



instytut biologii doświadczalnej
im. Marcelego Nenckiego PAN

Agnieszka Kamila Grabowska

**Zależna od deacetylazy histonowej 1 rearanzacja
chromatyny neuronów hipokampalnych szczura
indukowana pobudzeniem**

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

PROMOTOR:

Dr hab. Adriana Magalska

Warszawa 2023

Chciałabym najserdeczniej podziękować mojej promotorce Adzie Magalskiej, która nieugięcie niosła na swoich barkach ciężar sprawowania nade mną opieki, nie zawsze łatwej i nie tylko tej naukowej, jednocześnie tworząc niezawodne oparcie w życiu osobistym.

Dziękuję także Hannie Sas-Nowosielskiej, nie tylko za istotną pomoc w eksperymentach i wprowadzenie w mikroskopię konfokalną, ale również za stworzenie w zespole atmosfery wyjątkowej życzliwości i energii do pracy,

Dagmarze Holm, Eli Januszewicz, Janie Juszkiewicz, Iwonie Czaban, Pawłowi Trzaskomie i Kasi Krawczyk za wspólną pracę, nawiązane przyjaźnie i ciekawe dyskusje,

Grzegorzowi Bokocie za stworzenie wspaniałego programu Partseg do analizy obrazów z mikroskopu konfokalnego,

Bartoszowi Wojtasowi i Bartłomiejowi Gielniewskiemu za wykonanie i analizę sekwencjonowania RNA,

Małgorzacie Śliwińskiej za naukę i przeprowadzenie procedury mikroskopii elektronowej oraz

Prof. Annie Filipek za bardzo cenne i życzliwe uwagi, dotyczące poprawnego pisania prac naukowych.

Dziękuję również Kierownikom, Koleżankom i Kolegom z Pracowni Neuromorfologii Molekularnej i Systemowej prof. Grzegorza Wilczyńskiego i Pracowni Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych prof. Jolanty Rędownicz za nieocenioną pomoc i wspaniałą atmosferę pracy,

Pracowni Obrazowania Struktury i Funkcji Tkankowych za zawsze życzliwą pomoc niezależnie od pory dnia w obsłudze mikroskopów oraz

Pracowni Modeli Zwierzęcych za miłą współpracę przy tworzeniu lentiwirusa.

Na końcu chciałabym podziękować Rodzinie, zwłaszcza Mężowi, Rodzicom i Teściom, bo bez ich codziennego wsparcia i pomocy w opiece nad dziećmi ta praca nigdy by nie powstała.

Praca powstała dzięki badaniom zrealizowanym w ramach grantu NCN SonataBis5 nr: 2015/18/E/NZ3/00730.

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów	6
Streszczenie	8
Abstract.....	9
1. Wstęp.....	10
1.1. Neuroplastyczność – podstawowy mechanizm leżący u podstaw funkcji poznawczych.....	10
1.1.1. Podstawy molekularne długotrwałego wzmocnienia synaptycznego	11
1.1.2. Geny odpowiedzi wczesnej w długotrwałym wzmocnieniu synaptycznym	14
1.2. Organizacja chromatyny w jądrze komórkowym	15
1.2.1. Stopnie upakowania chromatyny w jądrze komórkowym	16
1.2.2. Wpływ czynników epigenetycznych na organizację chromatyny	16
1.2.3. Funkcjonalna organizacja chromatyny	20
1.2.4. Heterogenność organizacji chromatyny	24
2. Założenia i cele pracy	25
3. Materiały i metody	26
3.1. Odczynniki	26
3.1.1. Odczynniki do hodowli i utrwalania szczurzych neuronów	26
3.1.2. Odczynniki do chemicznego pobudzenia długotrwałego wzmocnienia synaptycznego	27
3.1.3. Inhibitory	28
3.1.4. Plazmidy do transfekcji i transdukcji	28
3.1.5. Przeciwciała pierwszorzędowe do barwień immunocytochemicznych	30
3.1.6. Przeciwciała drugorzędowe do barwień immunocytochemicznych	30
3.1.7. Odczynniki do barwień immunocytochemicznych	31
3.1.8. Odczynniki do fluorescencyjnej hybrydyzacji <i>in situ</i>	31
3.1.9. Odczynniki do metody western blot	31
3.1.10. Odczynniki do mikroskopii elektronowej	32
3.2. Roztwory i bufony	33
3.2.1. Bufory do hodowli szczurzych neuronów i przeprowadzonych doświadczeń ...	33
3.2.2. Bufory do barwień immunocytochemicznych	34
3.2.3. Bufory do fluorescencyjnej hybrydyzacji <i>in situ</i>	34
3.2.4. Bufory do metody western blot	35
3.2.5. Bufory do mikroskopii elektronowej	36

3.3.	Hodowla szczurzych neuronów hipokampalnych	37
3.3.1.	Przygotowanie szkiełek	37
3.3.2.	Warunki hodowli	37
3.3.3.	Stymulacja komórek mieszaniną do wywoływania długotrwałego wzmocnienia synaptycznego	38
3.3.4.	Stymulacja komórek buforem depolaryzującym z użyciem cyklosporyny i FK506.	38
3.3.5.	Użycie pozostałych inhibitorów	39
3.3.6.	Wyciszanie ekspresji genu <i>Hdac1</i>	39
3.3.7.	Przywrócenie funkcji białka HDAC1	39
3.4.	Izolacja i sekwencjonowanie RNA	40
3.5.	Western blot	40
3.5.1.	Zbieranie komórek i przygotowanie lizatów białkowych	41
3.5.2.	Rozdział i detekcja białek	41
3.6.	Barwienie immunocytochemiczne	41
3.7.	Fluorescencyjna hybrydyzacja <i>in situ</i>	42
3.8.	Mikroskopia konfokalna	43
3.8.1.	Analiza ilościowa obrazów uzyskanych z mikroskopu konfokalnego	43
3.9.	Mikroskopia elektronowa	44
3.9.1.	Obrazowanie w mikroskopie elektronowym transmisyjnym	45
3.10.	Testy statystyczne	46
4.	Wyniki	47
4.1.	Rearanżacji chromatyny towarzyszą zmiany w aktywności transkrypcyjnej genów	47
4.2.	Na skutek indukcji LTP chromatyna ulega rearanżacji	51
4.3.	Po indukcji LTP terytorium chromosomu 1 staje się mniejsze i ma bardziej złożoną budowę	59
4.4.	Rearanżacja chromatyny jest niezależna od transkrypcji	63
4.5.	Rearanżacji chromatyny towarzyszą zmiany w lokalizacji potranslacyjnie modyfikowanych histonów	65
4.6.	Zahamowanie działania enzymów przeprowadzających potranslacyjne modyfikacje histonów nie blokuje rearanżacji chromatyny	71
4.7.	Kondensacja chromatyny jest zależna od napływu jonów wapnia	74

4.8. Zablockowanie aktywności deacetylaz histonowych hamuje kondensację chromatyny..	
76	
4.9. W rearanżacji chromatyny kluczową rolę odgrywa białko HDAC1	80
5. Dyskusja	89
5.1. Wady i zalety wybranego modelu doświadczalnego	89
5.2. Podział neuronów	92
5.3. Kondensacja chromatyny	94
5.3.1. Kondensacja chromatyny a ekspresja genów	95
5.3.2. Kondensacja chromatyny a tworzenie pętli	97
5.3.3. Kondensacja chromatyny a acetylacja histonów	98
5.4. Acetylacja w plastyczności synaptycznej	99
5.5. Proponowany mechanizm kondensacji chromatyny z uwzględnieniem roli białka HDAC1	100
6. Podsumowanie i wnioski	103
7. Bibliografia	104
Publikacje doktorantki	115

Wykaz stosowanych skrótów

AMPAr (ang. *α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionic Acid Receptor*) – receptor kwasu α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowego

CaMKII (ang. *Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II*) – kinaza zależna od wapnia i kalmoduliny

cAMP (ang. *Cyclic Adenosine Monophosphate*) – cykliczny adenozylo-3',5'-monofosforan

CBP (ang. *CREB-Binding Protein*) – acetylotransferaza wiążąca się z białkiem CREB

CCD (ang. *Chromatin Contact Domain*) – kontaktowa domena chromatynowa (odpowiada domenom TAD)

CoREST (ang. *Co-Repressor For RE1 Silencing Transcription Factor*) – kompleks białkowy, korepresor transkrypcji

CTCF (ang. *CCCTC-Binding Factor*) – czynnik wiążący motyw CCCTC w sekwencji DNA

DIV (ang. *Days In Vitro*) – dzień hodowli *in vitro*

DMSO (ang. *Dimethyl Sulfoxide*) – dimetylosulfotlenek, odczynnik stosowany do rozpuszczania innych odczynników i z tego względu w pracy stosowany często jako kontrola

GFP (ang. *Green Fluorescence Protein*) – białko zielonej fluorescencji

HDAC (ang. *Histone Deacetylase*) – deacetylaza histonowa

IEGs (ang. *Immediate Early Genes*) – geny odpowiedzi wczesnej

FISH (ang. *Fluorescent In Situ Hybridization*) – fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*, pozwala na wizualizację specyficznych odcinków DNA lub RNA

KEGG (ang. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) – baza danych, łącząca informacje genetyczne i funkcjonalne

LADs (ang. *Lamin Associated Domains*) – domeny genomu związane z laminami jądrowymi

LTP (ang. *Long Term Potentiation*) – długotrwałe wzmocnienie synaptyczne

MAPKs (ang. *Mitogen-Activated Protein Kinases*) – kinazy białkowe MAP

NMDAr (ang. *N-Methyl-D-Aspartate Receptor*) – receptor kwasu N-metylo-D-asparaginowego
ns – różnice nieistotne statystycznie

NuRD (ang. *Nucleosome Remodeling Deacetylase*) – kompleks białkowy, uczestniczący w regulacji struktury chormatyny i ekspresji genów

PKA (ang. *Protein Kinase A*) – kinaza białkowa A

pp. – punkty procentowe

Rb (ang. *Retinoblastoma Protein*) – białko retinoblastoma

Regiony CpG (ang. *5'-C-Phosphate-G-3'*) – regiony w genomie o podwyższonej zawartości dinukleotydów cytozyna - guanina

RFP (ang. *Red Fluorescent Protein*) – białko czerwonej fluorescencji

RNAseq (ang. *RNA Sequencing*) – metoda umożliwiająca sekwencjonowanie RNA

scr RNA (ang. *Scrambled RNA*) – wariant kontrolny interferującego RNA zawierający proporcje nukleotydów identyczne z sekwencją RNA wyciszającego, ale ułożone w przypadkowej kolejności.

shHDAC1 (ang. *Short Hairspin RNA HDAC1*) – wariant interferującego RNA o sekwencji komplementarnej do RNA białka HDAC1

shRNA (ang. *Short Hairspin RNA*) – spinka RNA specyficzna dla wybranego białka

SEM (ang. *Mean Standard Error*) – błąd standardowy średniej

SIN3A (ang. *SIN3 Transcription Regulator Family Member A*) – białko należące do rodziny Sin3, regulator transkrypcji

TAD (ang. *Topologically Associating Domains*) – funkcjonalnie i strukturalnie spójna domena chromatyny o zwiększonej liczbie interakcji międzychromatynowych (odpowiada domenom CCD)

TEM (ang. *Transmission Electron Microscopy*) – transmisyjna mikroskopia elektronowa

TSA (ang. *Trichostatin A*) – trichostatyna A, inhibitor deacetylaz histonowych

Streszczenie

Funkcjonowanie organizmów żywych w nieustannie zmieniającym się środowisku wymaga od nich zdolności zarówno do szybkiej reakcji, jak i ciągłego uczenia się i formowania pamięci. Predyspozycja do adaptacji u zwierząt wiąże się z zachodzeniem długotrwałych modyfikacji funkcjonalnych w ich komórkach i tkankach. Współcześnie nie ma wątpliwości, że długotrwałe zmiany obserwowane na poziomie komórki wymagają zmian w ekspresji genów, co wpływa na morfologię i funkcjonowanie komórek, w tym neuronów, i w końcowym efekcie na zachowanie.

Wcześniej uzyskane wyniki w Pracowni Neuromorfologii Molekularnej i Systemowej wykazały, że indukcja długotrwałego wzmocnienia synaptycznego w szczurzych neuronach hipokampalnych hodowanych *in vitro* skutkuje globalną kondensacją chromatyny. Wspomnianej rearanżacji towarzyszył wzrost poziomu białka c-FOS, kodowanego przez gen odpowiedzi wczesnej *c-Fos*. Zmiany te były odwracalne i nie były związane z programowaną śmiercią komórki.

W związku z powyższym, celem niniejszej rozprawy było wyjaśnienie molekularnego mechanizmu wywołującego zmiany w przestrzennej organizacji chromatyny, zachodzące wskutek pobudzenia komórki nerwowej.

Uzyskane wyniki wykazały, że tempo i nasilenie zmian w organizacji chromatyny różnią się w zależności od typu badanych neuronów. Kondensacji chromatyny towarzyszyły zmiany w transkrypcji 931 genów, zmiany w lokalizacji potranslacyjnie modyfikowanych histonów i reorganizacja terytorium chromosomu 1. Co ciekawe, zmiany w organizacji chromatyny były niezależne od zachodzącej na skutek pobudzenia transkrypcji genów, bo pomimo specyficznego zahamowania aktywności polimerazy RNA II, chromatyna nadal ulegała kondensacji. Ponadto, wyniki pokazały, że kondensacja chromatyny jest zależna od napływu jonów wapnia do wnętrza komórki. Użycie inhibitorów deacetylaz histonowych o różnej specyficzności pozwoliło zidentyfikować deacetylazę HDAC1 jako bezpośrednio zaangażowaną w zmiany przestrzennej organizacji chromatyny po pobudzeniu neuronów. Wyciszenie ekspresji genu *Hdac1* za pomocą specyficznej spinki RNA, spowodowało widoczne zahamowanie kondensacji chromatyny, którą udało się przywrócić poprzez podanie ludzkiej wersji białka HDAC1, niewrażliwej na działanie interferencyjnego RNA.

Podsumowując, z uzyskanych wyników i danych literaturowych wyłania się obraz podwójnej roli białka HDAC1. Z jednej strony jego oddysocjowanie od DNA konieczne jest do aktywacji transkrypcji np. niektórych genów odpowiedzi wczesnej. Z drugiej – jego obecność na chromatynie jest kluczowa dla kondensacji chromatyny w celu wyciszenia transkrypcji genów, które w danej chwili nie powinny ulegać ekspresji.

Kondensacja chromatyny powodowana pobudzeniem może mieć długotrwały wpływ na funkcje neuronów, a tym samym odgrywać znaczącą rolę w plastyczności synaptycznej, obejmując procesy takie jak uczenie się i formowanie pamięci.

Abstract

The functioning of living organisms in a constantly changing environment requires them to possess the ability to react quickly and continuously adapt through learning and memory formation. The predisposition for adaptation in animals is associated with long-term functional modifications occurring in their cells and tissues. It is now widely accepted that long-term changes observed at the cellular level require changes in gene expression, which affect the morphology and functioning of cells, including neurons, ultimately resulting in behavioral changes.

Previously obtained results in the Laboratory of Molecular and Systemic Neuromorphology have shown that the induction of long-term potentiation in *in vitro* cultured rat hippocampal neurons leads to a global condensation of the chromatin. This reorganisation of chromatin is accompanied by an elevation in the level of c-FOS, an immediate-early gene. Importantly, these changes are reversible and do not coincide with programmed cell death. In light of these findings, the objective of this dissertation was to explain the molecular mechanism underlying the changes in the spatial organization of chromatin induced by neuronal stimulation.

The experiments outlined in this study demonstrate that the intensity of changes in chromatin organization varies depending on the neuron type. Chromatin condensation is accompanied by alterations in the transcription of 931 genes, changes in the localization of posttranslationally modified histones and reorganization of the chromosome 1 territory. Interestingly, despite specific inhibition of RNA polymerase II activity, chromatin continues to undergo rearrangement. Moreover, it has been demonstrated that chromatin condensation relies on the influx of calcium ions into the cell. By employing histone deacetylase inhibitors with different specificities, HDAC1 has been identified as a key player directly involved in the changes in spatial organization of chromatin after neuronal stimulation.. Silencing HDAC1 using specific RNA interference reveals visible disruptions in chromatin condensation and its reorganization upon stimulation, which can be reversed by addback of the human HDAC1 protein, which was not sensitive to RNAi.

In summary, based on the obtained results and existing literature, a dual role of the HDAC1 protein emerges. On one hand, its dissociation from DNA enables transcriptional activation, while on the other hand, it plays a crucial role in chromatin condensation following cell activation to silence genes that are not currently being expressed.

The activity-driven condensation of chromatin can have a long-lasting impact on neuronal function, thereby playing a significant role in synaptic plasticity, including processes such as learning and memory formation.

1. Wstęp

Zdolność organizmów żywych do funkcjonowania w zmieniającym się dynamicznie środowisku wymaga zarówno możliwości szybkiej reakcji na bodźce, jak i umiejętności adaptacyjnych opartych na uczeniu się i formowaniu pamięci. Predyspozycja do zapamiętywania faktów oraz minionych wydarzeń wiąże się z zachodzeniem w organizmach długotrwałych modyfikacji funkcjonalnych. U zwierząt, za przystosowanie się do zmian zachodzących w otoczeniu, odpowiedzialny jest układ nerwowy, zbudowany z neuronów oraz komórek glejowych. Dynamiczny i zróżnicowany proces odpowiedzi poszczególnych neuronów na bodźce zewnętrzne nazwano pobudliwością, natomiast utrzymujące się w konsekwencji zmiany – neuroplastycznością (Konorski 1948, Kania i wsp. 2017).

1.1. Neuroplastyczność – podstawowy mechanizm leżący u podstaw funkcji poznawczych

Pierwsze wzmianki na temat plastyczności, czyli procesu długotrwanie modyfikującego komórki nerwowe w reakcji na czynniki środowiskowe, pojawiły się w pracy prof. Jerzego Konorskiego (Konorski 1948), wybitnego polskiego neurofizjologa. Wcześniej układ nerwowy był postrzegany jako niezmienny i niewykazujący zdolności regeneracji, stąd nowe doniesienie nie zostało z początku przyjęte przychylnie przez środowisko naukowe. Rok później udowodniono jednak, że nabywanie nowych informacji wiąże się ze zmianami w sile oraz liczbie połączeń między neuronami, które są równocześnie i powtarzalnie pobudzane (Hebb 1949). Obydwa odkrycia zainicjowały szereg innych eksperymentów prowadzących do zgłębiania zjawiska neuroplastyczności. Współczesna jej definicja obejmuje szeroki zakres długotrwałych zmian w układzie nerwowym, związanych z jego rozwojem, naprawą czy stanem patologicznym, a także uczeniem się i pamięcią. Wszystkie wymienione procesy mają jednak podstawową cechę wspólną – zmiany w sile połączeń między neuronami (Kossut 2019).

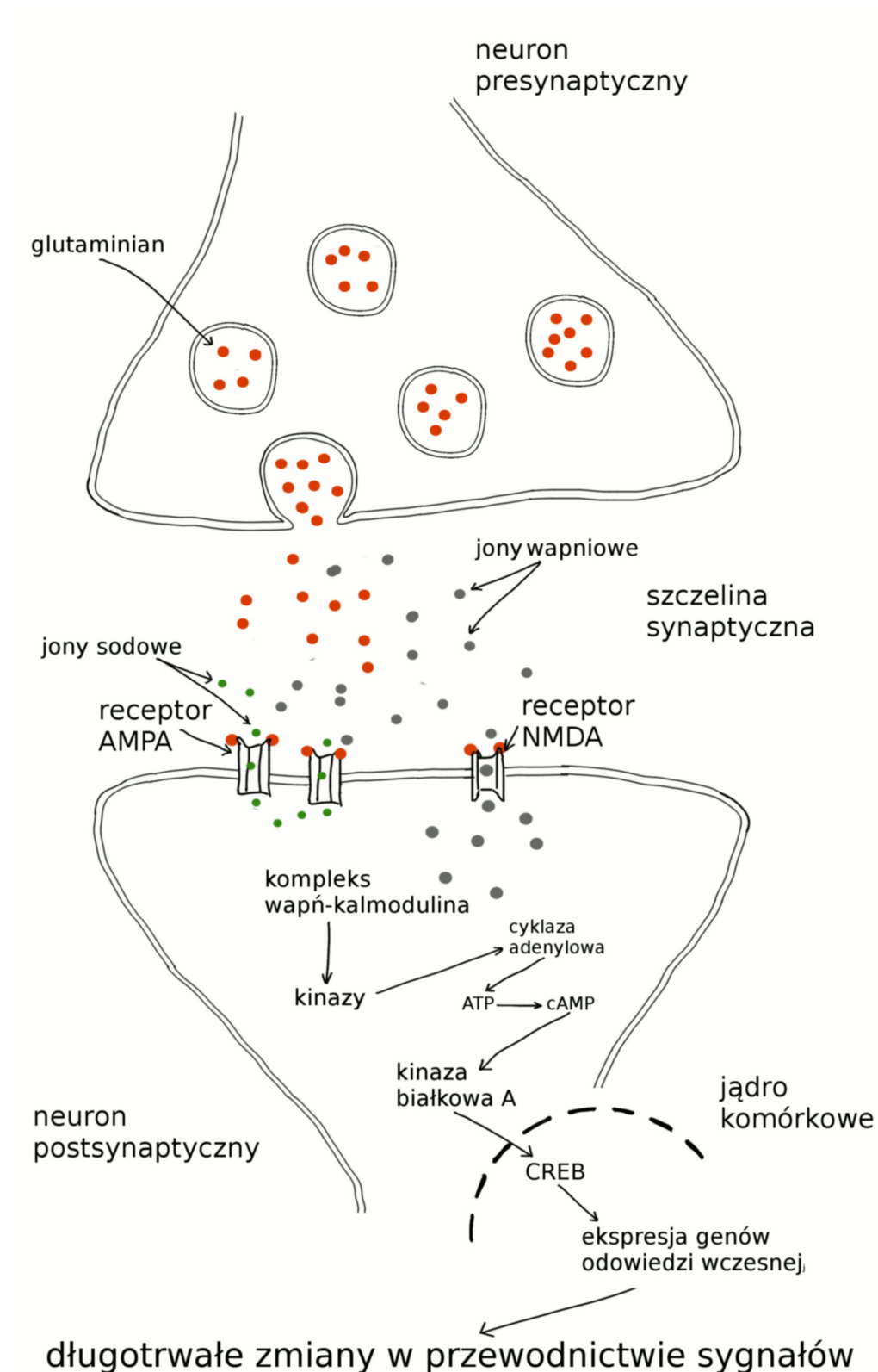
Komórki nerwowe tworzą sieć, lecz nie stykają się ze sobą bezpośrednio. Pomiędzy nimi występuje mała przerwa – synapsa, przez którą komórki się komunikują. Komunikacja ta może przybierać formę chemiczną, kiedy do szczeliny synaptycznej uwalniany jest neuroprzekaźnik lub fizyczną, polegającą na przeniesieniu impulsu elektrycznego, bezpośrednio depolaryzującego błonę komórkową. U ssaków zdecydowana większość synaps pobudzających jest chemiczna i zlokalizowana na wyspecjalizowanych wypustkach błony

komórkowej, nazywanych kolcami dendrytycznymi (Harris i Kater 1994, Nimchinsky i wsp. 2002). Synapsy mogą być modyfikowane na różne sposoby (opisane poniżej), co zmienia wydajność przekazywania sygnałów. Kolejne badania dotyczące plastyczności przyczyniły się do poznania zjawiska długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (LTP, ang. *Long Term Potentiation*), czyli modyfikacji, w wyniku której wzrasta efektywność przekazywania sygnału z jednej komórki do kolejnej, a reakcja w komórce postsynaptycznej staje się silniejsza (Bliss i Lomo 1973). Im częściej pobudzane są dane komórki, tym mocniejsze jest połączenie między nimi. Istnieje również zjawisko odwrotne, czyli długotrwałe osłabienie synaptyczne (LTD, ang. *Long Term Depression*), które prowadzi do wygaszania rzadziej używanych połączeń (Ito 2001). Obydwa procesy zmieniają budowę synaps zarówno po stronie postsynaptycznej, jak i presynaptycznej oraz leżą u podstaw neuroplastyczności, a w konsekwencji również uczenia się i zapamiętywania (Morris i wsp. 1990, Nabavi i wsp. 2014).

1.1.1. Podstawy molekularne długotrwałego wzmocnienia synaptycznego

Proces tworzenia długotrwałego wzmocnienia synaptycznego opiera się na współpracy receptorów kwasów α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowego (AMPA) i N-metylo-D-asparaginowego (NMDA), które są zaangażowane w przewodzenie sygnałów nerwowych między neuronami (Nicoll i Malenka 1995, Baltaci i wsp. 2019). W stanie spoczynku błona komórkowa neuronów charakteryzuje się potencjałem ujemnym, co oznacza, że wewnątrz komórki jest naładowane negatywnie w porównaniu do zewnętrznego środowiska. W wyniku działania bodźca, do szczeliny presynaptycznej może napłynąć neurotransmitter pobudzający (np. glutaminian), a następnie związać się z receptorami AMPA na błonie postsynaptycznej (ryc. 1). Uzyskana w ten sposób aktywacja receptorów AMPA powoduje napływ jonów sodu do wnętrza komórki, co powoduje depolaryzację błony komórkowej. Pojedynczy receptor AMPA wpływa na depolaryzację błony komórkowej w niewielkim stopniu, dlatego do osiągnięcia odpowiedniego pułapu i wzbudzenia impulsu niezbędna jest współpraca kilku receptorów naraz lub wielokrotnie powtarzany sygnał. Depolaryzacja błony spowodowana napływem kationów do wnętrza komórki powoduje elektrostatyczne wypchnięcie jonu magnezu z receptora NMDA i przy obecności glutaminianu, kanały jonowe otwierają się, umożliwiając napływ jonów wapnia (Bliss i Collingridge 1993, Baltaci i wsp. 2019). Wzrost stężenia jonów wapnia w cytoplazmie komórki jest kluczowym wydarzeniem, które inicjuje kaskadę procesów molekularnych prowadzących do wzmocnienia

synaptycznego. Najsilniejszej aktywacji ulega kinaza zależna od wapnia i kalmoduliny (CaMKII, ang. *Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II*), która z kolei pobudza cyklazę adenylową, co prowadzi do wzrostu cyklicznego AMP (ang. *Cyclic Adenosine Monophosphate*, cAMP) w komórce. Cząsteczki cAMP aktywują kinazę białkową A (PKA, ang. *Protein Kinase A*) oraz kinazy MAP (ang. *Mitogen-Activated Protein Kinases*) (Bliss i Collingridge 1993, Baltaci i wsp. 2019). Działanie kinaz ma wpływ na wzrost przewodnictwa receptorów AMPA i wstawianie kolejnych receptorów do błony komórkowej, co prowadzi do wzmocnienia sygnału. Wstawianie nowych receptorów AMPA obejmuje również tzw. „ciche” synapsy (Isaac i wsp. 1995, Herring i Nicoll 2016), które nie wykazują aktywności elektrycznej w warunkach spoczynku, ale są zdolne do przewodzenia sygnałów po odpowiednim bodźcu i dodatkowo zwiększają efektywność przewodzenia sygnałów w sieci neuronalnej. Kinaza PKA fosforyluje także czynnik CREB, umożliwiając ekspresję genów odpowiedzi wczesnej (IEGs, ang. *Immediate Early Genes*, Dragunow 1996, Cohen i Greenberg 2008).



Rycina 1. Uproszczony schemat przebiegu długotrwałego wzmocnienia synaptycznego. Depolaryzacja błony komórkowej, wskutek napływu jonów sodowych przez receptory AMPA oraz pojawienie się glutaminianu w szczelinie synaptycznej prowadzą do aktywacji receptorów NMDA i powodują napływ jonów wapnia do komórki. W neuronach wapń tworzy kompleks z kalmoduliną, który aktywuje kinazy. Pobudzona przez kinazę zależną od wapnia i kalmoduliny cyklaza adenylowa powoduje przekształcenie ATP w cAMP. Z kolei cAMP prowadzi do aktywacji kinazy białkowej A, która fosforyluje białko CREB i prowadzi do aktywacji transkrypcji. Powstające w konsekwencji białka powodują długotrwałe zmiany w sile przekazywania sygnałów.

1.1.2. Geny odpowiedzi wczesnej w długotrwałym wzmocnieniu synaptycznym

Jak wspomniano na początku, komórki nerwowe mają za zadanie szybko reagować na zmiany w środowisku, ale jednocześnie długo przechowywać istotne informacje. Indukcja genów odpowiedzi wczesnej jest właśnie najszybszą reakcją prowadzącą do długotrwałych zmian w odpowiedzi na bodźce (Kaczmarek 2018, Yap i Greenberg 2018). Charakteryzuje je szybka i przejściowa stymulacja, bez konieczności syntezy nowych czynników transkrypcyjnych. Choć niektóre geny odpowiedzi późnej również nie wymagają syntezy białek *de novo* (Tullai i wsp. 2007), w mojej pracy zastosuję uproszczenie, wykorzystując powyższą cechę jako charakterystyczną jedynie dla genów odpowiedzi wczesnej. Czynniki transkrypcyjne aktywujące geny odpowiedzi wczesnej ulegają przeważnie ciągłej ekspresji, a po pobudzeniu zostają aktywowane (Yap i Greenberg 2018). Geny odpowiedzi wczesnej możemy ponadto podzielić na geny o natychmiastowej i opóźnionej reakcji, zależnie od szybkości ich ekspresji w odpowiedzi na bodźce. Szybka transkrypcja genów natychmiastowej odpowiedzi wczesnej jest możliwa dzięki aktywacji polimerazy RNA II, która w stanie fosforylacji jest związana w proksymalnych regionach promotorów (Saha i wsp. 2011). W przypadku genów opóźnionej odpowiedzi wczesnej takie zjawisko nie występuje (Saha i wsp. 2011). Dotychczas poznano ponad 100 genów odpowiedzi wczesnej, ale niewiele z nich zidentyfikowano w neuronach (Gallo i wsp. 2018). Kodują one bardzo heterogenną funkcjonalnie grupę białek, w tym czynników transkrypcyjnych, białek sygnałowych lub strukturalnych. W wyniku aktywacji po pobudzeniu wiele z nich może indukować drugą falę transkrypcji genów (Benito i Barco 2014), kodujących z kolei białka działające i lokalizujące się w synapsach (Okuno 2011, Yap i Greenberg 2018). Obecność produktów genów odpowiedzi wczesnej jest często stosowana jako marker pobudzenia dla populacji neuronów, które przechodzą zmiany związane z LTP, w tym uczeniem się i zapamiętywaniem (Minatohara i wsp. 2016, Gallo i wsp. 2018). Udowodniono, że ekspresja genów w długotrwałym wzmocnieniu synaptycznym jest niezbędna do modyfikacji struktury synaps i utrzymania tych zmian (Bliss i Collingridge 1993, Kandel 2001).

Jednym z najlepiej poznanych genów odpowiedzi wczesnej jest gen *c-Fos*, kodujący czynnik transkrypcyjny c-FOS, wchodzący w skład kompleksu AP-1 (ang. *Activator Protein 1*, Sheng i Greenberg 1990, Gallo i wsp. 2018). Kompleks ten bierze udział w aktywacji transkrypcji, leżącej m.in. u podstaw uczenia się i pamięci (Barry i wsp. 2016). Ekspresja genu *c-Fos* jest dynamicznie regulowana w odpowiedzi na różnorodne bodźce, takie jak pobudzenie neuronalne, stres czy procesy zapalne. Długotrwałe pobudzone LTP, jak np.

trenowanie pamięci, prowadzi do szybkiej i trwałej akumulacji mRNA genu *c-Fos* w mózgu (Kaczmarek 1992). Z drugiej strony, zablokowanie jego ekspresji prowadzi do spadku zdolności uczenia się i osłabienia pamięci zależnej od hipokampu, choć wyniki innych testów behawioralnych pozostają bez zmian w stosunku do grupy kontrolnej (Fleischmann i wsp. 2003). Ekspresja genu *c-Fos* może być także wywołana poprzez pobudzenie receptorów glutaminergicznych zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* (Kaczmarek 1993).

1.2. Organizacja chromatyny w jądrze komórkowym

Z powyższego rozdziału wynika, że wzbudzenie długotrwałego wzmocnienia synaptycznego związane jest z ekspresją genów, których produkty białkowe wpływają na morfologię i funkcjonowanie komórek, a w końcu powodują również zmiany behawioralne. Mimo tak istotnej funkcji transkryptomu w neuronach niewiele wiadomo o jego podstawach epigenetycznych.

Konkretna definicja pojęcia epigenetyki jest do dziś kontrowersyjna i niejasna (Dean i Maggert 2015). Termin ten został wprowadzony w połowie XX wieku przez Conrada Hala Waddingtona, brytyjskiego genetyka i embriologa, i początkowo skupiał się na relacjach między genotypem a fenotypem oraz mechanizmach, które je łączą (Waddington 1942a). Jednakże, sposób wyjaśniania tego zjawiska ewoluował w miarę zdobywania nowych informacji. Późniejsze badania umożliwiły rozumienie epigenetyki w kontekście badań mechanizmów dziedziczenia pozagenowego (Holliday 1994). Obecnie pojęcie epigenetyki można analizować na dwa sposoby. Z jednej strony, istnieje ciągłość w tłumaczeniu tego terminu, jako dziedzicznych zmian w ekspresji genów, które nie są związane z modyfikacjami w samej sekwencji nukleotydów (Kłosin i wsp. 2017, Bošković i Rando 2018). Z drugiej strony, istnieje tendencja do stosowania innych określeń dla dziedziczenia epigenetycznego, oddzielając słowo "epigenetyka" od warunku dziedziczenia i interpretując je w bardziej dosłowny sposób, jako szeroko pojęte zmiany dotyczące organizacji genomu. Czynniki środowiskowe mogą wpływać na sposób wykorzystania informacji zawartej w DNA na różne sposoby. Ekspresja odpowiednich genów w danym momencie zależy od organizacji DNA w przestrzeni trójwymiarowej, w tym od jego dostępności dla białek regulatorowych i czynników transkrypcyjnych (Dean i Maggert 2015).

1.2.1. Stopnie upakowania chromatyny w jądrze komórkowym

Podwójna helisa kwasu deoksyrybonukleinowego jest upakowana w ograniczonej przestrzeni jądra komórkowego w sposób nieprzypadkowy i umożliwiający poprawną ekspresję informacji zawartej w sekwencji nukleotydowej w odpowiedniej komórce i w odpowiednim czasie (Pombo i Dillon 2015, Misteli 2020). Nić DNA o grubości ok. 2 nm jest nawinięta na oktamery utworzone z dwóch kopii czterech histonowych białek rdzeniowych (H2A, H2B, H3 i H4), tworząc nukleosomy, pomiędzy którymi występuje łącznikowe DNA (Felsenfeld i Groundine 2003). Wspólnie tworzą włókno nukleosomowe o grubości 10-11 nm, czyli podstawową jednostkę upakowania chromatyny w jądrze. Dotychczas jako kolejną formę kompresji genomu wskazywano włókno solenoidowe, powstające poprzez przyłączenie histonu H1 do łącznikowego DNA i ustabilizowaniu skręconego włókna 30 nm, obecnie jednak brakuje wskazań, że taka struktura występuje *in vivo* (Maeshima i wsp. 2014). Ostatnie badania, w oparciu o tomografię mikroskopowo-elektronową nienaruszonych komórek sugerują, że chromatyna standardowo przyjmuje formę włókien o średnicy 5 do 24 nm, zarówno w chromosomach mitotycznych, jak również chromatynie interfazowej (Ou i wsp. 2017). Włókna chromatynowe mogą fałdować się w sposób nieregularny i tworzyć bardziej kompleksowe struktury nazywane pętlami lub domenami. Stopień upakowania chromatyny jest niezwykle dynamiczny i może zmieniać się w zależności od potrzeb. Najbardziej upakowaną formą chromatyny jest chromosom metafazowy, przyjmujący grubość około 1400 nm (Ou i wsp. 2017).

1.2.2. Wpływ czynników epigenetycznych na organizację chromatyny

Jak wspomniano powyżej, gotowość transkrypcyjna chromatyny zależy od stopnia jej upakowania i dostępności dla czynników transkrypcyjnych. Najważniejsze typy zmian epigenetycznych to metylacja DNA (czyli dodawanie grup metylowych do nukleotydów w DNA), wymiana wariantów histonów rdzeniowych (m.in. H3.3, H2A.W, H2A.X, H2A.Z, CENP-A), potranslacyjne modyfikacje histonów (takie jak acetylacja, metylacja, fosforylacja), czy działanie cząsteczek RNA, jak długie niekodujące RNA (ang. *Long Non-Coding RNA*, lncRNA) lub interferencja RNA (ang. *RNA Interference*, RNAi, Gallegos i wsp. 2018, Yamazaki i wsp. 2019), które mogą regulować ekspresję genów na poziomie transkrypcji czy translacji. W bieżącym rozdziale skupiono się na niektórych z tych mechanizmów, ze szczególnym uwzględnieniem roli histonów.

1.2.2.1. Metylacja DNA

Podstawowym mechanizmem odwracalnego wyciszania genów u eukariontów jest metylacja wysp CpG, czyli regionów o podwyższonej frekwencji dinukleotydów cytozyny i guaniny połączonych wiązaniem fosfodiesterowym (Bestor i wsp. 2015). Metylacja przeprowadzana jest przez enzymy z rodziny metylotransferaz i prowadzi do dodania grupy metylowej do cytozyny, co w konsekwencji uniemożliwia przyłączenie się do DNA czynnikom transkrypcyjnym i skutkuje wyciszeniem ekspresji genów. Metylacja wysp CpG może być dziedziczona, co pozwala na odtworzenie jej wzoru w komórkach potomnych. U ssaków zdecydowana większość dinukleotydów CpG jest zmetylowanych, co jest charakterystyczne dla nieaktywnej transkrypcyjnie chromatyny, nazywanej heterochromatyną (Law i Jacobsen 2010). Choć wcześniej metylację wiązano przeważnie ze zmianami długotrwałymi, to może być ona dynamicznie modyfikowana w wyniku czynników środowiskowych, takich jak stres, ekspozycja na substancje chemiczne, czy depolaryzacja błony komórkowej (Hshieh i Gage 2005, Gallegos i wsp. 2018).

1.2.2.2. Wymiana wariantów histonów

Wymiana histonów rdzeniowych na inne warianty, różniące się sekwencją aminokwasów, może zachodzić w odpowiedzi na warunki środowiskowe lub być powiązana z fazą cyklu komórkowego, a także konkretnym etapem rozwoju organizmu (Herre i Korb 2019). Jest dynamicznym procesem przeprowadzanym przez wyspecjalizowane kompleksy enzymatyczne i wpływa na strukturę chromatyny i jej dostępność dla czynników transkrypcyjnych. Dotąd zidentyfikowano wiele wariantów histonów rdzeniowych, które mogą być związane z aktywacją lub wyciszeniem chromatyny. Na przykład geny indukowane pobudzeniem są w komórkach niestymulowanych wyciszane za pomocą wstawiania na ich promotorach histonu H2A.Z przez kompleks NuRD (ang. *Nucleosome Remodeling Deacetylase*, Yang i wsp. 2016), natomiast po pobudzeniu jest on szybko odłączany, umożliwiając transkrypcję. Pokazano, że usunięcie histonu H2A.Z wzmacnia ekspresję genów *c-Fos* i *Npas4* (Gallegos i wsp. 2018). Z kolei histon H3.3 jest wstawiany przez kompleks białkowy HIRA/DAXX do chromatyny w obrębie genów odpowiedzi wczesnej w odpowiedzi na wzrost aktywności neuronów (Herre i Korb 2019).

1.2.2.3. Potranslacyjne modyfikacje histonów

Model kodu histonowego zakłada korelację odpowiednich kombinacji modyfikacji histonowych ze stanami chromatyny, aktywacją czy wyciszaniem transkrypcji lub rekrutacją białek efektorowych (Jenuwein i Allis 2001, Zhang i wsp. 2015). Na tej podstawie możemy wyróżnić trzy stany chromatyny – euchromatynę, aktywną transkrypcyjnie i bogatą w acetylację lizyny 9 lub 56 histonu H3 (H3K9ac, H3K56ac), heterochromatynę fakultatywną – wyciszoną chromatynę w danym typie komórek i oznaczoną trimetylacją lizyny 27 histonu H3 (H3K27me3) oraz heterochromatynę konstytutywną – nieaktywną transkrypcyjnie, ciasno upakowaną i niezależną od specjalizacji komórek, charakteryzującą się metylacją wysp CpG i trimetylacją lizyny 9 histonu H3 (H3K9me3, Medrano-Fernandez i Barco 2016). Markerami związanymi z heterochromatyną obydwu typów jest również dimetylacja lizyny 9 na histonie H3 (H3K9me2) lub di- oraz trimetylacja lizyny 20 na histonie H4 (H4K20me2/3). Acetylacja lub fosforylacja białek histonowych wiąże się głównie z rozluźnianiem chromatyny i jej dostępnością dla czynników transkrypcyjnych, natomiast ich metylacja powoduje przeważnie jej gęstsze upakowanie i nieaktywny stan. Jednakże istnieje wiele wyjątków od tej reguły, jak fosforylacja seryny 10 histonu H3 (H3S10p) związana z kondensacją chromosomów w prometafazie lub trimetylacja lizyny 4 histonu H3 (H3K4me3) związana z promotorami aktywnych genów (Kouzarides 2007).

Konkretne modyfikacje lub ich brak często stają się markerem specyficznych miejsc w DNA, np. ciało Barra, czyli wyciszony chromosom X w żeńskich komórkach charakteryzuje się trimetylacją lizyny 27 histonu H3 (H3K27me3), wzmacniacze (ang. *Enhancer*), czyli sekwencje nukleotydowe regulujące aktywność wybranych promotorów, charakteryzują się acetylacją lizyny 27 histonu H3 (H3K27ac, Beagan i wsp. 2020), a chromocentra, czyli gęste skupiska heterochromatyny pericentromerowej powstające np. podczas dojrzewania neuronów, nie mają markerów heterochromatyny fakultatywnej (H3K27me3, H3K9me2), co sugeruje ich brak potencjału do aktywności transkrypcyjnej (Medrano-Fernandez i Barco 2016). Wiadomo również, że odpowiednie modyfikacje histonów mogą wpływać na siebie nawzajem, potęgując swoje działania lub przyczyniając się do kolejnych modyfikacji. W komórkach postmitotycznych fosforylacja seryny 10 histonu H3 (H3S10p) ułatwia przeprowadzenie innych modyfikacji np. acetylacji, a wraz z acetylacją lizyny 14 na histonie H3 (H3K14ac) wskazuje na otwieranie się chromatyny (Crosio i wsp. 2003). Z kolei w neuronach, fosforylacja seryny 10, z równoczesną acetylacją lizyny 9 histonu H3 (H3K9acS10p) jest związana z ich odpowiedzią na pobudzenie (Oey i wsp. 2015).

Potranslacyjne modyfikacje histonów wymagają maszynerii odpowiedzialnej za ich odczytywanie, zapisywanie lub usuwanie. Obecnie dzielimy je na trzy grupy: (1) kompleksy rozpoznające modyfikacje DNA i histonów (ang. *Readers*), w tym czynniki wiążące się do określonych sekwencji DNA i rekrutujące białka efektorowe, (2) kompleksy wprowadzające modyfikacje (ang. *Writers*), w tym metylotransferazy lub acetylotransferazy, oraz (3) kompleksy usuwające modyfikacje (ang. *Erasers*), w tym demetylaza i deacetylaza (Herre i Korb 2019). W niniejszej pracy, istotną rolę odgrywa deacetylaza histonowa 1.

