciem komercyjnego zestawu GenomiPhi (GE Healthcare) oraz znakowany w wyniku reakcji przemieszczania pęknięć (*ang. nick-translation*).

3.5.1 Reakcja GenomiPhi

Reakcja GenomiPhi pozwala na uzyskanie dużej ilości DNA z niewielkiej wyjściowej ilości materiału genetycznego. Polega ona na niespecyficznym namnożeniu DNA przy użyciu losowych 6-nukleotydowych starterów oraz polimerazy Phi29. Reakcję

przeprowadzono z użyciem zestawu illustraTm GenomPhi V2 firmy GE Healthcare, według protokołu:

1. Zmieszanie 9µl buforu (*ang.* Sample buffer) z 1µl wyizolowanego DNA (10ng)
2. Denaturacja próbki - 95°C, 3 min
3. Schłodzenie próbki na lodzie
4. Zmieszanie 9µl buforu (*and* Reaction buffer) z 1µl mieszaniny enzymów
5. Inkubacja zmieszanego DNA (z punktu 3) z enzymami (z punktu 4) – 30°C, 2,5 godziny
6. Zatrzymanie reakcji – 65°C, 10 min

Reakcje, których produkty, po rozdiale elektroforetycznym w żelu agarozowym przedstawiały smugę, wykorzystywane były w kolejnym etapie przygotowania sondy.

3.5.2 Reakcja przemieszczenia pęknięć

Reakcja wykonana została z wykorzystaniem zestawu Biotin-Nick Translation Mix (Roche). W jej wyniku uzyskano liniowe cząsteczki DNA o wielkości od 200 do 500pz. Jednocześnie, w trakcie reakcji, nowo zsyntetyzowane DNA zostało wyznakowane biotyną, z częstością co 20, 25 nukleotyd. Reakcję wykonano według następującego protokołu:

1. Przygotowanie reakcji:
 - 2µl produktu reakcji GenomiPhi
 - 8µl miksu Biotin-Nick Translation Mix
 - 30µl wody MiliQ.
 - Składniki mieszano.
2. Inkubacja: 15°C, 90 min
3. Elektroforeza w żelu agarozowym w celu sprawdzenia wielkości uzyskanych produktów (optymalnie 200-500pz).
4. Zatrzymanie reakcji, poprzez inkubację próbki w temp. 65°C, przez 10min
5. Wytrącanie DNA poprzez dodanie do próbki 126,5µl schłodzonego na lodzie bezwodnego alkoholu etylowego. Dodawano także 12,5µl mysiego DNA kompetycyjnego (*ang.* Mouse Hyblock DNA, Applied Genetics Laboratories)

Inc.), 1µl fragmentowanego DNA ze spermy łososia (*ang.* Salmon Sperm DNA, Invitrogen). Całość inkubowano w 4°C, przez 2 godziny.

6. Wirowanie próbki z prędkością 13 000rpm, 20min., 4°C
7. Suszenie DNA w wirówce próżniowej (20min., 45°C)
8. Inkubacja sondy z 6µl 100% formamidu przez noc, 37°C, z wytrząsaniem
9. Dodanie do próbki mieszaniny hybrydyzacyjnej, składającej się z 20%siarczanu dekstranu rozpuszczonego w buforze 4xSSC.
10. Inkubacja: 30min, 37°C, z wytrząsaniem

W przypadku, gdy sonda nie była używana od razu po przygotowaniu, przechowywano ją w -20°C. Następnie przed użyciem, dodatkowo inkubowano przez 30min, w temperaturze 37°C, z wytrząsaniem.

3.6. Przygotowanie i hybrydyzacja komórek neuronalnych i astrocytarnych do mikroskopii superrozdzielczej STED

Barwienia wykonane zostały przy użyciu zmodyfikowanej metody FISH poprzedzonej znakowaniem histonów (Solovei i Cremer, 2010) w neuronalnych i astrocytarnych hodowlach pierwotnych. Utrwalone komórki płukano 2-krotnie buforem PBS, inkubowano przez 20min w buforze 0,5% Triton X-100/ PBS i blokowano w buforze 4%BSA/0,2%Tween 20/PBS przez 1 godz. w temperaturze 37°C, z wytrząsaniem. Następnie wykonywano barwienie histonów: H3K9Ac (Sigma) i H3K9me3 (Merck). W tym celu komórki inkubowano najpierw z króliczym przeciwciałem skierowanym przeciwko jednemu z histonów (rozcieńczenie 1:200 w buforze 1%BSA/ PBST, przez 1godz. w 37°C), płukano 3-krotnie, przez 5min. buforem PBST, a następnie z przeciwciałem anty-króliczym sprzężonym z AbberiorStar 580 (Abberior, 1:100 w 1%BSA/ PBST, 45min., 37°C). Po zakończonej inkubacji komórki płukano 3-krotnie, przez 5min. buforem PBST. Następnie wykonywano dodatkowe utrwalanie poprzez inkubację komórek w 2% formaldehydzie, przez 10min, w temp pokojowej, po czym komórki płukano 2-krotnie buforem PBS (5min, z wytrząsaniem). Następnie wykonywano blokowanie endogennej biotyny stosując komercyjny zestaw (SP-2001, Vector Laboratories), według protokołu: inkubacja komórek przez 15 minut w roztworze awidyny (1 kropla awidyny/ 250µl PBS/ dołek), płukanie (3 x 5min, PBS), inkubacja w roztworze biotyny (1 kropla biotyny/ 250µl PBS/ dołek), płukanie (3 x 5min,

PBS). Kolejno komórki inkubowano w 20% glicerolu w PBS, przez 1 godz., w temp. pokojowej. Następnie, w celu zwiększenia przepuszczalności błon komórkowych, płytki ze szkiełkami, na których rosły komórki poddawano czterem seriom gwałtownego zamrażania i rozmrażania. Płytki umieszczano tuż nad powierzchnią ciekłego azotu, a następnie do dołków szalki dodawano 20% glicerol w PBS. Po zakończonej procedurze komórki płukano 3-krotnie, po 5 min w buforze 0,05% Triton X-100/ PBS, przez kolejne 5 minut w 0,1N NaCl i ponownie 3x 5min w 0,05% Triton X-100/ PBS. Następnie po przepłukaniu szkiełek 2 x 5 min ciepłym (37°C) buforem 2xSSC, komórki inkubowano w 37°C przez 10min z RNazą A/ 2xSSC (stężenie RNazy 0,1mg/ml). Po trawieniu komórki płukano ogrzonym buforem 2xSSC (3 x 5min, 37°C) i inkubowano przez noc w 4°C, w 50% formamidzie/ 2xSSC. Kolejnego dnia, odsączano formamid, a szkiełka (komórkami ku dołowi) umieszczano na kropli wcześniej przygotowanej sondy. Całość zabezpieczano przed wyschnięciem za pomocą cementu gumowego. Tak przygotowany preparat denaturowano w temperaturze 80°C, przez 5 minut i inkubowano w wilgotnej komorze o temperaturze 37°C przez 24-48 godzin. Po zakończonej hybrydyzacji, usuwano gumowy cement, a szkiełka z komórkami umieszczano na szalce hodowlanej. Komórki płukano ciepłym (37°C) buforem 2xSSC (3 x 5min), podgrzonym (60°C) buforem 0,1xSSC (3 x 5min, z wytrząsaniem) oraz ciepłym (37°C) buforem 0,2% Tween 20/ 4xSSC (3 x 3min, z wytrząsaniem), a następnie blokowano w 4% BSA/ 0,2% Tween 20/ 4xSSC, przez 1 godzinę w 37°C. Następnie przeprowadzano detekcję sondy. Z uwagi, na to iż sonda była biotynylowana, do detekcji użyto roztworu streptawidyny sprzężonej z fluorochromem AbberiorStar 635p (Abberior, rozcieńczenie 1:100 w 1%BSA/ 0,2% Tween 20/ 4xSSC, 37°C, 2 godz., z wytrząsaniem). Po barwieniu komórki płukano buforem 4xSSC (4 x 5min, 37°C, z wytrząsaniem). Następnie wykonywano barwienie znaczników komórkowych stosując następujące zestawy przeciwciał: dla astrocytów - kozie przeciwciało skierowane przeciwko białku GFAP (Abcam, rozcieńczenie 1:200 w 1%BSA/ 0,2% Tween 20/ 4xSSC, 37°C, 2 godz., z wytrząsaniem) i anty-kozie, osle przeciwciało sprzężone z fluoroforem DyLight 405 (Jackson Immuno Research, rozcieńczenie 1:100 w 1%BSA/ 0,2% Tween 20/ 4xSSC, 37°C, 1 godz., z wytrząsaniem); lub dla neuronów kurze przeciwciało skierowane przeciwko białku NeuN (Milipore, rozcieńczenie 1:200 w 1%BSA/ 0,2% Tween 20/ 4xSSC, 37°C, 2 godz., z wytrząsaniem) i anty-kurze, kozie przeciwciało sprzężone z fluoroforem DyLight 405 (Jackson Immuno Research, rozcieńczenie 1:100 w 1%BSA/ 0,2% Tween 20/ 4xSSC, 37°C, 1 godz., z wytrząsaniem). Po każdym barwieniu komórki płukano buforem 4xSSC (4 x 5min,

37°C, z wytrząsaniem). Następnie komórki inkubowano przez kilka minut w buforze. DNA znakowano barwnikiem SYTOX Green w PBS (Thermo Fisher Scientific, rozcieńczenie 1:30 000, 30min). Preparaty po płukaniu buforem PBST (3 x 10min) zamykano w medium Vectashield (Vector Laboratories) i obrazowano.

3.7. Przygotowanie i hybrydyzacja tkanki do mikroskopii konfokalnej

Reakcja FISH prowadzona była zasadniczo według protokołu opisanego w pracy Cremer i wsp. (Cremer i wsp., 2008), na 40µm skrawkach mózgu utrwalanego PFA. Bufor Anti freeze, w którym przechowywano skrawki, odpłukiwany był najpierw, buforem PBS z 20mM glicyną (1 x 10min, z wytrząsaniem), a następnie buforem PBS (2 x 10min, z wytrząsaniem). Kolejno tkankę inkubowano w buforze PBST (20min, z wytrząsaniem), ciepłym buforze 2xSSC (37°C, 1 x 5min, z wytrząsaniem) i buforze 2xSSC z 0,1mM RNazą A (10min, 37°C). Po trawieniu tkankę płukano ciepłym buforem 2xSSC (37°C, 2 x 5min, z wytrząsaniem). Kolejno skrawki inkubowano w buforze cytrynianowym (30min, 80°C), a następnie schładzano do temperatury pokojowej przez kolejne 30 minut i płukano buforem 2xSSC (2 x 5min, 37°C, z wytrząsaniem). Podobnie jak dla preparatów komórkowych, wykonywano blokowanie endogennej biotyny stosując komercyjnie dostępny zestaw (Vector Laboratories), według protokołu: inkubacja komórek przez 15 minut w roztworze awidyny (1 kropla awidyny/ 250µl PBS/ dołek), płukanie (3 x 5min, PBS), inkubacja w roztworze biotyny (1 kropla biotyny/ 250µl PBS/ dołek), płukanie (3 x 5min, PBS). Tkanke inkubowano przez noc, w 4°C, w 50% formamidzie/ 2xSSC. Kolejnego dnia skrawek mózgu przekładano do specjalnie wykonanej szklanej komory, dodawano kroplę przygotowanej wcześniej sondy, tak, aby całość tkanki była w niej zanurzona. Komorę zabezpieczano przed wyschnięciem za pomocą cementu gumowego i inkubowano przez 4 godziny, w 45°C. Następnie tkankę denaturowano poprzez 5-minutową inkubację preparatu w temperaturze 80°C i hybrydyzowano w wilgotnej komorze o temperaturze 37°C, przez 48godzin. Po zakończonej hybrydyzacji usuwano cement gumowy, a skrawki płukano ciepłym buforem 2xSSC (3 x 10min, 37°C, z wytrząsaniem) i 0,1xSSC (2 x 10min, 60°C, z wytrząsaniem). Następnie wykonywano blokowanie w buforze 4% BSA/ 0,2% Tween 20/ 4xSSC przez 30 minut, w temperaturze 37°C. Detekcję biotynylowanej sondy wykonano z użyciem awidyny sprzężonej z fluorochromem AlexaFluor 488

(rozcieńczenie 1:100 w 2% BSA/ 0,2% Tween 20/ 4xSSC, 4°C, przez noc, z wytrząsaniem) oraz anty-awidyną sprzężoną z FITC (Sigma, rozcieńczenie 1:100 w 2% BSA/ 0,2% Tween 20/ 4xSSC, 37°C, 2 godz., z wytrząsaniem). Po reakcji FISH wykonano dodatkowe reakcje immunofluorescencyjne: białko GFAP (marker astrocytów) znakowano przeciwciałem kozim anty-GFAP (Abcam, rozcieńczenie 1:200 w 2% BSA/ 0,2% Tween 20/ 4xSSC, 4°C, przez noc, z wytrząsaniem) oraz oślim, anty-kozim sprzężonym z TRITC (Thermo Scientific, rozcieńczenie 1:100 w 2% BSA/ 0,2% Tween 20/ 4xSSC, 37°C, 2 godz., z wytrząsaniem); białko NeuN (marker neuronów) znakowano przeciwciałami: kurzym anty-NeuN (Milipore, rozcieńczenie 1:200 w 2% BSA/ 0,2% Tween 20/ 4xSSC, 4°C, przez noc, z wytrząsaniem) i oślim, anty-kurzym sprzężonym z AlexaFluor 647 (Jackson Immuno Research, rozcieńczenie 1:100 w 2% BSA/ 0,2% Tween 20/ 4xSSC, 37°C, 2 godz., z wytrząsaniem). Po każdej inkubacji z przeciwciałem tkankę płukano buforem 4xSSC (3 x 10min, 37°C, z wytrząsaniem). DNA barwiono Hoechst 33342 (Thermo Scientific, stężenie 10µg/ml, 10min), a następnie płukano buforem 0,2% Tween 20/ 4xSSC (3 x 10min, z wytrząsaniem). Preparat zamykano w medium Vectashield (Vector Laboratories) i obrazowano.

3.8. Zbieranie obrazów mikroskopowych

W przypadku preparatów tkankowych do sekwencyjnego skanowania wykorzystano mikroskop konfokalny Zeiss LSM800 znajdujący się w Pracowni Obrazowania Struktury i Funkcji Tkankowych Centrum Neurobiologii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie. Użyto obiektywu immersyjnego 63x, o aperturze numerycznej 1,4 oraz laserów diodowych: 405nm, 488nm, 555nm i 647nm. Wielkość voksela ustalono na 70nm w osiach x-y i 210nm w osi z.

Znakowane fluorescencyjnie preparaty komórkowe skanowano sekwencyjnie przy użyciu mikroskopu superrozdzielczego Leica SP8 3X-STED znajdującego się w Pracowni Electron and Laserscanning Microscopy Lab w Instytucie Neurobiologii im. Leibniza w Magdeburgu, w Niemczech. Użyto laserów 405nm, 488nm, 561nm i 633nm. Superrozdzielczość uzyskano dzięki zastosowaniu lasera deplecyjnego 720nm w osiach x,y na poziomie mocy 30% (dla alleli) i 100% (dla markerów chromatyny). Uzyskana dzięki temu rozdzielczość wynosiła 24nm w osiach x-y i 183nm w osi z.

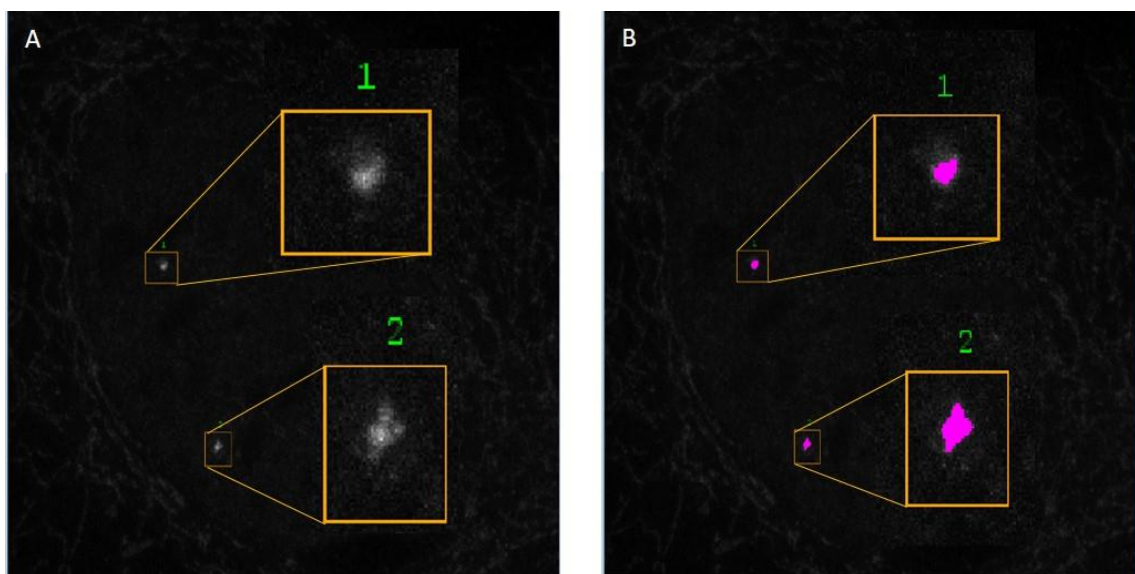
3.9. Analiza obrazów

Hybrydyzację wykonywano na skrawkach tkankowych zawierających korę przedczołową, hipokamp i jądro półleżące. Dla każdego modelu (silny stres; stres przewlekły/ depresja wywołowany przez dootrzewnowe podawanie DEX przez kolejnych 21 dni; depresja wywołwana chronicznym stresem) barwienie wykonywano dla 4 zwierząt z grup traktowanych i 4 z grup kontrolnych. Dla każdego zwierzęcia wykonywano hybrydyzację dla każdej z trzech struktur, po 1 - 2 preparaty z każdej półkuli, w sumie 2 - 4 preparatów dla każdego zwierzęcia. Następnie, dla każdego z preparatów wykonywano 3 skany mikroskopowe. Obszar skanowania wynosił 2048x 2048 pikseli. Z uwagi, iż przedmiotem analizy było rozmieszczenie względem siebie obiektów znajdujących się na dwóch kanałach: DNA na kanale niebieskim (405nm) i alleli na kanale zielonym (488nm), stosy obrazów mikroskopowym, po zeskanowaniu poddawano obróbce polegającej na wyrównaniu kanałów względem siebie (*ang. alignment*). W tym celu wykorzystano funkcję Alignment Extended w programie Zeiss Blue Edition.

Obrazy z mikroskopu konfokalnego analizowano za pomocą programu Segmentation magick. Program ten, napisany w języku Python, został stworzony na potrzeby Pracowni Neuromorfologii Molekularnej i Systemowej przez dra Błażeja Ruszczyckiego. Pozwala on na segmentację gęsto upakowanych obiektów, o kształcie zbliżonym do kuli (np. jąder komórkowych) z trójwymiarowych obrazów mikroskopowych (Ruszczycki i Wilczyński, 2011; Ruszczycki i wsp., 2019). Program wykorzystuje algorytm pozwalający na wyznaczenie granicy obiektu na podstawie ciągłych, gwałtownych zmian kontrastu. Umożliwia to badanie przestrzennej lokalizacji struktur wewnątrzjądrowych, np. alleli. Istotnym elementem programu jest moduł, opracowany we współpracy z dr. Ruszczyckim, pozwalający na określanie odległości małych obiektów wewnątrzjądrowych (alleli) względem skondensowanej chromatyny, wyznaczonej przez zastosowanie odpowiedniego progu jasności (*ang. threshold*). Analizie poddawano wszystkie poprawnie wysegmentowane jądra, zarówno astrocytów, jak i neuronów. Poprawna segmentacja oceniana była na podstawie dokładności wyznaczenia krawędzi jądra komórkowego. Dokładną liczbę jąder poddanych analizie podano w sekcji wyniki. Wyniki pomiarów (lokalizacji alleli, ich odległości do otoczki jądrowej, wielkości jądra, itp.) przedstawiono w postaci słupków prawdopodobieństwa lub rozkładu prawdopodobieństwa. Istotność statystyczna w obrębie każdego przedziału

danych liczona była za pomocą testu Monte Carlo. Poziom istotności statystycznej $p < 0,01$ oznaczany był za pomocą czerwonej kropki.

Obrazy z mikroskopu superrozdzielczego 3X-STED analizowano przy użyciu programu specjalnie napisanego do tego celu we współpracy z dr Błażem Ruszczyckim. Program, napisany w języku Python, umożliwia ręczne zaznaczenie alleli na obrazach mikroskopowych, co jest korzystne w przypadku znacznie rozproszonego sygnału pochodzącego od sondy, a tym samym dokładniejsze wyznaczenie kolokalizacji pomiędzy allelami, a markerami chromatyny. Sposób działania programu zaznaczono na rycinie poniżej.



Ryc.3.2 Schemat działania programu do analizy kolokalizacji na obrazach superrozdzielczych. A – oryginalny obraz z mikroskopu, B – ten sam obraz mikroskopowy z wyznaczonym obszarem alleli. Dla wyraźniejszego obrazu, sygnały od sondy/ allele umieszczono w powiększonych kwadratach oznaczonych numerami 1 i 2.

Uzyskane dane przedstawiane są w postaci stosunku rozkładów jasności allela do jasności chromatyny.

3.10. Analizy transkryptomyczne metodą sekwencjonowania RNA

Analizy transkryptomyczne wykonano na astrocytarnych i neuronalnych hodowlach pierwotnych kory mózgowej. Komórki po rozmrożeniu na lodzie, odklejano od dna płytki hodowlanej przez silne przepłukanie buforem z nad komórek. Następnie z zebranych komórek izolowano RNA za pomocą zestawu RNeasy Mini Kit (Qiagen), według protokołu producenta, z dodatkowym etapem trawienia DNazą I. Po izolacji mierzono stężenie otrzymanego RNA, a jego jakość oceniano na podstawie obrazu prążków na żelu agarozowych, po rozdiale elektroforetycznym. Doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach biologicznych, pochodzących z trzech pierwotnych hodowli komórkowych założonych w różnym czasie.

Wyizolowane RNA przesłano do Laboratorium ds. Badań nad Zmiennością Genomu Ludzkiego w Małopolskim Centrum Biotechnologii w Krakowie, gdzie wykonywane były dalsze etapy eksperymentu. Każda z przesłanych próbek, po przygotowaniu biblioteki, sekwencjonowania była 4-krotnie.

3.11. Analiza bioinformatyczna wyników sekwencjonowania RNA

Ocena jakościowa i analiza wzbogacenia w ścieżkach KEGG

Uzyskane wyniki sekwencjonowania poddawano ocenie jakościowej. W pierwszym etapie, za pomocą programu Trimmomatic (Bolger i wsp., 2014) usunięto sekwencje krótkie, tj. poniżej 50bp oraz te o niskiej jakości. Uzyskane odczyty mapowano względem mysiego genomu referencyjnego mm10 za pomocą programu STAR (Dobin i wsp., 2013). Następnie zmapowane dane poddano ocenie jakościowej z użyciem programów samtools (Danecek i wsp., 2021) i RSeQC (Wang i wsp., 2012). Za pomocą programu RSeQC feature_counts uzyskano macierz zliczeń. Kolejno, w środowisku R (R Core Team, 2020) policzono średnią zliczonych odczytów z trzech powtórzeń biologicznych, dla każdej próbki. Średnie znormalizowano do RPKM (*ang. reads per kolibase milion*), pod względem głębokości sekwencjonowania i długości genu. Następnie dane poddano analizie różnicowej przy użyciu programu NOISeq Bio (Tarazona i wsp., 2015). Geny, dla których zmiany ekspresji były istotne statystycznie ($FDR < 0,05$) poddano analizie wzbogacenia w ścieżkach KEGG przy użyciu programu clusterPrifiler (Yu i wsp., 2012).

Analiza skupień

Znormalizowane metodą RPKM profile ekspresji we wszystkich 12 próbkach dla 1084 genów istotnie ($FDR < 0.01$) zmienionych po traktowaniu DEX w jednym lub w obu typach komórek zostały scentrowane na wartości średniej dla danego profilu, tzn. wartości RPKM dla danego genu w danej próbce została podzielona przez średnią wartość RPKM dla tego genu we wszystkich 12 próbkach. Następnie, tak scentrowane profile RPKM zostały poddane klastrowaniu (analizie skupień) metodą K-mediod na podstawie ich odległości Euklidesowych, za pomocą funkcji FindClusters oprogramowania Mathematica 8.0 (Wolfram Research). Liczba istotnych (istotnie różnych) klastrowanych przez tę funkcję ustalana jest automatycznie na podstawie kryterium statystycznego. Wyniki klastrowania zostały przedstawione na dwa sposoby: 1) za pomocą profili ekspresji pojedynczych genów, z zaznaczonym dodatkowo profilem mediody – profilu łączącego mediany ekspresji genów w danym klastrze w każdej z 12 próbek; 2) za pomocą mapy cieplnej (*ang. heatmap*), czyli macierzy w której wartości liczbowe są przedstawione za pomocą skali barwnej.

Porównanie z opublikowanymi danymi mikromacierzowymi z astrocytów

Zmiany ekspresji po DEX w astrocytach zidentyfikowane w obecnej pracy metodą RNA-seq porównano z wcześniej opublikowanymi danymi mikromacierzowymi typu szereg czasowy w podobnym układzie doświadczalnym (pierwotne mysie astrocyty w hodowli poddane działaniu DEX, 8 punktów czasowych). W tym celu dane RNA-seq o średniej krotności zmiany w astrocytach dla 3938 genów o istotnie zmienionej ($FDR < 0.05$) ekspresji połączono – na podstawie identycznych nazw (symboli) 2753 wspólnych genów, z danymi o krotności zmiany w każdym z punktów czasowych analizowanych w pracy Carter i wsp. (2012) z tabeli pomocniczej “Supplemental Table S1” (plik table S1.xls). Następnie, w połączonym zbiorze danych przeprowadzono analizę korelacji a wyniki przedstawiono w postaci mapy cieplnej.

Porównanie z listą ludzkich genów o zmienności powiązanej z depresją

Na podstawie identycznych nazw (symboli) genów mysich i ludzkich, dokonano przecięcia listy 3938 genów istotnie zmienionych ($FDR < 0.05$) po DEX w mysich astrocytach, oraz osobno listy 2662 genów istotnie zmienionych ($FDR < 0.05$) po DEX

w mysich neuronach, z listą 269 ludzkich genów powiązanych z depresją zidentyfikowanych w meta-analizie opublikowanej w pracy (Howard i wsp. 2019), zawartych w tabeli pomocniczej “Supplementary Table 9” (plik 41593_2018_326_MOESM11_ESM__Supplementary_Table9.xlsx). Wyniki dla 43 wspólnych genów zmienionych po DEX w mysich astrocytach oraz dla 24 wspólnych genów w przypadku neuronów, przedstawiono w postaci tabel genów wspólnych oraz w formie graficznej, zaznaczając kolorem geny powiązane u człowieka z depresją na wykresie zlogarytmowanej w podstawie 2 krotności zmiany po DEX w danym typie komórek.

Analiza wyników sekwencjonowania RNA wykonana została w Zespole prof. Michała Dąbrowskiego w Instytucie Biologii Doświadczalnej PAN w Warszawie.

3.12. Analiza interakcji międzychromatynowych za pomocą metody ChIA-PET w neuronalnych i astrocytarnych hodowlach pierwotnych.

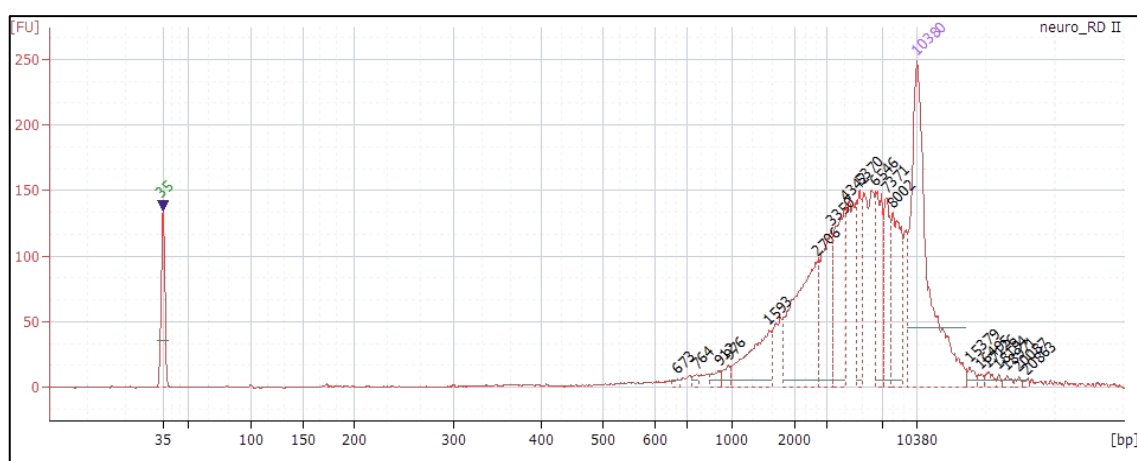
ChIA-PET to nowatorska metoda pozwalająca na globalną analizę interakcji międzychromatynowych. Do przygotowania bibliotek wykorzystano neuronalne i astrocytarne pierwotne hodowle komórkowe, które prowadzone były zgodnie z protokołem zamieszczonym w punkcie 3.1. Po dwóch tygodniach, licząc od dnia założenia hodowli, część neuronów i astrocytów traktowana była 100nM roztworem DEX (Sigma) w podłożu hodowlanym. Po 4 godzinach inkubacji, komórki utrwalano przy użyciu 1% formaldehydu (Sigma), w sposób opisany w punkcie 3.1.4. Do przygotowania jednej biblioteki użyto około 10 milionów komórek.

3.12.1 Liza komórek, permeabilizacja jąder komórkowych i trawienie restrykcyjne

Probówkę typu Eppendorf, zawierającą około 10mln komórek rozmrażano na lodzie przez około 20min. Następnie komórki wirowano z prędkością 2500g, przez 5 min, w temperaturze 4°C. Po usunięciu buforu, komórki zawieszano w 1ml buforu do lizy i inkubowano, z rotacją, przez 1 godz., w temperaturze 4°C. Po zakończonej lizie, komórki wirowano (2500g, 5 min, 4°C), osad zawieszano w 100µl buforu do permeabilizacji i inkubowano około 3godz, na statywie, w temperaturze pokojowej.

Następnie do próbki dodawano 50µl 10% Tritonu X-100 (Sigma-Aldrich) i 270µl podwójnie destylowanej wody (Thermo Fisher Scientific), w celu zahamowania działania SDSu. Probówkę wytrząsano przy użyciu wytrząsarki wertykalnej z prędkością 25rpm, przez 15min w temperaturze 37°C. Kolejno do próbki dodawano 50µl buforu restrykcyjnego CutSmart buffer (New England Biolabs), 30µl enzymu restrykcyjnego AluI (New England Biolabs) i inkubowano z wytrząsaniem przy użyciu wytrząsarki wertykalnej z prędkością 35rpm, w temperaturze 37°C, przez noc.

Kolejnego dnia wykonywano test kontroli jakości. W tym celu do 10µl trawionej restrykcyjnie próbki dodawano 90µl buforu TE, 5µl proteinazy K (Thermo Fisher Scientific) i inkubowano przez 1godz., w temperaturze 65°C w termobloku z wytrząsaniem 900rpm. Kolejno oczyszczano DNA przy użyciu zestawu QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) zgodnie z instrukcją producenta, mierzono stężenie za pomocą zestawu Qubit® dsDNA (Thermo Fisher Scientific) i sprawdzano profil DNA używając systemu firmy Agilent Technologies. Fragmenty DNA na tym etapie powinny mieścić się w zakresie wielkości 5-8kpz. Na Ryc.3.4 przedstawiono profil DNA uzyskany w wyniku lizy, permeabilizacji i trawienia restrykcyjnego dla biblioteki LMC0015. Biblioteka ta została wykonana na neuronalnej hodowli pierwotnej, kontrolnej. Krzywa przedstawiająca profil DNA osiąga maksimum przy wielkości 6,8kpz, a większość fragmentów DNA mieści się w sugerowanym zakresie.



Ryc.3.3 Profil DNA po etapie trawienia restrykcyjnego, dla biblioteki LMC0015. Krzywa wielkości DNA osiąga maksimum przy wartości 6,8kpz. Na wykresie widoczne są również maksima dla markera wielkości DNA (na zielono 35pz, na niebiesko 10380pz).

3.12.2 Znakowanie i ligacja fragmentów DNA.

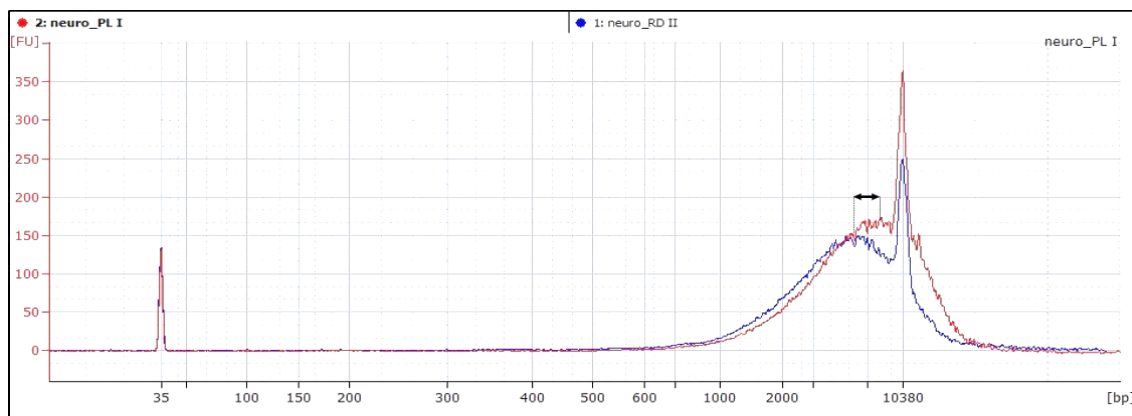
Fragmenty DNA, uzyskane poprzez trawienie restrykcyjne wydłużano, poprzez dodanie adeniny na końcu 3' dwuniciowej cząsteczki DNA w tzw. reakcji wydłużania (*ang. A-tailing*). W tym celu do schłodzonych na lodzie komórek (o objętości ok. 490µl), z poprzedniego etapu, dodawano 11µl BSA (New England Biolabs, 20mg/ml), 11µl dATP (New England Biolabs, 10mM), 4µl buforu CutSmart (New England Biolabs, 10x stężony), 3µl wody (Thermo Fisher Scientific) i 11µl polimerazy Klenow (New England Biolabs). Próbkę inkubowano przez godzinę, w temperaturze 37°C, z rotacją.

Następnie fragmenty DNA znajdujące się w bezpośrednim sąsiedztwie, w trójwymiarowej przestrzeni jądra komórkowego ligowano ze sobą. W tym celu, do próbki (530µl), z poprzedniego kroku, dodawano 257µl wody (Thermo Fisher Scientific), 200µl buforu do ligacji (New England Biolabs), 3µl łącznika (sekwencję łącznika zamieszczono poniżej), 10µl ligazy DNA T4 (New England Biolabs). Próbkę inkubowano (z rotacją) najpierw, przez 1 godz. w temperaturze pokojowej, a następnie w 16°C przez noc.



Ryc. 3.5 Sekwencja łącznika używanego w reakcji ligacji. Tymina na końcach 3', tworząca tzw. wolny koniec umożliwia wiązanie z adeniną dołączaną podczas reakcji wydłużania do fragmentów DNA w jądrze komórkowym (krok 3.11.3). Biotyna wykorzystywana jest do wzbogacania puli DNA o fragmenty zawierające łącznik, w kolejnym etapie eksperymentu.

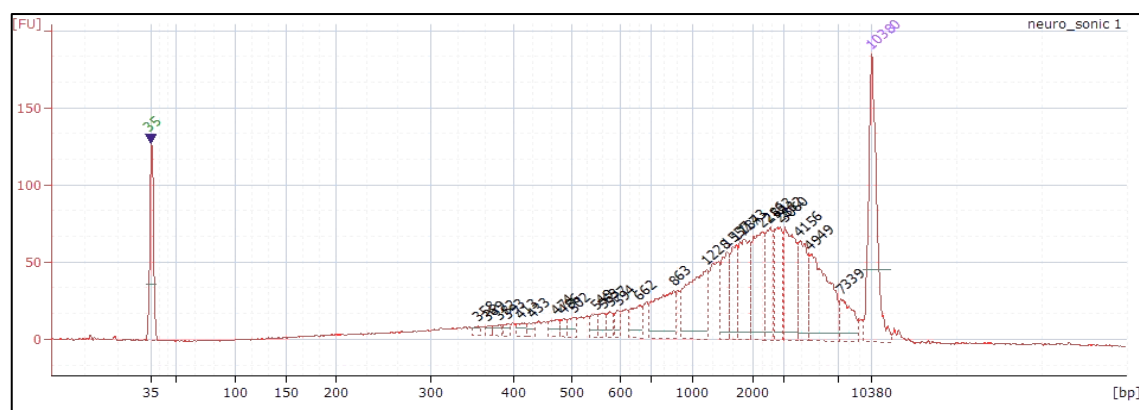
Kolejnego dnia wykonywano drugi test kontroli jakości. Próbkę przygotowywano w sposób analogiczny jak podczas pierwszego testu. W teście tym sprawdzano profil wielkości DNA po ligacji i porównywano do tego, uzyskanego po trawieniu restrykcyjnym. Wyznacznikiem udanej ligacji jest przesunięcie maksimum wielkości DNA, w prawo (w stronę większych wartości) o ok. 2-5kpz. Porównanie profili wielkości DNA uzyskane dla jednej z bibliotek przedstawiono na rycinie Ryc.3.4.



Ryc.3.4 Porównanie profili DNA po etapie trawienia restrykcyjnego (krzywa niebieska, profil DNA zamieszczony na ryc.3.3) i ligacji (krzywa czerwona), dla biblioteki LMC0015. Zieloną strzałką zaznaczono różnicę wielkości fragmentów DNA pomiędzy etapami (2,1kpz).

3.12.3 Sonikacja komórek

Próbkę, po zakończonej ligacji, wirowano z prędkością 5500 x g, w temperaturze 10°C, przez 10min. Osad komórek zawieszano w 0,5ml buforu do sonikacji i sonikowano w warunkach: czas 1min 30 sec, amplituda wibracji 41%. Następnie próbkę wirowano (6500 x g, 10min, 4°C) i wykonywano trzeci test kontroli jakości, mający na celu sprawdzenie efektywności sonikacji. Większość fragmentów DNA uzyskanych na tym etapie powinna mieścić się w zakresie wielkości 2-3kpz. Przykładowy profil wielkości DNA uzyskany w wyniku sonikacji został przedstawiony poniżej (Ryc.3.5).



Ryc.3.5 Profil DNA po etapie sonikacji, dla biblioteki LMC0015. Krzywa wielkości DNA osiąga maksimum przy wartości 2,8kpz. Na wykresie widoczne są również maksima dla markera wielkości DNA (na zielono 35pz, na niebiesko 10380pz).

3.12.4 Immunoprecypitacja chromatyny

100µl złoża magnetycznego (Thermo Fisher Scientific) płukano 3-krotnie 500µl buforu PBST. Złoże zawieszano w 500µl buforu PBST, dodawano 20µg przeciwciała przeciwko białku CTCF (Abclonal) lub polimerazie DNA II (BioLegend), w zależności od eksperymentu i inkubowano z rotacją, w temperaturze 4°C przez noc.

Następnego dnia przeprowadzano wstępne oczyszczanie próbki. W tym celu przygotowywano 100µl złoża magnetycznego (Thermo Fisher Scientific), płuczając je 3-krotnie 500µl buforu PBST. Do złoża dodawano próbkę uzyskaną w wyniku sonikacji i inkubowano z rotacją, przez godzinę, w temperaturze 4°C.

Następnie złoże ze związanym przeciwciałem płukano 3-krotnie 500µl buforu PBST, a następnie dodawano próbkę po wstępnym oczyszczaniu i inkubowano z rotacją, przez noc, w temperaturze 4°C.

3.12.5 Płukanie DNA związanego do złoża i rozbijanie kompleksów DNA-białko powstałych podczas sieciowania

Kompleksy DNA-białko związane do przeciwciał na złożu magnetycznym płukano 3-krotnie 1ml buforu o niskiej zawartości soli, 2-krotnie 1ml buforu o wysokiej zawartości soli, 1-krotnie 1ml buforu LiCl i 2-krotnie 1ml buforu TE. Każdorazowo, po zawieszeniu złoża w buforze inkubowano je z rotacją, przez 5min, w temp. 4°C i wirowano (800rpm, 1min, 4°C). Następnie DNA eluowano ze złoża. Do próbki dodawano 200µl buforu elucyjnego i inkubowano w termoboku z funkcją wytrząsania, z prędkością 900rpm, przez 30min, w temp. 65°C. Następnie nadsącz przenoszono do nowej probówki typu eppendorf, a złoże zawieszano ponownie w 100µl buforu EB, który po rozdzieleniu od złoża przenoszono do tej samej probówki, do której uprzednio dodano nadsącz. Do całości dodawano 10µl proteinazy K (Thermo Fisher Scientific), mieszano i inkubowano w termoboku z funkcją wytrząsania, z prędkością 900rpm, w temp. 65°C, przez noc.

3.12.6 Ocena wzbogacenia

Próbkę oczyszczano za pomocą zestawu (Zymo Research) wg. zaleceń producenta i eluowano z kolumny 2-krotnie 11 μ l buforu EB. Mierzono stężenie i obliczano ilość uzyskanego DNA. Wzbogacenie oceniano za pomocą reakcji PCR typu Real Time. Skład mieszaniny reakcyjnej dla jednej reakcji oraz program PCR zamieszczono w tabeli Tab.3.3.

Skład mieszaniny reakcyjnej dla jednej reakcji	Program PCR
5 μ l mieszaniny reakcyjnej SybrGreen (Roche)	95°C – 5min
2 μ l mieszaniny starterów (np. P4)	95°C – 10sec
2 μ l wody (Thermo Fisher Scientific)	60°C – 10sec
1 μ l DNA (0,1ng)	72°C – 10sec

Tab.3.3 Skład mieszaniny reakcyjnej dla jednej reakcji oraz program PCR używany w celu wyznaczenia wzbogacenia.

W zależności od typu przygotowywanej biblioteki (dla białka CTCF lub RNA Pol II) używano zarówno starterów pozytywnych, jak i negatywnych. Sekwencje starterów zamieszczono w tabeli Tab.3.4. Reakcje PCR przeprowadzano każdorazowo w dwóch powtórzeniach technicznych.

Wzbogacenie puli DNA o sekwencje specyficznie wiążące się do białka CTCF lub RNA Pol II wyznaczano w następujący sposób: (i) wyznaczano średnią (Ct) z dwóch powtórzeń dla każdej próbki, (ii) wyznaczano wartość średnią (Δ Ct) dla każdej pary starterów (starter pozytywny i negatywny), (iii) obliczano wzbogacenie, odejmując wartość Δ Ct dla startera negatywnego od wartości Δ Ct dla startera pozytywnego. Wzbogacenie równe, lub wyższe niż 5 uznawano za wystarczające do kontynuowania eksperymentu.

