

**Julia Masternak**

**Różnice w plastyczności synaptycznej w podregionach  
hipokampu zależne od receptora 5-HT<sub>7</sub>**

Praca doktorska

wykonana w Pracowni Biofizyki Komórki

Instytutu Biologii Doświadczalnej

im. M. Nenckiego PAN

**PROMOTOR:**

**Dr hab. Monika Bijata**

Warszawa, 2024



*Pragnę podziękować:*

*Mojej Promotor*

*dr hab. Monice Bijacie*

*za zaangażowanie i opiekę naukową.*

*Kierownikowi Pracowni Biofizyki Komórki*

*prof. dr. hab. Jakubowi Włodarczykowi*

*za możliwość wykonania pracy w Pracowni Biofizyki Komórki.*

*Współpracownikom z Pracowni Biofizyki Komórki*

*za wszelką udzieloną mi pomoc.*

*Najbliższym*

*za cierpliwość, wsparcie i motywację.*



Praca finansowana ze środków przyznanych dr hab. Monice Bijacie przez:

- Narodowe Centrum Nauki na podstawie decyzji numer:  
NCN nr 2019/35/D/NZ4/02042
- Fundację na rzecz Nauki Polskiej, na podstawie decyzji numer:  
FNP Homing POIR.04.04.00-00-43BC/17-00.



# Spis treści

Lista skrótów.....	9
Streszczenie .....	12
Abstract .....	13
1. Wstęp .....	14
1.1. Neuronalna plastyczność synaptyczna.....	14
1.2. Receptory serotoniny .....	19
1.2.1. Receptor 5-HT <sub>7</sub> .....	22
1.3. Rodzina małych Rho GTPaz.....	25
1.4. Struktura i funkcje hipokampu .....	28
2. Cele pracy.....	32
3. Materiały i metody .....	33
3.1. Stosowane roztwory i odczynniki chemiczne.....	33
3.2. Zwierzęta .....	36
3.3. Dootrzewnowe iniekcje u myszy .....	37
3.4. Operacje stereotaktyczne .....	37
3.5. Testy behawioralne.....	40
3.5.1. Test preferencji sacharozy (SPT).....	40
3.5.1. Test zawieszenia za ogon (TST).....	41
3.5.2. Badanie lokomotoryczne .....	41
3.6. Techniki biochemiczne .....	42
3.6.1. Oczyszczanie żelatynaz.....	42
3.6.2. Elektroforeza białek w żelu denaturującym .....	42
3.6.3. Zymografia żelowa.....	43
3.6.4. Western blot.....	44

3.6.5. Test aktywności RhoA/Cdc42 .....	45
3.7. Badanie struktury kolców dendrytycznych.....	45
3.7.1. Znakowanie neuronów .....	45
3.7.2. Obrazowanie kolców dendrytycznych .....	47
3.7.3. Analiza kolców dendrytycznych.....	47
3.8. Pierwotna hodowla neuronalna .....	48
3.9. Obrazowanie przyżyciowe neuronów hipokampu <i>in vitro</i> .....	49
3.10. Obrazowanie i pomiar zmian aktywności białek metodą FLIM .....	50
3.11. Analiza statystyczna wyników .....	51
4. Wyniki .....	53
4.1. Wpływ stymulacji 5-HT <sub>7</sub> R <i>in vivo</i> na zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych w podregionach hipokampu .....	53
4.2. Wpływ stymulacji 5-HT <sub>7</sub> R <i>in vitro</i> na zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych komórek ziarnistych hipokampu.....	57
4.3. Wpływ wyciszenia białek Gα <sub>s</sub> oraz Gα <sub>12</sub> na aktywność MMP-9 .....	60
4.4. Wpływ stymulacji 5-HT <sub>7</sub> R na aktywność MMP-9 w poszczególnych podregionach hipokampu .....	68
4.5. Wpływ stymulacji 5-HT <sub>7</sub> R na aktywność białek Cdc42 oraz RhoA w poszczególnych podregionach hipokampu .....	70
4.6. Wpływ chronicznej stymulacji 5-HT <sub>7</sub> R na zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych w podregionach hipokampu .....	74
4.7. Wpływ stymulacji 5-HT <sub>7</sub> R na zmiany behawioralne.....	79
5. Dyskusja .....	83
6. Podsumowanie i wnioski.....	98
7. Bibliografia.....	100
8. Spis publikacji własnych.....	120