1.2.2.4. Rola deacetylazy histonowej 1

Deacetylazy histonowe to białka enzymatyczne, które katalizują usuwanie grup acetylowych z reszt lizynowych i mimo nazwy wpływają na wiele niehistonowych substratów jak np. czynniki transkrypcyjne i modelujące chromatynę czy podjednostki regulujące polimerazę RNA II (Penney i Tsai 2014). W odpowiedzi na inhibitory deacetylaz histonowych stwierdzono hiperacetylację ponad 1700 białek, w tym czynników transkrypcyjnych, białek uczestniczących w rearanżacji chromatyny oraz kinaz białkowych (Choudhary i wsp. 2009). Wspomniane enzymy mają również zdolność deacetylacji wolnych histonów, ale znacznie mniejszą niż znajdujących się w nukleosomach (Schmidt i Schreiber 1999). Deacetylazy są podzielone na klasy (jak przedstawiono w tab. 1) w oparciu o podobieństwo sekwencji. Klasyczna budowa deacetylaz histonowych, obejmująca klasy I, II i IV, zawiera w centrum katalitycznym dwuwartościowy jon cynku (Zn^{+2}). Natomiast klasa III to tzw. rodzina sirtuin, które do prawidłowego funkcjonowania wymagają obecności utlenionej postaci dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (ang. *Nicotinamide Adenine Dinucleotide*, NAD^+). Mechanizm działania deacetylaz histonowych polega na usuwaniu grupy acetylowej z nukleosomu. W wyniku tej reakcji przestrzeń między oktamerem histonów a DNA maleje, co zmniejsza dostępność dla czynników transkrypcyjnych. Usunięcie grupy acetylowej zachodzi poprzez reakcję przekazania ładunku, a niezbędnym elementem tego systemu jest, w przypadku deacetylaz klasycznych, obecność jonu cynku. Inhibitory deacetylaz, jak trichostatyna A (TSA), powoduje wyparcie jonu cynku, a tym samym zablokowanie funkcji katalitycznej. TSA jest najsilniejszym odwracalnym inhibitorem deacetylaz, działającym również w niskim stężeniu. Uważa się, że wszystkie deacetylazy histonowe klasy I, II i IV są wrażliwe na działanie tego inhibitora w podobnym stopniu (Seto i Yoshida 2014).

Klasa	Deacetylazy histonowe
I	HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8
IIa	HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9
IIb	HDAC6, HDAC10
III (sirtuiny)	SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7
IV	HDAC11

Tabela1. Lista znanych deacetylaz histonowych z podziałem na klasy.

Deacetylaza histonowa 1 (HDAC1) jest homologiem białka drożdżowego Rpd3p i stała się przedmiotem pierwszych badań dotyczących aktywności deacetylaz (Rundlett i wsp. 1996). U ssaków stanowi ona podstawową deacetylazę w neuronach (Lagger i wsp. 2002, Dovey i wsp. 2010). Badania wykazały, że uszkodzenie obydwu alleli białka HDAC1 prowadzi do letalności mysich embrionów z powodu defektu proliferacji komórek i zahamowania rozwoju (Dovey i wsp. 2010). Przy wyciszeniu białka HDAC1, poziomy HDAC2 i HDAC3 są podwyższone, ale nie są w stanie zrekompensować jego braku. Przez działanie enzymatyczne, białka HDAC1 i HDAC2 wpływają na kondensację chromatyny i regulują dostępność DNA dla czynników transkrypcyjnych, a w konsekwencji oddziałują na ekspresję genów (Yamada i wsp. 2005, Parker i wsp. 2007). Obydwa białka współtworzą wiele kompleksów biorących udział w rearanżacji chromatyny, jak Sin3A (ang. *SIN3 Transcription Regulator Family Member A*), NuRD, CoREST (ang. *REST Corepressor 1*) czy NODE (ang. *Nanog and Oct4 Associated Deacetylase Complex*, Yang i Seto 2008). Utrata białka HDAC1 prowadzi do hiperacetylacji części histonów H3 i H4 (Lagger 2002), a dodatkowo powoduje znaczący spadek aktywności deacetylaz w kompleksach Sin3A, NuRD, CoREST, co z kolei powoduje wzrost acetylacji histonu H3 na lizynie 56, jedyne, poznanego dotychczas, specyficznego substratu dla deacetylazy 1 (Dovey i wsp. 2010).

Wykazano, że deacetylazy histonowe pełnią ważną rolę w ekspresji genów w mózgu (Van Dyke 2014), zaś samo białko HDAC1 jest istotne w procesach neuroplastyczności, jak konsolidacja czy wygaszanie pamięci (Siddiqui i wsp. 2019).

1.2.3. Funkcjonalna organizacja chromatyny

Wiele badań wskazuje, że organizacja chromatyny w jądrze komórkowym jest bardzo dynamiczna i zależy od cyklu komórkowego, stopnia zróżnicowania komórek, a także

aktualnej transkrypcji czy naprawy DNA (Cremer i wsp. 2020). W neuronach może się ona zmieniać się pod wpływem pobudzenia i dotyczyć kompleksowej rearanżacji chromatyny (Tao-Cheng 2018) lub jej wybranych regionów, jak w przypadku ciała Barra – przesunięcia go w stronę otoczki jądrowej (Barr i Bertram 1949) albo grupowania centromerowego satelitarnego DNA w jądrach komórkowych w skrawkach mózgu szczura po pobudzeniu LTP (Billia i wsp. 1992). Wykazano również, że naruszenie organizacji przestrzennej chromatyny wiąże się z defektami transkrypcyjnymi neuronów, które mogą w następstwie zaburzać zachowanie (Ito, Magalska i wsp. 2014). Istnieje również szereg stanów patologicznych związanych z zaburzeniami w organizacji jądra oraz struktury chromatyny, jak zespół Retta lub epilepsja (Wilczyński 2014, Medrano-Fernandez i Barco 2016). Jasny jest więc związek między organizacją genomu a transkrypcją oraz funkcjonowaniem neuronów, choć dokładna maszyna molekularna stojąca za rearanżacją chromatyny wciąż pozostaje nieznana.

W ciągu ostatnich kilkunastu lat pojawiło się wiele publikacji traktujących o organizacji jądra komórkowego i przestrzennym rozlokowaniu chromatyny oraz połączeniu struktury DNA z jego funkcjonalnością. Nowoczesne metody wywodzące się z technik 3C (ang. *Chromosome Conformation Capture*) umożliwiły głębsze zrozumienie kompaktowego i równocześnie użytkowego upakowania chromatyny w jądrze komórkowym. Odkryto, że podczas interfazy chromosomy zajmują specjalne, określone przestrzenie, tzw. terytoria chromosomowe (Cremer i Cremer 2010). Jednym z modeli funkcjonalnej organizacji chromatyny jest podział na aktywne (ANC, ang. *Active Nuclear Compartments*) i nieaktywne (INC, ang. *Inactive Nuclear Compartments*) przedziały jądrowe. Transkrypcyjnie aktywna chromatyna znajduje się na obrzeżach domen chromatynowych (CD, ang. *Chromatin Domains*), podczas gdy nieaktywna chromatyna znajduje się wewnątrz nich (Cremer i wsp. 2015). Zgodnie z powyższym modelem terytoria chromosomowe składają się ze wspomnianych domen chromatynowych, poprzedzielanych kanałami tworzącymi sieć przestrzeni międzychromatynowej (IC, ang. *Interchromatin Compartment*).

Obserwuje się związek między wielkością i aktywnością chromosomu a jego lokalizacją w jądrze komórkowym. Mniejsze chromosomy przeważnie znajdują się w centrum, zaś większe – bliżej otoczki jądrowej (Sun i wsp. 2000). W rozmieszczeniu chromosomów istotna jest również liczba znajdujących się w nich genów. Najlepiej widać to na przykładzie pary zbliżonych wielkością chromosomów 18 i 19, z których pierwszy zawiera mało genów i ustawiony jest peryferyjnie, a drugi posiada wiele genów i lokalizuje się bliżej centrum jądra komórkowego (Croft i wsp. 1999). Ponadto chromosomy są ustawione w sposób radialny, co dodatkowo umożliwia odpowiednią segregację i kompartmentalizację jądra komórkowego

(Bickmore 2013), w tym tworzenie domen związanych z laminami jądrowymi (ang. *Lamin Associated Domains*, LADs, Cremer i wsp. 2020, Crosetto i Bienko 2020). Są to regiony przeważnie heterochromatynowe, położone na peryferiach jądrowych, które w różnej liczbie występują na każdym z chromosomów (Briand i Collas 2020). Laminopatie, czyli choroby często powodowane mutacjami lamin, mogą przyczynić się do utraty radialnej organizacji chromosomów (Meaburn i wsp. 2007). Wiadomo także, że całe terytoria chromosomowe mogą zmieniać swoje pozycje pod wpływem zmian fizjologicznych bądź zaburzeń chorobotwórczych (Borden i Manuelidis 1988, Martou i De Boni 2000).

W obrębie terytoriów chromosomowych możemy wyodrębnić dodatkowe jednostki strukturalne, nazywane według jednych źródeł topologicznymi domenami chromatynowymi (ang. *Topologically Associating Domains*, TADs, Dixon i wsp. 2012) lub według innych – kontaktowymi domenami chromatynowymi (ang. *Chromatin Contact Domains*, CCDs, Tang i wsp. 2015). Wszystkie źródła są zgodne, że zawierają one średnio od kilkuset do miliona par zasad i stanowią funkcjonalną jednostkę chromatyny (Dixon i współaut. 2012, Tang i wsp. 2015). W obrębie domen TAD/ CCD obserwuje się więcej interakcji międzychromatynowych zachodzących głównie pomiędzy wzmacniaczami a promotorami genów, prowadzących do formowania pętli chromatyny, niż pomiędzy nimi (Dekker i Mirny 2016). Z kolei na granicach domen zidentyfikowano miejsca utrudniające interakcje, czyli tzw. regiony izolujące (ang. *insulators*, Sexton i Cavalli 2015).

Podobnie jak pozycje większych struktur, również lokalizacja poszczególnych genów w przestrzeni jądra komórkowego nie jest przypadkowa. Przeważnie aktywne geny są położone centralnie, a wyciszone – peryferyjnie lub w pobliżu jąderka (Croft i wsp. 1999, Bickmore 2013). Często aktywacja genu powoduje jego przemieszczanie w stronę środka jądra komórkowego (Meister i wsp. 2010, Walczak i wsp. 2013), choć znanych jest wiele wyjątków od tego zjawiska (Dekker i Misteli 2015), zatem na podstawie samej lokalizacji nie można wyrokować na temat ich aktywności (Kociucka i wsp. 2012). Geny o podobnej funkcji często zbliżają się do siebie przestrzennie, na skutek wzajemnych oddziaływań (Bickmore 2013, Tang i wsp. 2015), a istnienie domen TAD/CCD może promować tworzenie się takich interakcji (Dekker i Heard 2015, Dekker i wsp. 2013).

DNA zajmuje tylko około piętnastu procent objętości jądra komórkowego (Dekker i Mistelli 2015). W kanałach międzychromatynowych występują przestrzenie zawierające kompleksy białkowe, niezbędne m.in. do procesów transkrypcji czy syntezy i składania RNA. Białka często tworzą bezbłonowe domeny zwane ciałkami jądrowymi, jak jąderko, ciałka

Cajala (ang. *Cajal Bodies*), ciała PML (ang. *Promyelocytic Leukemia Protein Bodies*) czy cętki jądrowe (ang. *Nuclear/ Splicing Speckles*), których organizacja jest bardzo dynamiczna (Misteli 2020, Grabowska, Sas-Nowosielska, Magalska i wsp. 2022,). Ciała jądrowe często znajdują się niedaleko miejsc aktywnej transkrypcji.

Aktywność transkrypcyjną w komórce organizują kondensaty transkrypcyjne – zespoły białek, tworzące się w wyniku separacji faz i mające zdolność do koncentracji biopolimerów, takich jak białka niezbędne do aktywacji ekspresji genów (w tym kompleksy mediatorowe lub białka towarzyszące polimerazie RNA, Hnisz i wsp. 2017, Peng i wsp. 2020). Kondensaty transkrypcyjne mogą wpływać na tempo transkrypcji, kontrolować dostępność DNA dla enzymów i innych czynników regulujących oraz modulować ekspresję wielu genów jednocześnie.

1.2.3.1. Tworzenie pętli DNA

Odkryto, że kluczowym mechanizmem zaangażowanym w regulację aktywności genów jest tworzenie się pętli (Rao i wsp. 2014), które zbliżają do siebie fizycznie dwa regiony DNA leżące daleko od siebie w liniowej sekwencji genomu. Pętle tworzone są przy pomocy białek kohezyn i czynnika CTCF (ang. *CCCTC-Binding Factor*), który wiąże się do specyficznego motywu DNA i tworzy dimer z drugą cząsteczką CTCF, również związaną z DNA, ale w pewnej odległości linowej (Tang i wsp. 2015). Pętle mogą powstawać, na przykład między promotorami – sekwencją DNA inicjującą transkrypcję genu i wzmacniaczami lub represorami – sekwencją zmniejszającą efektywność ekspresji danego genu (Rao i wsp. 2014, Pombo i Dillon 2015). Choć elementy regulatorowe najczęściej kontrolują pobliskie geny, mogą też dotyczyć genów oddalonych, tworząc większe pętle (Dekker i Mistelli 2015). Badania nad genomami ssaczymi wykazały, że wzmacniaczy jest znacznie więcej niż promotorów, a ekspresja genów jest regulowana przez interakcję jednego lub wielu promotorów z wieloma wzmacniaczami, np. gen *c-Fos* ma co najmniej 5 różnych wzmacniaczy, aktywowanych zależnie od drogi pobudzenia (Joo i wsp. 2015). Ponad 10% badanych pętli wokół genów odpowiedzi wczesnej, późnej oraz genów synaptycznych powstaje *de novo* po aktywacji komórek. W przypadku genów odpowiedzi wczesnej pętle były krótsze i mniejsze, zaś późnych – dłuższe i bardziej kompleksowe (Beagan i wsp. 2020). Jednak dokładny mechanizm powstawania pętli i jego dynamika pozostają niejasne.

1.2.4. Heterogenność organizacji chromatyny

Badania przeprowadzane na pojedynczych komórkach sugerują, że struktura chromatyny wykazuje się niezwykle heterogennością obejmującą nawet komórki po podziale mitotycznym (Finn i Misteli 2019, Trzaskoma i wsp. 2020). Jedną z przyczyn takiego zjawiska są dyfuzyjne ruchy chromatyny w obrębie 1 μm , niezależne od genomu lub wielkości jądra i różniące się w trakcie cyklu komórkowego (Marshall i wsp. 1997, Shaban i Seeber 2020). Takie ruchy umożliwiają zbudowanie interakcji np. między promotorem i wzmacniaczem lub do utworzenia grup współregulowanych genów, niekoniecznie w jeden możliwy sposób (Shaban i Seeber 2020). Udowodniono, że układ domen TAD/CCD i tworzenie pętli są różne w komórkach po podziale mitotycznym, ale organizacja euchromatyny, heterochromatyny, domen LAD czy aktywnych wzmacniaczy oraz promotorów pozostaje stała, co wskazuje, że mogą one wpływać na fałdowanie całego genomu (Stevens i wsp. 2017).

Również relacja chromatyny z białkami jest niezwykle dynamiczna, np. średni czas przyłączenia danego histonu rdzeniowego do chromatyny trwa kilka godzin, ale histony łącznikowe przyłączają się jedynie na kilka minut, zaś wiele białek chromatynowych, jak HP1 (ang. *Heterochromatin Protein 1*) lub HMG (ang. *High Mobility Group*) na kilka sekund (Misteli 2020). Dzięki dynamicznej strukturze chromatyna może ulegać szybkiej rearanżacji w odpowiedzi na bodźce.

W kontekście powyższego wstępu wyjątkowo ciekawym zagadnieniem wydają się być zmiany w przestrzennej strukturze chromatyny pojedynczej komórki nerwowej, zachodzące na skutek stymulacji LTP.

2. Założenia i cele pracy

Badania opisane w niniejszej rozprawie stanowią kontynuację doświadczeń prowadzonych w Pracowni Neuromorfologii Molekularnej i Systemowej w ramach pracy magisterskiej (Czechowska 2016). Uzyskane wówczas wyniki wykazały, że chromatyna stymulowanych szczurzych neuronów hipokampalnych ulegała globalnej kondensacji, co sugeruje istotną rolę rearanżacji chromatyny w plastyczności synaptycznej. Stąd głównym celem niniejszej pracy doktorskiej było wyjaśnienie molekularnego mechanizmu wywołującego te zmiany w odpowiedzi na pobudzenie neuronów.

Szczegółowymi celami badań niniejszej pracy doktorskiej były:

1. Analiza jakościowa i ilościowa zmian w przestrzennej organizacji chromatyny, zachodzących wskutek pobudzenia komórki nerwowej.
2. Weryfikacja hipotezy, mówiącej, że tempo i stopień tych zmian zależy od typu pobudzanego neuronu.
3. Sprawdzenie, czy rearanżacji chromatyny towarzyszą zmiany w potranslacyjnych modyfikacjach histonów i aktywacji genów.
4. Identyfikacja białka odpowiedzialnego za proces rearanżacji chromatyny po pobudzeniu neuronów hipokampalnych.

3. Materiały i metody

3.1. Odczynniki

3.1.1. Odczynniki do hodowli i utrwalania szczurzych neuronów

Nazwa odczynnika	Producent	Numer katalogowy
Alkohol etylowy bezwodny 99,8%	POCH	396480111
Beta-merkaptoetanol	Sigma Aldrich	M6250
Boraks	POCH	796080110
Bufor HEPES (1M)	Sigma Aldrich	H0887
Chlorek magnezu ($MgCl_2$)	Sigma Aldrich	M8266
Chlorek potasu (KCl)	POCH	739740114
Chlorek sodu (NaCl)	Bioshop	7647-14-5
Chlorek wapnia ($CaCl_2$)	POCH	874870116
Cysteina	Lab Empire S.C.	CYS555.10
Dwuwodorofosforan potasu (KH_2PO_4)	Bioshop	7778-77-0
Inhibitor trypsyny z białka jaja kurzego	Sigma Aldrich	T9253
Kwas 2-amino-5-fosfonowalerianowy (AP5)	Sigma Aldrich	A5282
Kwas azotowy 65%	POCH	BA9603115
Kwas borowy	POCH	531360115
Kwas kynureninowy	Sigma Aldrich	K3375-5G
Kwas pirogronowy	Sigma Aldrich	107360
Laminina	Roche	11243217001
Lipofektamina 3000	Thermo Scientific	L3000015
Odczynnik GlutaMAX	Life Technologies	35050061
Papaina	Cell Systems Biotechnologie Vertrieb GmbH	LS003126
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma Aldrich	P6148
Pirogronian sodu	Life Technologies	11360070
Płodowa surowica bydlęca (HI FBS)	Life Technologies	16140071
Poli-D-lizyna	Sigma Aldrich	P7886
OptiMEM	Gibco	11058021

Pożywka Neurobasal A 1x	Life Technologies	10888022
Pożywka minimalna MEM 1x	Life Technologies	51200046
Roztwór czerwieni fenolowej	Sigma Aldrich	P0290
Roztwór D-(+)-glukozy 45%	Sigma Aldrich	G8769
Roztwór MEM aminokwasów egzogennych 100x	Sigma Aldrich	M7145
Roztwór penicylina/streptomycyna	Life Technologies	15140148
Sacharoza	Thermo Scientific	15503022
Siarczan potasu (K ₂ SO ₄)	POCH	7778805
Siarczan sodu (Na ₂ SO ₄)	POCH	7757826
Suplement B-27	Life Technologies	17504044
Szalki 24-dołkowe	VWR	VWR 734-2325
Szalki 6-dołkowe	VWR	VWR 734-2323
Szkiełka nakrywkowe 13 mm	VWR	6311578
Tetrodotoxin (TTX)	Abcam	ab120054
Wodorofosforan sodu (Na ₂ HPO ₄)	POCH	799230112
Wodorotlenek sodu (NaOH)	POCH	1310732
Zestaw RNeasy Mini Kit	QIAGEN	74104

Tabela 2. Lista odczynników użytych do hodowli szczurzych neuronów hipokampalnych.

3.1.2. Odczynniki do chemicznego pobudzenia długotrwałego wzmocnienia synaptycznego

Nazwa odczynnika	Producent	Numer katalogowy	Stężenie	Czas działania
Forskolina	Sigma Aldrich	F6886	50 μM	10 minut, 30 minut, 60 minut, 2 godziny
Rolipram	Sigma Aldrich	R6520	50 μM	10 minut, 30 minut, 60 minut, 2 godziny
Pikrotoksyna	Sigma Aldrich	P1675	200 μM	10 minut, 30 minut, 60 minut, 2 godziny
DMSO (Dimetylosulfotlenek)	Sigma Aldrich	276855	35.2 μM	10 minut, 30 minut, 60 minut, 2 godziny

Tabela 3. Lista odczynników użytych do przeprowadzenia chemicznego LTP, z ostatecznymi stężeniami i czasem oddziaływania na komórki.

3.1.3. Inhibitory

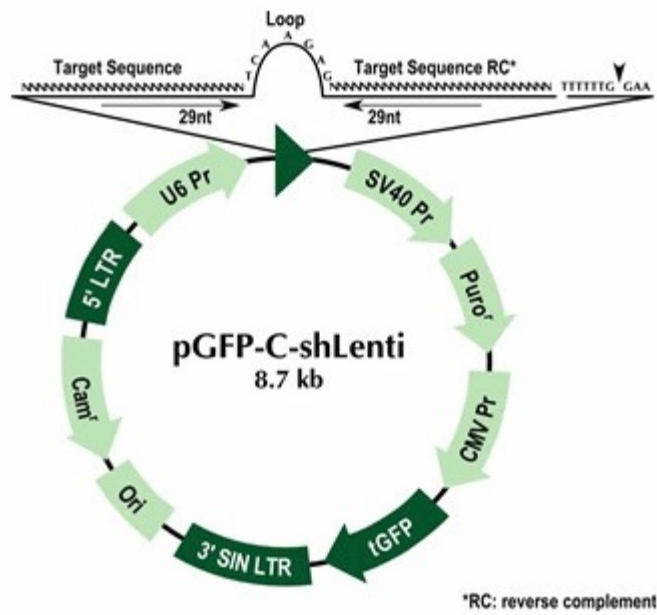
Nazwa inhibitora	Producent	Numer katalogowy	Stężenie	Czas działania
A-196	Cayman Chemical Company	18317	100 μ M	2 godziny
α -amanityna	Sigma Aldrich	A2263	10 μ g/ml	12 godzin
Aktynomycyna D	Sigma Aldrich	A9415	32 μ g/ml	1 godzina
BIX 01294	APExBIO	A1909	2 μ M	2 godziny
CI-994	Sigma Aldrich	EPI009	10 μ M	2 godziny
Cyklosporyna	Millipore	239835	100 μ M	2 godziny
DRB	Abcam	ab120939	200 μ M	1 godzina
JQ1	APExBIO	A1910	1 μ M	24 godziny
FK506	Enzo	ALX380008M001	10 μ M	2 godziny
Kwas anakardowy	APExBIO	A4488	1 μ M	24 godziny
MI-192	Cayman Chemical Company	18288	250 nM	2 godziny
Panobinostat	Sigma Aldrich	EPI009	250 nM	2 godziny
Romidepsin	Cayman Chemical Company	17130	250 nM	2 godziny
Worinostat (SAHA)	Sigma Aldrich	EPI009	10 μ M	2 godziny
Skryptaid	Sigma Aldrich	EPI009	10 μ M	2 godziny
Trichostatyna (TSA)	Sigma Aldrich	EPI009	250 nM	2 godziny

Tabela 4. Lista zastosowanych inhibitorów, z ostatecznymi stężeniami i czasem oddziaływania na komórki.

3.1.4. Plazmidy do transfekcji i transdukcji

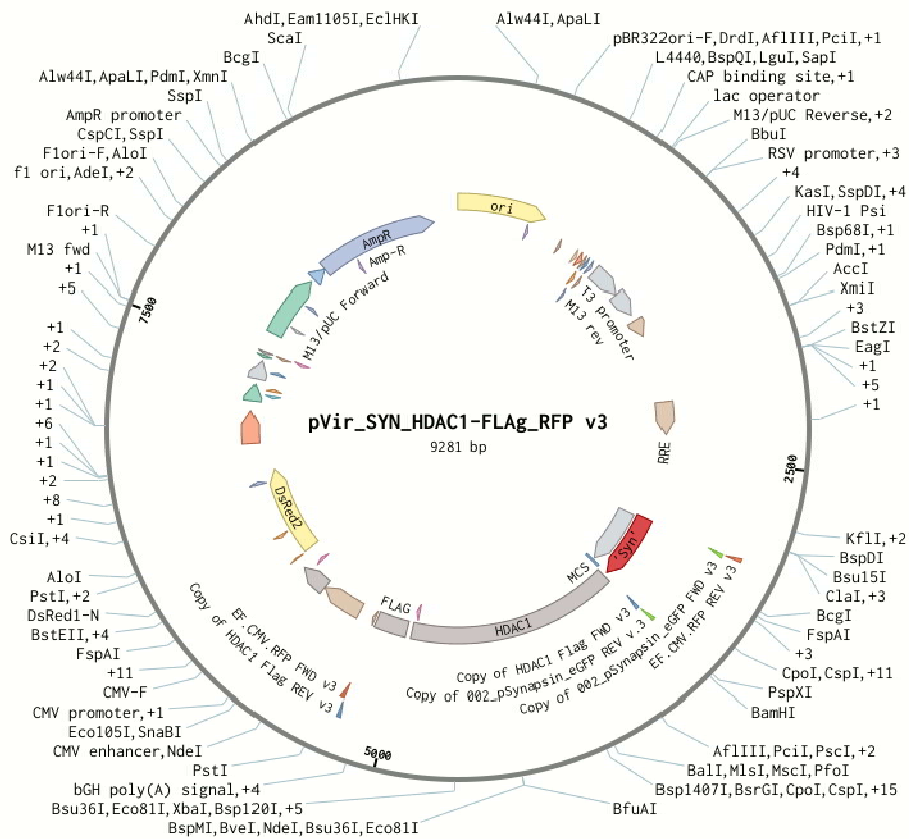
Nazwa plazmidu	Producent	Numer katalogowy
pGFP-C-shLenti_scrambled (kontrola)	Origene	TL702923
pGFP-C-shLenti_shHDAC1	Origene	TL702923
pSynHDAC1FlagRFP	dzięki uprzejmości dr Hanny Sas-Nowosielskiej	

Tabela 5. Lista zastosowanych plazmidów.



Rycina 2. Mapa plazmidu pGFP-C-shLenti. Źródło ryciny: <https://www.origene.com/>.

pVir_SYN_HDAC1-FLAG_RFP v3 (9281 bp)



Rycina 3. Mapa plazmidu pSynHDAC1FlagRFP. Projekt ryciny we współpracy z dr Hanną Sas-Nowosielską.

3.1.5. Przeciwciała pierwszorzędowe do barwień immunocytochemicznych

Przeciwciało	Zastosowane rozcieńczenie	Producent	Numer katalogowy
CaMKII	1:200 (IF)	Abcam	ab22609
c-FOS	1:1000 (IF)	Synaptic System	226004
H2Bac	1:1000 (IF), 1:1000 (WB)	dzięki uprzejmości Angela Barco	-
H3K27me3	1:200 (IF), 1:1000 (WB)	Sigma Aldrich	07-449
H3K56ac	1:1000 (IF), 1:1000 (WB)	Abcam	ab71956
H3K9ac	1:1000 (IF), 1:1000 (WB)	Abcam	ab12179
H3K9me2	1:500 (IF), 1:500 (WB)	Abcam	ab1220
H3K9me2/me3	1:100 (IF), 1:1000 (WB)	Merck Millipore	07-442
H4K20me2/me3	1:500 (IF), 1:1000 (WB)	Abcam	ab78517
H4K20me3	1:500 (IF), 1:1000 (WB)	Abcam	Ab9053
HDAC1	1:1000 (IF), 1:1000 (WB)	Abcam	ab19845
NeuN	1:1000 (IF)	Merck Millipore	ABN91
Nukleolina	1:1000 (IF)	Abcam	ab22758
PROX1	1:1000 (IF)	Abcam	ab199359

Tabela 6. Lista zastosowanych przeciwciał pierwszorzędowych w barwieniach immunofluorescencyjnych (IF) i metodzie western blot (WB).

3.1.6. Przeciwciała drugorzędowe do barwień immunocytochemicznych

Specyficzność przeciwciała	Producent	Numer katalogowy	Sprzężony fluorofor
Awidyna	Sigma Aldrich	F1269	FITC (ang. <i>Fluorescein Isothiocyanate</i>)
Kawia domowa	Jackson Immuno Research	706545148	488
Kurczak	Jackson Immuno Research	703606155	647
Królik	Jackson Immuno Research	711166152	Cy3
Mysz	Jackson Immuno Research	715165150	Cy3

Tabela 7. Lista zastosowanych przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z fluoroforami.

3.1.7. Odczynniki do barwień immunocytochemicznych

Nazwa odczynnika	Producent	Numer katalogowy
Hoechst 33342	Thermo Fischer	H3570
Medium służące do zamykania preparatów i zapobiegające wyświecaniu fluorochromów (Vectashield)	Vector Laboratories	H-1000
Odczynnik Triton X-100 (Tx100)	Sigma Aldrich	T8532
Surowica ośła (NDS)	Jackson Immuno Research	017-000-121

Tabela 8. Lista odczynników do barwień immunofluorescencyjnych, niewymienionych w poprzednich tabelach.

3.1.8. Odczynniki do fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*

Nazwa odczynnika	Producent	Numer katalogowy
Albumina surowicy bydlęcej (BSA)	Sigma Aldrich	A7030
Biotynylowana sonda na chromosom 1	Chrombios	-
Bufor 20x SSC	Invitrogen	15557044
Formamid	Merck Millipore	344206
Glicerol	POCH	443320113
Kwas solny 37% (HCl)	Fluka	258148
Klej kauczukowy (Fixogum)	Marabu	2901 17 000
Odczynnik Tween 20	Merck Millipore	655204

Tabela 9. Lista odczynników do przeprowadzenia fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*, niewymienionych w poprzednich tabelach.

3.1.9. Odczynniki do metody western blot

Nazwa odczynnika	Producent	Numer katalogowy
30% roztwór akrylamidów	Sigma Aldrich	A3699
Błękit bromofenolowy	Carl Roth	A512.1
Bufor RIPA	Sigma Aldrich	R0278
Ditiotreitol (DTT)	Sigma Aldrich	43815
Fluorek fenylometylosulfonylu (PMSF)	Sigma Aldrich	P7626
Fluorek sodu (NaF)	Sigma Aldrich	S7920
Glicyna	Lab Empire	GLN001.1
Marker białkowy do elektroforezy	Thermo Scientific	26617

Metanol	Sigma Aldrich	322415
Mieszanka inhibitorów proteaz	Roche	11697498001
Mleko w proszku	Mlekpól	-
Nadsiarczan amonu (APS)	Sigma Aldrich	A3678
N,N,N',N'-Tetrametyloetylenodiamina (TEMED)	Bio-Rad	161-0800
Odczynnik Tris	Bioshop	TRS001
Odczynnik wykrywający do metody Western blot (Amersham™ ECL™ Prime)	GE Healthcare	RPN2232
Przeciwciało antiRabbit (1:5000)	Abcam	ab205722
Przeciwciało anti-Mouse (1:5000)	Abcam	ab97040
Siarczan dodecyłu sodu (SDS)	Sigma Aldrich	436143

Tabela 10. Lista odczynników do przeprowadzenia metody western blot, niewymienionych w poprzednich tabelach.

3.1.10. Odczynniki do mikroskopii elektronowej

Nazwa odczynnika	Producent	Numer katalogowy
2,4,6-Tris(dimetyloaminometyl)fenol (DMP 30)	Sigma Aldrich	T58203
Aldehyd glutarowy	POCH	461025424
Azotan ołowiu	POCH	701040111
Cyjanożelaziany (KFeCN)	Sigma Aldrich	P3289
Dwuwodorofosforan sodu (NaH ₂ PO ₄)	POCH	799180111
Kwas asparaginowy	POCH	529230118
Miedziana siatka z pokryciem Formvar	Agar Scientific	AGS138-1
Octan uranylu	POCH	6159-44-0
Probówki BEEM	Agar Scientific	AGG362-1
Tiokarbonydrazyd	Sigma Aldrich	88535
Tlenek osmu (OsO ₄)	Agar Scientific	AGR1023
Żywica epoksydowa (Durcupan A/M)	Sigma Aldrich	44611
Żywica epoksydowa (Durcupan B)	Sigma Aldrich	44612
Żywica epoksydowa (Durcupan D)	Sigma Aldrich	44614

Tabela 11. Lista odczynników, przygotowujących próbki do mikroskopu elektronowego, niewymienionych w poprzednich tabelach.

3.2. Roztwory i bufor

3.2.1. Bufory do hodowli szczurzych neuronów i przeprowadzonych doświadczeń

Bufor/roztwór	Skład i stężenie końcowe substratów
Bufor boranowy 0,1M pH 8,5	77 mM kwas borowy 6,7 mM boraks ddH ₂ O
Bufor do pokrywania szkiełek	1mg/ml poli-D-lizyny 5 µg/ml lamininy 0,1M bufor boranowy
Niepełny bufor do dysocjacji pH 7,4	20,45 ml 1 M siarczanu sodu (Na ₂ SO ₄) 15 ml 0,5 M siarczanu potasu (K ₂ SO ₄) 1,45 ml 1 M chlorku magnezu (MgCl ₂) 0,63 ml 100 mM chlorku wapnia (CaCl ₂) 0,25 ml 1 M buforu HEPES 2 ml 45% roztworu glukozy 0,5 ml 0,5% roztworu czerwieni fenolowej 0,1 M wodorotlenek sodu (NaOH) do ustalenia pH ddH ₂ O do 250 ml filtrowanie
Bufor Ky/Mg 10x stężony pH 7,4	757 mg kwasu kynureninowego 2 ml 0,5% roztworu czerwieni fenolowej 2 ml 1 M buforu HEPES 40 ml 1 M chlorku magnezu (MgCl ₂) 1 M wodorotlenek sodu (NaOH) do ustalenia pH ddH ₂ O do 400 ml filtrowanie
Bufor do dysocjacji (DM)	1x stężony bufor Ky/Mg niepełny bufor do dysocjacji
Bufor z papainą pH 7,4	4,5 mg cysteiny 100 jednostek papainy 1 M wodorotlenek sodu (NaOH) do ustalenia pH pożywka do dysocjacji filtrowanie
Bufor z inhibitorem trypsyny pH 7,4	50 mg inhibitora trypsyny 1 M wodorotlenek sodu (NaOH) do ustalenia pH pożywka do dysocjacji filtrowanie
Pożywka MEM+	85,3 ml pożywki minimalnej MEM 1x 10 ml płodowej surowicy bydlęcej (HI FBS) 1 ml roztworu MEM aminokwasów egzogennych 1 ml roztworu Penicyliny/Streptomycyny 1 ml odczynnika GlutaMAX 1 ml pirogronianu sodu 0,7 ml 45% roztworu glukozy
Pożywka Neurobasal+	48,4 ml pożywki Neurobasal A 1x 1 ml suplementu B-27

	0,5 ml roztworu Penicylina/Streptomycyna 0,5 ml odczynnika GlutaMAX
Bufor depolaryzacyjny do pobudzania komórek mieszaną z KCl	170mM KCl 2mM CaCl ₂ 1mM MgCl ₂ 10mM HEPES ddH ₂ O
Bufor do utrwalania komórek	4% paraformaldehyd (PFA) ddH ₂ O
Pożywka do transfekcji	2% suplement B-27 1 mM kwas pirogronowy 0.5 mM odczynnik GlutaMAX 25 μM beta-merkaptotanol pożywka OptiMEM
Bufor do zbierania RNA	1% beta-merkaptotanol bufor RTL (składnik RNeasy Mini Kit)

Tabela 12. Lista i skład buforów użytych do hodowli i utrwalania szczurzych neuronów hipokampalnych.

3.2.2. Bufory do barwień immunocytochemicznych

Bufor/roztwór	Skład i stężenie końcowe substratów
Roztwór zbuforowanej soli fizjologicznej (1x PBS) pH 7,4	1,8 mM dwuwodorofosforan potasu (KH ₂ PO ₄) 10 mM wodorofosforan sodu (Na ₂ HPO ₄) 137 mM chlorek sodu (NaCl) 2,7 mM chlorek potasu (KCl) dd H ₂ O
Bufor do płukania	0,1% odczynnik Triton X-100 (Tx100) 1x PBS
Bufor do blokowania i przeciwciał	5% surowica ośła (NDS) 0,1% odczynnik Triton X-100 (Tx100) 1x PBS

Tabela 13. Lista i skład buforów użytych do barwień immunofluorescencyjnych.

3.2.3. Bufory do fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*

Bufor/Roztwór	Skład i stężenie końcowe substratów:
0,5% Tx100	0,5% odczynnik Triton X-100 (Tx100) 1x PBS
20% glicerol	20% glicerol 1x PBS
2x SSC pH 7,0	10% bufor 20x SSC ddH ₂ O
5x SSC pH 7,0	25% bufor 20x SSC ddH ₂ O
50% formamid pH 7,0	50% formamid 10% bufor 20x SSC kwas solny (HCl) do ustalenia pH
0,1x SSC pH 7,0	0,5% bufor 20x SSC ddH ₂ O

4x SSCT	20% bufor 20x SSC 0,2% odczynnik Tween 20 ddH ₂ O
Bufor do przygotowania sondy (HybMix)	50% formamid 0, 1% odczynnik Tween 20 bufor 5x SSC
Bufor blokujący	4% albumina surowicy bydlęcej (BSA) bufor 4x SSCT ddH ₂ O
Bufor dla przeciwciał	1% albumina surowicy bydlęcej (BSA) bufor 4x SSCT ddH ₂ O

Tabela 14. Lista i skład buforów użytych do przeprowadzenia fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*.

3.2.4. Bufory do metody western blot

Bufor/roztwór	Skład i stężenie końcowe substratów
Bufor lizujący	1x mieszanina inhibitorów proteaz 1μM fluorek sodu (NaF) 1mM fluorek fenylometylosulfonylu (PMSF) bufor RIPA
Bufor 1M Tris pH 6,8	121,14g odczynnika Tris 1l ddH ₂ O kwas solny (HCl) do ustalenia pH
Bufor 1,5M Tris pH 8,8	181,71g odczynnika Tris 1l ddH ₂ O kwas solny (HCl) do ustalenia pH
2x bufor Laemliego	4% siarczan dodecyłu sodu (SDS) 20% glicerol 0,125 M bufor Tris (pH 6,8) 0,004% błękit bromofenolowy 50 mM ditiotretitol (DTT) ddH ₂ O
1x bufor Laemliego	50% 2x bufor Laemliego ddH ₂ O
Bufor do płukania (TBST)	0,01% odczynnik Tween 20 1x PBS
Żel akrylamidowy (zagęszczający)	0,67 ml 30% roztworu akrylamidów 0,5 ml 1,0M buforu Tris (pH 6.8) 0,04 ml 10% siarczanu dodecyłu sodu (SDS) 0,04 ml 10% nadsiarczanu amonu 0,004 ml N,N,N',N'-Tetrametyloetylenodiamina (TEMED) 2,7 ml ddH ₂ O
Żel akrylamidowy (rozdzielający) (proporcje podane dla żelu 12%)	4 ml 30% roztworu akrylamidów 2,5 ml 1,5 M buforu Tris (pH 8.8) 0,1 ml 10% siarczanu dodecyłu sodu (SDS) 0,1 ml 10% nadsiarczanu amonu 0,004 ml N,N,N',N'-Tetrametyloetylenodiaminy

	(TEMED) 3,3 ml ddH ₂ O
Bufor do elektroforezy	30,3g odczynnika Tris 144g glicyny 10g siarczanu dodecyłu sodu (SDS) ddH ₂ O
Bufor do transferu	3,03g odczynnika Tris 14,4g glicyny 200 ml metanolu ddH ₂ O
Bufor do blokowania membrany	5% mleko w proszku bufor TBST
Bufor dla przeciwciał	1% mleko w proszku bufor TBST

Tabela 15. Lista i skład buforów użytych do przeprowadzenia metody western blot.

3.2.5. Bufory do mikroskopii elektronowej

Bufor/roztwór	Skład i stężenie końcowe substratów
Bufor do utrwalania komórek	2% paraformaldehyd (PFA) 1% aldehyd glutarowy 0,2M bufor HEPES
Bufor TCH	0.1g tiokarbohydrazyl ddH ₂ O
Bufor fosforanowy	0,1M dwuwodorofosforan monosodowy ddH ₂ O
Bufor RedOs	3% cyjanożelaziany (kFeCN) 4% tlenek osmu (OsO ₄) ddH ₂ O
4% OsO ₄	4% tlenek osmu (OsO ₄) ddH ₂ O
2% OsO ₄	2% tlenek osmu (OsO ₄) ddH ₂ O
1% octan uranylu	1% octan uranylu ddH ₂ O
Asparagininian ołowiu pH 5.5	0,040g kwasu asparaginowego 0,066g azotanu ołowiu 1M NaOH do ustalenia pH ddH ₂ O
Żywica epoksydowa	8.33 g żywicy A/M 8.33 g żywicy B 0,33g żywicy D 4 krople 2,4,6-Tris(dimetylolaminometyl)fenol (DMP 30)

Tabela 16. Lista i skład buforów, przygotowujących próbki do mikroskopii elektronowej.

3.3. Hodowla szczurzych neuronów hipokampalnych

Zwierzęta laboratoryjne zostały zakupione w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN. Hodowle szczurzych neuronów hipokampalnych były zakładane i utrzymywane zgodnie z protokołem Beaudoin i wsp. (2012) z nielicznymi zmianami, przy zastosowaniu odczynników wymienionych w tabelach 2 i 12.

3.3.1. Przygotowanie szkiełek

Szkiełka nakrywkowe 13 mm do hodowli neuronów zostały przygotowane w następujący sposób: po ułożeniu szkiełek w ceramicznych raczkach, zostały one jednorazowo przepłukane w wodzie destylowanej, a następnie zanurzone w stężonym kwasie azotowym na 48 godzin. Po tym czasie szkiełka były płukane z wytrząsaniem w wodzie destylowanej 8 razy, przy czym ostatnie płukanie odbywało się przez noc. Na koniec szkiełka były zanurzane w 96% etanolu, suszone w sterylnych warunkach i sterylizowane w piecu w 180°C przez 3 godziny.

Dzień przed planowanym założeniem hodowli, szkiełka były wkładane pojedynczo do dołków szalek 24-dołkowych, a następnie pokrywane buforem zawierającym: kwas borowy, boraks, poli-D-lizynę oraz lamininę. Inkubacja z buforem pokrywającym odbywała się w ciemności i w temperaturze pokojowej przez 12 godzin. Taka sama procedura została zastosowana w przypadku plastiku w szalkach 6-dołkowych (z wyjątkiem dodania lamininy do buforu pokrywającego). W dniu hodowli, szkiełka i plastik były płukane 3 razy sterylną wodą i pozostawione do całkowitego wyschnięcia w komorze laminarnej.

3.3.2. Warunki hodowli

Neurony hipokampalne izolowane były z mózgów nowonarodzonych szczurzych osesków rasy Wistar w dniu P0 (ang. *Postnatal Day 0*). Po humanitarnym uśmierceniu zwierząt, hipokampy były pobierane na lodzie. Uzyskana tkanka była płukana na lodzie zimnym buforem do dysocjacji (DM) 3 razy i poddawana działaniu papainy, podgrzanej wcześniej do 37°C. Po 30 minutach trawienia w 37°C, hipokampy były płukane ciepłym buforem do dysocjacji, po czym działanie enzymu zahamowywano inhibitorem trypsyny 2 razy po 3 minuty w 37°C. Nadtrawioną tkankę przenoszono do ciepłej pożywki MEM+, w której była rozbijana za pomocą wielokrotnego pipetowania. W kolejnym kroku komórki

były rozcieńczane w 20 ml pożywki MEM+ i odwirowywane przez 10 minut przy prędkości 208,5 x g w temperaturze pokojowej. Osad z komórek był zawieszany w świeżej pożywce MEM+, a komórki liczone w komorze Bürkera. Komórki były umieszczane w gęstości 75 000 na pokryte wcześniej szkiełka w szalkach 24-dołkowych lub 300 000 na szalkach 6-dołkowych. Po około 2 godzinach, po przyklejeniu się komórek do podłoża, pożywka MEM+ była zmieniana na Neurobasal+. Komórki były przechowywane w inkubatorze przy 37°C i 5% zawartości CO₂, a następnie wykorzystywane do dalszych eksperymentów. Zgodnie z publikacją Michaluk i wsp. (2011) komórki z hodowli hipokampalnej 12-ego dnia hodowli *in vitro* (ang. *Days In Vitro*, DIV12) wykazują profil ekspresji genów charakterystyczny dla dojrzałych neuronów ziarnistych, stąd wszystkie eksperymenty były przeprowadzane w DIV13 – DIV14.

3.3.3. Stymulacja komórek mieszaniną do wywoływania długotrwałego wzmocnienia synaptycznego

Długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (LTP) było wywoływane zgodnie z protokołem Szepesi i wsp. (2013) za pomocą mieszaniny zawierającej: forskolinę, rolipram i pikrotoksynę (tab. 3) w DIV13 – DIV14. Ponieważ wszystkie odczynniki były rozpuszczone w DMSO, odpowiednia objętość rozpuszczalnika stanowiła kontrolę do eksperymentów.