Startery używane w przypadku biblioteki dla białka CTCF	Startery używane w przypadku biblioteki dla białka RNA Pol II
Startery pozytywne P4 Starter wiodący 5'GCCGAGTCAGTGGCAGATA Starter odwrocony 5'GGGTGTCCTATGAAAAGTGTC	Startery pozytywne P1 Starter wiodący 5'GTCCGGCTTGCACACTTC Starter odwrotny 5'GGGGACAGTCGGAAACTG P2 Starter wiodący 5'GGGCCCACGACTGTCTAC Starter odwrotny 5'CAGCCAACTTTACGCCTAGC
Startery negatywne Starter wiodący 5'GGCCTTCCACTGTAACATGC Starter odwrocony 5'GGGAGGGGAATCAGGATATT	Startery negatywne Starter wiodący 5'GGCCTTCCACTGTAACATGC Starter odwrocony 5'GGGAGGGGAATCAGGATATT

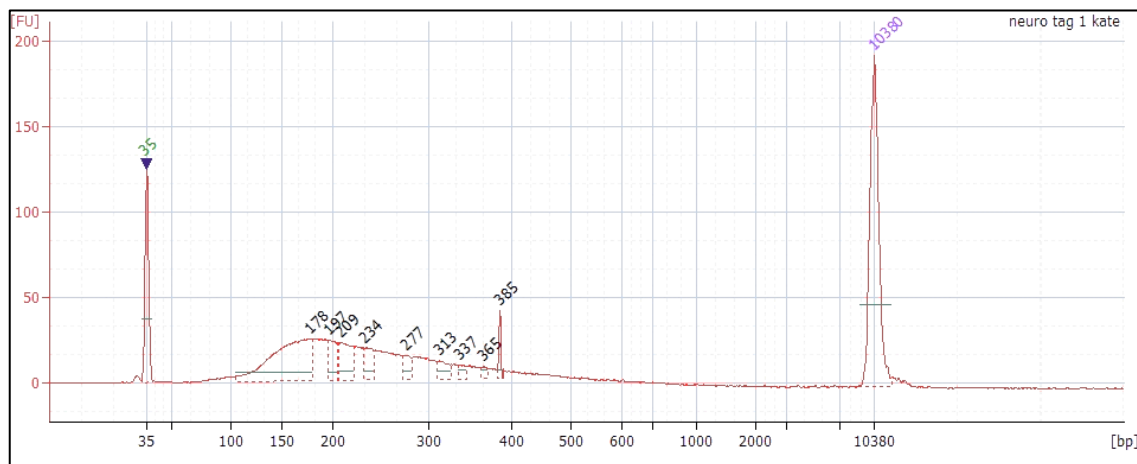
Tab.3.4 Wykaz starterów pozytywnych i negatywnych dla białek CTCF i RNA Pol II.

3.12.7 Przygotowanie biblioteki Illumina

Przygotowanie biblioteki do sekwencjonowania składa się z kilku etapów: tagmetacji DNA, wzbogacenia puli fragmentów o te zawierające łącznik, namnażania z jednoczesnym przyłączeniem specjalnych znaczników oraz selekcji wielkości DNA.

DNA uzyskane w wyniku immunoprecypitacji poddawano fragmentacji enzymatycznej (*ang. tagmentation*) wykorzystując specjalnie dedykowane zestaw firmy Illumina, według następującego schematu: do DNA (maksymalnie 50ng na 1 reakcję) dodawano 25µl buforu, enzym w ilości 0,17µl na każdy nanogram DNA, i dopełniano wodą (Thermo Fisher Scientific) do 50µl. Próbkę wirowano i inkubowano w temp. 55°C przez 5min, a następnie przez 10min w temp. 10°C. DNA oczyszczano za pomocą zestawu firmy ZymoResearch, według zaleceń producenta. Końcowym krokiem było sprawdzenie profilu DNA (Agilent Technologies). Przykładowy wynik fragmentacji

uzyskany dla biblioteki LMC0015 przedstawiono poniżej. Optymalna wielkość fragmentów DNA powinna mieścić się w zakresie 150-700pz.



Ryc.3.6 Profil wielkości DNA po etapie fragmentacji dla biblioteki LMC0015. Krzywa wielkości DNA osiąga maksimum przy wartości 178pz. Na wykresie widoczne są również maksima dla markera wielkości DNA (na zielono 35pz, na niebiesko 10380pz).

30 μ l złoża magnetycznego sprzężonego ze streptawidyną (Thermo Fisher Scientific) płukano 2-krotnie 150 μ l buforu wiążącego/ myjącego (stężonego 2x). Następnie złoże zawieszano w 100 μ l buforu blokującego i inkubowano w temperaturze pokojowej, przy użyciu wytrząsarki wertykalnej z prędkością 50rpm, przez 45min. Złoże płukano 2-krotnie 200 μ l buforu wiążącego/ myjącego (stężonego 1x). Kolejno blokowano niespecyficzne wiązanie pomiędzy DNA, a złożem poprzez jego inkubację z 100 μ l mieszaniny blokującej (500ng DNA blokującego zawieszono w 50 μ l wody (Thermo Fisher Scientific) i 50 μ l 2-krotnie stężonego buforu wiążącego/ myjącego), na wytrząsarce wertykalnej z prędkością 50rpm, przez 30min. Następnie złoże płukano 2-krotnie 200 μ l buforu wiążącego/ myjącego (stężonego 1x) i wiązano z pofragmentowanym DNA (DNA uzupełnione do objętości 50 μ l wodą (Thermo Fisher Scientific) i 50 μ l 2-krotnie stężonego buforu wiążącego/ myjącego) w temperaturze pokojowej, używając wytrząsarki wertykalnej z prędkością 50rpm, przez 45min. Po zakończonej inkubacji złoże płukano 5-krotnie 500 μ l buforu 0,5% SDS/ 2xSSC, 2-krotnie 500 μ l buforu wiążącego/ myjącego (stężonego 1x). Następnie DNA związane do złoża zawieszano w 30 μ l buforu EB.

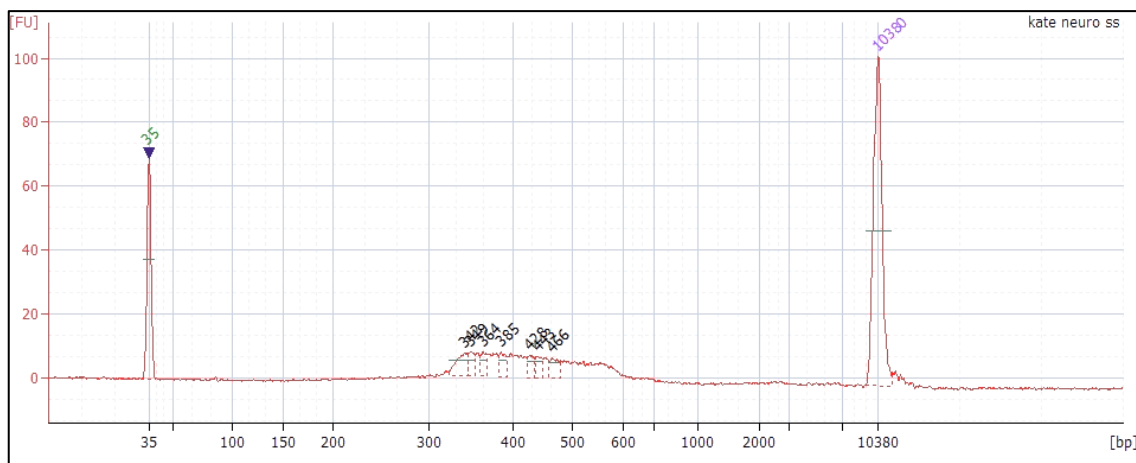
W kolejnym kroku DNA amplifikowano w reakcji PCR, dodając jednocześnie specjalne, oligonukleotydowe znaczniki, umożliwiające sekwencjonowanie przygotowanej biblioteki w sekwenatorach firmy Illumina. Skład mieszaniny reakcyjnej i program PCR zamieszczono w tabeli poniżej.

Skład mieszaniny reakcyjnej dla jednej reakcji	Program PCR
10µl DNA związanego ze złożem	72°C – 3min
25µl mieszaniny reakcyjnej (New England Biolabs)	98°C – 30sec
5µl znacznika 1 (Illumina)	98°C – 10sec
5µl znacznika 2 (Illumina)	63°C – 30sec
5µl wody (Thermo Fisher Scientific)	72°C – 40sec
1µl DNA (0,1ng)	72°C – 5min
	4°C – ∞

Tab.3.5 Skład mieszaniny reakcyjnej dla jednej reakcji oraz program PCR używany podczas przygotowania biblioteki do sekwencjonowania.

Nadszacz z mieszaniny reakcyjnej zawierający namnożony DNA oczyszczano z wykorzystaniem złoża magnetycznego AMPure XP (Beckman) – przenoszono 50µl DNA po reakcji PCR do probówki 1,5ml typu eppendorf, dodawano 50µl złoża, mieszano i inkubowano w temperaturze pokojowej używając wytrząsarki wertykalnej z prędkością 30rpm, przez 5min. Następnie złożo płukano 2-krotnie 200µl świeżo przygotowanego 80% etanolu (Sigma-Aldrich). Złożo suszono przez ok. 10min, w temperaturze pokojowej, a następnie DNA eluowano w 14µl buforu EB, mierzono stężenie uzyskanego DNA i sprawdzano profil jego wielkości.

Ostatnim krokiem w przygotowaniu biblioteki jest selekcja rozmiaru. Wielkość fragmentów poddawanych sekwencjonowaniu powinna mieścić się w zakresie 300-600pz. W tym celu uzyskane we wcześniejszym etapie DNA rozdzielano elektroforetycznie przy użyciu zestawu BluePippin firmy Sage Science. Następnie oznaczano stężenie uzyskanego DNA i sprawdzano profil wielkości. Przykładową krzywą reprezentującą wielkość fragmentów DNA po selekcji rozmiaru, uzyskaną dla biblioteki LMC0015 przedstawiono poniżej.



Ryc.3.7 Profil wielkości DNA po etapie selekcji rozmiaru, uzyskany dla biblioteki LMC0015. Wielkość uzyskanych fragmentów DNA mieści się w zakresie 300-600pz. Na wykresie widoczne są również maksima dla markera wielkości DNA (na zielono 35pz, na niebiesko 10380pz).

Biblioteki sekwencjonowano przy użyciu sekwenatora Illumina Hi-Seq 2500.

3.13. Analiza bioinformatyczna bibliotek ChIA-PET

Analizę bioinformatyczną wyników sekwencjonowania wykonano przy użyciu w pełni zautomatyzowanego oprogramowania ChIA-PIPE (Lee i wsp., 2020), stworzonego w Laboratorium prof. Yijuna Ruana w Jackson Laboratory for Genomic Medicine (CT, USA). W skrócie: podczas analizy identyfikowany jest łącznik, który następnie jest usuwany z sekwencji. Zsekwencjonowane fragmenty, zawierające łącznik i dwie sekwencje DNA, tzw. PETs (*ang. paired-end tags*), mapowane są do genomu referencyjnego. Z uwagi na to, iż biblioteka ChIA-PET przygotowana jest z kilku milionów komórek, PET które występują tylko raz w puli zsekwencjonowanych cząsteczek, traktowane są jako przypadkowe, i nie brane pod uwagę w dalszej analizie.

Oprogramowanie to umożliwia weryfikację szeregu parametrów, świadczących o przydatności przygotowanej i zsekwencjonowanej biblioteki do dalszych analiz, m.in. procent sekwencji zawierających łącznik, stosunek interakcji wewnątrzchromosomowych do międzychromosomowych, procent sekwencji przypadkowych. Jedynie biblioteki spełniające wymagane kryteria mogą być analizowane.

Co ważne, w wyniku analizy uzyskuje się, nie tylko (i) mapy kontaktów w postaci pętli chromatynowych z przypisanymi do nich miejscami wiązania białka, tzw. PETs (takie pętle są uważane za najbardziej wiarygodne), ale także (ii) pliki, zawierające wszystkie sekwencje, w tym te nie zawierające łącznika. Umożliwiają one 2-wymiarową wizualizację kontaktów w postaci map cieplnych. Pierwsze z wymienionych plików (i) wizualizowano przy pomocy narzędzia BASIC Browser, natomiast (ii) przy pomocy narzędzia Juice Box (Robinson i wsp., 2018).

W bieżących eksperymentach, jako genomu referencyjnego użyto mysiego genomu, wersja mm10.

3.14. Odczynniki i bufory

Do sporządzenia buforów wykorzystywanych do przygotowania bibliotek ChIA-PET używano wody wolnej od nukleaz (Thermo Fisher Scientific). Do pozostałych buforów używano wody oczyszczonej przez odwróconą osmozę i ultrafiltrację (MiliQ).

Tab.3.6 Odczynniki stosowane w hodowli komórek

Nazwa	Producent	Numer katalogowy
B27	Gibco	17504-044
Deksametazon	Sigma	D4902
DMEN	Gibco	41965-039
Glutamina	Sigma	G7513
HBSS (<i>ang. Hanks Balanced Salt</i>)	Sigma	H641
HEPES	Thermo Fisher Scientific	15630080
Kwas glutaminowy	Sigma	G8415
Neurobasal	Gibco	21103-049
Penicylina/ Streptomycyna (10 000U/ml)	Sigma	P4333
Płodowa surowica bydlęca (FBS)	Gibco/ Life Technologies	10500-064

Poli-L-lizyna (PLL)	Sigma	P1274
Trypsyna	Gibco	15090_046

Tab.3.7 Odczynniki do hybrydyzacji, jej detekcji oraz mikroskopii

Nazwa	Producent	Numer katalogowy
Albumina surowicy bydłej (BSA)	Sigma	A7030
Alkohol etylowy, bezwodny 99,8%	POCH	396480111
Anty-kurze przeciwciało ośle sprzężone z Alexa Fluor 647	Jackson Immuno Research	703-605-155
Anty-awidyna sprzężona z FITC	Sigma	F1269
Anty-gęsie przeciwciało ośle sprzężone z DyLight 405	Jackson Immuno Research	705-475-147
Anty-kozie przeciwciało ośle sprzężone z TRITC	Thermo Scientific	SAS_10087
Anty-królicze przeciwciało gęsie sprzężone z Abberior Star 580	Abberior	ST580-1002
Anty-kurze przeciwciało gęsie sprzężone z DyLight 405	Jackson Immuno Research	103-477-008
Awidyna sprzężona z Alexa Fluor 488	Molecular Probes	A21370
Biotin-Nick Translation Kit	Roche	11745824910
Bufor 20xSSC	Invitrogen	15557044
Cement gumowy	Marabu	290117000
DNA kompetycyjny, Mouse Hyblock DNA	Applied Genetics Laboratories Inc.	MHB
DNA ze spermy łososa (Salmon Sperm)	Invitrogen	AM9680
Formamid	Calbiochem / Merck	344206
Gęsie przeciwciało przeciwko białku GFAP	Abcam	Ab 53554

Glicerol	POCH	443320113
Hoechst 33342	Thermo Scientific	H3570
Illustra Genomi Phi V2 DNA Amplification kit	GE Healthcare	25-6600-30
Królicze przeciwciało przeciwko H3K9Ac	Sigma	H9286
Królicze przeciwciało przeciwko H3K9me3	Merck	07-422
Kurze przeciwciało przeciwko NeuN	Milipore	ABN91
Kwas solny (HCl, 37%)	Fluka	258148
Medium do zamykania preparatów, Vectashield	Vector Laboratories	H-1000
Przeciwciało Abberior Star 635p sprzężone ze streptawidyną	Abberior	ST635P-0120
RNaza A	Sigma	R6513
Siarczan dekstranu	Milipore	S4030
Sytox Green	Thermo Fisher Scientific	S7020
Triton X-100	Sigma	T8532
Tween 20	Calbiochem / Merck	655204
Zestaw do blokowania endogennej biotyny	Vector Laboratories	SP-2001

Tab.3.8 Odczynniki stosowane do przygotowywania bibliotek ChIA-PET

Nazwa	Producent	Numer katalogowy
Albumina surowicy bydlęcej, BSA, molecular-biology grade, 20 mg/ml	New England Biolabs	B9000S
Alkohol etylowy, bezwodny 99,8%	Sigma-Aldrich	51976
Bufor 20×SSC	Thermo Fisher Scientific	AM9763
Bufor do cięcia restrykcyjnego 10× CutSmart buffer	New England Biolabs	B7204S

Bufor do ligacji NEBNext® Quick Ligation Reaction Buffer, 5×	New England Biolabs	B6058S
Bufor EB	Qiagen	19086
Bufor fosforanowy Dulbecco, bez wapnia i magnezu (DPBS)	Gibco	14190-250
Bufor fosforanowy, 10×PBS	Life Technologies	AM9937
Bufor HEPES-KOH pH 7.5	Fisher Scientific	PZ299-1
Bufor TE, pH 8.0, wolny od Rnaz	Thermo Fisher Scientific	AM9858
Chlorek litu (LiCl)	Sigma-Aldrich	L7026
Chlorek sodu (NaCl)	Sigma-Aldrich	S9888
dATP (100 mM)	New England Biolabs	N0440S
Dimetyloosulfotlenek (DMSO)	Sigma-Aldrich	D2650
EGS, (ethylene glycol bis(succinimidyl succinate))	Thermo Fisher Scientific	21565
Enzym restrykcyjny AluI	New England Biolabs	R0137L
Formaldehyd (FA, 36% v/v)	Sigma-Aldrich	47608-250ML-F
Glicyna	Sigma	G7126
iBlock Protein-Based Blocking Reagent	Thermo Fisher Scientific	T2015
Koktajl inhibitorów proteaz, cOmplete™ Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (PI)	Roche	11836170001
Kwas wersenowy (EDTA, 0.5 M, pH 8.0, RNase-free)	Thermo Fisher Scientific	AM9261
Ligaza DNA T4	New England Biolabs	M0202L
Mieszanina do reakcji PCR NEBNext®High-Fidelity 2×PCR Master Mix	New England Biolabs	M0541S
Mieszanina do reakcji Real Time PCR LightCycler®480 SYBR Green I Master	Roche	0-4707516001
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich	11754599001

Polimeraza DNA I, fragment Klenowa	New England Biolabs	M0210L
Proteinaza K	Thermo Fisher Scientific	AM2548
Przeciwciało przeciwko białku CTCF	Abclonal	A1133
Przeciwciało monoklonalne przeciwko Polimerazie RNA II	BioLegend	664912
SDS, sodium dodecyl sulfate	Thermo Fisher Scientific	AM9822
Sodium deoxycholate	Thermo Fisher Scientific	89904
Tris HCl, 1M, pH 7.5	Thermo Fisher Scientific	15567027
Triton X-100, molecular biology grade	Sigma-Aldrich	648464
Tween 20 (molecular biology grade)	Sigma-Aldrich	P9416
Woda wolna od nukleaz	Thermo Fisher Scientific	AM9932
Zestaw do elektroforezy DNA Agilent DNA High-Sensitivity Kit	Agilent Technologies	5067-4626
Zestaw do elektroforezy DNA BluePippin Cassette Kit	Sage Science	BDF2010
Zestaw do oczyszczania DNA QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen	28106
Zestaw do oczyszczania DNA, DNA Clean & Concentrator kit	Zymo Research	D4014
Zestaw do oznaczania stężenia DNA Qubit® dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Q32854
Zestaw do fragmentacji DNA Illumina Tagment DNA Enzyme and Buffer Large Kit	Illumina	20034198
Złoże magnetyczne do immunoprecypitacji chromatyny, Dynabeads Protein G beads	Thermo Fisher Scientific	10009D
Złoże magnetyczne do oczyszczania DNA AmPure XP beads (60 ml)	Beckman	A63881
Złoże magnetyczne opłaszczone streptawidyną Dynabeads M-280 Streptavidin	Thermo Fisher Scientific	11205D

Znaczniki DNA, do sekwencjonowania Nextera XT Index Kit v2 Set A	Illumina	FC-131-2001
---	----------	-------------

Tab.3.9 Pozostałe odczynniki

Nazwa	Producent	Numer katalogowy
Aerrane, anestetyk wziewny zawierający izofluran	Baxter Polska	Brak
Agaroza	Sigma-Aldrich	9012-36-6
Barwnik DNA, midori green	Genetics	MG04
Chloramfenikol	Sigma	C0378
Dexaven, roztwór do wstrzykiwań zawierający deksametazon	Bausch Health	-
dNTP	Thermo Scientific	R0192
Heptan	POCH	470470117
Inhibitor RNaz, Rnase OUT	Invitrogen	10777019
Inhibitor Rnaz, RNaseOUTTM Recombinant RNase Inhibitor	Invitrogen	10777-019
Losowe 6-cio nukleotydowe startery (Random hexamer primers)	Invitrogen	N8080127
Marker DNA O'RangeRuller 100+500pz	Thermo Scientific	SM0653
Mieszanina do reakcji PCR, GoTaq Green Master Mix	Promega	M7122
Mieszanina reakcyjna do reakcji Real Time PCR, Sybr Green	Roche	12239264001
Morbital	Biowet Puławy	Brak
Odwrotna transkryptaza, SuperScriptTM III Reverse Transcriptase	Invitrogen	18080-093
oligo(dT)	Invitrogen	18418012

Paraformaldehyd w proszku (PFA)	Sigma	P6148
PBS w proszku	Sigma	P3813
Podłoże płynne LB (Luria-Bertani Broth)	Bio-Shop	LBL405
Podłoże stałe LB, z agarem	Bio-Shop	LBL406
RNAlater	ThermoFisher Scientific	AM7020
Sacharoza	Bioshop Canada Inc.	SUC507.1
Sacharyna	Sigma-Aldrich	109185
Wodorotlenek sodu, NaOH	Sigma-Aldrich	655104
Zestaw do izolacji RNA Rneasy Mini	Qiagen	74004
Zestaw do oznaczania endogennego kortykosteronu we krwi (Corticosterone ELISA Kit)	Enzo Life Sciences	ADI-900_097

Tab.3.10 Media hodowlane i buforu.

Nazwa medium/ buforu	Skład
0,1xSSC, pH 7.0	0,5ml 20xSSC 99,5ml wody MiliQ
0.55% SDS solution	55µl of 10% SDS 10 ml wody wolnej od nukleaz
1% FA-DPBS	1,429ml 36% formaldehydu 50ml buforu DPBS
2mM EGS-DPBS	45.63mg EGS rozpuszczone w 250µl DMSO 50 ml buforu DPBS.
2.5 M glicyna (do ChIA-PET)	27.89g glicyny woda podwójnie destylowana do 100 ml
2xSSC, pH 7.0	50ml 20xSSC 450ml wody MiliQ
2xSSC/0.5% SDS	10ml 20xSSC 5ml of 10% SDS 85ml wody MiliQ
4xSSC/Tween 0,2%, pH 7.0	40ml 20xSSC 0,4ml Tween 20

	160ml wody MiliQ
50%formamid/ 2xSSC, pH 7.0	10ml 20xSSC 50ml formamidu 40ml wody MiliQ
bufor Anti-freeze	300 ml glicerolu 300 ml glikolu etylenowego 300 ml wody MiliQ 100 ml buforu (o składzie: 3,365g NaH ₂ PO ₄ , 0,77gNaOH, woda do 100ml)
bufor blokujący (<i>ang.</i> <i>iBlock buffer</i>)	2g iBlock Protein-Based Blocking Reagent 5ml 10% SDS woda do 100ml
bufor cytrynianowy, pH 6.0	2,94g Tri-sodium citrate dihydrate 0,5ml Tween 20 1000ml wody MiliQ
bufor do elektroforezy, 10x stężony, 1l	10g SDS 144,1g glicyny 30,3g Trisma base woda do 1000ml
bufor do lizy komórek	50 mM HEPES-KOH pH 7.5 150 mM NaCl 1mM EDTA 1% Triton X-100 0.1% sodium deoxycholate 0.1% SDS
bufor do permeabilizacji jąder komórkowych	10μl 10% SDS 9890μl wody 100μl inhibitora proteaz
bufor do sonikacji	5ml 0,1%SDS-FA 1ml 1% SDS-FA
bufor elucyjny (<i>ang.</i> <i>ChIP elution buffer</i>)	50mM Tris·HCl pH 7.5 10mM EDTA 1% SDS
bufor HBSS	50ml 10xHanks Balanced Salt 16.5ml HEPES 0,3M, pH 7.3 5ml Pen/Strep dopełnić sterylną wodą MiliQ do 500ml
bufor LiCl	10 mM Tris·HCl pH 8.0 250mM LiCl

	1mM EDTA 0.5% Nonidet P-40 0.5% sodium deoxycholate
bufor o niskiej zawartości soli	5mM Tris-HCl pH 7.5 0,5mM EDTA 0,15M NaCl
bufor o wysokiej zawartości soli	5mM Tris-HCl pH 7.5 0.5mM EDTA 1M NaCl
bufor PBS, pH 7.4	1,09 g Na ₂ HPO ₄ 0,3 g NaH ₂ PO ₄ 9 g NaCl woda do 1000 ml
bufor wiążący/ myjący 1x	5 mM Tris·HCl pH 7.5 0.5 mM EDTA 1M NaCl
bufor wiążący/ myjący 2x	5 mM Tris·HCl pH 7.5 1mM EDTA 1M NaCl
DNA blokujące (<i>ang.</i> sheared genomic DNA mixture)	fragmenty mysiego, całkowitego DNA o wielkości 200-1000kbp
medium hodowlane do hodowli astrocytów	DMEM Hi-glukose 10% FBS 1% pen/ strep
medium hodowlane do hodowli neuronów	50ml pożywki Neurobasal 125ul Glataminy (stężenie końcowe 0.5mM) 62,5ul kwasu glutaminowego (stężenie końcowe 12,5 uM) 0,5ml Pen/Strep (końcowe stężenie 1%) 1ml B27
PBST (do hybrydyzacji)	10ml 1xPBS 50μl Triton X-100
PBST (do ChIA-PET)	10ml 10xPBS 100μl Tween 20 89.9ml wody MiliQ

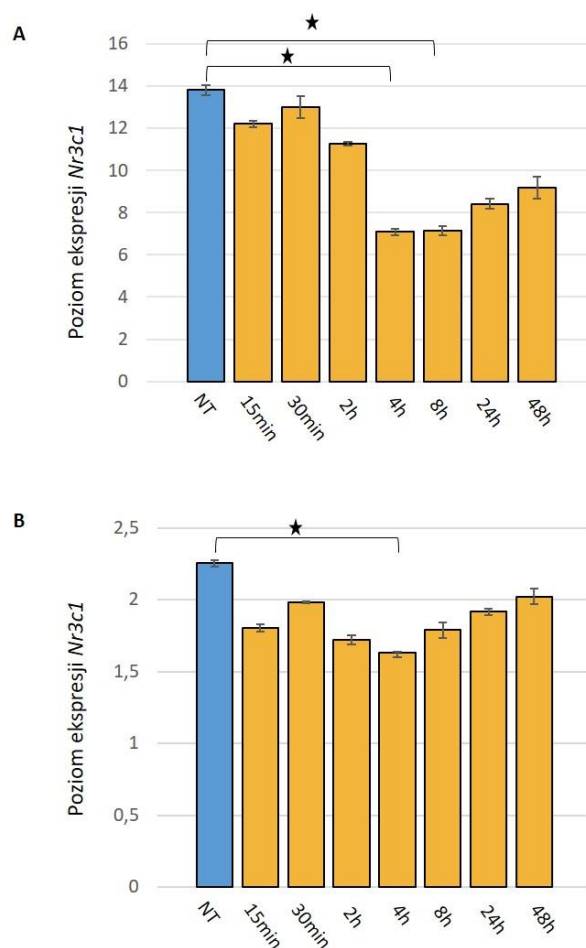
roztwór do perfuzji/ utrwalania PFA	40g PFA 1.15g Na ₂ HPO ₄ 0,228g NaH ₂ PO ₄ 9g NaCl woda do 1000ml
--	---

4. Wyniki

W przedstawionych w niniejszej pracy wynikach zastosowano kod kolorów, wyniki uzyskane dla grupy kontrolnej prezentowano zawsze w kolorze niebieskim, a dla grup traktowanych – kolorem pomarańczowym.

4.1. Analiza zmian ekspresji genu *Nr3c1* wywołanych działaniem deksametazonu (model *in vitro*)

Choć patogeneza depresji wciąż nie jest do końca jasna to jednym z najlepiej poznanych dotąd genów/ białek, o udokumentowanym udziale w rozwoju zaburzeń lękowych i depresji jest gen *Nr3c1*, kodujący białko - GR, odpowiedzialne za zaburzenia osi HPA (Bamberger i wsp., 1996; Farrell i O'Keane, 2016). W literaturze znajdziemy wiele informacji na temat zmian ekspresji genu *Nr3c1* po podaniu DEX – czynnika o udokumentowanym działaniu prodepresyjnym. W pierwszym etapie projektu wykonano analizy mające na celu sprawdzenie czy DEX powoduje zależne od czasu zmiany w ekspresji genu *Nr3c1* w neuronach i astrocytach kory przedczołowej, w wybranym układzie eksperymentalnym oraz w jakim punkcie czasowym zmiany będą najbardziej wyraźne. Analizy wykonano na pierwotnych hodowlach neuronalnych i astrocytarnych. Hodowle zakładano z fragmentów kory czołowej pobranych od mysich embrionów (E16). Po dwóch tygodniach, kiedy w hodowlach neuronalnych widoczna była dobrze rozwinięta sieć połączeń, obydwie typy hodowli komórkowych (neuronalne i astrocytarne) poddawano działaniu DEX, o stężeniu końcowym 100nM w podłożu hodowlanym. Ekspresję genu *Nr3c1* sprawdzano w następujących punktach czasowych: 15 i 30 minut oraz 2, 4, 8, 24 i 48 godzin po podaniu DEX. Po zakończeniu inkubacji, izolowano RNA z komórek, przepisano je na cDNA w wyniku reakcji odwrotnej transkrypcji, a następnie poziom ekspresji mierzono za pomocą metody Real-Time PCR pozwalającej na pomiar ilości transkryptów w czasie rzeczywistym. Jako kontroli negatywnej użyto starterów zaprojektowanych dla genu *HPRT1* (ang. *hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*). Gen ten należy do tzw. „housekeeping genes”, czyli genów metabolizmu podstawowego i charakteryzuje się stałą, niską ekspresją we wszystkich komórkach somatycznych. Eksperyment przeprowadzono w dwóch powtórzeniach biologicznych. Dodatkowo dla każdego eksperymentu wykonano po trzy powtórzenia techniczne.



Ryc.4.1 Analiza ekspresji genu *Nr3c1* w korowych pierwotnych hodowlach astrocytarnych (A) i neuronalnych (B). Kolorem niebieskim zaznaczono komórki kontrolne – nie traktowane DEX (NT), kolorem pomarańczowym zaś – komórki traktowane DEX, w kolejnych punktach czasowych (15 min-48h). Istotność statystyczna obliczono stosując test t Welcha, gdzie * oznacza $p < 0,05$ (dla A: NTvs4h $p = 0,014$, NTvs8h $p = 0,018$, dla B NTvs4h $p = 0,02$).

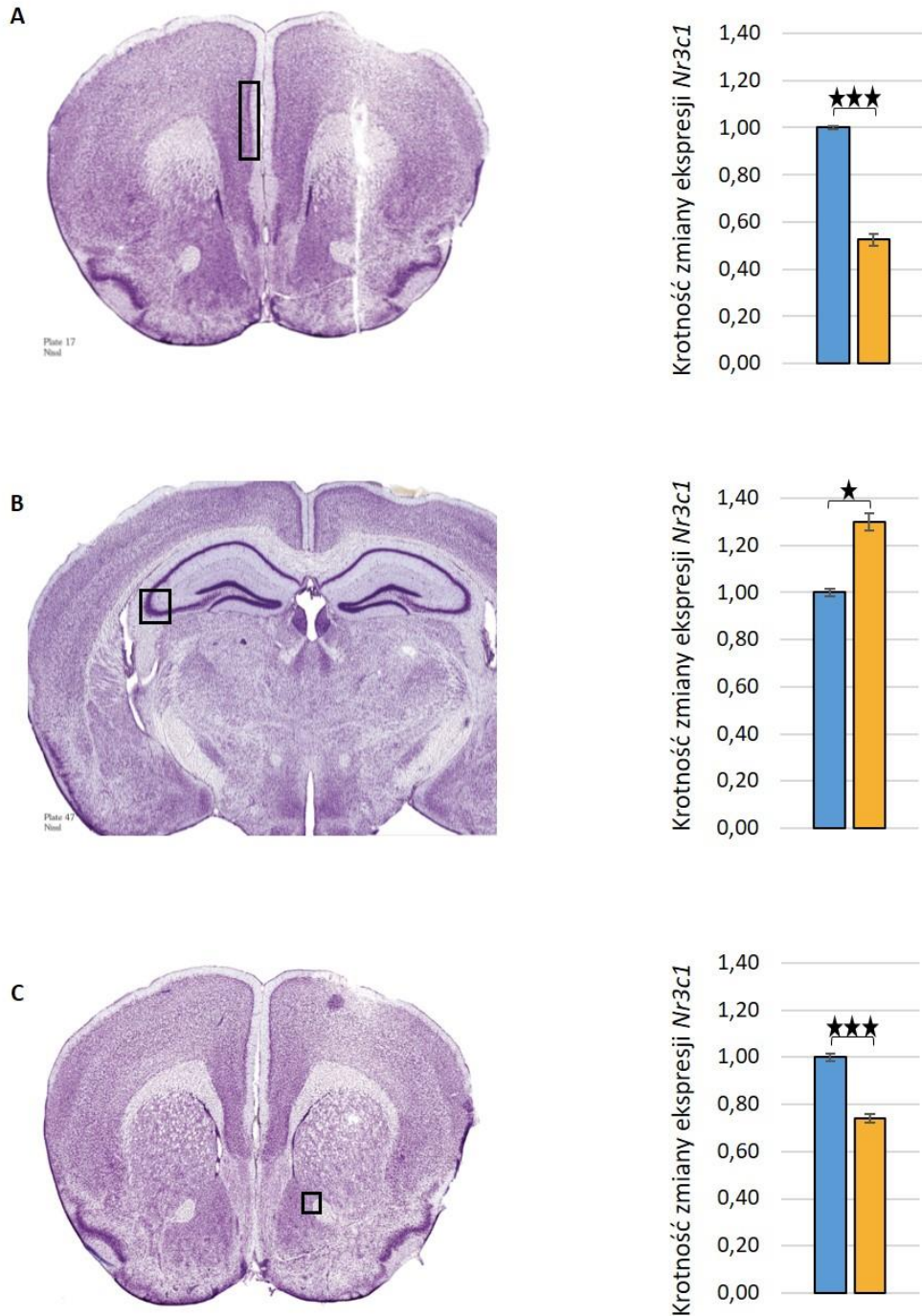
Wyniki analiz pozwoliły stwierdzić, iż DEX wpływa na poziom ekspresji genu *Nr3c1* w badanych komórkach – wraz z czasem ilość transkryptów ulegała zmniejszeniu (Ryc.4.1). Przy czym, najbardziej drastyczne zmiany obserwowane były w komórkach astrocytarnych (Ryc.4.1 A). Największy spadek ekspresji zaobserwowano po 4 godzinach od podania DEX, o blisko połowę, w stosunku do kontroli. Niski poziom utrzymywał się przez kolejne kilka godzin. Po 24 godzinach obserwowano ponownie zwiększony poziom ekspresji, który rósł aż do zakończenia eksperymentu po 48 godzinach od podania DEX, osiągając końcowo blisko 70% poziomu wyjściowego.

W przypadku neuronów schemat zmian poziomu ekspresji przypominał ten zaobserwowany dla astrocytów, przy czym zmiany były wyraźnie mniejsze w każdym z analizowanych punktów czasowych (Ryc.4.1 B). Podobnie, jak w przypadku astrocytów najniższą ekspresję osiągnięto po 4 godzinach od rozpoczęcia inkubacji z DEX. Z tego względu ten punkt czasowy wybrano do dalszych analiz.

Podsumowując, największe zmiany w poziomie ekspresji genu *Nr3c1* obserwowano po 4 godzinach inkubacji z DEX, w obu typach hodowli komórkowych. Astrocyty charakteryzowały się wyższym bezwzględnym poziomem ekspresji genu *Nr3c1* w porównaniu do neuronów.

4.2. Analiza zmian ekspresji genu *Nr3c1* po jednorazowym podaniu deksametazonu – zwierzęcy model silnego stresu.

W związku z obniżonym poziomem ekspresji genu *Nr3c1* w hodowlach pierwotnych, w kolejnym etapie projektu sprawdzono, czy DEX wywołuje podobny efekt w organizmie, a dokładniej w trzech strukturach mózgu: korze przedczołowej, hipokampie i jądrze półęzającym, o których wiadomo, iż podlegają licznym zmianom m.in. morfologicznym w wyniku rozwoju depresji. W tym celu, u 9-10 tygodniowych samców myszy szczepu C57BL/6J indukowano silny stres, poprzez jednorazowe podanie Dexavenu (Bausch Health) - leku zawierającego DEX, w dawce 4mg/ kg masy ciała. Lek podawano w postaci zastrzyku dootrzewnowego. Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta, którym podano zastrzyki z soli fizjologicznej. Cztery godziny po podaniu zastrzyku zwierzęta uśmiercano w sposób humanitarny, a z pobranych mózgów wyodrębniano badane struktury. Ze względu na niewielkie rozmiary struktur, materiał pochodzący od kilku zwierząt (zazwyczaj od 4 do 6 osobników) łączono w jednej próbce. Sposób postępowania był podobny jak, opisany w rozdziale 4.1 – z materiału tkankowego izolowano RNA, przepisywano na cDNA w reakcji odwrotnej transkrypcji. Poziom ekspresji mierzono w reakcji Real-Time PCR. Jako kontroli negatywnej użyto starterów dla genu *HPRT1*. Wyniki przedstawiono w postaci krotności poziomu ekspresji (*ang. fold change*), gdzie wartość dla kontroli była zawsze równa 1.



Ryc.4.2 Analiza ekspresji genu *Nr3c1* w strukturach mózgu myszy: korze przedczołowej (A), hipokampie (B) i jądrze półłożącym (C), 4 godziny po jednorazowym podaniu DEX. Kolorem niebieskim zaznaczono komórki kontrolne – nietraktowane DEX (NT), kolorem pomarańczowym zaś – komórki traktowane DEX. Istotność statystyczna obliczono stosując test Anova ($p=0,00000014$, a następnie testem t Welcha, gdzie *** oznacza $p<0,001$ (dla A $p=0,00037$, dla C $p=0,000297$), * oznacza $p<0,05$ (dla B $p=0,021$). Dodatkowo, na przekrojach mózgu myszy, z atlasu anatomicznego (Paxinos i Franklin, 2007), zawierających analizowane struktury mózgu, czarnymi kwadratami oznaczono fragmenty struktur, gdzie wykonywano skanowanie mikroskopowe w następstwie immunofluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*, której wyniki zamieszczono w rozdziale 4.3.

Uzyskane wyniki wskazywały jednoznacznie, iż DEX, w cztery godziny od podania, wywoływał istotne statystycznie zmiany poziomu ekspresji genu *Nr3c1*, nie tylko w hodowlach komórkowych, ale także w żywym organizmie. Zmiany obserwowano we wszystkich trzech badanych strukturach mózgu (Ryc.4.2).

Co ciekawe jednak, nie we wszystkich strukturach odpowiedź na DEX była taka sama. Poziom ekspresji zmniejszał się w korze przedczołowej (o 25%, Ryc.4.2 A) i jądrze półleżącym (o niemal 50%, Ryc.4.2 C). W hipokampie natomiast ulegał podwyższeniu (Ryc.4.2 B) o ok. 30% w stosunku do kontroli.

Zmiany poziomu ekspresji były wyraźne we wszystkich badanych strukturach mózgu już po 4 godzinach od podania DEX, co potwierdziło, iż ten test punkt czasowy jest odpowiedni do przeprowadzenia dalszych analiz.

Podsumowując, cztery godziny po jednorazowym podaniu DEX myszom, w postaci zastrzyku dootrzewnowego, dochodziło do zmniejszenia poziomu ekspresji genu *Nr3c1* w korze przedczołowej i jądrze półleżącym i zwiększenia poziomu ekspresji tego genu w hipokampie.

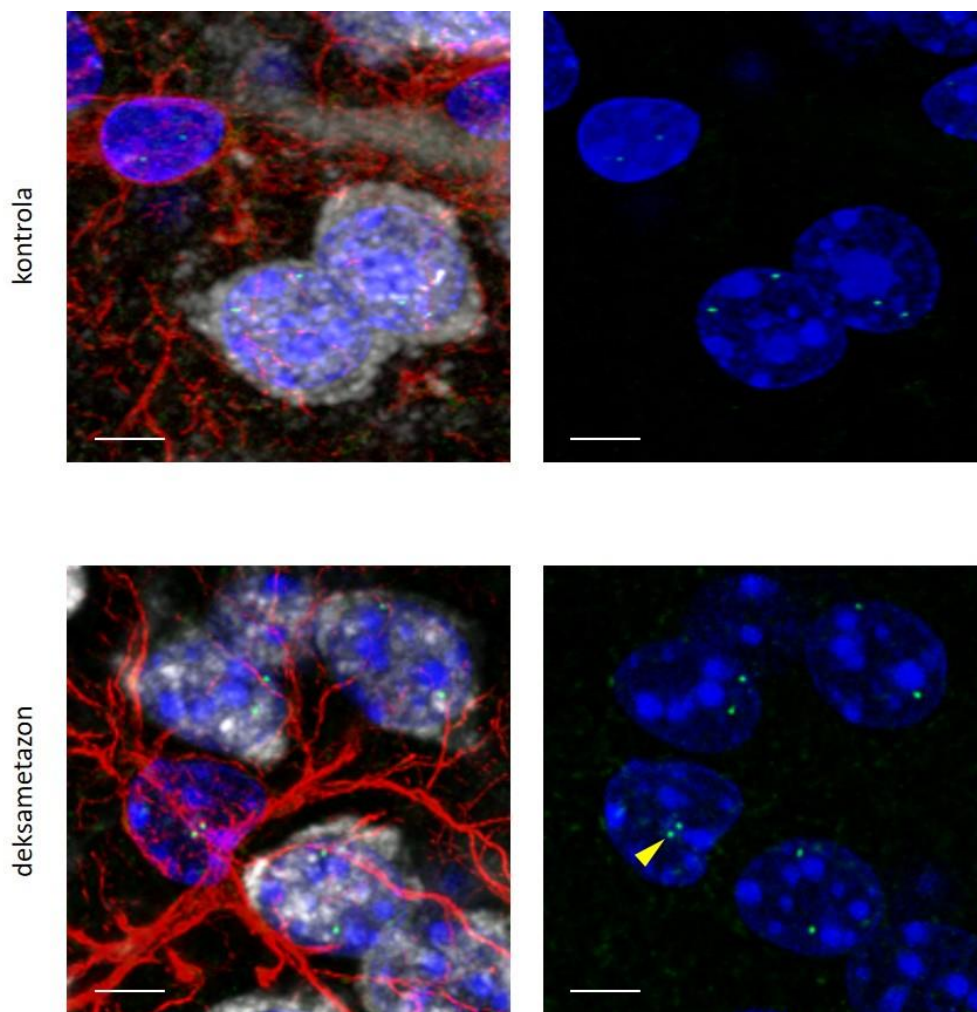
4.3. Analiza zmian morfometrycznych w obrębie jądra komórkowego po jednorazowym podaniu deksametazonu – zwierzęcy model silnego stresu.