## Lista skrótów

- 5-HT** – (ang. *5-hydroxytryptamine*) serotonina
- 5-HT<sub>7</sub>R** – (ang. *5-hydroxytryptamine receptor 7*) receptor serotoninowy 7
- AAV** – (ang. *adeno-associated virus*) wektor wirusa związanego z adenowirusami
- AGH-194** – specyficzny agonista 5-HT<sub>7</sub>R
- APS** – (ang. *ammonium persulfate*) nadsiarczan amonu
- BSA** – (ang. *bovine serum albumin*) albumina surowicy bydłowej
- CA1** – (łac. *Cornu ammonis 1*) pole 1 rogu Amona hipokampu
- CA3** – (łac. *Cornu ammonis 3*) pole 3 rogu Amona hipokampu
- cAMP** – (ang. *cyclic adenosine monophosphate*) cykliczny adenozylo-3',5'-monofosforan
- Cdc42** – (ang. *cell division cycle 42*) białko 42 cyklu komórkowego
- CFP** – (ang. *cyan fluorescent protein*) białko niebieskiej fluorescencji
- DiI** – nadchloran 1,10-dioktadecylo-3,3,3,3-tetrametyloindokarbocyaniny
- DIV** – (ang. *day in vitro*) dzień hodowli *in vitro*
- DG** – (łac. *Gyrus dentatus*) zakręt zębaty hipokampu
- DMEM** – (ang. *Dulbecco's modified Eagle medium*) podłoże do hodowli komórkowych
- DMSO** – (ang. *dimethyl sulfoxide*) dimetylosulfotlenek
- DQ-żelatyna** – (ang. *dye-quenched gelatin*) fluorescencyjny substrat MMP-2 oraz MMP-9
- ECM** – (ang. *extracellular matrix*) macierz zewnątrzkomórkowa
- EDTA** – (ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*) kwas etylenosiaminotetraoctowy
- FBS** – (ang. *fetal bovine serum*) płodowa surowica bydła
- FITC** – (ang. *fluorescein isothiocyanate*) fluoresceina izotiocyanianowa
- FLIM** – (ang. *Fluorescence Lifetime Imaging*) mikroskopia obrazowania czasu życia fluorescencji

**FRET** – (ang. *Förster Resonance Energy Transfer*) Försterowski rezonansowy transfer energii

**GAP** – (ang. *GTPase-Activating Protein*) białko aktywujące GTPazę

**GAPDH** – (ang. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego

**GEF** – (ang. *Guanine Nucleotide Exchange Factor*) czynnik wymiany nukleotydów guaninowych

**GFP** – (ang. *green fluorescent protein*) białko zielonej fluorescencji

**GPCR** – (ang. *G protein-coupled receptors*) receptory sprzężone z białkami G

**HBSS** – (ang. *Hanks' balanced salt solution*) buforowany roztwór soli Hanksa

**HEPES** – 2-(4-hydroksyetylo)piperazyń-1-yl)etanol

**HRP** – (ang. *horseradish peroxidase*) peroksydaza chrzanowa

**KTR** – grupa kontrolna

**LP-211** – specyficzny agonista 5-HT<sub>7</sub>R

**MMP** – (ang. *matrix metalloproteinases*) metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej

**MMP-2** – (ang. *matrix metalloproteinases 2*) metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 2

**MMP-9** – (ang. *matrix metalloproteinases 9*) metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 9

**OCT** – (ang. *Optimum Cutting Temperature Compound*) medium wykorzystywane do cięcia na kriostacie

**P** – (ang. *postnatal day*) dzień po urodzeniu

**P/S** – (ang. *Penicilin-Streptomycin*) antybiotyki penicylina i streptomycyna stosowane w hodowlach komórkowych

**PDL** – (ang. *Poly-D-Lysine*) poli-D-lizyna

**PBS** – (ang. *phosphate buffered saline*) buforowana sól fizjologiczna

**PFA** – (ang. *paraformaldehyde*) paraformaldehyd

**PLL** – (ang. *Poly-L-Lysine*) poli-L-lizyna

**PVDF** – (ang. *polyvinylidene difluoride membrane*) membrana z poliflorku winylidenu

**RFP** – (ang. *red fluorescent protein*) białko czerwonej fluorescencji

**RhoA** – (ang. *Ras homolog gene family, member A*) białko A rodziny białek homologicznych do Ras

**RNA** – (ang. *ribonucleic acid*) kwas rybonukleinowy

**SB** – (ang. *sample buffer*) bufor obciążający do SDS-PAGE

**SDS** – (ang. *sodium dodecyl sulfate*) dodecylosiarczan sodu

**SDS-PAGE** – (ang. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) elektroforeza na żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących

**SEM** – (ang. *standard error of the mean*) błąd standardowy średniej

**shRNA** – (ang. *short hairpin RNA*) sekwencja RNA tworząca strukturę spinki

**SPT** – (ang. *sucrose preference test*) test preferencji sacharozy

**SSRIs** – (ang. *selective serotonin reuptake inhibitors*) selektywne inhibitory zwrotnego wychwytu serotoniny

**TEMED** – (ang. *tetramethylethylenediamine*) N’N’N’N’-tetrametylenodiamina

**Tris** – 2-amino-2-hydroksymetylo-propanodiol

**TST** – (ang. *test suspension test*) test zawieszenia za ogon

**YFP** – (ang. *yellow fluorescent protein*) białko żółtej fluorescencji

## Streszczenie

Światowa Organizacja Zdrowia szacuje, że ok. 5% dorosłych na całym świecie cierpi na depresję. Najważniejsze objawy depresji to uczucie smutku, irytacji, pustki, utrata zainteresowań i szczęścia, niska samoocena oraz chroniczne zmęczenie. Nie zawsze są one zauważane, a osoby cierpiące na depresję często potrafią je dobrze ukrywać. W skrajnych przypadkach nieleczona lub nieskutecznie leczona depresja może prowadzić do myśli samobójczych, a nawet do prób samobójczych.

Główne badania związane z tym zagadnieniem opierają się na zrozumieniu mechanizmów molekularnych prowadzących do depresji. Wśród wielu zaangażowanych w to zaburzenie receptorów serotoninowych, od pewnego czasu receptor serotoninowy 7 (5-HT<sub>7</sub>R) wzbudza duże zainteresowanie.

Obecnie uważa się, że depresja wynika ze zmian strukturalnych w określonych obszarach mózgu. Liczne choroby neurologiczne i neuropsychiatryczne (w tym depresja) przyczyniają się do anomalii w gęstości i kształcie kolców dendrytycznych, czyli małych wypukłości dendrytów niektórych neuronów. Kształt kolców dendrytycznych zwykle koreluje z ich funkcją i fizjologiczną siłą połączenia synaptycznego. Odkrycie dokładnych mechanizmów modulujących kształt kolców jest niezwykle ważne i może stanowić przełom w leczeniu depresji.

Analiza morfometryczna kolców dendrytycznych wykazała, że stymulacja 5-HT<sub>7</sub>R prowadzi do wydłużenia kolców dendrytycznych w polu CA1 hipokampu, podczas gdy w zakręcie zębatym (podregion DG) zaobserwowano dojrzewanie kolców. Wykazano również, że zmiany te są przemijające. Korzystając z kombinacji metod biochemicznych i biofizycznych, przeprowadzono szczegółowe badanie mechanizmów leżących u podstaw różnic w plastyczności strukturalnej specyficznych dla CA1 i DG po stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R. W podregionach hipokampu zbadano profile aktywacji kluczowych regulatorów cytoszkieletu aktynowego, jakim są białka Cdc42 oraz RhoA. Wykazano zróżnicowany wpływ agonistów 5-HT<sub>7</sub>R na kształt i gęstość kolców dendrytycznych, jak również na zachowanie zwierząt. Przeprowadzone badania potwierdzają kluczowy i wielowymiarowy udział aktywacji 5-HT<sub>7</sub>R w modulowaniu plastyczności strukturalnej w hipokampie.

## Abstract

The World Health Organization estimates that 5% of adults all over the world suffer from major depression disorder (MDD). The most important symptoms of MDD are feeling sadness, irritation, emptiness, loss of interest and happiness, low self-esteem and chronic fatigue. They are not very always noticed and people suffering from depression can often hide them well. In extreme cases, untreated or ineffectively treated depression can lead to suicidal thoughts or even suicide attempts.

The main studies related to this issue are based on understanding of the molecular mechanisms leading to depression. Among multiple serotonin receptors involved in this disorder, serotonin receptor 7 (5-HT<sub>7</sub>R) has recently raised considerable interest.

Depression is now thought to result from structural changes in specific areas of the brain. Numerous neurological and neuropsychiatric diseases (including depression) contribute to abnormalities in the density and shape of small protuberances on the dendrites (dendritic spines). The shape of dendritic spines usually correlates with their function and the physiological strength of the synaptic connection. The discovery of the exact mechanisms modulating spines shape is extremely important and may represent a breakthrough in the treatment of depression.