Komórki były inkubowane z mieszaniną indukującą chemiczny model LTP (cLTP) w odpowiednich czasach, zależnie od eksperymentu, a następnie utrwalane w 4% PFA przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Na koniec PFA było wypłukiwane trzykrotnie przez roztwór zbuforowanej soli fizjologicznej (1x PBS), a komórki były przechowywane w 4°C do późniejszego użycia.

3.3.4. Stymulacja komórek buforem depolaryzującym z użyciem cyklosporyny i FK506

W celu zablokowania potencjału czynnościowego neuronów, do pożywki hodowlanej podawano mieszaninę odczynników: TTX (inhibitor kanałów sodowych) w stężeniu 1 μM i AP5 (antagonista receptorów NMDA) w stężeniu 100 μM na 16 godzin. Po inkubacji dodawano inhibitory: cyklosporynę lub FK506 na 2 godziny, w stężeniach podanych w tabeli 4. Na koniec podawano bufor depolaryzacyjny, tak by stężenie końcowe KCl w pożywce

wynosiło 55 mM. Po kolejnych 2 godzinach neurony utrwalano zgodnie z powyższym protokołem.

3.3.5. Użycie pozostałych inhibitorów

Inhibitory były dodawane w odpowiednich stężeniach i czasach (podanych w tab. 4) przed indukcją cLTP.

3.3.6. Wyciszanie ekspresji genu *Hdac1*

Lentiwirusy zawierające plazmidy (tab. 5, ryc. 2): pGFP-C-shLenti_scrambled (niosący kontrolną sekwencję spinki RNA) lub pGFP-C-shLenti_HDAC1 (wyciszający ekspresję szczurzego genu *Hdac1* za pomocą specyficznej spinki RNA) zostały wykonane na zamówienie w Pracowni Modeli Zwierzęcych Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie. W dalszej części pracy wariant z użyciem plazmidu kontrolnego będzie nazywany skrótowo scr (ang. *Scrambled*), a wyciszającego – shHDAC1.

Wirusy były podawane do pożywki hodowlanej w DIV3, w liczbie odpowiadającej 100 cząsteczkom wirusa na jedną komórkę badaną. W DIV13 – DIV14 hodowle były wykorzystywane do dalszych eksperymentów.

3.3.7. Przywrócenie funkcji białka HDAC1

Dzień po transdukcji hodowle były transfekowane zgodnie z protokołem od producenta za pomocą lipofektaminy 3000. Użyto plazmidu pSynHDAC1FlagRFP (ryc. 3) zawierającego sekwencję ludzkiego białka HDAC1, niewrażliwego na zastosowaną do wyciszenia spinkę RNA. W pożywce do transfekcji rozpuszczano osobno lipofektaminę i wybrane DNA (w stężeniu 500 µg na 75 000 komórek). Następnie łączono obie mieszaniny i inkubowano razem przez 5 minut, w celu utworzenia kompleksów lipofektaminy z DNA. Po tym czasie mieszaninę podawano w pojedynczych kroplach do pożywki hodowlanej. Szalki umieszczano w inkubatorze (37°C, 5% CO₂). Po 45 minutach zmieniano pożywkę z lipofektaminą na kondycjonowaną pożywkę hodowlaną (Neurobasal+).

3.4. Izolacja i sekwencjonowanie RNA

RNA zostało wyizolowane z komórek za pomocą zestawu RNeasy Mini Kit zgodnie z instrukcją od producenta, obejmując opcjonalny wariant podania DNAzy. Komórki do izolacji RNA zostały zebrane w następujący sposób: dołki szalki 6-dołkowej zostały wypłukane buforem 1x PBS, a następnie zalane roztworem RTL z beta-merkaptanołem i zdrapane na lodzie. Cała mieszanina była zbierana do probówek po trzy dołki na badany wariant cLTP lub DMSO. Elucja związanego z kolumną do izolacji RNA odbywała się w 30 μ l wody. Stężenie i czystość uzyskanego RNA zostało zmierzone za pomocą urządzenia NanoDrop One (Thermo Scientific).

Sekwencjonowanie RNA (metoda RNAseq) zostało wykonane i przeanalizowane przez dr. hab. Bartosza Wojtasa i dr. Bartłomieja Gielniewskiego w Pracowni Sekwencjonowania Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie. Biblioteki RNAseq zostały przygotowane za pomocą zestawu KAPA Stranded mRNA Sample Preparation Kit (Kapa Biosystems, KK8420), zgodnie z zaleceniami od producenta i modyfikacjami zawartymi w pracy Rajan i wsp. (Rajan i wsp. 2020). Analiza danych transkryptomicznych została przeprowadzona w następujący sposób: pliki fastq zostały zmapowane na referencyjny genom szczura m6 przy użyciu programu STAR (Dobin i wsp. 2013), odczyty zostały zliczone dla genów przy użyciu algorytmu feature Counts (Liao i wsp. 2014). Liczby genów zostały znormalizowane metodą FPKM, a analiza różnicowa została przeprowadzona za pomocą DESeq2 (Love i wsp. 2014). Różnice w ekspresji genów zostały uznane przy skorygowanej wartości $p < 0,05$. Analiza szlaków KEGG dla genów, których różnica w ekspresji była istotna statystycznie, została wykonana w R przy użyciu pakietu clusterProfiler (Yu i wsp. 2012).

3.5. Western blot

Metoda western blot została przeprowadzona zgodnie z poniższym protokołem i odczynnikami wymienionymi w tabelach 10 i 15. Metodę western blot wykonano we współpracy z dr Hanną Sas-Nowosielską.

3.5.1. Zbieranie komórek i przygotowanie lizatów białkowych

Komórki do izolacji białek zostały zebrane z hodowli neuronów po przeprowadzeniu stosownych eksperymentów. Dołki szalek 6-dołkowych zostały wypłukane zimnym buforem 1x PBS i inkubowane z buforem lizującym przez 30 minut na lodzie. Następnie komórki zostały zdrapane w buforze do lizy, przeniesione do probówek i rozbite za pomocą cienkiej igły (0,5 mm średnicy). Mieszanina była odwirowana przy prędkości 16 000 g przez 20 minut, w temperaturze 4°C. Stężenie białka w nadsączy zostało oznaczone za pomocą urządzenia NanoDrop One (Thermo Scientific). Po dodaniu 2x stężonego buforu Laemliego, próbki zostały podgrzane przez 5 minut w 95°C i schowane do -20°C, w celu późniejszego wykorzystania.

3.5.2. Rozdział i detekcja białek

Próbki zawierające 15 µg białka wyizolowanego z neuronów hipokampalnych oraz marker białkowy uwidoczniający białka o znanym ciężarze zostały nałożone na żel poliakrylamidowy o procentowości 12 – 15% (zależnie od wielkości białka). Elektroforeza odbywała się przy potencjale 90 V dla żelu zagęszczającego i 110 V dla żelu rozdzielającego w dedykowanym buforze. Następnie białka były przenoszone na membranę w buforze do transferu i warunkach 100 V przez 1 godzinę w temperaturze 4°C. Kolejnym krokiem było zablokowanie białek na membranie za pomocą 5% odtłuszczonego mleka rozpuszczonego w buforze TBST przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. W celu zastosowania immunodetekcji, najpierw podano przeciwciała pierwszorzędowe rozpuszczone w 1% mleku w TBST (4°C, przez noc), następnie membranę płukano 3 x 5 minut buforem TBST i naniesiono odpowiednie przeciwciała drugorzędowe w rozcieńczeniu 1:5000 (temperatura pokojowa, 1 godzina). Po tym czasie membrany były płukane buforem TBST 5 x 10 minut, a następnie wizualizowane za pomocą odczynnika Amersham ECL Prime w urządzeniu G-Box (firmy Syngen). Analizę densytometryczną prążków wykonano za pomocą programu ImageJ.

3.6. Barwienie immunocytochemiczne

Barwienia immunofluorsecencyjne były robione zgodnie z ogólnym protokołem Michaluk i wsp. (2011) z drobnymi odstępstwami i odczynnikami wymienionymi w tabelach

8 i 13. Utrwalone za pomocą PFA neurony były permabilizowane w buforze do płukania przez 3 x 5 minut. Następnie preparaty blokowano w 5% NDS w 0,1% Tx100 w PBS przez 1 godzinę. Po tym czasie neurony inkubowano z przeciwciałem pierwszorzędowym (tab. 6) rozpuszczonym w roztworze do blokowania przez kolejną godzinę. Preparaty płukano 3 x 5 minut w roztworze PBS z 0,1% Tx100 i inkubowano kolejną godzinę z przeciwciałem drugorzędowym, skoniugowanym z odpowiednim fluoroforem (tab. 7). Po tym czasie próbki płukano 5 x 5 minut w roztworze PBS z 0,1% Tx100 i barwiono DNA za pomocą Hoechst rozpuszczonym w PBS z 0,1% Tx100 w proporcji 1:1000. Preparaty znów płukano 3 x 5 minut. Na koniec próbki były zamykane na szkiełku podstawowym w odczynniku Vectashield. Całą procedurę przeprowadzano w temperaturze pokojowej. Otrzymane w ten sposób preparaty były przechowywane w -20°C do analiz mikroskopowych.

3.7. Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*

Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH) z sondą malującą na chromosom 1 została wykonana zgodnie z protokołem z publikacji Cremer i wsp. (2008), z pewnymi modyfikacjami i odczynnikami wymienionymi w tabelach 9 i 14. Po utrwaleniu komórki zostały wypłukane roztworem PBS z 0,5% Tx100 w celu permabilizacji błony. Następnie były inkubowane w 20% glicerolu przez godzinę w temperaturze pokojowej. Po tym czasie szkiełka były zanurzane na kilka sekund w ciekłym azocie 4 razy, po każdym zamrożeniu szkiełka były zalewane na kilka sekund 20% glicerolem, aby uniknąć ich pęknięć. W kolejnym kroku szkiełka płukano roztworem PBS z 0,5% Tx100, a następnie inkubowano w 0,1 M kwasie solnym przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Potem preparaty były płukane buforem 2 x SSC przez 5 minut w 37°C i inkubowane 20 minut w temperaturze pokojowej w 50% formamidzie, podgrzanym uprzednio do 37°C i tak pozostawione w 4°C na kolejne 12 godzin. Następnego dnia biotynylowana sonda na chromosom 1 (uzyskana na zamówienie z firmy ChromBios) została rozpuszczona w stosunku 1:4 w roztworze Hybmix i inkubowana 15 minut w 37°C z wytrząsaniem 250 rpm. Denaturacja próbki następowała w 85°C przez 7 minut, a następnie sonda nakładana była na szkiełka i zamykana za pomocą kleju kauczukowego. Hybrydyzacja próbki z sondą odbywała się w uprzednio przygotowanej komorze, wyłożonej nasączonym w buforze 2 x SSC papierem ręcznikowym i trwała 48 godzin w 37°C. Po tym czasie, niespecyficzne wiązania były usuwane przez serię płukań – najpierw w buforze 2 x SSC z 50% formamidem w 37°C, następnie w buforze 0,1 x SSC w 60°C i w końcu w buforze 4 x SSC z 0,2% Tweenem w temperaturze pokojowej.

Dodatkowo, na preparatach przeprowadzono barwienie immunocytochemiczne, zgodnie z procedurą opisaną w poprzednim podrozdziale (zastąpiono jedynie bufor do blokowania na 4% BSA w 4 x SSC z 0,2% odczynnikiem Tween, i roztwór dla przeciwciał na 1% BSA w 4 x SSC z 0,2% odczynnikiem Tween). Próbkki były uwidaczniane dzięki użyciu awidyny sprzężonej z fluoroforem FITC w stężeniu 1:1000. Sygnał był dodatkowo wzmacniany za pomocą przeciwciała anty-awidyna z fluoroforem 488. Na końcu wybarwiono DNA odczynnikiem Hoechst przez 10 minut inkubacji w temperaturze pokojowej. Na koniec preparaty zostały zamknięte w odczynniku Vectashield i obrazowane w mikroskopie konfokalnym ZEISS LSM 780.

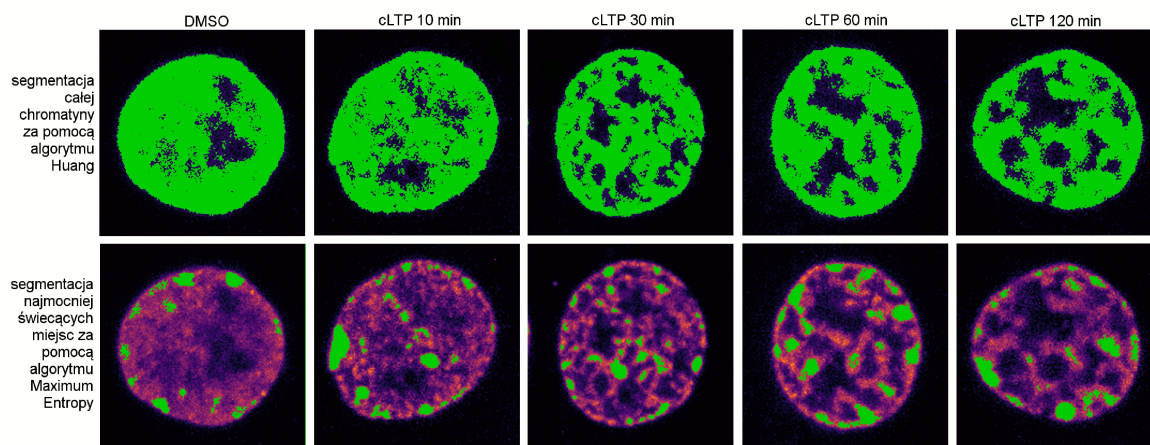
3.8. Mikroskopia konfokalna

Obrazy zostały uzyskane za pomocą mikroskopu ZEISS LSM780 i ZEISS LSM800 w Pracowni Obrazowania Struktury i Funkcji Tkankowych Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie. Zdjęcia były zbierane przy obiektywie immersyjnym 63x NA 1.4 i wielkości pikseli 70 nm w osiach x-y i 210 nm w osi z. Fluorescencja fluoroforów była wzbudzana odpowiednimi laserami: diodowymi 405 nm lub 561 nm, argonowym 488 nm i helowo-neonowym 633 nm. Obrazy były uzyskiwane w programie Zen. W celu ustandaryzowania danych, każdy obraz został znormalizowany przez odniesienie do wzorcowych kulek pomiarowych o średnicy 0,5 μm .

3.8.1. Analiza ilościowa obrazów uzyskanych z mikroskopu konfokalnego

Analizę ilościową obrazów uzyskanych z mikroskopu konfokalnego przeprowadzono dzięki zastosowaniu innowacyjnego oprogramowania Partseg (Bokota i wsp. 2020). Jądra neuronów były segmentowane w trójwymiarze, w oparciu o wartości graniczne, ustalone ręcznie na podstawie całkowitego sygnału pochodzącego z barwienia DNA. W tym celu wybrane zostały jedynie komórki wykazujące ekspresję genów kodujących markery neuronalne: PROX1, CaMKII lub NeuN. Chromatyna w całości została wysegmentowana w tym samym programie za pomocą automatycznego algorytmu Huang (Huang i Wang 1995), charakteryzującego się minimalizacją miary rozmycia obrazu i jednocześnie na tej podstawie definiującego zakres rozmyty w celu identyfikacji odpowiedniej wartości progowej. W celu wysegmentowania chromocentrow i najmocniej świecących miejsc zastosowany został algorytm Maximum Entropy, znajdujący najjaśniejsze piksele (Kapur i in. 1985). Terytoria

chromosomów zostały wysegmentowane za pomocą algorytmu Multiscale Opening, który rozdziela dwa połączone obiekty rozmyte o różnych właściwościach intensywności świecenia (Saha i in. 2016). Na rycinie 4 przedstawiono przykładową segmentację chromatyny, wykonaną za pomocą programu Partseg (ryc. 4).



Rycina 4. Przykładowa segmentacja chromatyny uzyskana za pomocą programu Partseg. Na górnym panelu przedstawiono segmentację za pomocą algorytmu Huang dla całkowitej chromatyny, na dolnym – algorytmu Maximum Entropy dla najmniej skondensowanych miejsc chromatyny. W kolumnach zaprezentowano wybrane punkty czasowe eksperymentu po pobudzeniu (cLTP) i komórek kontrolnych (DMSO). Na fioletowo zaznaczono DNA wyznakowane barwnikiem Hoechst, na zielono – automatyczną segmentacją za pomocą programu.

3.9. Mikroskopia elektronowa

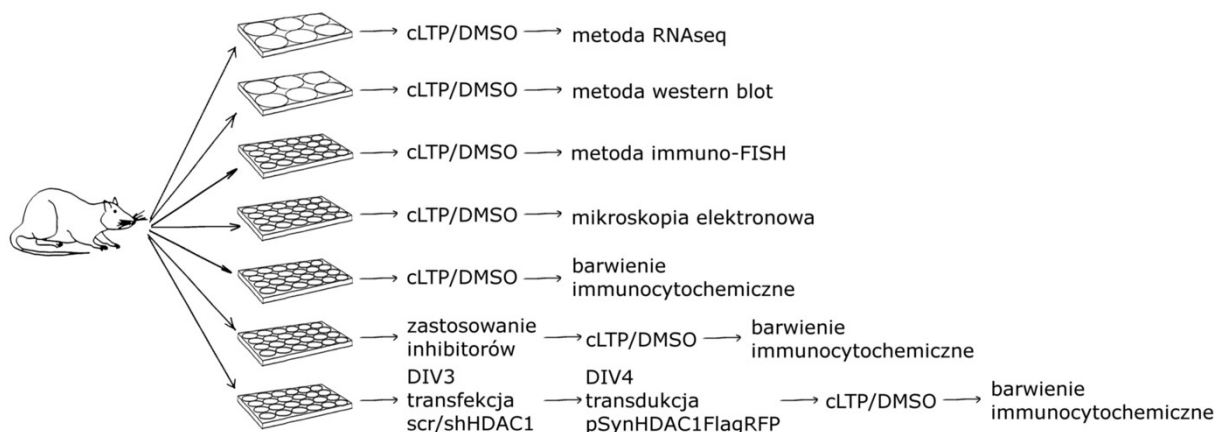
Cała procedura mikroskopii elektronowej została wykonana przez Małgorzatę Śliwińską. Próbkę służącą uzyskaniu preparatów do mikroskopu elektronowego zostały przygotowane zgodnie z protokołem Deerinck i wsp. (2010), z drobnymi zmianami opisanymi poniżej i odczynnikami wymienionymi w tabelach 11 i 16. Hodowle utrwalano przez 5 minut w 2% PFA z 1% glutaraldehydem w 0,2 molarnym buforze HEPES, po czym płukano 6 x 5 minut w PBS. Następnie zmieniono roztwór na zimny bufor fosforanowy i ponownie płukano 3 x 5 minut. Dotrwalenie komórek zostało uzyskane dzięki zastosowaniu roztworu 1,5% żelazocyjanku potasu z 1% uwodnionym tlenkiem osmu przez 30 minut na lodzie, po czym preparaty wypłukano wodą 5 x 3 minuty. W kolejnym kroku komórki zanurzano w buforze TCH na 20 minut w temperaturze pokojowej i ponownie płukano 5 x 3 minuty w wodzie. Drugie dotrwalenie komórek odbywało się w 2% tlenku osmu przez 20 minut w temperaturze pokojowej, po którym następowało płukanie 5 x 3 minut w wodzie w temperaturze pokojowej. Po tym czasie próbki umieszczono w 1% octanie uranylu na 12 godzin. Następnego dnia próbki wypłukano 5 x 3 minuty w wodzie i wystawiono na działanie 0,66% asparagianu ołowiu przez 30 minut w 60°C. Wypłukano 5 x 3 minuty w wodzie i zastosowano szereg

rozcieńczeń etanolu po 5 minut w celu odwodnienia próbek (20%, 50%, 70%, 90%, 100%, 100%) w temperaturze pokojowej. Na koniec próbki w specjalnych probówkach BEEM zalano 50% żywicą w 50% etanolu na 30 minut, potem 100% żywicą na godzinę, 100% żywicą na 12 godzin i ponownie 100% świeżą żywicą na godzinę. Po tym czasie próbki były osadzone na specjalnych miedzianych siatkach i umieszczone w piecu o temperaturze 65-70°C na co najmniej 48 godzin. Na koniec bloki żywicy zostały przycięte za pomocą ultramikrotomu (ultracut R, Leica) na ultracienkie skrawki o grubości 65 nm.

3.9.1. Obrazowanie w mikroskopie elektronowym transmisyjnym

Obrazy z mikroskopu elektronowego zostały uzyskane dzięki transmisyjnemu mikroskopowi elektronowemu JEM 1400 (JEOL), wyposażonemu w kamerę 11 Megapixel TEM Morada G2 (EMSIS GmbH) w Pracowni Mikroskopii Elektronowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie.

Podsumowanie wszystkich wykonanych eksperymentów laboratoryjnych przedstawiono na rycinie 5 (ryc. 5).



Rycina 5. Schemat eksperymentów przeprowadzonych w niniejszej pracy doktorskiej. Komórki pobrane ze szczurzych hipokampów były umieszczane na szalkach 6-dołkowych lub 24-dołkowych, a następnie wykorzystane do badań w czternastym dniu hodowli *in vitro* (z wyjątkiem transfekcji i transdukcji).

3.10. Testy statystyczne

Wszystkie analizy ilościowe obrazów z mikroskopu konfokalnego zostały oparte na trzech niezależnych eksperymentach. Najpierw wykonano testy Kołmogorowa-Smirnowa oraz Shapiro-Wilka w celu sprawdzenia, czy wyniki odpowiadają rozkładowi normalnemu. Ze względu na brak spełnienia warunków normalności rozkładu, zastosowano nieparametryczny test Kruskala-Wallisa. Aby sprawdzić, pomiędzy którymi grupami różnice są istotne statystycznie, przeprowadzono testy post hoc Dunna. Gwiazdki były nadawane przy odpowiedniej istotności statystycznej (p): jedna gwiazdka dla wartości $p < 0.05$, dwie gwiazdki przy $p < 0.01$ i trzy gwiazdki przy $p < 0.001$. Oznaczenie „ns” wskazuje na różnice nieistotne statystycznie. Słupki błędów przedstawiają standardowy błąd średniej (SEM, wg wzoru: SD/\sqrt{n} , gdzie SD oznacza odchylenie standardowe, a n – liczebność próbki). Wszystkie obliczenia zostały wykonane za pomocą programu GraphPad Prism (numer seryjny: GPS-1975744-TLR4-E2FD8).

W celu porównania intensywności sygnału pochodzącego z detekcji metody western blot zastosowano test t -Studenta dla par niezależnych.

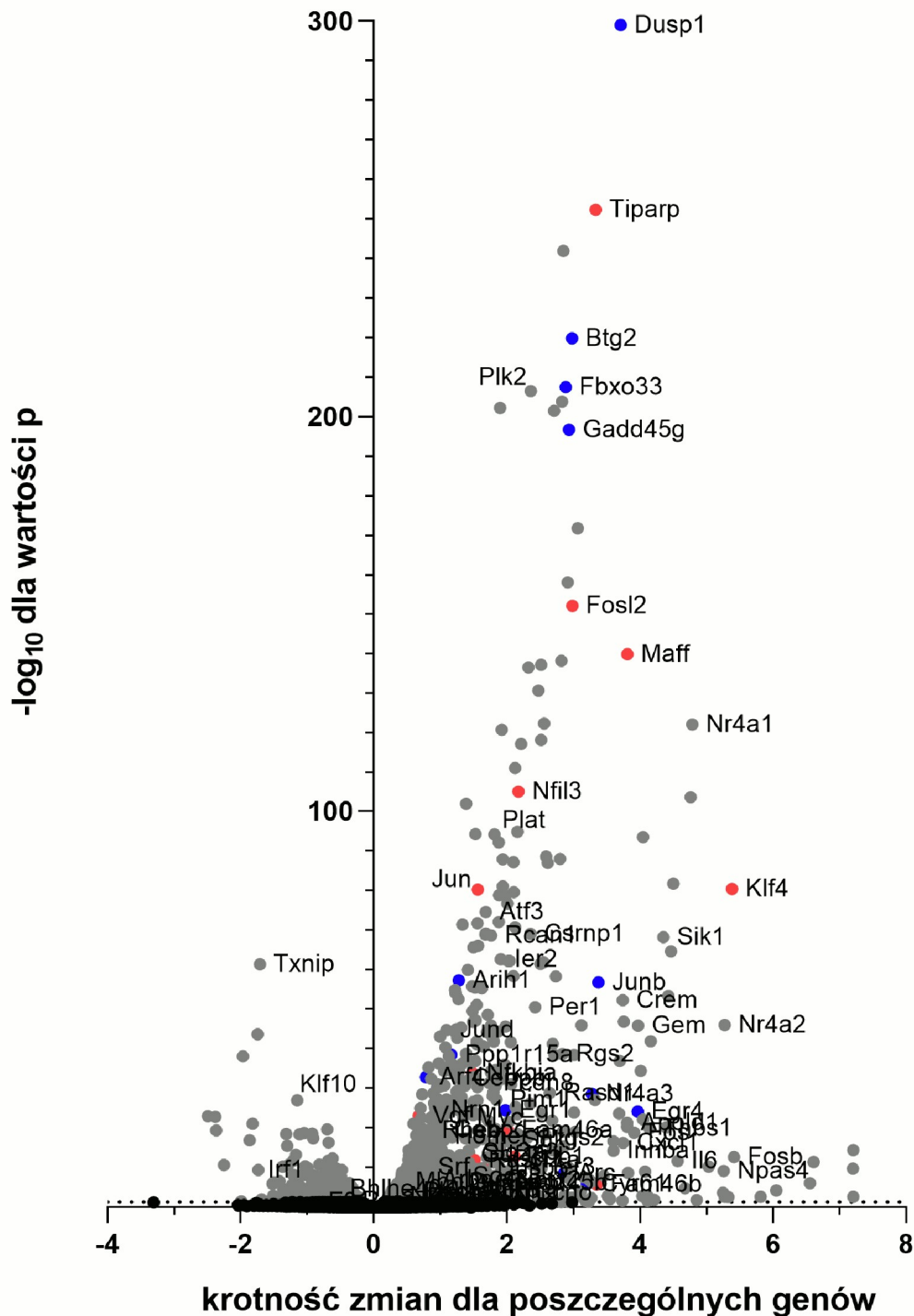
4. Wyniki

W celu wyjaśnienia molekularnego mechanizmu wywołującego zmiany zachodzące w architekturze chromatyny w neuronach w odpowiedzi na pobudzenie, zastosowano model chemicznej indukcji LTP, wykorzystując mieszaninę forskoliny, rolipramu i pikrotoksyny. Forskolina bezpośrednio stymuluje cyklazę adenylową, przez co zwiększa się endogenny poziom cAMP w komórce, rolipram zaś wspiera to działanie poprzez zahamowanie fosfodiesterazy-4 (ang. *Phosphodiesterase 4*, PDE4), która w fizjologicznych warunkach rozkłada cAMP (Otmakhov i wsp. 2004). Pikrotoksyna natomiast blokuje receptory neurotransmitera hamującego GABA, uniemożliwiając napływ jonów chlorkowych do komórki i wyciszenie sygnału. Jak wspomniano we Wstępie, wysoki poziom cAMP indukuje szereg molekularnych szlaków, w tym aktywację kinazy A i kinaz MAP oraz ekspresję genów odpowiedzi wczesnej.

4.1. Rearanżacji chromatyny towarzyszą zmiany w aktywności transkrypcyjnej genów

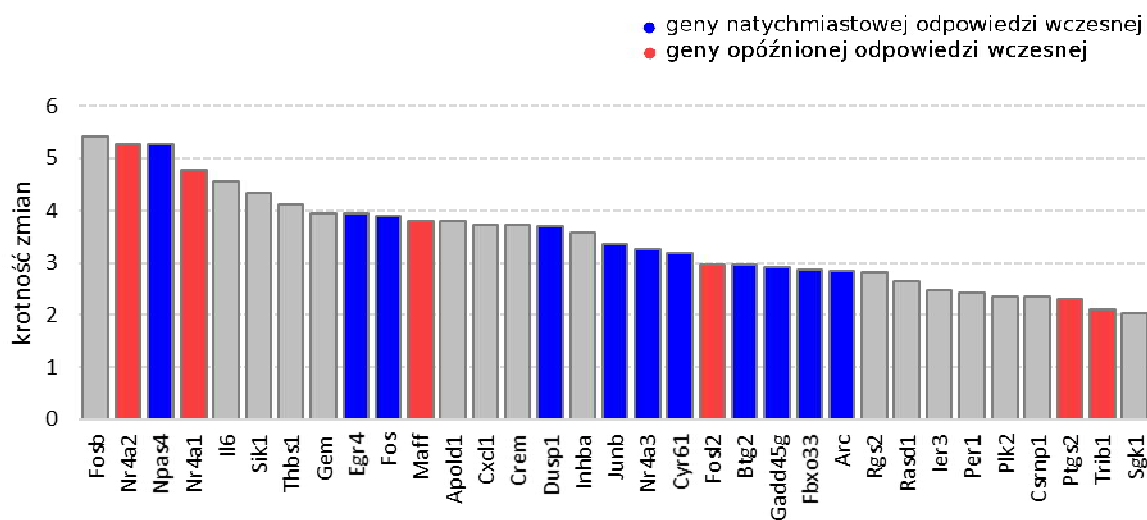
Wiadomym jest, że po indukcji LTP w neuronach następuje transkrypcja genów kluczowych dla ich funkcjonalności (Kaczmarek 2018, Yap i Greenberg 2018, Benito i Barco 2014). Przeprowadzone badanie wysokowydajnego sekwencjonowania mRNA (RNA-Seq) na naszym modelu wykazało wzrost ekspresji 708 genów i zmniejszenie ekspresji 223 genów w neuronach stymulowanych w porównaniu do komórek kontrolnych (wyk. 1). Największe różnice w ekspresji zanotowano dla genów *Fosb*, *Nr4a2* i *Npas4* (ponad pięciokrotny wzrost ekspresji), kodujących białka związane z aktywnością neuronalną i procesami pamięciowymi (wyk. 2). Z drugiej strony wyniki wykazały prawie dwukrotny spadek w ekspresji genów *Irf1* lub *Txnip*, które kodują białka zaangażowane w regulację odpowiedzi immunologicznej, czy równowagę redoks (wyk. 3).

- geny natychmiastowej odpowiedzi wczesnej
- geny opóźnionej odpowiedzi wczesnej



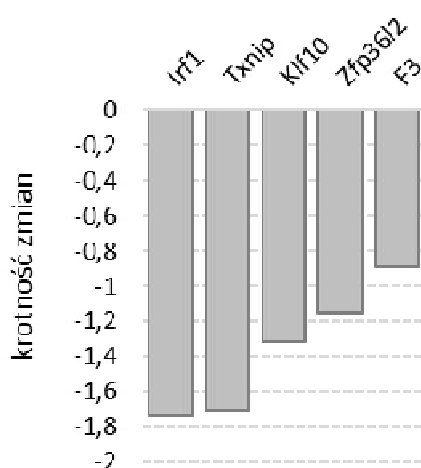
Wykres 1. Analiza zmian ilościowych dla wybranych genów natychmiastowej (przedstawione na niebiesko) lub opóźnionej (przedstawione na czerwono) odpowiedzi wczesnej, których ekspresja wzrastała lub malała po indukcji LTP w porównaniu do kontroli DMSO. Na kolorowo przedstawiono geny zaprezentowane w publikacji Saha i wsp. 2011, na szaro – wybrane geny nieujęte we wspomnianej publikacji. Analiza została oparta na wynikach z wysokowydajnego sekwencjonowania mRNA z 3 niezależnych eksperymentów. Każda kropka reprezentuje inny gen. Na osi x zaznaczono wartości funkcji logarytmicznej o podstawie 2 z krotności zmian w ekspresji genów. Na osi y przedstawiono wartości funkcji logarytmicznej o podstawie 10 z modyfikowanej wartości istotności statystycznej (p). Stąd geny, osiągające wartości najbardziej istotne znajdują się najwyżej, a geny ulegające najwyższym zmianom są najbardziej oddalone od wartości 0 na osi x.

Wybrane geny odpowiedzi wczesnej, których ekspresja najbardziej wzrasta po pobudzeniu cLTP

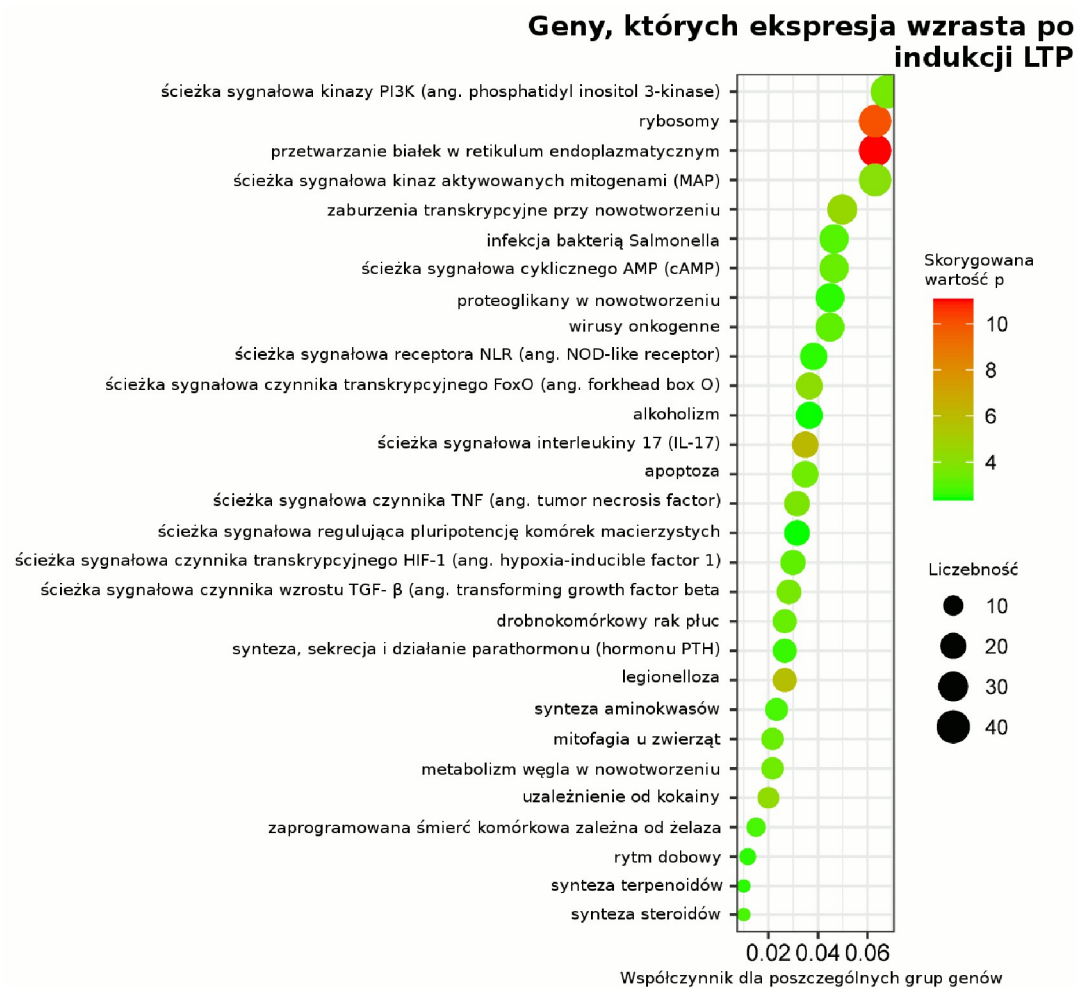


Wykres 2. Analiza zmian ilościowych dla wybranych genów natychmiastowej (przedstawione na niebiesko) lub opóźnionej (przedstawione na czerwono) odpowiedzi wczesnej, których ekspresja wzrastała po indukcji LTP w porównaniu do kontroli DMSO. Na kolorowo przedstawiono geny zaprezentowane w publikacji Saha i wsp. 2011, na szaro – geny nieujęte we wspomnianej publikacji. Analiza została oparta na wynikach z wysokowydajnego sekwencjonowania mRNA z 3 niezależnych eksperymentów. Na osi x podpisano odpowiednie geny. Oś y prezentuje wartości funkcji logarytmicznej o podstawie 2, oznaczającej krotność zmian w ekspresji genów.

Wybrane geny odpowiedzi wczesnej, których ekspresja najbardziej maleje po pobudzeniu cLTP

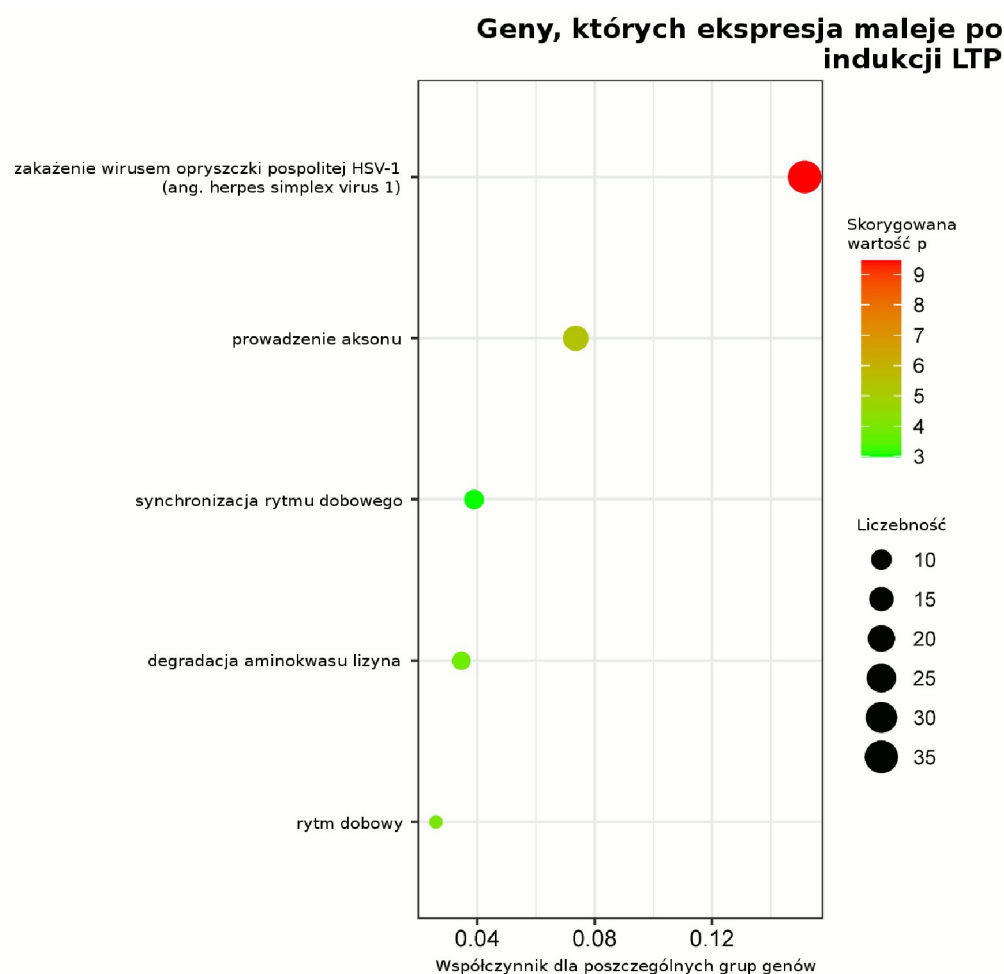


Wykres 3. Analiza zmian ilościowych dla wybranych genów odpowiedzi wczesnej, których ekspresja malała po indukcji LTP w porównaniu do kontroli DMSO. Analiza została oparta na wynikach z wysokowydajnego sekwencjonowania mRNA z 3 niezależnych eksperymentów. Na osi x podpisano odpowiednie geny. Oś y prezentuje wartości funkcji logarytmicznej o podstawie 2, oznaczającej krotność zmian w ekspresji genów.



Rycina 6. Porównanie różnych grup funkcjonalnych genów, których ekspresja wzrastała po indukcji LTP w porównaniu do kontroli DMSO. Badanie zostało oparte na wynikach z wysokowydajnego sekwencjonowania mRNA z 3 niezależnych eksperymentów oraz analizie ontologicznej genów (ang. *Gene Ontology*, GO). Każda kropka reprezentuje inną grupę genów, podzielonych ze względu na udział w danym szlaku biochemicznym. Wielkość kropki odpowiada liczbie genów, należącej do danej grupy, a jej kolor – odpowiedniej skorygowanej wartości istotności statystycznej p. Na osi x zaznaczono uzyskane z analizy współczynniki, bazujące na liczbie zidentyfikowanych genów oraz liczbie genów, należących do danej grupy funkcjonalnej. Oś y prezentuje podpisy poszczególnych grup funkcjonalnych.

Dalsza analiza w oparciu o uzyskane dane, literaturę (Saha i wsp. 2011, Okuno 2011) oraz dostępną bazę KEGG (ang. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) wykazała wzrost ekspresji większej liczby genów kluczowych dla uczenia się, pamięci i innych funkcji poznawczych, jak np. ścieżki sygnałowe kinaz PI3K/AKT lub cAMP (ryc. 6). Natomiast geny, których ekspresja spadała były zaangażowane m.in. w kierowanie aksonami, rytm dobowy, czy utrzymanie populacji komórek macierzystych i regulację metabolizmu komórek (ryc. 7).



Rycina 7. Porównanie różnych grup funkcjonalnych genów, których ekspresja malała po indukcji LTP w porównaniu do kontroli DMSO. Badanie zostało oparte na wynikach z wysokowydajnego sekwencjonowania mRNA z 3 niezależnych eksperymentów oraz analizie ontologicznej genów (GO). Każda kropka reprezentuje inną grupę genów, podzielonych ze względu na udział w danym szlaku biochemicznym. Wielkość kropki odpowiada liczbie genów, należącej do danej grupy, a jej kolor – odpowiedniej skorygowanej wartości istotności statystycznej p. Na osi x zaznaczono uzyskane z analizy współczynniki, bazujące na liczbie zidentyfikowanych genów oraz liczbie genów, należących do danej grupy funkcjonalnej. Oś y prezentuje podpisy poszczególnych grup funkcjonalnych.

4.2. Na skutek indukcji LTP chromatyna ulega rearanzacji

Dostępne w literaturze dane wskazują, że w hipokampalnej hodowli komórkowej występuje wiele typów neuronów różniących się funkcją w przebiegu LTP. Żeby sprawdzić, czy różne typy neuronów są tak samo podatne na zmiany strukturalne chromatyny po pobudzeniu, wykonano barwienia immunofluorescencyjne pozwalające na rozróżnienie komórek ziarnistych, wykazujących ekspresję genów kodujących markery PROX1 i CaMKII oraz komórek piramidowych, wykazujących tylko ekspresję genu kodującego białko CaMKII (Williams i wsp. 2011, Iwano i wsp. 2012).