Wiadomo, iż zmiany ekspresji genów są ściśle związane z trójwymiarową organizacją chromatyny w jądrze komórkowym. Obserwowane zmiany ekspresji genu *Nr3c1* były istotne we wszystkich badanych strukturach mózgu. Pojawiło się zatem pytanie, czy zmiany te są powiązane ze zmianami organizacji chromatyny w obrębie genu kodującego GR, m.in., czy allele tego genu ulegają przemieszczeniu wewnątrz jądra komórkowego. Aby odpowiedzieć na powyższe pytanie, zastosowano metodę FISH połączoną z trójwymiarową analizą stosów obrazów mikroskopowych.

Doświadczenia wykonano na materiale tkankowym pochodzącym od zwierząt, u których wywoływano silny stres w skutek jednorazowego podania Dexavenu (Bausch Health, dawka leku 4mg/ kg masy ciała), w postaci dootrzewnowych zastrzyków oraz zwierzętach kontrolnych. Preparaty wykonywano wg. opisu przedstawionego w punkcie 3.6. Przygotowane preparaty skanowano sekwencyjnie przy użyciu mikroskopu konfokalnego. W przypadku kory przedczołowej skanowano obszar II i III warstwy, dla

hipokampa – obszar CA3, a dla jądra półleżącego – obszar rdzenia (core). Skanowane obszary dla każdej ze struktur, zaznaczono czarnymi prostokątami na przekrojach mózgu, na Ryc.4.2.

Co ciekawe, już na zdjęciach konfokalnych zauważalne były różnice w lokalizacji alleli genu *Nr3c1* wewnątrz jąder komórkowych (Ryc.4.3). U zwierząt kontrolnych allele zlokalizowane były głównie w obszarach chromatyny nieskondensowanej (o niższej fluorescencji, ciemniejszych), natomiast u zwierząt traktowanych DEX ich lokalizacja zmieniała się i częściej obserwowane były w obszarach o skondensowanej chromatynie (wyższej intensywności fluorescencji, jaśniejszych), tzw. chromocentrach.



Ryc.4.3 Obraz konfokalny przedstawiający fragment rdzenia jądra półleżącego. U zwierzęcia kontrolnego wszystkie allele zlokalizowane były w obszarach o nieskondensowanej chromatynie (jaśniejszy odcień wybarwionego na niebiesko DNA). U zwierząt traktowanych DEX allele obserwowane były także w obszarach skondensowanej chromatyny (ciemniejszy odcień niebieskiego wewnątrz jądra komórkowego), co zostało wyróżnione żółta strzałką. Kolory: niebieski – DNA, zielony – allele genu *Nr3c1*, czerwony – GFAP, znacznik astrocytów, srebrny – NeuN, znacznik neuronów. Skala 5µm.

Aby stwierdzić, czy przemieszczenie alleli wewnątrz jądra komórkowego nie jest artefaktem, wykonano analizę zmian morfometrycznych z użyciem programu Segmentation magick (Ruszczycki i Wilczyński, 2011; Ruszczycki i wsp., 2019).

Analizę przeprowadzono na 4 osobnikach z każdej grupy (kontrola i DEX). Dla każdego osobnika wykonano po 2-3 hybrydyzacje dla każdej z 3 badanych struktur. Następnie w obrębie każdego z preparatów wykonano po 3 skany sekwencyjne (obszar skanowania 2048x2048 pikseli w osi x-y i około 170 płaszczyzn w osi z, w zależności od ułożenia skrawka tkankowego na szkiełku). Segmentację przeprowadzono na wszystkich uzyskanych stosach obrazów mikroskopowych. Do analizy morfologicznej wykorzystano jedynie te jądra, które zostały wysegmentowane poprawnie i zawierały 2 allele. Ilość jąder, na których wykonano analizy morfologiczne, z rozróżnieniem na neurony i astrocyty zamieszczono w tabeli Tab.4.1.

Struktura mózgu	rodzaj komórek	zwierzęta kontrolne					zwierzęta traktowane				
		M1	M2	M3	M4	Suma	M1	M2	M3	M4	Suma
kora przedczołowa	liczba astrocytów	36	37	45	35	153	47	33	42	29	151
	liczba neuronów	92	136	75	94	397	154	104	121	85	464
jadro półleżące	liczba astrocytów	37	45	67	55	204	64	47	50	59	220
	liczba neuronów	51	178	229	102	560	82	105	185	94	466
Hipokamp	liczba astrocytów	90	55	74	48	267	90	47	53	38	228
	liczba neuronów	122	160	169	141	592	214	145	186	164	709
Suma					2173	Suma					2238

Tab.4.1 Liczba jąder, na których przeprowadzono analizy morfometryczne, z rozróżnieniem na neurony i astrocyty, uzyskanych dla każdej ze struktur i każdego z osobników. Kolorem niebieskim zaznaczono informacje dotyczące zwierząt kontrolnych, kolorem pomarańczowym – zwierząt traktowanych DEX.

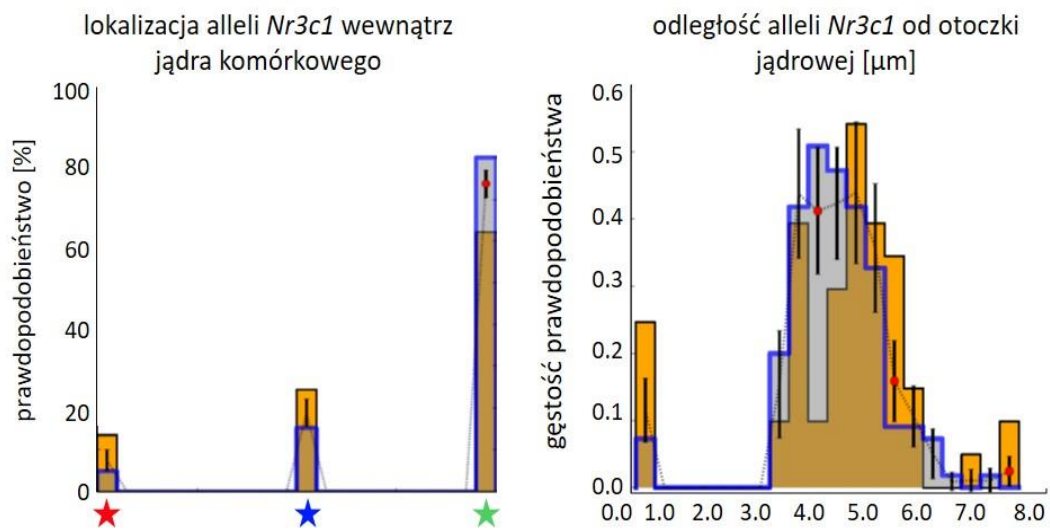
W trakcie analizy sprawdzono wiele parametrów, jednak najbardziej interesujące z punktu widzenia projektu, wydały się wyniki określające lokalizację alleli wewnątrz jądra komórkowego, z rozróżnieniem na obszary skondensowanej i nieskondensowanej chromatyny, a także pomiar odległości alleli od otoczki jądrowej.

Analizy morfometryczne przeprowadzone na kilku tysiącach jąder komórkowych potwierdziły zaobserwowane wcześniej na obrazach mikroskopowych (Ryc.4.3), przemieszczenie alleli genu *Nr3c1* w obrębie jądra komórkowego na skutek działania DEX (Ryc.4.4, Ryc.4.5, Ryc.4.6).

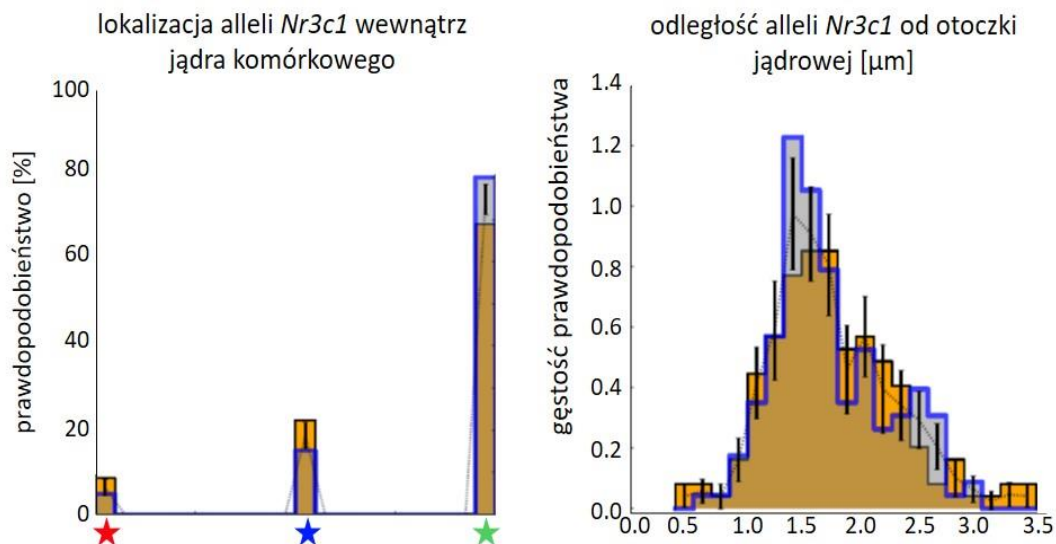
Co ciekawe, choć kierunek obserwowanych zmian lokalizacji był jednakowy dla astrocytów i neuronów w poszczególnych strukturach, to podobnie jak w przypadku analizy poziomu ekspresji w hodowlach komórkowych, zmiany były wyraźnie mniejsze w neuronach, niż w astrocytach. Ta sama tendencja występowała we wszystkich trzech analizowanych strukturach mózgu.

Dodatkowo, kierunek przemieszczania się alleli nie był taki sam dla wszystkich struktur. W przypadku kory przedczołowej (Ryc.4.4) i jądra półleżącego (Ryc.4.6) allele przemieszczały się z obszarów o nieskondensowanej chromatynie, do obszarów o chromatynie skondensowanej, najprawdopodobniej nieaktywnej transkrypcyjnie. W korze przedczołowej, pomimo istotnego statystycznie przemieszczenia alleli wywołanego podaniem Dexavenu ($p < 0,01$), znaczna większość komórek posiadała obydwa kopie genu *Nr3c1* związane z chromatyna skondensowaną (oznaczone na wykresie zieloną gwiazdką). Drastyczną zmianę obserwowano w przypadku jądra półleżącego. Tutaj u zwierząt kontrolnych ok. 90% komórek posiadało obydwa allele zlokalizowane w obszarach nieskondensowanej chromatyny, natomiast po 4 godzinach od podania DEX liczba takich komórek zmniejszyła się do kilkunastu procent. Wzrosła natomiast do 57 wzrósł procent komórek, gdzie dwa allele związane były z chromatyna skondensowaną, z ok. 2% u zwierząt kontrolnych (oznaczone na wykresie czerwoną gwiazdką).

ASTROCYTY

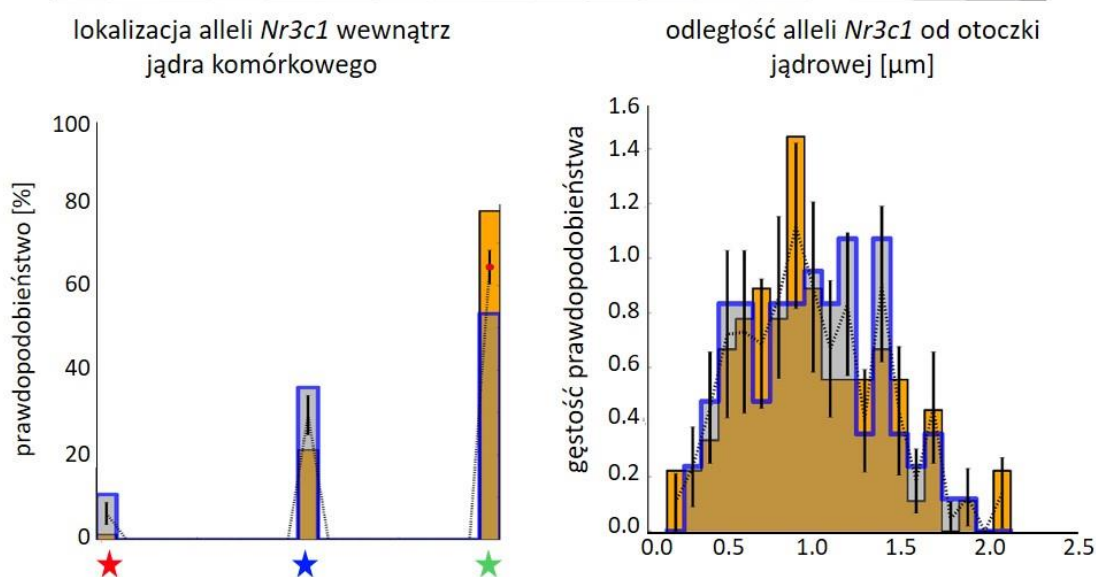


NEURONY

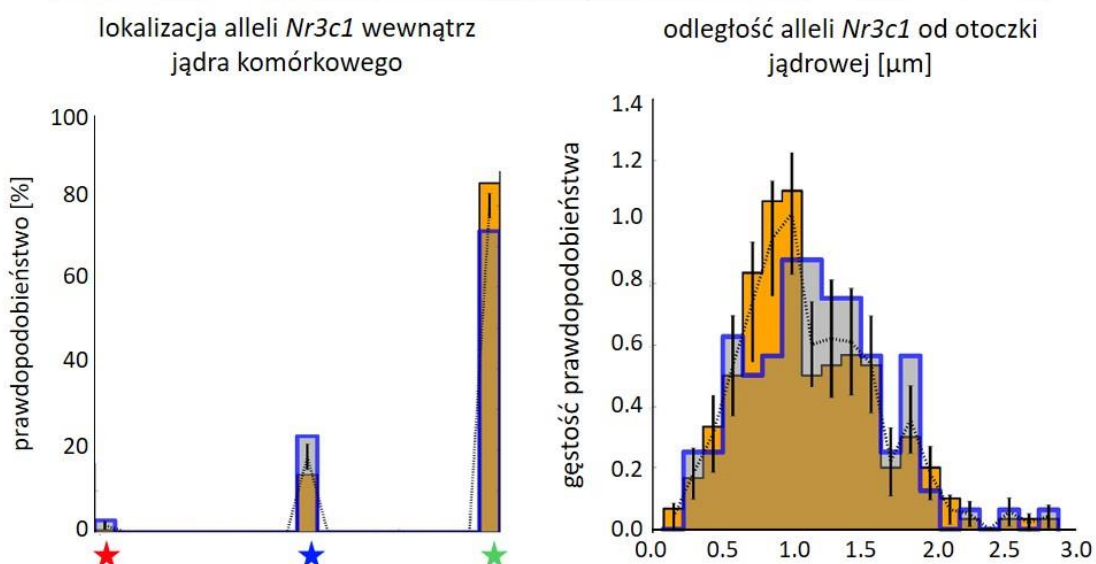


Ryc.4.4 Wyniki analizy lokalizacji alleli genu *Nr3c1* wewnątrz jądra komórkowego i odległości tychże alleli od otoczki jądrowej dla astrocytów i neuronów kory przedczołowej, przed i po podaniu DEX. Wyniki przedstawiono w postaci słupków gęstości prawdopodobieństwa lub prawdopodobieństwa. Czerwone kropki na słupkach błędów oznaczają istotność statystyczną na poziomie $p < 0,01$, liczoną za pomocą testu Monte Carlo. Gwiazdki pod wykresem lokalizacji alleli wewnątrz jądra komórkowego oznaczają: gwiazdka czerwona – obydwie allele znajdują się w obszarze skondensowanej chromatyny, niebieska – jeden z alleli znajduje się w obszarze chromatyny skondensowanej, drugi – nieskondensowanej, gwiazdka zielona – obydwie allele znajdują się w obszarze chromatyny nieskondensowanej. Na osi x wykresów przedstawiających odległość alleli od otoczki jądrowej, znajdują się odległości w μm . Na obu wykresach kolorem niebieskim oznaczone są pomiary dla grupy kontrolnej, a kolorem pomarańczowym – dla grupy traktowanej DEX.

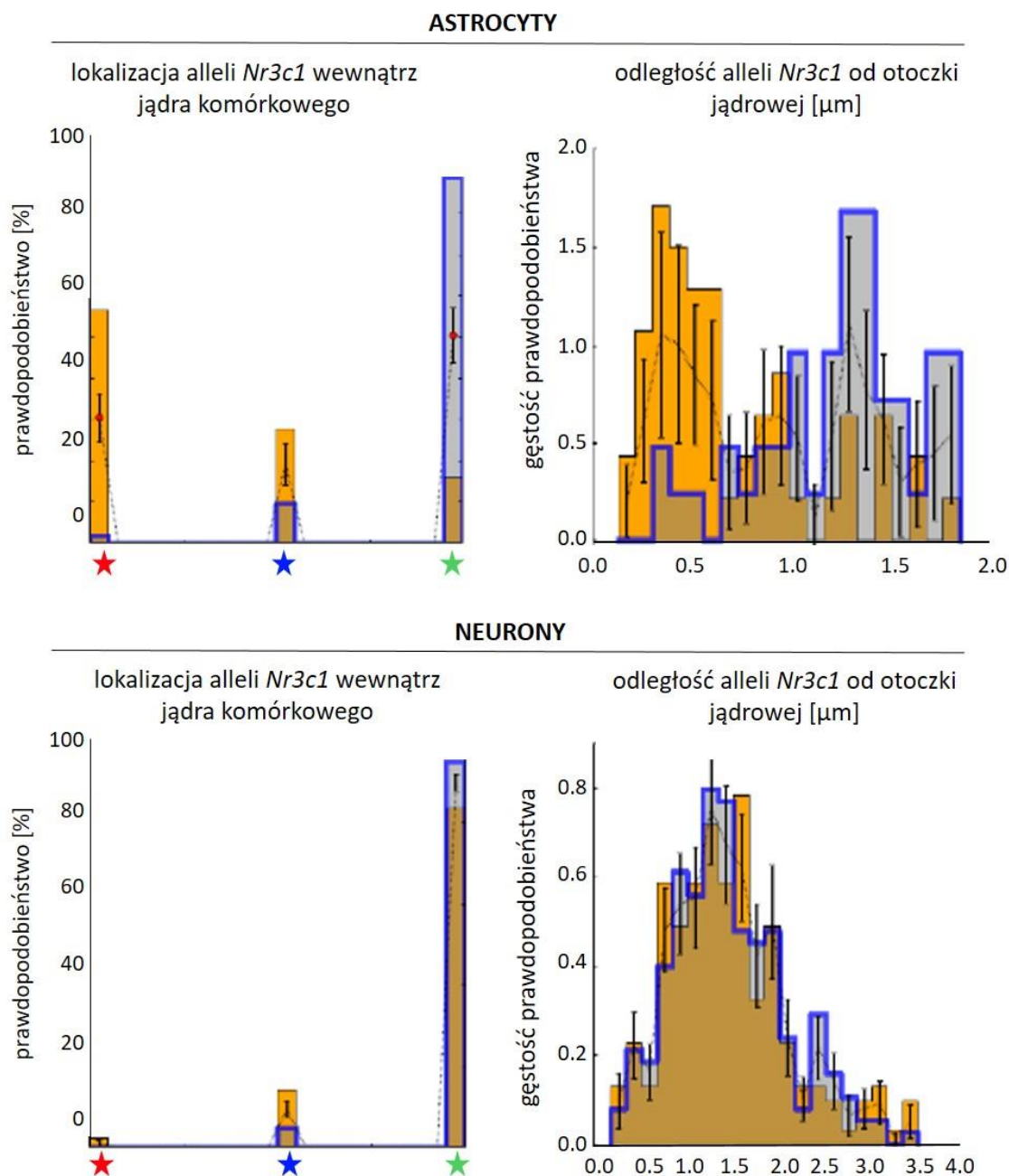
ASTROCYTY



NEURONY



Ryc.4.5 Wyniki analizy lokalizacji alleli genu *Nr3c1* wewnątrz jądra komórkowego i odległości tychże alleli od otoczki jądrowej dla astrocytów i neuronów hipokampa, przed i po podaniu DEX. Wyniki przedstawiono w postaci słupków gęstości prawdopodobieństwa lub prawdopodobieństwa. Czerwone kropki na słupkach błędów oznaczają istotność statystyczną na poziomie $p < 0,01$, liczoną za pomocą testu Monte Carlo. Gwiazdki pod wykresem lokalizacji alleli wewnątrz jądra komórkowego oznaczają: gwiazdka czerwona – obydwie allele znajdują się w obszarze skondensowanej chromatyny, niebieska – jeden z alleli znajduje się w obszarze chromatyny skondensowanej, drugi – nieskondensowanej, gwiazdka zielona – obydwie allele znajdują się w obszarze chromatyny nieskondensowanej. Na osi x wykresów przedstawiających odległość alleli od otoczki jądrowej, znajdują się odległości w μm . Na obu wykresach kolorem niebieskim oznaczone są pomiary dla grupy kontrolnej, a kolorem pomarańczowym – dla grupy traktowanej DEX.



Ryc.4.6 Wyniki analizy lokalizacji alleli genu *Nr3c1* wewnątrz jądra komórkowego i odległości tychże alleli od otoczki jądrowej dla astrocytów i neuronów jądra półleżącego, przed i po podaniu DEX. Wyniki przedstawiono w postaci słupków gęstości prawdopodobieństwa lub prawdopodobieństwa. Czerwone kropki na słupkach błędów oznaczają istotność statystyczną na poziomie $p < 0,01$, liczoną za pomocą testu Monte Carlo. Gwiazdki pod wykresem lokalizacji alleli wewnątrz jądra komórkowego oznaczają: gwiazdka czerwona – obydwa allele znajdują się w obszarze skondensowanej chromatyny, niebieska – jeden z alleli znajduje się w obszarze chromatyny skondensowanej, drugi – nieskondensowanej, gwiazdka zielona – obydwa allele znajdują się w obszarze chromatyny nieskondensowanej. Na osi x wykresów przedstawiających odległość alleli od otoczki jądrowej, znajdują się odległości w μm . Na obu wykresach kolorem niebieskim oznaczone są pomiary dla grupy kontrolnej, a kolorem pomarańczowym – dla grupy traktowanej DEX.

W komórkach hipokampa kierunek przemieszczania alleli był przeciwny do tego obserwowanego w dwóch pozostałych strukturach. Tutaj allele ulegały przemieszczeniu do obszarów chromatyny nieskondensowanej (Ryc.4.5). Wzrost liczby komórek, gdzie 2 allele znajdowały się w obszarze chromatyny nieskondensowanej wyniósł 25%, w stosunku do grupy kontrolnej.

Ponadto, zmianie ulegała także odległość alleli od otoczki jądrowej. W przypadku jądra półleżącego (Ryc.4.6) zmiany odległości miały miejsce głównie w astrocytach. Średnia odległość zmniejszyła się z 13 μ m do 3 μ m. Niewielkie zmiany w odległości zaobserwowano także dla neuronów hipokampa (Ryc.4.5). W astrocytach kory przedczołowej allele w komórkach kontrolnych znajdowały się w odległości od 3 do 6 μ m od otoczki jądrowej. Natomiast po podaniu DEX allele bądź zbliżały się do otoczki jądrowej, bądź też ich odległość była większa niż w kontroli. W pozostałych komórkach, badanych struktur mózgu, nie zaobserwowano istotnych zmian w odległości alleli od otoczki jądrowej.

Podsumowując, cztery godziny po jednorazowym podaniu DEX myszom dochodziło do przemieszczenia alleli do obszarów skondensowanej chromatyny w korze przedczołowej i jądrze półleżącym. Natomiast w hipokampie zachodził proces przemieszczenia alleli do obszarów nieskondensowanej chromatyny. Zmiany te zachodziły głównie w astrocytach.

4.4. Analiza zmian kolokalizacji alleli genu *Nr3c1* z markerami chromatyny aktywnej i nieaktywnej transkrypcyjnie, wywołanych przez jednorazowe podanie deksametazonu (model *in vitro*).

Powyższe wyniki pozwoliły stwierdzić, iż po jednorazowym podaniu DEX allele genu *Nr3c1* ulegają przemieszczaniu pomiędzy obszarami skondensowanej i nieskondensowanej chromatyny, wewnątrz jądra komórkowego. Aby zweryfikować, czy przemieszczenia te są związane z aktywnością transkrypcyjną genu i sąsiadującej z nim chromatyny wykonano szereg hybrydyzacji FISH połączonych z barwieniami immunocytochemicznymi dla markerów chromatyny aktywnej i nieaktywnej transkrypcyjnie. Aby uzyskać większą rozdzielczość obrazów mikroskopowych, a co za tym idzie dokładniejsze wyniki, używany dotąd mikroskop konfokalny zastąpiono mikroskopią superrozdzielczą typu STED. Ze względu na ograniczenia tego typu

mikroskopii, barwienia wykonano na korowych pierwotnych hodowlach neuronalnych i astrocytarnych, kontrolnych i inkubowanych z DEX.

2-tygodniowe hodowle komórkowe traktowano DEX, o końcowym stężeniu w podłożu hodowlanym 100nM. Po 4 godzinach, komórki utrwalano. Hybrydyzacje i barwienia wykonywano przy użyciu zmodyfikowanej metody FISH poprzedzonej znakowaniem modyfikacji potranslacyjnych histonów (Solovei i Cremer, 2010).. Preparaty przygotowano wg. opisu zamieszczonego w punkcie 3.5. Jako znacznik chromatyny aktywnej transkrypcyjnie wybrano H3K9Ac (acetylowana lizyna 9, na histonie 3), zaś dla chromatyny nieaktywnej – H3K9me3 (trójmetylowaną lizynę 9, na histonie 3). Przygotowane preparaty obrazowano przy użyciu mikroskopu Leica SP8 z modułem do mikroskopii superrozdzielczej 3X-STED. Skanowano sekwencyjnie z rozdzielczością 24nm w osiach x-y i 183nm w osi z.

Zobrazowane jądra komórkowe analizowano przy użyciu algorytmu specjalnie w tym celu opracowanego wspólnie z dr. Błażem Ruszczyckim z Instytutu Biologii Doświadczalnej, PAN. Zaletą algorytmu była możliwość analizowania oryginalnych stosów obrazów mikroskopowych, bez konieczności wykonywania wcześniejszej dekonwolucji. Ilość przeanalizowanych jąder dla każdego z punktów eksperymentalnych zamieszczono w tabeli poniżej.

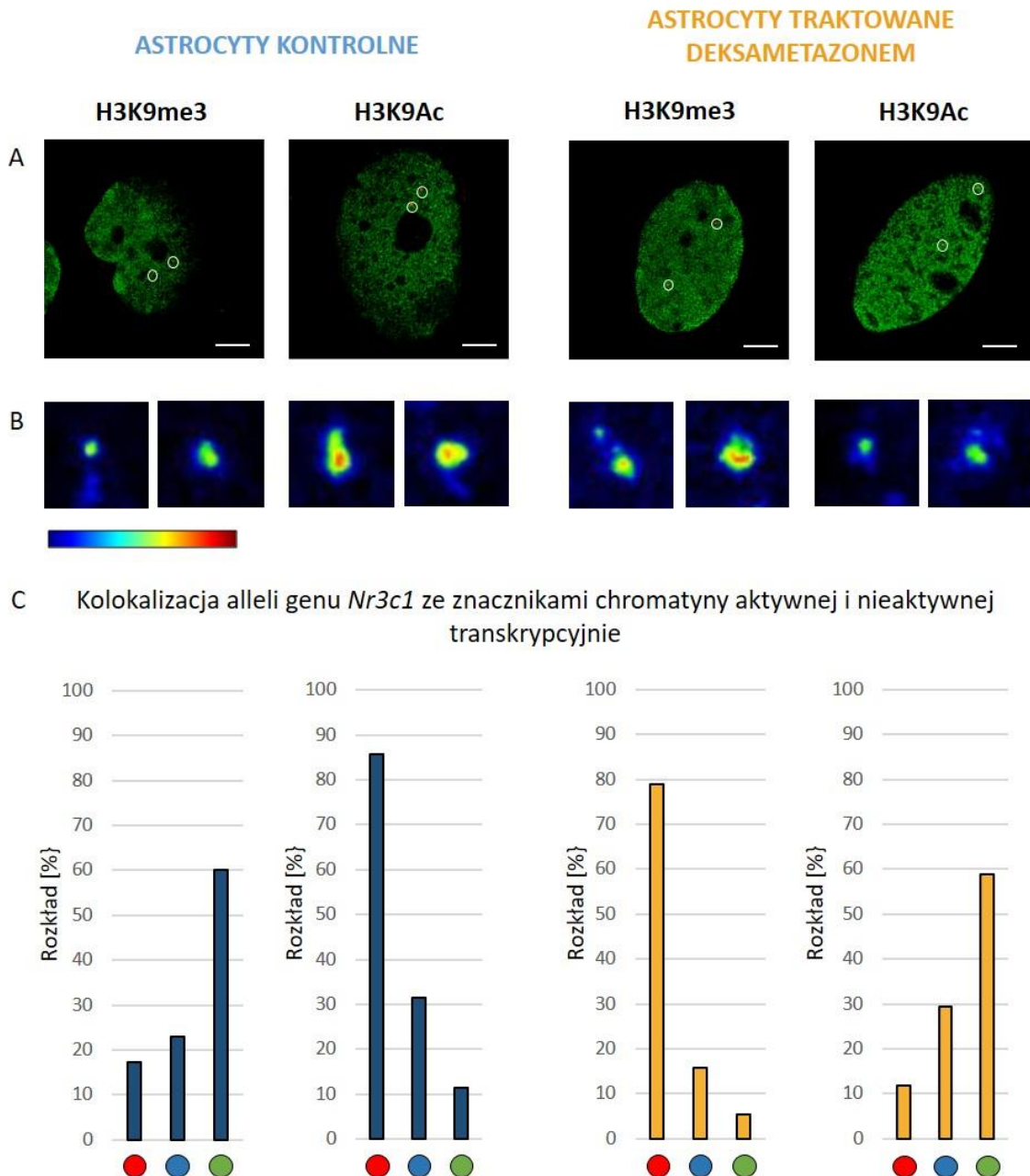
	rodzaj komórek	komórki kontrolne		suma	komórki traktowane		Suma
		Astrocyty	Neurony		Astrocyty	Neurony	
Rodzaj znacznika chromatyny	H3K9Ac	35	38	73	34	40	74
	H3K9me3	35	37	72	38	37	75
Suma				145	Suma		149

Tab.4.2 Liczba jąder, na których przeprowadzono analizy kolokalizacji, z rozróżnieniem na neurony i astrocyty kontrolne (zaznaczone kolorem niebieskim) i traktowane DEX (zaznaczone kolorem pomarańczowym).

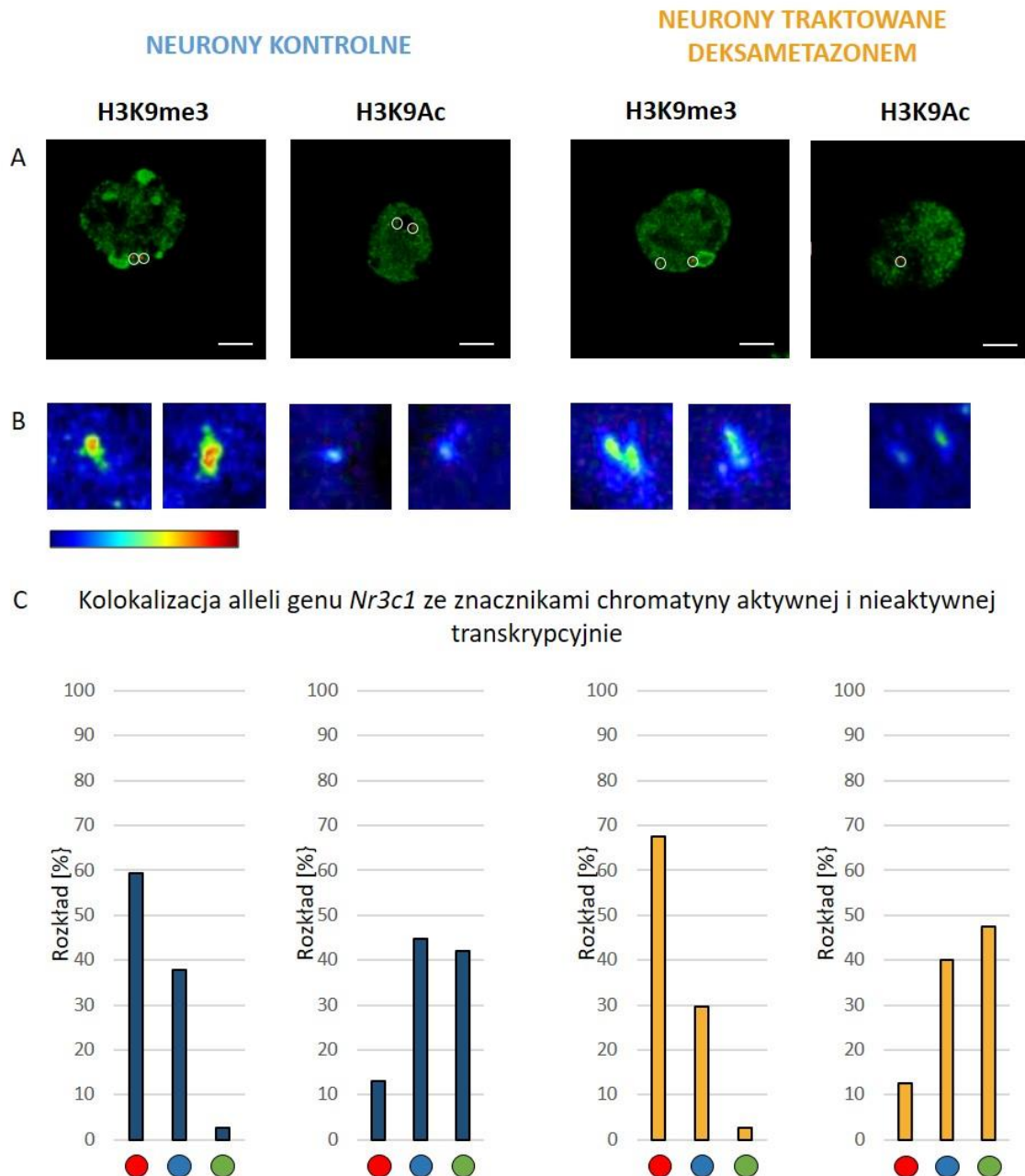
Po przeanalizowaniu jąder okazało się, iż w przypadku astrocytów allele genu *Nr3c1*, pod wpływem działania DEX, nie tylko ulegają przemieszczeniu, ale także zmienia się rodzaj aktywności transkrypcyjnej chromatyny w ich bezpośrednim sąsiedztwie (Ryc.4.7). I tak, w astrocytach kontrolnych przeważająca liczba alleli

związana była z chromatyną aktywną transkrypcyjnie (wysoki procentowy udział komórek, gdzie obydwie allele kolokalizowały z H3K9Ac, Ryc.4.7C). Natomiast po 4-godzinnej inkubacji komórek z DEX, następowała wyraźna zmiana i znaczna większość alleli kolokalizowała z chromatyną nieaktywną transkrypcyjnie. W blisko 80% przeanalizowanych astrocytów traktowanych DEX, obydwie allele kolokalizowały z H3K9me3 i jedynie w 10% z H3K9Ac. Interesującą obserwacją jest, iż w przypadku wszystkich analizowanych punktów eksperymentalnych komórki, gdzie jeden z alleli wykazywał kolokalizację, a drugi nie, stanowiły niewielki procent wszystkich analizowanych astrocytów.

W przypadku neuronów (Ryc.4.8) rozkład kolokalizacji przedstawiał się podobnie, zarówno przed, jak i po inkubacji z DEX. Co ciekawe, w obydwu przypadkach wyraźnie większa liczba neuronów posiadała allele kolokalizujące z znacznikiem chromatyny nieaktywnej transkrypcyjnie, odpowiednio 60% komórek kontrolnych i 70% neuronów traktowanych. Znacznie wyższy odsetek, niż w przypadku astrocytów, stanowiły komórki, gdzie jeden z alleli związany był z chromatyną aktywną, a drugi z nieaktywną transkrypcyjnie.



Ryc.4.7 Wyniki analizy kolokalizacji alleli genu *Nr3c1* z markerami chromatyny aktywnej i nieaktywnej transkrypcyjnie, w korowych, astrocytarnych hodowlach pierwotnych. Panel A – przykładowe pojedyncze płaszczyzny przedstawiające wybarwioną chromatynę (kolor zielony) z widocznymi dwoma allelami genu *Nr3c1* (kolor czerwony, dodatkowo zaznaczone białą obwódką). Skala 5µm. Panel B – powiększone fragmenty płaszczyzn z panelu A, przedstawiające obrazowo siłę i rozkład kolokalizacji pomiędzy allelami, a znacznikami chromatyny, wg. skali barwnej zamieszczonej poniżej. Kolor niebieski na skali oznacza najłabszą kolokalizację, kolor czerwony – najsilniejszą. Panel C – Procentowy rozkład komórek, ze względu na kolokalizację alleli z markerami chromatyny. Słupki niebieskie reprezentują astrocyty kontrolne, pomarańczowe – traktowane DEX. Czerwona kropka oznacza komórki, gdzie obydwa allele kolokalizowały z danym znacznikiem chromatyny, kropka niebieska - komórki, gdzie jeden z alleli kolokalizował, a drugi nie, kropka zielona – oznacza komórki, gdzie żaden z alleli nie kolokalizował.



Ryc.4.8 Wyniki analizy kolokalizacji alleli genu *Nr3c1* z markerami chromatyny aktywnej i nieaktywnej transkrypcyjnie, w korowych, neuronalnych hodowlach pierwotnych. Panel A – przykładowe pojedyncze płaszczyzny przedstawiające wybarwioną chromatynę (kolor zielony) z widocznymi dwoma allelami genu *Nr3c1* (kolor czerwony, dodatkowo zaznaczone białą obwódką). Skala 5 μ m. Panel B – powiększone fragmenty płaszczyzn z panelu A, przedstawiające obrazowo siłę i rozkład kolokalizacji pomiędzy allelami, a znacznikami chromatyny, wg. skali barwnej zamieszczonej poniżej. Kolor niebieski na skali oznacza najslabszą kolokalizację, kolor czerwony – najsilniejszą. Panel C – Procentowy rozkład komórek, ze względu na kolokalizację alleli z markerami chromatyny. Słupki niebieskie reprezentują neurony kontrolne, pomarańczowe – traktowane DEX. Czerwona kropka oznacza komórki, gdzie obydwa allele kolokalizowały z danym znacznikiem chromatyny, kropka niebieska - komórki, gdzie jeden z alleli kolokalizował, a drugi nie, kropka zielona – oznacza komórki, gdzie żaden z alleli nie kolokalizował.

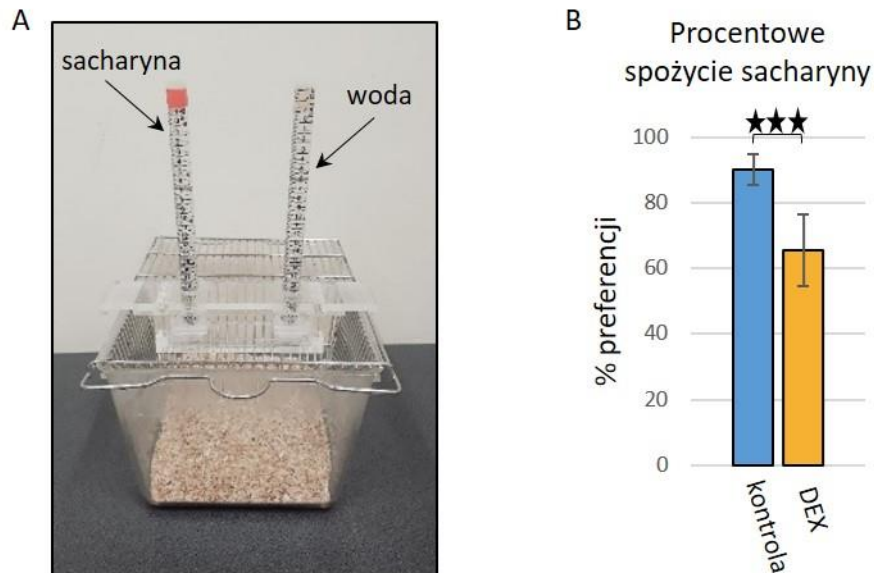
Podsumowując, w korowych, pierwotnych hodowlach astrocytarnych po 4-godzinnej inkubacji z DEX allele genu *Nr3c1* wykazywały znacznie wyższą kolokalizację z chromatyną nieaktywną transkrypcyjnie, w porównaniu do astrocytów kontrolnych. W przypadku hodowli neuronalnych allele wykazywały silną kolokalizację z chromatyną nieaktywną transkrypcyjnie, zarówno w warunkach kontrolnych, jak i inkubacji z DEX.

4.5. Weryfikacja zachowań depresyjnych u myszy – farmakologiczny model depresji

Zachowania depresyjne, u 9-10 tygodniowych samców myszy szczepu C57BL/6J, indukowano poprzez podawanie zwierzętom dootrzewnowych zastrzyków z Dexavenu (Bausch Health), przez kolejne 21 dni. Zwierzęta z grupy kontrolnej otrzymywały zastrzyki z soli fizjologicznej. Myszy każdego dnia, przed iniekcją były ważone i jeśli ich masa ciała była mniejsza niż 20g, nie otrzymywały zastrzyku w danym dniu. Na czas eksperymentu zwierzęta przebywały w klatkach po 4-5 osobników. Doświadczenie wykonano w dwóch powtórzeniach: w pierwszym na 16 osobnikach (10 traktowanych DEX i 6 kontrolnych), w drugim – 38 osobnikach, po 19 z każdej grupy (DEX i kontrola). Choć model ten został już opisany w literaturze (Skupio i wsp., 2015), to ze względu na dużą zmienność osobniczą, zachowania depresyjne mierzono u każdej z myszy poprzez serię testów behawioralnych. Wyniki przedstawione poniżej odnoszą się jedynie do tych osobników, których tkanki wykorzystano w kolejnych badaniach: do pomiaru ekspresji genu *Nr3c1* (13 osobników traktowanych i 12 kontrolnych) i zmian morfologicznych w jądrze komórkowym (po 4 osobniki traktowane i kontrolne).