Morphometric analysis of dendritic spines has shown that activation of 5-HT<sub>7</sub>R leads to the elongation of dendritic spines in CA1, while spines maturation was observed in the DG subregion. These changes were also shown to be transient. Using a combination of biochemical and biophysical methods, a detailed investigation of the mechanisms underlying CA1- and DG-specific differences in structural plasticity following 5-HT<sub>7</sub>R stimulation was conducted. The activation profiles of the key regulators of the actin cytoskeleton, the Cdc42 and RhoA proteins, were examined in hippocampal subregions. Differential effects of 5-HT<sub>7</sub>R agonists on the shape and density of dendritic spines, as well as on animal behaviour, have been demonstrated. This study confirms the crucial and multidimensional involvement of 5-HT<sub>7</sub>R activation in modulating structural plasticity in the hippocampus.

# 1. Wstęp

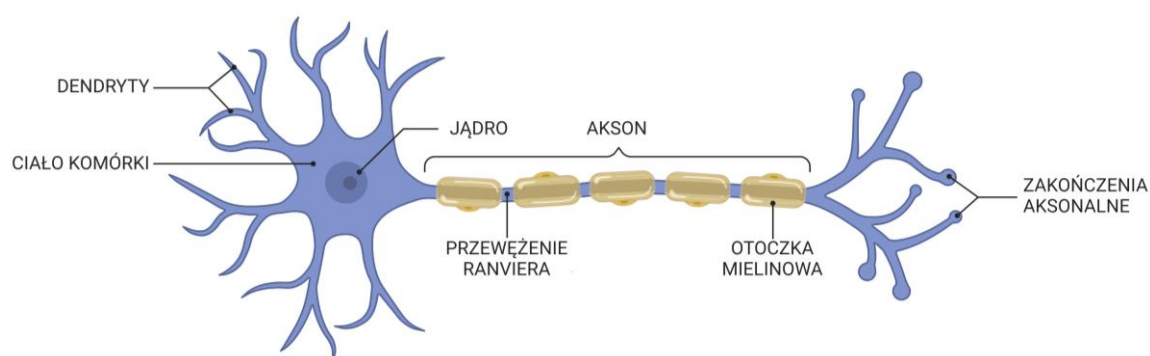
## 1.1. Neuronalna plastyczność synaptyczna

Plastyczność neuronalna stanowi jedną z najistotniejszych i zarazem fundamentalnych cech ośrodkowego układu nerwowego. Odnosi się do zdolności układu nerwowego do reorganizacji połączeń synaptycznych w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiskowe lub uszkodzenia, co pozwala na adaptację oraz naprawę funkcji [Konorski, 1948]. Koncepcję plastyczności synaptycznej wprowadził w 1948 roku polski naukowiec Jerzy Konorski, który jako pierwszy opisał ten mechanizm i jego kluczowe znaczenie dla funkcjonowania organizmu. Neuroplastyczność jest procesem trwającym całe życie organizmu, obejmującym zmiany zachodzące zarówno w pojedynczych komórkach nerwowych, jak i w szeroko zakrojonych sieciach neuronalnych. Fundamentem tego zjawiska jest modyfikacja siły połączeń synaptycznych między neuronami [Pascual-Leone i wsp., 2005; Rakic, 2002]. Plastyczność neuronalna przejawia się w procesach takich jak tworzenie i eliminacja połączeń synaptycznych, a także modyfikacje struktury dendrytów i aksonów. Na podstawie wieloletnich badań neuroplastyczność została podzielona na różne typy, w tym plastyczność rozwojową [Berardi i wsp., 2000], naprawczą [Murphy i Corbett, 2009], związaną z uczeniem się [Mayford i wsp., 2012], fizjologiczną [Holtmaat i Svoboda, 2009] i patologiczną [Martin i Huntsman, 2012; Penzes i wsp., 2011]. Jednakże wciąż najważniejszym aspektem plastyczności neuronalnej pozostaje plastyczność synaptyczna.