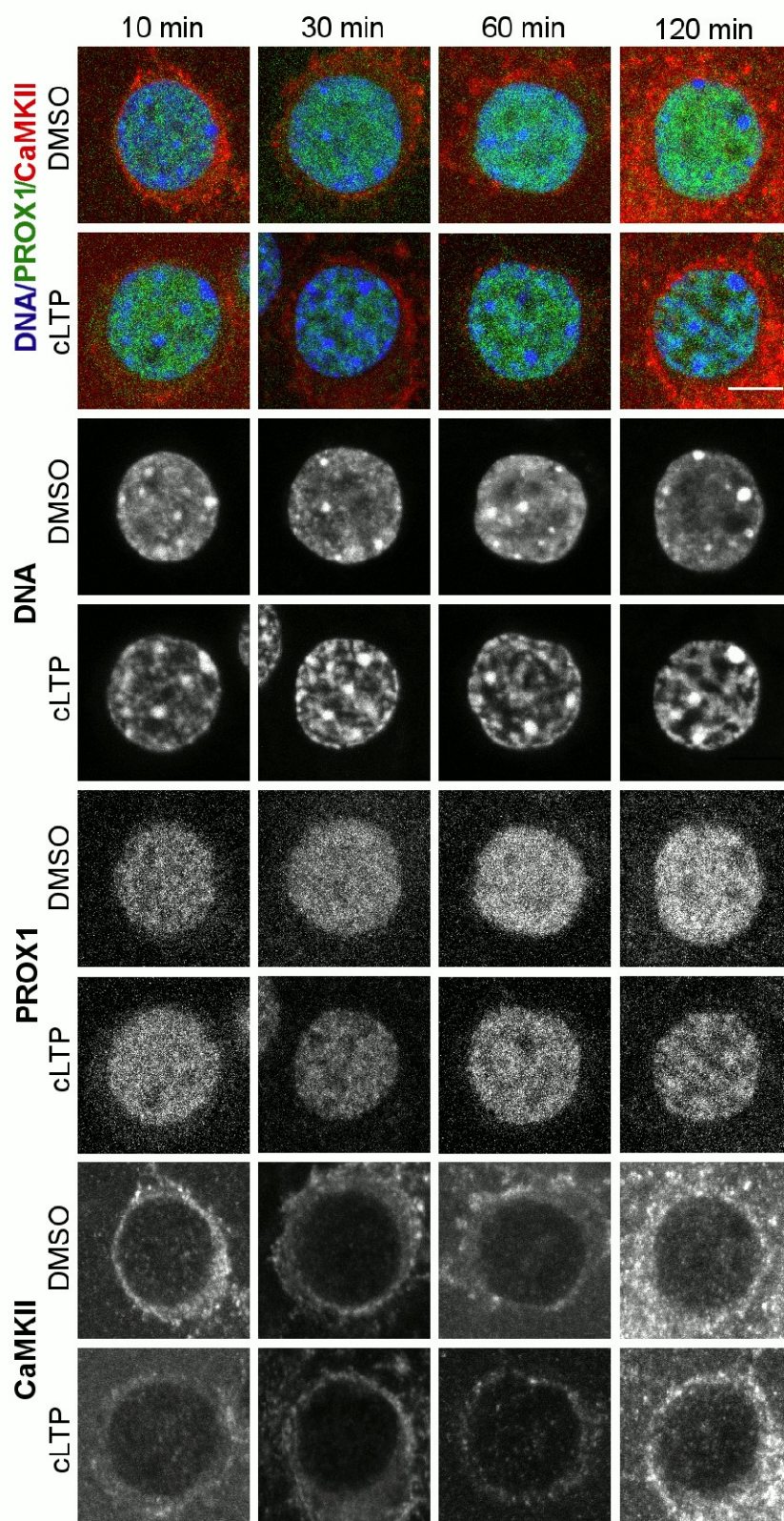
W obydwu typach neuronów już w pierwszych minutach indukcji LTP widać wyraźne zmiany w organizacji chromatyny nasilające się z czasem (ryc. 8 i ryc. 9). Najpierw są one widoczne w postaci pojedynczych, coraz mocniej świecących foci w barwieniu DNA, które powiększają swoją objętość, by po dwóch godzinach inkubacji przybrać najbardziej skondensowaną formę. Jednocześnie pojawiają się coraz większe przestrzenie jądrowe bez widocznego barwienia, wskazujące na brak DNA w tych miejscach. Jak widać na rycinach ósmej i dziewiątej kondensacja chromatyny komórek ziarnistych po pobudzeniu cLTP jest szybsza i intensywniejsza.

Uzyskane dane jakościowe poparto analizą ilościową. Obrazy, uzyskane za pomocą mikroskopu konfokalnego, zostały zamienione na wartości liczbowe za pomocą programu Partseg i przeanalizowane statystycznie jak opisano w rozdziale Materiały i Metody. Na wykresie czwartym (wyk. 4) widać zmniejszenie całkowitej objętości DNA w jądrze komórki ziarnistej o 3 punkty procentowe (pp.) w stosunku do kontroli już po pierwszych 10 minutach. Następnie różnica ta pogłębia się kolejno o 8 pp., 11 pp. i 15 pp., osiągając w ostatnim punkcie czasowym spadek objętości chromatyny do 45% w stosunku do całego jądra. Średnia objętość chromatyny w jądrze komórek kontrolnych (wariant z DMSO) to 60%, przy największej różnicy 2 pp. pomiędzy kontrolami – zgodnie z wynikiem testu Kruskala-Wallisa jest to różnica nieistotna statystycznie (wyk. 4).

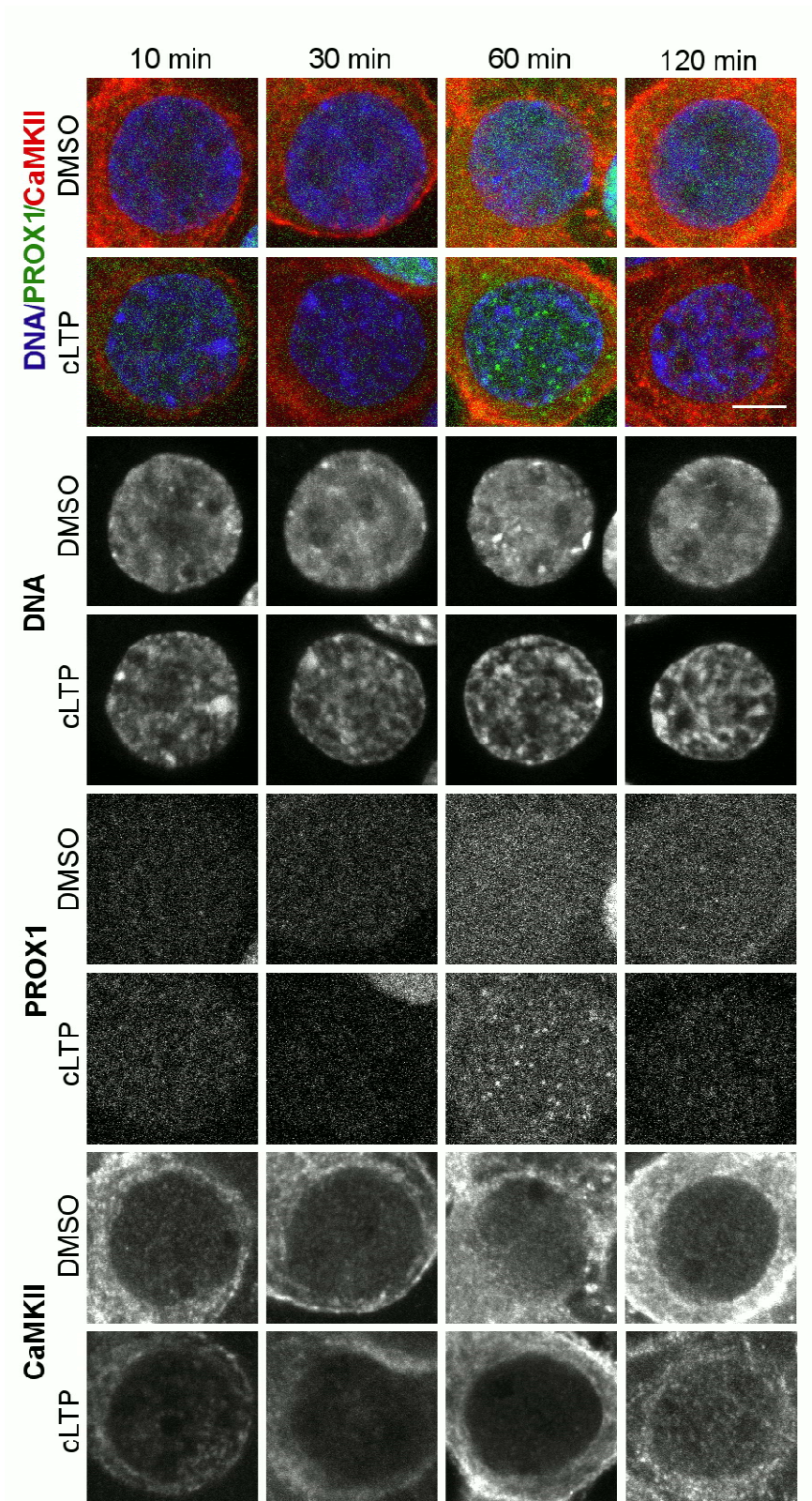
Rearanżacja chromatyny neuronów piramidowych jest wolniejsza i mniej spektakularna, a same jądra tego typu komórek są większe (ryc. 9). W porównaniu do komórek ziarnistych, zmiany w komórkach piramidowych są mniejsze i zachodzą bardziej stopniowo – kolejno o 4 pp., 6 pp., 6 pp. i 10 pp., co ostatecznie daje wynik 50% objętości DNA w stosunku do całego jądra komórkowego po 2 godzinach trwania eksperymentu. Średnia objętość DNA dla wariantu DMSO w komórkach piramidowych wynosi 59%, a największa różnica między kontrolami również dochodzi do 2 pp., co ponownie daje różnicę nieistotną statystycznie (wyk. 5).

Najsilniej skondensowanymi obszarami chromatyny są chromocentra zawierające chromatynę pericentromerową dwóch lub więcej chromosomów, zagregowaną w postaci kilku heterochromatynowych foci (Lee i wsp. 2020). Obliczone zostały również zmiany w objętości chromocentrów i innych najsilniej skondensowanych obszarów chromatyny. W przypadku komórek ziarnistych jest to wzrost ich objętości najpierw o 0,7 pp., a potem kolejno o 2,4 pp., 3,8 pp. oraz 5,5 pp., co w wartościach procentowych daje zmianę wyniku z 3,9% objętości jądra do 8%. Dla kontroli DMSO średnia objętość najbardziej

skondensowanej chromatyny, która ograniczała się głównie do chromocentrow wynosiła 3%, a największa różnica między kontrolami sięgała 0,8 pp. (wyk. 6). W przypadku komórek piramidowych wzrost wynosił kolejno 0,4 pp., 1,2 pp., 1,4 pp., oraz ponownie 1,2 pp. W wartościach bezwzględnych różnice te wahały się od 1,2% objętości jądra do 2%, najwyższą wartość (3,1%) przyjmując dla trzeciego punktu czasowego (60 min). Dla kontroli chromocentra zajmowały 1,1% objętości jądra, a największa różnica między nimi stanowiła 0,5 pp. (wyk. 7). Aby dopełnić analizę obliczono również liczbę silnie skondensownych obszarów chromatyny. Dla komórek ziarnistych różnice w liczebności między kontrolą a wariantem eksperymentalnym wynosiły kolejno -4, -12, -1 i 2, jednocześnie przy największej różnicy między kontrolami równej 5 (wyk. 8). Dla komórek piramidowych zmiany wyglądały następująco: -11, -24, -11 oraz -13, a największa różnica między kontrolami to 10 (wyk. 9).

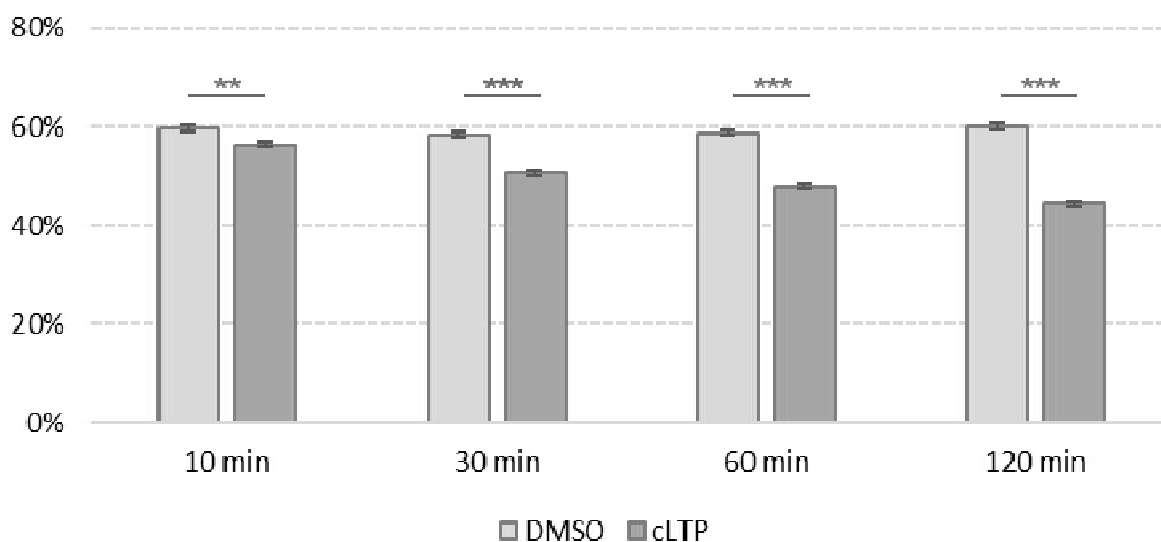


Rycina 8. Obraz zmian organizacji chromatyny neuronów ziarnistych po pobudzeniu (cLTP) i komórek kontrolnych (DMSO). Kolumny prezentują wybrane punkty czasowe eksperymentu. Na górnym panelu przedstawiono złożenie 5-ciu płaszczyzn konfokalnych, z nałożonymi na siebie kanałami: DNA znakowanym barwnikiem Hoechst (przedstawiony na niebiesko), markera neuronów ziarnistych PROX1 (przedstawiony na zielono) i markera neuronów pobudzających CaMKII (przedstawiony na czerwono). Na niższych panelach przedstawiono kolejno: barwienie DNA, barwienie immunofluorescencyjne na marker PROX1 i CaMKII. Skala, 5 μ m.



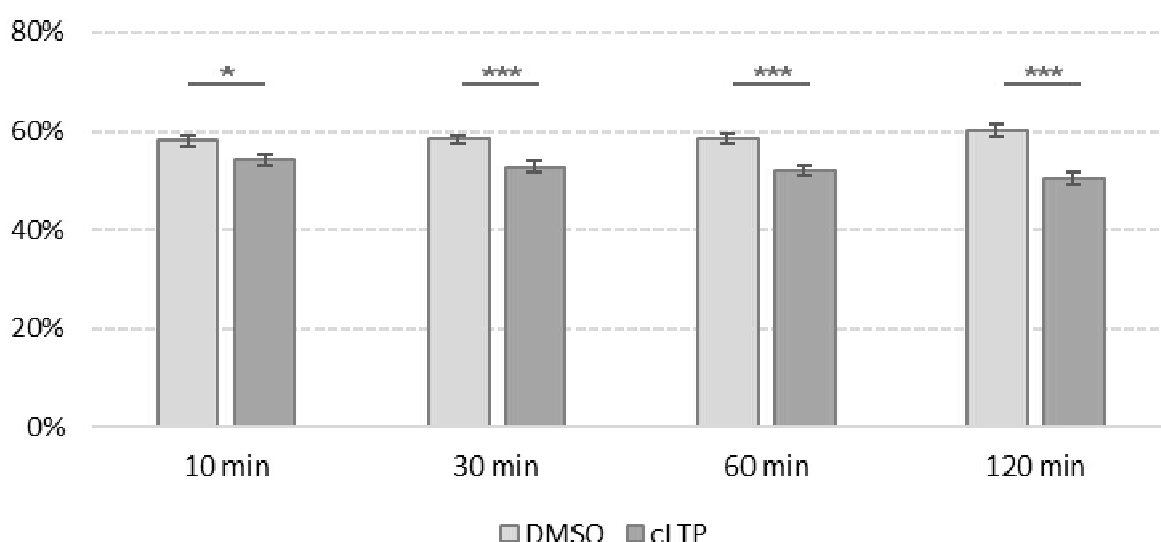
Rycina 9. Obraz zmian organizacji chromatyne neuronów piramidowych po pobudzeniu (cLTP) i komórek kontrolnych (DMSO). Kolumny prezentują wybrane punkty czasowe eksperymentu. Na górnym panelu przedstawiono złożenie 5-ciu płaszczyzn konfokalnych, z nałożonymi na siebie kanałami: DNA znakowanym barwnikiem Hoechst (przedstawiony na niebiesko), markera neuronów ziarnistych PROX1 (przedstawiony na zielono) i markera neuronów pobudzających CaMKII (przedstawiony na czerwono). Na niższych panelach przedstawiono kolejno: barwienie DNA, barwienie immunofluorescencyjne na marker PROX1 i CaMKII. Skala, 5 μ m.

Całkowita objętość DNA w jądrze komórkowym neuronów ziarnistych



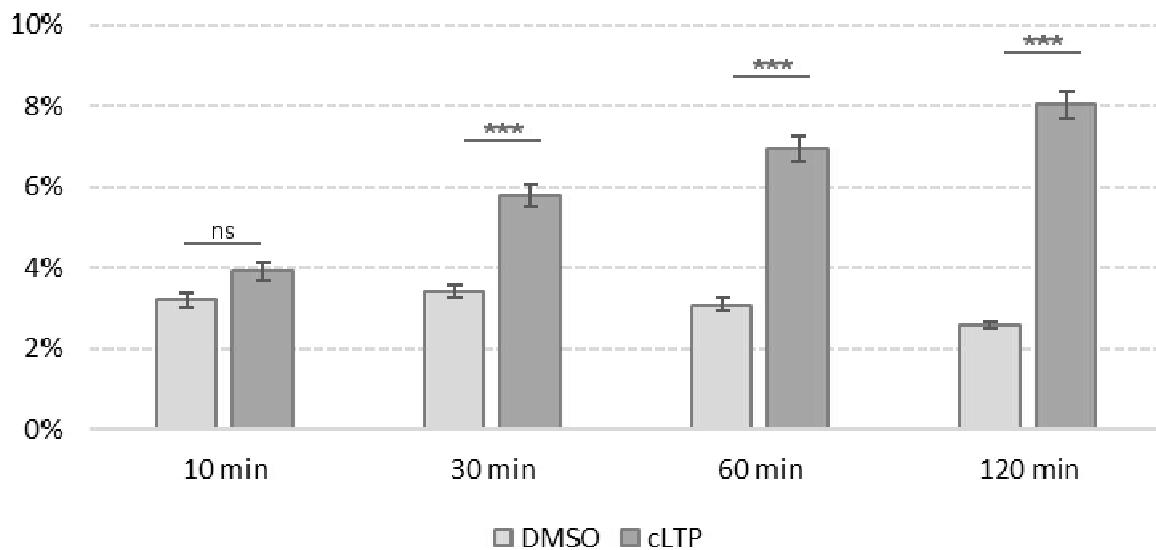
Wykres 4. Analiza ilościowa całkowitej objętości DNA w jądrze komórkowym neuronów ziarnistych po pobudzeniu (cLTP) i komórek kontrolnych (DMSO). Wyniki zostały przedstawione jako procentowy udział chromatyny w stosunku do objętości całego jądra. Na osi x zaznaczono kolejne punkty czasowe dla eksperymentu. Na osi y przedstawiono wartość procentową. Słupki błędów wyrażają wartość SEM (standardowy błąd średniej) dla 3 niezależnych powtórzeń doświadczeń, gwiazdki reprezentują test Kruskala-Wallisa, w którym wartość istotności statystycznej $p < 0,01$ jest pokazana jako **, natomiast $p < 0,001$ jest pokazana jako ***.

Całkowita objętość DNA w jądrze komórkowym neuronów piramidowych



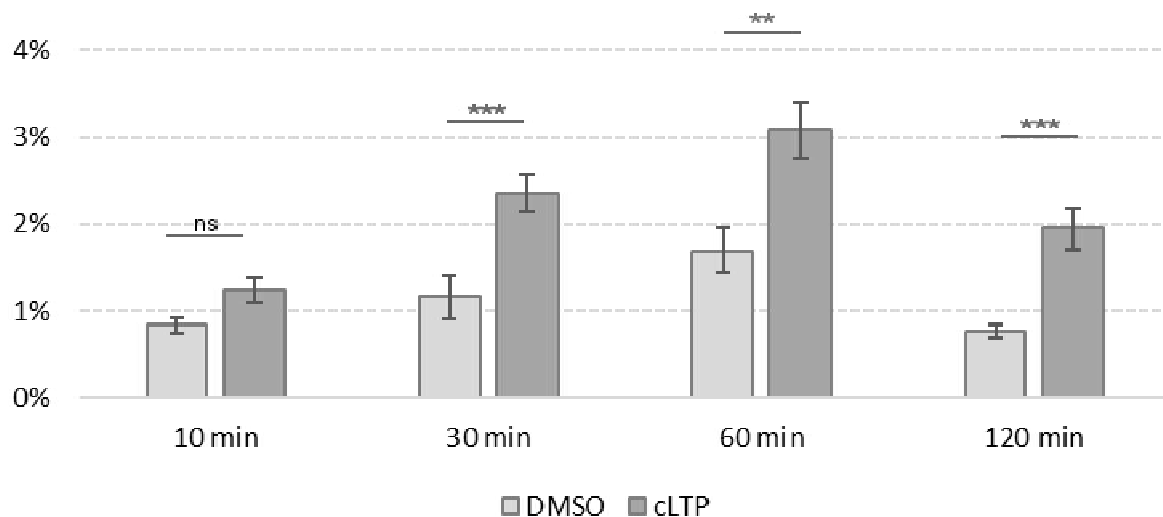
Wykres 5. Analiza ilościowa całkowitej objętości DNA w jądrze komórkowym neuronów piramidowych po pobudzeniu (cLTP) i komórek kontrolnych (DMSO). Wyniki zostały przedstawione jako procentowy udział chromatyny w stosunku do objętości całego jądra. Na osi x zaznaczono kolejne punkty czasowe dla eksperymentu. Na osi y przedstawiono wartość procentową. Słupki błędów wyrażają wartość SEM dla 3 niezależnych powtórzeń doświadczeń, gwiazdki reprezentują test Kruskala-Wallisa, w którym wartość istotności statystycznej $p < 0,05$ jest pokazana jako *, natomiast $p < 0,001$ jest pokazana jako ***.

Objętość najmocniej świecących miejsc DNA w jądrze komórkowym neuronów ziarnistych



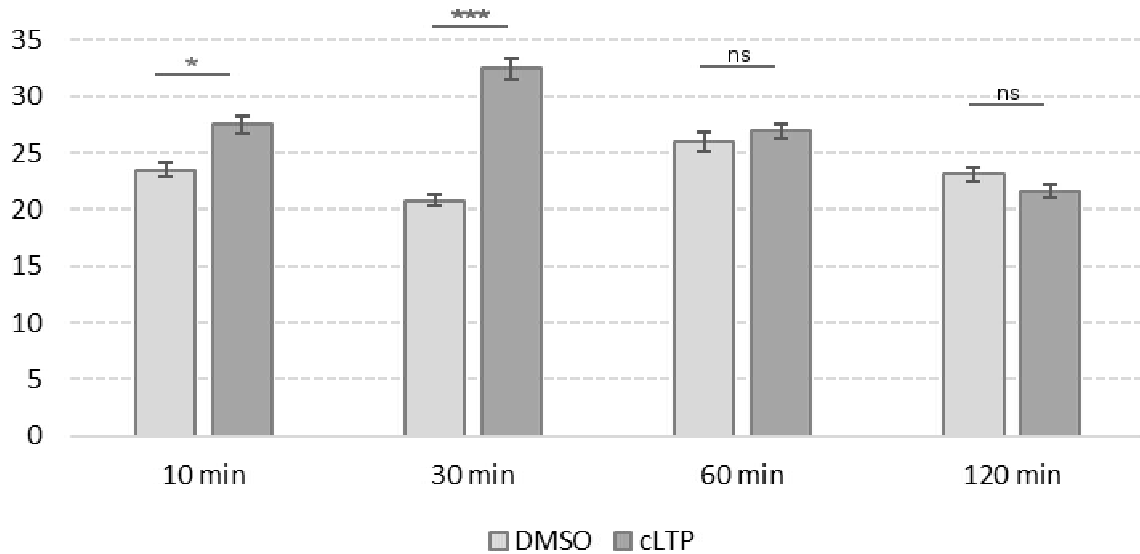
Wykres 6. Analiza ilościowa względnej objętości najbardziej skondensowanej chromatyny w jądrze komórkowym neuronów ziarnistych po pobudzeniu (cLTP) i komórek kontrolnych (DMSO). Wyniki zostały przedstawione jako procentowy udział skondensowanej chromatyny w stosunku do objętości całego jądra. Na osi x zaznaczono kolejne punkty czasowe dla eksperymentu. Na osi y przedstawiono wartość procentową. Słupki błędów wyrażają wartość SEM dla 3 niezależnych powtórzeń doświadczeń, gwiazdki reprezentują test Kruskala-Wallisa, w którym wartość istotności statystycznej $p < 0,001$ jest pokazana jako ***. Skrót „ns” oznacza różnice nieistotne statystycznie.

Objętość najmocniej świecących miejsc DNA w jądrze komórkowym neuronów piramidowych



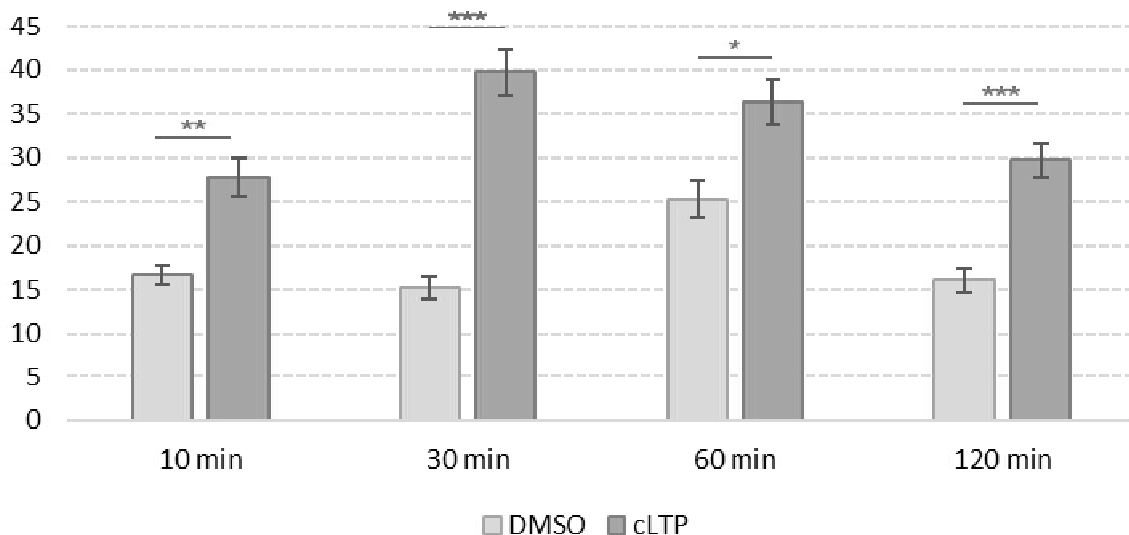
Wykres 7. Analiza ilościowa względnej objętości najbardziej skondensowanej chromatyny w jądrze komórkowym neuronów piramidowych po pobudzeniu (cLTP) i komórek kontrolnych (DMSO). Wyniki zostały przedstawione jako procentowy udział skondensowanej chromatyny w stosunku do objętości całego jądra. Na osi x zaznaczono kolejne punkty czasowe dla eksperymentu. Na osi y przedstawiono wartość procentową. Słupki błędów wyrażają wartość SEM dla 3 niezależnych powtórzeń doświadczeń, gwiazdki reprezentują test Kruskala-Wallisa, w którym wartość istotności statystycznej $p < 0,01$ jest pokazana jako **, natomiast $p < 0,001$ jest pokazana jako ***. Skrót „ns” oznacza różnice nieistotne statystycznie.

Średnia liczba najmocniej świecących miejsc DNA w jądrze komórkowym neuronów ziarnistych



Wykres 8. Analiza średniej liczby foci silnie skondensowanej chromatyny w jądrze komórkowym neuronów ziarnistych po pobudzeniu (cLTP) i komórek kontrolnych (DMSO). Na osi x zaznaczono kolejne punkty czasowe dla eksperymentu. Na osi y przedstawiono wartość liczbową. Słupki błędów wyrażają wartość SEM dla 3 niezależnych powtórzeń doświadczeń, gwiazdki reprezentują test Kruskala-Wallisa, w którym wartość istotności statystycznej $p < 0,05$ jest pokazana jako *, natomiast $p < 0,001$ jest pokazana jako ***. Skrót „ns” oznacza różnice nieistotne statystycznie.

Średnia liczba najmocniej świecących miejsc DNA w jądrze komórkowym neuronów piramidowych



Wykres 9. Analiza średniej liczby foci silnie skondensowanej chromatyny w jądrze komórkowym neuronów piramidowych po pobudzeniu (cLTP) i komórek kontrolnych (DMSO). Na osi x zaznaczono kolejne punkty czasowe dla eksperymentu. Na osi y przedstawiono wartość liczbową. Słupki błędów wyrażają wartość SEM dla 3 niezależnych powtórzeń doświadczeń, gwiazdki reprezentują test Kruskala-Wallisa, w którym wartość istotności statystycznej $p < 0,05$ jest pokazana jako *, $p < 0,01$ jest pokazana jako **, natomiast $p < 0,001$ jest pokazana jako ***.

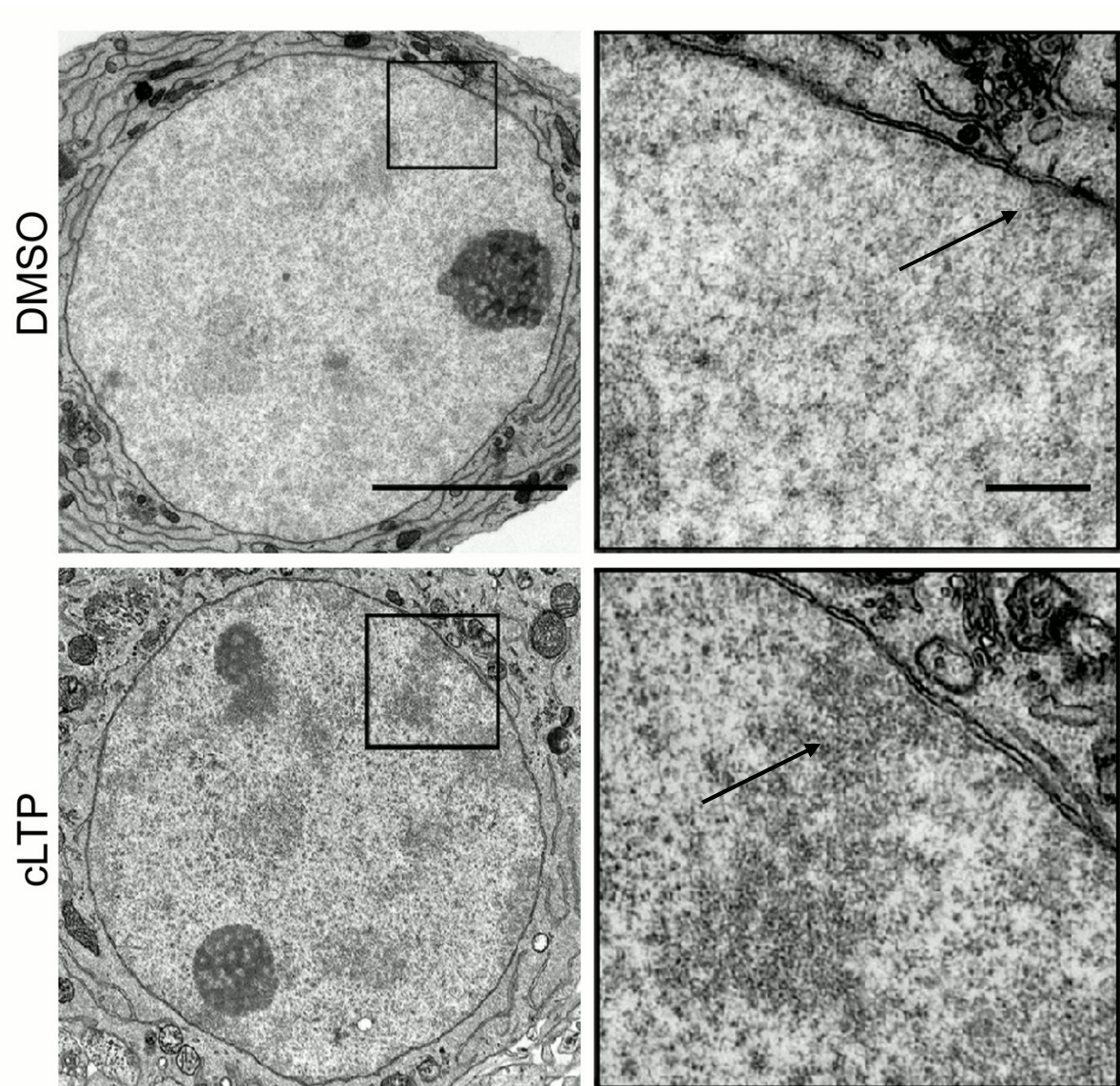
Ciągły wzrost objętości foci silnie skondensowanej chromatyny, przy jednoczesnej relatywnie największej ich liczbie w drugim punkcie czasowym (30 minut), sugeruje powstawanie nowych skupisk skondensowanej chromatyny na początku trwania eksperymentu i łączenie się istniejących już skondensowanych obszarów DNA w dalszej części przeprowadzanego badania.

Aby potwierdzić wyniki uzyskane za pomocą mikroskopii konfokalnej, pobudzone neurony obrazowano, stosując transmisyjną mikroskopię elektronową (ang. *Transmission Electron Microscope*, TEM). W odróżnieniu do kontroli, w neuronach aktywowanych zauważono zagęszczenie chromatyny, widoczne szczególnie pod błoną jądrową (zaznaczono strzałkami na ryc. 10) i zwiększenie przestrzeni interchromatynowych.

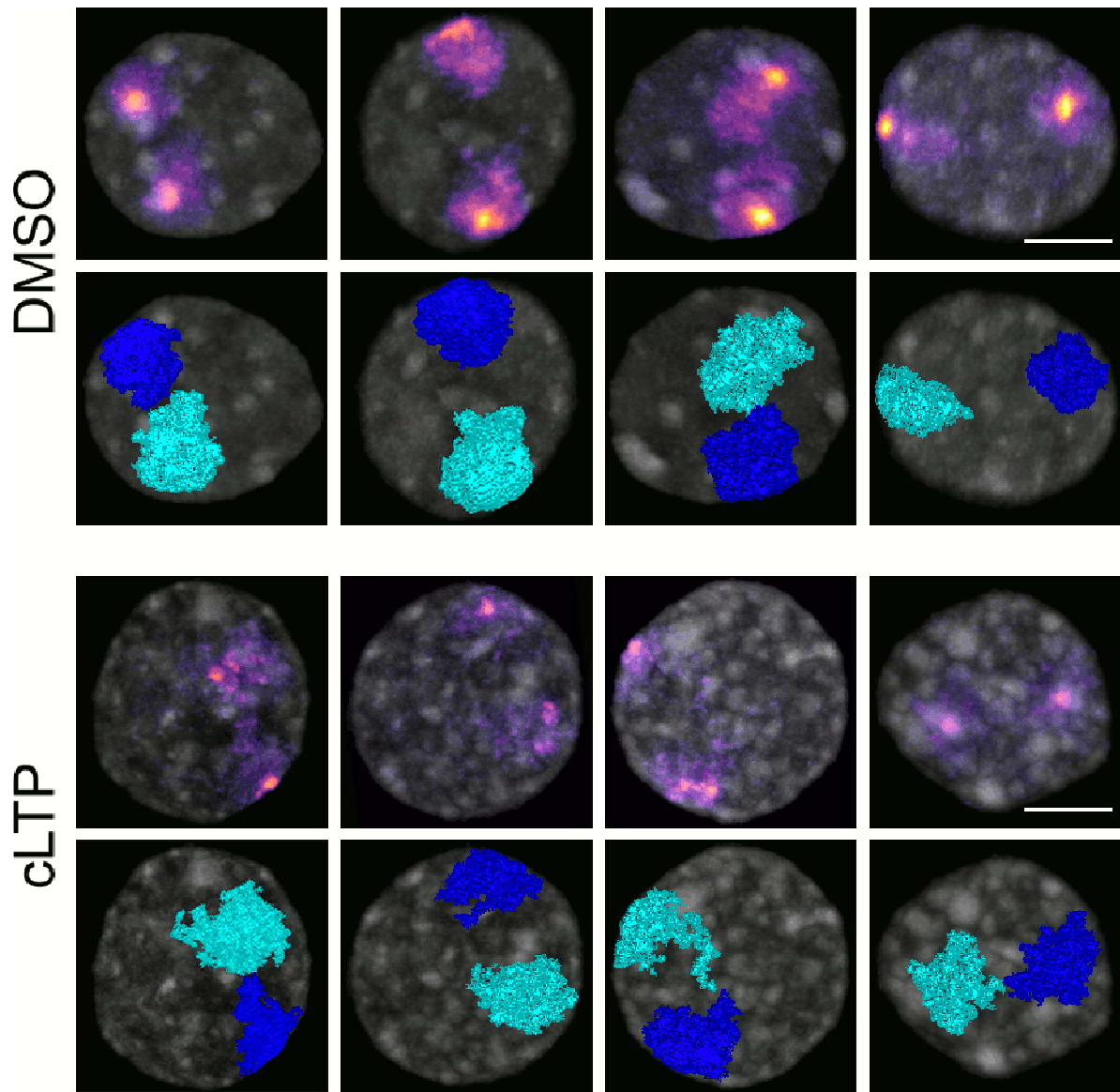
Podsumowując tę część wyników, chromatyna neuronów hipokampalnych indukowanych do LTP ulega globalnej kondensacji, przy czym stopień i tempo jej rearanżacji zależą od rodzaju komórki.

4.3. Po indukcji LTP terytorium chromosomu 1 staje się mniejsze i ma bardziej złożoną budowę

Aby dodatkowo scharakteryzować zaprezentowane zmiany, wybrano i zbadano konkretny obszar chromatyny - terytorium chromosomu 1, przy użyciu metody immuno-FISH. Na rycinie jedenastej (ryc. 11) widać wyznakowane specyficzną sondą terytorium chromosomu 1. Po indukcji LTP w komórkach widać, jak kondensacji chromatyny towarzyszy zmniejszenie terytorium chromosomu 1 w stosunku do kontroli (ryc. 11). Analiza ilościowa sygnałów FISH wykazała, że po stymulacji terytorium chromosomu 1 zajmuje mniejszą część objętości jądra komórkowego o 2 pp. (wyk. 10), jednocześnie zwiększając swoją powierzchnię w wartościach bezwzględnych – średnio o 29 μm^2 (wyk. 11). Wskazuje to na większe rozgałęzienie jego struktury w porównaniu z neuronami kontrolnymi.

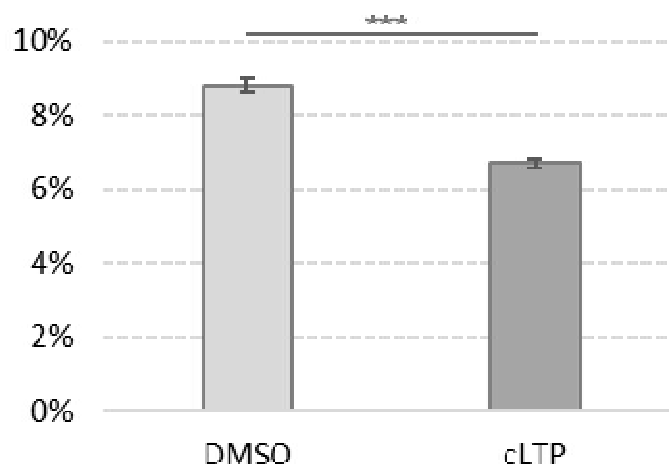


Rycina 10. Obraz zmian organizacji chromatyny neuronów hipokampalnych po cLTP lub DMSO w transmisyjnym mikroskopie elektronowym TEM. Lewy panel pokazuje całe jądro komórkowe, natomiast prawy panel – jego wycięty fragment. Strzałki wskazują skondensowaną chromatynę. Skala – 5 μm dla lewego panelu i 0,5 μm dla prawego panelu.



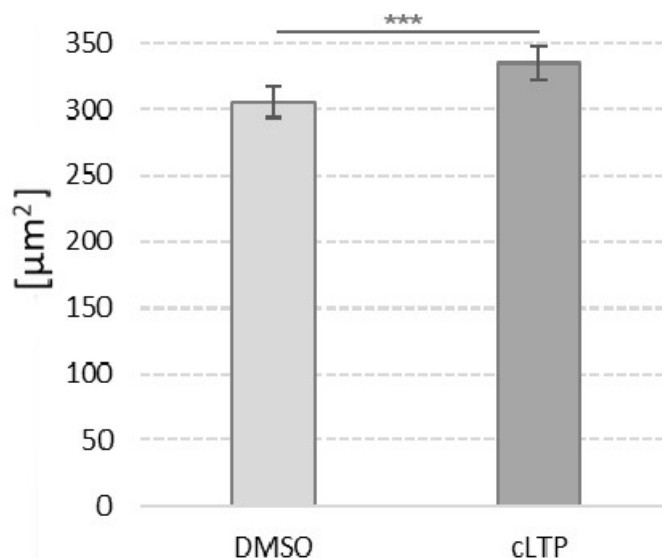
Rycina 11. Obraz jąder komórkowych neuronów hipokampalnych z mikroskopu konfokalnego LSM 780 po zastosowaniu metody DNA-FISH. Na górze przedstawiono wariant z DMSO, na dole – z cLTP. Na wyższych panelach dla każdego wariantu przedstawiono złożenie 5-ciu płaszczyzn w osi z, z nałożonymi na siebie DNA znakowanym barwieniem Hoechst (przedstawiony w skali szarości) i wyznakowanego terytorium chromosomu 1 (przedstawiony na kolorowo). Na niższych panelach pokazano dla każdego wariantu trójwymiarową rekonstrukcję segmentacji terytoriów chromosomu 1 (uwidocznione na turkusowo i granatowo) oraz barwienie DNA (przedstawione w skali szarości). Skala, 5 μm .

Objętość terytorium chromosomu 1 w jądrze komórkowym



Wykres 10. Analiza ilościowa objętości terytorium chromosomu 1. Analiza została oparta na sygnale z barwienia DNA oraz znakowania terytorium chromosomu 1 za pomocą metody DNA-FISH i przeprowadzona na jądrach komórkowych wysegmentowanych z trójwymiarowych obrazów z mikroskopu konfokalnego. Wyniki zostały przedstawione jako procentowa zmiana objętości terytorium chromosomowego w stosunku do objętości całego jądra. Na osi x zaznaczono warianty eksperymentu - komórki kontrolne (DMSO) lub stymulowane (cLTP). Na osi y przedstawiono wartość procentową objętości jądra komórkowego. Słupki błędów wyrażają wartość SEM, gwiazdki reprezentują test Kruskala-Wallisa, w którym wartość istotności statystycznej $p < 0,001$ jest pokazana jako ***.

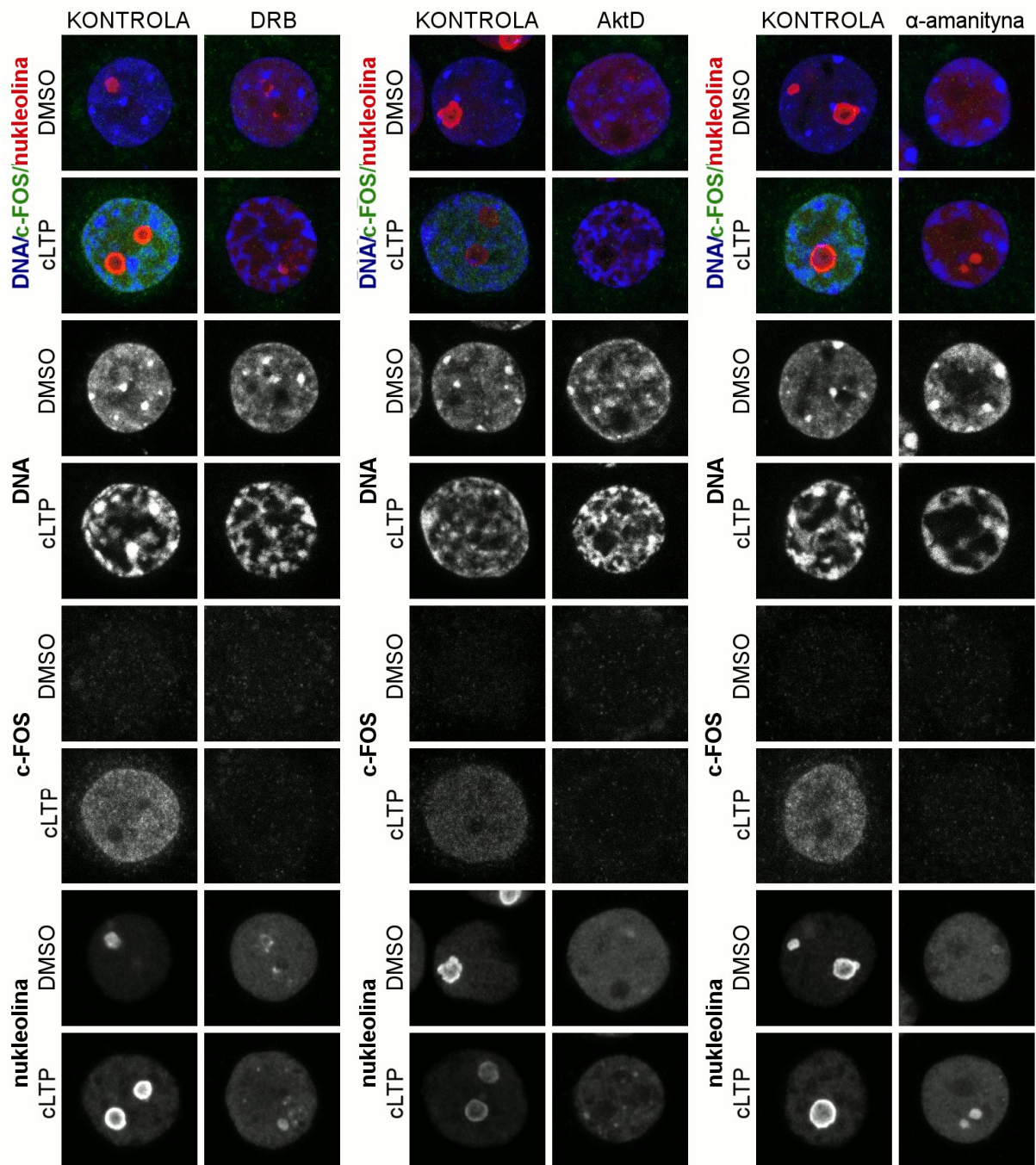
Powierzchnia terytorium chromosomu 1



Wykres 11. Analiza ilościowa powierzchni terytorium chromosomu 1. Analiza została oparta na sygnale z barwienia DNA oraz znakowania terytorium chromosomu 1 za pomocą metody DNA-FISH i przeprowadzona na jądrach komórkowych wysegmentowanych z trójwymiarowych obrazów z mikroskopu konfokalnego. Na osi x zaznaczono warianty eksperymentu - komórki kontrolne (DMSO) lub stymulowane (cLTP). Na osi y przedstawiono wartości wyrażone w μm^2 . Słupki błędów wyrażają wartość SEM, gwiazdki reprezentują test Kruskala-Wallisa, w którym wartość istotności statystycznej $p < 0,001$ jest pokazana jako ***.