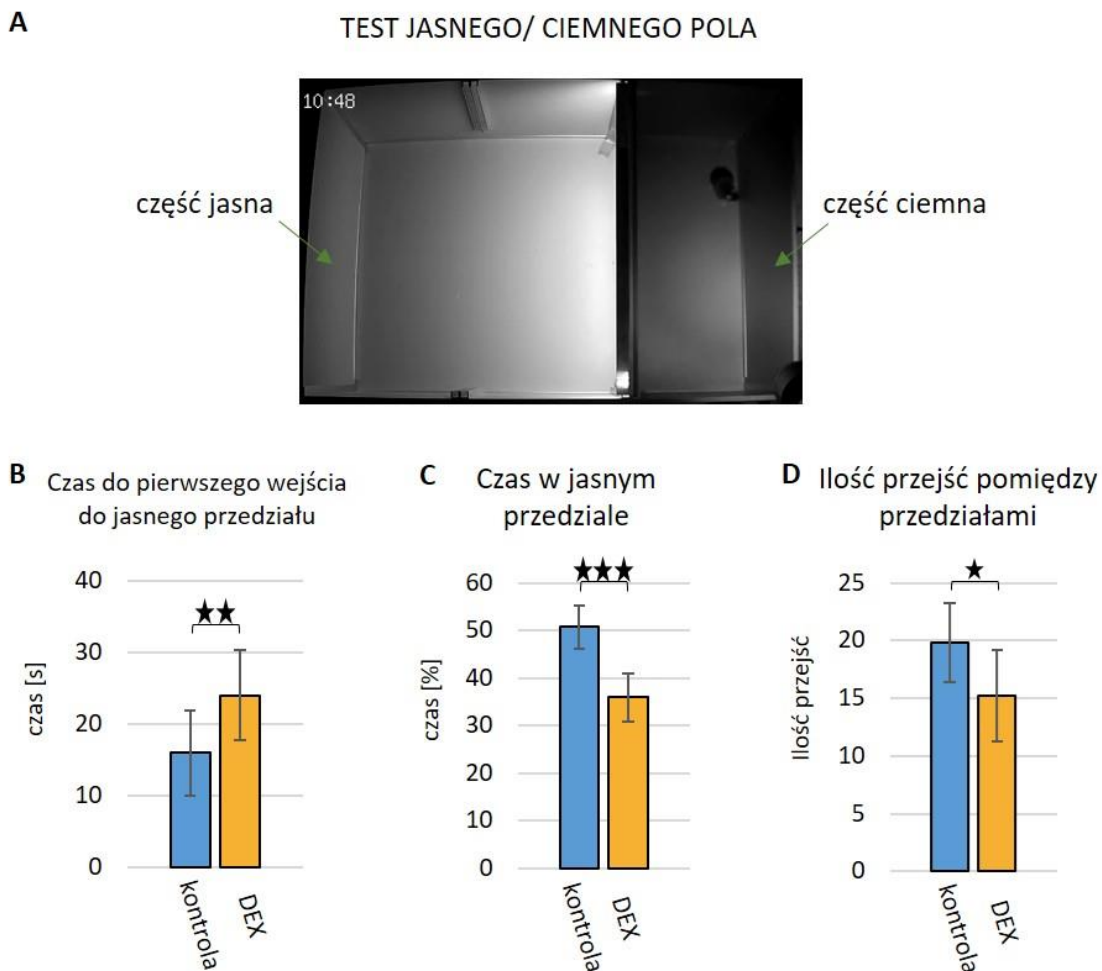
Pierwszym z mierzonych parametrów była anhedonia, czyli niezdolność do odczuwania przyjemności, z rzeczy wcześniej uznawanych za przyjemne. Pomiar wykonywano jednorazowo, w piętnastym dniu eksperymentu i polegał on na określeniu preferencji zwierząt do spożycia słodkiego płynu (1% roztworu sacharyny). Na Ryc.4.9 przedstawiono jedynie wyniki uzyskane dla drugiego powtórzenia eksperymentu. W pierwszym powtórzeniu, użyto butelek, z których niestety, pod wpływem nawet lekkiego potrącenia, wyciekał płyn. Uzyskanych w tym powtórzeniu wyników, nie można było zatem uznać za wiarygodne. U zwierząt, z drugiego powtórzenia, przewlekłe podawanie

DEX powodowało zmniejszenie preferencji do spożycia sacharyny, w porównaniu z grupą kontrolną o blisko 25%.



Ryc.4.9 Wyniki pomiaru spożycia sacharyny – test na anhedonię. Panel A – zdjęcie klatki, ze specjalnymi butelkami wyposażonymi w miarkę, wykorzystanymi w drugim powtórzeniu eksperymentu. Panel B – wykres przedstawiający procentowe spożycie sacharyny. Trzy gwiazdki nad wykresem oznaczają istotność statystyczną na poziomie $p < 0,001$ ($p = 0,000019$) liczoną za pomocą testu t Welcha.

Kolejnym wykonanym testem był test L/D box, służący do pomiaru poziomu lęku zwierząt. Wykorzystuje się w nim naturalną dla myszy awersję do przebywania w otwartych, jasno oświetlonych przestrzeniach. Test ten wykonano w 17-tym dniu eksperymentu, z wykorzystaniem specjalnego pudełka podzielonego na dwie części: jasną i ciemną (Ryc.4.10 A). Na początku myszy umieszczano w ciemnej części i mierzono czas, jaki zwierzę w nim spędzało, zanim po raz pierwszy przeszło do części jasnej. Wartość średnia czasu dla myszy, którym podawano Dexaven była wyższa w porównaniu do zwierząt kontrolnych (Ryc.4.10 B).

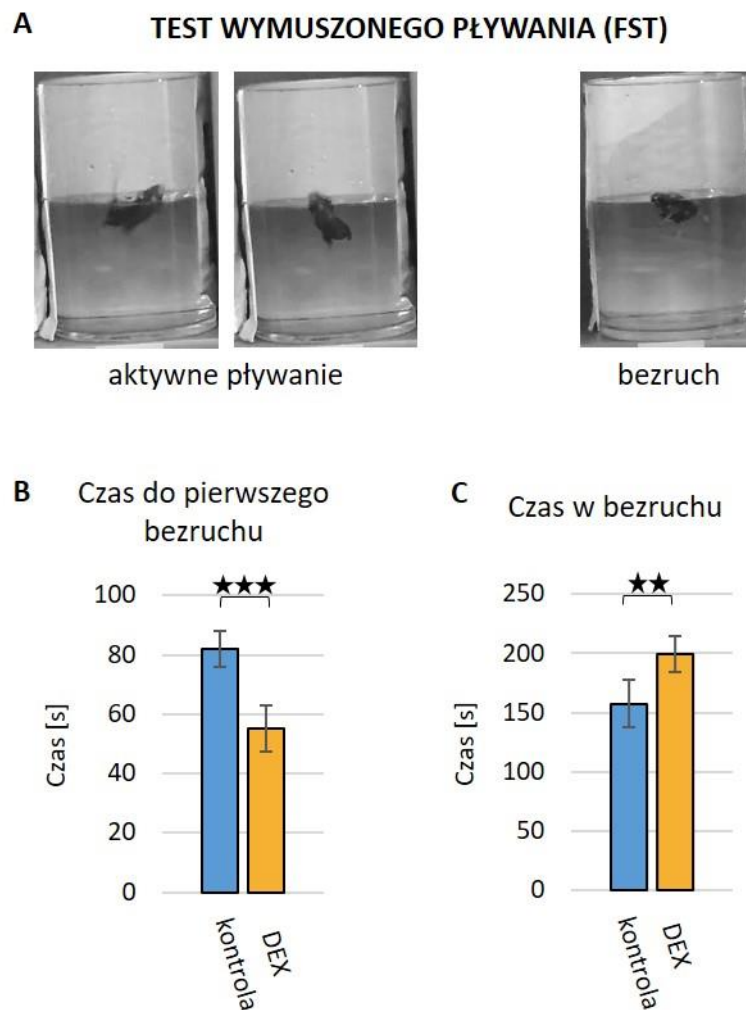


Ryc.4.10 Wyniki testu L/D box. Test wykonywano w pojemniku podzielonym na dwie części jasną i ciemną. Mysz na początku pomiaru umieszczano w części ciemnej (A). Za pomocą testu mierzono oznaczano poziom lęku, poprzez pomiar czasu, jaki zajęło zwierzętom przejście, po raz pierwszy, do jasnej części (B), czasu spędzanego w jasnej części (C), a także ilości przejść pomiędzy przedziałami (D). Istotność statystyczną dla C i D mierzono za pomocą testu t Welcha, gdzie *** oznacza $p < 0,001$ (dla C $p = 0,0000016$), ** oznacza $p < 0,01$ (dla B $p = 0,0018$), * oznacza $p < 0,05$ (dla D $p = 0,02$).

Następnie mierzono całkowity czas, jaki mysz spędzała w jasnej części pojemnika (Ryc.4.10 C). Wyniki podano jako stosunek czasu spędzonego przez zwierzę w części jasnej do całkowitego czasu. Taka forma wynikała z błędu pomiaru. Czas nagrywania, a zarazem czas testu wynosił każdorazowo 6 minut. Jednak podczas pomiarów, nie liczono czasu kiedy mysz znajdowała się pomiędzy przedziałami (gdy np. część jej ciała znajdowała się w jasnym, a część w ciemnym przedziale). Po analizie wyników z dużą dokładnością można stwierdzić, iż myszy traktowane DEX spędzały średnio ok. 15% mniej czasu w jasnym przedziale, w porównaniu do zwierząt kontrolnych.

Ostatnim z mierzonych parametrów była liczba przejść pomiędzy przedziałami. Za przejście uznawano przemieszczenie całego ciała myszy z jednej części pojemnika do drugiej. Zwierzęta z grupy kontrolnej zmieniały przedziały znacznie częściej niż zwierzęta traktowane DEX (Ryc.4.10 D).

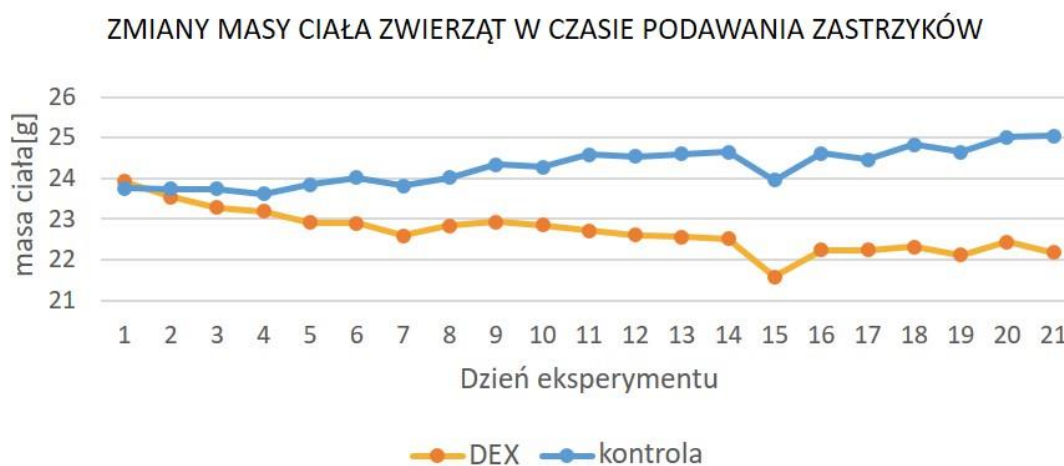
Trzecim, stosowanym testem behawioralnym był test FST. Zwierzęta umieszczano w cylindrycznym naczyniu, wypełnionym do 2/3 objętości wodą o temperaturze 24-28°C (Ryc.4.11 A).



Ryc.4.11 Wyniki testu FST. Podczas testu mierzono czas, kiedy zwierzęta aktywnie pływały i pozostawały w bezruchu (A). W celu opisu zachowań depresyjnych wyznaczano czas do pierwszego bezruchu (B) i całkowity czas pozostawania w bezruchu (C). Istotność statystyczną dla B i C mierzono za pomocą testu t Welcha, gdzie *** oznacza $p < 0,001$ (dla B $p = 0,00002$), ** oznacza $p < 0,01$ (dla C $p = 0,002$).

Podczas trwającego 6 minut testu mierzono czas, jaki upłynął do pierwszego trwającego dłużej niż sekundę bezruchu zwierzęcia (Ryc.4.11 B) oraz całkowity czas pozostawania w bezruchu (Ryc.4.11.C). Myszy, którym podawano Dexaven, w przeciwieństwie do zwierząt kontrolnych, szybciej zapadały w bezruch, średnio po 55 sekundach, w porównaniu z 82 sekundami dla grupy kontrolnej (Ryc.4.11 B) oraz znacznie więcej czasu pozostawały w takim stanie, średnio 200 sekund w porównaniu z 157 sekundami dla grupy kontrolnej (Ryc.4.11 C).

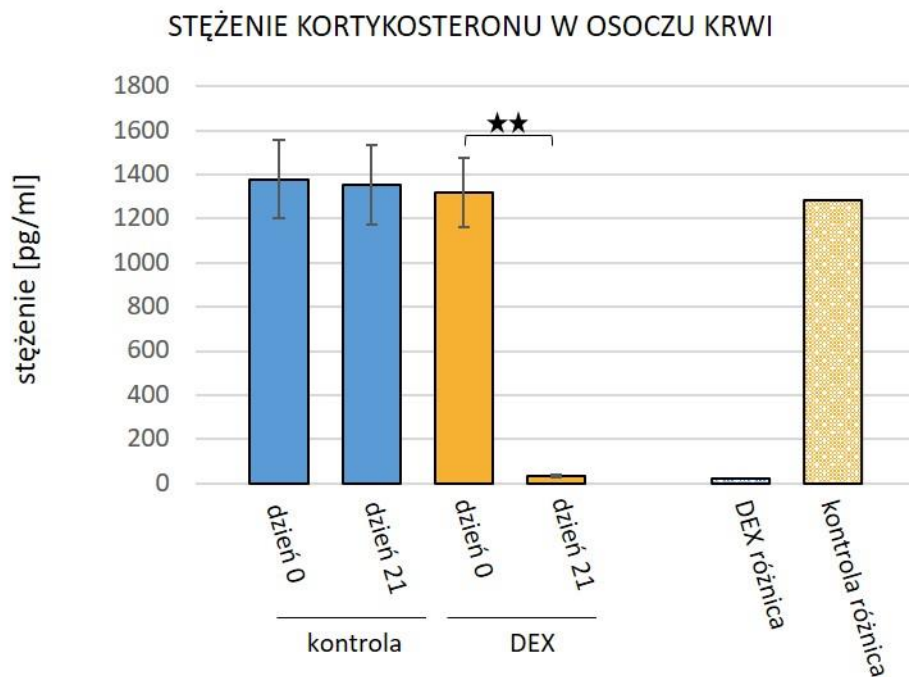
Jak wspomniano wcześniej, zwierzęta ważono każdego dnia eksperymentu. Uśrednione wyniki pomiarów przedstawiono na Ryc.4.12. Podawanie zastrzyków z soli fizjologicznej nie miało większego wpływu na masę ciała zwierząt (niebieska krzywa). Średnia masa ciała wzrosła tutaj o 1g w stosunku do wagi początkowej. Zastrzyki z Dexavenem natomiast powodowały postępujący w czasie ubytek masy ciała zwierząt (Ryc, pomarańczowa krzywa). Średnia waga zwierząt, z tej grupy, na końcu eksperymentu była niższa o 2g od wagi początkowej i o ok. 3g od wagi zwierząt kontrolnych, mierzonej w tym samym czasie. Interesująco, w obu grupach zaobserwowano znaczny ubytek masy ciała w 15-tym dniu eksperymentu.



Ryc.4.12 Pomiar masy ciała zwierząt podczas eksperymentu. Na niebiesko zaznaczone uśrednione wartości dla myszy z grupy kontrolnej, na pomarańczowo – traktowanych DEX.

Przed rozpoczęciem podawania zastrzyków (pierwszego dnia) myszom pobierano niewielką ilość krwi z ogona, po ich uprzednim unieruchomieniu. Czynność tę

powtarzano po zakończeniu iniekcji, w 21 dniu eksperymentu. Następnie w osoczu krwi oznaczano poziom endogennego kortykosteronu. U zwierząt kontrolnych, którym podawano zastrzyki z soli fizjologicznej poziom kortykosteronu nie zmienił się po zakończeniu eksperymentu, natomiast u zwierząt, którym podawano Dexaven nastąpiło drastyczne zmniejszenie stężenia kortykosteronu w osoczu krwi, o 97% w stosunku do wartości dla tych samych zwierząt na początku eksperymentu (Ryc.4.13).



Ryc.4.13 Wyniki pomiaru poziomu endogennego kortykosteronu w osoczu krwi zwierząt kontrolnych (kolor niebieski) i traktowanych DEX (kolor pomarańczowy). Pomiaru dokonywano w pierwszym i ostatnim (21) dniu eksperymentu. Pokazano także słupki obrazujące różnice w poziomie kortykosteronu pomiędzy 1, a 21 dniem u zwierząt kontrolnych i traktowanych DEX (słupki fakturowane). ** oznaczają istotność statystyczną na poziomie $p < 0,01$, liczoną za pomocą testu Wilcozona dla par obserwacji. Dla zwierząt kontrolnych istotność wyniosła 0,4, a dla zwierząt traktowanych DEX $p = 0,0019$.

Przedstawione powyżej wyniki jednoznacznie świadczą o występowaniu zachowań depresyjnych/ rozwoju depresji u objętych analizą zwierząt, którym podawano przewlekle DEX. Materiał tkankowy pobrany od tych zwierząt wykorzystano w kolejnych doświadczeniach mających na celu pomiary ekspresji genu kodującego GR (*Nr3c1*) oraz zmian morfometrycznych w obrębie jądra komórkowego.

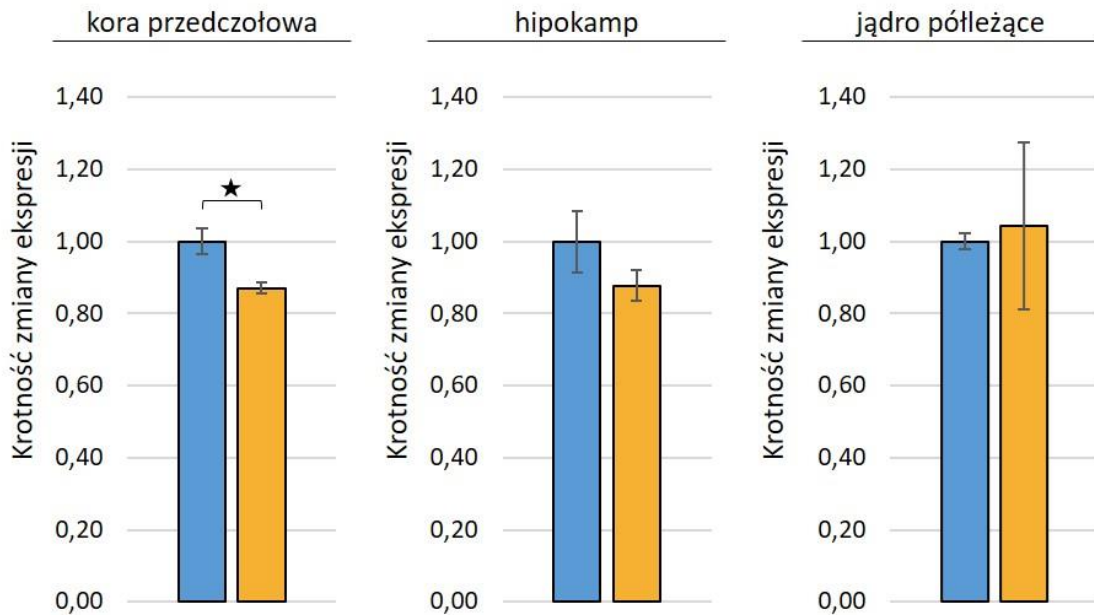
Podsumowując, przewlekłe podawanie DEX myszom, w postaci zastrzyków dootrzewnowych indukowało zachowania depresyjne: zmniejszone spożycie sacharyny (test preferencji), dłuższy czas przed pierwszym wejściem do jasnego przedziału, krótszy całkowity czas spędzany w tym przedziale i mniejszą ilość przejść pomiędzy przedziałami (test L/D box), krótszy czas do pierwszego bezruchu i dłuższy całkowity czas pozostawania w bezruchu (test FST). Ponadto zwierzęta traktowane traciły wagę w czasie eksperymentu, zmniejszało się także stężenie endogennego kortykosteronu w ich osoczu krwi.

4.6. Analiza zmian poziomu ekspresji genu *Nr3c1* oraz zmian morfometrycznych w obrębie jądra komórkowego – farmakologiczny model depresji.

W kolejnym etapie projektu zbadano, czy wielokrotne podawanie DEX, wywołującego objawy depresyjne prowadzi, jak w przypadku modelu silnego stresu, do zmian ekspresji genu *Nr3c1* oraz zmian morfologicznych w obrębie kory przedczołowej, hipokampa i jądra półleżącego u zwierząt.

Badania opisane w niniejszym rozdziale wykonano na zwierzętach, u których potwierdzono występowanie zachowań depresyjnych (na podstawie testów behawioralnych, opisanych szczegółowo w poprzednim rozdziale) oraz zwierzętach z grupy kontrolnej. W materiale tkankowym oznaczano poziom ekspresji genu *Nr3c1* metodą Real-Time PCR. Jako kontroli negatywnej, użyto starterów zaprojektowanych dla genu *HPRT1*. Analizy przeprowadzono analogicznie do opisanych w rozdziałach 4.1 i 4.2. Ze względu na niewielkie fragmenty tkanki, łączono ze sobą próbki pochodzące z 4 lub 5 zwierząt. Wykonano po 2 powtórzenia techniczne dla każdego z 3-ch powtórzeń biologicznych. Wyniki przedstawiono w postaci krotności zmian ekspresji (*ang. fold change*) na Ryc.4.14.

Krotność zmiany ekspresji (*ang. fold change*) genu *Nr3c1*



Ryc.4.14 Analiza ekspresji genu *Nr3c1* w korze przedczołowej, hipokampie i jądrze półleżącym, zwierząt kontrolnych i traktowanych przewlekle DEX. Kolorem niebieskim zaznaczono poziom ekspresji dla zwierząt kontrolnych, kolorem pomarańczowym zaś – traktowanych DEX. Istotność statystyczna obliczono testem t Welcha, gdzie * oznacza $p < 0,05$ (dla kory przedczołowej $p = 0,0117$).

Dla wszystkich badanych struktur mózgu nie zaobserwowano różnic w poziomie ekspresji genu *Nr3c1* w wyniku przewlekłego podawania Dexavenu, w porównaniu do grupy kontrolnej. W przypadku kory przedczołowej obserwowano niewielkie, ale istotne statystycznie zmniejszenie poziomu ekspresji, o ok. 13%, w stosunku do kontroli. Dla hipokampa i jądra półleżącego zmiany nie wykazywały istotności statystycznej.

Kolejnym etapem eksperymentu było określenie parametrów morfometrycznych, m.in. lokalizacji alleli wewnątrz jądra komórkowego, z uwzględnieniem obszarów skondensowanej i nieskondensowanej chromatyny. Badania wykonano na materiale tkankowym pobranym od zwierząt, które wykazywały zachowania depresyjne (4 osobniki) i zwierząt kontrolnych (4 osobniki). Zwierzęta, podobnie jak opisano powyżej, po ok. 4 godzinach od podania ostatniego zastrzyku z Dexavenu usypiano, a następnie tkanki utrwalano poprzez perfuzję. Kolejno, na 40 μ m skrawkach zawierających wybrana strukturę mózgu (korę przedczołową, hipokamp lub jądro półleżące Ryc.4.2) wykonywano hybrydyzację *in situ* połączoną z barwieniami

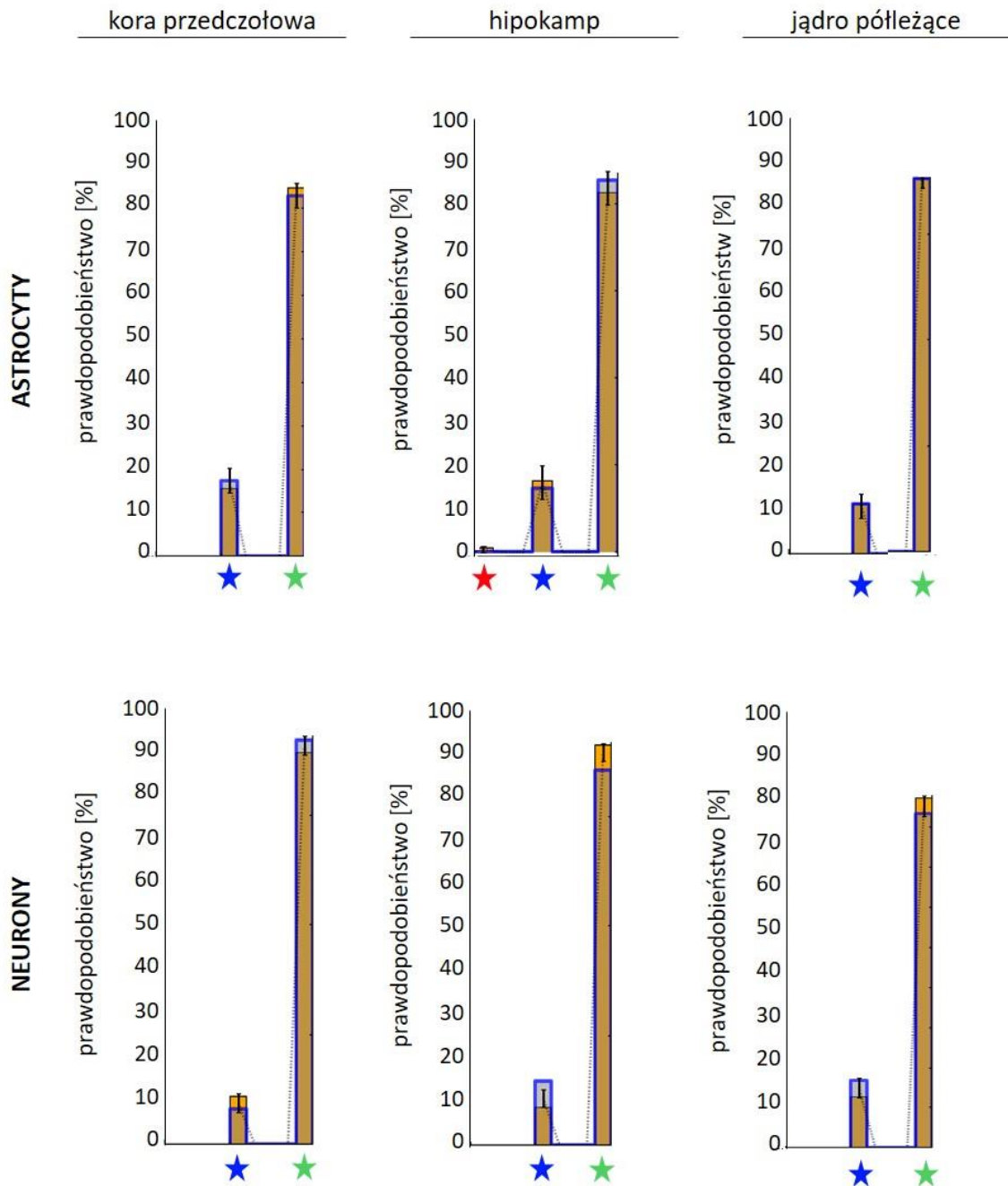
immunocytochemicznymi, dokładnie w ten sam sposób jak w przypadku modelu silnego stresu (rozdział 4.3). Jądra segmentowano ze stosów obrazów mikroskopowych za pomocą narzędzia Segmentation magick (Ruszczycki i Wilczyński, 2011; Ruszczycki i wsp., 2019). Liczbę przeanalizowanych jąder, z rozróżnieniem za względu na typ komórek i poszczególne zwierzęta zamieszczono w tabeli Tab.4.3.

Struktura mózgu	rodzaj komórek	zwierzęta kontrolne				suma	zwierzęta traktowane				Suma
		M1	M2	M3	M4		M1	M2	M3	M4	
kora przedczołowa	liczba astrocytów	48	57	48	48	201	45	46	44	44	179
	liczba neuronów	128	123	77	125	453	64	81	174	146	465
jadro półleżące	liczba astrocytów	39	67	35	48	189	66	24	34	38	162
	liczba neuronów	134	73	35	111	353	48	68	63	43	222
Hipokamp	liczba astrocytów	62	57	50	56	225	49	55	54	43	201
	liczba neuronów	106	57	92	130	385	155	149	188	98	590
Suma					1806	1819					

Tab.4.3 Liczba jąder, na których przeprowadzono analizy morfometryczne, z rozróżnieniem na neurony i astrocyty, uzyskanych dla każdej ze struktur i każdego z analizowanych osobników. Kolorem niebieskim zaznaczono informacje dotyczące zwierząt kontrolnych, kolorem pomarańczowym – zwierząt traktowanych DEX.

Na skutek przewlekłego podawania DEX dochodziło do licznych zmian morfometrycznych wewnątrz jąder komórkowych neuronów i astrocytów analizowanych struktur mózgu, m.in. w astrocytach regionu CA3 hipokampa i obszaru rdzenia jądra półleżącego odległość alleli do otoczki jądrowej zmniejszała się, w efekcie czego allele znajdowały się w odległości mniejszej niż 500nm do otoczki jądrowej podobnie jak w przypadku astrocytów pozostałych analizowanych struktur (dane nie prezentowane). Co ciekawe, średnia odległość alleli do środka jądra komórkowego nie ulegała zmianie w komórkach zwierząt z depresją w porównaniu do grupy kontrolnej. Wyjątek stanowiły wspomniane powyżej astrocyty jądra półleżącego, gdzie odległość ta ulegała zwiększeniu.

Lokalizacja alleli *Nr3c1* wewnątrz jądra komórkowego



Ryc.4.15 Wyniki analizy lokalizacji alleli genu *Nr3c1* wewnątrz jądra komórkowego dla astrocytów i neuronów trzech badanych struktur mózgu, przed i po przewlekłym podawaniu DEX. Wyniki przedstawiono w postaci słupków prawdopodobieństwa. Gwiazdki pod wykresami oznaczają: czerwona – obydwie allele znajdują się w obszarze skondensowanej chromatyny, niebieska – jeden z alleli znajduje się w obszarze chromatyny skondensowanej, drugi – nieskondensowanej, gwiazdka zielona – obydwie allele znajdują się w obszarze chromatyny nieskondensowanej. Słupki w kolorze niebieskim oznaczają pomiary dla grupy kontrolnej, a kolorem pomarańczowym – dla grupy traktowanej DEX.

Średnia objętość jądra komórkowego zwiększała się w przypadku neuronów II i III warstwy kory przedczołowej i obszaru C3 hipokampa, zmniejszała zaś w przypadku neuronów obszaru „core” jądra półleżącego. Rozkład i ilość obszarów skondensowanej chromatyny (chromocentrów) nie zmieniała się w żadnej grupie analizowanych komórek (dane nie prezentowane). Podobnie większym zmianom nie podlegała lokalizacja alleli w jądrze komórkowym. We wszystkich grupach komórek przeważająca większość alleli genu *Nr3c1* znajdowała się w obszarach nieskondensowanej chromatyny, zarówno w grupie kontrolnej, jak i traktowanej (Ryc.4.15).

Podsumowując, przewlekłe podawanie DEX myszom, w postaci zastrzyków dootrzewnowych powodowało zmniejszenie poziomu ekspresji genu *Nr3c1* w korze przedczołowej. Nie obserwowano natomiast, zmian w poziomie ekspresji w przypadku hipokampa i jądra półleżącego. Lokalizacja alleli w neuronach i astrocytach wszystkich 3 analizowanych struktur nie zmieniała się na skutek podawania DEX. Allele, w większości zlokalizowane były w obszarach chromatyny nieskondensowanej.

4.7. Analiza zmian morfometrycznych w obrębie jądra komórkowego – model chronicznego, nieprzewidywalnego stresu.

W kolejnym etapie projektu wykonano podobną analizę, jak ta opisana w punkcie 4.6, tym razem jednak wykorzystując zwierzęta, u których zachowania depresyjne wywoływano w sposób behawioralny. W tym celu zastosowano model chronicznego, nieprzewidywalnego stresu (*ang. chronic unpredictable stress*). Zachowania depresyjne indukowane wg. protokołu zamieszczonego w rozdziale 3.2.3, oceniano na podstawie testów behawioralnych (test preferencji sacharozy, test wymuszonego wpływanie). Całość przygotowania zwierząt wraz z oznaczeniem zachowań behawioralnych została wykonana przez Zespół prof. Jakuba Włodarczyka, w Pracowni Biofizyki Komórki Instytutu Biologii Doświadczalnej, PAN w Warszawie.

Następnie wykonywano hybrydyzację FISH połączoną z barwieniami immunocytochemicznymi, jak opisano w rozdziałach 4.3 i 4.6. Uzyskane stopy obrazów mikroskopowych analizowano programem Segmentation magick (Ruszczycki i Wilczyński, 2011; Ruszczycki i wsp., 2019). Ilość przeanalizowanych jąder, z rozróżnieniem za względu na typ komórek i poszczególne zwierzęta zamieszczono w tabeli Tab.4.4.

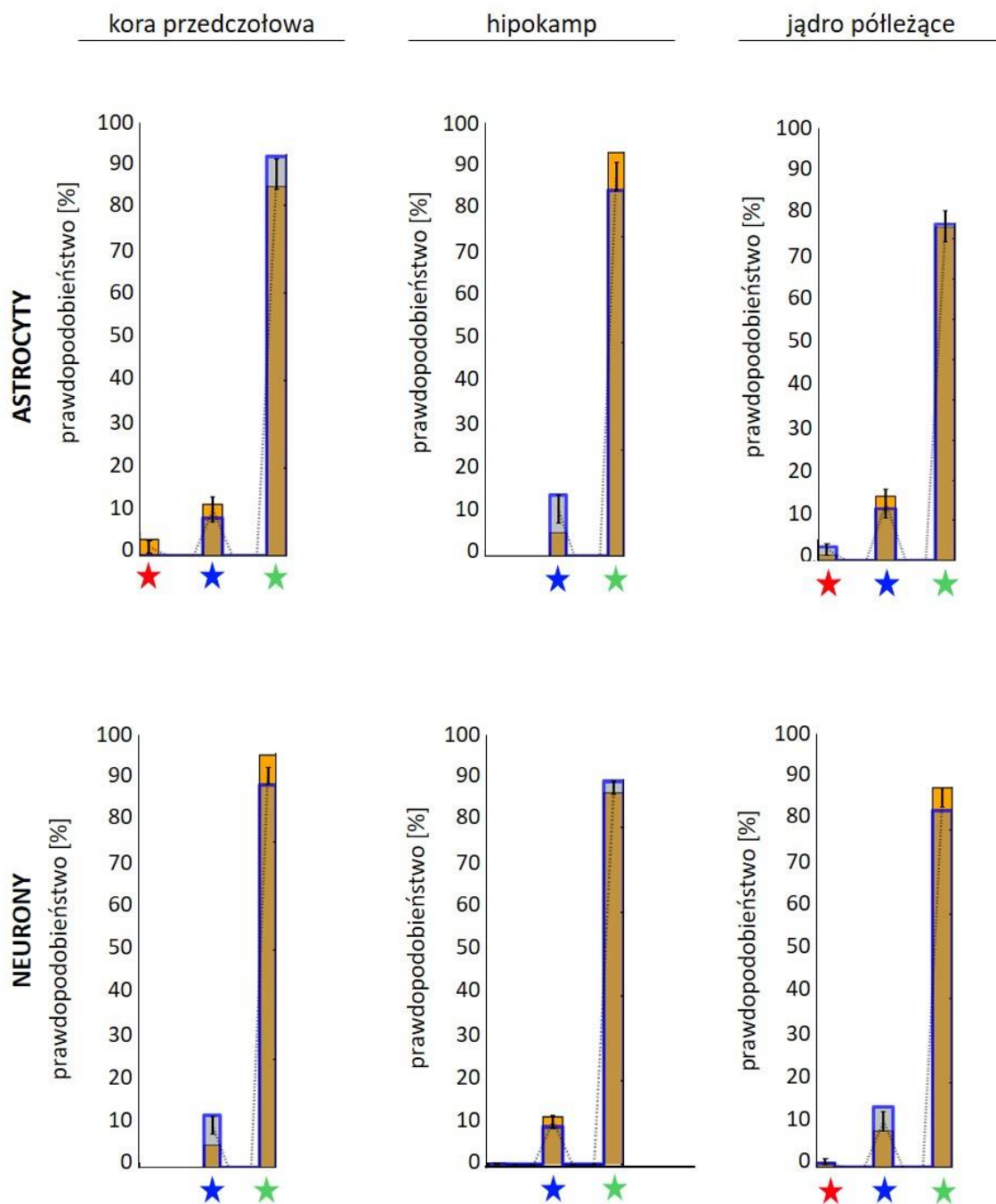
Struktura mózgu	rodzaj komórek	zwierzęta kontrolne					suma	zwierzęta traktowane				
		M1	M2	M3	M4	M1		M2	M3	M4	Suma	
kora przedczołowa	liczba astrocytów	41	39	66	74	220	61	67	61	90	279	
	liczba neuronów	177	170	139	195	681	140	128	123	136	527	
jadro półleżące	liczba astrocytów	60	85	59	53	257	58	30	47	26	161	
	liczba neuronów	101	8	107	62	278	90	141	50	103	384	
Hipokamp	liczba astrocytów	45	80	59	43	227	59	65	60	61	245	
	liczba neuronów	28	115	144	159	446	213	173	157	171	714	
Suma					2109					2310		

Tab.4.4 Liczba jąder, na których przeprowadzono analizy morfometryczne, z rozróżnieniem na neurony i astrocyty, uzyskanych dla każdej ze struktur i każdego z analizowanych osobników. Kolorem niebieskim zaznaczono informacje dotyczące zwierząt kontrolnych, kolorem pomarańczowym – zwierząt traktowanych DEX.

Kompleksowa analiza wykazała, iż u zwierząt, u których potwierdzono objawy depresji dochodziło do zmian morfometrycznych wewnątrz jąder komórkowych neuronów i astrocytów analizowanych struktur mózgu. W astrocytach warstwy II i III kory przedczołowej oraz obszaru rdzenia jądra półleżącego odległość alleli do otoczki jądrowej ulegała zmniejszeniu, w porównaniu do grupy kontrolnej. Zaś w neuronach regionu C3 hipokampa, u zwierząt z depresją allele odsuwały się o otoczki (dane nie prezentowane).

Średnia odległość alleli do środka jądra komórkowego, dokładnie tak samo jak w przypadku komórek analizowanych w przypadku modelu farmakologicznego nie ulegała zmianie w komórkach zwierząt z depresją w porównaniu do grupy kontrolnej. Średnia objętość jądra komórkowego zwiększała się w przypadku neuronów II i III warstwy kory przedczołowej i obszaru rdzenia jądra półleżącego. Rozkład i ilość obszarów skondensowanej chromatyny (chromocentrów) nie zmieniała się w żadnej grupie analizowanych komórek.

Lokalizacja alleli *Nr3c1* wewnątrz jądra komórkowego



Ryc.4.16 Wyniki analizy lokalizacji alleli genu *Nr3c1* wewnątrz jądra komórkowego dla astrocytów i neuronów trzech badanych struktur mózgu, w grupie kontrolnej i grupie z wyindukowaną depresją. Wyniki przedstawiono w postaci słupków prawdopodobieństwa. Gwiazdki pod wykresami oznaczają: czerwona – obydwa allele znajdują się w obszarze skondensowanej chromatyny, niebieska – jeden z alleli znajduje się obszarze chromatyny skondensowanej, drugi – nieskondensowanej, gwiazdka zielona – obydwa allele znajdują się w obszarze chromatyny nieskondensowanej. Słupki w kolorze niebieskim oznaczają pomiary dla grupy kontrolnej, a kolorem pomarańczowym – dla grupy z depresją.

Podobnie większym zmianom nie podlegała lokalizacja alleli w jądrze komórkowym (Ryc.4.16). W wszystkich grupach komórek przeważająca większość alleli genu *Nr3c1* znajdowała się w obszarach nieskondensowanej chromatyny, zarówno w grupie kontrolnej, jak i traktowanej. Opisane powyżej wyniki przedstawiające lokalizację alleli genu *Nr3c1* wewnątrz jądra komórkowego w wyniku depresji, uzyskane dla komórek zwierząt w modelu depresji indukowanej behawioralnie są tożsame, jak te uzyskane dla modelu farmakologicznego.

Podsumowując, lokalizacja alleli genu *Nr3c1* w neuronach i astrocytach kory przedczołowej, jądra pólkowego i hipokampa, u myszy, u których indukowano zachowania depresyjne w wyniku chronicznego, nieprzewidywalnego stresu była taka sama jak u zwierząt kontrolnych. Allele, w większości zlokalizowane były w obszarach chromatyny nieskondensowanej.

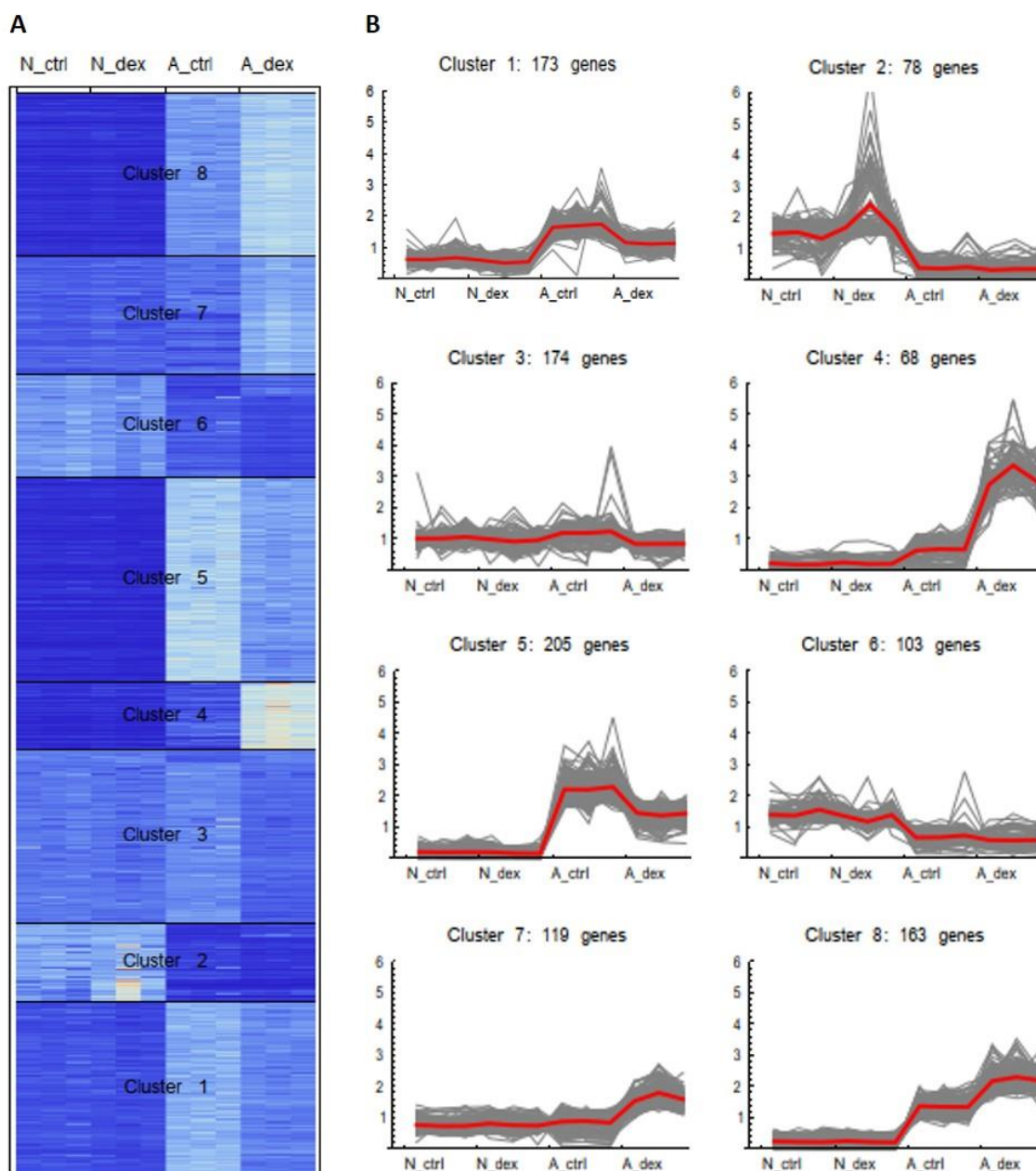
4.8. Globalna analiza zmian ekspresji genów, indukowanych w skutek jednorazowego podania deksametazonu, metodą sekwencjonowania RNA.