Podstawą plastyczności synaptycznej jest modyfikacja siły i liczby połączeń synaptycznych między komórkami nerwowymi. Zjawisko to może przejawiać się w postaci długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (LTP), które po raz pierwszy opisali Bliss i Lomo w 1973 roku lub długotrwałego osłabienia synaptycznego (LTD). Oba mechanizmy były przedmiotem licznych badań w kolejnych latach [Magee i Johnston, 1997; Bi i Poo, 1998; Sjostrom i wsp., 2001; Graupner i Brunel, 2012]. W ramach plastyczności synaptycznej obecnie wyróżnia się dwie ściśle powiązane składowe: zmiany strukturalne i funkcjonalne synaps [Noguchi i wsp., 2011; Sala i Segal, 2014]. Plastyczność strukturalna obejmuje zmiany liczby oraz budowy synaps [Engert i Bonhoeffer, 1999; Holtmaat i Svoboda, 2009], podczas gdy plastyczność funkcjonalna dotyczy modyfikacji liczby receptorów na błonie postsynaptycznej oraz regulacji ilości

i prawdopodobieństwa uwalniania neuroprzebieżników w części presynaptycznej [Weisskopf i Nicoll., 1995; Matsuzaki i wsp., 2004].

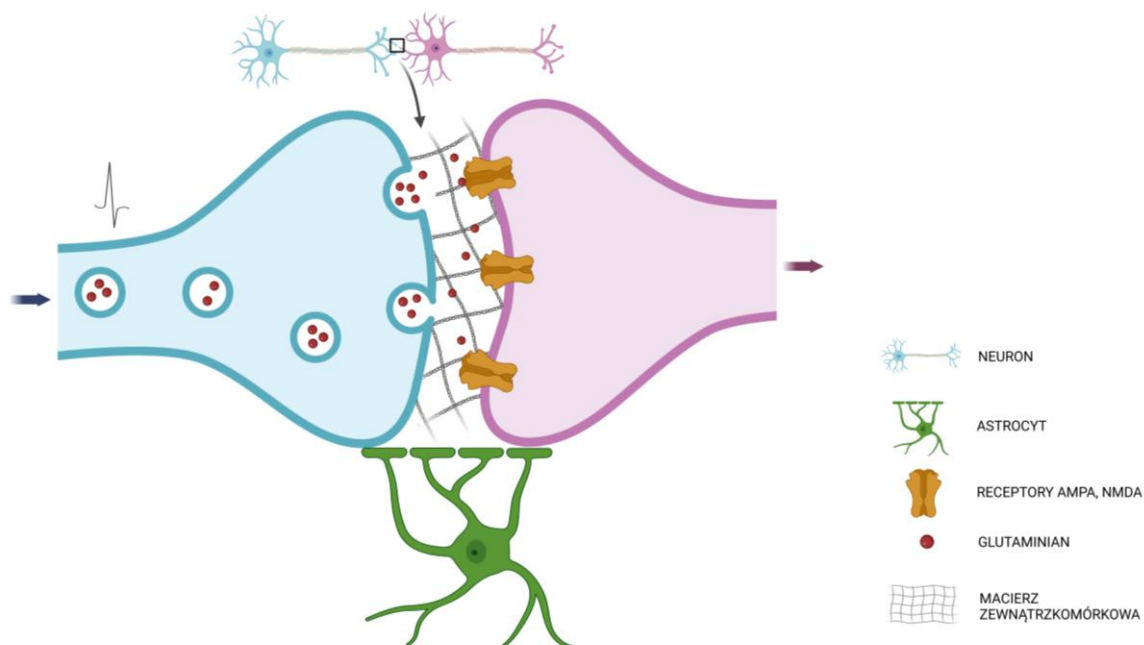
Komórka nerwowa (neuron) jest podstawową jednostką funkcjonalną układu nerwowego. Neuron zbudowany jest z ciała komórki (perikarionu) oraz dwóch rodzajów neurytów, z których wyróżniamy akson oraz dendryt (Ryc. 1.). Akson jest strukturą cieńszą niż dendryty, mającą nawet do 1 m długości. Jego podstawową funkcją jest przekazywanie informacji do innych neuronów. Natomiast dendryty, mogące posiadać na swojej powierzchni liczne wypustki, nazwane kolcami dendrytycznymi, odbierają informacje przekazywane od innych komórek nerwowych. Informacja w postaci impulsu nerwowego jest przesyłana między neuronami za pomocą synaps [Harris i Weinberg, 2012].