4.4. Rearanżacja chromatyny jest niezależna od transkrypcji

Ze względu na fakt, że stymulacja neuronów jest związana z masową aktywacją genów (Yap i Greenberg 2018, Benito i Barco 2014), a aktywacja genów z rearanżacją chromatyny (Tao Cheng 2018, Walczak i wsp. 2013) postanowiono sprawdzić, czy globalna kondensacja chromatyny zależy od aktywnej transkrypcji. Wybrano trzy różne inhibitory: DRB, który blokuje kinazę CDK9, przez co hamuje elongację transkrypcji, aktynomycynę D, która interkaluje do DNA, w wyniku czego również blokuje elongację transkrypcji oraz α -amanitynę, która bezpośrednio blokuje polimerazę RNA II (Bensaude 2011). Zgodnie z oczekiwaniami w przypadku wszystkich inhibitorów zaobserwowano brak ekspresji genu *c-Fos* po stymulacji neuronów (ryc. 12). Użyty marker jąderkowy (białko nukleolina) ukazał również charakterystyczny rozpad jąderka po zastosowaniu powyższych odczynników. Co ciekawe, żaden z użytych inhibitorów nie zablokował zależnej od aktywności kondensacji chromatyny. Jednakże, jak widać na przykładzie kontroli z DMSO, już samo zastosowanie powyższych odczynników skutkowało niewielkimi zmianami w organizacji chromatyny (ryc. 12). Te wyniki sugerują, że reorganizacja chromatyny po pobudzeniu neuronów jest niezależna od transkrypcji i transkrybowanych *de novo* genów.



Rycina 12. Obraz jąder neuronów hipokampalnych z mikroskopu konfokalnego LSM 780 po zastosowaniu wybranych inhibitorów transkrypcji. Pierwszy panel przedstawia zastosowanie DRB, drugi – aktynomycyny D, trzeci – α -amanityny. Wyższe wiersze przedstawiają wariant kontrolny (DMSO), niższe – komórki po pobudzeniu (cLTP). Górny panel przedstawia złożenie 5-ciu płaszczyzn w osi z, z nałożonymi na siebie kanałami: DNA znakowanym barwnikiem Hoechst (przedstawiony na niebiesko), markera pobudzenia neuronów – białka c-FOS (przedstawiony na zielono) i markera jąderkowego – białka nukleoliny (przedstawiony na czerwono). Niższe panele przedstawiają kolejno: barwienie DNA i barwienia immunofluorescencyjne na wybrane białka. Skala, 5 μ m.

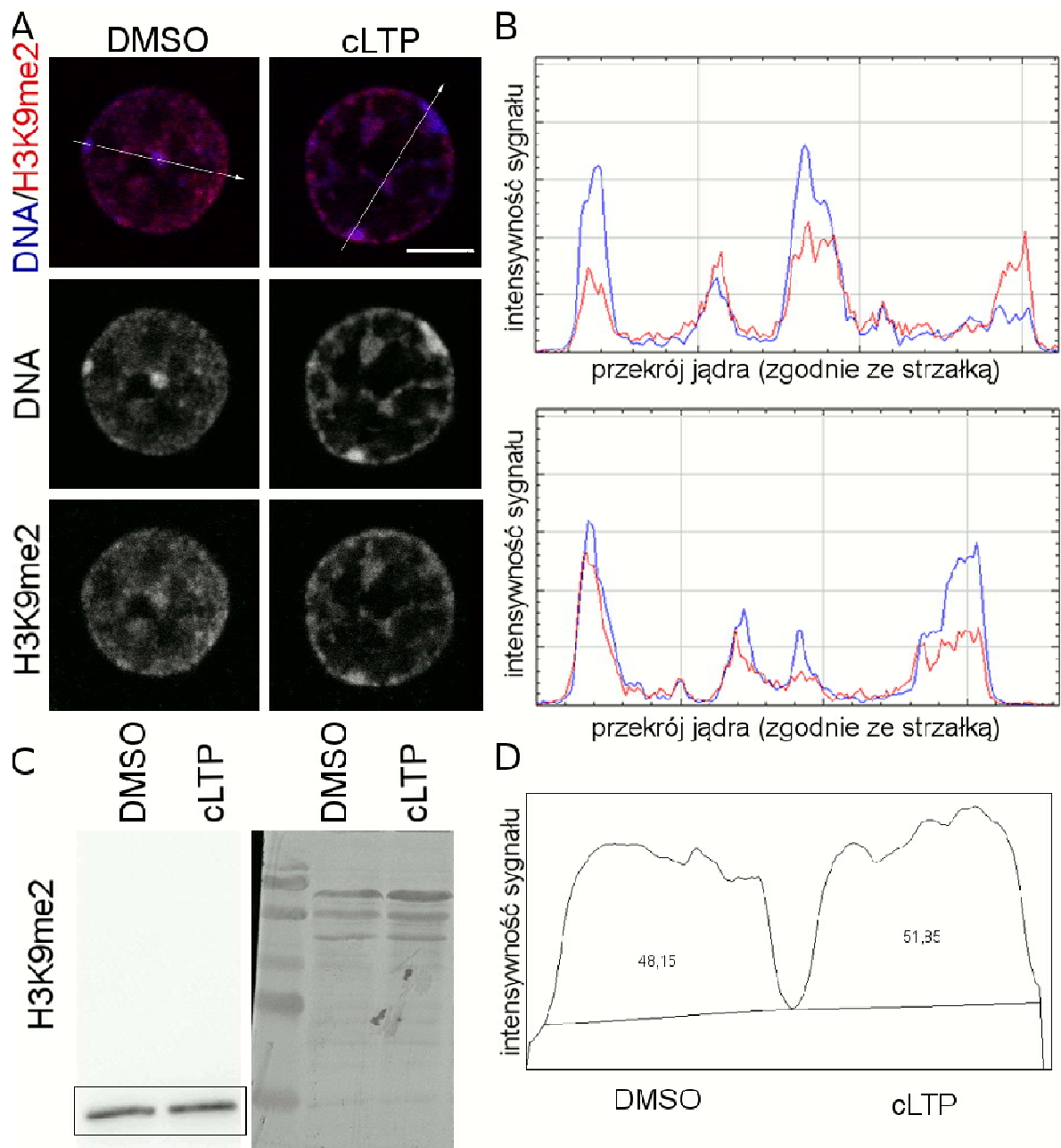
4.5. Rearanżacji chromatyny towarzyszą zmiany w lokalizacji potranslacyjnie modyfikowanych histonów

Lokalna organizacja chromatyny w komórkach postmitotycznych regulowana jest przez potranslacyjne modyfikacje histonów, które powodując odpychanie lub przyciąganie się reszt histonowych, wpływają na otwieranie i zamykanie się struktury chromatyny, a tym samym na aktywność transkrypcyjną danego regionu DNA (Kouzarides 2007). Ze względu na zmiany zachodzące w aktywności genów oraz lokalnej kondensacji chromatyny indukowanych pobudzeniem neuronów, postanowiono sprawdzić rozlokowanie markerów chromatyny wyciszonej (heterochromatyny) i chromatyny aktywnej (euchromatyny) w komórkach kontrolnych i poddanych stymulacji.

Wyniki wskazują, że obserwowanej przebudowie strukturalnej chromatyny towarzyszyły zmiany w lokalizacji potranslacyjnie modyfikowanych histonów. W komórkach kontrolnych markery heterochromatyny, jak dimetylacja lizyny 9 na histonie H3 (H3K9me2) lub di- oraz trimetylacja lizyny 20 na histonie H4 (H4K20me2/3) są zlokalizowane głównie w chromocentrach (ryc. 13 A/B i ryc. 14 A/B). Po pobudzeniu neuronów wzór rozlokowania markerów odpowiadał chromocentrom i skondensowanym ogniskom chromatyny. Jednakże poziom modyfikacji pozostaje stały (ryc. 13 C/D i ryc. 14 C/D), a zmienia się tylko ich umiejscowienie. Aby sprawdzić, czy pobudzenie neuronów wpływa na organizację ciała Barra, zbadano trimetylację histonu H3 na lizynie 27 (H3K27me3) – modyfikację charakterystyczną dla nieaktywnego chromosomu X w żeńskich komórkach. Wyniki po pobudzeniu komórek nie wykazały zmian w lokalizacji ani w poziomie tej modyfikacji względem kontroli (ryc. 15).

Markery euchromatyny, jak acetylacja lizyny 9 na histonie H3 (H3K9ac) lub lizyny 56 na histonie H3 (H3K56ac) były równomiernie rozmieszczone w jądrach komórek kontrolnych z wyłączeniem silnie skondensowanych chromocentrow. Po pobudzeniu gromadziły się blisko granic skondensowanej chromatyny, (ryc. 16 A/B i ryc. 17 A/B). Nie zauważono jednak istotnych różnic między poziomami tych modyfikacji dla wariantu kontrolnego oraz eksperymentalnego (ryc. 16 C/D i ryc. 17 C/D).

Powyższe wyniki sugerują, że po stymulacji aktywna chromatyna jest przesuwana w stronę wolnej przestrzeni międzychromatynowej i otacza wyciszone transkrypcyjnie, skondensowane części genomu.

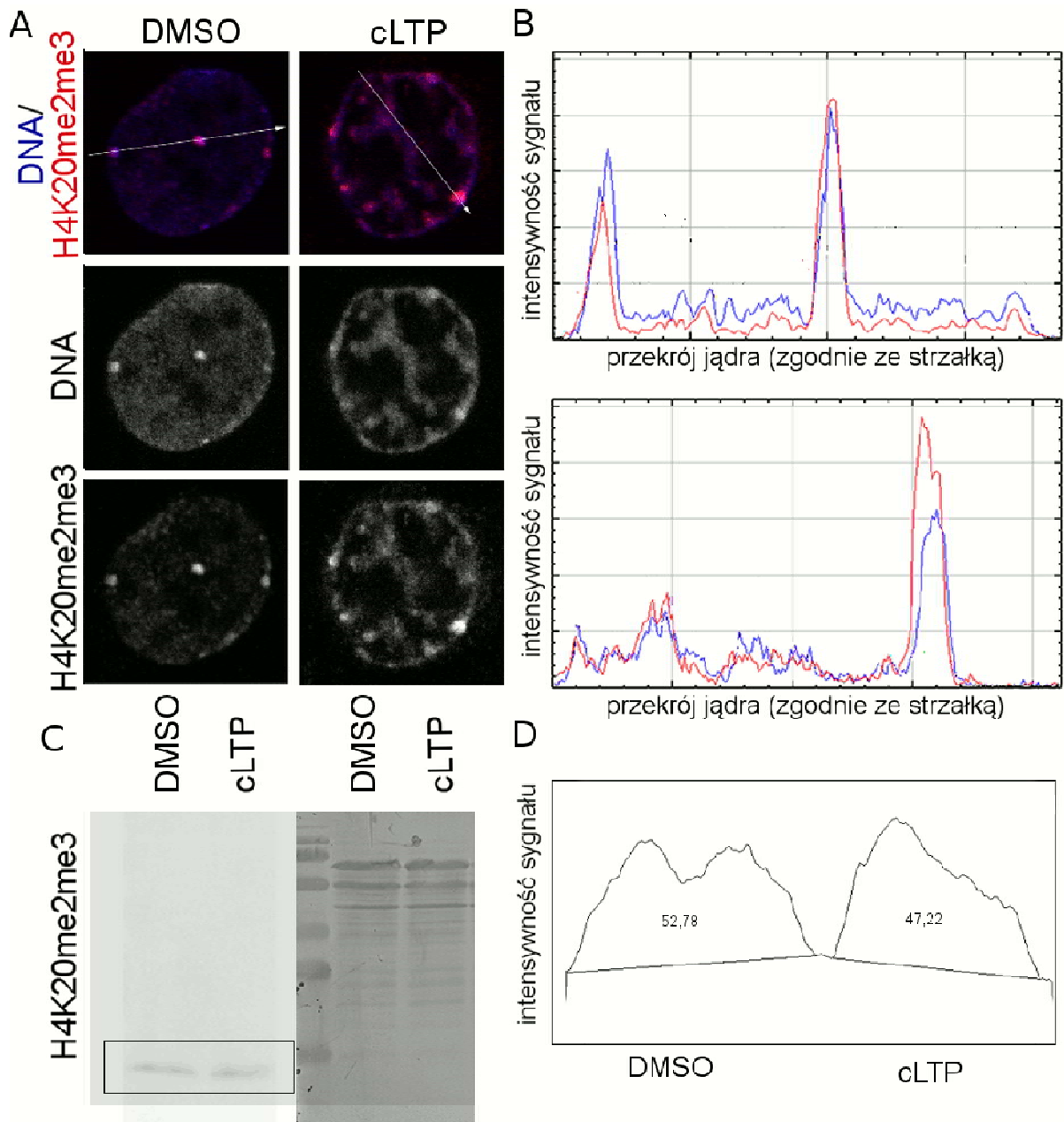


Rycina 13. (A) Immunodetekcja dimetylacji lizyny 9 histonu H3 (H3K9me2) w kontrolnych (DMSO) lub stymulowanych (cLTP) neuronach hipokampalnych. Pierwszy wiersz przedstawia złożenie 5-ciu płaszczyzn w osi z, z nałożonymi na siebie sygnałami pochodzącymi z DNA (przedstawione na niebiesko) oraz H3K9me2 (przedstawione na czerwono). Poniższe wiersze przedstawiają osobno: barwienie DNA, barwienie immunofluorescencyjne na H3K9me2. Skala, 5 μ m.

(B) Intensywność sygnału fluorescencyjnego w 8-bitowej skali szarości (0-255), pochodzącego z barwienia DNA (uwidocznione na niebiesko) i barwienia H3K9me2 (uwidocznione na czerwono). Na górnym wykresie przedstawiono wartości dla wariantu DMSO, na dolnym – dla cLTP. Osie x reprezentują przekroje jąder, zgodne z zaznaczeniem strzałki.

(C) Wynik metody western blot z przeciwciałem rozpoznającym modyfikację H3K9me2 (z lewej, oznaczono czarnym prostokątem) oraz barwienie całkowitego białka przeprowadzone na tej samej membranie przy pomocy odczynnika Ponceau (po prawej stronie). Do pierwszej kolumny podano lizat białkowy z wariantu DMSO, do drugiej – cLTP.

(D) Densytometryczna analiza intensywności sygnału, pochodzącego z detekcji H3K9me2. Lewa część wykresu odnosi się do wariantu DMSO, prawa – cLTP. Porównywane liczby przedstawiają obliczone pole powierzchni dla danych części wykresu. Przeprowadzony test *t*-Studenta dla prób niezależnych wykazał wynik nieistotny statystycznie.

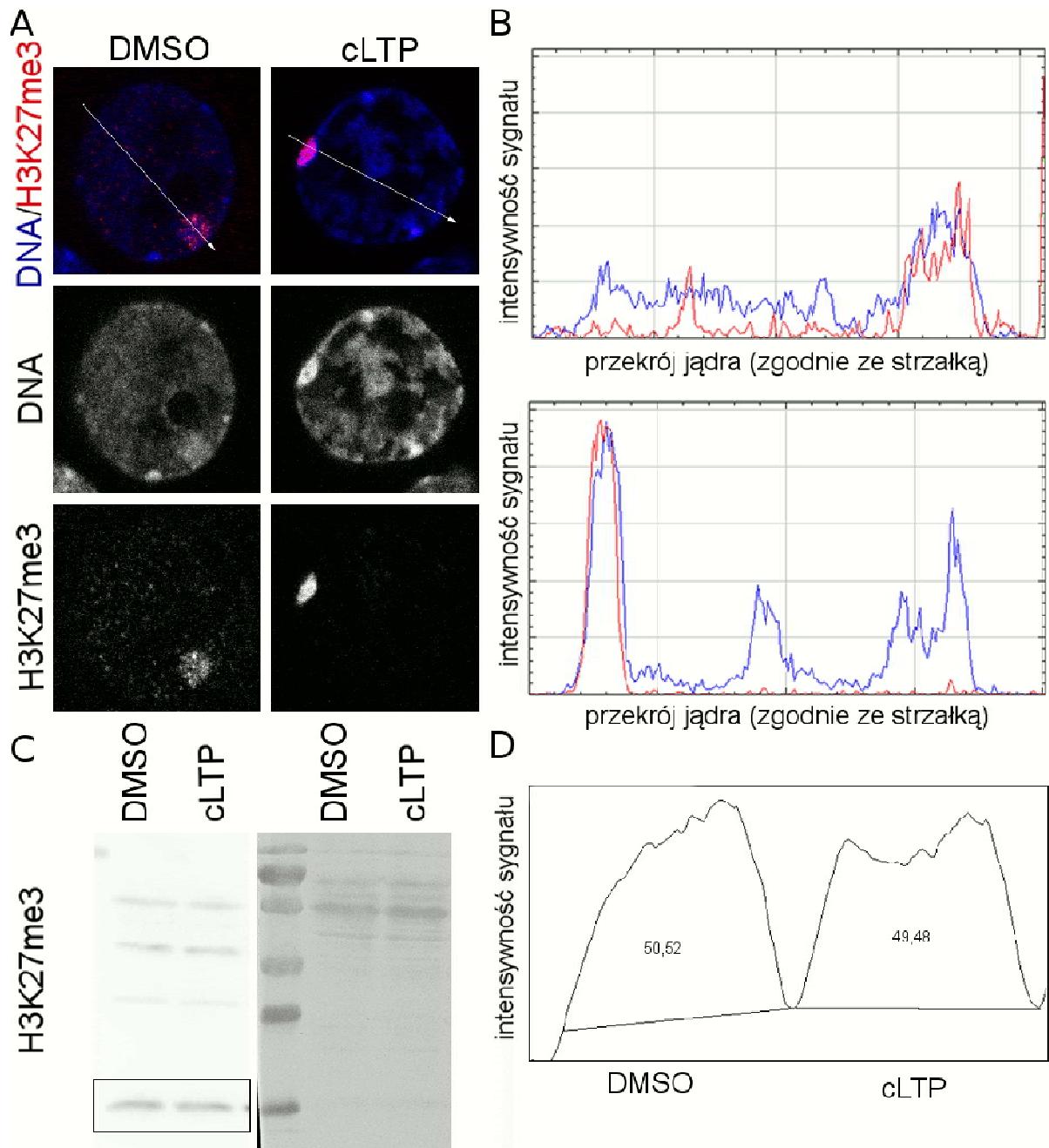


Rycina 14. (A) Immunodetekcja di- i trimetylacji lizyny 20 histonu H4 (H4K20me2me3) w kontrolnych (DMSO) lub stymulowanych (cLTP) neuronach hipokampalnych. Pierwszy wiersz przedstawia złożenie 5-ciu płaszczyzn w osi z, z nałożonymi na siebie sygnałami pochodzącymi z DNA (przedstawione na niebiesko) oraz H4K20me2me3 (przedstawione na czerwono). Poniższe wiersze przedstawiają osobno: barwienie DNA, barwienie immunofluorescencyjne na H4K20me2me3. Skala, 5 μ m.

(B) Intensywność sygnału fluorescencyjnego w 8-bitowej skali szarości (0-255), pochodzącego z barwienia DNA (uwidocznione na niebiesko) i barwienia H4K20me2me3 (uwidocznione na czerwono). Na górnym wykresie przedstawiono wartości dla wariantu DMSO, na dolnym – dla cLTP. Oś x reprezentują przekroje jąder, zgodnie z zaznaczeniem strzałki.

(C) Wynik metody western blot z przeciwciałem rozpoznającym modyfikację H4K20me2me3 (z lewej, oznaczono czarnym prostokątem) oraz barwienie całkowitego białka przeprowadzone na tej samej membranie przy pomocy odczynnika Ponceau (po prawej stronie). Do pierwszej kolumny podano lizat białkowy z wariantu DMSO, do drugiej – cLTP.

(D) Densytometryczna analiza intensywności sygnału, pochodzącego z detekcji H4K20me2me3. Lewa część wykresu odnosi się do wariantu DMSO, prawa – cLTP. Porównywane liczby przedstawiają obliczone pole powierzchni dla danych części wykresu. Przeprowadzony test *t*-Studenta dla prób niezależnych wykazał wynik nieistotny statystycznie.

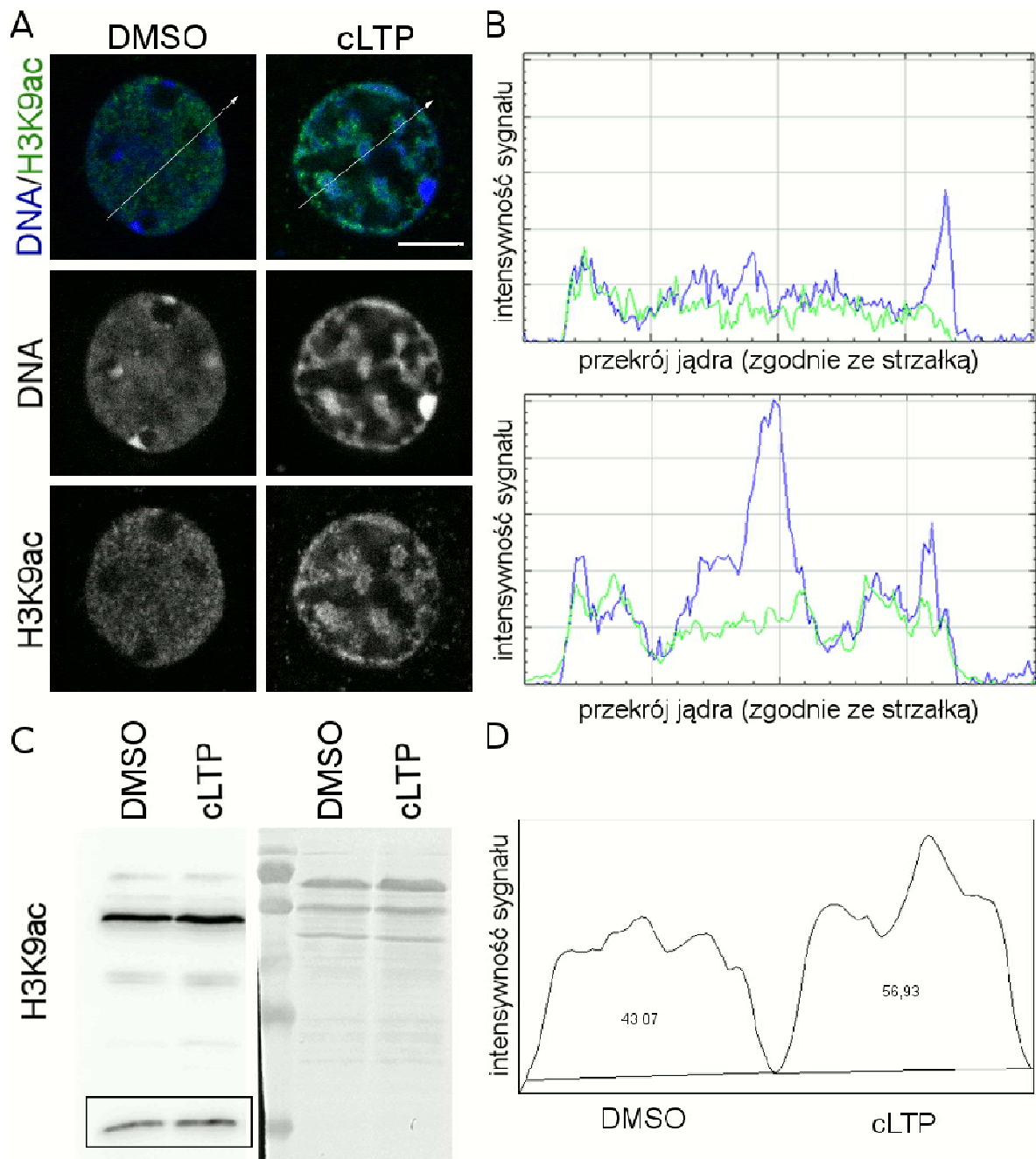


Rycina 15. (A) Immunodetekcja trimetylacji lizyny 27 histonu H3 (H3K27me3) w kontrolnych (DMSO) lub stymulowanych (cLTP) neuronach hipokampalnych. Pierwszy wiersz przedstawia złożenie 5-ciu płaszczyzn w osi z, z nałożonymi na siebie sygnałami pochodzącymi z DNA (przedstawione na niebiesko) oraz H3K27me3 (przedstawione na czerwono). Poniższe wiersze przedstawiają osobno: barwienie DNA, barwienie immunofluorescencyjne na H3K27me3. Skala, 5 μ m.

(B) Intensywność sygnału fluorescencyjnego w 8-bitowej skali szarości (0-255), pochodzącego z barwienia DNA (uwidocznione na niebiesko) i barwienia H3K27me3 (uwidocznione na czerwono). Na górnym wykresie przedstawiono wartości dla wariantu DMSO, na dolnym – dla cLTP. Osie x reprezentują przekroje jąder, zgodne z zaznaczeniem strzałki.

(C) Wynik metody western blot z przeciwciałem rozpoznającym modyfikację H3K27me3 (z lewej, oznaczono czarnym prostokątem) oraz barwienie całkowitego białka przeprowadzone na tej samej membranie przy pomocy odczynnika Ponceau (po prawej stronie). Do pierwszej kolumny podano lizat białkowy z wariantu DMSO, do drugiej – cLTP.

(D) Densytometryczna analiza intensywności sygnału, pochodzącego z detekcji H3K27me3. Lewa część wykresu odnosi się do wariantu DMSO, prawa – cLTP. Porównywane liczby przedstawiają obliczone pole powierzchni dla danych części wykresu. Przeprowadzony test *t*-Studenta dla prób niezależnych wykazał wynik nieistotny statystycznie.

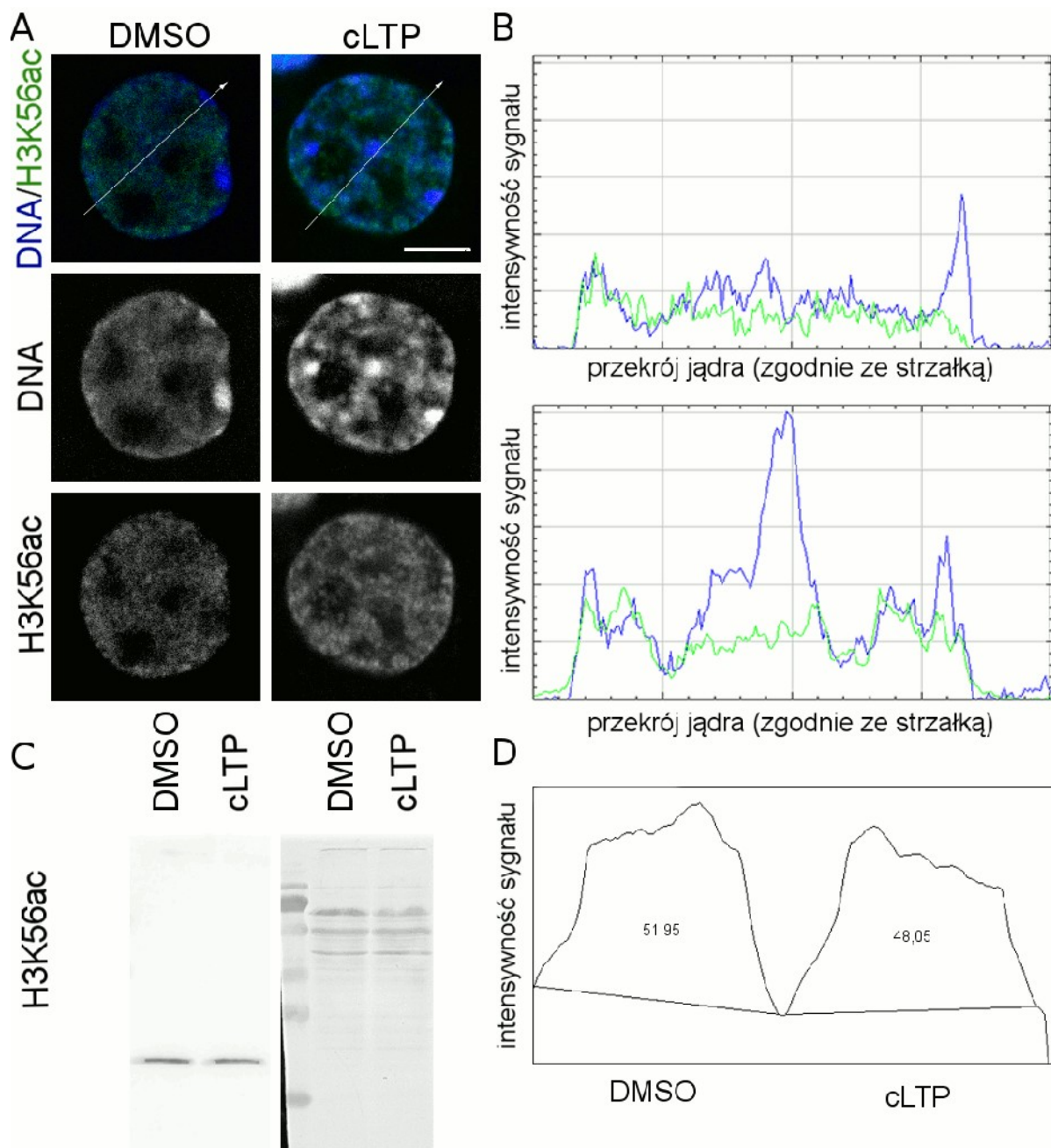


Rycina 16. (A) Immunodetekcja acetylacji lizyny 9 histonu H3 (H3K9ac) w kontrolnych (DMSO) lub stymulowanych (cLTP) neuronach hipokampalnych. Pierwszy wiersz przedstawia złożenie 5-ciu płaszczyzn w osi z, z nałożonymi na siebie sygnałami pochodzącymi z DNA (przedstawione na niebiesko) oraz H3K9ac (przedstawione na czerwono). Poniższe wiersze przedstawiają osobno: barwienie DNA, barwienie immunofluorescencyjne na H3K9ac. Skala, 5 μm .

(B) Intensywność sygnału fluorescencyjnego w 8-bitowej skali szarości (0-255), pochodzącego z barwienia DNA (uwidocznione na niebiesko) i barwienia H3K9ac (uwidocznione na czerwono). Na górnym wykresie przedstawiono wartości dla wariantu DMSO, na dolnym – dla cLTP. Osie x reprezentują przekroje jąder, zgodne z zaznaczeniem strzałki.

(C) Wynik metody western blot z przeciwciałem rozpoznającym modyfikację H3K9ac (z lewej, oznaczono czarnym prostokątem) oraz barwienie całkowitego białka przeprowadzone na tej samej membranie przy pomocy odczynnika Ponceau (po prawej stronie). Do pierwszej kolumny podano lizat białkowy z wariantu DMSO, do drugiej – cLTP.

(D) Densytometryczna analiza intensywności sygnału, pochodzącego z detekcji H3K9ac. Lewa część wykresu odnosi się do wariantu DMSO, prawa – cLTP. Porównywane liczby przedstawiają obliczone pole powierzchni dla danych części wykresu. Przeprowadzony test *t*-Studenta dla prób niezależnych wykazał wynik nieistotny statystycznie.



Rycina 17. (A) Immunodetekcja acetylacji lizyny 56 histonu H3 (H3K56ac) w kontrolnych (DMSO) lub stymulowanych (cLTP) neuronach hipokampalnych. Pierwszy wiersz przedstawia złożenie 5-ciu płaszczyzn w osi z, z nałożonymi na siebie sygnałami pochodzącymi z DNA (przedstawione na niebiesko) oraz H3K56ac (przedstawione na czerwono). Poniższe wiersze przedstawiają osobno: barwienie DNA, barwienie immunofluorescencyjne na H3K56ac. Skala, 5 μ m.

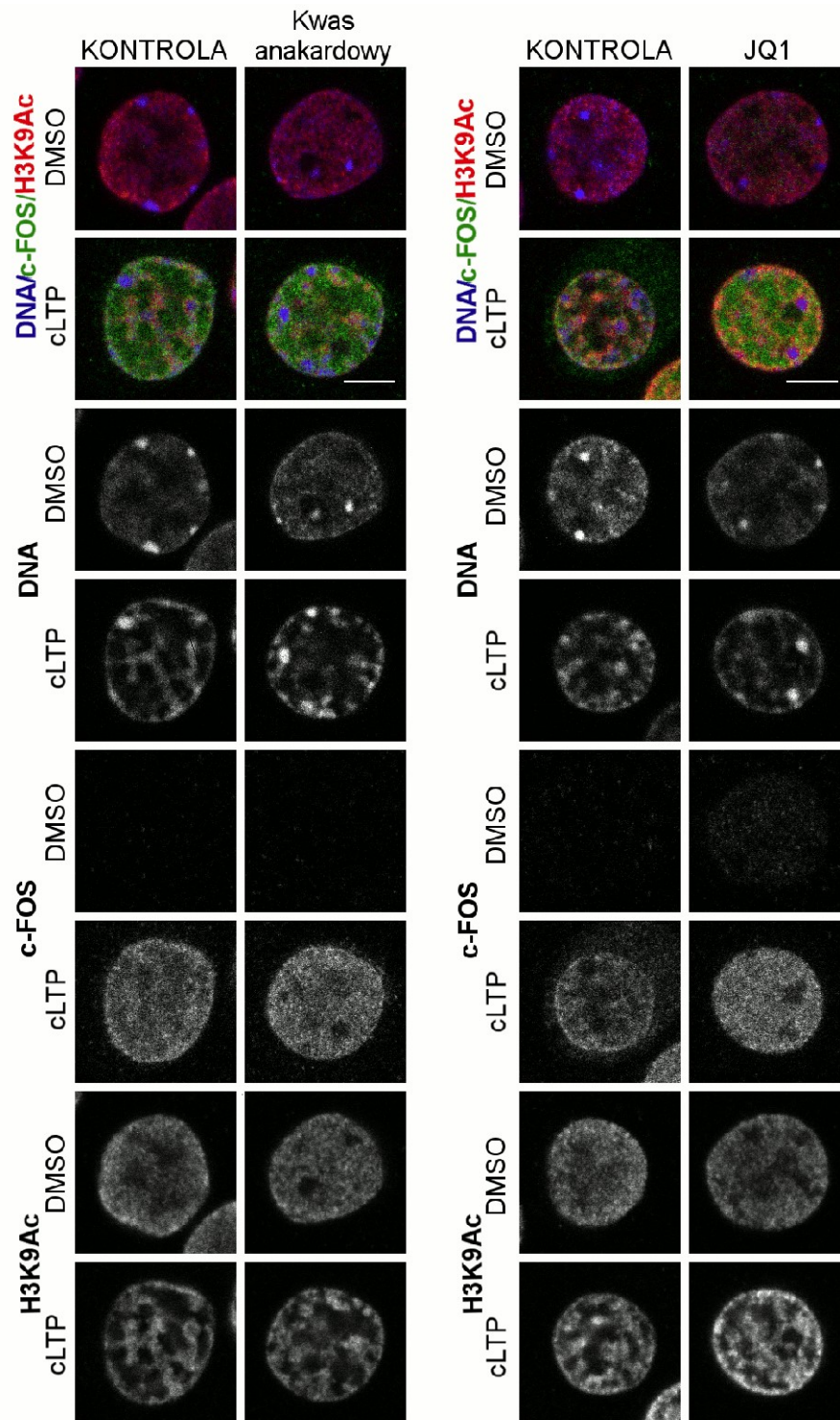
(B) Intensywność sygnału fluorescencyjnego w 8-bitowej skali szarości (0-255), pochodzącego z barwienia DNA (uwidocznione na niebiesko) i barwienia H3K56ac (uwidocznione na czerwono). Na górnym wykresie przedstawiono wartości dla wariantu DMSO, na dolnym – dla cLTP. Osie x reprezentują przekroje jąder, zgodne z zaznaczeniem strzałki.

(C) Wynik metody western blot z przeciwciałem rozpoznającym modyfikację H3K56ac (z lewej, oznaczono czarnym prostokątem) oraz barwienie całkowitego białka przeprowadzone na tej samej membranie przy pomocy odczynnika Ponceau (po prawej stronie). Do pierwszej kolumny podano lizat białkowy z wariantu DMSO, do drugiej – cLTP.

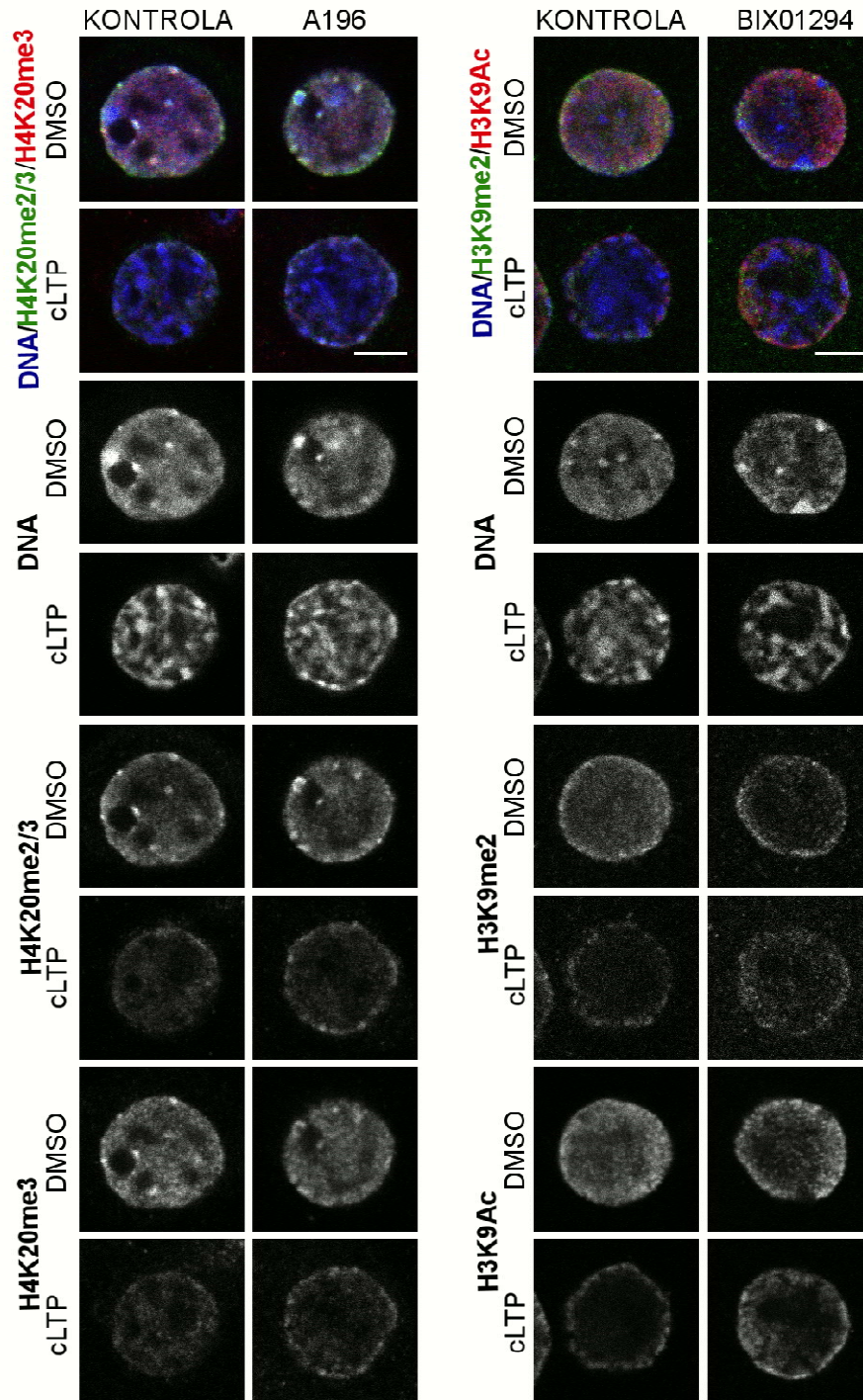
(D) Densytometryczną analizę intensywności sygnału, pochodzącego z detekcji H3K56ac. Lewa część wykresu odnosi się do wariantu DMSO, prawa – cLTP. Porównywane liczby przedstawiają obliczone pole powierzchni dla danych części wykresu. Przeprowadzony test *t*-Studenta dla prób niezależnych wykazał wynik nieistotny statystycznie.

4.6. Zahamowanie działania enzymów przeprowadzających potranslacyjne modyfikacje histonów nie blokuje rearanżacji chromatyny

Bazując na powyższych wynikach podjęto próbę wyjaśnienia mechanizmu, odpowiedzialnego za globalną rearanżację chromatyny po pobudzeniu. Zaczęto od sprawdzenia inhibitorów blokujących enzymy odpowiedzialne za odczytywanie, zapisywanie lub usuwanie potranslacyjnych modyfikacji histonów. Wybrano następujące odczynniki: kwas anakardowy (inhibitor acetylotransferazy histonowej p300/CBP), JQ1 (inhibitor wiązania bromodomen z acetylowanymi histonami), a także BIX 01294 (inhibitor metylotransferazy G9a) i A196 (inhibitor metylotransferaz SUV420H1 i SUV420H2). Jednak żaden z użytych inhibitorów nie zablokował kondensacji chromatyny po pobudzeniu cLTP (ryc. 18 i 19). Nie zaobserwowano również zmian w lokalizacji określonych modyfikacji histonów (ryc. 18 i 19). Dane literaturowe wskazują ponadto, że inhibitor JQ1 zakłóca działanie super-wzmacniaczy (ang. *Super-Enhancer*, SE) – skupisko wzmacniaczy zaangażowanych w regulację wielu kluczowych genów w neuronach, w tym genu wczesnej odpowiedzi *c-Fos*. (Joo i wsp. 2015). Jednak po traktowaniu hodowli odczynnikiem JQ1 ani globalna kondensacja chromatyny, ani ekspresja genu *c-Fos* nie uległa zmianie (ryc. 18). Sugeruje to, że obserwowana rearanżacja chromatyny wywołana aktywacją neuronów nie jest zależna od regulacji potranslacyjnych modyfikacji histonów ani aktywacji super-wzmacniaczy.



Rycina 18. Immunodetekcja acetylacji lizyny 9 histonu H3 (H3K9ac) oraz markera aktywacji białka c-FOS w kontrolnych (DMSO) lub stymulowanych (cLTP) neuronach hipokampalnych. Z lewej strony pokazano komórki preinkubowane z kwasem anakardowym (kolumna po prawej) lub buforem służącym do jego rozpuszczenia (KONTROLA). Z prawej pokazano komórki preinkubowane z inhibitorem JQ1 (kolumna po prawej) lub buforem służącym do jego rozpuszczenia (KONTROLA). Górne wiersze przedstawiają wariant inhibitora z DMSO, dolne – z cLTP. Górny panel przedstawia złożenie 5-ciu płaszczyzn w osi z, z nałożonymi na siebie kanałami: DNA znakowanym Hoechst (przedstawiony na niebiesko), markera pobudzenia neuronów - białka c-FOS (przedstawiony na zielono) i acetylacji histonu H3 na lizynie 9 (przedstawiony na czerwono). Niższe panele przedstawiają kolejno: barwienie DNA, barwienie immunofluorescencyjne na białko c-FOS i H3K9ac. Skala, 5 μm .