Kolejnym celem badawczym postawionym na potrzeby niniejszej pracy było określenie globalnych zmian ekspresji genów, do jakich dochodzi w warunkach silnego stresu, metodą sekwencjonowania RNA. Z uwagi na to, iż jednorazowe podanie DEX prowadzi do zmian ekspresji genu *Nr3c1*, a także licznych zmian morfometrycznych, m.in. przemieszczania się alleli oraz zmian rodzaju aktywności chromatyny w bezpośrednim sąsiedztwie tychże alleli w neuronach i astrocytach kory przedczołowej hodowanych *in vitro*, zdecydowano na wybór tego modelu w dalszej części badań. Dodatkową zaletą pracy na pierwotnych hodowlach komórkowych było uzyskanie stosunkowo szybko dużej liczby komórek, potrzebnej w doświadczeniach.

Jak już wspomniano doświadczenia w tej części projektu wykonano na korowych, astrocytarnych i neuronalnych hodowlach pierwotnych, kontrolnych i inkubowanych z DEX. Doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach biologicznych, pochodzących z trzech pierwotnych hodowli komórkowych założonych w różnym czasie. Wyizolowane RNA, wysyłano na suchym lodzie do Laboratorium ds. Badań nad Zmiennością Genomu Ludzkiego w Małopolskim Centrum Biotechnologii w Krakowie, gdzie wykonywane były dalsze etapy eksperymentu (przygotowanie bibliotek i sekwencjonowanie). Każda z przesłanych próbek, po przygotowaniu biblioteki, sekwencjonowania była 4-krotnie.

Przetworzenie danych surowych oraz analizy porównawcze zostały wykonane przez Zespół prof. Michała Dąbrowskiego, w Pracowni Bioinformatyki Instytutu Biologii Doświadczalnej, PAN w Warszawie.

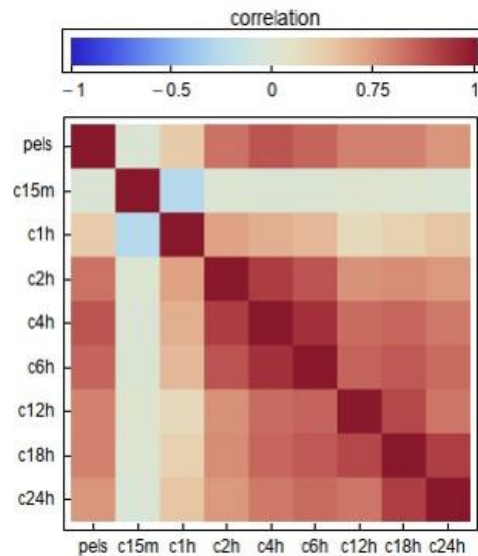
W wyniku analizy zidentyfikowano 3938 genów istotnie ($FDR < 0,05$) zmienionych w astrocytach i 2662 genów istotnie ($FDR < 0,05$) zmienionych w neuronach, po 4-godzinnej inkubacji z DEX. Ze względu na dużą liczbę genów, w pierwszym etapie porównano uzyskane profile ekspresji genów istotnie zmienionych ($FDR < 0,01$) po traktowaniu DEX w jednym lub w obu typach komórek (Ryc.4.17). Profile ekspresji zostały scentrowane do wartości średniej dla danego profilu i poddane klastrowaniu. Profile ekspresji dla powtórzeń biologicznych były niemal w 100% jednakowe. W wyniku analizy wyróżniono 8 różnych klastrów, charakteryzujących się odmienną ekspresją genów w każdym z punktów eksperymentalnych. Wyniki klastrowania przedstawiono w postaci mapy cieplnej (*ang. heatmap*), gdzie wartości liczbowe reprezentowane są poprzez skalę barwną (ciemny odcień niebieskiego oznacza niski poziom ekspresji, a jasny odcień poziom wysoki, Ryc.4.17 A) oraz profili ekspresji pojedynczych genów, z zaznaczoną na czerwono medioidą, czyli linią łączącą mediany ekspresji pojedynczych genów dla każdej z próbek w danym klastrze (Ryc.4.17 B). Wyróżnione klastry charakteryzowały się nie tylko różnym poziomem ekspresji genów, dla obu typów komórek w grupie kontrolnej i traktowanej, ale także inną liczbą należących do nich genów. Gen *Nr3c1*, kodujący GR znalazł się w pierwszym klastrze, charakteryzującym się niską ekspresją w neuronach, zarówno przed, jak i po inkubacji z DEX, natomiast w astrocytach – zmniejszeniem poziomu ekspresji na skutek działania DEX. Wyniki te są zgodne z wynikami uzyskanymi wcześniej i opisanymi w rozdziałach 4.1 i 4.2 niniejszej pracy.



Ryc.4.17 Wyniki klastrowania przedstawione na dwa sposoby: za pomocą mapy ciepłej (*ang. heatmap*), czyli macierzy w której wartości liczbowe są przedstawione za pomocą skali barwnej, gdzie ciemniejszy odcień niebieskiego oznacza niższą ekspresję, a jaśniejszy – wyższą (A) oraz za pomocą profili ekspresji pojedynczych genów, z zaznaczonym dodatkowo profilem medioidy – profilu łączącego mediany ekspresji genów w danym klastrze w każdej z próbek (B).

Następnie wykonano analizę porównawczą zmian ekspresji genów w astrocytach, 4 godziny po podaniu DEX z opublikowanymi danymi mikromacierzowymi, pochodzącymi z podobnego układu badawczego, gdzie mysie pierwotne hodowle astrocytarne poddawane działaniu DEX, a następnie analizowano zmiany profili ekspresji

genów w ośmiu punktach czasowych, od 15 minut do 24 godzin od podania DEX (Carter i wsp., 2012). Wyniki analizy korelacji przedstawiono w postaci mapy cieplnej (Ryc.4.18). Najsilniejszą korelację obserwowano pomiędzy uzyskanymi wynikami sekwencjonowania RNA, a profilami ekspresji po 4 godzinach inkubacji z DEX, opublikowanymi w pracy Cartera.

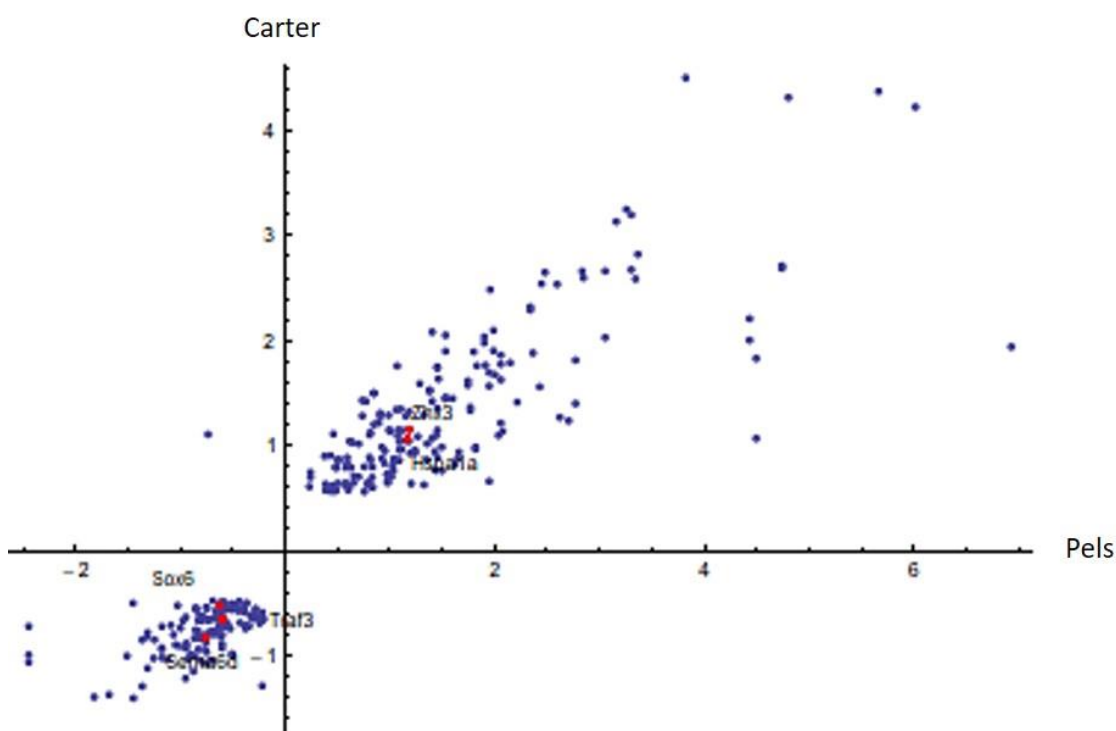


Ryc.4.17 Mapa cieplna przedstawiająca wyniki analizy korelacji uzyskanych wyników z wcześniej opublikowanymi (Carter i wsp., 2012) profilami ekspresji astrocytów poddanych działaniu DEX, w różnych punktach czasowych (od 15 minut do 24 godzin). Wyniki uzyskane w trakcie realizacji projektu zostały oznaczone jako „pels”.

Kolejno, porównano osobno, zbiory genów istotnie zmienionych ($FDR < 0,05$) w mysich neuronach (2662 geny) lub astrocytach (3938 genów), uzyskanych w wyniku sekwencjonowania RNA, ze zbiorem 269 genów ludzkich powiązanych z depresją, zidentyfikowanych w meta-analizie opublikowanej w pracy Howarda (2019). W wyniku analizy zidentyfikowano 43 geny wspólne dla mysich astrocytów i człowieka oraz 24 geny wspólne dla mysich neuronów i człowieka. Listę genów zamieszczono w tabeli (Tab.4.5).

Typ komórki	Geny wspólne dla danego typu komórki i powiązane z depresją u człowieka
Astrocyty	Asic2, Hspa1a, Rab27b, Zhx3, Lpin3, Cdh22, Tcf4, Stau1, Sf3b1, Ep300, Htt, Tmem106b, Plcg1, Sorbs3, Ckpz, Klcl, Fads2, Med19, Rftn2, Bad, Ephb2, Samd5, Scyl1, Ptprs, Arhgef25, Ube2m, Hars2, Grik5, Serping1, Rtn1, Sppl3, Nrg1, Ltpz3, Kmt2a, Ext1, Pogz, Shisa9, Psen2, Traf3, Sox6, Gtf2ird1, Spry2, Sema6d
Neurony	Ptprs, Zc3h7b, Acvr1b, Hars, Kmt2a, Plcg1, Tenm2, Nicn1, Sema6d, Prs6k11, Traf3, Arhgef25, Phf2, Grik5, Atpla3, Spry2, Rtn1, Ccs, Bag5, Gtf2irdl, Scyl1, Bad, Klcl, Ube2m

Tab.4.5 Lista genów wspólnych dla mysich astrocytów lub neuronów (FDR<0,05, wyniki sekwencjonowania RNA) oraz genów zidentyfikowanych, jako powiązane z depresją u ludzi (Howard i wsp., 2019).



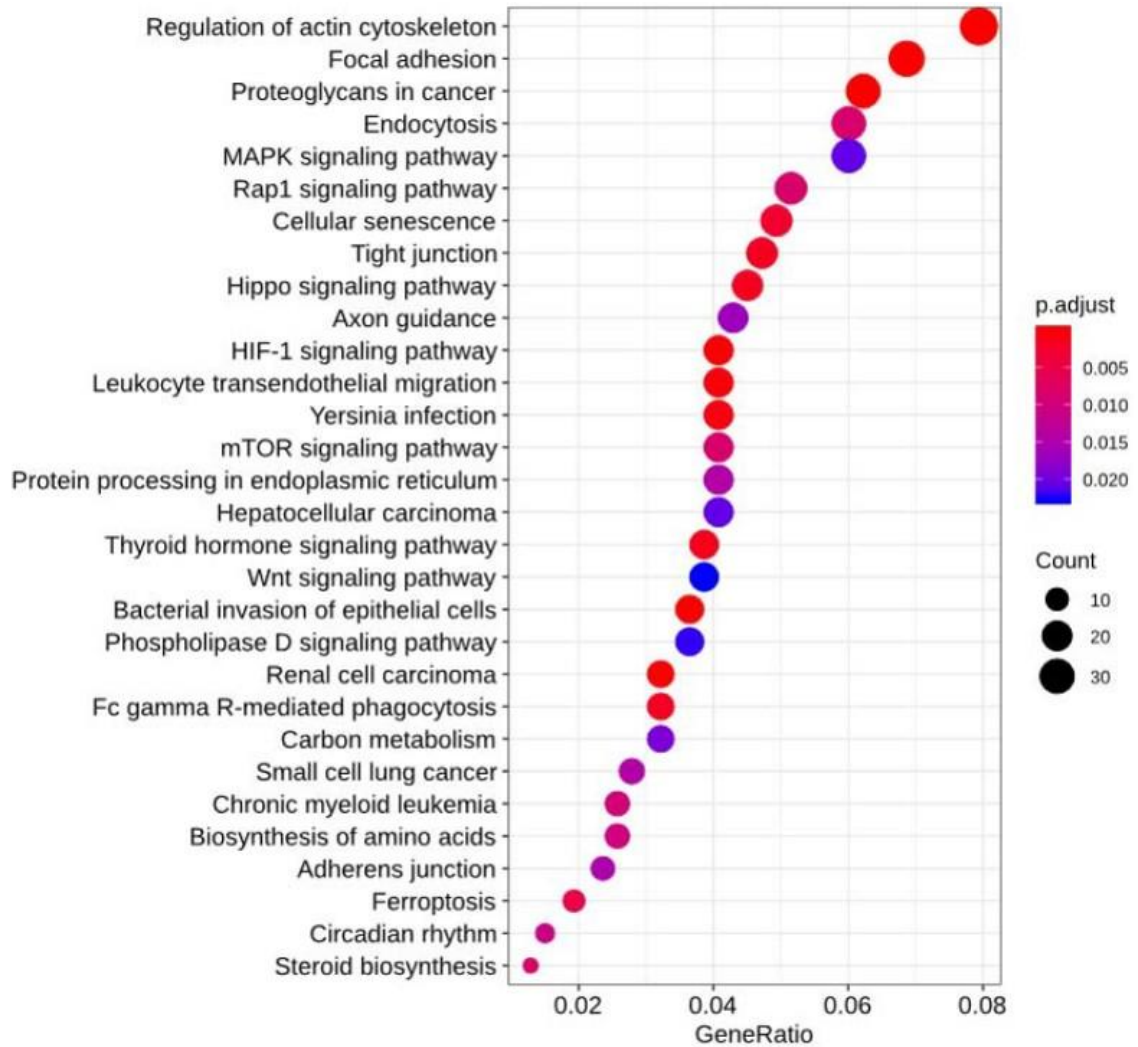
Ryc.4.19 Analiza porównawcza trzech zbiorów danych: (i) genów regulowanych w astrocytach, w modelu silnego stresu, Pels, (ii) wyników ekspresji dla astrocytów z pracy Cartera i wsp. (2012) i (iii) listy genów powiązanych z depresją u ludzi, opublikowanej w pracy Howarda i wsp. (2019). Niebieskie kropki oznaczają geny wspólne dla (i) i (ii). Czerwonymi kropkami oznaczono geny wspólne dla wszystkich trzech zbiorów danych.

Kolejno wykonano podobną analizę, zawiązując tym razem ilość genów, których zmiany ekspresji w astrocytach na skutek działania DEX wykazywały istotność statystyczną $FDR < 0,01$. Wyniki porównano z tymi opisanymi w pracy Cartera i wsp. (2012), dla tego samego punktu czasowego (4godziny, Ryc.4.19 – oznaczone niebieskimi kropkami). A następnie geny wspólne porównano z listą genów zidentyfikowanych jako powiązane z depresją u ludzi w pracy Howarda i wsp. (2019) (Ryc.4.19 – oznaczone czerwonymi kropkami). Co interesujące, w tym przypadku zidentyfikowano 5 genów (*Zhx3*, *Hspa1a*, *Sox6*, *Traf3* i *Sema6*) wspólnych dla analizowanych zbiorów – genów związanych z depresją u ludzi, jak również podlegającym zmianom ekspresji w mysich astrocytach kory przedczołowej, po 4-godzinnej inkubacji z DEX.

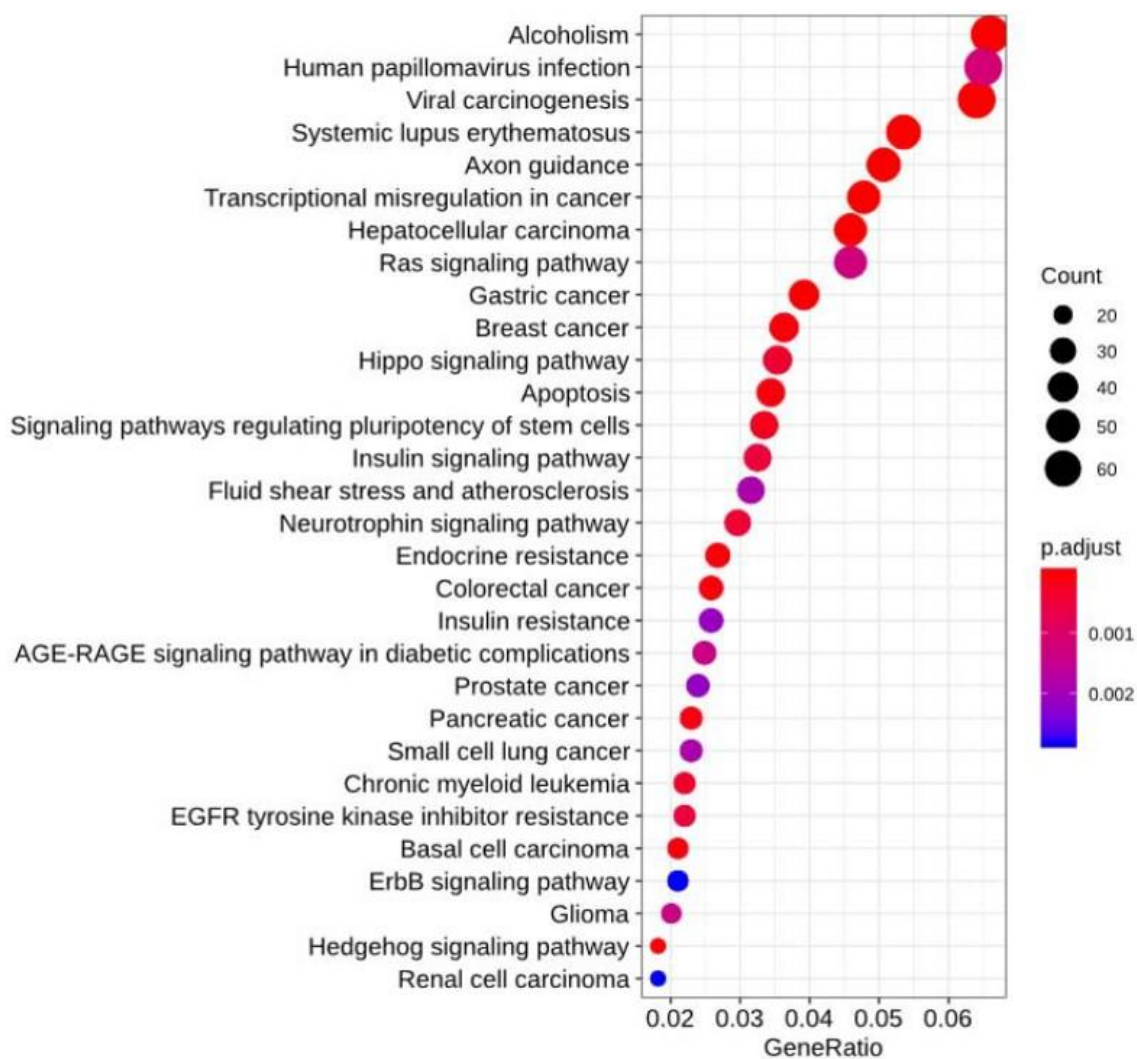
Aby poznać znaczenie funkcjonalne genów istotnie zmienionych ($FDR < 0,05$) w korowych, pierwotnych hodowlach astrocytarnych i neuronalnych, po 4-godzinnej inkubacji z DEX, wykonano analizę wzbogacenia w ścieżkach KEGG. KEGG (*ang. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) jest zbiorem bioinformatycznych baz danych zawierających informacje na temat genów, szlaków metabolicznych i metabolitów, przydzielonych do sieci białkowej, genetycznej i biochemicznej, co w konsekwencji pozwala na połączenie informacji genomicznych i funkcjonalnych.

Analizę wykonano z podziałem na geny, których poziom ekspresji zwiększał się lub zmniejszał na skutek działania DEX w obu rodzajach komórek. I tak, w przypadku astrocytów, duża liczba genów o zwiększonej ekspresji brała udział w regulacji cytoszkieletu aktynowego, oddziaływaniach komórki z macierzą zewnątrzkomórkową, czy endocytozie (Ryc.4.20). Wśród genów o zmniejszonej ekspresji w astrocytach znalazły się te związane z alkoholizmem, jak również infekcjami wirusowymi, czy procesem nowotworowym (Ryc.4.21). Warto zauważyć, że duża liczba genów, regulowanych w astrocytach, zarówno poprzez zwiększenie, jak i zmniejszenie ekspresji, związana była ze szlakiem odpowiedzialnym za regulację tworzenia sieci neuronalnych poprzez połączenia aksonalne (*ang. axon guidance*). W przypadku neuronów, co ciekawe, analiza wyróżniła tylko jedną ścieżkę KEGG wśród transkryptów regulowanych dodatnio. Znalazły się w niej klastry małych niekodujących cząsteczek RNA (miRNA) o funkcji regulatorowej w procesie nowotworzenia (dane nie prezentowane). Transkrypty o obniżonej ekspresji, pod wpływem działania DEX, w neuronach, w głównej mierze związane były z procesem termogenezy, ale także ze szlakami rozwoju chorób: Huntingtona, Parkinsona, czy Alzheimerera. Co ciekawe, tutaj

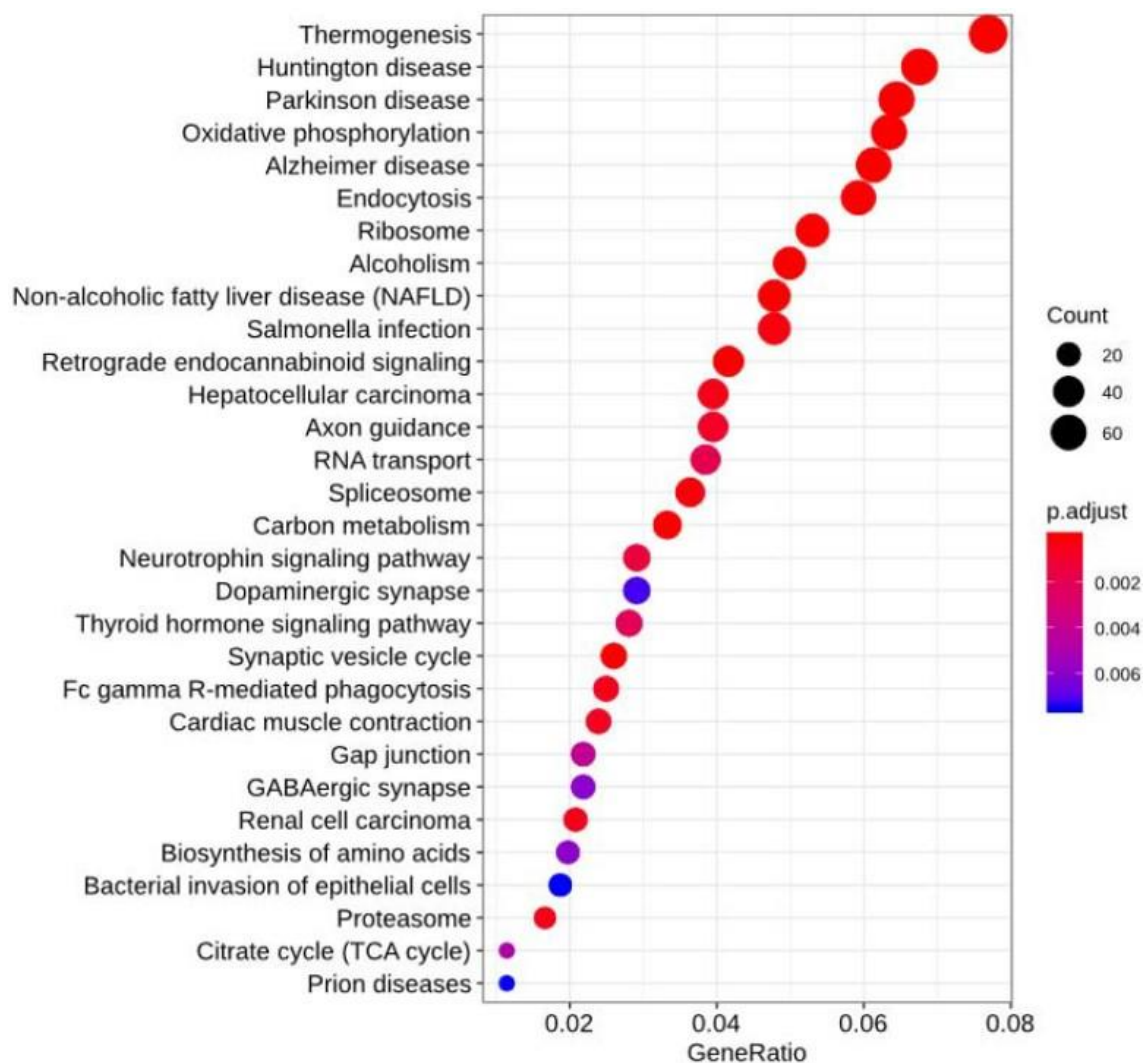
również znalazły się geny związane z procesem endocytozy oraz alkoholizmem (Ryc.4.2).



Ryc.4.20 Analiza funkcjonalna genów astrocytarnych, których poziom ekspresji wzrastał w skutek działania DEX, wyrażona jako wzbogacenie w ścieżkach KEGG. Kolor kropek oznacza stopień istotności FDR, wielkość kropki zaś – ilość analizowanych genów przydzielonych do danej ścieżki, w stosunku do wszystkich genów przypisanych do danej ścieżki w bazie KEGG.



Ryc.4.21 Analiza funkcjonalna genów astrocytarnych, których poziom ekspresji zmniejszył się w skutek działania DEX, wyrażona jako wzbogacenie w ścieżkach KEGG. Kolor kropek oznacza stopień istotności FDR, wielkość kropki zaś – ilość analizowanych genów przydzielonych do danej ścieżki, w stosunku do wszystkich genów przypisanych do danej ścieżki w bazie KEGG.



Ryc.4.22 Analiza funkcjonalna genów neuronalnych, których poziom ekspresji zmniejszył się w skutek działania DEX, wyrażona jako wzbogacenie w ścieżkach KEGG. Kolor kropek oznacza stopień istotności FDR, wielkość kropki zaś – ilość analizowanych genów przydzielonych do danej ścieżki, w stosunku do wszystkich genów przypisanych do danej ścieżki w bazie KEGG.

Podsumowując, w wyniku 4-godzinnej inkubacji z DEX dochodziło do aktywacji/inhibicji licznych genów w astrocytach (3938 genów) i neuronach (2662 geny). Geny te związane były z różnymi szlakami funkcjonalnymi: regulacją cytoszkieletu aktynowego, oddziaływaniami komórki z macierzą zewnątrzkomórkową, endocytozą (geny regulowane dodatnio w astrocytach); chorobą alkoholową, infekcjami wirusowymi (geny hamowane w astrocytach), czy chorobami neurodegeneracyjnymi (geny hamowane w neuronach). W wyniku porównania genów zmienionych w wyniku silnego stresu, w mysich neuronach i astrocytach ze zbiorem genów ludzkich związanych z depresją

zidentyfikowano 62 genów (FDR<0,05) i 5 genów (FDR<0,01) wspólnych dla obu zbiorów.

4.9. Globalna analiza zmian organizacji chromatyny, wynikających z jednorazowego podania deksametazonu, metodą ChIA-PET.

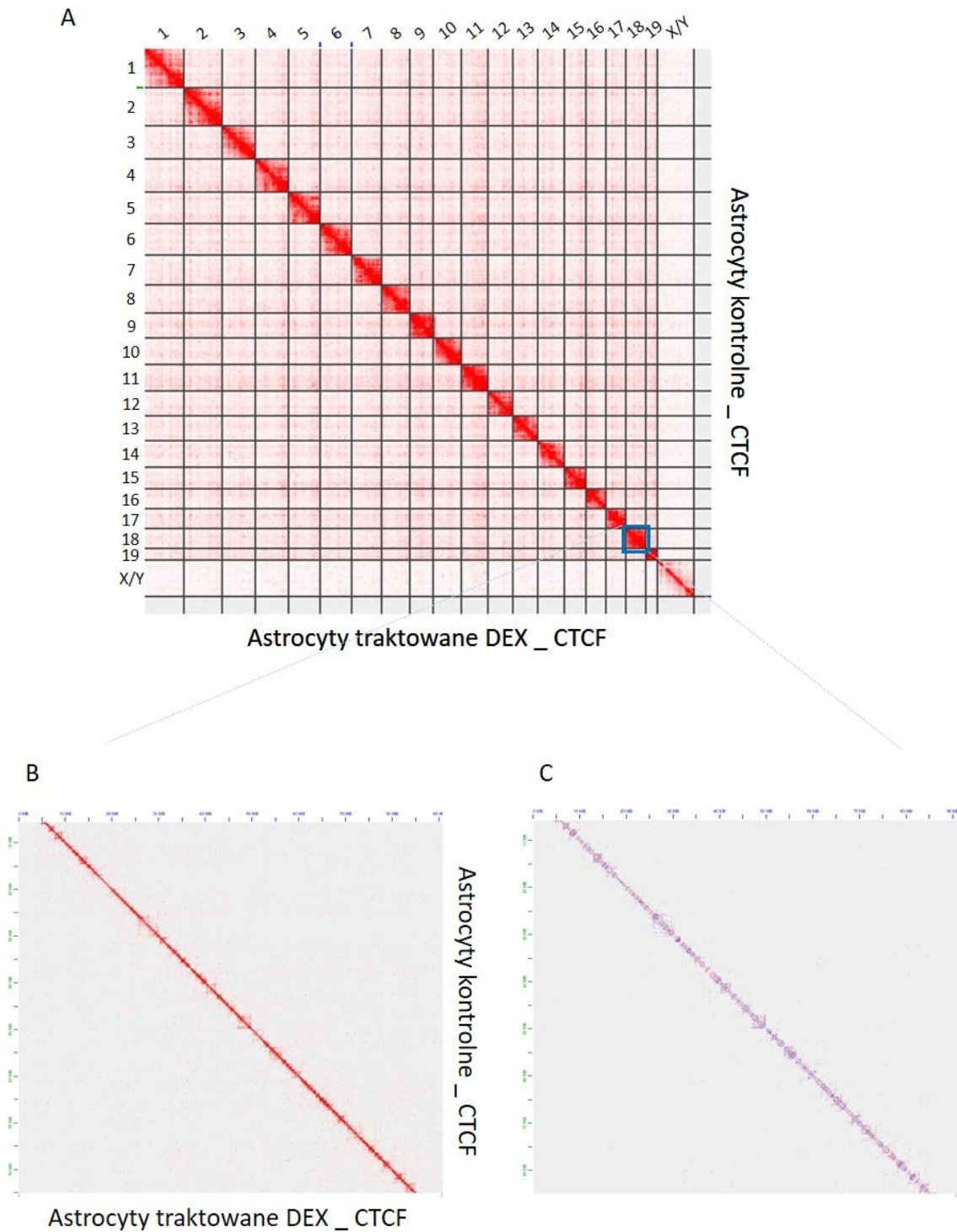
Ostatnim celem badawczym postawionym na potrzeby niniejszej pracy było określenie globalnych zmian w przestrzennej organizacji chromatyny wewnątrz jądra komórkowego neuronów i astrocytów kory przedczołowej, na skutek indukowanej DEX aktywacji GR. W poprzednim rozdziale opisane zostały liczne zmiany w ekspresji wielu genów spowodowanych działaniem DEX, a jak wiadomo są one nierozzerwalnie związane ze zmianami w przestrzennej organizacji chromatyny. W celu poznania tych zmian, zachodzących w komórkach mózgu poddanego działaniu stresu przeprowadzono kompleksową analizę wszystkich oddziaływań jakie zachodzą pomiędzy fragmentami chromatyny wewnątrz jądra komórkowego komórek nerwowych i astrocytów poddanych działaniu DEX. Było to możliwe dzięki zastosowaniu zaawansowanej metody badania interakcji międzychromatynowych: ChIA-PET.

Doświadczenia wykonano na korowych, pierwotnych neuronalnych i astrocytarnych hodowlach. Co istotne, wykorzystany materiał pochodził z tych samych hodowli, które wykorzystano do analizy ekspresji genów metodą sekwencjonowania RNA (rozdział 4.8). Komórki inkubowano z DEX (4 godz.). Następnie utrwalano naturalnie występujące w komórkach oddziaływania DNA-białko, przygotowano biblioteki i sekwencjonowano. Głębokość sekwencjonowania wynosiła 300-500 milionów sczytań, na jedną bibliotekę. Wybór hodowli komórkowej, jako materiału badawczego podyktowany był koniecznością uzyskania dużej liczby komórek: do przygotowania jednej biblioteki ChIA-PET potrzebne było aż 10 milionów komórek.

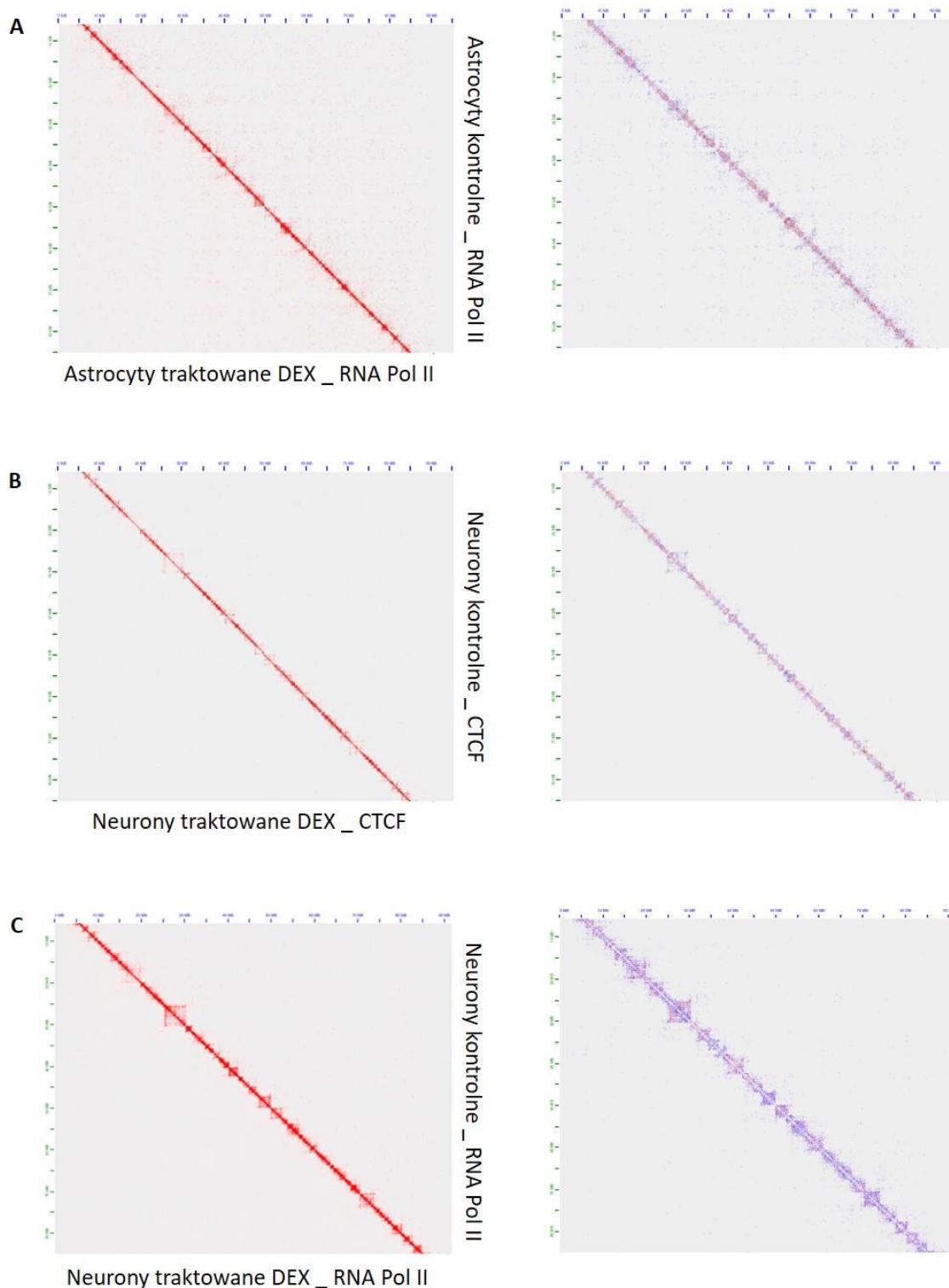
Przygotowane i zsekwencjonowane biblioteki weryfikowano pod względem jakości. Te, które spełniły kryteria podlegały analizie. W tabeli Tab.4.6 znajduje się wykaz wszystkich przygotowanych bibliotek wraz z przykładowymi parametrami je opisującymi. W przypadku, gdy dla danego punktu eksperymentalnego przygotowano więcej niż jedną bibliotekę, do dalszych analiz wybierano tę o lepszych parametrach.

Nr	Nazwa biblioteki	Rodzaj komórek	Czynnik	Wzbogacenie	% sekwencji z łącznikiem
1	LMA0001	Astrocyty kontrolne	CTCF		0,91
2	LMA0002V	Astrocyty kontrolne	RNA Pol II		0,77
3	LMA0003V	Astrocyty kontrolne	CTCF		0,90
4	LMA0004V	Astrocyty, DEX	CTCF		0,90
5	LMC0015	Neurony kontrolne	CTCF	P4 – 7,73	0,85
6	LMC0016	Neurony kontrolne	RNA Pol II	Pr1 – 6,1 Pr2 – 6,73	0,83
7	LMC0017	Neurony kontrolne	CTCF	Pr4 – 7,04	0,45
8	LMC0018	Neurony, DEX	CTCF	Pr4 – 7,245	0,90
9	LMC0019	Neurony kontrolne	RNA Pol II	Pr1 – 5,32 Pr2 – 6,685	0,90
10	LMC0020	Neurony korowe, DEX	RNA Pol II	Pr1 – 6,305 Pr2 – 7,455	0,92
11	LMC0021	Astrocyty, DEX	RNA Pol II	Pr1 – 6,08 Pr2 – 6,665	0,90
12	LMC0022	Astrocyty kontrolne	RNA Pol II	Pr1 – 6,08 Pr2 – 7,365	0,89

Tab.4.6 Wykaz wszystkich przygotowanych na poczet projektu, bibliotek ChIA-PET wraz z opisującymi je parametrami: wzbogaceniem (dla poszczególnych par starterów) oraz stosunkiem sekwencji zawierających łącznik w puki wszystkich uzyskanych sekwencji.



Ryc.4.23 Dane przedstawiające organizację genomu w mysich astrocytach kontrolnych i traktowanych DEX, uzyskane za pomocą metody ChIA-PET. Wyniki przedstawiono w postaci map kontaktów chromatynowych mediowanych przez białko CTCF, wzdłuż liniowej cząsteczki DNA. A – porównanie map kontaktów dla astrocytów kontrolnych i traktowanych DEX. B – porównawcza mapa kontaktów dla chromosomu 18, w obrębie którego znajduje się gen *Nr3c1*. Kolor czerwony oznacza dużą częstość występowania kontaktów, kolor biały – brak (A, B); C – mapa przedstawiająca różnice w oddziaływaniach pomiędzy astrocytami kontrolnymi i traktowanymi DEX. Kolor czerwony obejmuje interakcje występujące z większą częstością w komórkach traktowanych, kolor niebieski – w komórkach kontrolnych.



Ryc.4.24 Dane przedstawiające organizację chromaty w obrębie chromosomu 18 jako mapy kontaktów mediowanych przez białko RNA Pol II w astrocytach (A) i neuronach (C) oraz białko CTCF w neuronach (B). Wyniki przedstawiono w postaci (i) map kontaktów, gdzie kolor czerwony oznacza dużą częstość występowania kontaktów, kolor biały – brak, a także map różnic w oddziaływaniach pomiędzy komórkami kontrolnymi i traktowanymi DEX, gdzie kolor czerwony obejmuje interakcje występujące z większą częstością w komórkach traktowanych, kolor niebieski – w komórkach kontrolnych.

Pliki zawierające dane sekwencyjne poddawano przetworzeniu, za pomocą w pełni zautomatyzowanego narzędzia ChIA-PIPE (Lee i wsp., 2020). W trakcie analizy usunięto sekwencje łącznika a te fragmenty, które łącznik zawierały mapowano względem mysiego genomu referencyjnego mm10. Te interakcje, które charakteryzowały się wyższą częstością występowania uważane były za nieprzypadkowe. Warto zaznaczyć, iż ChIA-PIPE pozwala na uzyskanie nie tylko plików zawierających informacje o pętłach chromatynowych mediowanych przez konkretne białko, ale także informujące o częstości wszystkich kontaktów. Te ostatnie wizualizowano przy pomocy narzędzia Juicebox (Robinson i wsp., 2018), co pozwalało na uzyskanie charakterystycznych dla metody Hi-C map kontaktów (Ryc.2.23 i Ryc.4.24). Narzędzie to pozwoliło także na analizę porównawczą organizacji chromatyny w komórkach kontrolnych i traktowanych DEX. Zmiany w częstości oddziaływań widoczne były w obu typach komórek, zarówno jeśli chodzi o te związane z białkiem CTCF, jak i polimerazą RNA II (Ryc.4.23; Ryc.4.24) w obrębie chromosomu 18, w którym zlokalizowany jest gen *Nr3c1*.

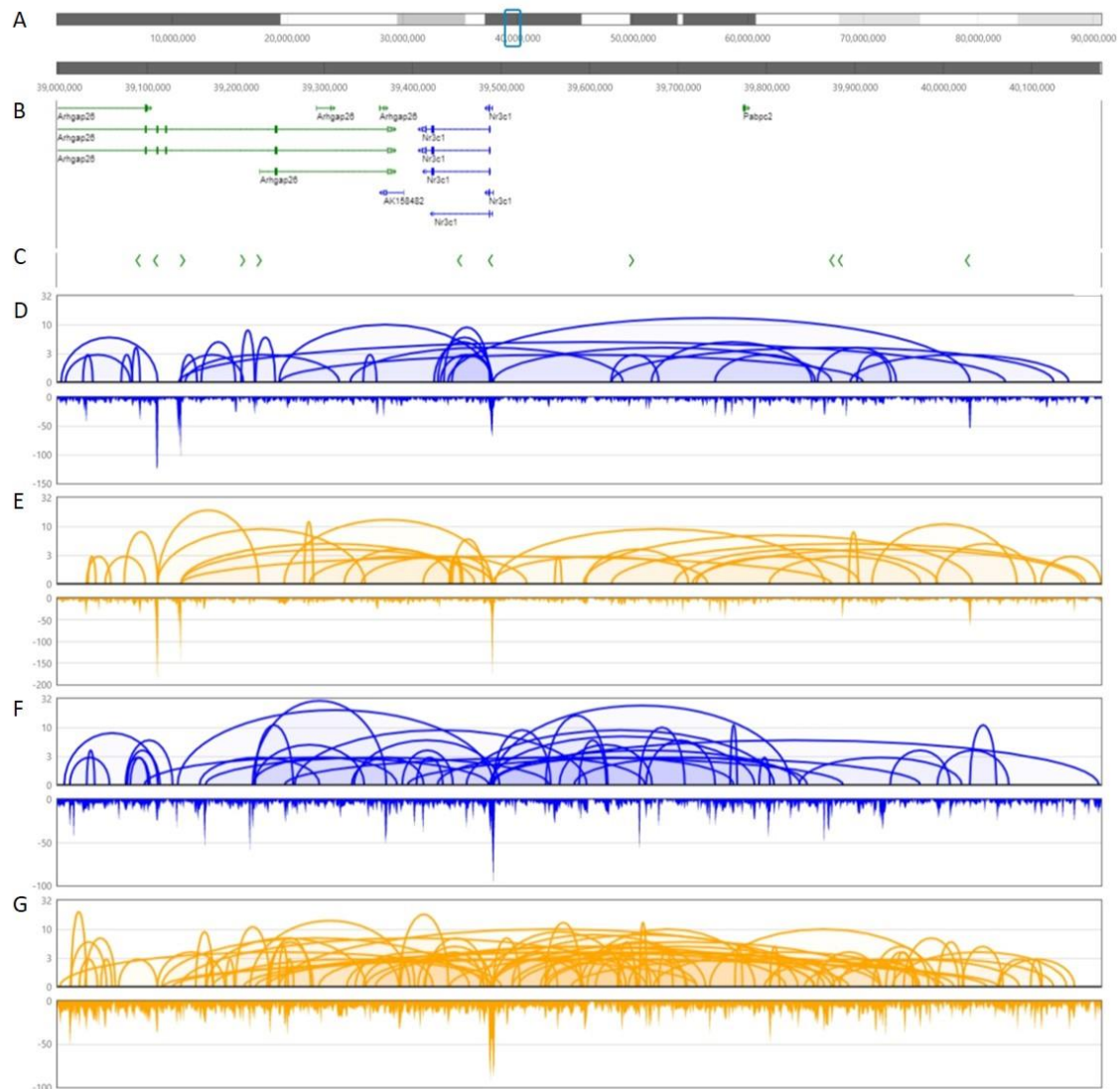
Następnie, używając przeglądarki BASIC Browser, wizualizowano rozkład pętli chromatynowych związanych z białkami: CTCF i RNA Pol II w neuronach i astrocytach kontrolnych i poddanych działaniu DEX w obrębie chromosomu 18:38998208-40178240, w bezpośrednim sąsiedztwie genu *Nr3c1*.

I tak, w przypadku astrocytów po inkubacji z DEX obserwowano zanik części pętli CTCF wewnątrz genu *Nr3c1*. W sąsiedztwie genu liczba pętli nie wykazywała większych zmian, niemniej jednak wyraźnej zmianie uległy miejsca tworzenia pętli (Ryc.4.25 D i E). Zwiększyła się natomiast ilość białka CTCF związanego w miejscu startu transkrypcji genu *Nr3c1*. Wyraźne zmiany obserwowano także w ilości pętli, których tworzeniu uczestniczyła polimeraza RNA II. W wyniku działania DEX zwiększała się nie tylko ogólna liczba pętli, ale również co ciekawe liczba pętli, których jeden z końców zlokalizowany był w miejscu startu transkrypcji (*ang. Transcription Start Site, TSS*) genu *Nr3c1* (Ryc.4.25 F i G).

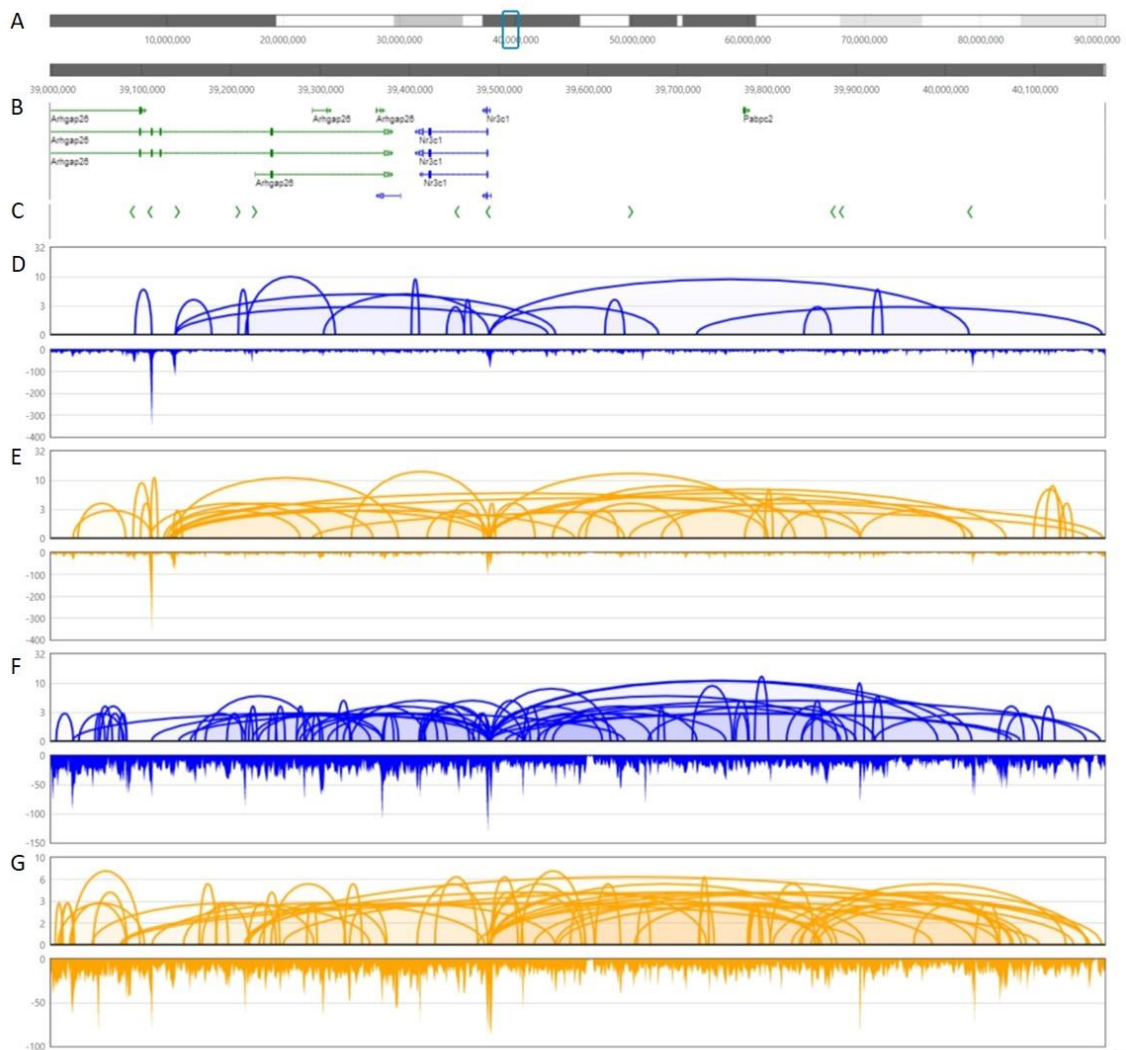
W przypadku neuronów, obserwowano zwiększenie ogólnej liczby pętli związanych z białkiem CTCF w wyniku działania DEX (Ryc.26.D i E), jak również tych, które rozpoczynały się lub kończyły w miejscu TSS genu *Nr3c1*. Odwrotną sytuację obserwowano, jeśli chodzi o pętle związane z RNA Pol II. Tutaj działanie DEX

powodowało zmniejszenie liczby pętli, w szczególności tych związanych z miejscem TSS analizowanego genu (Ryc.4.26 F i G).

Co ciekawe, w przypadku oby typów komórek, zaobserwowano duże, równoczesne nagromadzenie białek: CTCF i RNA Pol II w miejscu TSS genu *Nr3c1*.



Ryc.4.25 Mapy interakcji przedstawione w postaci pętli chromatynowych oraz gęstości wiązania białka CTCF lub RNA Pol II do danego miejsca w genomie, w obszarze genu *Nr3c1* w astrocytach. A – wizualizowany zakres chromosomu 18:38998208-40178240, B – lista genów znajdujących się w przedstawionym fragmencie chromosomu 18, C – motywy CTCF. Na panelach D-G przedstawiono pętłe chromatynowe oraz gęstość wiązania białka: CTCF w astrocytach kontrolnych (D) i traktowanych DEX (E) oraz białka RNA Pol II w astrocytach kontrolnych (F) i traktowanych DEX (G).



Ryc.4.26 Mapy interakcji przedstawione w postaci pętli chromatynowych oraz gęstości wiązania białka CTCF lub RNA Pol II do danego miejsca w genomie, w obszarze genu *Nr3c1* w neuronach. A – wizualizowany zakres chromosomu 18:38998208-40178240, B – lista genów znajdujących się w przedstawionym fragmencie chromosomu 18, C – motywy CTCF. Na panelach D-G przedstawiono pętłe chromatynowe oraz gęstość wiązania białka: CTCF w neuronach kontrolnych (D) i traktowanych DEX (E) oraz białka RNA Pol II w neuronach kontrolnych (F) i traktowanych DEX (G).

Podsumowując, globalna analiza interakcji międzychromatynowych wykazała zmiany w częstości oddziaływań, w których pośredniczyło białko CTCF i polimeraza RNA II w neuronach i astrocytach kory przedczołowej. Ponadto obserwowano zmiany lokalnej organizacji chromatyny w bezpośrednim otoczeniu genu *Nr3c1* we wszystkich wariantach eksperymentalnych.

5. Dyskusja

Badania przedstawione w niniejszej dysertacji opisują zmiany na poziomie molekularnym i zmiany epigenetyczne wyższego rzędu jakie zachodzą w jądrze komórkowym neuronów i astrocytów trzech struktur mózgu (kory przedczołowej, hipokampa i jądra półleżącego) na skutek masywnej stymulacji GR, a mających potencjalne znaczenie w rozwoju zaburzeń lękowych i depresji. Potwierdzono, iż zmiany ekspresji genu *Nr3c1*, kodującego GR korespondują ze zmianami lokalizacji alleli tego genu pomiędzy skondensowanymi i nieskondensowanymi obszarami chromatyny, we wszystkich badanych strukturach mózgu. Dodatkowo pokazano, iż masowa stymulacja GR prowadzi do zróżnicowanej odpowiedzi neuronów i astrocytów kory przedczołowej, poprzez aktywację różnych ścieżek sygnałowych. Zidentyfikowano geny ulegające podobnym zmianom w komórkach kory przedczołowej myszy traktowanych DEX oraz ludzi, u których zdiagnozowano depresję (Howard i wsp., 2019). Wykazano, iż zmiany ekspresji licznych genów związane są z globalną reorganizacją struktury chromatyny, zarówno w neuronach, jak i astrocytach kory przedczołowej.

Prezentowane w niniejszej pracy wyniki, pokazują po raz pierwszy zmiany morfometryczne (wywołane silnym stresem przemieszczanie się alleli genu *Nr3c1* wewnątrz jądra komórkowego), biochemiczne (aktywację ścieżek sygnałowych związanych z ekspresją genów) i strukturalne (zmiany organizacji chromatyny wewnątrz jądra komórkowego), będących wynikiem masywnej stymulacji GR. Wskazują także na znaczącą rolę astrocytów, w wymienionych powyżej procesach.

5.1. Analiza zmian ekspresji i zmian morfometrycznych dotyczących genu *Nr3c1*, będących skutkiem silnego stresu.

Istotnym elementem rozwoju zaburzeń lękowych i depresji są zaburzenia działania osi HPA związane z nadmiernym wydzielaniem glukokortykoidów. To z kolei prowadzi do nadmiernej aktywacji GR. Badania wykazały, iż podobną, masywną aktywację GR, imitującą sytuację silnego stresu, można wywołać używając syntetycznego agonisty GR – DEX (Cruceanu i wsp., 2021; Yao i wsp., 2020). Niemal stu procentowa specyficzność DEX względem GR i dłuższy czas działania, w porównaniu do endogennych glukokortykoidów, a także udowodnione działanie

prodepresyjne zarówno u ludzi, jak i zwierząt, czyni go dobrym narzędziem stosowanym powszechnie w celu indukowania zaburzeń lękowych/ depresji w badaniach prowadzonych z wykorzystaniem zarówno modeli komórkowych, jak i zwierzęcych (Yuen i wsp., 2009; Slezak i wsp., 2013; Wróbel i wsp., 2013; Petropoulos i wsp., 2014; Skupio i wsp., 2015). GR aktywowany na skutek przyłączenia cząsteczki glukokortykoidu, ulega translokacji do jądra komórkowego, gdzie działa jako czynnik transkrypcyjny, aktywując, bądź hamując ekspresję wielu genów, w tym genu *Nr3c1*, kodującego GR. Do tej pory wykazano, iż na skutek przewlekłego podawania DEX dochodzi do zmian w ekspresji tego genu w tkance kory przedczołowej, hipokampa i prążkowie (Skupio i wsp., 2015). W niniejszej pracy pokazano dodatkowo, iż zmiany w ekspresji obserwowane są, nie tylko na poziomie tkanki, ale także poszczególnych typów komórek. Stosując pierwotne hodowle neuronalne i astrocytarne wyprowadzone z kory przedczołowej mysich embrionów E16, szczepu C57BL/6J wykazano, iż w obu typach komórek działanie DEX (100nM) powoduje obniżenie poziomu ekspresji genu *Nr3c1*. Co więcej zmiany te zależne są od czasu działania DEX.

Największy spadek ekspresji, obserwowano już po 4 godzinach inkubacji z DEX, co, z jednej strony może mieć związek z wysoką skutecznością działania DEX, a także być skorelowane z obecnością kompleksu hamującego. Traktowanie komórek DEX powoduje bardzo wydajną aktywację GR i przemieszczenie kompleksów GR:DEX do jądra. W pracy Kevina i wsp. (2013) wykazano, iż blisko 60% kompleksów znajdujących się początkowo w cytoplazmie ulega translokacji do jądra w ciągu pierwszych 15 minut inkubacji z DEX. Co więcej, obserwowane zmiany skorelowane były w czasie ze zmianami licznych, innych genów, których ekspresja, podobnie jak genu *Nr3c1*, regulowana jest przez GR (Slezak i wsp., 2013). W pracy Ramamoorthy i wsp. (2012) pokazano, iż już po 15 minutach inkubacji komórek raka płuca (A549) z DEX (100nM), dochodzi do utworzenia kompleksu złożonego z aktywowanego białka GR (po przyłączeniu cząsteczki DEX) związanego z miejscem nGRE, (odpowiedzialnym za negatywną regulację transkrypcji) znajdującym się w obrębie eksonu 6 genu *Nr3c1*, a także białek: NCoR1 i HDAC3. Powstała w ten sposób pętla chromatynowa łącząca ekson 6 z miejscem startu transkrypcji, stabilizowana przez kompleks hamujący skutecznie uniemożliwia transkrypcję genu *Nr3c1* aż do 8 godzin po zadziałaniu czynnika stresowego.

Warto także zauważyć, iż profil zmian ekspresji genu *Nr3c1*, zarówno w przypadku pierwotnych hodowli astrocytarnych, jak i neuronalnych, tzn. duży spadek w pierwszych godzinach inkubacji z DEX, a następnie stopniowy wzrost ekspresji po 24 i 48 godzinach przypominał ten, obserwowany dla hepatocytów wątroby szczura po podaniu jednorazowej dawki DEX (Okret i wsp., 1991).

W pracy pokazano także, iż ekspresja genu *Nr3c1* zmienia się nie tylko w przypadku hodowli komórkowych poddanych działaniu DEX, ale także tkanek pobranych od zwierząt, już po jednorazowym podaniu DEX w postaci zastrzyku dootrzewnowego (w dawce 4mg/ kg masy ciała). Co istotne, zastrzyki podawano godzinę po włączeniu światła w pokoju hodowlanym, w którym znajdowały się zwierzęta, czyli w czasie kiedy poziom kortykosteronu w ich krwi był najniższy (Malish i wsp., 2008). Dodatkowo, aby wyeliminować możliwość, iż obserwowane zmiany były wynikiem działania endogennych glukokortykoidów wydzielanych w sytuacji stresowej, wszystkie zwierzęta podlegały habitacji, co niwelowało stres związany z obecnością eksperymentatora, a także wszystkie zwierzęta, zarówno traktowane, jak i kontrolne otrzymały zastrzyk, co z kolei pozwalało wykluczyć stres związany z samym ukłuciem.

Po 4 godzinach od podania zastrzyku dochodziło do znaczącej zmiany poziomu ekspresji genu *Nr3c1* we wszystkich trzech badanych strukturach mózgu: korze przedczołowej, hipokampie i jądrze półleżącym. Nadmienić należy, iż wybór tych struktur mózgu wynikał z ich bezpośredniego związku z zaburzeniami, zarówno behawioralnymi, jak również morfologicznymi i molekularnymi obserwowanymi w ich obrębie, w wyniku rozwoju zaburzeń lękowych i depresji (Drevets, 2007; Drevets i Furey, 2009; Francis i wsp., 2015).

Interesującą obserwacją był kierunek zmian ekspresji genu *Nr3c1* w badanych strukturach mózgu: spadek w przypadku kory przedczołowej i jądra półleżącego, a wzrost w przypadku hipokampa. Różnice te najprawdopodobniej związane są z gęstością rozmieszczenia GR oraz funkcjami, jakie struktury te pełnią w odpowiedzi organizmu na stres. Już w latach osiemdziesiątych XX wieku, wykazano, iż w normalnych warunkach działanie osi HPA regulowane jest poprzez wiązanie glukokortykoidów przez receptory mineralokortykoidowe zlokalizowane w obrębie hipokampa, a także przez działanie hamujące hipokampa względem jądra przykomorowego podwzgórza, odpowiedzialnego za uwalnianie kortykoliberyny (De Kloet i Reul, 1987). W warunkach silnego lub

przewlekłego stresu, nadmierny poziom glukokortykoidów powoduje aktywację GR. Te w przeciwieństwie do receptorów mineralokortykoidowych, rozmieszczone są we wszystkich strukturach mózgu, choć nierównomiernie, m.in. w hipokampie ich ilość jest znacznie wyższa (Reul i wsp., 1987). To z kolei może sugerować istotną rolę tej struktury w odpowiedzi na silny stres. Obserwowana, zwiększona ekspresja genu *Nr3c1* w hipokampie, w 4 godziny po podaniu DEX, być może przekłada się na zwiększoną ilość białka GR, co z kolei umożliwia związanie większej ilości DEX znajdującego się we krwi i ustabilizowania działania osi HPA. W zgodzie z postawioną hipotezą, są badania pokazujące, iż zwiększoną ekspresję genu *Nr3c1* w hipokampie, skorelowaną z obecnością 5-hydroksymetylocytozyny (związanej z aktywną transkrypcją genów) zaobserwowano u 7-tygodniowych myszy poddanych jednorazowemu stresowi unieruchomienia (McGowan i wsp., 2009; Li i wsp., 2015). Dodatkowo, u myszy hodowlanych pojedynczo w klatkach, które miały swobodny dostęp do kołowrotka, obserwowano zwiększony poziom ekspresji genu *Nr3c1* w hipokampie, co korelowano z większą odpornością tych zwierząt na stres, mierzoną za pomocą testów behawioralnych, w porównaniu do zwierząt, które nie miały dostępu do tego rodzaju aktywności fizycznej (Pan-Vazquez i wsp., 2015).

Ciekawym spostrzeżeniem jest różny wpływ na działanie konkretnych struktur mózgu wywierany przez ten sam czynnik stresowy. Wystąpienia publiczne, stresor często wykorzystywany w badaniach behawioralnych, z jednej strony poprawia działanie pamięci przestrzennej, co związane jest z funkcją hipokampa, a z drugiej zaburza zdolności poznawcze i pamięć roboczą, co z kolei stanowi funkcję kory przedczołowej (Alexander i wsp., 2007; Luethi i wsp., 2008; Arnsten 2009). Podobnie, przedstawione w niniejszej pracy badania wykazały, iż ten sam stresor – **pojedyncza dawka DEX w przypadku hipokampa powodował wzrost poziomu ekspresji genu *Nr3c1*, a w przypadku kory przedczołowej i jądra półzającego, przeciwnie – ekspresja zmniejszała się.** Co ciekawe, obniżony poziom ekspresji genu kodującego GR w obrębie kory przedczołowej obserwowano także u pacjentów ze diagnozowaną schizofrenią (Sinclair i wsp., 2011) i depresją (Webster i wsp., 2002). U osób, które popełniły samobójstwo, w obu strukturach obserwowano zmiany w ekspresji genów (kodujących białka należące do rodziny metalotionein) regulowanych przez glukokortykoidy/ stres (Sequeira i wsp., 2012).

Obecny stan wiedzy wskazuje, iż aktywność transkrypcyjna genów jest ściśle powiązana z organizacją chromatyny w jądrze komórkowym. W pracy Szczerbal i wsp. (2009) pokazano, iż w procesie adipogenezy u świni dochodzi do przemieszczenia w kierunku środka jądra komórkowego, alleli genów ulegających ekspresji w momencie przeprowadzanej analizy. Zatem, w kolejnym etapie projektu przeprowadzono analizy morfometryczne w celu weryfikacji, czy zmiany w ekspresji genu *Nr3c1* zaobserwowane w korze przedczołowej, jądrze pólleżącym i hipokampie są powiązane z lokalnymi zmianami organizacji chromatyny, m.in. przemieszczeniem alleli wewnątrz jądra komórkowego.

Analiza przeprowadzona została na stosach obrazów mikroskopowych przy użyciu programu Segmentation magick. Co istotne, program ten określał lokalizację alleli wewnątrz konkretnych obszarów chromatynowych jądra komórkowego wykorzystując zadany próg odcięcia (*ang. threshold*). Poprawne określenie tego parametru było niezwykle ważne, ze względu na dokładność uzyskanych wyników. Po przeanalizowaniu kilkudziesięciu jąder zarówno neuronów, jak i astrocytów zdecydowano, iż najbardziej odpowiednim będzie próg, który odcinał intensywność fluorescencji przy jej skokowej zmianie. W związku z tym za obszary o chromatynie skondensowanej uważane były tylko te fragmenty jądra komórkowego, które charakteryzowały się odpowiednio wysoką fluorescencją (barwnika Hoechst użytego do wyznakowania DNA), np. chromocentra. Choć można przypuszczać, iż obszary te ze względu na stopień upakowania DNA najprawdopodobniej składają się z chromatyny nieaktywnej transkrypcyjnie (Fakan, 2004), to z całą pewnością nie można określić obszarów, które nie wykazywały odpowiednio wysokiej fluorescencji jako miejsca aktywnej transkrypcji. W pracy Cremer i wsp. (2004) wykazano, iż chromatyna nieaktywna transkrypcyjnie może przybierać strukturę cienkich siateczek o niskiej intensywności, które rozpościerają się w całej objętości jądra komórkowego. Dlatego też, w obszarach określanych jako nieskondensowane, wciąż może znajdować się chromatyna nieaktywna transkrypcyjnie.

Co ważne, **wyniki analiz morfometrycznych lokalizacji alleli genu *Nr3c1* korespondowały ze zmianami ekspresji tego genu w poszczególnych strukturach.** I tak, z przypadku kory przedczołowej (II i III warstwa) i jądra pólleżącego (obszar rdzenia), gdzie obserwowano zmniejszoną ekspresję genu kodującego GR, jego allele ulegały przemieszczeniu do obszarów skondensowanej chromatyny – najprawdopodobniej nieaktywnej transkrypcyjnie. Zatem można przypuszczać, iż takie

przemieszczenie wiązało się z inaktywacją genu. Analogicznie, przemieszczenie alleli do obszarów nieskondensowanych w komórkach pola CA3 hipokampa, najprawdopodobniej wynikało z ich aktywacji, co przekładało się na zwiększenie ekspresji. Warto również zauważyć iż wielkość zmian w poziomie ekspresji i liczba alleli które uległy przemieszczeniu były ze sobą ściśle powiązane.

Wyjaśnić należy, dlaczego analizy morfometryczne wykonano na konkretnych obszarach badanych struktur mózgu. Jak już wspomniano, wszystkie trzy wymienione struktury związane są z rozwojem zaburzeń lękowych. Ponadto, kora przedczołowa, uważana jest za centralny układ wykonawczy pamięci roboczej, który odpowiada za analizę i odpowiedź na bodźce pochodzące ze środowiska, w tym bodźce stresowe (Arnsten, 2009). W literaturze opisano wiele przykładów zmian morfologicznych i molekularnych, zachodzących w jej obrębie w wyniku zadziałania bodźca stresowego. W większości, zmiany te kojarzone są ze zwiększonym poziomem glukokortykoidów i aktywacją GR. Szczególną uwagę zwraca się na II i III warstwę kory przedczołowej, sugerując jej kluczowe znaczenie, nie tylko dla odpowiedzi stresowej, ale także rozwoju depresji (Shrestha i wsp., 2015). Potwierdzają to badania, w których m.in. w skutek podawania szczurom DEX obserwowano zmniejszenie całkowitej objętości struktury oraz redukcję długości (Cerqueira i wsp., 2007) i stopnia rozgałęzienia (Radley i wsp., 2004) dendrytów apikalnych neuronów piramidowych we wspomnianych warstwach kory przedczołowej. Wykazano ponadto, iż częściowe wyciszenie genu kodującego GR w tym obszarze mózgu prowadziło do nadaktywności osi HPA i wystąpienia zachowań typowych dla depresji (zwiększony bezruch w teście FST, nadaktywność ruchowa w teście otwartego pola) u szczurów (McKlveen i wsp., 2013). Z tego też względu analizę morfometryczną (dyskutowaną dalej) przeprowadzono na neuronach i astrocytach znajdujących się właśnie w II i III warstwie kory przedczołowej. Jądro półleżące z kolei, jest centralną częścią układu nagrody, związanego z kontrolą zachowania i motywacją, a w warunkach patologicznych - zachowaniami depresyjnymi. Struktura ta otrzymuje informacje m.in. z kory przedczołowej i hipokampa. Nadaktywność kory przedczołowej powoduje zaburzenia w działaniu rdzenia (*ang.* core) jądra półleżącego, co odgrywa istotną rolę m.in. w rozwoju PTSD (Piao i wsp., 2017). Co więcej, obserwowane zmniejszenie ekspresji genu *Nr3c1* w obrębie tej struktury ma związek z odpowiedzią stresową. Jak pokazano u szczurów, w warunkach naturalnych, obniżony poziom ekspresji genu kodującego GR występuje u osobników wykazujących większy niepokój

i zachowania poddańcze, w porównaniu do osobników dominujących (Papilloud i wsp., 2020). Ze względu na powyższe, w dalszych analizach morfometrycznych skupiono się na komórkach (neuronach i astrocytach) znajdujących się w obrębie obszaru rdzenia jądra półleżącego. W przypadku hipokampa analizy morfometryczne prowadzono dla komórek obszaru CA3, gdzie obserwowano liczne zmiany morfologiczne, zarówno u zwierząt, jak i ludzi, u których zdiagnozowano depresję. Wywołane przewlekłym stresem skrócenie dendrytów i zanik rozgałęzień dendrytycznych w tym obszarze łączy jest z zaburzeniami pamięci przestrzennej. Wykazano, iż ma także wpływ na działanie osi HPA, a przez to pośrednio na regulację wydzielania glukokortykoidów (Conrad, 2006).

Ponadto allele genu *Nr3c1* w obrębie jąder komórkowych astrocytów ulegały przemieszczeniu względem otoczki jądrowej. Niemniej jednak proces ten nie był skorelowany ze zmianami w poziomie ekspresji – w jądrze półleżącym allele wyraźnie zbliżały się do otoczki, w korze przedczołowej oddalały, a w hipokampie nie obserwowano znaczących zmian. Można zatem przypuszczać, iż obserwowane zjawisko nie wiązało się z ukierunkowanym przemieszczeniem alleli w pobliże kompleksów porów jądrowych, odpowiedzialnych za transport makrocząsteczek pomiędzy jądrem komórkowym, a cytoplazmą. Wyjaśnić należy, iż chromatyna wokół kompleksu poru jądrowego jest aktywna transkrypcyjnie, a zgodnie z teorią sygnałową (*ang. gene gating hypothesis*), relokalizacja alleli w pobliże kompleksu ułatwia eksport mRNA (Blobel, 1985; Taddei i wsp., 2006). Obserwowane zmiany w korze przedczołowej i jądrze półleżącym wynikały najprawdopodobniej z przemieszczenia alleli do obszarów skondensowanych (nieaktywnych) transkrypcyjnie (Cremer i wsp., 2004).

Zmiany w lokalizacji alleli widoczne były zarówno w neuronach, jak i astrocytach wszystkich analizowanych struktur mózgu. I choć dla każdej ze struktur oba typy komórek prezentowały ten sam kierunek zmian, to jedynie te obserwowane w astrocytach były istotne statystycznie ($p < 0,001$, test Monte Carlo). W przypadku neuronów ilość alleli, która uległa przemieszczeniu w porównaniu do kontroli była znacznie niższa. Ponadto nie obserwowano niemal żadnych zmian w odległości alleli od otoczki jądrowej, z wyjątkiem niewielkiego zbliżenia w neuronach hipokampa. Dodatkowo bezwzględny poziom ekspresji genu *Nr3c1* w neuronach kontrolnych pochodzących z korowych hodowli pierwotnych był ponad 6-krotni niższy w porównaniu do kontrolnych astrocytów pochodzących z analogicznych hodowli. Podobne wyniki, świadczące o znacznie wyższej ekspresji genu kodującego GR w astrocytach, w porównaniu do neuronów

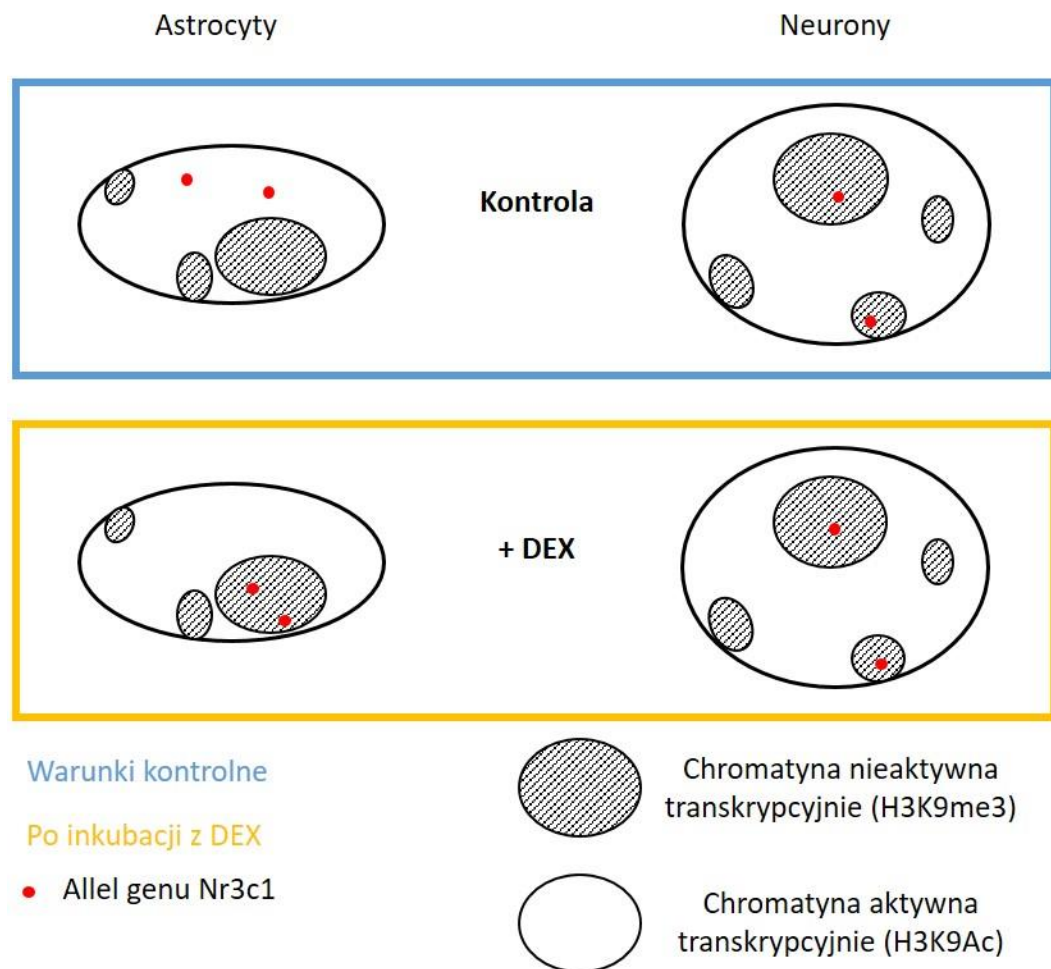
pokazano w pracy Piechota i wsp. (Piechota i wsp., 2017). Można zatem przyjąć, iż zmiany w ekspresji genu kodującego GR w poszczególnych strukturach mózgu mierzone w homogenacie tkankowym, zachodzą w głównej mierze w astrocytach. Sugeruje to istotną rolę tych komórek w reakcji stresowej.

Zaznaczyć należy, iż w przedstawionej analizie morfometrycznej do wyznakowania astrocytów używano przeciwciała skierowanego przeciwko białku GFAP. Białko to, choć charakterystyczne dla astrocytów, obecne jest jedynie w 15% wszystkich komórek tego typu w mózgu (Bushong i wsp., 2002). Niemniej jednak, ze względu na nierównomierne rozmieszczenie astrocytów GFAP pozytywnych w strukturach mózgu, marker ten uważa się za najbardziej odpowiedni do znakowania astrocytów m.in. w hipokampie (Zhang i wsp., 2019). Dodatkowo liczne prace pokazują, iż zmiany w poziomie tego białka, a także zmniejszenie liczby astrocytów GFAP pozytywnych m.in. w korze przedczołowej związane są z zaburzeniami lękowymi i depresją (Lima i wsp., 2014), a zwiększenie mRNA GFAP obserwowano w wyniku terapii antydepresyjnej (Fujiki i Steward, 1997). Z tego też względu morfometryczna analiza zmian związanych z lokalizacją alleli genu *Nr3c1* właśnie w astrocytach GFAP-pozytywnych wydaje się zasadna.

Podsumowując, wykazano, iż jednorazowe podanie DEX wywoływało przemieszczenie alleli genu *Nr3c1* w obrębie jądra komórkowego, w trzech strukturach mózgu związanych z depresją, co ze względu na obserwowaną korelację ze zmianami w ekspresji tego genu, najprawdopodobniej związane było z jego aktywacją lub inaktywacją. Dodatkowo, pokazano, iż ogromna większość obserwowanych zmian lokalnej organizacji chromatyny zachodzi w jądrach komórkowych astrocytów, we wszystkich analizowanych strukturach. W neuronach zaś zmiany te nie wykazywały istotności statystycznej. Zatem, kolejnym etapem była próba wyjaśnienia zróżnicowanego nasilenia odpowiedzi tych dwóch typów komórek na działanie silnego stresu.

I tak, poprzez wykonanie szeregu hybrydyzacji FISH połączonych z barwieniami immunocytochemicznymi markerów chromatyny aktywnej (H3K9Ac) i nieaktywnej (H3K9me3) transkrypcyjnie wykazano iż **obserwowane w astrocytach kory przedczołowej zmniejszenie ekspresji genu *Nr3c1* i przemieszczenie alleli do obszarów skondensowanej chromatyny wskutek działania DEX wiąże się**

jednocześnie z wyciszeniem genu. W neuronach natomiast, brak wyraźnych zmian w lokalizacji alleli i ekspresji genu *Nr3c1* wynikał ze związania alleli z nieaktywną transkrypcyjnie chromatyną nie tylko po zadziałaniu DEX, ale również w komórkach kontrolnych (Ryc.5.1).



Ryc.5.1 Schemat przedstawiający zmiany lokalizacji alleli genu *Nr3c1* podczas odpowiedzi stresowej (wywołanej inkubacją z DEX) w astrocytach i neuronach kory przedczołowej. W warunkach kontrolnych, w astrocytach wykazujących wyższą ekspresję genu *Nr3c1*, allele tego genu zlokalizowane są w obszarach chromatyny aktywnej transkrypcyjnie. W wyniku zadziałania czynnika stresowego allele ulegają przemieszczeniu do obszarów nieaktywnych transkrypcyjnie, co związane jest z jednoczesnym obniżeniem ekspresji genu *Nr3c1*. W przypadku neuronów allele zlokalizowane są w obszarach chromatyny nieaktywnej transkrypcyjnie, zarówno w warunkach kontrolnych, jak i po zadziałaniu czynnika stresowego. Przekłada się to na znacznie niższy poziom ekspresji genu *Nr3c1* w warunkach kontrolnych, w porównaniu do astrocytów i niewielkie zmiany ekspresji w wyniku inkubacji z DEX.

Uzyskane wyniki sugerują mniejszą wrażliwość neuronów na podwyższony poziom glukokortykoidów, w porównaniu do astrocytów. Podobny efekty, selektywnej aktywacji ekspresji genów zależnych od GR w astrocytach prądkowia przedstawiono w pracy Slezak i wsp. (2013). Po czterech godzinach inkubacji z DEX obserwowano zmiany poziomu transkrypcji 32 genów w astrocytach, podczas, gdy nie obserwowano żadnych zmian w neuronach. W pracy Piechota i wsp. (2017) porównano wpływ agonistów receptorów steroidowych na transkrypcję genów w hodowlach neuronalnych i astrocytarnych. W wyniku czego wykazano, iż astrocyty stanowią główny cel działania steroidów w ośrodkowym układzie nerwowym. A zmiany indukowane aktywacją GR mogą pełnić istotną rolę w regulacji działania osi HPA i reakcji organizmu na stres.

Warto zaznaczyć, iż wyniki te charakteryzowały się dużą dokładnością, m.in. dzięki (i) zastosowaniu przeciwciał specyficznych dla markerów aktywności chromatyny, (ii) roztworu streptawidyny sprzężonej z fluorochromem AbberiorStar 635p do detekcji sondy, zamiast dwóch różnych przeciwciał i (iii) mikroskopii superrozdzielczej STED, która umożliwiła skanowanie z rozdzielczością 24nm w osiach x-y i 183nm w osi z. Z drugiej strony, stosowanie mikroskopii STED wiązało się z pewnymi ograniczeniami, głównie jeśli chodzi o zmniejszenie rozdzielczości wraz z głębokością skanowania na skutek rozpraszania i absorpcji światła przez tkankę (Galbraith i Galbraith, 2011). Z tego też względu doświadczenia wykonano na pierwotnych hodowlach neuronalnych i astrocytarnych.

Ponadto, ze względu na czasochłonność skanowania superrozdzielczego STED (ok. 40 min/ 1 komórkę) analizy przeprowadzono jedynie na pierwotnych hodowlach komórkowych wyprowadzonych z kory przedczołowej. Strukturę tę wybrano ze względu na dyskutowane wcześniej wyraźne zmiany w ekspresji genu *Nr3c1* w zależności od czasu inkubacji z DEX.

Podsumowując, wyniki omówione w niniejszym rozdziale jasno pokazują, iż działanie silnego stresu powoduje zależne od aktywacji GR zmiany w ekspresji genu *Nr3c1* w neuronach i astrocytach kory przedczołowej, hipokampa i jądra półleżącego – struktur mózgu ściśle związanych z patogenezą depresji. Po raz pierwszy pokazano, iż zmiany te związane są lokalną reorganizacją struktury chromatyny, w obrębie genu kodującego GR. Ponadto wykazano, iż różnice w odpowiedzi neuronów i astrocytów

wynikają z ich bazowej lokalizacji alleli genu *Nr3c1*, co najprawdopodobniej ma związek z wrażliwością tych komórek na stres.

5.2. Porównanie zmian morfometrycznych dotyczących genu *Nr3c1* u zwierząt, na skutek przewlekłego stresu i farmakologicznie.

Wywołany bodźcem stresowym, wysoki poziom glukokortykoidów we krwi, utrzymujący się przez dłuższy czas prowadzi do rozwoju depresji. Czynnikiem stresowym może być zarówno (i) traumatyczne doświadczenie, jak i (ii) substancja chemiczna. W pierwszym przypadku mamy do czynienia z tzw. depresją wywołaną stresem. Mysi model chronicznego, nieprzewidywalnego stresu (*ang. chronic unpredictable stress*) jest jednym z najczęściej wykorzystywanych modeli zwierzęcych w badaniach nad depresją, w szczególności w celu weryfikacji działania potencjalnych leków o działaniu antydepresyjnym (Nollet i wsp., 2013; Nollet, 2021). W drugim przypadku, do rozwoju depresji dochodzi na skutek działania substancji chemicznej, najczęściej leku (*ang. substance-induced mood disorder*). Jednym z przykładów są przyjmowane przez pacjentów syntetyczne glukokortykoidy, w tym DEX.

Przewlekłe podawanie DEX myszom, w postaci zastrzyków dootrzewnowych wywoływało zachowania depresyjne. Zwierzęta wykazywały zwiększony poziom lęku, w porównaniu do myszy kontrolnych, mierzony testem L/D box, a wyrażony m.in. poprzez krótszy czas spędzany w jasnym przedziale oraz mniejszą ilość przejść pomiędzy przedziałami. Nie obserwowano także spontanicznych dla zwierząt zachowań eksploracyjnych. Z kolei szybsze porzucanie aktywnych prób ucieczki z pojemnika wypełnionego wodą (test FST) świadczyło o wymuszonej bezradności zwierząt. Wyniki te są zgodne z uprzednio opublikowanymi, gdzie już pojedyncza dawka DEX powodowała znaczące wydłużenie czasu bezruchu u myszy w teście FST (Wróbel i wsp., 2013) oraz zwiększony poziom stresu mierzony testem uniesionego labiryntu krzyżowego (*ang. elevated plus-maze*) (Vafaei i wsp., 2008). Przewlekłe podawanie DEX, przez 7 dni, powodowało natomiast skrócenie czasu, jaki szczury spędzały w otwartych ramionach uniesionego labiryntu krzyżowego (Park i wsp., 2011). Myszy, po 21 dniach podawania DEX spędzały istotnie mniej czasu w jasnym przedziale (L/D box) i wykazywały zmniejszoną aktywność ruchową w teście FST (Skupio i wsp., 2015).

Warto zauważyć, iż obserwowane zmiany w zachowaniu zwierząt traktowanych, w stosunku do zwierząt kontrolnych były skutkiem podawania DEX. Obie grupy podlegały habituacji poprzedzającej eksperyment, a także otrzymywały zastrzyki dootrzewnowe, z DEX (grupa traktowana) lub soli fizjologicznej (grupa kontrolna), w tej samej objętości, co wykluczało stres związany z samym podaniem substancji. Dodatkowo, aby zniwelować stres wynikający z izolacji (Ma i wsp., 2011) zwierzęta trzymano po 4 lub 5 osobników w jednej klatce przez cały czas trwania eksperymentu, z wyjątkiem testu preferencji sacharyny. Zaznaczyć należy, iż nie obserwowano u zwierząt zachowań agresywnych.

W trakcie eksperymentu zwierzęta, które otrzymywały przewlekle DEX wyraźnie traciły na wadze, średnio ok. 2g w stosunku do początkowej masy ciała i ok. 3g w stosunku do masy ciała zwierząt kontrolnych w ostatnim dniu eksperymentu. Co jest zgodne z wynikami uzyskanymi dla mysiego modelu chronicznego unieruchomienia (*ang. chronic restraint stress*), gdzie wykazano, iż w wyniku stresu dochodzi do zmian aktywności genów zależnych od GR (Jeong i wsp., 2013). Ponadto w obu grupach nastąpił wyraźny spadek wagi w 15 dniu, co korelowało z czasem pierwszego testu behawioralnego – testu preferencji sacharyny, podczas którego myszy przebywały pojedynczo w klatkach przez okres 24 godzin. Jak wspomniano wyżej izolacja jest również czynnikiem stresowym (Ma i wsp., 2011), wystarczająco silnym aby wywołać wyraźne zmiany wagi. Sugeruje to jednocześnie, iż waga zwierząt jest dobrym wskaźnikiem odzwierciedlającym ich poziom strachu/ stresu.