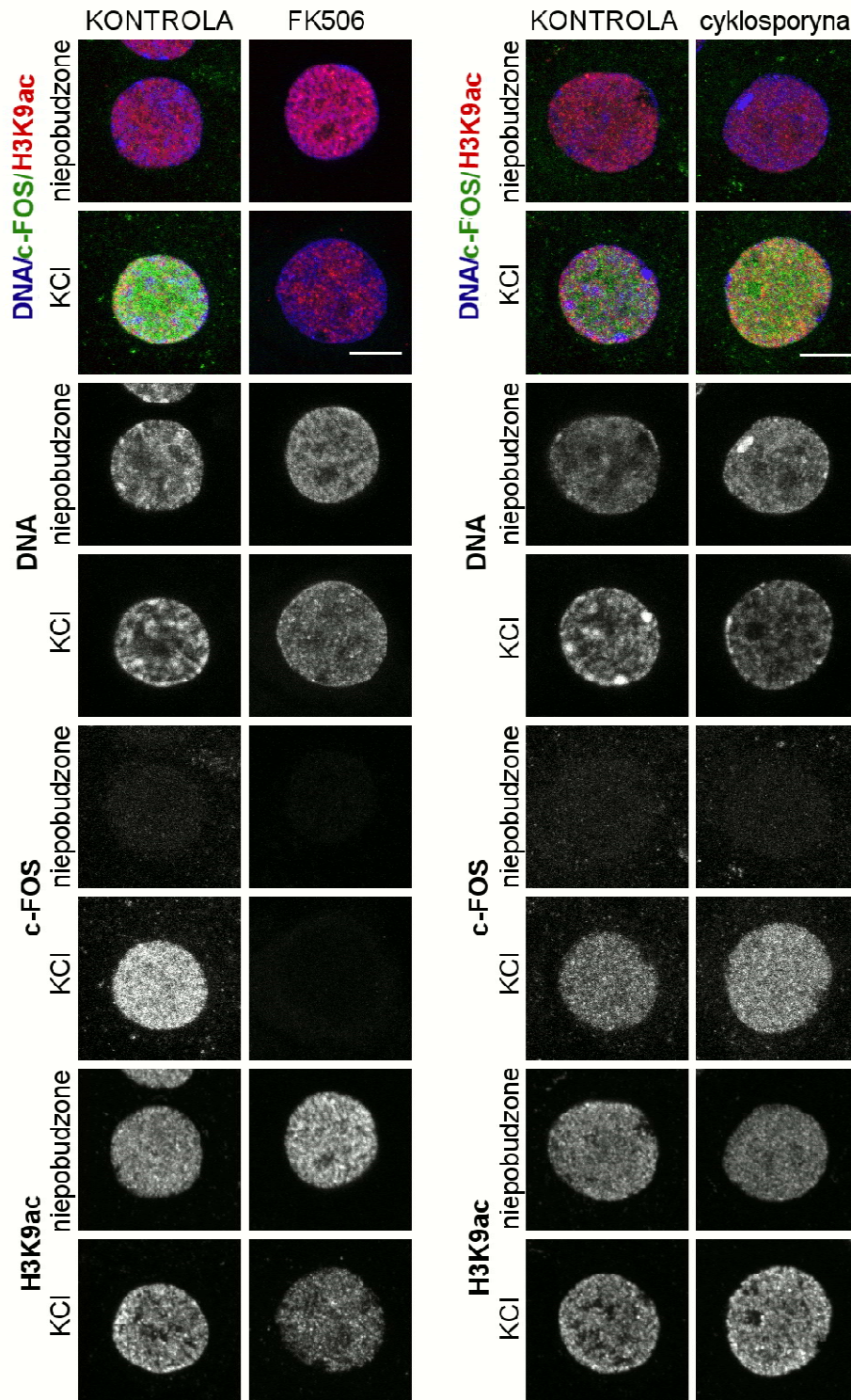


Rycina 19. Immunodetekcja di- i trimetylacji lizyny 20 histonu H4 lub dimetylacji lizyny 9 histonu H3 oraz trimetylacji lizyny 20 histonu H4 lub acetylacji lizyny 9 histonu H3 w kontrolnych (DMSO) lub stymulowanych (cLTP) neuronach hipokampalnych. Z lewej pokazano komórki preinkubowane z inhibitorem A196 (kolumna po prawej) lub buforem służącym do jego rozpuszczenia (KONTROLA). Z prawej pokazano komórki preinkubowane z inhibitorem BIX1294 (kolumna po prawej) lub buforem służącym do jego rozpuszczenia (KONTROLA). Górne wiersze przedstawiają wariant inhibitora z DMSO, dolne – z cLTP. Górny panel przedstawia złożenie 5-ciu płaszczyzn w osi z, z nałożonymi na siebie kanałami: DNA znakowanym Hoechst (przedstawiony na niebiesko), markera di- i trimetylacji histonu H4 na lizynie 20 lub dimetylacji histonu H3 na lizynie 9 (przedstawione na zielono) i markera trimetylacji histonu H4 na lizynie 20 lub acetylacji histonu H3 na lizynie 9 (przedstawione na czerwono). Niższe panele przedstawiają kolejno: barwienie DNA, barwienie immunofluorescencyjne na białko c-FOS i H4K20me2/3, H4K20me3, H3K9me2 lub H3K9ac. Skala, 5 μ m.

4.7. Kondensacja chromatyny jest zależna od napływu jonów wapnia

Aby rozważyć możliwe ścieżki sygnałowe leżące u podstaw kondensacji chromatyny po pobudzeniu, zdecydowano się dodatkowo na zastosowanie dwóch różnych inhibitorów kalcyneuryny (FK506 oraz cyklosporyny). Kalcyneuryna jest zależną od kalmoduliny fosfatazą białkową serynowo-treoninową, aktywowaną przez jony wapnia. Uczestniczy w przekazywaniu sygnałów wewnątrzkomórkowych i moduluje aktywność innych białek, a także reguluje ekspresję genów odpowiedzi wczesnej (Qiu i Ghosh, 2008). W użytym wcześniej modelu aktywacji neuronów, zastosowane odczynniki bezpośrednio powodowały wzrost poziomu wewnątrzkomórkowego cAMP z pominięciem pierwotnej aktywacji kalcyneuryny. Z tego powodu zdecydowano się na wykorzystanie bardziej fizjologicznej ścieżki pobudzania neuronów i zastosowano stymulację komórek poprzez podanie jonów potasu, które w następstwie aktywują receptory NMDA i umożliwiają napływ jonów wapniowych do komórki, a w konsekwencji dalszą kaskadę sygnałową.

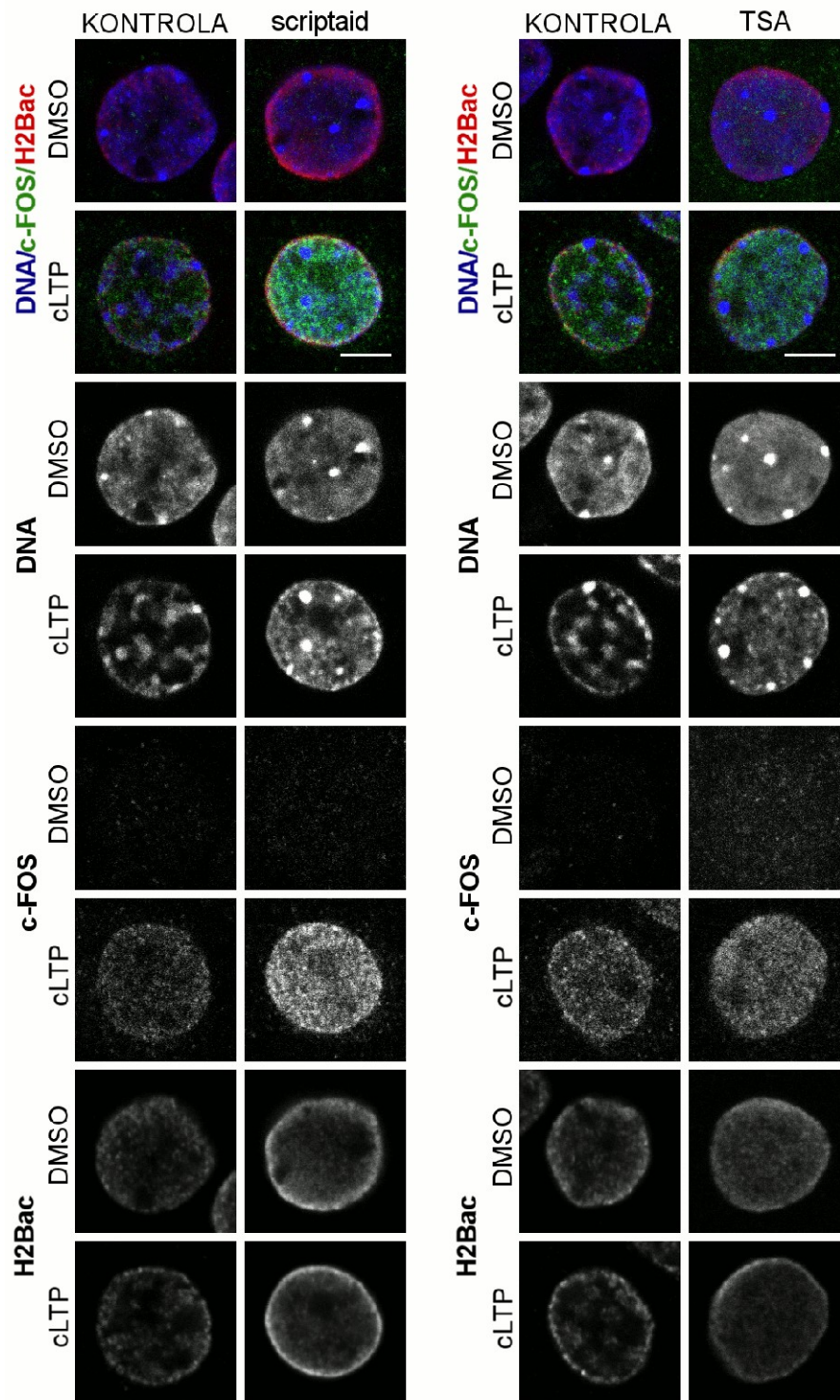
Zgodnie z intencją, zahamowanie kalcyneuryny przez inhibitor FK506 blokowało ekspresję genu *c-Fos*, a co ciekawe także całkowicie blokowało zależną od aktywacji reorganizację chromatyny (ryc. 20). W przypadku cyklosporyny, rearanżacja chromatyny również była zahamowana, choć w mniejszym stopniu, a białko c-FOS wciąż było produkowane. Nie zaobserwowano natomiast istotnych zmian w poziomie ani lokalizacji acetylacji lizyny 9 histonu H3 (H3K9ac). Uzyskane wyniki wskazują na kluczową rolę jonów wapnia w kondensacji chromatyny po stymulacji komórek.



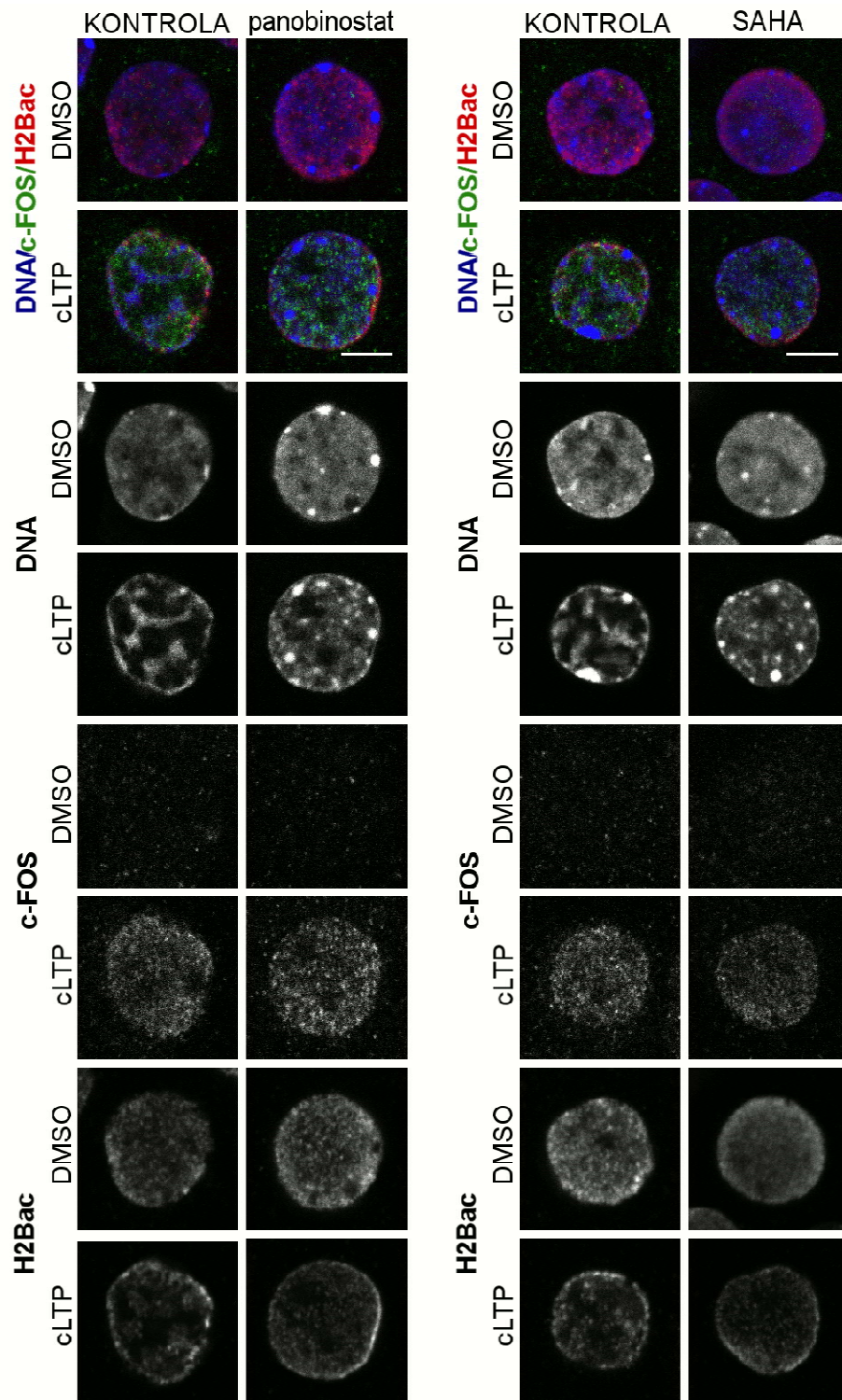
Rycina 20. Immunodetekcja acetylacji lizyny 9 histonu 3 (H3K9ac) oraz markera aktywacji białka c-FOS w kontrolnych (DMSO) lub stymulowanych (KCl) neuronach hipokampalnych. Z lewej pokazano komórki preinkubowane z inhibitorem FK506 (kolumna po prawej) lub buforem służącym do jego rozpuszczenia (KONTROLA). Z prawej pokazano komórki preinkubowane z inhibitorem cyklosporyną (kolumna po prawej) lub buforem służącym do jego rozpuszczenia (KONTROLA). Górne wiersze przedstawiają wariant inhibitora z DMSO, dolne – z cLTP. Górny panel przedstawia złożenie 5-ciu płaszczyzn w osi z, z nałożonymi na siebie kanałami: DNA znakowanym Hoechst (przedstawiony na niebiesko), markera pobudzenia neuronów - białka c-FOS (przedstawiony na zielono) i acetylacji lizyny 9 histonu H3 (przedstawiony na czerwono). Niższe panele przedstawiają kolejno: barwienie DNA, barwienie immunofluorescencyjne białka c-FOS i H3K9ac. Skala, 5 μ m.

4.8. Zablockowanie aktywności deacetylaz histonowych hamuje kondensację chromatyny

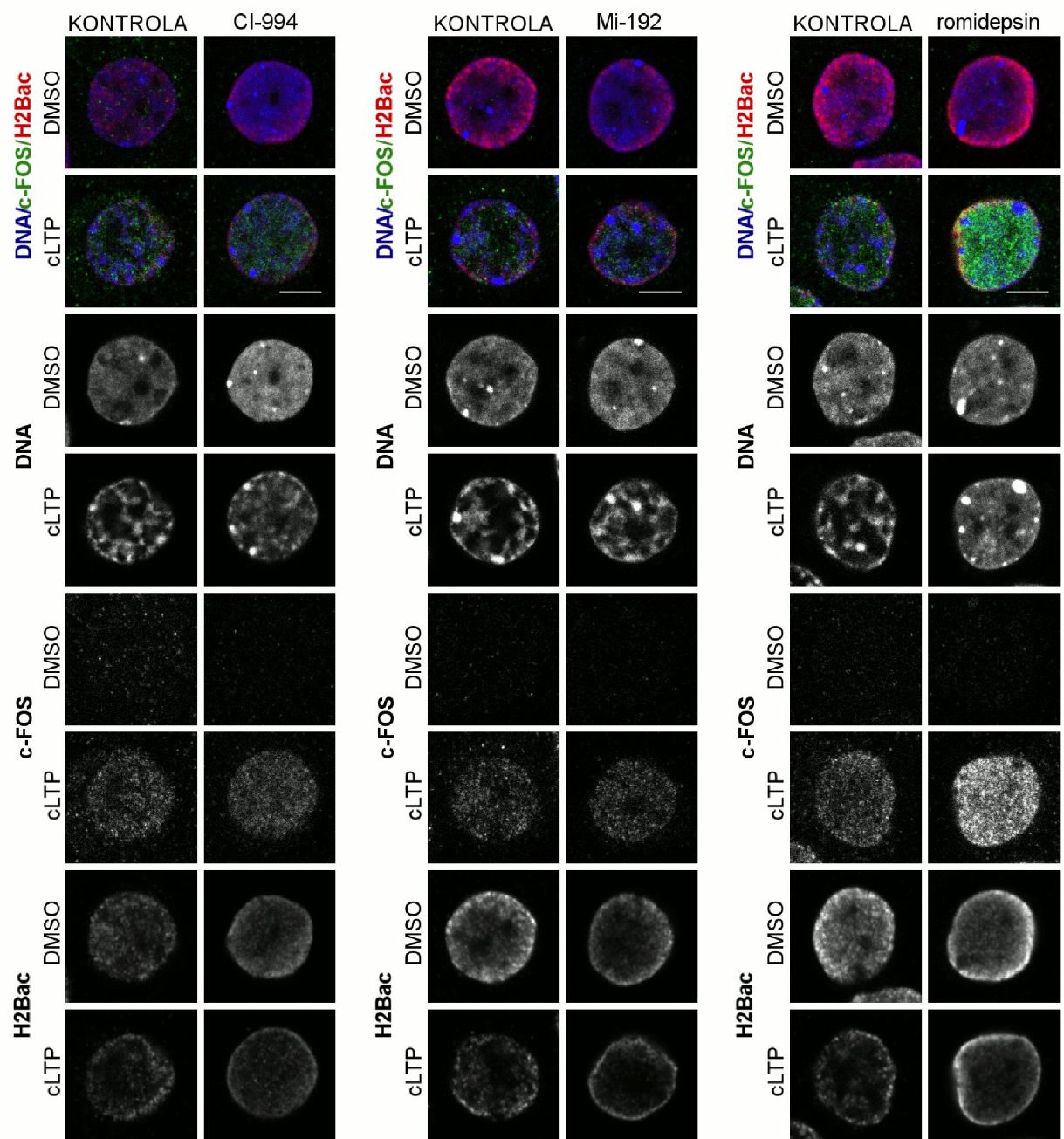
W następnym kroku zastosowano inhibitory deacetylaz histonowych (ang. *Histone Deacetylase*, HDAC) o szerokim spektrum– skryptaid i TSA, które całkowicie zahamowały kondensację chromatyny po pobudzeniu, nie blokując jednak ekspresji genu *c-Fos* (ryc. 21). W celu sprawdzenia wpływu podanych odczynników na poziom acetylacji zastosowano barwienie immunofluorescencyjne na acetylację histonu H2B. Zauważono niewielki wzrost w poziomie tej modyfikacji po zastosowaniu powyższych substancji (ryc. 21). Następnie, zdecydowano się zastosować inne, bardziej specyficzne inhibitory deacetylaz histonowych, jak panobinostat (inhibitor klasy I, IIa i IIb), SAHA (inhibitor klasy I i IIb), CI-994 (inhibitor klasy I), Mi-192 (inhibitor HDAC2 i HDAC3) oraz romidepsin (inhibitor HDAC1 i HDAC2). Większość zastosowanych inhibitorów zwiększała zarówno ekspresję genu *c-Fos*, jak i poziom acetylacji histonu H2B (ryc. 22 i 23). Ponadto zaobserwowano, że wszystkie odczynniki z wyjątkiem Mi-192 zahamowały zmiany strukturalne chromatyny w stymulowanych neuronach. Zastosowanie blokerów o różnej specyficzności umożliwiło zidentyfikowanie białka HDAC1, jako kluczowego elementu zaangażowanego w obserwowaną reorganizację chromatyny, dlatego zostało ono wybrane do dalszych badań.



Rycina 21. Immunodetekcja acetylacji histonu H2B (H2Bac) oraz markera aktywacji białka c-FOS w kontrolnych (DMSO) lub stymulowanych (cLTP) neuronach hipokampalnych. Z lewej pokazano komórki preinkubowane z inhibitorem skriptaid (kolumna po prawej) lub buforem służącym do jego rozpuszczenia (KONTROLA). Z prawej pokazano komórki preinkubowane z inhibitorem TSA (kolumna po prawej) lub buforem służącym do jego rozpuszczenia (KONTROLA). Górne wiersze przedstawiają wariant inhibitora z DMSO, dolne – z cLTP. Górny panel przedstawia złożenie 5-ciu płaszczyzn w osi z, z nałożonymi na siebie kanałami: DNA znakowanym Hoechst (przedstawiony na niebiesko), markera pobudzenia neuronów - białka c-FOS (przedstawiony na zielono) i acetylacji histonu H2B (przedstawiony na czerwono). Niższe panele przedstawiają kolejno: barwienie DNA, barwienie immunofluorescencyjne na białko c-FOS i H2Bac. Skala, 5 μ m.



Rycina 22. Immunodetekcja acetylacji histonu H2B (H2Bac) oraz markera aktywacji białka c-FOS w kontrolnych (DMSO) lub stymulowanych (cLTP) neuronach hipokampalnych. Z lewej pokazano komórki preinkubowane z inhibitorem panobinostat (kolumna po prawej) lub buforem służącym do jego rozpuszczenia (KONTROLA). Z prawej pokazano komórki preinkubowane z inhibitorem SAHA (kolumna po prawej) lub buforem służącym do jego rozpuszczenia (KONTROLA). Górne wiersze przedstawiają wariant inhibitora z DMSO, dolne – z cLTP. Górny panel przedstawia złożenie 5-ciu płaszczyzn w osi z, z nałożonymi na siebie kanałami: DNA znakowanym Hoechst (przedstawiony na niebiesko), markera pobudzenia neuronów - białka c-FOS (przedstawiony na zielono) i acetylacji histonu H2B (przedstawiony na czerwono). Niższe panele przedstawiają kolejno: barwienie DNA, barwienie immunofluorescencyjne na białko c-FOS i H2Bac. Skala, 5 μ m.



Rycina 23. Immunodetekcja acetylacji histonu H2B (H2Bac) oraz markera aktywacji białka c-FOS w kontrolnych (DMSO) lub stymulowanych (cLTP) neuronach hipokampalnych. Z lewej pokazano komórki preinkubowane z inhibitorem CI-994 (kolumna po prawej) lub buforem służącym do jego rozpuszczenia (KONTROLA). W środkowym panelu pokazano komórki preinkubowane z inhibitorem Mi-192 (kolumna po prawej) lub buforem służącym do jego rozpuszczenia (KONTROLA). Z prawej pokazano komórki preinkubowane z inhibitorem romidepsin (kolumna po prawej) lub buforem służącym do jego rozpuszczenia (KONTROLA). Górne wiersze przedstawiają wariant inhibitora z DMSO, dolne – z cLTP. Górny panel przedstawia złożenie 5-ciu płaszczyzn w osi z, z nałożonymi na siebie kanałami: DNA znakowanym Hoechst (przedstawiony na niebiesko), markera pobudzenia neuronów - białka c-FOS (przedstawiony na zielono) i acetylacji histonu H2B (przedstawiony na czerwono). Niższe panele przedstawiają kolejno: barwienie DNA, barwienie immunofluorescencyjne na białko c-FOS i H2Bac. Skala, 5 μm .

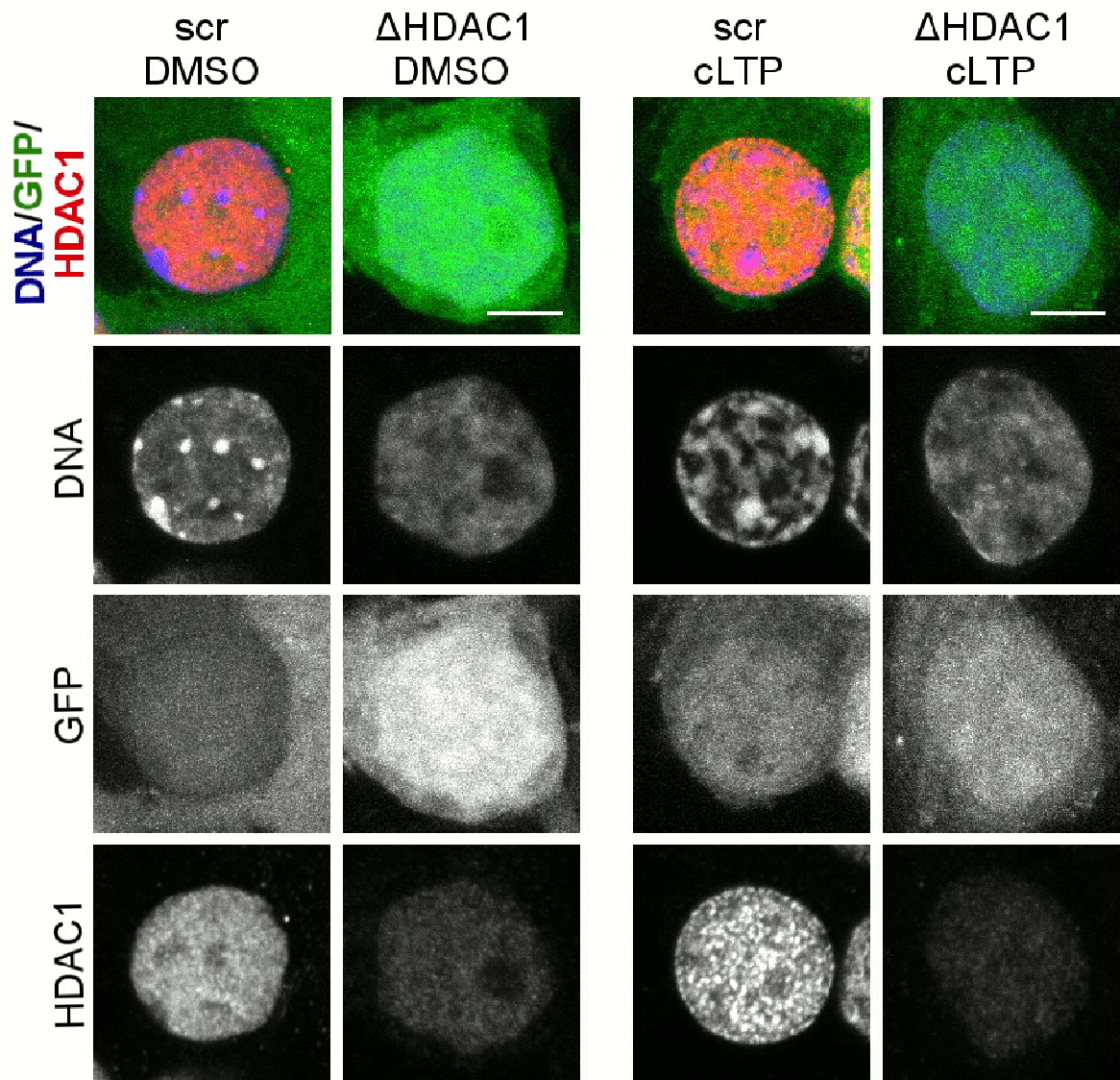
4.9. W rearanzacji chromatyny kluczową rolę odgrywa białko HDAC1

Za pomocą wektora lentiwirusowego, niosącego sekwencję spinki RNA (shRNA, ang. *Short Hairspin RNA*) specyficznej dla szczurzego białka HDAC1 i jednocześnie sekwencję białka zielonej fluorescencji (GFP, ang. *Green Fluorescence Protein*), udało się wyciszyć deacetylazę HDAC1 na poziomie zarówno transkryptu, jak i białka (ryc. 24, ryc. 25). Wynik ten ma potwierdzenie w podwyższonym poziomie acetylacji lizyny 56 histonu H3, która jest specyficznym substratem dla enzymu HDAC1 (Dovey i wsp. 2010).

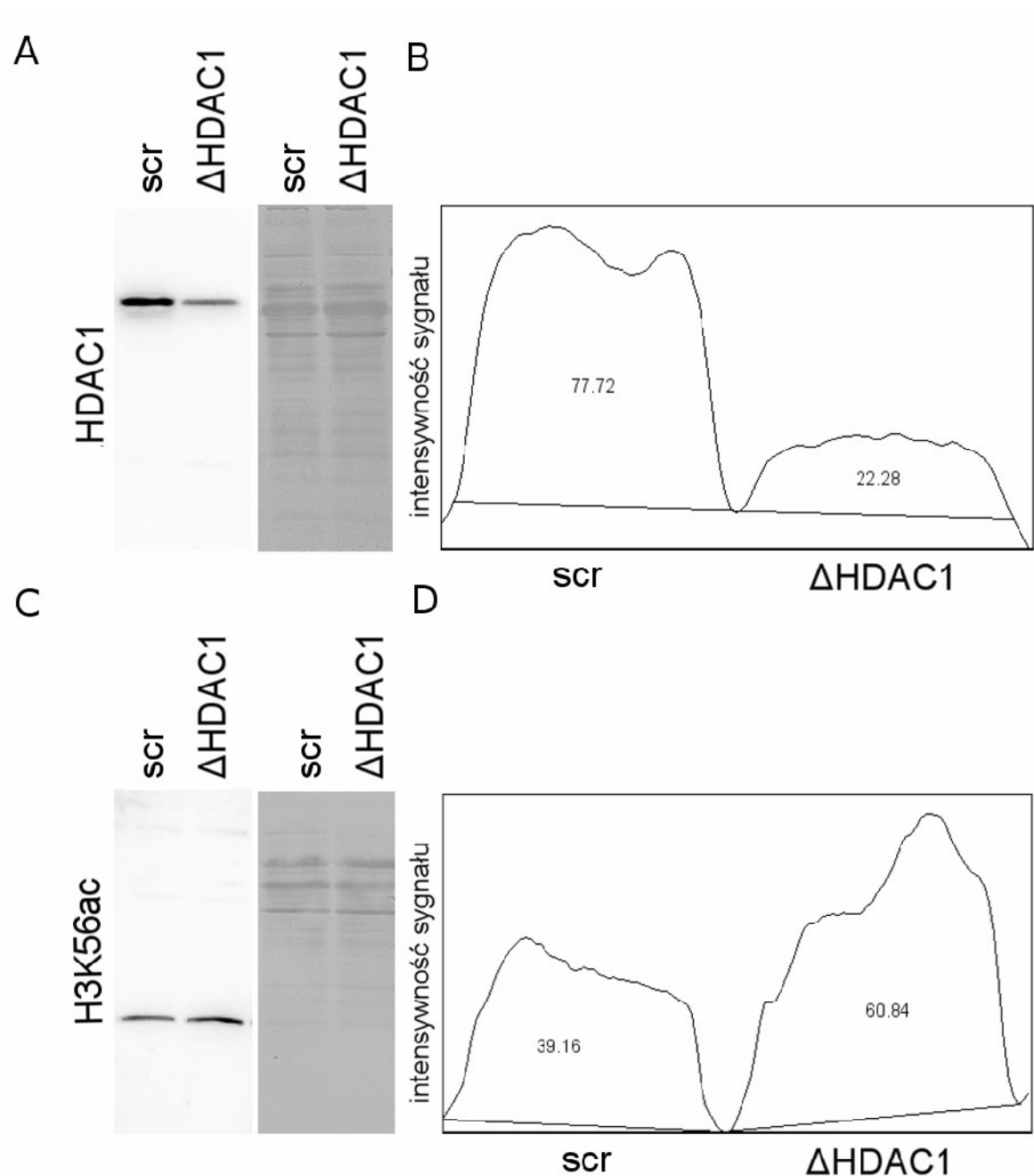
Przedstawione na rycinie dwudziestej czwartej (ryc. 24) dane pokazują, że po wyciszeniu ekspresji genu *Hdac1* w barwieniu chromatyny neuronów widać znaczną redukcję liczby skondensowanych foci DNA – zarówno w kontroli (Δ HDAC1, DMSO), jak i wariacie eksperymentalnym (Δ HDAC1, cLTP). Struktura chromatyny nie ulega rearanzacji po stymulacji neuronów. Przeprowadzona analiza ilościowa wskazuje na spadek objętości całkowitej chromatyny w jądrach komórek traktowanych wektorem kontrolnym na skutek indukcji LTP (scr, cLTP) o 14 pp., przy jednoczesnym braku takiej różnicy w przypadku komórek pozbawionych białka HDAC1 (Δ HDAC1, cLTP, wyk. 12). Dodatkowo, jądra komórek pozbawionych HDAC1 stawały się większe, a granice wybarwionego DNA mocno zatarte w porównaniu do wariantu transdukowanego wektorem kontrolnym (ryc. 24). Komórki z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko HDAC1 (Δ HDAC1) wykazywały większą średnicę jąder (średnio 16 μ m) w porównaniu do wariantu kontrolnego (13 μ m, wyk. 13). Przeanalizowano również liczbę i procentowy udział silnie skondensowanych ognisk chromatyny i chromocentrów – komórki pozbawione białka HDAC1 zawierały wyjściowo mniej chromocentrów (średnio 5 na jądro komórkowe), które zajmowały mniejszą objętość (1,1% objętości w stosunku do całego jądra) w porównaniu do wariantu kontrolnego (średnio 21 chromocentrów oraz 2,6% objętości, wyk. 14 i wyk. 15). Po indukcji LTP liczba silnie skondensowanych ognisk chromatyny i całkowita objętość również wzrastała, choć w mniejszym stopniu – w przypadku plazmidu niosącego wyciszające shRNA ich objętość wzrastała o 1,2 pp., a ich liczba zmieniała się średnio o 3 dodatkowe foci (w przypadku wariantu scr wzrost objętości wynosił 3,3 pp., a liczba średnio rosła o 17 skondensowanych foci, wyk. 14 i wyk. 15).

Aby udowodnić, że białko HDAC1 jest niezbędne do kondensacji chromatyny, przeprowadzono eksperyment z przywracaniem funkcji białka. W tym celu użyto plazmidu, zawierającego ludzką wersję białka HDAC1, wyznakowaną czerwonym białkiem fluorescencyjnym (ang. *Red Fluorescent Protein*, RFP). Sekwencja ludzkiego białka nie jest

podatna na działanie zastosowanej spinki RNA specyficznej dla szczurzej sekwencji HDAC1, dlatego udało się z powodzeniem przywrócić funkcję białka HDAC1 w komórkach traktowanych shRNA dla HDAC1, jak również kondensację chromatyny po stymulacji neuronów (ryc. 26). Komórki z przywróconą funkcją białka HDAC1 wykazały podobny spadek całkowitej objętości chromatyny po pobudzeniu – 16 pp. w przypadku wariantu kontrolnego oraz 10 pp. dla komórek z wcześniejszym wyciszeniem białka HDAC1 (wyk. 16). Dodatkowo, nie wykazywały istotnych różnic między średnicami jąder (wyk. 17). Po przywróceniu funkcji białka HDAC1 i stymulacji cLTP, zarówno w wariacie kontrolnym, jak i wyciszającym następował wzrost objętości chromocentrow i silnie skondensowanych ognisk chromatyny o 2,7 pp. (wyk. 18) oraz ich liczby o 31 nowych chromocentrow dla wariantu kontrolnego i 22 – dla wariantu Δ HDAC1 (wyk 19). Wszystkie te wyniki pokazują istotną rolę deacetylazy histonowej HDAC1 w regulacji organizacji chromatyny stymulowanej pobudzeniem neuronów.



Rycina 24. Obraz jąder neuronów hipokampalnych z mikroskopu konfokalnego LSM 780 po zastosowaniu transdukcji wyciszającej białko HDAC1. Lewy panel przedstawia komórki niestymulowane po zastosowaniu wirusa kontrolnego (scr DMSO) i wyciszającego ekspresję genu *Hdac1* (Δ HDAC1 DMSO), prawy – komórki stymulowane po zastosowaniu wirusa kontrolnego (scr cLTP) i wyciszającego ekspresję genu *Hdac1* (Δ HDAC1 cLTP). Najwyższy wiersz przedstawia złożenie 5-ciu płaszczyzn w osi z, z nałożonymi na siebie kanałami: DNA znakowanym Hoechst (przedstawiony na niebiesko), markera transdukcji - białka GFP (przedstawiony na zielono) i wybarwionego białka HDAC1 (przedstawionym na czerwono). Niższe panele przedstawiają kolejno: barwienie DNA, detekcję białka GFP oraz barwienie immunofluorescencyjne na białko HDAC1. Skala, 5 μ m.



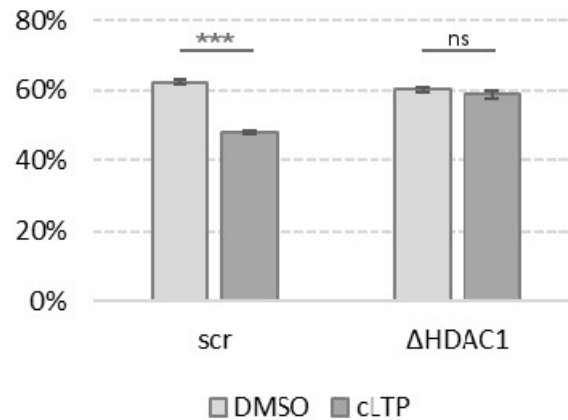
Rycina 25. (A) Wynik metody western blot z przeciwciałem rozpoznającym białko HDAC1 (z lewej strony) oraz barwienie całkowitego białka przeprowadzone na tej samej membranie przy pomocy odczynnika Ponceau (po prawej stronie). Do pierwszej kolumny podano lizat białkowy z wariantu scr, do drugiej - Δ HDAC1.

(B) Densytometryczna analiza intensywności sygnału, pochodzącego z detekcji białka HDAC1. Lewa część wykresu odnosi się do wariantu scr, prawa - Δ HDAC1. Porównywane liczby przedstawiają obliczone pole powierzchni dla danych części wykresu. Przeprowadzony test *t*-Studenta dla prób niezależnych wykazał wynik o istotności statystycznej $p < 0,001$ (***)

(C) Wynik metody western blot z przeciwciałem rozpoznającym modyfikację H3K56ac (z lewej strony) oraz barwienie całkowitego białka przeprowadzone na tej samej membranie przy pomocy odczynnika Ponceau (po prawej stronie). Do pierwszej kolumny podano lizat białkowy z wariantu scr, do drugiej - Δ HDAC1.

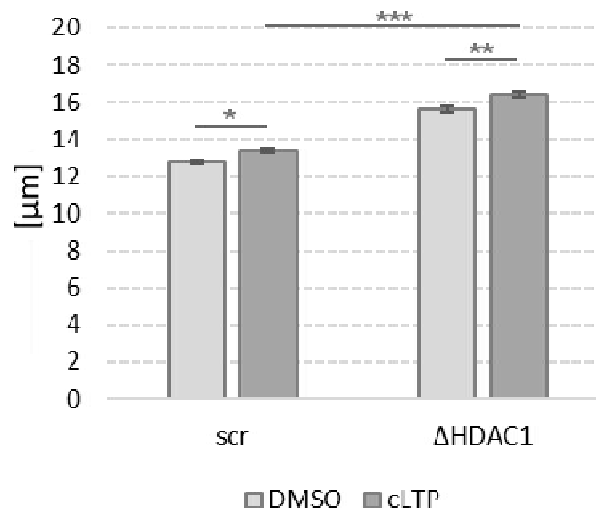
(D) Densytometryczna analiza intensywności sygnału, pochodzącego z detekcji H3K56ac. Lewa część wykresu odnosi się do wariantu scr, prawa - Δ HDAC1. Porównywane liczby przedstawiają obliczone pole powierzchni dla danych części wykresu. Przeprowadzony test *t*-Studenta dla prób niezależnych wykazał wynik o istotności statystycznej $p < 0,01$ (**).

Całkowita objętość DNA w jądrze komórkowym po wyciszeniu białka HDAC1



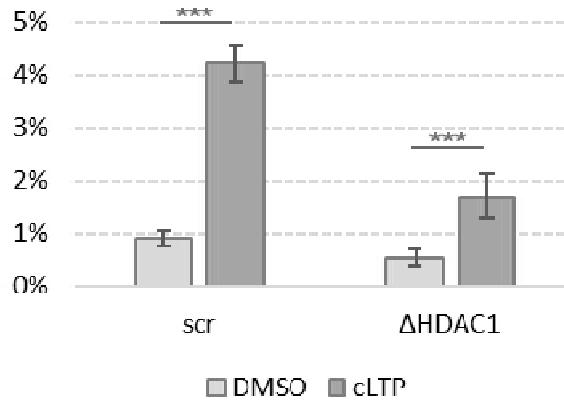
Wykres 12. Analiza ilościowa całkowitej objętości DNA w jądrze komórkowym neuronów kontrolnych (DMSO) i stymulowanych (cLTP) transdukowanych plazmidem kontrolnym (scr) lub wyciszającym białko HDAC1 (Δ HDAC1). Analiza została oparta na sygnale z barwienia Hoechst i przeprowadzona na wysegmentowanych jądrach z 3 niezależnych eksperymentów. Wyniki zostały przedstawione, jako procentowy udział chromatyny w stosunku do objętości całego jądra. Na osi x zaznaczono wariant plazmidu kontrolnego (scr) lub wyciszającego (Δ HDAC1). Na osi y przedstawiono wartość procentową objętości jądra komórkowego. Słupki błędów wyrażają wartość SEM, gwiazdki reprezentują test Kruskala-Wallisa, w którym wartość istotności statystycznej $p < 0,001$ jest pokazana jako ***. Skrót „ns” oznacza różnice nieistotne statystycznie.

Średnica jąder komórkowych po wyciszeniu białka HDAC1



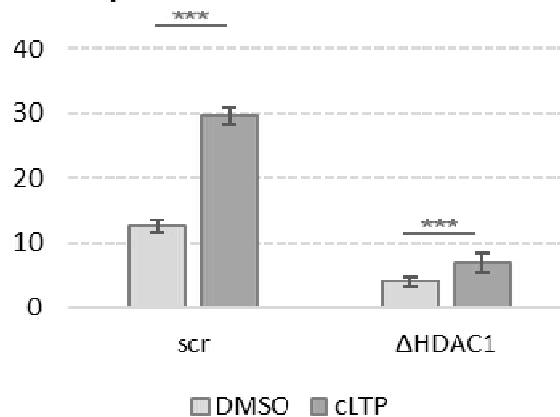
Wykres 13. Analiza ilościowa średnicy jąder komórkowych neuronów kontrolnych (DMSO) i stymulowanych (cLTP) transdukowanych plazmidem kontrolnym (scr) lub wyciszającym białko HDAC1 (Δ HDAC1). Analiza została oparta na sygnale z barwienia Hoechst i przeprowadzona na wysegmentowanych jądrach z 3 niezależnych eksperymentów. Na osi x zaznaczono wariant plazmidu kontrolnego (scr) lub wyciszającego (Δ HDAC1). Na osi y przedstawiono wartość liczbową wyrażoną w μm . Słupki błędów wyrażają wartość SEM, gwiazdki reprezentują test Kruskala-Wallisa, w którym wartość istotności statystycznej $p < 0,05$ jest pokazana jako *, $p < 0,01$ jako ** i $p < 0,001$ jako ***.