Za względu na utratę wagi zwierząt, do testu preferencji, użyto sacharyny, a nie powszechnie wykorzystywanej sacharozy. Sacharyna, w przeciwieństwie do sacharozy nie posiada wartości kalorycznej, jest natomiast bardziej słodka, nawet o 300-500 razy. Stąd też spożycie słodkiego roztworu sacharyny nie pozwala na uzupełnienie kalorii, a jedynie wynika z jego lepszego smaku i odczuwanej z tego tytułu przyjemności (Buchmanov i wsp., 2001). Zwierzęta, którym podawano DEX wypijały średnio 20% mniej słodkiego roztworu, w porównaniu do zwierząt kontrolnych, co w odparciu o powyższe wyjaśnienia można traktować jako przejaw anhedoni. Ponadto przewlekle podawanie DEX prowadziło do zahamowania wydzielania endogennych glukokortykoidów, co najprawdopodobniej było efektem zahamowania aktywności osi HPA na skutek wywołanej DEX aktywacji GR w hipokampie (Zhu i wsp., 2014).

Następnie sprawdzono, czy przewlekłe podawanie DEX powoduje zmiany w ekspresji genu kodującego GR w korze przedczołowej, jądrze półleżącym i hipokampie. W obrębie tych struktur obserwowano wcześniej zmiany morfologiczne (McEvan i Milner, 2007), m.in. skrócenie dendrytów (Bloss i wsp., 2010) oraz zmniejszenie ilości synaps (Radley i wsp., 2008) będące efektem przewlekłego stresu. Istotnie statystycznie zmniejszenie ekspresji genu *Nr3c1* ($p < 0,05$) obserwowano jedynie w przypadku kory przedczołowej. Podobnie, wykazano, iż zaburzenia działania GR, zwłaszcza w przodomózgowiu mają wpływ na występowanie zachowań depresyjnych, m.in. myszy, u których wyciszono ekspresję GR w neuronach i astrocytach mózgu nie rozwijały zachowań depresyjnych (Tronche i wsp., 1999), natomiast te, u których wyindukowano nadekspresję wykazywały nasilone zachowania depresyjne w porównaniu do zwierząt kontrolnych (Wei i wsp., 2004). Ponadto uzyskane wyniki są częściowo zgodne z opublikowanymi w pracy Skupio i wsp., gdzie również pokazano, iż przewlekłe podawanie DEX prowadzi do zmniejszenia ekspresji *Nr3c1* m.in. w korze przedczołowej (Skupio i wsp., 2015). W pracy Herman i Spencer pokazano zaś, iż duża dawka kortykosteronu nie powodowała zmian w ekspresji genu *Nr3c1*, jak również białka GR (Herman i Spencer, 1998). W przypadku dwóch pozostałych struktur mózgu, jądra półleżącego i hipokampa, nie obserwowano zmian w ekspresji genu kodującego GR. Co jest zgodne z wynikami Romeo i wsp., (2008), gdzie także nie obserwowano zmian w ekspresji genu kodującego GR w hipokampie, w wyniku aplikowania szczurom chronicznego stresu unieruchomienia. Natomiast, we wspomnianej już pracy Skupio i wsp., (2015) wykazano iż chroniczne podawanie DEX wywołuje zmiany ekspresji genu *Nr3c1* także w hipokampie i jądrze półleżącym.

Wyniki analiz morfometrycznych uzyskane dla farmakologicznego modelu depresji były podobne do tych uzyskanych u myszy poddanych przewlekłemu, nieprzewidywalnemu stresowi, ale różne od wyników uzyskanych w modelu silnego stresu. W przypadku obu modeli depresji, we wszystkich analizowanych strukturach i obu typach komórek (neuronach i astrocytach) allele nie zmieniały swojej lokalizacji wewnątrz jądra komórkowego pod wpływem stresu i w przeważającej większości znajdowały się w obszarach nieskondensowanej chromatyny. Zaznaczyć tu jednak należy, iż ze względu na rozmieszczenie chromatyny w jądrze (Cremer i wsp., 2004) nie jest możliwe określenie, czy były to obszary chromatyny aktywnej, czy też nieaktywnej transkrypcyjnie. Ponadto, ze względu, iż prezentowane wyniki ekspresji korespondowały

z lokalizacją alleli w komórkach analizowanych struktur, różnice uzyskane w niniejszej pracy i pracy Skupio i wsp. (2015), mogą być związane z odmienną procedurą izolacji tkanki do badań – pobraniem różnych fragmentów, co wraz ze zróżnicowanym rozmieszczeniem GR, m.in. w poszczególnych częściach hipokampa, mogło przyczynić się do uzyskania innych wyników.

5.3. Analiza funkcjonalna genów, których ekspresja ulegała zmianie pod wpływem działania deksametazonu – badania z wykorzystaniem metody sekwencjonowania RNA

Aktywacja GR, powoduje iż przemieszcza się on do jądra komórkowego, gdzie działa jako czynnik transkrypcyjny. Co istotne może on zarówno aktywować, jak i hamować ekspresję wielu genów. **Aktywacja GR za pośrednictwem DEX wywoływała zmiany (FDR<0,05) ekspresji licznych genów zarówno w korowych pierwotnych hodowlach neuronalnych (2662 geny), jak i astrocytarnych (3938 genów).** W tym, jak omówiono w poprzednich rozdziałach, genu *Nr3c1*, kodującego GR, zarówno w komórkach kory przedczołowej, jak i hipokampa oraz jądra półleżącego.

Analiza poziomu ekspresji genów istotnie zmienionych (FDR<0,01, 1084 geny) w jednym lub obu typach komórek, przed i po zadziałaniu DEX umożliwiła podzielenie ich na 8 grup (klastrów). Większość z poddanych analizie genów, bo aż w przypadku 7 z 8 klastrów, wykazywała znaczne zmiany ekspresji w astrocytach i niewielkie w neuronach. Jednym z takich genów był wspomniany już, gen *Nr3c1*. Charakteryzował się on znacznie niższym poziomem ekspresji w neuronach kontrolnych, w porównaniu do kontrolnych astrocytów, natomiast po zadziałaniu DEX jego poziom obniżał się nieznacznie w neuronach i wyraźnie w astrocytach. Zauważyć należy, iż wyniki te odpowiadają uzyskanym uprzednio. Podobnie, w pracy Slezak i wsp. (2013) wykazano, iż inkubacja komórek z DEX skutkuje zmianą ilości transkryptów dla 32 genów w astrocytach, podczas gdy w neuronach nie wywołuje żadnych zmian.

Ponadto, analiza porównawcza potwierdziła, iż geny, których poziom ekspresji zwiększał się lub zmniejszał (FDR<0,05) w astrocytach były tożsame z genami regulowanymi przez GR w tym samym typie komórek w modelu *in vitro*, w wyniku 4-godzinnej inkubacji z DEX (Carter i wsp., 2012). Te z kolei, w większości odpowiadały genom, ze zmienionym poziomem ekspresji w mysim modelu *in vivo*, tak po

jednorazowym, jak i przewlekłym podawaniu glukokortykoidów (Carter i wsp., 2013). Można zatem przyjąć, iż analizowany w niniejszej pracy, zbiór genów był reprezentatywny zarówno dla komórkowego modelu silnego stresu, jak również mysiego modelu silnego stresu/ depresji.

W kolejnym kroku przeprowadzono analizę funkcjonalną genów z istotnie zmienionym poziomem ekspresji (FDR<0,05). Wykazała ona aktywację, bądź hamowanie licznych, różnych ścieżek w neuronach i astrocytach wskutek inkubacji z DEX, przy czym w astrocytach liczba regulowanych, zwłaszcza ujemnie, ścieżek była znacznie większa w porównaniu do tych, regulowanych w neuronach.

Najliczniejsze grupy genów regulowanych dodatnio przez GR w astrocytach, związane były z regulacją cytoszkieletu aktynowego (25 genów: *Arpc5, Vav2, Ppp1cb, Egfr, Rock2, Gna13, Iqgap2, Vcl, Enah, Itgb8, Itgb1, Gsn, Pip5k1a, Actb, Bcar1, Rdx, Vav3, Gng12, Fgf2, Pik3r1, F2r, Ezr, Fgfr3, Actn4, Cfl1*), endocytozą (24 geny: *Epn2, Grk5, Chmp2b, Kif5b, Arpc5, Rab4a, Vps26a, Egfr, Rab10, Tfrc, Ehd3, Kif5c, Pip5k1a, Snx1, Cbl, Pard6b, Cltc, Cltb, Arf1, Acap2, Asap2, Fgfr3, Hspa1b, Hspa1a*) oraz oddziaływaniami komórki z macierzą zewnątrzkomórkową (20 genów: *Vav2, Ppp1cb, Egfr, Rock2, Vcl, Itgb8, Itgb1, Lamc1, Lamc2, Capn2, Pip5k1a, Actb, Zyx, Ilk, Col4a1, Col4a2, Bcar1, Vav3, Pik3r1, Actn4*). Ponadto, duża grupa genów odpowiedzialnych za tworzenie sieci neuronalnych poprzez połączenia aksonalne (*ang. axon guidance*), regulowana była w astrocytach zarówno poprzez zwiększenie, jak i zmniejszenie ich ekspresji. Zmiany w ekspresji powyższych genów mogą mieć bezpośredni związek z funkcjami astrocytów opisanymi w literaturze, co do których wykazano iż są zaburzane na skutek działania DEX. Wiadomo obecnie, iż oddziaływanie pomiędzy astrocytami, a neuronami przynajmniej w części odpowiadają za plastyczność strukturalną i funkcjonalną (Calabrese i wsp., 2009). Wykazano w hodowlach komórkowych, iż astrocyty indukują gromadzenie się neuronów i tworzenie klastrów komórkowych, które zanikają po inkubacji z DEX (500nM). Ponadto, DEX wpływa negatywnie na ruchliwość astrocytów i ich naturalną zdolność do usuwania szczątków komórek pozostałych w hodowli po procesie apoptozy lub nekrozy (Henkel i wsp., 2014).

Kolejną dużą grupę genów regulowanych dodatnio w astrocytach stanowią te związane ze starzeniem komórkowym (17 genów: *Hipk1, Mcu, Ppp1cb, Fbxw11, Igfpz3, Gadd45g, Cdkn1a, Capn2, Hipk3, Rheb, Ppp3r1, Lin54, Serpine1, Tgfb2, Pik3r1, Foxo3*,

Lin52). Proces ten jest ściśle związany z patogenezą depresji. Ponadto badania pokazują integracyjną rolę astrocytów w rozwoju chorób neurodegeneracyjnych związanych z zaburzeniami funkcji poznawczych wraz z wiekiem (Cohen i Torres, 2019). Depresji często towarzyszą zaburzenia funkcji poznawczych w postaci tzw. pseudodemencji (Lin i wsp. 2021). Za jedną z przyczyn uważa się przedwczesne starzenie astrocytów na skutek działania stresu, charakteryzujące się zmianami w morfologii, zmniejszeniem proliferacji oraz zwiększeniem ekspresji markerów starzenia (Britto i wsp., 2010).

Geny, których ekspresja była hamowana wskutek działania DEX w astrocytach korowych związane były z szeroko pojętą odpowiedzią odpornościową: infekcją brodawczakiem ludzkim (68 genów), toczeniem rumieniowatym układowym (52 gany) oraz nowotworami różnego typu. Wykazano, iż osoby cierpiące na choroby układu odpornościowego wykazują znacznie większe prawdopodobieństwo rozwoju zaburzeń depresyjnych. Z drugiej strony, stres jest silnie związany z odpowiedzią odpornościową. Wykazano, iż ma on istotny wpływ na skuteczność szczepień, obniża szybkość gojenia ran, a także zmniejsza odpowiedź odpornościową przeciwko infekcjom wirusowym (Godbout i Glaser, 2006). Ponadto, w patogenezie depresji obserwuje się cechy charakterystyczne dla reakcji zapalnej, jak wzrost poziomu czynników prozapalnych, np. interleukiny 1beta, interleukiny 6 (Schiepers i wsp., 2005) oraz innych czynników wydzielanych przez astrocyty (TNF α , S100B). Może to prowadzić do nadaktywności osi HPA (podobnie jak w depresji) i zaburzenia wydzielania glukokortykoidów. Ponadto, astrocyty ze względu na bezpośrednie interakcje funkcjonalne z neuronami i komórkami śródbłonna są celem infekcji wirusowych (Palus i wsp., 2014).

Ostatnia duża grupa genów, tym razem o zmniejszonym poziomie ekspresji w neuronach, związana była z chorobami neurodegeneracyjnymi: chorobą Huntingtona, Parkinsona oraz Alzheimerera. Choroby te wiążą się z obniżeniem funkcji poznawczych i/ lub motorycznych. Przyczyną jest degeneracja neuronów, zaburzenia ich aktywności funkcjonalnej, a także zaburzenia połączeń sieci neuronalnej. Zmiany (dodatnie i ujemne) w ekspresji genów związanych z formowaniem połączeń pomiędzy neuronami obserwowano również w astrocytach. W literaturze znajdziemy potwierdzenie związku stresu z rozwojem chorób neurodegeneracyjnych. Z jednej strony stres przyczynia się do rozwoju choroby, z drugiej zaburzenia neuronalne wpływają negatywnie na odpowiedź organizmu na stres, co z kolei może nasilać już występujące objawy (Martocchia i wsp., 2016).

Podsumowując, DEX indukował zmiany ekspresji licznych genów zależnych od GR w neuronach i astrocytach kory przedczołowej. Znacznie większa liczba genów w astrocytach wykazywała zmiany ekspresji (7 klastrów), w porównaniu do genów zmienionych w neuronach (1 klaster). Ponadto geny te związane były z różnymi grupami funkcjonalnymi związanymi m.in. z regulacją cytoszkieletu aktynowego, endocytozą, starzeniem komórkowym i odpowiedzią odpornościową (w astrocytach) oraz chorobami neurodegeneracyjnymi (w neuronach). W literaturze znajdziemy wyniki wskazujące na powiązanie tych szlaków z zaburzeniami lękowymi, czy depresją. Niemniej jednak wiele z analizowanych genów pojawiło się w niniejszej pracy po raz pierwszy w tym kontekście, co stwarza możliwość dalszych badań nad funkcją neuronów i astrocytów w odpowiedzi stresowej.

Na uwagę zasługuje również fakt, iż zaprezentowane w niniejszej pracy wyniki wskazują na wiodącą rolę astrocytów w odpowiedzi stresowej indukowanej jednorazowym podaniem DEX. Krótko podsumowując, wykazano iż astrocyty kontrolne (model komórkowy) wykazują znacznie wyższy poziom ekspresji genu *Nr3c1*, oraz większe zmiany w ekspresji tego genu pod wpływem DEX, w porównaniu do neuronów. W modelu zwierzęcym zaś, jednorazowa dawka DEX powoduje nie tylko zmiany ekspresji *Nr3c1* we wszystkich badanych strukturach mózgu, ale także korespondujące z nimi przemieszczenia alleli wewnątrz jądra komórkowego, związane z aktywacją lub inaktywacją genu. Wreszcie, większość genów zależnych od GR ulegała zmianom pod wpływem DEX właśnie w astrocytach. Wyniki te sugerują swego rodzaju rolę opiekuńczą astrocytów względem neuronów. Zgodnie z teorią plastyczności, przyczyną depresji są modyfikacje neuronów i związanych z tym zaburzeń w przekaźnictwie synaptycznym. Astrocyty oddziałują z neuronami poprzez synapsy (1 astrocyt tworzy połączenia z 2 milionami synaps w ludzkim mózgu i 0,1 miliona - w mózgu mysim) (Oberheim i wsp., 2006). Ponadto astrocyty wydzielają neurotrofiny niezbędne dla prawidłowej plastyczności synaptycznej. Znana jest także neuroprotekcjna rola astrocytów w przypadku obrażeń rdzenia kręgowego, udaru mózgu, czy zapalenia układu nerwowego. Astrocyty zwiększają wówczas wydzielanie BDNF, który po związaniu do swojego receptora Trkp2 na neuronach indukuje wzrost aksonów i przetrwanie komórek (Linnerbauer i Rothhammer, 2020). Niemniej jednak potwierdzenie teorii o protekcyjnej roli astrocytów w zaburzeniach związanych ze stresem wymaga dalszych badań.

W kolejnym etapie projektu porównano zbiór genów zmienionych istotnie ($FDR < 0,05$) w mysich, korowych neuronach i astrocytach z listą 269 genów, które zidentyfikowano jako związane z depresją u ludzi, na podstawie analizy typu GWAS (ang. *Genome-Wide Association Studies*) na materiale biologicznym pochodzącym od ponad 246 tysięcy osób (Howard i wsp., 2019). W wyniku analizy **zidentyfikowano 67 genów wspólnych dla mysiego modelu stresu i depresji u człowieka**. Wśród nich 43 geny ulegały zmianom w astrocytach, a 24 w neuronach. Zawężenie liczby genów ze względu na istotność statystyczną $FDR < 0,01$, pozwoliło na zidentyfikowanie pięciu genów występujących we wszystkich analizowanych zbiorach. Poniżej przedstawiono ich krótką charakterystykę wraz z sugerowaną funkcją w zaburzeniach lękowych i/ lub depresji.

HSPA1A (ang. *Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 1A*, Hsp72) to gen kodujący białko szoku cieplnego. Jako białko opiekuńcze odpowiada za poprawne fałdowanie nowo zsyntetyzowanych białek, ich stabilizację i degradację, przez co chroni komórkę przed apoptozą. Z tego też względu wysoka ekspresja genu często łączona jest z silnym stresem (Trystuła i wsp., 2017). Dodatkowo białko HSPA1A bierze udział w redukcji stanu zapalnego, a zaburzenia jego ekspresji występują w wielu chorobach neurologicznych i psychicznych, m.in. chorobie Alzheimerera, Parkinsona, schizofrenii, czy depresji (Zhang i wsp., 2015). Co ciekawe, wysoki poziom białka HSPA1A obserwowany u pacjentów z depresją, ulegał znaczącemu obniżeniu pod wpływem leków antydepresyjnych (Pae i wsp., 2007), co sugeruje potencjalną rolę tego białka w ewentualnej terapii antydepresyjnej.

SOX6 (ang. *SRY-Box Transcription Factor 6*) to gen kodujący czynnik transkrypcyjny, istotny m.in. dla prawidłowego rozwoju ośrodkowego układu nerwowego. Niestety nie ma informacji dotyczących bezpośredniego związku tego genu z zaburzeniami lękowymi/ depresją. Niemniej jednak niedawno pokazano, iż zwiększona ekspresja Sox6 w hipokampie związana jest z zaburzeniami procesu uczenia i pamięci (Lichtensteiger i wsp., 2021) – zjawiska często obserwowanego także w kontekście zaburzeń lękowych, wywołanym m.in. poprzez przewlekłe podawanie glukokortykoidów (Darcet i wsp., 2014).

ZHX3 (ang. *zinc fingers and homeoboxes protein 3*) białko to może działać jako wszechstronny represor transkrypcji. Poziom mRNA tego genu jest pozytywnie

skorelowany z ekspresją receptora estrogenowego należącego podobnie jak GR do rodziny receptorów jądrowych o aktywności czynników transkrypcyjnych. Zaburzenia ekspresji genu *Zhx3* wykazano w nowotworach (You i wsp., 2019), chorobach hematologicznych, neurologicznych (Liu i wsp. 2015) i psychicznych, w tym depresji (Zhang i wsp., 2021). W szczególności w fazie tzw. przejścia pomiędzy etapem stresu, a depresji w modelu przewlekłego odrzucenia społecznego (*ang. chronic social defeat stress*), gdzie, co ciekawe, obserwowane zmiany ekspresji genów miały miejsce głównie w astrocytach (Konstantin i wsp., 2021).

SEMA6D (*ang. Semaphorin 6D*) to białko z rodziny semaforyn, mogących w sposób negatywny regulować powstawanie rozgałęzień dendrytycznych oraz sieci neuronalnych poprzez połączenia aksonalne. Analizy typu GWAS wykazały iż, w obrębie genu *Sema6d* występują polimorfizmy charakterystyczne dla depresji (Powell i wsp., 2021).

TRAF3 (*ang. TNF receptor associated factor 3*) to czynnik transkrypcyjny, o istotnej roli w aktywacji układu odpornościowego, w tym reakcji organizmu na infekcje wirusowe m.in. poprzez regulację syntezy interferonu typu I (Xie i wsp., 2019). Wykazano iż osoby leczone interferonem są w grupie zwiększonego ryzyka wystąpienia objawów depresyjnych (Chiu i wsp., 2017).

Podsumowując, powyższe wyniki opisują po raz pierwszy geny wspólne dla mysich modeli stresu/depresji i człowieka. Wśród pięciu scharakteryzowanych, jedynie dwa geny opisano do tej pory jako bezpośrednio związane z depresją. Specyficzna funkcja pozostałych genów w patogenezie zaburzeń lękowych i depresji jest wciąż nieznana. Co stwarza wiele możliwości do dalszych badań.

5.4. Analiza zmian organizacji chromatyny w efekcie podania deksametazonu – badania metodą ChIA-PET

Genom, tak ludzki, jak i mysi składa się z ponad 6 miliardów par zasad. Biorąc pod uwagę przeciętną długość jednej pary zasad, w interfazowym jądrze komórkowym, o średnicy ok. 10µm, znajduje się nić DNA o długości ponad dwóch metrów. Umieszczenie tak dużej ilości DNA w mikrometrowej przestrzeni jądra komórkowego wymaga jego rozległego upakowania (Bickmore, 2013), które charakteryzuje się specyficznością, ale także, ma znaczenie funkcjonalne (Ong i Corces, 20114).

Trójwymiarowa organizacja chromatyny w jądrze komórkowym traktowana jest jako nadrzędny czynnik epigenetyczny wpływający na funkcje genomu, poprzez efektywne przechowywanie ogromnej ilości informacji oraz regulację jej dostępności. Uważa się, iż dynamiczne zmiany w organizacji chromatyny w jądrze komórkowym wpływają na różnice w ekspresji genów.

GR, jako czynnik transkrypcyjny wpływa pośrednio, lub bezpośrednio na ekspresję wielu genów. Jak pokazano, aktywacja GR w wyniku zadziałania DEX, wywoływała zmiany ekspresji licznych genów, zarówno w astrocytach, jak i neuronach kory przedczołowej. Pojawiło się zatem pytanie, czy zmiany te są skoordynowane ze zmianami w trójwymiarowej organizacji chromatyny, w jądrach tych komórek. Porównanie map kontaktów uzyskanych dla neuronów i astrocytów przed i po zadziałaniu czynnika stresowego wykazało zmiany w częstości oddziaływań pomiędzy określonymi fragmentami genomu, tak w przypadku oddziaływań mediowanych przez białko CTCF, jak i RNA Pol II. Zmiany dotyczyły głównie większej częstości lokalnych kontaktów w komórkach kontrolnych, w porównaniu z komórkami traktowanymi. Dane te są zgodne z opublikowanymi uprzednio. W pracy D'ippolito i wsp. (2018) pokazano, iż w komórkach nabłonkowych raka płuca (A549) inkubowanych przez 1 godzinę z DEX (500 μ M) dochodziło do zmniejszenia częstości w przypadku 4.21% wszystkich obserwowanych oddziaływań międzychromatynowych. W pracy Kuznetsova i wsp. (2015) pokazano, iż aktywowany GR, w przeważającej większości rekrutowany jest do miejsc w genomie, związanych już wcześniej z innymi elementami regulatorowymi (np. AP1) i białkiem EP300, a jedynie mniej niż 10% wszystkich miejsc wiązania GR tworzonych jest *de novo*. Białko EP300 jest kofaktorem GR, a jego obecność w danym miejscu w genomie sugeruje, iż dana sekwencja pełni rolę aktywnego wzmacniacza transkrypcji (Visel i wsp., 2009). Wiązanie GR do istniejących już miejsc regulacji transkrypcji łączone jest z tzw. modelem permissywnym. Według niego, wiązanie czynnika transkrypcyjnego do istniejących miejsc regulacji transkrypcji nie wpływa na długodystansowe oddziaływania międzychromatynowe (de Laat i Duboule, 2013), zatem w takim przypadku **nie obserwuje się drastycznych zmian w organizacji genomu, zwłaszcza jeśli chodzi o zanikanie lub powstawanie nowych pętli chromatynowych pomiędzy fragmentami chromatyny wchodzącymi w skład różnych domen topologicznych.**

Niemniej jednak, przedstawione w niniejszej pracy wyniki, wskazują na lokalne zmiany organizacji chromatyny, m.in. w obszarze (18:38998208-40178240) otaczającym gen *Nr3c1*, kodujący GR, wywołane działaniem DEX. Zmiany te dotyczyły pojawiania się lub zanikania poszczególnych pętli chromatynowych. Podobnie, w komórkach raka szyjki macicy (HeLa B2) wykazano, iż aktywowany GR zwiększa liczbę lokalnych interakcji międzychromatynowych mediowanych przez RNA Pol II (Kuznetsova i wsp., 2015). W organizacji chromatyny szczególną rolę odgrywa klasa białek architektonicznych, z której jednym z najlepiej scharakteryzowanych jest białko CTCF. Białko to pośredniczy w interakcjach, zarówno wewnątrz jak i międzychromosomowych. Co ważne, wykazano, iż oddziaływania regulowane przez białko CTCF, z lub bez związanego białka GR, ulegają znacznie mniejszym zmianom w porównaniu do oddziaływań zależnych jedynie od GR (bez białka CTCF). W tym drugim przypadku, w procesie tworzenia pętli główną rolę odgrywa białko kohezyna (McDowell i wsp., 2018, D'Ipollito i wsp., 2018). Dlatego też, najprawdopodobniej, obserwowane, zarówno w neuronach, jak i astrocytach, pętle nie wzbogacone w białko CTCF regulowane są przez kohezynę i związany GR, a granice domen topologicznych, wyznaczone przez maszyną obecność białka CTCF nie ulegają zaburzeniom na skutek działania DEX (D'Ipollito i wsp., 2018), co jest zgodne z wynikami dyskutowanymi powyżej.

Warto zauważyć, iż miejsce TSS genu *Nr3c1* wzbogacone jest w białka: CTCF i RNA Pol II, co jest charakterystyczne dla regionu promotorowego. Ponadto obecność w tym regionie motywu białka CTCF, świadczy iż gen *Nr3c1* należy do grupy genów zakotwiczonych (z *ang. anchor-genes*), które wykazują mniejszą specyficzność komórkową w porównaniu do genów, których miejsca startu transkrypcji zlokalizowane są w obrębie pętli CTCF (z *ang. loop-genes*) (Tang i wsp., 2015).

Różnice w liczbie pętli w bezpośrednim sąsiedztwie genu *Nr3c1*, obserwowane w neuronach i astrocytach mogą mieć związek z kolokalizacją alleli z chromatyną aktywną lub nieaktywną transkrypcyjnie. Tak, np. zwiększenie liczby pętli tworzonych z udziałem CTCF w neuronach na skutek działania DEX, w stosunku do komórek kontrolnych może mieć związek z większym upakowaniem DNA w otoczeniu genu *Nr3c1*. Podobnie zmniejszenie liczby pętli, w których tworzeniu pośredniczy RNA Pol II może wynikać ze zmniejszonej aktywności. Za słusznością powyższych przypuszczeń przemawiają wyniki zamieszczone w pracy D'Ipollito i wsp. (2018). Wskazują one, iż w wyniku zależnej od DEX aktywacji genów dochodzi do wzbogacenia ich

bezpośredniego otoczenia w modyfikacje histonów związane z chromatyną aktywną transkrypcyjnie (H3K27Ac), oraz zwiększoną obecność białek związanych z transkrypcją (EP300, JUN). Podobnie, w przypadku genów, których ekspresja jest hamowana w wyniku działania DEX, ma miejsce sytuacja odwrotna (D'ippolito i wsp., 2018). Niemniej jednak, określenie dokładniejszych zmian w organizacji chromatyny w jądrach neuronów i astrocytów oraz ewentualnych różnic pomiędzy tymi dwoma typami komórek wymaga przeprowadzenia dalszych analiz. Szczególnie ciekawe wydaje się przeanalizowanie lokalnych zmian interakcji w obrębie genów zidentyfikowane jako związane ze stresem/depresją u myszy i ludzi oraz interakcji pomiędzy tymi genami a genem *Nr3c1*.

6. Podsumowanie i wnioski końcowe

Zaprezentowane w niniejszej rozprawie badania przeprowadzone z wykorzystaniem modeli: *in vitro* (pierwotnych, korowych hodowli neuronalnych i astrocytarnych, traktowanych DEX) i *in vivo* (mysie modele: silnego stresu, depresji indukowanej farmakologicznie i depresji indukowanej przewlekłym stresem) wykazały, iż:

- aktywacja GR, w wyniku jednorazowego podania agonisty GR – DEX, powoduje zmiany ekspresji oraz zmiany organizacji chromatyny w obrębie genu *Nr3c1*,
- odpowiedź w strukturach mózgu na działanie DEX jest zróżnicowana: obniżenie poziomu ekspresji i przemieszczenie alleli genu *Nr3c1* do obszarów skondensowanej chromatyny zachodzi w przypadku kory przedczołowej i jądra półleżącego, a wzrost ekspresji i przemieszczenie alleli *Nr3c1* do obszarów nieskondensowanych w przypadku hipokampa,
- w astrocytach kory przedczołowej, DEX powoduje przemieszczenie alleli genu *Nr3c1* skorelowane z jego wyciszeniem. Brak zmian w neuronach wynika ze związania alleli genu *Nr3c1* z chromatyną nieaktywną transkrypcyjnie przed i po zadziałaniu DEX,
- DEX indukuje aktywację odmiennych ścieżek sygnałowych w neuronach i astrocytach kory przedczołowej, poprzez zmiany w poziomie ekspresji genów zależnych od GR. Ponadto 67 genów zidentyfikowano jako wspólne dla mysiego modelu stresu / depresji i związanych z depresją u ludzi
- jednorazowy stres indukuje globalne zmiany częstości oddziaływań międzychromatynowych oraz lokalne zmiany organizacji chromatyny w sąsiedztwie genu *Nr3c1*,
- przewlekłe podawanie DEX indukuje zachowania depresyjne u myszy,
- zarówno przewlekłe podawanie DEX, jak i stosowanie przewlekłego, nieprzewidywalnego stresu nie wpływa na zmiany lokalizacji alleli genu *Nr3c1* w neuronach i astrocytach trzech analizowanych struktur mózgu.

Powyższe wyniki wskazują na istotną rolę GR w patogenezie zaburzeń lękowych i depresji, poprzez jego wpływ na zmiany morfologiczne, biochemiczne i strukturalne. Ponadto, częstość występowania zmian zależnych od GR w astrocytach sugeruje ich wiodącą rolę w odpowiedzi stresowej.

7. Piśmiennictwo

1. ALT S. R., TURNER J. D., KLOK M. D., MEIJER O. C., LAKKE E. A., DERIJK R. H., MULLER C. P., 2010. *Differential expression of glucocorticoid receptor transcripts in major depressive disorder is not epigenetically programmed.* Psychoneuroendocrinology 35, 544-556.
2. AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013. *APA Practice Guideline for the Treatment of Patients with Major Depressive Disorder. 3rd edition.* Arlington, Virginia. A
3. AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition.* Arlington, Virginia. B
4. ANACKER C., ZUNSZAIN P. A., CARVALHO L. A., PARIANTE C. M., 2011. *The glucocorticoid receptor: pivot of depression and of antidepressant treatment?* Psychoneuroendocrinology 36, 415-425.
5. ALEXANDER J.K., HILLIER A., SMITH R.M., TIVARUS M.E., BEVERSDORF D.Q. 2007. *Beta-adrenergic modulation of cognitive flexibility during stress.* J Cogn Neurosci. 19(3):468-78.
6. ARCHER T., OSCAR-BERMAN M., BLUM K., GOLD M., 2013. *Epigenetic modulation of mood disorders.* J. Genet. Syndr. Gene Therapy 4, 1000120.
7. ARNSTEN A.F., 2009. *Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function.* Nat Rev Neurosci. 10(6):410-422.
8. BACHMANOV A.A., TORDOFF M.G., BEAUCHAMP G.K., 2001. *Sweetener preference of C57BL/6ByJ and 129P3/J mice.* Chem Senses 26:905–913.
9. BALE T. L., BARAM T. Z., BROWN A. S., GOLDSTEIN J. M., INSEL T. R., MCCARTHY M. M., NEMEROFF C. B., REYES T. M., SIMERLY R. B., SUSSER E. S., NESTLER E. J., 2010. *Early life programming and neurodevelopmental disorders.* Biol. Psychiatry 68, 314-319.
10. BAMBERGER C.M., SCHULTE H.M., CHROUSOS G.P., 1996. *Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids,* Endocrine Reviews 17(3):245–261
11. BECHTHOLT-GOMPF A. J., WALTHER H. V., ADAMS M. A., CARLEZON W. A. JR., ONGUR D., COHEN B. M., 2010. *Blockade of astrocytic glutamate uptake in rats induces signs of anhedonia and impaired spatial memory.* Neuropsychopharmacology 35, 2049-2059.

12. BINDER E. B., 2009. *The role of FKBP5, a co-chaperone of the glucocorticoid receptor in the pathogenesis and therapy of affective and anxiety disorders.* Psychoneuroendocrinology 34, S186-S195.
13. BLOBEL G., 1985. *Gene gating: a hypothesis.* Proc Natl Acad Sci USA. 82(24):8527-9.
14. BLOSS E.B., JANSSEN W.G., MCEWEN B.S., MORRISON J.H., 2010. *Interactive effects of stress and aging on structural plasticity in the prefrontal cortex.* J Neurosci. 30(19):6726-31.
15. BOLGER, A. M., LOHSE, M., USADEL, B., 2014, Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*, btu170.
16. BORMAN M.C., SCHMALLEMBERG H.C., 1951. *Suicide following cortisone treatment.* J Am Med Assoc. 146(4):337-8.
17. BICKMORE W. A., 2013. *The spatial organization of the human genome.* Annu Rev Genomics Hum Genet. 14:67-84.
18. BITTO A., SELL C., CROWE E., LORENZINI A., MALAGUTI M., HRELIA S., TORRES C. 2010. *Stress-induced senescence in human and rodent astrocytes.* *Experimental Cell Research.* 316(17), 2961– 2968.
19. BROWN, E.S., JEON-SLAUGHTER, H., LU, H., JAMADAR, R., ISSAC, S., SHAD, M., DENNISTON, D., TAMMINGA, C., NAKAMURA, A., THOMAS, B.P., 2014b. *Hippocampal Volume in Healthy Controls Given 3-Day Stress Doses of Hydrocortisone.* *Neuropsychopharmacology.* 40(5):1216-21.
20. BUSHONG E.A., MARTONE M.E., JONES Y.Z., ELLISMAN M.H., 2002. *Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains.* J Neurosci. 22(1):183-92.
21. CALABRESE F., MOLTENI R., RACAGNI G., RIVA M. A., 2009. *Neuronal plasticity: a link between stress and mood disorders.* Psychoneuroendocrinology 34:S208–s216.
22. CARTER B.S., HAMILTON D.E., THOMPSON R.C., 2013. *Acute and chronic glucocorticoid treatments regulate astrocyte-enriched mRNAs in multiple brain regions in vivo.* Front Neurosci. 7:139.
23. CARTER B.S., MENG F., THOMPSON R.C., 2012. *Glucocorticoid treatment of astrocytes results in temporally dynamic transcriptome regulation and astrocyte-enriched mRNA changes in vitro.* *Physiological Genomics,* 44(24):1188-200
24. CERQUEIRA J.J., MAILLIET F., ALMEIDA O.F., JAY T.M., SOUSA N., 2007. *The prefrontal cortex as a key target of the maladaptive response to stress.* J Neurosci 27: 2781–2787.

25. CERQUEIRA J.J., TAIPA R., UYLINGS H.B., ALMEIDA O.F., SOUSA N., 2007. *Specific configuration of dendritic degeneration in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex induced by differing corticosteroid regimens.* Cereb Cortex. 17(9):1998-2006.
26. CHIU W.C., SU Y.P., SU K.P., CHEN P.C., 2017. *Recurrence of depressive disorders after interferon-induced depression.* Transl Psychiatry. 7(2):e1026.
27. CHUNG W. S., ALLEN N. J., EROGLU C., 2015. *Astrocytes Control Synapse Formation, Function, and Elimination.* Cold Spring Harb Perspect Biol 7, a020370.
28. CIPRIANI A., FURUKAWA T. A., SALANTI G., CHAIMANI A., ATKINSON L. Z., OGAWA Y., LEUCHT S., RUHE H. G., TURNER E. H., HIGGINS J. P. T., EGGER M., TAKESHIMA N., HAYASAKA Y., IMAI H., SHINOHARA K., TAJIKA A., IOANNIDIS J. P. A., GEDDES J. R., 2018. *Comparative efficacy and acceptability of 21 antidepressant drugs for the acute treatment of adults with major depressive disorder: a systematic review and network meta-analysis.* The LANCET 391, 1357-1366.
29. COHEN J., TORRES C., 2019. *Astrocyte senescence: Evidence and significance.* Aging Cell. 18(3):e12937.
30. CONRAD C. D., 2006. *What is the functional significance of chronic stress-induced CA3 dendritic retraction within the hippocampus?* Behav Cogn Neurosci Rev. 5(1):41-60.
31. CREMER T., CREMER M., HÜBNER B., STRICKFADEN H., SMEETS D., POPKEN J., STERR M., MARKAKI Y., RIPPE K., CREMER C., 2015. *The 4D nucleome: Evidence for a dynamic nuclear landscape based on co-aligned active and inactive nuclear compartments.* FEBS Lett. 589(20 Pt A):2931-43.
32. CREMER M., GRASSER F., LANCTÔT C., MÜLLER S., NEUSSER M., ZINNER R., SOLOVEI I., CREMER T., 2008. *Multicolor 3D fluorescence in situ hybridization for imaging interphase chromosomes.* Methods Mol Biol. 463:205-39.
33. CREMER M., ZINNER R., STEIN S., ALBIEZ H., WAGLER B., CREMER C., CREMER T., 2014. *Three dimensional analysis of histone methylation patterns in normal and tumor cell nuclei.* Eur J Histochem. 48(1):15-28.
34. CRUCEANU C., DONY L., Krontira A.C., FISCHER D.S., ROEH S., DI GIAIMO D., KYROUSI CH., KASPAR L., ARLOTH J., CZAMARA D., GERSTNER N., MARTINELLI S., WEHNER S., BREEN M.S., KOEDEL M., SAUER S., SPORTELLI V., REX-HAFFNER M., CAPPELLO S., THEIS F.J., BINDER E.B., 2021. *Cell-type-specific impact of glucocorticoid receptor activation on the developing brain: A Cerebral Organoid Study.* American Journal of Psychiatry. Am J Psychiatry appiajp202121010095.

35. CREPALDI L., POLICARPI C., COATTI A., SHERLOCK W. T., JONGBLOETS B. C., DOWN T. A., RICCIO A., 2013. *Binding of TFIIC to sine elements controls the relocation of activity-dependent neuronal genes to transcription factories*. PLoS Genet. 9, e1003699.
36. CUI W., MIZUKAMI H., YANAGISAWA M., AIDA T., NOMURA M., ISOMURA Y., TAKAYANAGI R., OZAWA K., TANAKA K., AIZAWA H., 2014. *Glial dysfunction in the mouse habenula causes depressive-like behaviors and sleep disturbance*. J. Neurosci. 34, 16273-16285.
37. DANECEK P., BONFIELD J.K., LIDDLE J., MARSHALL J., OHAN V., POLLARD M.O., WHITWHAM A., KEANE T., MCCARTHY S.A., DAVIES R.M., LI H., 2021, *Twelve years of SAMtools and BCFtools*, GigaScience 10(2)
38. DARCET F, MENDEZ-DAVID I, TRITSCHLER L, GARDIER AM, GUILLOUX JP, DAVID DJ., 2014. *Learning and memory impairments in a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression*. Front Behav Neurosci. 8:136.
39. DEKKER J., RIPPE K., DEKKER M., KLECKNER N., 2002. *Capturing chromosome conformation*. Science. 295(5558):1306-11.
40. DE KLOET E.R., REUL J.M.H.M., 1987. *Feedback action and tonic influence of corticosteroids on brain function: a concept arising from the heterogeneity of brain receptor systems*. Psychoneuroendocrinology. 12:83–105.
41. DE KLOET E.R., VREUGDENHIL E., OITZL M.S., JOËLS M., 1998. *Brain corticosteroid receptor balance in health and disease*. Endocr. Rev. 19, 269-301.
42. DE LAAT W., DUBOULE D., 2013. *Topology of mammalian developmental enhancers and their regulatory landscapes*. Nature 502:499–506.
43. DEMIN K.A., SMAGIN D.A., KOVALENKO I.L., STREKALOVA T., GALSTYAN D.S., KOLESNIKOVA T.O., DE ABREU M.S., GALYAMINA A.G., BASHIRZADE A., KALUEFF A.V., 2021. *CNS genomic profiling in the mouse chronic social stress model implicates a novel category of candidate genes integrating affective pathogenesis*, Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, Volume 105, 110086
44. D'IPPOLITO A. M., MCDOWELL I. C., BARRERA A., HONG L. K., LEICHTER S. M., BARTELT L. C., VOCKLEY CH. M, MAJOROS W. H., SAFI A., SONG L., GERSBACH CH. A., CRAWFORD G. E., REDDY T. E., 2018. *Pre-established Chromatin Interactions Mediate the Genomic Response to Glucocorticoids*, Cell Systems, 7(2):146-160.e7,
45. DIXON J.R., SELVARAJ S., YUE F., KIM A., LI Y., SHEN Y., HU M., LIU J.S., REN, B., 2012. *Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions*. Nature 485, 376–380.

46. DOBIN A., DAVIS C.A., SCHLESINGER F., DRENKOW J., ZALESKI C., JHA S., BATUT P., CHAISSON M., GINGERAS T.R., 2013. *STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner*. *Bioinformatics* 29(1):15-21.
47. DREVETS W.C., 2007. *Orbitofrontal cortex function and structure in depression*. *Ann NY Acad Sci* 1121: 499–527.
48. DREVETS W. C., FUREY M. L., 2009. *Depression and the Brain*. *Encyclopedia of Neuroscience*, Academic Press, 459-470.
49. DRISSEN R., R.J. PALSTRA, N. GILLEMANS, E. SPLINTER, F. GROSVELD, S. PHILIPSEN, W. DE LAAT, *The active spatial organization of the beta-globin locus requires the transcription factor EKLF*. *Genes Dev.* 18 (2004) 2485–2490.
50. EILAND L., MCEWEN B.S., 2012. *Early life stress followed by subsequent adult chronic stress potentiates anxiety and blunts hippocampal structural remodeling*. *Hippocampus* 22, 82–91.
51. FAKAN, S., 2004. *Ultrastructural cytochemical analyses of nuclear functional architecture*. *Eur. J. Histochem.* 48, 5e14.
52. FARRELL C., O'KEANE V., 2016. *Epigenetics and the glucocorticoid receptor: A review of the implications in depression*. *Psychiatry Research* 242: 349-356
53. FERGUSSON D. M., HORWOOD L. J., LYNSKEY M. T., 1996. *Childhood sexual abuse and psychiatric disorder in young adulthood. II. Psychiatric outcomes of childhood sexual abuse*. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 35, 1365-1374.
54. FRANCIS T.C., CHANDRA R., FRIEND D.M., FINKEL E., DAYRIT G., MIRANDA J., BROOKS J.M., IÑIGUEZ S.D., O'DONNELL P., KRAVITZ A., LOBO M.K., 2015. *Nucleus accumbens medium spiny neuron subtypes mediate depression-related outcomes to social defeat stress*. *Biol Psychiatry.* 77(3):212-222.
55. FRANCIS T.C., LOBO M.K., 2017. *Emerging Role for Nucleus Accumbens Medium Spiny Neuron Subtypes in Depression*. *Biol Psychiatry.* 81(8):645-653.
56. FRIEDRICH M. J., 2017. *Depression is the leading cause of disability around the world*. *JAMA* 317, 1517.
57. FUJIKI M., STEWARD O., 1997. *High frequency transcranial magnetic stimulation mimics the effects of ECS in upregulating astroglial gene expression in the murine CNS*. *Brain Res Mol Brain Res.* 44(2):301-8.
58. FULLER P. J., LIM-TIO S. S., BRENNAN F. E., 2000. *Specificity in mineralocorticoid versus glucocorticoid action*. *Kidney Int.* 57, 1256-1264.