Objętość najmocniej świecących miejsc DNA w jądrze komórkowym po wyciszeniu białka HDAC1

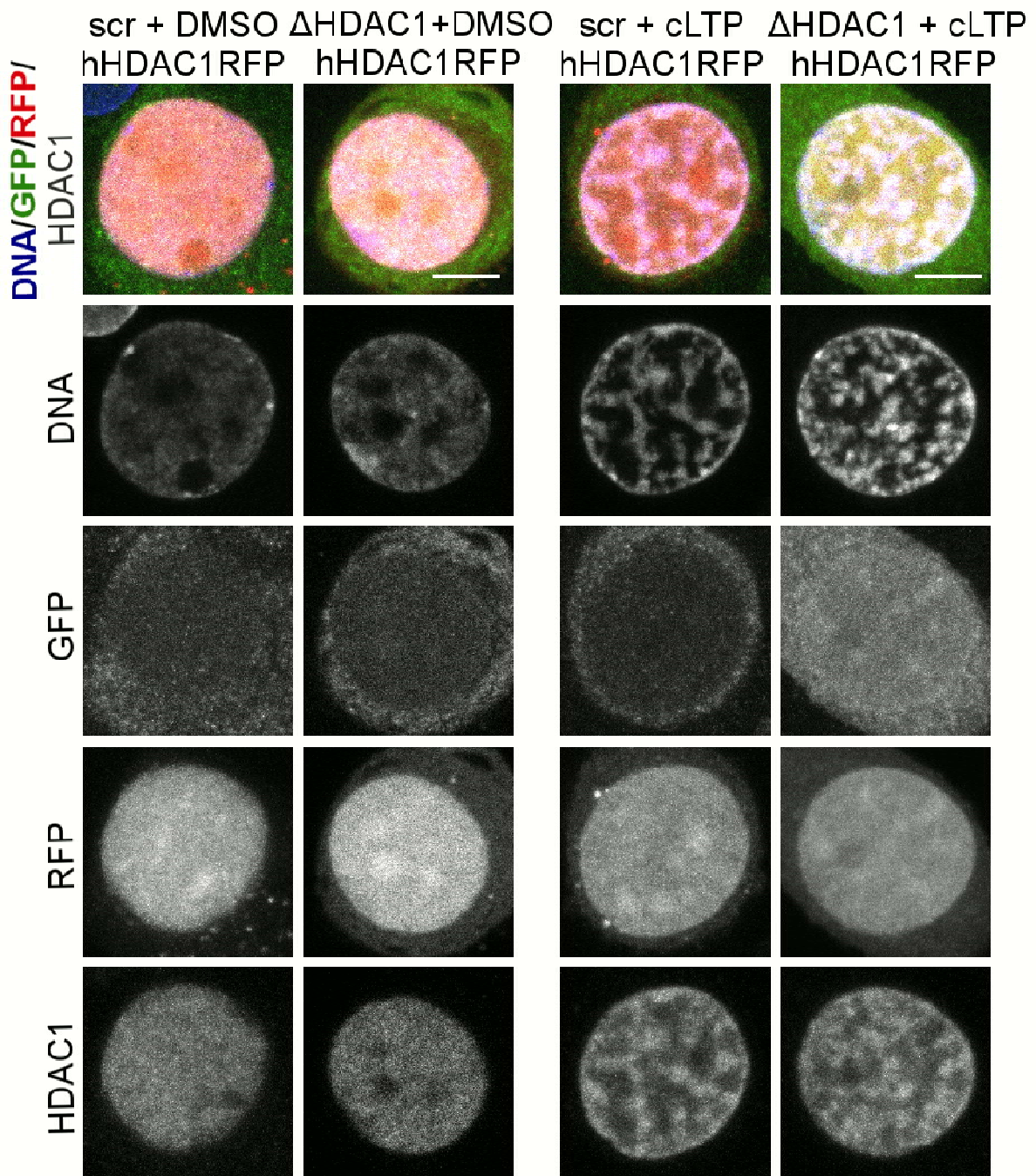


Wykres 14. Analiza ilościowa całkowitej objętości chromocentrów i silnie skondensowanych ognisk chromatyny w jądrze komórkowym neuronów kontrolnych (DMSO) i stymulowanych (cLTP) transdukowanych plazmidem kontrolnym (scr) lub wyciszającym białko HDAC1 (Δ HDAC1). Analiza została oparta na sygnale z barwienia Hoechst i przeprowadzona na wysegmentowanych jądrach z 3 niezależnych eksperymentów. Wyniki zostały przedstawione, jako procentowy udział chromocentrów i silnie skondensowanych ognisk chromatyny w stosunku do objętości całego jądra. Na osi x zaznaczono wariant plazmidu kontrolnego (scr) lub wyciszającego (Δ HDAC1). Na osi y przedstawiono wartość procentową objętości jądra komórkowego. Słupki błędów wyrażają wartość SEM, gwiazdki reprezentują test Kruskala-Wallisa, w którym wartość istotności statystycznej $p < 0,001$ jest pokazana jako ***.

Średnia liczba najmocniej świecących miejsc DNA w jądrze komórkowym po wyciszeniu białka HDAC1

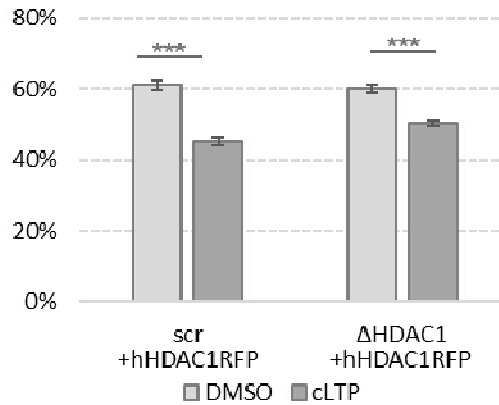


Wykres 15. Analiza ilościowa średniej liczby chromocentrów i silnie skondensowanych ognisk chromatyny w jądrze komórkowym neuronów kontrolnych (DMSO) i stymulowanych (cLTP) transdukowanych plazmidem kontrolnym (scr) lub wyciszającym białko HDAC1 (Δ HDAC1). Analiza została oparta na sygnale z barwienia Hoechst i przeprowadzona na wysegmentowanych jądrach z 3 niezależnych eksperymentów. Na osi x zaznaczono wariant plazmidu kontrolnego (scr) lub wyciszającego (Δ HDAC1). Na osi y przedstawiono wartość liczbową. Słupki błędów wyrażają wartość SEM, gwiazdki reprezentują test Kruskala-Wallisa, w którym wartość istotności statystycznej $p < 0,001$ jest pokazana jako ***.



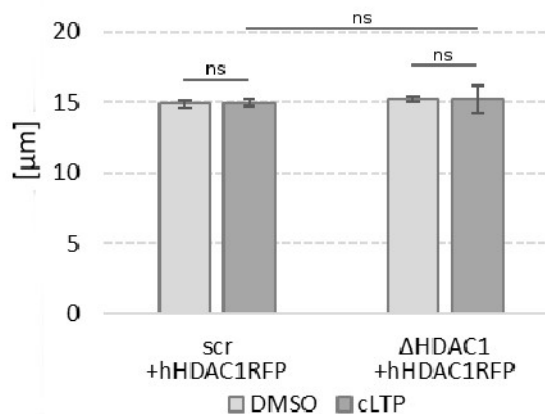
Rycina 26. Obraz jąder neuronów hipokampalnych z mikroskopu konfokalnego LSM 780 po zastosowaniu transdukcji wyciszającej białko HDAC1, a następnie podaniu plazmidu zawierającego ludzkie białko HDAC1. Lewy panel przedstawia komórki niestymulowane po zastosowaniu wirusa kontrolnego (scr DMSO) i wyciszającego ekspresję genu *Hdac1* (Δ HDAC1 DMSO). Do obydwu wariantów podano plazmid zawierający ludzkie białko HDAC1. Prawy panel przedstawia komórki stymulowane po zastosowaniu wirusa kontrolnego (scr cLTP) i wyciszającego ekspresję genu *Hdac1* (Δ HDAC1 cLTP). Do obydwu wariantów również podano plazmid zawierający ludzkie białko HDAC1. Najwyższy wiersz przedstawia złożenie 5-ciu płaszczyzn w osi z, z nałożonymi na siebie kanałami: DNA znakowanym Hoechst (przedstawiony na niebiesko), markera transdukcji - białka GFP (przedstawiony na zielono), markera udanej transfekcji - białka RFP (przedstawiony na czerwono) i wybarwionego białka HDAC1 (przedstawionym na szaro). Niższe panele przedstawiają kolejno: barwienie DNA, detekcję białka GFP, detekcję białka RFP oraz barwienie immunofluorescencyjne na białko HDAC1. Skala, 5 μ m.

Całkowita objętość chromatyny w jądrze komórkowym po przywróceniu funkcji białka HDAC1



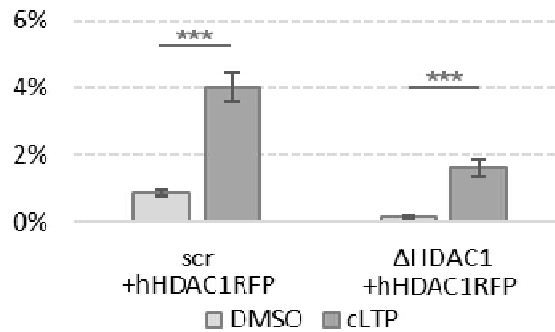
Wykres 16. Analiza ilościowa całkowitej objętości chromatyny w jądrze komórkowym neuronów kontrolnych (DMSO) i stymulowanych (cLTP) transdukowanych plazmidem kontrolnym (scr) lub wyciszającym białko HDAC1 (Δ HDAC1) oraz po zastosowaniu transfekcji przywracającej funkcję białka HDAC1. Analiza została oparta na sygnale z barwienia Hoechst i przeprowadzona na wysegmentowanych jądrach z 3 niezależnych eksperymentów. Wyniki zostały przedstawione, jako procentowy udział chromatyny w stosunku do objętości całego jądra. Na osi x zaznaczono wariant plazmidu kontrolnego (scr) lub wyciszającego (Δ HDAC1), po których podano wektor przywracający funkcję białka HDAC1. Na osi y przedstawiono wartość procentową objętości jądra komórkowego. Słupki błędów wyrażają wartość SEM, gwiazdki reprezentują test Kruskala-Wallisa, w którym wartość istotności statystycznej $p < 0,001$ jest pokazana jako ***.

Średnica jąder komórkowych po przywróceniu funkcji białka HDAC1



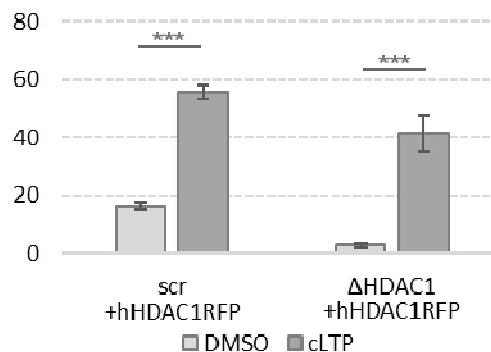
Wykres 17. Analiza ilościowa średnicy jąder komórkowych neuronów kontrolnych (DMSO) i stymulowanych (cLTP) transdukowanych plazmidem kontrolnym (scr) lub wyciszającym białko HDAC1 (Δ HDAC1) oraz po zastosowaniu transfekcji przywracającej funkcję białka HDAC1. Analiza została oparta na sygnale z barwienia Hoechst i przeprowadzona na wysegmentowanych jądrach z 3 niezależnych eksperymentów. Na osi x zaznaczono wariant plazmidu kontrolnego (scr) lub wyciszającego (Δ HDAC1), po których podano wektor przywracający funkcję białka HDAC1. Na osi y przedstawiono wartość liczbowa wyrażoną w μm . Słupki błędów wyrażają wartość SEM, gwiazdki reprezentują test Kruskala-Wallisa. Skrót „ns” oznacza różnice nieistotne statystycznie.

Objętość najmocniej świecących miejsc DNA w jądrze komórkowym po przywróceniu funkcji białka HDAC1



Wykres 18. Analiza ilościowa całkowitej objętości chromocentrow silnie skondensowanych ognisk chromatyny w jądrze komórkowym neuronów kontrolnych (DMSO) i stymulowanych (cLTP) transdukowanych plazmidem kontrolnym (scr) lub wyciszającym białko HDAC1 (Δ HDAC1) oraz po zastosowaniu transfekcji przywracającej funkcję białka HDAC1. Analiza została oparta na sygnale z barwienia Hoechst i przeprowadzona na wysegmentowanych jądrach z 3 niezależnych eksperymentów. Wyniki zostały przedstawione, jako procentowy udział chromocentrow w stosunku do objętości całego jądra. Na osi x zaznaczono wariant plazmidu kontrolnego (scr) lub wyciszającego (Δ HDAC1), po których podano wektor przywracający funkcję białka HDAC1. Na osi y przedstawiono wartość procentową objętości jądra komórkowego. Słupki błędów wyrażają wartość SEM, gwiazdki reprezentują test Kruskala-Wallisa, w którym wartość istotności statystycznej $p < 0,001$ jest pokazana jako ***.

Średnia liczba najmocniej świecących miejsc DNA w jądrze komórkowym po przywróceniu funkcji białka HDAC1



Wykres 19. Analiza ilościowa średniej liczby chromocentrow i silnie skondensowanych ognisk chromatyny w jądrach komórkowych neuronów kontrolnych (DMSO) i stymulowanych (cLTP) transdukowanych plazmidem kontrolnym (scr) lub wyciszającym białko HDAC1 (Δ HDAC1) oraz po zastosowaniu transfekcji przywracającej funkcję białka HDAC1. Analiza została oparta na sygnale z barwienia Hoechst i przeprowadzona na wysegmentowanych jądrach z 3 niezależnych eksperymentów. Na osi x zaznaczono wariant plazmidu kontrolnego (scr) lub wyciszającego (Δ HDAC1), po których podano wektor przywracający funkcję białka HDAC1. Na osi y przedstawiono wartość liczbową. Słupki błędów wyrażają wartość SEM, gwiazdki reprezentują test Kruskala-Wallisa, w którym wartość istotności statystycznej $p < 0,001$ jest pokazana jako ***.

5. Dyskusja

Postawiona w niniejszej pracy hipoteza zakłada, że reorganizacja struktury chromatyny neuronów indukowana pobudzeniem odgrywa istotną rolę w kształtowaniu plastyczności synaptycznej. Głównym celem pracy było wyjaśnienie molekularnego mechanizmu wywołującego zmiany w przestrzennej organizacji chromatyny, zachodzącego wskutek pobudzenia komórki nerwowej. Doświadczenia były przeprowadzane na hodowlach szczurzych neuronów hipokampalnych, stymulowanych mieszaniną forskoliny, rolipramu i pikrotoksyny, wywołującej chemiczne LTP. Uzyskane wyniki wykazały, że struktura chromatyny neuronów ziarnistych była poddawana większym i szybszym zmianom, niż w przypadku neuronów piramidowych. Rearanżacji chromatyny towarzyszyły zmiany w transkrypcji genów, lokalizacji potranslacyjnie modyfikowanych histonów i reorganizacja terytorium chromosomu 1. Ponadto, zmiany w organizacji chromatyny były zależne od napływu jonów wapnia do wnętrza komórki. Co więcej, w zmianę przestrzennej organizacji chromatyny okazało się być zaangażowane białko HDAC1.

5.1. Wady i zalety wybranego modelu doświadczalnego

Modelem służącym do przeprowadzenia badań doświadczalnych w tej pracy doktorskiej była hodowla pierwotna szczurzych neuronów hipokampalnych (Beaudoin i wsp. 2012). Hipokamp jest kluczową strukturą w mózgu dla uczenia się i konsolidacji pamięci, dlatego LTP bada się głównie w tym regionie (Sprick 1995, Kaczmarek 2018). Ze względu na wygodę i łatwość uzyskiwania hodowla pierwotna komórek nerwowych z hipokampa szczura jest powszechnie używanym modelem badań procesów zachodzących *in vivo* (Banker i Cowan 1977, Beaudoin i wsp. 2012, Michaluk i wsp. 2011). Jej jednowarstwowość umożliwia badanie pojedynczych jąder komórkowych oraz wygodny dostęp do synaps, w celu przeprowadzenia analiz cytochemicznych, natomiast wyniki eksperymentów są łatwe w obrazowaniu mikroskopowym po zastosowaniu technik fluorescencyjnych. W przeciwieństwie do eksperymentów przeprowadzanych na zwierzętach, prosta struktura hodowli pozwala na skupienie się na konkretnych mechanizmach ze znacznie mniejszą liczbą zmiennych. Można również założyć, że wszystkie badane komórki znajdują się w tej samej fazie cyklu komórkowego i są końcowo zróżnicowane, ponieważ wykazują ekspresję genu kodującego białko NeuN.

Istnieje wiele modeli pobudzania hodowli komórek nerwowych, w tym samego wywoływania chemicznego LTP (Molnar 2011). Różnią się one zastosowanymi odczynnikami i poruszonymi szlakami metabolicznymi, jednakże dane literaturowe wskazują na istotną rolę aktywacji receptorów NMDA i wzrostu wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia w każdym z nich (Molnar 2011). W niniejszej pracy zdecydowano się na pobudzanie komórek mieszaniną forskoliny, rolipramu i pikrotoksyny poprzez dodanie jej wprost do pożywki hodowlanej, zgodnie z opublikowanym protokołem (Szepesi i wsp. 2013). Takie postępowanie ma wyższość nad technikami elektrofizjologicznymi, ze względu na możliwość pobudzania ciągłym sygnałem wielu komórek jednocześnie, w przeciwieństwie do jednorazowej aktywacji poszczególnych synaps. Przyjęta taktyka daje sposobność do badania całej sieci równocześnie, a dodatkowo pomija się etap uciążliwego poszukiwania pojedynczych, pobudzonych komórek. Niebagatelne znaczenie ma również fakt, że w porównaniu do stymulacji glutaminianem, jonoforami wapniowymi, glicyną, czy antagonistami NMDA wybrany model wyróżnia się minimalną interwencją w ustaloną hodowlę komórkową, bez konieczności odplukiwania odczynników lub wymiany pożywki na bardziej specyficzny roztwór, np. pozbawiony jonów magnezu (Molnar 2011). Ponadto podawanie substancji wprost do pożywki ułatwia zastosowanie dodatkowych odczynników, jak np. wybranych inhibitorów, przy stałych warunkach hodowli.

Pobudzanie neuronów mieszaniną forskoliny, rolipramu i pikrotoksyny powoduje bezpośrednio wzrost wewnątrzkomórkowego cAMP, który aktywuje kinazę białkową A i szlaki sygnalizacyjne leżące u podstaw plastyczności synaptycznej. Wskazany dobór odczynników umożliwia jednak pominięcie fizjologicznego etapu LTP, którym jest napływ jonów wapniowych do wnętrza komórki. Stąd, obok podstawowego modelu pobudzania komórek, w niniejszej rozprawie zastosowano również stymulację jonami potasu, które aktywują receptory NMDA, a w następstwie powodują napływ jonów wapniowych do komórek i aktywację kinaz białkowych. Eksperyment ten wykazał podobną rearanżację chromatyny po pobudzeniu. Podobną kondensację chromatyny zależną od wapnia w neuronach hipokampalnych zauważono także w pracy Tao-Cheng i wsp. (2018) po stymulacji komórek jonami potasu lub receptorami NMDA.

W celu dodatkowej walidacji użytego modelu zastosowano wysokoprzepustowe sekwencjonowanie mRNA (RNAseq), co umożliwiło zidentyfikowanie 708 genów, których ekspresja wzrastała po stymulacji komórek. Wiele z nich należało do grupy genów odpowiedzi wczesnej, istotnych dla uczenia się, pamięci i innych funkcji poznawczych.

Warto zwrócić również uwagę na ekspresję genu *c-Fos*, czyli ekspresję genu natychmiastowej odpowiedzi wczesnej – kluczowego dla pamięci i uczenia (Fleischmann i wsp. 2003, Kaczmarek 2018). Publikacje opierające się na tym samym modelu wykazały ponadto zmianę struktury kolców dendrytycznych (Szepesi i wsp. 2013), aktywację i fosforylację kinazy CaMKII (Molnar 2011) oraz wzrost liczby receptorów AMPA w błonie postsynaptycznej (Molnar 2011), co razem sugeruje plastyczność neuronalną. Reasumując, skład zastosowanej w niniejszej pracy mieszaniny i badanie reakcji komórek sugeruje, że udało nam się aktywować bezpośrednio procesy biochemiczne odpowiadające za przeprowadzanie LTP w neuronach *in vitro*.

Oczywiście, jak każdy model doświadczalny wiąże się on z wieloma wadami (Molnar 2011). Podstawowym zarzutem jest tutaj konieczność pozyskiwania tkanki, pociągająca za sobą uśmiercanie szczurzych osesków. Innym mankamentem jest wysoka heterogenność poszczególnych hodowli – za każdym razem sieć neuronalna powstaje na nowo, różni się gęstością, zawartością gleju i samą tkanką, co podważa w pewnym stopniu powtarzalność eksperymentalną. Udowodniono, że gęstość hodowli może wpływać na różnicowanie i dojrzewanie sieci neuronalnej (Dąbrowski i wsp. 2003), a zawartość gleju pełni istotne funkcje w przeżywalności komórek (Moutin i wsp. 2020). W trakcie przeprowadzonych badań zauważono również, że sam fakt niewielkiej ingerencji w hodowlę komórkową, jak np. zmiana pożywki czy przenoszenie szalek, może mieć wpływ na pobudliwość neuronów. Niemniej, analiza uzyskanych w pracy wyników wykazała ich wysoką powtarzalność. Ostatecznie nie jest również jasne, jak utrata skomplikowanych interakcji w mózgu wpływa na proces samego LTP. W publikacji Grabowska, Sas-Nowosielska, Magalska i wsp. (2022) wykazano, że podobna rearanżacja chromatyny występuje w modelach *in vivo*, m.in. w neuronach piramidowych ciała migdałowatego szczurów poddanych warunkowaniu strachu, w neuronach ziarnistych szczurów po napadach drgawkowych indukowanych kwasem kainianowym lub po stymulacji LTP *in vivo*. Niewątpliwie wartościowe byłoby przeprowadzenie dalszych badań na modelach zwierzęcych i odniesienie wyników z obydwu strategii do ewentualnych zmian behawioralnych.

Podsumowując wszystkie przedstawione argumenty, mimo istniejących niedoskonałości, wskazują one na zasadność zastosowania wybranego modelu, w celu badania zmian w organizacji chromatyny po stymulacji neuronów.

5.2. Podział neuronów

W hipokampie znajduje się ponad 100 różnych typów neuronów, różniących się morfologią, rodzajami produkowanych neurotransmiterów, kształtem drzewek dendrytycznych i aksonalnych oraz specyficznością przenoszenia sygnałów (Wheeler i wsp. 2015). Możemy podzielić je funkcjonalnie na neurony pobudzające i hamujące, które różnią się rolą w przebiegu LTP (Wheeler i wsp. 2015). Zadaniem neuronów pobudzających jest przekazywanie i wzmacnianie sygnału, natomiast neuronów hamujących – zmniejszanie pobudliwości kolejnych komórek i w konsekwencji wyciszenie sygnału. Na uwagę zasługuje fakt, że choć po godzinie od stymulacji transkrypcja genów odpowiedzi wczesnej w komórkach pobudzających i hamujących jest bardzo zbliżona, to po dwóch godzinach wzór transkryptomu może okazać się całkiem odmienny (Yap i Greenberg 2018). Komórki piramidowe z regionu CA (łac. cornu ammonis) i ziarniste z regionu zakrętu zębatego (ang. *Dentate Gyrus*) są podstawowymi typami neuronów pobudzających w hipokampie (Digilio i wsp. 2015).

Neurony piramidowe wykazują charakterystyczną budowę ciała komórkowego w kształcie trójkąta, który daje początek długiemu i grubemu dendrytowi wierzchołkowemu i kilku mniejszym dendrytom podstawowym. W ten sposób komórki piramidowe przyjmują kształt dwustożkowy, a ich dendryty zorientowane w przeciwnych kierunkach mogą zbierać sygnały z szerokiego obszaru mózgu (Wheeler i wsp. 2015). Neurony piramidowe występują we wszystkich częściach hipokampa i są zaangażowane w wiele mechanizmów, związanych z integracją i przetwarzaniem informacji, regulowaniem aktywności hipokampa oraz przetwarzaniem emocji i procesów pamięciowych. Z kolei komórki ziarniste charakteryzują się jednostożkowym ciałem z wierzchołkowymi dendrytami skierowanymi w jedną stronę. Formują one gęste sieci synaptyczne i regulują przepływ informacji wewnątrz hipokampa. Komórki ziarniste występują głównie w zakręcie zębatym hipokampa. Z danych literaturowych wynika jednak, że w hodowli obydwa typy neuronów mogą wykazywać podobne wzory morfologiczne z pojedynczym dendrytem i kilkoma mniejszymi, które w komórkach ziarnistych *in vivo* zostałyby zdegradowane (Wu i wsp. 2015).

Aby sprawdzić, czy powyższe typy neuronów różnią się reakcją na pobudzenie chemicznego LTP, zmiany w chromatynie neuronów obydwu grup zbadano osobno. We wstępnych badaniach zauważono, że mniejsze jądra komórkowe, należące do neuronów ziarnistych podlegają większym zmianom po pobudzeniu niż większe jądra komórkowe neuronów piramidowych. Ten wniosek potwierdzono za pomocą analizy liczbowej. Okazało

się, że różne rodzaje neuronów odpowiadają w różnym stopniu i tempie na pobudzenie mieszaniną LTP. Ze względu na predyspozycje neuronów ziarnistych do tworzenia gęstych siatek synaptycznych pomiędzy sobą, mogą być one silniej pobudzane z powodu zwielokrotniania przekazywanego sygnału. Z drugiej strony, dane literaturowe wskazują, że neurony piramidowe wykazują przeważnie niższy próg pobudzenia niż komórki ziarniste (Scharfman 1995). Inną przyczyną silniejszych zmian w chromatynie komórek ziarnistych może być zastosowany model LTP. Dane publikacyjne sugerują, że w niektórych neuronach ziarnistych stymulacja LTP może być niezależna od receptorów NMDA (Harris i Cotman 1986). Być może wybrane odczynniki, działające bezpośrednio przez wzrost wewnątrzkomórkowego cAMP i omijające receptory NMDA powodowały pobudzenie najpierw komórek ziarnistych, a dopiero w drugiej kolejności neuronów piramidowych. Ponadto, komórki ziarniste wykazują wyższy poziom białka jądrowej kalmoduliny w stanie spoczynku, która jest niezbędna do aktywacji CaMKII. Z kolei w neuronach piramidowych następuje większy napływ kalmoduliny do jądra komórkowego po stymulacji (Mermelstein i wsp. 2001), co może sugerować ich opóźnioną reakcję względem komórek ziarnistych. Ostatecznie, wydaje się, że ciaśniejsze upakowanie tego samego materiału genetycznego w mniejszych jądrach komórek ziarnistych powinno lepiej uwidaczniać również jego reorganizację. Wiadomym jest więc, że analizowane komórki różnią się kształtem, pobudliwością, eksprymowanymi receptorami lub neurotransmiterami (Wheeler i wsp. 2015), a nawet wydajnością i tempem transkrypcji (Digilio i wsp. 2015). Wciąż nie jest jednak jasne, jaki mechanizm molekularny jest odpowiedzialny za wyżej wymienione różnice w reorganizacji chromatyny po pobudzeniu neuronów.

Można zauważyć, że dane ilościowe zamieszczone w niniejszej pracy doktorskiej odbiegają od publikacyjnych (Grabowska, Sas-Nowosielska, Magalska i wsp. 2022). Wyjaśnieniem zaistniałej sytuacji jest wybiórczość analizowanych neuronów – w publikacji brano pod uwagę wszystkie komórki, a w mojej pracy tylko ziarniste i piramidowe, które łącznie nie pokrywają wszystkich komórek w hodowli. Niewątpliwie w dopełnieniu pracy przydałaby się również analiza neuronów hamujących, jednakże była ona utrudniona ze względu na małą liczebność interneuronów w hodowli lub większą ich śmiertelność po traktowaniu mieszaniną pobudzającą czy wyciszeniem białka HDAC1. Ze względu na brak istotności statystycznej wynikający z ograniczonej liczby danych dotyczących interneuronów, nie zdecydowano się na ich analizę.

Dodatkowo, nie wszystkie eksperymenty zostały przeprowadzone z podziałem na neurony ziarniste i piramidowe. W celu odróżnienia typów neuronów od siebie zastosowano barwienie immunocytochemiczne z przeciwciałami dla białek PROX1 i CaMKII. Niektóre eksperymenty wymagały jednak równoczesnego barwienia różnych białek i chromatyny w celach porównawczych, np. potranslacyjnych modyfikacji histonów, wraz z DNA i białkiem c-FOS, jako markerem pobudzenia komórek. Ze względu na ograniczoną liczbę kanałów podczas użytkowania mikroskopu konfokalnego, wynikającego z dostępności laserów i wzbudzanych widm, czasem barwienie odróżniające typy neuronów nie było możliwe. Wtedy stosowano pojedyncze barwienie na białko NeuN, pozwalające odróżnić neurony od komórek glejowych. Ponadto, transfekcji i transdukcji łatwiej ulegały neurony ziarniste, neurony piramidowe wykazywały niższą przeżywalność i wydajność zastosowanej metody. Z tych względów nie zdecydowano się na analizę porównawczą obydwu typów neuronów w każdym z przeprowadzonych badań.

Analizując wyniki, należy mieć również na uwadze istnienie ogromnej heterogenności transkryptomów i organizacji chromatyny między komórkami (Finn i Misteli 2019). Fakt, że uzyskane dane liczbowe są wartościami uśrednionymi, dodatkowo podkreśla istotność różnic między kontrolą a wariantami badanymi.

5.3. Kondensacja chromatyny

Zauważono, że z kondensacją chromatyny wiążą się różne stany fizjologiczne i patologiczne komórek, np. zmiany faz cyklu komórkowego, czy apoptoza (Illner i wsp. 2010). W neuronach rearanżacja chromatyny może wiązać się z ich pobudliwością (Benito i Barco 2014, Tao-Cheng 2018, Yap i Greenberg 2018). Jak wspomniano powyżej, w pracy magisterskiej potwierdzono, że zastosowany model nie powoduje zaprogramowanej śmierci komórki (Czechowska 2016). Zastosowanie opracowanego modelu wskazuje, że nie wiąże się on również ze zmianami cyklu komórkowego, ponieważ dojrzałe neurony są komórkami niedzielącymi się. Badana kondensacja wizualnie przypomina za to zmiany zachodzące w jądrach komórkowych fibroblastów po zastosowaniu chaetocyny (Illner i wsp. 2010). Jest ona inhibitorem metylotransferazy histonowej SUV39, która pośredniczy w trimetylacji lizyny 9 na histonie H3 (H3K9me3), jest więc często badana w modelach, obejmujących wyciszenie genów wskutek tworzenia się heterochromatyny. Po zastosowaniu chaetocyny chromosomy zachowują swoje terytoria, jednakże zaburzona zostaje radialna organizacja

chromatyny, zakładająca dużą liczbę genów w środku jądra w stosunku do ich małej liczby na jego peryferiach. Zamiast tego geny aktywne transkrypcyjnie są przesuwane na powierzchnię najbardziej skondensowanych miejsc, mocno wzbogaconych w RNA (Illner i wsp. 2011). Jednakże w naszych badaniach inhibitory metylotransferaz nie powodowały, ani nie hamowały globalnej reorganizacji chromatyny po pobudzeniu neuronów.

5.3.1. Kondensacja chromatyny a ekspresja genów

Badania wskazują, że w neuronach czasowa i dokładna ekspresja genów indukowanych pobudzeniem jest regulowana przez zmiany w potranslacyjnych modyfikacjach histonów, przyłączanie odpowiednich białek do chromatyny i zmiany jądrowej architektury (Bártová i wsp. 2008). Wykazano, że zmiana architektury chromatyny w neuronach poprzez wprowadzenie histonów znakowanych GFP może wpływać nie tylko na transkrypcję genów, ale także ma wpływ na zachowanie zwierząt (Ito, Magalska i wsp. 2014). Przedstawione w niniejszej pracy wyniki pokazują, że w zastosowanym modelu globalnej reorganizacji chromatyny po pobudzeniu LTP towarzyszą zmiany w transkryptomie. Nie jest jednak jasne, w jaki sposób te dwa procesy są ze sobą powiązane.

W publikacji Grabowska, Sas-Nowosielska, Magalska i wsp. (2022), oprócz zbadania terytorium chromosomu 1, zamieszczono analizę zmian zachodzących w terytorium chromosomu 16. Chromosomy zostały wybrane ze względu na występujące między nimi różnice - chromosom 1 jest większy i zawiera więcej heterochromatyny niż chromosom 16 (Vernole i wsp. 1984). Po stymulacji obydwie terytoria zachowują się w odmienny sposób – chromosom 1 staje się bardziej rozgałęziony, jego objętość zmniejsza się, ale powierzchnia rośnie. Natomiast terytorium chromosomu 16 stawało się większe i bardziej sferyczne. Analiza transkryptomyczna wykazała, że geny odpowiedzi wczesnej są zlokalizowane na chromosomie 1 w skupiskach, co mogłoby wyjaśniać lokalną dekondensację chromatyny, podczas gdy na chromosomie 16 są one zlokalizowane równomiernie, co z kolei tłumaczyłoby globalną dekondensację tego regionu chromatyny.

Kondensacja chromatyny prowadzi do zwiększenia objętości przestrzeni międzychromatynowej. Przymuszczalnie przedstawiona reorganizacja chromatyny wiąże się ze zmianą lokalizacji silnie aktywowanych genów do wolnych przestrzeni pozbawionych DNA, wraz z przenoszeniem wyciszonych genów do środka skondensowanych miejsc genomu, podobnie jak w modelu z chaetocyną (Illner i wsp. 2011) i przedstawionym we wstępie funkcjonalnym modelu organizacji chromatyny (Cremer i wsp. 2015). Obserwacja

markerów nieaktywnej chromatyny w środku i markerów aktywnej chromatyny na peryferiach genomu potwierdzają takie stanowisko, co sugerowałoby tworzenie się kondensatów transkrypcyjnych, w celu skutecznej transkrypcji genów zaangażowanych w plastyczność neuronów. Z drugiej strony, zamieszczony w publikacji Grabowska, Sas-Nowosielska, Magalska i wsp. (2022) eksperyment z odczynnikiem 1,6-heksanodiol, który łamie wiązania hydrofobowe niezbędne do tworzenia separacji faz, wykazał, że omawiana reorganizacja chromatyny jest niezależna od separacji faz, a tym samym poddaje w wątpliwość tworzenie kondensatów transkrypcyjnych. Z kolei przedstawione w tej samej pracy barwienie z markerem cętek jądrowych wskazuje, że choć całościowa objętość cętek po pobudzeniu się nie zmienia, to wzrasta ich liczba i powierzchnia, czyli miejsce interakcji białek zaangażowanych w składanie RNA i genomu (Grabowska, Sas-Nowosielska, Magalska i wsp. 2022). Ten wynik, wraz z potwierdzeniem zwiększonej transkrypcji wielu genów, dodatkowo potwierdzają pogląd, że po stymulacji neuronów euchromatyna zostaje wyeksponowana w stronę przestrzeni międzychromatynowej, w której odbywa się transkrypcja i otacza transkrypcyjnie wyciszone części genomu, choć niekoniecznie wiąże się z powstawaniem kondensatów transkrypcyjnych.

Ponadto, wyniki uzyskane za pomocą metody RNAseq wykazały spadek wielu transkryptów zaangażowanych w podstawowy metabolizm i regulację transkrypcji. Analogiczne obserwacje poczyniono po stymulacji neuronów kwasem kainianowym, który jest agonistą receptora glutaminianu. Zasugerowano, że aktywacja neuronów ogranicza podstawową transkrypcję do niezbędnego minimum, jednocześnie umożliwiając transkrypcję genów indukowanych pobudzeniem (Fernandez-Albert i wsp. 2019). W publikacji Su i wsp. (2017) zaobserwowano, że chromatyna otwierała się przy genach indukowanych po pobudzeniu, a proces ten zależał od wiązania białka c-FOS, co prowadziło do dalszej ekspresji powiązanych genów. Jednocześnie geny wyciszane związane były z jej zamykaniem i nie znaleziono tam dominujących motywów wiążących ten czynnik transkrypcyjny (Su i wsp. 2017). Białko c-FOS może oddziaływać z innymi czynnikami transkrypcyjnymi w celu zrekrutowania kompleksu remodelującego chromatynę SWI/SNF i utrzymania dostępu do wzmacniaczy dla innych białek (Gallegos i wsp. 2018). Możliwe więc, że kondensacja chromatyny w pobudzanych komórkach nerwowych jest kolejnym poziomem regulującym transkrypcję, oprócz hierarchicznej ekspresji genów czynników transkrypcyjnych, potranslacyjnych modyfikacji histonów czy tworzenia pętli DNA. Wykazano, że kondensacja chromatyny prowadzi do wyciszenia genów, zaś dekondensacja może wiązać się ze skokiem transkrypcji (Vankova Hausnerova i Lanctot 2016). Może wynikać on z akumulowania

polimerazy RNA II, która w warunkach skondensowanej chromatyny, nie może przeprowadzać wydajnej elongacji.

W przedstawionym modelu inhibitory deacetylaz histonowych hamują rearanżację chromatyny, ale nie ekspresję genu *c-Fos*, natomiast inhibitory transkrypcji, mimo braku białek powstających *de novo*, nie hamują kondensacji DNA. Przeprowadzone eksperymenty nie pozostawiają również wątpliwości, że białko HDAC1 odgrywa istotną rolę w rearanżacji chromatyny po pobudzeniu, choć nie jest to jednoznaczne z zaburzeniem transkrypcji. Stąd wydaje się, że zmiany strukturalne chromatyny zachodzą przed aktywacją transkrypcji i syntezą białek *de novo* i mogą zachodzić niezależnie od siebie.

Intrygujące wyniki ujawnia również eksperyment z wyciszeniem transkrypcji, za pomocą inhibitorów: DRB, aktynomycyny D i α -amanityny. Choć integralność jąderka jest niezbędna do przeprowadzenia LTP (Medrano-Fernandez i Barco 2016), w wynikach widać jego rozpad równocześnie jednak z pobudzeniem ekspresji genu *c-Fos* i kondensacją chromatyny. Nie zbadano jednak, czy w badanym modelu zachodzą dalsze zmiany charakterystyczne dla długotrwałego wzmocnienia synaptycznego, jak tworzenie kolców dendrytycznych czy wstawianie nowych receptorów do błony komórkowej w obrębie synaps.

Ciekawym zagadnieniem wydaje się być również badanie fosforylacji białka CREB i CREB-zależnej transkrypcji w zaprezentowanym modelu. Wiadomo, że deacetylazy histonowe mogą hamować CREB-zależną transkrypcję ze względu na udział białka HDAC1 w wyciszaniu białka CREB, poprzez jego defosforylację (Fass i wsp. 2012). Odczynnik crebinostat, powodujący mocną aktywację transkrypcji CREB-zależnej, wywołuje silne zahamowanie działania deacetylaz histonowych klasy I oraz silną indukcję acetylacji w neuronach (Fass i wsp. 2012). Wśród genów pobudzanych przez CREB-zależną transkrypcję znajduje się badany powyżej gen odpowiedzi wczesnej *c-Fos* (Joo i wsp. 2015). Po wyciszeniu białka HDAC1 nie zauważono jednak jego wzmocnionej ekspresji. Natomiast wartym uwagi, wydaje się być kierunek badań, mający na celu zbadanie zmian w transkryptomie komórek z wyciszonym białkiem HDAC1 w porównaniu do kontroli.

5.3.2. Kondensacja chromatyny a tworzenie pętli

Techniki 4C (ang. *Chromosome Conformation Capture*), nazywane tak ze względu na badania interakcji chromatynowych w czasie, ujawniły wiele pętli powstających *de novo* między promotorami i wzmacniaczami, a także łączących miejsca startu lub zakończenia

transkrypcji po pobudzeniu, zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*. Wykazano jednak, że w indukowanych neuronach, niewielki procent pętli powstających *de novo*, obejmuje geny natychmiastowej i opóźnionej odpowiedzi wczesnej (Beagan i wsp. 2020). Większość interakcji promotor-wzmacniacz powstaje podczas neurogenезy i nie powoduje aktywacji genów (Lu i wsp. 2020). Dlatego wydaje się nieprawdopodobne, żeby kompleksowa kondensacja chromatyny w przyjętym tutaj modelu odzwierciedlała tworzenie się pętli po aktywacji.

Najnowsze badanie wspierają za to stanowisko, że tworzenie pamięci może prowadzić do rearanżacji chromatyny na dużą skalę. Wykazano przesuwanie się całych regionów DNA o średniej wielkości 436 kb między wyciszonymi i aktywnymi przedziałami chromatyny (Marco i wsp. 2020). Również wyniki uzyskane za pomocą metody DNA-FISH dotyczące całego chromosomu 1 sugerują raczej zmiany większych regionów DNA. Ze względu na kompleksową kondensację chromatyny w badanym modelu, wydaje się, że mechanizm obejmujący przemieszczanie większych obszarów DNA lepiej wyjaśnia prezentowaną w niniejszej pracy reorganizację niż powstawanie poszczególnych pętli.

5.3.3. Kondensacja chromatyny a acetylacja histonów

Acetylacja reszt histonowych jest modyfikacją związaną przeważnie z aktywnymi regionami chromatyny (Kouzarides 2007). Badania wskazują na silną korelację acetylacji i transkrypcji genów indukowanych pobudzeniem. Wciąż nie jest jednak jasne, czy acetylacja jest przyczyną czy raczej konsekwencją takiej transkrypcji (Lopez-Atalaya i Barco 2014). Panował pogląd, że acetylacja powoduje rozluźnianie chromatyny, która umożliwiałaby białkom przyłączanie się do DNA, ale jest również jasne, że same czynniki transkrypcyjne mogą przyczyniać się do acetylacji reszt histonowych. Ponadto acetylacja nie powodowała osłabienia interakcji DNA z histonami w modelu zrekonstruowanym *in vitro*. Dodatkowo wykazano, że aktywacja transkrypcji może wydarzać się również bez acetylacji histonów (Lopez-Atalaya i Barco 2014). W badanym tutaj modelu nie zauważono istotnego wzrostu poziomu acetylacji i innych potranslacyjnych modyfikacji histonów po pobudzeniu komórek, przy jednoczesnej dużej zmianie w transkryptomie neuronów. Zmiana lokalizacji acetylowanych i metylowanych reszt histonów sugeruje jedynie zmianę dystrybucji grup acetylowanych do innych obszarów DNA, które w danej chwili bardziej tego wymagają. Również wyciszenie podstawowej deacetylazy w histonach, choć nie spowodowało istotnego zwiększenia ogólnego poziomu acetylacji histonów poza acetylacją histonu H3 na lizynie 56,

zablokowało zmiany w chromatynie i powodowało zaburzenia w jej strukturze. Z kolei inhibitory acetylacji, jak kwas anakardowy (inhibitor acetylotransferazy histonowej p300/CBP), czy JQ1 (inhibitor wiązania bromodomen z acetylowanymi histonami) nie miały wpływu na zmiany w strukturze chromatyny, ani na poziom białka c-FOS.

Dane literaturowe wspierają wniosek, że deacetylazy histonowe pełnią istotną rolę w regulacji kondensacji chromatyny (Ji i wsp. 2010, Yamada i wsp. 2005, Parker i wsp. 2007), mimo że nie wpływają na lokalizację domen centromerowych (Gilchrist i wsp. 2004). Mogłoby to oznaczać, że częściowe zahamowanie możliwości usuwania grup acetylowych z histonów ma znaczenie dla reorganizacji chromatyny, jednakże potwierdzenie takiego wniosku wymaga dalszych badań.

5.4. Acetylacja w plastyczności synaptycznej

Istnieje wiele przesłanek sugerujących, że acetylacja pełni ważną rolę w plastyczności komórek nerwowych i tworzeniu pamięci (Kazantsev i Thompson 2008, Volmar i Wahlestedt 2015, Lopez-Atalaya i Barco 2014). Wskazuje na to m.in. dynamiczna regulacja acetylacji histonów podczas formowania pamięci (Lopez-Atalaya i Barco 2014) lub wzrost poziomu acetylacji histonu H3 w hipokampie po indukcji LTP (Penney i Tsai 2014). Sam przebieg acetylacji jest bardzo szybkim zjawiskiem (okres jego półtrwania wynosi kilka minut) i raczej nie wpływa na utrzymywanie pamięci, ale reguluje procesy z nią związane (Lopez-Atalaya i Barco 2014). Wiadomo również, że redukcja acetylotransferazy lizyn w neuronach skutkuje zmniejszeniem zdolności intelektualnych ludzi i myszy, natomiast spadek deacetylaz histonowych jest związany z ich wspomaganiami. Z kolei podanie inhibitorów deacetylaz powodowało wzmocnienie acetylacji, polepszenie pamięci i plastyczności, a nawet częściowe odwrócenie deficytów pamięci (Gräff i Tsai 2013, Peixoto i Abel 2013). Ponadto znany jest fakt, że geny związane z otoczką jądrową są zwykle hipoacetylowane, a traktowanie ich inhibitorami deacetylaz histonowych odwraca wyciszenie tych genów (Finlan i wsp. 2008). Udowodniono również, że zaburzenia w homeostazie acetylacji, mogą prowadzić do zaburzeń poznawczych, np. starzenia się, choroby Alzheimera lub Huntingtona (Gräff i Tsai 2013).

Z przeprowadzonych badań wynika, że podanie inhibitorów deacetylaz powoduje zahamowanie kondensacji chromatyny po pobudzeniu LTP. Kuszącym kierunkiem badań byłoby wykonanie testów behawioralnych, mających na celu sprawdzenie, czy sam brak kondensacji chromatyny skutkowałby osłabieniem pamięci lub zdolności intelektualnych

u szczurów. Co ważne, udowodniono, że samo białko HDAC1 odgrywa rolę w utrwalaniu i wygaszaniu pamięci (Siddiqui i wsp. 2019). Ponadto, pokazano, że obniżony poziom białka HDAC1 na promotorach różnych genów związanych z plastycznością zwiększa ich ekspresję i wywołuje deficyty poznawcze, wywołane stresem we wczesnym okresie życia (Adler i Schmauss 2016). Przedstawione wyniki również wskazują na istotną rolę HDAC1 w przebiegu LTP.

5.5. Proponowany mechanizm kondensacji chromatyny z uwzględnieniem roli białka HDAC1

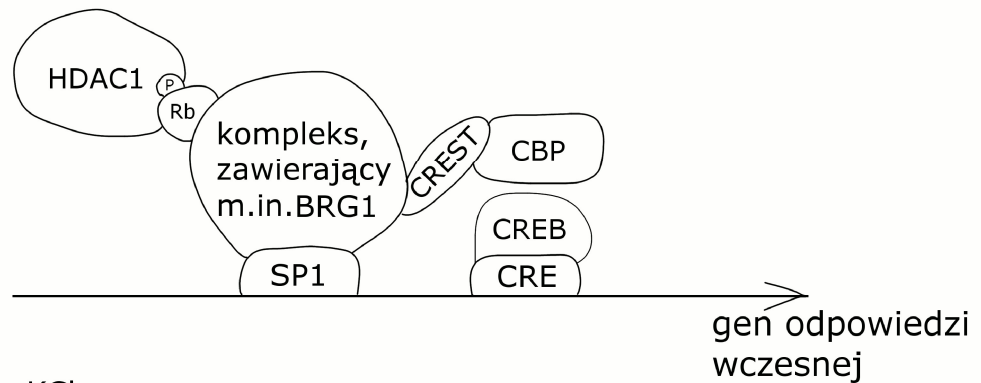
Zważywszy na kluczową rolę białka HDAC1 w rearanżacji chromatyny po pobudzeniu, zdecydowano się na próbę wyjaśnienia tego mechanizmu w oparciu o analizę wyników i dane literaturowe. Wykazano, że w stanie spoczynku komórki nerwowej białko HDAC1 wiąże się z kompleksem CREST-BRG1, który odpowiada za wyciszenie transkrypcji (Qiu i Ghosh 2008, ryc. 27). Kompleks ten wiąże się z promotorem genu *c-Fos* przez interakcję z białkiem Sp1 (ang. *Specificity Protein 1*). W niepobudzonej komórce białko BRG1 (ang. *Brahma-Related Gene 1*) rekrutuje białko Rb (ang. *Retinoblastoma Protein*), który z kolei wiąże białka HDAC1 i mSIN3A (ang. *Mammalian Switch-Independent 3A*) do promotora genu *c-Fos* w celu zahamowania jego ekspresji. Po pobudzeniu w sposób zależny od wapnia kalcyneuryna defosforyluje białko Rb i uwalnia deacetylazę HDAC1 z kompleksu, a jednocześnie prowadzi do rekrutacji acetylotransferazy CBP (ang. *CREB-Binding Protein*), która aktywuje transkrypcję. Oddysocjowanie białka HDAC1 od promotorów genów odpowiedzi wczesnej jest niezbędne do aktywacji ich ekspresji (Qiu i Ghosh 2008).

Opisane w niniejszej pracy eksperymenty udowodniły, że zahamowanie kalcyneuryny, która reguluje dysocjację HDAC1 od chromatyny, całkowicie zablokowało kondensację chromatyny. Oznacza to, że białko HDAC1 może w jakiś sposób uczestniczyć w reorganizacji chromatyny *per se* lub w kompleksie białkowym. W przedstawionym modelu cLTP, podwyższony poziom cAMP spowodowany podawanymi odczynnikami, umożliwił pominięcie fizjologicznego szlaku indukcji komórek, który obejmuje wcześniejszy napływ wapnia. Z tego powodu zdecydowano się na przeprowadzenie eksperymentu ze stymulacją neuronów jonami potasu, który uwzględnia naturalny przebieg pobudzenia neuronów i blokowaniem kalcyneuryny specyficznym inhibitorem FK506, który nie tylko blokował transkrypcję genu kodującego białko c-FOS, ale także całkowicie utrudniał zależną od

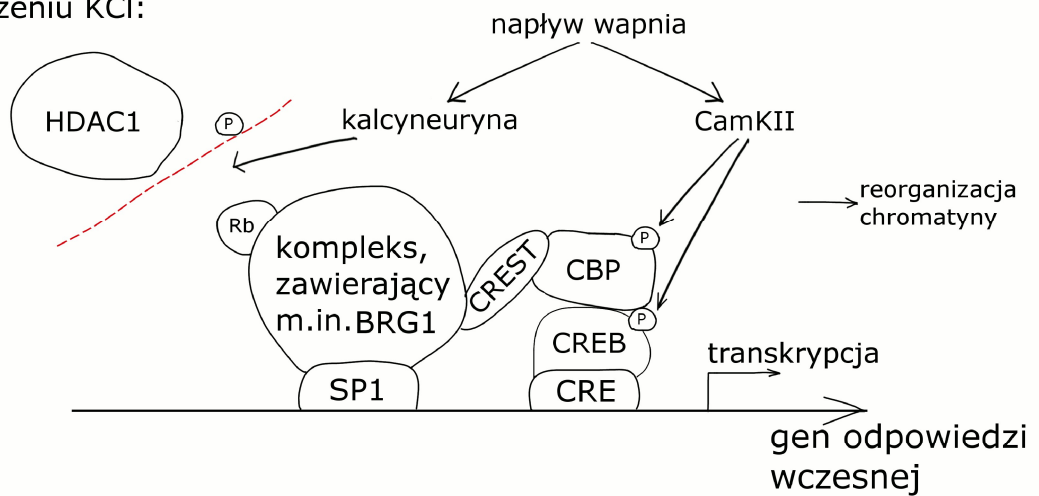
aktywności reorganizację chromatyny. Z kolei zastosowanie cyklosporyny, mimo zahamowania zmian w chromatynie, nie spowodowało wyciszenia transkrypcji. Możliwym wyjaśnieniem tej niezgodności jest tworzenie przez inhibitory wyciszających kompleksów z różnymi białkami (Almawi i Melemedjian 2000), choć molekularny mechanizm takiego działania i jego następstwa dla dalszych szlaków sygnałowych nie jest do końca poznany.

Opisane wyniki sugerują podwójną rolę białka HDAC1 – z jednej strony jego oddysocjowanie od DNA w celu umożliwienia transkrypcji (Qiu i Ghosh 2008), z drugiej – umożliwienie kondensacji chromatyny po aktywacji komórek w celu wyciszenia genów, które w danej chwili nie ulegają ekspresji. (ryc. 27).

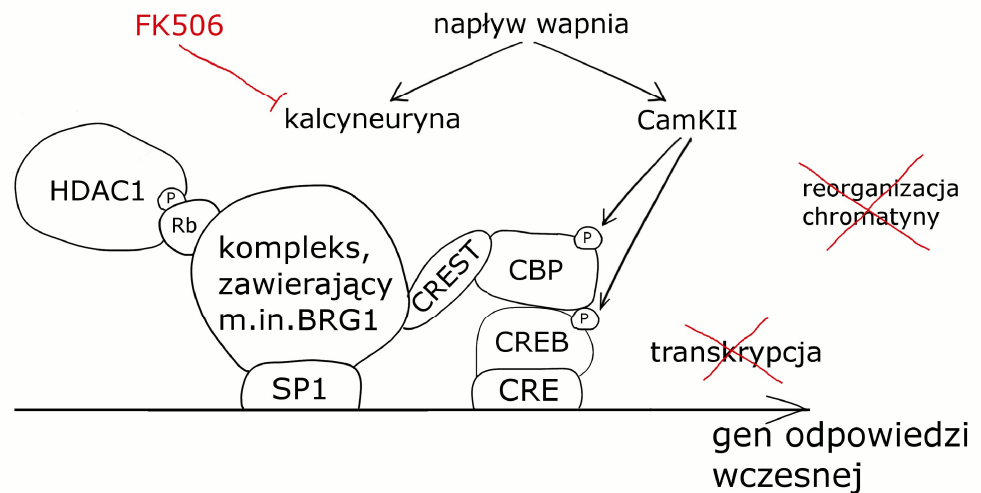
w stanie spoczynku:



po pobudzeniu KCl:



po zastosowaniu inhibitora kalcyneuryny i pobudzeniu KCl:



Rycina 27. Proponowany mechanizm regulacji kondensacji chromatyny w neuronach po indukcji chemicznego LTP z uwzględnieniem roli białka HDAC1. W neuronach w stanie spoczynku białko HDAC1 przyłączone jest do kompleksu białkowego remodelującego chromatynę. Po pobudzeniu, napływ wapnia aktywuje kalcyneurynę, która powoduje odłączenie się białka HDAC1, co umożliwia reorganizację chromatyny i aktywację transkrypcji. W przypadku zahamowania kalcyneuryny nie zauważono zmian w chromatynie, ani ekspresji genu *c-Fos*. W regionach, które w trakcie pobudzenia nie powinny ulegać aktywacji deacetylaza HDAC1 jest przyłączona do chromatyny i umożliwia jej wyciszenie. Obraz sporządzono na podstawie opisanych wyników i danych literaturowych (Qiu i Ghosh 2008). Wyjaśnienie nieużywanych dotąd skrótów: CREST – ang. *Calcium RESponsive Transactivator*, CRE - *cAMP Response Element*, P – reszta fosforanowa.

6. Podsumowanie i wnioski

Uzyskane dane zaprezentowane w niniejszej rozprawie można podsumować w następujący sposób:

- Po indukcji LTP w szczurzych neuronach hipokampalnych chromatyna ulega kondensacji, a proces ten różni się tempem oraz stopniem nasilenia w neuronach ziarnistych i piramidowych.
- Rearanżacji chromatyny po pobudzeniu neuronów towarzyszą zmiany w ekspresji ponad 900 genów oraz zmiany w lokalizacji potranslacyjnie modyfikowanych histonów.
- Zmianom zachodzącym w chromatynie towarzyszy również reorganizacja terytorium chromosomu 1.
- Indukowana pobudzeniem kondensacja chromatyny jest niezależna od aktywnej transkrypcji i *de novo* powstających białek.
- Indukowana pobudzeniem kondensacja chromatyny jest zależna od napływu jonów wapnia do wnętrza neuronów i propagacji sygnału wapniowego.
- Białko HDAC1 jest bezpośrednio zaangażowane w proces kondensacji chromatyny indukowany pobudzeniem.

Powyższe wyniki sugerują, że zależna od białka HDAC1 reorganizacja chromatyny może stanowić dodatkowy i istotny poziom regulacji indukowanej transkrypcji genów, których produkty białkowe uczestniczą w tworzeniu nowych połączeń między komórkami nerwowymi, a co za tym idzie, również w formowaniu pamięci i procesach poznawczych.

7. Bibliografia

1. **Adler S.M., Schmauss C. 2016.** Cognitive deficits triggered by early life stress: The role of histone deacetylase 1. *Neurobiol. Dis.* 94: 1-9.
2. **Almawi W.Y., Melemedjian O.K. 2000.** Clinical and mechanistic differences between FK506 (tacrolimus) and cyclosporin A. *Nephrol. Dial Transplant.* 15(12): 1916-8.
3. **Banker G.A., Cowan W.M. 1977.** Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res.* 126(3): 397-42.
4. **Baltaci S.B., Mogulkoc R., Baltaci A.K. 2019.** Molecular Mechanisms of Early and Late LTP. *Neurochem. Res.* 44(2): 281-296.
5. **Barr M.L., Bertram E.G. 1949.** A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. *Nature.* 163(4148): 676.
6. **Barry D.N., Coogan A.N., Commins S. 2016.** The time course of systems consolidation of spatial memory from recent to remote retention: A comparison of the Immediate Early Genes Zif268, c-Fos and Arc. *Neurobiol. Learn. Mem.* 128: 46-55.
7. **Bártová E., Krejčí J., Harničarová A., Galiová G., Kozubek S. 2008.** Histone modifications and nuclear architecture: A review. *J. Histochem. Cytochem.* 56, 711–721.
8. **Beagan J.A., Pastuzyn E.D., Fernandez L.R., Guo M.H., Feng K., Titus K.R., Chandrashekar H., Shepherd J.D., Phillips-Cremins J.E. 2020.** Three-dimensional genome restructuring across timescales of activity-induced neuronal gene expression. *Nat. Neurosci.* 23(6): 707-717.
9. **Beaudoin G.M. 3rd, Lee S.H., Singh D., Yuan Y., Ng Y.G., Reichardt L.F., Arikath J. 2012.** Culturing pyramidal neurons from the early postnatal mouse hippocampus and cortex. *Nat. Protoc.* 7(9): 1741-54.
10. **Benito E., Barco A. 2014.** The Neuronal Activity-Driven Transcriptome. *Mol. Neurobiol.* 51, 1071–1088.
11. **Bensaude O. 2011.** Inhibiting eukaryotic transcription: Which compound to choose? How to evaluate its activity? *Transcription.* 2(3): 103-108.
12. **Bestor T.H., Edwards J.R., Boulard M. 2015.** Notes on the role of dynamic DNA methylation in mammalian development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 112(22): 6796-9.
13. **Bickmore W A. 2013.** The spatial organization of the human genome. *Annu. Rev. Genomics. Hum. Genet.* 14: 67-84.
14. **Billia F., Baskys A., Carlen P. L., De Boni U. 1992.** Rearrangement of centromeric satellite DNA in hippocampal neurons exhibiting long-term potentiation. *Mol. Brain Res.* 14, 101–108.
15. **Bliss T.V., Collingridge G.L. 1993.** A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature.* 361(6407): 31-9.

16. **Bliss T.V., Lomo T. 1973.** Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* 232(2): 331-56.
17. **Bokota G., Sroka J., Basu S., Das N., Trzaskoma P., Yushkevich Y., Grabowska A., Magalska A., Plewczynski D. 2021.** PartSeg: a tool for quantitative feature extraction from 3D microscopy images for dummies. *BMC Bioinformatics.* 22(1): 72.
18. **Borden J., Manuelidis L. 1988.** Movement of the X chromosome in epilepsy. *Science.* 242(4886): 1687-91.
19. **Bošković A., Rando O.J. 2018.** Transgenerational Epigenetic Inheritance. *Annu Rev Genet.* 52: 21-41.
20. **Briand N., Collas P. 2020.** Lamina-associated domains: peripheral matters and internal affairs. *Genome Biol.* 21(1): 85.
21. **Choudhary C., Kumar C., Gnad F., Nielsen M.L., Rehman M., Walther T.C., Olsen J.V., Mann M. 2009.** Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science.* 325(5942): 834-40.
22. **Cohen S., Greenberg M.E. 2008.** Communication between the synapse and the nucleus in neuronal development, plasticity, and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 24: 183-209.
23. **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.
24. **Cremer T., Cremer M. 2010.** Chromosome territories. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2(3): a003889.
25. **Cremer T., Cremer M., Hübner B., Silahiroglu A., Hendzel M., Lanctôt C., Strickfaden H., Cremer C. 2020.** The Interchromatin Compartment Participates in the Structural and Functional Organization of the Cell Nucleus *Bioessays.* 42(2): e1900132.
26. **Croft J.A., Bridger J.M., Boyle S., Perry P., Teague P., Bickmore W.A. 1999.** Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J. Cell Biol.* 145(6): 1119-31.
27. **Crosio C., Heitz E., Allis C.D., Borrelli E., Sassone-Corsi P. 2003.** Chromatin remodeling and neuronal response: multiple signaling pathways induce specific histone H3 modifications and early gene expression in hippocampal neurons. *Journal of Cell Science.* 116: 4905-4914.
28. **Crosetto N., Bienko M. 2020.** Radial Organization in the Mammalian Nucleus. *Front. Genet.* 11:33.
29. **Czechowska A. 2016.** Zmiany architektury chromatyny neuronów hipokampalnych szczura indukowane pobudzeniem [Nieopublikowana praca magisterska]. Uniwersytet Warszawski. Wydział Biologii.
30. **Dabrowski M., Aerts S., Van Hummelen P., Craessaerts K., De Moor B., Annaert W., Moreau Y., De Strooper B. 2003.** Gene profiling of hippocampal neuronal culture. *J. Neurochem.* 85(5): 1279-88.

31. **Deerinck T., Bushong E., Lev-Ram V., Shu X., Tsien R., Ellisman M. 2010.** Enhancing Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy to Enable High Resolution 3-D Nanohistology of Cells and Tissues. *Microscopy and Microanalysis*. 16(S2), 1138-1139.
32. **Dekker J., Rippe K., Dekker M., Kleckner N. 2002.** Capturing Chromosome Conformation. *Science*. 295: 1306-1311.
33. **Dekker J., Marti-Renom M.A., Mirny L.A. 2013.** Exploring the three-dimensional organization of genomes: interpreting chromatin interaction data. *Nat. Rev. Genet.* 14(6): 390-403.
34. **Dekker J., Misteli T. 2015.** Long-Range Chromatin Interactions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7(10): a019356.
35. **Dekker J., Heard E. 2015.** Structural and functional diversity of Topologically Associating Domains. *FEBS Lett.* 589: 2877-84.
36. **Dekker J., Mirny L. 2016.** The 3D Genome as Moderator of Chromosomal Communication. *Cell*. 164(6): 1110-1121.
37. **Deans C., Maggert K.A. 2015.** What do you mean, "epigenetic"? *Genetics*. 199(4): 887-96.
38. **Digilio L., Yap C.C., Winckler B. 2015.** Ctip2-, Satb2-, Prox1-, and GAD65-Expressing Neurons in Rat Cultures: Preponderance of Single- and Double-Positive Cells, and Cell Type-Specific Expression of Neuron-Specific Gene Family Members, Nsg-1 (NEEP21) and Nsg-2 (P19). *PLoS One*. 10(10): e0140010.
39. **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(7398): 376-80.
40. **Dobin A., Davis C.A., Schlesinger F., Drenkow J., Zaleski C., Jha S., Batut P., Chaisson M. and Gingeras T.R. 2013.** STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15–21.
41. **Dovey O. M., Foster C. T., Cowley S. M. 2010.** Histone deacetylase 1 (HDAC1), but not HDAC2, controls embryonic stem cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 107, 8242–8247.
42. **Dragunow M. 1996.** A role for immediate-early transcription factors in learning and memory. *Behav. Genet.* 26(3): 293-9.
43. **Fass D.M., Reis S.A., Ghosh B., Hennig K.M., Joseph N.F., Zhao W.N., Nieland T.J., Guan J.S., Kuhnle C.E., Tang W., Barker D.D., Mazitschek R., Schreiber S.L., Tsai L.H., Haggarty S.J. 2013.** Crebinostat: a novel cognitive enhancer that inhibits histone deacetylase activity and modulates chromatin-mediated neuroplasticity. *Neuropharmacology*. 64: 81-96.
44. **Felsenfeld G., Groudine M. 2003.** Controlling the double helix. *Nature*. 421, 448–453.
45. **Fernandez-Albert J., Lipinski M., Lopez-Cascales M.T., Rowley M.J., Martin-Gonzalez A.M., Del Blanco B., Corces V.G., Barco A. 2019.** Immediate and deferred epigenomic signatures of *in vivo* neuronal activation in mouse hippocampus. *Nat. Neurosci.* 22(10): 1718-1730.

46. **Finlan L.E., Sproul D., Thomson I., Boyle S., Kerr E., Perry P., Ylstra B., Chubb J.R., Bickmore W.A. 2008.** Recruitment to the nuclear periphery can alter expression of genes in human cells. *PLoS Genet.* 4(3): e1000039.
47. **Finn E.H., Misteli T. 2019.** Molecular basis and biological function of variability in spatial genome organization. *Science.* 365(6457): eaaw9498.
48. **Fleischmann A., Hvalby O., Jensen V., Strekalova T., Zacher C., Layer L.E., Kvello A., Reschke M., Spanagel R., Sprengel R., Wagner E.F., Gass P. 2003.** Impaired Long-Term Memory and NR2A-Type NMDA Receptor-Dependent Synaptic Plasticity in Mice Lacking-Fos in the CNS. *The Journal of Neuroscience* 23(27): 9116-9122.
49. **Gallegos D.A., Chan U., Chen L.F., West A.E. 2018.** Chromatin Regulation of Neuronal Maturation and Plasticity. *Trends Neurosci.* 41(5): 311-324.
50. **Gilchrist S., Gilbert N., Perry P., Bickmore W.A. 2004.** Nuclear organization of centromeric domains is not perturbed by inhibition of histone deacetylases. *Chromosome Res.* 12(5): 505-16.
51. **Grabowska A., Sas-Nowosielska H., Wojtas B., Holm-Kaczmarek D., Januszewicz E., Yushkevich Y., Czaban I., Trzaskoma P., Krawczyk K., Gielniewski B., Martin-Gonzalez A., Filipkowski R.K., Olszynski K.H., Bernas T., Szczepankiewicz A.A., Sliwinska M.A., Kanhema T., Bramham C.R., Bokota G., Plewczynski D., Wilczynski G.M., Magalska A. 2022.** Activation-induced chromatin reorganization in neurons depends on HDAC1 activity. *Cell Rep.* 38(7): 110352.
52. **Gräff J., Tsai L.H. 2013.** Histone acetylation: molecular mnemonics on the chromatin. *Nat. Rev. Neurosci.* 14(2): 97-111.
53. **Harris E.W., Cotman C.W. 1986.** Long-term potentiation of guinea pig mossy fiber responses is not blocked by N-methyl D-aspartate antagonists. *Neurosci Lett.* 70(1): 132-7.
54. **Harris K.M., Kater S.B. 1994.** Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu. Rev. Neurosci.* 17: 341–71.
55. **Hebb D.O. 1949.** *The Organization of Behavior.* Willey. New York.
56. **Herre M., Korb E. 2019.** The chromatin landscape of neuronal plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 59:79-86.
57. **Herring B.E., Nicoll R.A. 2016.** Long-Term Potentiation: From CaMKII to AMPA Receptor Trafficking. *Annu. Rev. Physiol.* 78: 351-65.
58. **Hnisz D., Shrinivas K., Young R.A., Chakraborty A.K., Sharp P.A. 2017.** A Phase Separation Model for Transcriptional Control. *Cell.* 169(1): 13-23.
59. **Holliday R. 1994.** Epigenetics: an overview. *Dev. Genet.* 15: 453–457.
60. **Hsieh J., Gage F.H. 2005.** Chromatin remodeling in neural development and plasticity. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17(6): 664-71.

61. **Huang L.K., Wang M.J.J. 1995.** Image thresholding by minimizing the measures of fuzziness. *Pattern Recognition*. 28(1): 41–51.
62. **Illner D., Zinner R., Handtke V., Rouquette J., Strickfaden H., Lanctôt C., Conrad M., Seiler A., Imhof A., Cremer T., Cremer M. 2010.** Remodeling of nuclear architecture by the thiodioxopiperazine metabolite chaetocin. *Exp. Cell Res.* 316(10): 1662-80.
63. **Isaac J.T., Nicoll R.A., Malenka R.C. 1995.** Evidence for silent synapses: implications for the expression of LTP. *Neuron*. 15(2): 427-34.
64. **Ito M. 2001.** Cerebellar long-term depression: characterization, signal transduction, and functional roles. *Physiol. Rev.* 81: 1143-95.
65. **Ito S., Magalska A., Alcaraz-Iborra M., Lopez-Atalaya J.P., Rovira V., Contreras-Moreira B., Lipinski M., Olivares R., Martinez-Hernandez J., Ruszczycki B., Lujan R., Geijo-Barrientos E., Wilczynski G.M., Barco A. 2014.** Loss of neuronal 3D chromatin organization causes transcriptional and behavioural deficits related to serotonergic dysfunction. *Nat Commun.* 18; 5: 4450.
66. **Iwano T., Masuda A., Kiyonari H., Enomoto H., Matsuzaki F. 2012.** Prox1 postmitotically defines dentate gyrus cells by specifying granule cell identity over CA3 pyramidal cell fate in the hippocampus. *Development*. 139(16): 3051-62.
67. **Jenuwein T., Allis C.D. 2001.** Translating the histone code. *Science*. 293(5532): 1074-80.
68. **Ji P., Yeh V., Ramirez T., Murata-Hori M., Lodish H. F. 2010.** Histone deacetylase 2 is required for chromatin condensation and subsequent enucleation of cultured mouse fetal erythroblasts. *Haematologica*. 95, 2013–2021.
69. **Joo J. Y., Schaukowitz K., Farbiak L., Kilaru G., Kim T. K. 2015.** Stimulus-specific combinatorial functionality of neuronal c-fos enhancers. *Nat. Neurosci.* 19, 75–83.
70. **Kaczmarek L. 1992.** Expression of c-fos and other genes encoding transcription factors in long-term potentiation. *Behav. Neural. Biol.* 57(3): 263-6.
71. **Kaczmarek L. 1993.** Molecular biology of vertebrate learning: is c-fos a new beginning? *J. Neurosci. Res.* 34(4): 377-81.
72. **Kaczmarek L. 2018.** From c-Fos to MMP-9: In control of synaptic plasticity to produce healthy and diseased mind, a personal view. *Postepy Biochem.* 64(2): 101-109.
73. **Kandel E.R. 2001.** The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*. 294(5544): 1030-8.
74. **Kania B., Wrońska D., Zięba D. 2017.** Introduction to Neural Plasticity Mechanism. *Journal of Behavioral and Brain Science*. 7: 41-49.
75. **Kapur J.N., Sahoo P.K., Wong A.K.C. 1985.** A new method for gray-level picture thresholding using the entropy of the histogram. *Computer Vision, Graphics, and Image Processing*. 29(3): 273–285.

76. **Kazantsev A.G., Thompson L.M. 2008.** Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7(10): 854-68.
77. **Klosin A., Casas E., Hidalgo-Carcedo C., Vavouri T., Lehner B. 2017.** Transgenerational transmission of environmental information in *C. elegans*. *Science.* 356(6335): 320-323.
78. **Kociucka B., Cieslak J., Szczerbal I. 2012.** Three-dimensional arrangement of genes involved in lipid metabolism in nuclei of porcine adipocytes and fibroblasts in relation to their transcription level. *Cytogenet. Genome Res.* 136(4): 295-302.
79. **Konorski J. 1948.** *Conditioned Reflexes and Neuron Organization.* Cambridge University Press. Cambridge.
80. **Kossut M. 2019.** Basic mechanism of neuroplasticity. *Neuropsychiatria i Neuropsychologia/Neuropsychiatry and Neuropsychology.* 14(1): 1-8.
81. **Kouzarides T. 2007.** Chromatin modifications and their function. *Cell.* 128(4): 693-705.
82. **Lagger G., O'Carroll D., Rembold M., Khier H., Tischler J., Weitzer G., Schuettengruber B., Hauser C., Brunmeir R., Jenuwein T., Seiser C. 2002.** Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression. *EMBO J.* 21(11): 2672-81.
83. **Law J.A., Jacobsen S.E. 2010.** Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat. Rev. Genet.* 11(3): 204-20.
84. **Liao Y., Smyth G.K., and Shi W. 2014.** Featurecounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30, 923–930.
85. **Lopez-Atalaya J.P., Barco A. 2014.** Can changes in histone acetylation contribute to memory formation? *Trends Genet.* 30(12): 529-39.
86. **Lu L., Liu X., Huang W.K., Giusti-Rodríguez P., Cui J., Zhang S., Xu W., Wen Z., Ma S., Rosen J.D., Xu Z., Bartels C.F., Kawaguchi R., Hu M., Scacheri P.C., Rong Z., Li Y., Sullivan P.F., Song H., Ming G.L., Li Y., Jin F. 2020.** Robust Hi-C Maps of Enhancer-Promoter Interactions Reveal the Function of Non-coding Genome in Neural Development and Diseases. *Mol. Cell.* 79(3): 521-534.e15.
87. **Maeshima K., Imai R., Tamura S., Nozaki T. 2014.** Chromatin as dynamic 10-nm fibers. *Chromosoma.* 123(3): 225-37.
88. **Marco A., Meharena H.S., Dileep V., Raju R.M., Davila-Velderrain J., Zhang A.L., Adaikkan C., Young J.Z., Gao F., Kellis M., Tsai L.H. 2020.** Mapping the epigenomic and transcriptomic interplay during memory formation and recall in the hippocampal engram ensemble. *Nat. Neurosci.* 23(12): 1606-1617.
89. **Marshall W.F., Straight A., Marko J.F., Swedlow J., Dernburg A., Belmont A., Murray A.W., Agard D.A., Sedat J.W. 1997.** Interphase chromosomes undergo constrained diffusional motion in living cells. *Curr. Biol.* 7(12): 930-9.
90. **Martou G., De Boni U. 2000.** Nuclear topology of murine, cerebellar Purkinje neurons: changes as a function of development. *Exp. Cell Res.* 256(1): 131-9.

91. **Meaburn K.J., Cabuy E., Bonne G., Levy N., Morris G.E., Novelli G., Kill I.R., Bridger J.M. 2007.** Primary laminopathy fibroblasts display altered genome organization and apoptosis. *Aging Cell.* 6(2): 139-53.
92. **Medrano-Fernández A, Barco A. 2016.** Nuclear organization and 3D chromatin architecture in cognition and neuropsychiatric disorders. *Mol. Brain.* 9(1): 83.
93. **Meister P., Towbin B.D., Pike B.L., Ponti A., Gasser S.M. 2010.** The spatial dynamics of tissue-specific promoters during *C. elegans* development. *Genes Dev.* 24(8): 766-82.
94. **Mermelstein P.G., Deisseroth K., Dasgupta N., Isaksen A.L., Tsien R.W. 2001.** Calmodulin priming: nuclear translocation of a calmodulin complex and the memory of prior neuronal activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 98(26): 15342-7.
95. **Michaluk P., Wawrzyniak M., Alot P., Szczot M., Wyrembek P., Mercik K., Medvedev N., Wilczek E., De Roo M., Zuschratter W., Muller D., Wilczynski G.M., Mozrzymas J.W., Stewart M.G., Kaczmarek L., Wlodarczyk J. 2011.** Influence of matrix metalloproteinase MMP-9 on dendritic spine morphology. *J. Cell Sci.* 124(Pt 19): 3369-80.
96. **Minatohara K., Akiyoshi M., Okuno H. 2016.** Role of Immediate-Early Genes in Synaptic Plasticity and Neuronal Ensembles Underlying the Memory Trace. *Front. Mol. Neurosci.* 8: 78
97. **Misteli T. 2020.** The Self-Organizing Genome: Principles of Genome Architecture and Function. *Cell* 183, 28–45.
98. **Molnár E. 2011.** Long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Semin. Cell Dev. Biol.* 22(5): 506-13.
99. **Moutin E., Hemonnot A.L., Seube V., Linck N., Rassendren F., Perroy J., Compan V. 2020.** Procedures for Culturing and Genetically Manipulating Murine Hippocampal Postnatal Neurons. *Front. Synaptic Neurosci.* 12: 19.
100. **Morris R.G, Davis S., Butcher S.P. 1990.** Hippocampal synaptic plasticity and NMDA receptors: a role in information storage? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol Sci.* 329(1253): 187-204.
101. **Nabavi S., Fox R., Proulx C.D., Lin J.Y., Tsien R.Y., Malinow R. 2014.** Engineering a memory with LTD and LTP. *Nature* 511(7509): 348–35.
102. **Nicoll R.A., Malenka R.C. 1995.** Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature.* 377(6545): 115-8.
103. **Nimchinsky E.A., Sabatini B.L., Svoboda K. 2002.** Structure and Function of Dendritic Spines. *Annual Review of Physiology.* 64(1): 313–353.
104. **Lee Y.C.G., Ogiyama Y., Martins N.M.C., Beliveau B.J., Acevedo D., Wu C.T., Cavalli G., Karpen G.H. 2020.** Pericentromeric heterochromatin is hierarchically organized and spatially contacts H3K9me2 islands in euchromatin. *PLoS Genet.* 16(3): e1008673.
105. **Love M.I., Huber W., and Anders S. 2014.** Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 1–21.

106. **Oey N.E., Leung H.W., Ezhilarasan R., Zhou L., Beurman R.W., VanDongen H.M., VanDongen A.M. 2015.** A Neuronal Activity-Dependent Dual Function Chromatin-Modifying Complex Regulates Arc Expression. *eNeuro*. 2(1): ENEURO.0020-14.2015.
107. **Okuno H. 2011.** Regulation and function of immediate-early genes in the brain: Beyond neuronal activity markers. *Neuroscience Research*. 69, 175–186.
108. **Ou H.D., Phan S., Deerinck T.J., Thor A., Ellisman M.H., O’Shea C.C. 2017.** ChromEMT: Visualizing 3D chromatin structure and compaction in interphase and mitotic cells. *Science* 357(6349): eaag0025.
109. **Otmakhov N., Khibnik L., Otmakhova N., Carpenter S., Riahi S., Asrican B., Lisman J. 2004.** Forskolin-induced LTP in the CA1 hippocampal region is NMDA receptor dependent. *J. Neurophysiol.* 91(5):1955-62.
110. **Parker K., Maxson J., Mooney A., Wiley E. A. 2007.** Class I histone deacetylase Thd1p promotes global chromatin condensation in *Tetrahymena thermophila*. *Eukaryot. Cell*. 6, 1913–1924.
111. **Penney J., Tsai L.H. 2014.** Histone deacetylases in memory and cognition. *Sci. Signal*. 7(355): re12.
112. **Peixoto L., Abel T. 2013.** The Role of Histone Acetylation in Memory Formation and Cognitive Impairments. *Neuropsychopharmacol.* 38: 62–76.
113. **Pombo A., Dillon N. 2015.** Three-dimensional genome architecture: players and mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16(4): 245-57.
114. **Qiu Z., Ghosh A. 2008.** A calcium-dependent switch in a CREST-BRG1 complex regulates activity-dependent gene expression. *Neuron*. 60(5): 775-87.
115. **Rajan W.D., Wojtas B., Gielniewski B., Miro-Mur F., Pedragosa J., Zawadzka M., Pilanc P., Planas A.M., and Kaminska B. 2020.** Defining molecular identity and fates of CNS-border associated macrophages after ischemic stroke in rodents and humans. *Neurobiol. Dis.* 137, 104722.
116. **Rao S.S., Huntley M.H., Durand N.C., Stamenova E.K., Bochkov I.D., Robinson J.T., Sanborn A.L., Machol I., Omer A.D., Lander E.S., Aiden E.L. 2014.** A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell*. 159(7): 1665-80.
117. **Rundlett S.E., Carmen A.A., Kobayashi R., Bavykin S., Turner B.M., Grunstein M. 1996.** HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 14503–14508.
118. **Saha P.K., Basu S., Hoffman E.A. 2016.** Multiscale Opening of Conjoined Fuzzy Objects: Theory and Applications. *IEEE Trans Fuzzy Syst.* 24(5): 1121-1133.
119. **Saha R.N., Wissink E.M., Bailey E.R., Zhao M., Fargo D.C., Hwang J.Y., Daigle K.R., Fenn J.D., Adelman K., Dudek S.M. 2011.** Rapid activity-induced transcription of Arc and other IEGs relies on poised RNA polymerase II. *Nat. Neurosci.* 14(7): 848-56.
120. **Scharfman H.E. 1995.** Electrophysiological diversity of pyramidal-shaped neurons at the granule cell layer/hilus border of the rat dentate gyrus recorded *in vitro*. *Hippocampus*. 5(4): 287-305.

121. **Schmidt D.R., Schreiber S.L. 1999.** Molecular association between ATR and two components of the nucleosome remodeling and deacetylating complex, HDAC2 and CHD4. *Biochemistry*. 38(44): 14711-7.
122. **Seto E., Yoshida M. 2014.** Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 6(4): a018713.
123. **Sexton T., Cavalli G. 2015.** The role of chromosome domains in shaping the functional genome. *Cell*. 160(6):1049-59.
124. **Shaban H.A., Seeber A. 2020.** Monitoring the spatio-temporal organization and dynamics of the genome. *Nucleic Acids Res*. 48(7): 3423-3434.
125. **Sheng M., Greenberg M.E. 1990.** The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*. 4(4): 477-85.
126. **Siddiqui S.A., Singh S., Ugale R., Ranjan V., Kanojia R., Saha S., Tripathy S., Kumar S., Mehrotra S., Modi D.R., Prakash A. 2019.** Regulation of HDAC1 and HDAC2 during consolidation and extinction of fear memory. *Brain Res. Bull*. 150: 86-101.
127. **Sprick U. 1995.** Functional aspects of the involvement of the hippocampus in behavior and memory functions. *Behav. Brain Res*. 66(1-2): 61-4.
128. **Stevens T.J., Lando D., Basu S., Atkinson L.P., Cao Y., Lee S.F., Leeb M., Wohlfahrt K.J., Boucher W., O'Shaughnessy-Kirwan A., Cramard J., Faure A.J., Ralser M., Blanco E., Morey L., Sansó M., Palayret M.G.S., Lehner B., Di Croce L., Wutz A., Hendrich B., Klenerman D., Laue E.D. 2017.** 3D structures of individual mammalian genomes studied by single-cell Hi-C. *Nature*. 544(7648): 59-64.
129. **Su Y., Shin J., Zhong C., Wang S., Roychowdhury P., Lim J., Kim D., Ming G.L., Song H. 2017.** Neuronal activity modifies the chromatin accessibility landscape in the adult brain. *Nat. Neurosci*. 20(3): 476-483.
130. **Sun H.B., Shen J., Yokota H. 2000.** Size-dependent positioning of human chromosomes in interphase nuclei. *Biophys. J*. 79(1): 184-90.
131. **Szepesi Z., Bijata M., Ruszczycski B., Kaczmarek L., Wlodarczyk J. 2013.** Matrix metalloproteinases regulate the formation of dendritic spine head protrusions during chemically induced long-term potentiation. *PLoS One*. 8(5): e63314.
132. **Tang Z., Luo O.J., Li X., Zheng M., Zhu J.J., Szalaj P., Trzaskoma P., Magalska A., Wlodarczyk J., Ruszczycski 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(7): 1611-27.
133. **Tao-Cheng J. H. 2018.** Stimulation-induced structural changes at the nucleus, endoplasmic reticulum and mitochondria of hippocampal neurons. *Mol. Brain* 11: 1–14.

134. **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. *Nat. Commun.* 11(1): 2120.
135. **Tullai J.W., Schaffer M.E., Mullenbrock S., Sholder G., Kasif S., Cooper G.M. 2007.** Immediate-early and delayed primary response genes are distinct in function and genomic architecture. *J. Biol. Chem.* 282(33): 23981-95.
136. **Van Dyke M.W. 2014.** Lysine deacetylase (KDAC) regulatory pathways: an alternative approach to selective modulation. *Chem. Med. Chem.* 9(3): 511-22.
137. **Vaňková Hausnerová V., Lanctôt C. 2017.** Chromatin decondensation is accompanied by a transient increase in transcriptional output. *Biol. Cell.* 109(1): 65-79.
138. **Vernole, P., Neri, G., and Serra, A. 1984.** A new banding technique of rat *Rattus norvegicus* chromosomes. *Hereditas* 101, 199–204.
139. **Volmar C. H., Wahlestedt C. 2015.** Histone deacetylases (HDACs) and brain function. *Neuroepigenetics* 1, 20–27.
140. **Walczak A., Szczepankiewicz A.A., Ruszczycki B., Magalska A., Zamlynska K., Dzwonek J., Wilczek E., Zybura-Broda K., Ryłski M., Malinowska M., Dabrowski M., Szczepinska T., Pawłowski K., Pyskaty M., Włodarczyk J., Szczerbal I., Switonski M., Cremer M., Wilczyński G.M. 2013.** Novel higher-order epigenetic regulation of the *Bdnf* gene upon seizures. *J. Neurosci.* 33(6): 2507-11.
141. **Waddington C. H. 1942a.** The epigenotype. *Endeavour* 1: 18.
142. **Wheeler D.W., White C.M., Rees C.L., Komendantov A.O., Hamilton D.J., Ascoli G.A. 2015.** Hippocampome.org: a knowledge base of neuron types in the rodent hippocampus. *Elife.* 4: e09960.
143. **Wilczyński G.M. 2014.** Significance of higher-order chromatin architecture for neuronal function and dysfunction. *Neuropharmacology.* 80: 28-33.
144. **Williams M.E., Wilke S.A., Daggett A., Davis E., Otto S., Ravi D., Ripley B., Bushong E.A., Ellisman M.H., Klein G., Ghosh A. 2011.** Cadherin-9 regulates synapse-specific differentiation in the developing hippocampus. *Neuron.* 71(4): 640-55.
145. **Wu Y.K., Fujishima K., Kengaku M. 2015.** Differentiation of apical and basal dendrites in pyramidal cells and granule cells in dissociated hippocampal cultures. *PLoS One.* 10(2): e0118482.
146. **Yamada T., Fischle W., Sugiyama T., Allis C. D., Grewal S. I. S. 2005.** The nucleation and maintenance of heterochromatin by a histone deacetylase in fission yeast. *Mol. Cell.* 20, 173–185.
147. **Yamazaki T., Nakagawa S., Hirose T. 2019.** Architectural RNAs for Membraneless Nuclear Body Formation. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 84: 227-237.

148. **Yang X.J., Seto E. 2008.** The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9(3): 206-18.
149. **Yang Y., Yamada T., Hill K.K., Hemberg M., Reddy N.C., Cho H.Y., Guthrie A.N., Oldenborg A., Heiney S.A., Ohmae S., Medina J.F., Holy T.E., Bonni A. 2016.** Chromatin remodeling inactivates activity genes and regulates neural coding. *Science.* 353(6296): 300-305.
150. **Yap E.L., Greenberg M.E. 2018.** Activity-Regulated Transcription: Bridging the Gap between Neural Activity and Behavior. *Neuron.* 100(2): 330-348.
151. **Yu G., Wang L.G., Han Y., and He Q.Y. 2012.** ClusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *Omi. A. J. Integr. Biol.* 16, 284–287.
152. **Zhang T., Cooper S., Brockdorff N. 2015.** The interplay of histone modifications - writers that read. *EMBO Rep.* 16(11): 1467-81.

Publikacje doktorantki

1. Bokota G., Sroka J., Basu S., Das N., Trzaskoma P., Yushkevich Y., **Grabowska A.**, Magalska A., Plewczynski D. 2021. PartSeg: a tool for quantitative feature extraction from 3D microscopy images for dummies. *BMC Bioinformatics*. 22(1): 72.
2. **Grabowska A.**, Sas-Nowosielska H., Wojtas B., Holm-Kaczmarek D., Januszewicz E., Yushkevich Y., Czaban I., Trzaskoma P., Krawczyk K., Gielniewski B., Martin-Gonzalez A., Filipkowski R.K., Olszynski K.H., Bernas T., Szczepankiewicz A.A., Sliwinska M.A., Kanhema T., Bramham C.R., Bokota G., Plewczynski D., Wilczynski G.M., Magalska A. 2022. Activation-induced chromatin reorganization in neurons depends on HDAC1 activity. *Cell Rep*. 38(7): 110352.