59. FULLERTON C.S., URSANO R.J., WANG L., 2004. *Acute Stress Disorder, Posttraumatic Stress Disorder, and Depression in Disaster or Rescue Workers* Am. J. Psychiatry, 161:1370-1376,
60. FULLWOOD MJ, LIU MH, PAN YF, LIU J, XU H, MOHAMED YB, ORLOV YL, VELKOV S, HO A, MEI PH, CHEW EG, HUANG PY, WELBOREN WJ, HAN Y, OOI HS, ARIYARATNE PN, VEGA VB, LUO Y, TAN PY, CHOY PY, WANSA KD, ZHAO B, LIM KS, LEOW SC, YOW JS, JOSEPH R, LI H, DESAI KV, THOMSEN JS, LEE YK, KARUTURI RK, HERVE T, BOURQUE G, STUNNENBERG HG, RUAN X, CACHEUX-RATABOUL V, SUNG WK, LIU ET, WEI CL, CHEUNG E, RUAN Y., 2009. *An oestrogen-receptor-alpha-bound human chromatin interactome*. Nature. 462(7269):58-64.
61. GALBRAITH C.G., GALBRAITH J.A., 2011. *Super-resolution microscopy at a glance*. J Cell Sci. 124(Pt 10):1607-11.
62. GILBERT P., GILBERT J., 2003. *Entrapment and arrested fight and flight in depression: an exploration using focus groups*. Psychol Psychother. 76(Pt 2):173-88.
63. GLOVER, L.R., SCHOENFELD, T.J., KARLSSON, R.-M., BANNERMAN, D.M., CAMERON, H.A., 2017. *Ongoing neurogenesis in the adult dentate gyrus mediates behavioral responses to ambiguous threat cues*. PLoS Biol 15, e2001154.
64. GODBOUT, J. P., GLASER, R., 2006. *Stress-Induced Immune Dysregulation: Implications for Wound Healing, Infectious Disease and Cancer*. Jnl Neuroimmune Pharm 1, 421–427.
65. GOURLEY S.L., WU F.J., KIRALY D.D., PLOSKI J.E., KEDVES A.T., DUMAN R.S., TAYLOR J.R., *Regionally Specific Regulation of ERK MAP Kinase in a Model of Antidepressant-Sensitive Chronic Depression*, Biological Psychiatry, Volume 63, Issue 4, 2008, Pages 353-359
66. HAMMEN C., KIM E.Y., EBERHART N.K., BRENNAN P.A., 2009. *Chronic and acute stress and the prediction of major depression in women*, Depression and Anxiety. 26(8):718-723
67. HALASSA M.M., FLORIAN C., FELLIN T., MUNOZ J.R., LEE S.Y., ABEL T., HAYDON P.G., FRANK M.G., 2009. *Astrocytic modulation of sleep homeostasis and cognitive consequences of sleep loss*. Neuron. 61(2):213-9.
68. HARRISON P. J., 2002. *The neuropathology of primary mood disorder*. Brain 125, 1428-1449
69. HAYLEY S., LITTELJOHN D., 2013. *Neuroplasticity and the next wave of antidepressant strategies*. Front. Cell. Neurosci. 7, 218.

70. HEIM C., NEWPORT D. J., MLETZKO T., MILLER A. H., NEMEROFF C. B., 2008. *The link between childhood trauma and depression: insights from HPA axis studies in humans*. Psychoneuroendocrinology 33, 693-710.
71. HEIM C., SHUGART M., CRAIGHEAD W. E., NEMEROFF C. B., 2010. *Neurobiological and psychiatric consequences of child abuse and neglect*. Develop. Psychobiol. 52, 671-690.
72. HELL S. W., 2015. *Nanoscopy with focused light*. Annalen der Physik 527, 423-445.
73. HENKEL A. W., ALALI H., DEVASSY A., ALAWADI M. M., REDZIC Z. B., 2014. *Antagonistic interactions between dexamethasone and fluoxetine modulate morphodynamics and expression of cytokines in astrocytes*. Neuroscience. 280:318-27.
74. HERCULANO-HOUZEL S., 2014. *The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution*. Glia, 62, 1377–1391
75. HERMAN J. P., MCKLVEEN J. M., GHOSAL S., KOPP B., WULSIN A., MAKINSON R., SCHEIMANN J., MYERS B., 2016. *Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response*. Comp. Physiol. 6, 603-621.
76. HERMAN J.P., SPENCER R., 1998. *Regulation of hippocampal glucocorticoid receptor gene transcription and protein expression in vivo*. J Neurosci. 18(18):7462-73.
77. HORNUNG O. P., HEIM C. M., 2014. *Gene–environment interactions and intermediate phenotypes: early trauma and depression*. Front. Endocrinol. 5, 14.
78. HOWARD D. M., ADAMS M. J., CLARKE T. K., HAFFERTY J. D., GIBSON J., SHIRALI M., COLEMAN J. R. I., HAGENAARS S. P., WARD J., WIGMORE E. M., ALLOZA C., SHEN X., BARBU M. C., XU E. Y., WHALLEY H. C., MARIONI R. E., PORTEOUS D. J., DAVIES G., DEARY I. J., HEMANI G., BERGER K., TEISMANN H., RAWAL R., AROLT V., BAUNE B.T., DANNLOWSKI U., DOMSCHKE K., TIAN C., HINDS D.A., 23ANDME RESEARCH TEAM; MAJOR DEPRESSIVE DISORDER WORKING GROUP OF THE PSYCHIATRIC GENOMICS CONSORTIUM, TRZASKOWSKI M., BYRNE E.M., RIPKE S., SMITH D.J., SULLIVAN P.F., WRAY N.R., BREEN G., LEWIS C.M., MCINTOSH A.M., 2019. *Genome-wide meta-analysis of depression identifies 102 independent variants and highlights the importance of the prefrontal brain regions*. Nature Neuroscience 22(3):343-352.
79. INSTITUTE OF HEALTH METRICS AND EVALUATION. GLOBAL HEALTH DATA EXCHANGE (GHDX). <http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool?params=gbd-api-2019-permalink/d780dffbe8a381b25e1416884959e88b> (dostęp z dnia 18 lutego 2022).

80. JEONG J. Y., LEE D. H., KANG S. S., 2013. *Effects of chronic restraint stress on body weight, food intake, and hypothalamic gene expressions in mice*. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 28(4):288-296.
81. KANG H. J., VOLETI B., HAJSZAN T., RAJKOWSKA G., STOCKMEIER C. A., LICZNEKSKI P., LEPACK A., MAJK M. S., JEONG L. S., BANASR M., SON H., DUMAN R. S., 2012. *Decreased expression of synapse-related genes and loss of synapses in major depressive disorder*. *Nat. Med.* 18, 1413-1417.
82. KRISHNAN V., NESTLER E. J., 2008. *The molecular neurobiology of depression*. *Nature* 455, 894-902.
83. KRISHNAN V., NESTLER E. J., 2010. *Linking molecules to mood: new insight into the biology of depression*. *Am. J. Psychiatry* 167, 1305-1320.
84. KRZYSTYNIAK A., BACZYNSKA E., MAGNOWSKA M., ANTONIUK S., ROSZKOWSKA M., ZAREBA-KOZIOL M., DAS N., BASU S., PIKULA M., WLODARCZYK J., 2019. *Prophylactic Ketamine Treatment Promotes Resilience to Chronic Stress and Accelerates Recovery: Correlation with Changes in Synaptic Plasticity in the CA3 Subregion of the Hippocampus*. *International Journal of Molecular Science* 20(7):1726
85. KUZNETSOVA T, WANG SY, RAO NA, MANDOLI A, MARTENS JH, ROTHER N, AARTSE A, GROH L, JANSSEN-MEGENS EM, LI G, RUAN Y, LOGIE C, STUNNENBERG HG., 2015. *Glucocorticoid receptor and nuclear factor kappa-b affect three-dimensional chromatin organization*. *Genome Biol.* 16:264.
86. LEE Y., GASKINS D., ANAND A., SHEKHAR A., 2007. *Glia mechanisms in mood regulation: a novel model of mood disorders*. *Psychopharmacolog* 191, 55-65.
87. LEE B., WANG J., CAI L., KIM M., NAMBURI S., TJONG H., FENG Y., WANG P., TANG Z., ABBAS A., WEI. CH. L., RUAN Y., LI S., 2020. *ChIA-PIPE: a fully automated pipeline for comprehensive ChIA-PET data analysis and visualization*. *Sci. Adv.* 6eaay2078
88. LICHTENSTEIGER W., BASSETTI-GAILLE C., REHRAUER H., GEORGJEVIC J. K., TRESGUERRES J. A. F., SCHLUMPF M., 2021. *Converging Effects of Three Different Endocrine Disrupters on Sox and Pou Gene Expression in Developing Rat Hippocampus: Possible Role of microRNA in Sex Differences*. *Front Genet.* 12:718796.

89. LIEBERMAN-AIDEN E., VAN BERKUM N. L., WILLIAMS L., IMAKAEV M., RAGOCZY T., TELLING A., AMIT I, LAJOIE B. R., SABO P. J., DORSCHNER M. O., SANDSTROM R., BERNSTEIN B., BENDER M. A., GROUDINE M., GNIRKE A., STAMATOYANNOPOULOS J., MIRNY L. A., LANDER E. S., DEKKER J., 2009. *Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome.* Science.326(5950):289-93.
90. LIMA A., SARDINHA V. M., OLIVEIRA A. F., REIS M., MOTA C., SILVA M. A., MARQUES F., CERQUEIRA J. J., PINTO L., SOUSA N., OLIVEIRA J. F., 2014. *Astrocyte pathology in the prefrontal cortex impairs the cognitive function of rats.* Mol Psychiatry 19:834–841.
91. LIN Y. F., WANG L. Y., CHEN C. S., LI C. C., HSIAO Y. H., 2021. *Cellular senescence as a driver of cognitive decline triggered by chronic unpredictable stress.* Neurobiol Stress. 15:100341.
92. LINNERBAUER M., ROTHHAMMER V., 2020. *Protective Functions of Reactive Astrocytes Following Central Nervous System Insult.* Front Immunol. 30;11:573256.
93. LISTON C., MILLER M. M., GOLDWATER D. S., RADLEY J. J., ROCHER A. B., HOF P. R., MORRISON J. H., MCEWEN B. S., 2006. *Stress-induced alterations in prefrontal cortical dendritic morphology predict selective impairments in perceptual attentional set-shifting.* J Neurosci 26: 7870–7874.
94. LIU Y., MA D., JI C., 2015. *Zinc fingers and homeoboxes family in human diseases.* Cancer Gene Ther. 22(5):223-6.
95. LOLAK S., SUWANNARAT P., LIPSKY R. H., 2014. *Epigenetics of depression.* Progr. Mol. Biol. Transl. Sci. 128, 103-137.
96. LUETHI M., MEIER B., SANDI C., 2008. *Stress effects on working memory, explicit memory, and implicit memory for neutral and emotional stimuli in healthy men.* Front Behav Neurosci. 15;2:5.
97. MA X., JIANG D., JIANG W., WANG F., JIA M., WU J., HASHIMOTO K., DANG Y., GAO C., 2011. *Social isolation-induced aggression potentiates anxiety and depressive-like behavior in male mice subjected to unpredictable chronic mild stress.* PLoS ONE 6:e20955.
98. MALISCH J. L., BREUNER C. W., GOMES F. R., CHAPPELL M. A., GARLAND T., 2008. *Circadian pattern of total and free corticosterone concentrations, corticosteroid-binding globulin, and physical activity in mice selectively bred for high voluntary wheel-running behavior.* Gen. Comp. Endocrinol 156(2):210-217
99. MANIGLIO R., 2009. *The impact of child sexual abuse on health: a systematic review of reviews.* Clin. Psychol. Rev. 29, 647-657.

- 100.MANJI H. K., DREVETS W. C., CHARNEY D. S., 2001. *The cellular neurobiology of depression*. Nat. Med. 7, 541-547.
- 101.MANN J. J., CURRIER D., 2006. *Effects of genes and stress on the neurobiology of depression*. Int. Rev. Neurobiol. 73, 153-189.
- 102.MARTOCCHIA A., STEFANELLI M., FALASCHI G. M., TOUSSAN L., FERRI C., FALASCHI P., 2016. *Recent advances in the role of cortisol and metabolic syndrome in age-related degenerative diseases* Aging Clin. Exp. Res., 28:17-23.
- 103.MCDOWELL I. C., BARRERA A., D'IPPOLITO A. M., VOCKLEY C. M., HONG L. K., LEICHTER S. M., BARTELT L. C., MAJOROS W. H., SONG L., SAFI A., KOÇAK D. D., GERSBACH C. A., HARTEMINK A. J., CRAWFORD G. E., ENGELHARDT B. E., REDDY T. E., 2018. *Glucocorticoid receptor recruits to enhancers and drives activation by motif-directed binding*. Genome Res. 28(9):1272-1284.
- 104.MCEWEN B. S., MILNER T. A., 2007. *Hippocampal formation: shedding light on the influence of sex and stress on the brain*. Brain Res Rev. 55(2):343-55.
- 105.MCGOWAN P. O., SASAKI A., D'ALESSIO A. C., DYMOV S., LABONTÉ B., SZYF M., TURECKI G., MEANEY M. J., 2009. *Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse*. Nat Neurosci. 12(3):342-8.
- 106.MCGUFFIN P., COHEN S., KNIGHT J., 2007. *Homing in on depression genes*. Am. J. Psychiatry 164, 195-197.
- 107.MCKLVEEN J.M., MYERS B., FLAK J.N., BUNDZIKOVA J., SOLOMON M.B., SEROOGY K.B., HERMAN J.P., 2013. *Role of prefrontal cortex glucocorticoid receptors in stress and emotion*. Biol Psychiatry. 74(9):672-679.
- 108.MENKE A., KLENGEL T., BINDER E. B., 2012. *Epigenetics, depression and antidepressant treatment*. Curr. Pharm. Des. 18, 5879-5889.
- 109.MURGATROYD C., PATCHEV A. V., WU Y., MICALE V., BOCKMUHL Y., FISCHER D., HOLSBOER F., WOTJAK C. T., ALMEIDA O. F., SPENGLER D., 2009. *Dynamic DNA methylation programs persistent adverse effects of early-life stress*. Nat. Neurosci. 12, 1559-1566.
- 110.MCGOWAN P. O., SASAKI A., D'ALESSIO A. C., DYMOV S., LABONTÉ B., SZYF M., TURECKI G., MEANEY M. J., 2009. *Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse*. Nat. Neurosci. 12, 342-348.

111. NAGANO T., LUBLING Y., STEVENS T. J., SCHOENFELDER S., YAFFE E., DEAN W., LAUE E.D., TANAY A., FRASER P., 2013. *Single-cell Hi-C reveals cell-to-cell variability in chromosome structure*. Nature 502, 59–64.
112. NIMCHINSKY E. A., SABATINI B. L., SVOBODA K., 2002. *Structure and function of dendritic spines*. Ann. Rev. Physiol. 64, 313-353.
113. NOLLET M., 2021. *Models of Depression: Unpredictable Chronic Mild Stress in Mice*. Curr Protoc. 1(8):e208.
114. NOLLET M., LE GUIQUET A. M., BELZUNG C., 2013. *Models of depression: unpredictable chronic mild stress in mice*. Curr Protoc Pharmacol. Chapter 5:Unit 5.65.
115. OBERHEIM, N. A., WANG, X., GOLDMAN, S., & NEDERGAARD, M., 2006. *Astrocytic complexity distinguishes the human brain*. Trends in Neuroscience, 29, 547–553.
116. O'KEANE V., FRODL T., DINAN T. G., 2012. *A review of atypical depression in relation to the course of depression and changes in HPA axis organization*. Psychoneuroendocrinol 37, 1589-1599.
117. Okret S., Dong Y., Brönnegård M., Gustafsson J.A., 1991. *Regulation of glucocorticoid receptor expression*. Biochimie. 73(1):51-9.
118. ONG C. T., CORCES V. G., 2014. *CTCF: an architectural protein bridging genome topology and function*. Nat Rev Genet. 15(4):234-46.
119. ORAY M., ABU SAMRA K., EBRAHIMIADIB N., MEESE H., FOSTER C. S., 2016. *Long-term side effects of glucocorticoids*. Expert Opin. Drug Safety, 15, 457-465.
120. PAE C. U., MANDELLI L., SERRETTI A., PATKAR A. A., KIM J. J., LEE C. U., LEE S. J., LEE C., DE RONCHI D., PAIK I. H., 2007. *Heat-shock protein-70 genes and response to antidepressants in major depression*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 31(5):1006-11.
121. PALUS, M. BÍLÝ, T., ELSTEROVÁ, J., LANGHANSOVÁ, H., SALÁT, J., VANCOVÁ, M., RŮŽEK, D., 2014. *Infection and injury of human astrocytes by tick-borne encephalitis virus*. J. Gen. Virol. 95, 2411–2426.
122. PAN-VAZQUEZ A., RYE N., AMERI M., MCSPARRON B., SMALLWOOD G., BICKERDYKE J., RATHBONE A., DAJAS-BAILADOR F., TOLEDO-RODRIGUEZ M., 2015. *Impact of voluntary exercise and housing conditions on hippocampal glucocorticoid receptor, miR-124 and anxiety*. Mol Brain 8, 40.

- 123.PAPAGNI, S.A., BENETTI, S., ARULANANTHAM, S., MCCRORY, E., MCGUIRE, P., MEHELLI, A., 2011. *Effects of stressful life events on human brain structure: a longitudinal voxelbased morphometry study*. Stress (Amsterdam, Netherlands) 14, 227–232.
- 124.LI S., PAPALE L. A., KINTNER D. B., SABAT G., BARRETT-WILT G.A., CENGIZ P., ALISCH R. S., 2015. *Hippocampal increase of 5-hmC in the glucocorticoid receptor gene following acute stress*. Behav Brain Res. 286:236-240.
- 125.PAPILLOU A., WEGER M., BACQ A., ZALACHORAS I., HOLLIS F., LARRIEU T., BATTIVELLI D., GROSSE J., ZANOLETTI O., PARNAUDEAU S., TRONCHE F., SANDI C., 2020. *The glucocorticoid receptor in the nucleus accumbens plays a crucial role in social rank attainment in rodents*. Psychoneuroendocrinology, 112:104538
- 126.PARK D.I., KIM H.G., JUNG W.R., SHIN M.K., KIM K.L., 2011. *Mecamylamine attenuates dexamethasone-induced anxiety-like behavior in association with brain derived neurotrophic factor upregulation in rat brains*. Neuropharmacology 61:276–282.
- 127.PALSTRA R.J., TOLHUIS B., SPLINTER E., NIJMEIJER R., GROSVELD F., DE LAAT W., 2003. *The beta-globin nuclear compartment in development and erythroid differentiation*. Nat Genet. 2003 Oct;35(2):190-4.
- 128.PAXINOS G., FRANKLIN K. B. J., 2007. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates 3rd Edition*, Elsevier
- 129.PELS K., 2020, *O molekularnej patogenezie stresu i depresji*. KOSMOS, 69(326):169-183
- 130.PETERS A., PALAY S. L., WEBSTER H., 1991. *The fine structure of the nervous system. Neurons and their supporting cells*. Oxford University Press, Nowy Jork.
- 131.PETROPOULOS S., MATTHEWS S.G., SZYF M., 2014. *Adult glucocorticoid exposure leads to transcriptional and DNA methylation changes in nuclear steroid receptors in the hippocampus and kidney of mouse male offspring*. Biol Reprod. 90(2):43.
- 132.PIAO C., DENG X., WANG X., YUAN Y., LIU Z., LIANG J., 2017. *Altered function in medial prefrontal cortex and nucleus accumbens links to stress-induced behavioral inflexibility*. Behav Brain Res. 317:16-26.
- 133.PIECHOTA M., KOROSTYNSKI M., GOLDA S., FICEK J., JANTAS D., BARBARA Z., PRZEWLOCKI R., 2017. *Transcriptional signatures of steroid hormones in the striatal neurons and astrocytes*. BMC Neurosci. 18(1):37.

134. POWELL V., MARTIN J., THAPAR A., RICE F., ANNEY R.J.L., 2021. *Investigating regions of shared genetic variation in attention deficit/hyperactivity disorder and major depressive disorder: a GWAS meta-analysis*. *Sci Rep*. 11(1):7353.
135. RADLEY J.J., ROCHER A.B., RODRIGUEZ A., EHLENBERGER D.B., DAMMANN M., MCEWEN B.S., MORRISON J.H., WEARNE S.L., HOF P.R., 2008. *Repeated stress alters dendritic spine morphology in the rat medial prefrontal cortex*. *J Comp Neurol*. 507(1):1141-50.
136. RADLEY J.J., SISTI H.M., HAO J., ROCHER A.B., MCCALL T., HOF P.R., MCEWEN B.S., MORRISON J.H., 2004. *Chronic behavioral stress induces apical dendritic reorganization in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex*. *Neuroscience* 125(1):1-6
137. RAJARAJAN P., BORRMAN T., LIAO W., SCHRODE N., FLAHERTY E., CASIÑO C., POWELL S., YASHASWINI C., LAMARCA E. A., KASSIM B., JAVIDFAR B., ESPESO-GIL S., LI A., WON H., GESCHWIND D. H., HO S. M., MACDONALD M., HOFFMAN G. E., ROUSSOS P., ZHANG B., HAHN C. G., WENG Z., BRENNAND K. J., AKPZARIAN S., 2018. *Neuron-specific signatures in the chromosomal connectome associated with schizophrenia risk*. *Science* 236, eaat4311.
138. RAJARAJAN P., GIL S. E., BRENNAND K. J., AKPZARIAN S., 2016. *Spatial genome organization and cognition*. *Neuroscience* 17, 681-691.
139. RAJKOWSKA G., STOCKMEIER C.A., 2013. *Astrocyte pathology in major depressive disorder: insight from human postmortem brain tissue*. *Curr. Drug Targets* 14, 1225-1236.
140. RAMAMOORTHY S., CIDLOWSKI J. A., 2013. *Ligand-induced repression of the glucocorticoid receptor gene is mediated by an NCoR1 repression complex formed by long-range chromatin interactions with intragenic glucocorticoid response elements*. *Mol. Cell. Biol.* 33, 1711-1722.
141. R CORE TEAM, 2020. *R: A language and environment for statistical computing*. *R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria*.
142. REUL J.M.H.M., VAN DEN BOSCH F.R., DE KLOET E.R. *Relative occupation of type-I and type-II corticosteroid receptors in rat brain following stress and dexamethasone treatment: functional implications*. *J. Endocrinol.* 1987;115:459-467.
143. RODGERS A.B., MORGAN C.P., BRONSON S.L., REVELLO S., BALE T.L., 2013. *Paternal stress exposure alters sperm microRNA content and reprograms offspring HPA stress axis regulation*. *J Neurosci.* 33(21):9003-9012.

- 144.ROMEO R. D., ALI F. S., KARATSOREOS I. N., BELLANI R., CHHUA N., VERNOV M., MCEWEN B. S., 2008. *Glucocorticoid receptor mRNA expression in the hippocampal formation of male rats before and after pubertal development in response to acute or repeated stress*. Neuroendocrinology. 87(3):160-7.
- 145.ROTH T. L., LUBIN F. D., FUNK A. J., SWEATT J. D., 2009. *Lasting epigenetic influence of early-life adversity on the BDNF gene*. Biol. Psychiatry 65, 760-769.
- 146.RUSH A. J., TRIVEDI M. H., WISNIEWSKI S. R., NIERENBERG A. A., STEWART J. W., WARDEN D., NIEDEREHE G., THASE M. E., LAVORI P. W., LEBOWITZ B. D., MCGRATH P. J., ROSENBAUM J. F., SACKEIM H. A., KUPFER D. J., LUTHER J., FAVA M., 2006. *Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR*D report*. Am. J. Psychiatry 163, 1905-1917.
- 147.RUSZCZYCKI B., PELS K.K., WALCZAK A., ZAMŁYŃSKA K., SUCH M., SZCZEPANKIEWICZ A.A., HALL M.H., MAGALSKA A., MAGNOWSKA M., WOLNY A., BOKOTA G., BASU S., PAL A., PLEWCZYNSKI D., WILCZYŃSKI G.M., 2019. *Three-Dimensional Segmentation and Reconstruction of Neuronal Nuclei in Confocal Microscopic Images*. Frontiers in Neuroanatomy 20;13-81.
- 148.RUSZCZYCKI B., WILCZYNSKI G.M., 2011. *A method and a system for segmenting a 3D image comprising round objects*. EP 2 549 433 A1
- 149.ROBINSON J.T., TURNER D., DURAND N.C., THORVALDSDÓTTIR H., MESIROV J.P., LIEBERMAN AIDEN F., 2018. *Juicebox.js Provides a Cloud-Based Visualization System for Hi-C Data*. Cell Systems 6(2),2018
- 150.SALARI N, HOSSEINIAN-FAR A, JALALI R, VAISI-RAYGANI A, RASOULPOOR S, MOHAMMADI M, RASOULPOOR S, KHALEDI-PAVEH B., 2020. *Prevalence of stress, anxiety, depression among the general population during the COVID-19 pandemic: a systematic review and meta-analysis*. Global Health 16, 57.
- 151.SANACORA G., BANASR M., 2013. *From pathophysiology to novel antidepressant drugs: glial contributions to the pathology and treatment of mood disorders*. Biol. Psychiatry 73, 1172-1179.
- 152.SAPOLSKY R.M., 2000 *Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders*. Arch. Gen. Psychiatry 57, 925-935.
- 153.SCHIEPERS O. J., WICHERS M. C., MAES M., 2005. *Cytokines and major depression*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 29(2):201-17.

154. SEQUEIRA A., MORGAN L., WALSH D.M., CARTAGENA P.M., CHOUDARY P., LI J., SCHATZBERG A.F., WATSON S.J., AKIL H., MYERS R.M., JONES E.G., BUNNEY W.E., VAWTER M.P., 2012. *Gene expression changes in the prefrontal cortex, anterior cingulate cortex and nucleus accumbens of mood disorders subjects that committed suicide*. PLoS One. 7(4):e35367.
155. SHRESTHA P, MOUSA A, HEINTZ N., 2015. *Layer 2/3 pyramidal cells in the medial prefrontal cortex moderate stress induced depressive behaviors*. Elife. 4:e08752.
156. SINCLAIR D., TSAI S.Y., WOON H.G., WEICKERT C.S., 2011. *Abnormal Glucocorticoid Receptor mRNA and Protein Isoform Expression in the Prefrontal Cortex in Psychiatric Illness*. Neuropsychopharmacol 36:2698–2709.
157. SLEZAK M., KOROSTYNSKI M., GIERYK A., GOLDA S., DZBEK J., PIECHOTA M., WLAZLO E., BILECKI W., PRZEWLOCKI R., 2013. *Astrocytes are a neural target of morphine action via glucocorticoid receptor-dependent signaling*. Glia. 61(4):623-35.
158. SMART C., STRATHDEE G., WATSON S., MURGATROYD C., MCALLISTER-WILLIAMS R. H., 2015. *Early life trauma, depression and the glucocorticoid receptor gene – an epigenetic perspective*. Psychol. Med. 45, 3393-3410.
159. SMOAK K. A., CIDLOWSKI J. A., 2004. *Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation*. Mech. Ageing Dev. 125, 697-706.
160. SKUPIO U, TERTIL M, SIKORA M, GOLDA S, WAWRZCZAK-BARGIELA A, PRZEWLOCKI R., 2015. *Behavioral and molecular alterations in mice resulting from chronic treatment with dexamethasone: relevance to depression*. Neuroscience 286:141-150
161. SOBOCKI P., JÖNSSON B., ANGST J., REHNBERG C., 2006. *Cost of depression in Europe*. J. Ment. Health Policy Econ. 9, 87-98.
162. SOLOVEI I., CREMER M., 2010, *3D-FISH on cultured cells combined with immunostaining*. Methods in Molecular Biology 659:117-26
163. STEINHÄUSER C., KETTENMANN H., 2009. *Astrocyte: Neurotransmitter and Hormone Receptors*. Encyclopedia of Neuroscience, 579-585.
164. STEPHENS M. A., WAND G., 2012. *Stress and the HPA axis: role of glucocorticoids in alcohol dependence*. Alcohol Res. Curr. Rev. 34, 468-483.
165. SZCZERBAL I., FOSTER H. A., BRIDGER J. M., 2009. *The spatial repositioning of adipogenesis genes is correlated with their expression status in a porcine skeletal mesenchymal stem cell adipogenesis model system*. Chromosoma 118, 647-663.

166. TADDEI A., VAN HOUWE G., HEDIGER F., KALCK V., CUBIZOLLES F., SCHOBER H., GASSER S.M., 2006. *Nuclear pore association confers optimal expression levels for an inducible yeast gene*. *Nature*. 441(7094):774-8.
167. TAKASAKI K.T., DING J.B., SABATINI B.L., 2013. *Live-Cell Superresolution Imaging by Pulsed STED Two-Photon Excitation Microscopy*. *Biophysical Journal*, 104(4):770-777
168. TANG Z., LUO O. J., LI X., ZHENG M., ZHU J. J., SZALAJ P., TRZASKOMA P., MAGALSKA A., WLODARCZYK J., RUSZCZYCKI B., MICHALSKI P., PIECUCH E., WANG P., WANG D., TIAN S. Z., PENRAD-MOBAYED M., SACHS L. M., RUAN X., WEI C. L., LIU E. T., WILCZYNSKI G. M., PLEWCZYNSKI D., LI G., RUAN Y., 2015. *CTCF-Mediated human 3D genome architecture reveals chromatin topology for transcription*. *Cell* 163, 1611-1627.
169. TARAZONA S., FURIO-TARI P., TURRA D., PIETRO A. D., NUEDA M. J., FERRER A., CONESA A., 2015. *Data quality aware analysis of differential expression in RNA-seq with NOISeq R/Bioc package*. *Nucleic Acids Research*, 43(21), e140.
170. TOLHUIS B., PALSTRA R.J., SPLINTER E., GROSVELD F., DE LAAT W., 2002. *Looping and interaction between hypersensitive sites in the active beta-globin locus*. *Mol. Cell* 10:1453-1465
171. TRONCHE F., KELLENDONK C., KRETZ O., GASS P., ANLAG K., ORBAN P. C., BOCK R., KLEIN R., SCHÜTZ G., 1999. *Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety*. *Nat Genet* 23:99–103.
172. TRYSTUŁA M., ŻYCHOWSKA M., WILK-FRAŃCZUK M., KROPOTOV J. D., PAÇHALSKA M., 2017. *CASE-REPORT Dysregulation of gene expression in a patient with depressive disorder after transient ischemic attack confirmed by a neurophysiological neuromarker*. *Genet Mol Res*. 16(1).
173. TSANKOVA N., RENTHAL W., KUMAR A., NESTLER E. J., 2007. *Epigenetic regulation in psychiatric disorders*. *Nat. Rev, Neurosci*. 8, 355-367.
174. VAFAEI A. A., RASHIDY-POUR A., TAHERIAN A. A., 2008. *Peripheral injection of dexamethasone modulates anxiety related behaviors in mice: an interaction with opioidergic neurons*. *Pak J Pharm Sci* 21:285–289
175. VAKOC C. R., LETTING D. L., GHELDOLF N., SAWADO T., BENDER M. A., GROUDINE M., WEISS M. J., DEKKER J., BLOBEL G. A., 2005. *Proximity among distant regulatory elements at the beta-globin locus requires GATA-1 and FOG-1*. *Mol. Cell* 17:453–462.

176. VISEL A., BLOW M. J., LI Z., ZHANG T., AKIYAMA J. A., HOLT A., PLAJSER-FRICK I., SHOUKRY M., WRIGHT C., CHEN F., AFZAL V., REN B., RUBIN E. M., PENNACCHIO L.A., 2009. *ChIP-seq accurately predicts tissue-specific activity of enhancers*. Nature. 57(7231):854-8.
177. VOLTERRA A., 2009. *Neurotransmitter Release from Astrocytes*. Encyclopedia of Neuroscience, 1061-106.
178. WALCZAK A., SZCZEPANKIEWICZ A. A., RUSZCZYCKI B., MAGALSKA A., ZAMLYNSKA K., DZWONEK J., WILCZEK E., ZYBURA-BRODA K., RYLSKI M., MALINOWSKA M., DABROWSKI M., SZCZEPINSKA T., PAWLOWSKI K., PYSKATY M., WLODARCZYK J., SZCZERBAL I., SWITONSKI M., CREMER M., WILCZYNSKI G. M., 2013. *Novel higher-order epigenetic regulation of the Bdnf gene upon seizures*. J Neurosci. 33, 2507-2511.
179. WANG P., FENG Y., ZHU K., CHAI H., CHANG Y.T., YANG X., LIU X., SHEN C., GEGA E., LEE B., KIM M., RUAN X., RUAN Y., 2021. *In situ Chromatin Interaction Analysis Using Paired-End Tag Sequencing*. Curr Protoc. 1(8):e174.
180. WANG Q., JIE W., LIU J. H., YANG J. M., GAO T. M., 2017. *An astroglial basis of major depressive disorder? An overview*. Glia 65, 1227-1250
181. WANG Q, TIMBERLAKE MA 2ND, PRALL K, DWIVEDI Y. The recent progress in animal models of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2017;77:99-109.
182. WANG, L., WANG, S., LI, W., 2012. *RSeQC: quality control of RNA-seq experiments*. Bioinformatics 28(16), 2184–2185
183. WEBSTER M. J., KNABLE M. B., O'GRADY J., ORTHMANN J., WEICKERT C. S., 2002. *Regional specificity of brain glucocorticoid receptor mRNA alterations in subjects with schizophrenia and mood disorders*. Mol Psychiatry 7, 985–994.
184. WEI Q., LU X.-Y., LIU L., SCHAFER G., SHIEH K.-R., BURKE S., ROBINSON T. E., WATSON S. J., SEASHOLTZ A. F., AKIL H., 2004. *Glucocorticoid receptor overexpression in forebrain: a mouse model of increased emotional lability*. Proc Natl Acad Sci USA 101:11851–11856.
185. WIDOM C. S., DUMONT K., CZAJA S. J., 2007. *A prospective investigation of major depressive disorder and comorbidity in abused and neglected children grown up*. Arch. Gen. Psychiatry 64, 49-56.
186. WILCZYŃSKI G. M., 2014. *Significance of higher-order chromatin architecture for neuronal function and dysfunction*, Neuropharmacology 80, 28-33.

187. WRÓBEL A., SEREFKO A., WLAŻ P., POLESZAK E., 2014. *The depressogenic-like effect of acute and chronic treatment with dexamethasone and its influence on the activity of antidepressant drugs in the forced swim test in adult mice.* Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 54:243-8
188. XIE X., JIN J., ZHU L., JIE Z., LI Y., ZHAO B., CHENG X., LI P., SUN S. C., 2019. *Cell type-specific function of TRAF2 and TRAF3 in regulating type I IFN induction.* Cell Biosci 9, 5.
189. YOU Y., MA Y., WANG Q., YE Z., DENG Y., BAI F., 2019. *Attenuated ZHX3 expression serves as a potential biomarker that predicts poor clinical outcomes in breast cancer patients.* Cancer Manag Res. 11:1199-1210.
190. YAO Y., YAO Q.-Y., XUE J.-S., TIAN X.-Y., AN Q.-M., CUI L.-X., XU C., SU H., YANG L., FENG Y.-Y., HAO C.-Y., ZHOU T.-Y., 2020. *Dexamethasone inhibits pancreatic tumor growth in preclinical models: Involvement of activating glucocorticoid receptor.* Toxicology and Applied Pharmacology, 401,115118
191. YU G., WANG L., HAN Y., HE Q., 2012. *clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters.* OMICS: A Journal of Integrative Biology 16(5):284-287.
192. YUEN E. Y., LIU W., KARATSOREOS I. N., FENG J., MCEWEN B. S., YAN Z., 2009. *Acute stress enhances glutamatergic transmission in prefrontal cortex and facilitates working memory.* Proc Natl Acad Sci U S A. 106(33):14075-14079.
193. ZHANG F., CAO H., BARANOVA A., 2021. *Shared Genetic Liability and Causal Associations Between Major Depressive Disorder and Cardiovascular Diseases.* Front Cardiovasc Med. 8:735136.
194. ZHANG Z., MA Z., ZOU W., GUO H., LIU M., MA Y., ZHANG L., 2019. *The Appropriate Marker for Astrocytes: Comparing the Distribution and Expression of Three Astrocytic Markers in Different Mouse Cerebral Regions.* Biomed Res Int. 2019:9605265.
195. ZHANG X., XU Y., ZHOU L., ZHANG C., MENG Q., WU S., WANG S., DING Z., CHEN X., LI X., CHEN R., 2015. *Sex-Dependent Depression-Like Behavior Induced by Respiratory Administration of Aluminum Oxide Nanoparticles.* Int J Environ Res Public Health. 12(12):15692-705.
196. ZHENG M., TIAN S. Z., CAPURSO D., KIM M., MAURYA R., LEE B., PIECUCH E., GONG L., ZHU J. J., LI Z., WONG C. H., NGAN C. Y., WANG P., RUAN X., WEI C. L., RUAN Y., 2019. *Multiplex chromatin interactions with single-molecule precision.* Nature 566, 558–562.

197. ZHOU X, XIAO Q, XIE L, YANG F, WANG L, TU J., 2019. *Astrocyte, a Promising Target for Mood Disorder Interventions*. *Front Mol Neurosci*. 2019 Jun 5;12:136.
198. ZHU L. J., LIU M. Y., LI H., LIU X., CHEN C., HAN Z., WU H. Y., JING X., ZHOU H. H., SUH H., ZHU D. Y., ZHOU Q. G., 2014. *The different roles of glucocorticoids in the hippocampus and hypothalamus in chronic stress-induced HPA axis hyperactivity*. *PLoS One*. 9(5):e97689.

8. Spis własnych publikacji

8.1. Publikacje

1. SKUPIEN-JAROSZEK A., WALCZAK A., CZABAN I., **PELS K. K.**, SZCZEPANKIEWICZ A. A., KRAWCZYK K., RUSZCZYCKI B., WILCZYŃSKI G. M., DZWONEK J., MAGALSKA A., 2021. *The interplay of seizures-induced axonal sprouting and transcription-dependent Bdnf repositioning in the model of temporal lobe epilepsy*; PLoS ONE 16(6):e0239111
2. BĄCZYŃSKA E., **PELS K. K.**, BASU S., WŁODARCZYK J., RUSZCZYCKI B., 2021. *Quantification of Dendritic Spines Remodeling under Physiological Stimuli and in Pathological Conditions*. International Journal of Molecular Sciences 22,4053.
3. MLYNARCZUK-BIALY I., DZIUBA I., SARNECKA A., PLATOS E., KOWALCZYK M., **PELS K. K.**, WILCZYŃSKI G. M., WOJCIK C., BIALY L. P., 2020. *Entosis: from cell biology to clinical cancer pathology*; Cancers, 12(9) 2481
4. TRZASKOMA P., RUSZCZYCKI B., LEE B., **PELS K. K.**, KRAWCZYK K., BOKOTA G., SZCZEPANKIEWICZ A. A., AARON J., WALCZAK A., ŚLIWIŃSKA M. A., MAGALSKA A., KADLOF M., WOLNY A., PARTEKA Z., ARABASZ S., KISS-ARABASZ M., PLEWCZYŃSKI D., RUAN Y., WILCZYŃSKI G. M., 2020. *Ultrastructural visualization of 3D chromatin folding using volume electron microscopy and DNA in situ hybridization*. Nature Communications; 11, 2120.
5. PEĆAK A., SKALNIAK Ł., **PELS K.**, KSIĄŻEK M., MADEJ M., KRZEMIEŃ D., MALICKI S., WŁADYKA B., DUBIN A., HOLAK T. A., DUBIN G., 2020. *Anti-CD44 DNA Aptamers Selectively Target Cancer Cells*. Nucleic Acid Therapeutic; 10.1089.
6. **PELS K. K.**, 2020 *O molekularnej patogenezie stresu i depresji*; Kosmos 69 (1).
7. RUSZCZYCKI B., **PELS K. K.**, WALCZAK A., ZAMŁYŃSKA K., SUCH M., SZCZEPANKIEWICZ A. A., HALL M. H., MAGALSKA A., MAGNOWSKA M., WOLNY A., BOKOTA G., BASU S., PAL A., PLEWCZYŃSKI D., WILCZYŃSKI G. M., 2019. *Three-Dimensional Segmentation and Reconstruction of Neuronal Nuclei in Confocal Microscopic Images*. Frontiers in Neuroanatomy 13:81
8. SKUPIO U., TERTIL M., BARUT J., KOROSTYŃSKI M., GOLDA S., KUDLA L., WIKTOROWSKA L., SOWA J. E., SIWIEC M., BOBULA B., **PELS K.**, TOKARSKI K., HESS G., RUSZCZYCKI B., WILCZYŃSKI G., PRZEWŁOCKI R., 2019. *Glucocorticoid receptor in astrocytes modulates opioid reward sensitivity*. Neuropsychopharmacology 0:1–12.
9. BARTNICKI F., KOWALSKA E., **PELS K.**, STRZALKA W., 2015. *Imidazole-free purification of His₃-tagged recombinant proteins using ssDNA aptamer-based affinity chromatography*, Journal of Chromatography A 1418:130-139

10. KOWALSKA E., BARTNICKI F., **PELS K.**, STRZAŁKA W., 2014. *The impact of immobilized metal affinity chromatographic (IMAC) resins on DNA aptamer selection*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 406(22):5495-9
11. STRZAŁKA W., BARTNICKI F., **PELS K.**, JAKUBOWSKA A., TSURIMOTO T., TANAKA K., 2013. *RAD5a ubiquitin ligase is involved in ubiquitination of Arabidopsis thaliana proliferating cell nuclear antigen*. Journal of Experimental Botany 64(4):859-69

8.2. Patenty

1. Patent nr 237241 „Aptamers against CD44 protein and their applications”, PEĆCAK A, PELS K., SKALNIAK Ł., MALICKI S., DUBIN G., DUBIN A., 23 marzec 2021.
2. Patent nr 15747581.5-1401 „DNA aptamer against arginin tag and its application”, BARTNICKI F., STRZAŁKA W., KOWALSKA E., PELS K., 7 luty 2017.
3. Patent nr 14736043.2-1401 „DNA aptamers against histidin tag and their application”, BARTNICKI F., STRZAŁKA W., KOWALSKA E., PELS K., 12 luty 2016