**Ryc. 1. Schemat budowy komórki nerwowej.** Utworzono w programie BioRender.com.

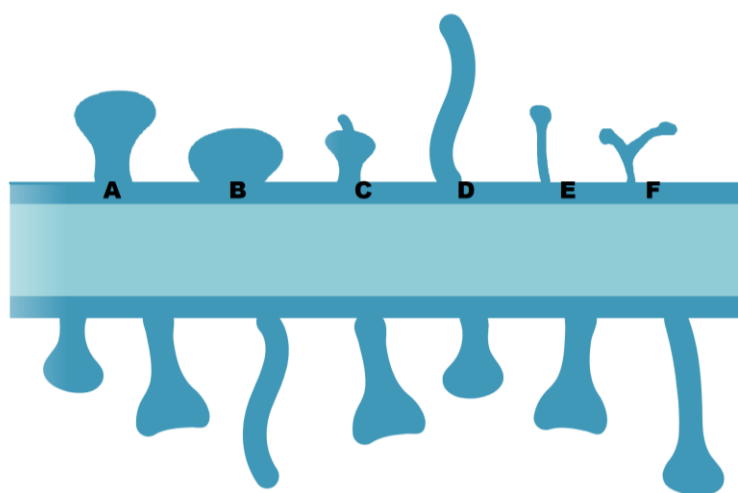
Synapsy można podzielić na synapsy elektryczne, w których informacja przekazywana jest bezpośrednio między neuronami oraz synapsy chemiczne, które charakteryzują się przekazywaniem informacji pomiędzy komórkami nerwowymi za pośrednictwem neuroprzebieżników. Neuroprzebieżnikami mogą być zarówno stosunkowo małe cząsteczki monoamin (np. dopamina, serotonina) i aminokwasów (np. glicyna), jak i większe cząsteczki, takie jak neuropeptydy (np. cholecystokinina, oksytocyna). W zależności od receptora, z którym się wiążą, neuroprzebieżniki mogą wywoływać efekty pobudzające lub hamujące. Cząsteczki neuroprzebieżników wiążące się z receptorami metabotropowymi powodują aktywację białek G. Inicjuje to szlaki sygnałowe prowadzące do uwolnienia wtórnych przebieżników wewnątrzkomórkowych. Natomiast związanie neuroprzebieżnika z receptorem jonotropowym wywołuje natychmiastowe otwarcie kanału jonowego. Pierwotnie uważano, że synapsa chemiczna składa się jedynie z części presynaptycznej na aksonie oraz części postsynaptycznej,

na dendrycie zaś pomiędzy tymi elementami występuje szczelina synaptyczna. Jednakże w 1999 roku zauważono, że istotną rolę w przekazywaniu informacji przez synapsę odgrywają również komórki głojowe -astrocyty [Ventura i Harris, 1999]. Odkrycie to doprowadziło do powstania pojęcia potrójnej synapsy [Araque i wsp., 1999]. Wykazano, że astrocyty pełnią funkcję kontrolującą przekazywanie sygnałów, zarówno poprzez uwalnianie cząsteczek chemicznych, m. in. ATP, glutaminianu i D-seryny, ale również eliminację neuroprzekazników ze szczeliny synaptycznej [Chung i wsp., 2015]. Kolejne badania wykazały jednak, że koncepcja potrójnej synapsy jest niepełna. Macierz zewnątrzkomórkowa (ECM) została wskazana jako element niezbędny do prawidłowego funkcjonowania synapsy, dając początek koncepcji poczwórnej synapsy (Ryc. 2.) [Dityatev i wsp., 2006; Dityatev Rusakov i wsp., 2011; Song i Dityatev, 2018]. ECM składa się z białek i glikanów, syntetyzowanych przez komórki nerwowe i komórki głojowe, a następnie uwalnianych do szczeliny synaptycznej, gdzie wchodzi w interakcje z receptorami na powierzchni komórek [Song i Dityatev, 2018]. ECM wpływa na regulację procesów neurogenezy, migracji komórek nerwowych, ich różnicowania, a także wzrost aksonów w trakcie rozwoju ośrodkowego układu nerwowego [Bandtlow i Zimmermann, 2000]. Oprócz tego ECM również stabilizuje istniejące połączenia synaptyczne i kontroluje mechanizmy plastyczności [Dityatev i Schachner, 2003; Włodarczyk i wsp., 2011].



**Ryc. 2. Schemat ilustrujący budowę poczwórnej synapsy (Dityatev i wsp., 2011).** Utworzono w programie BioRender.com.

Pierwszy opis kolców dendrytycznych pochodzi od Ramona y Cajala, który odkrył je w 1888 roku. Kolce dendrytyczne zbudowane są z główki o objętości od 0,02 do 0,3  $\mu\text{m}^3$  oraz szyjki o średnicy od 0,09 do 0,5  $\mu\text{m}$  i długości od 0,1 do 3  $\mu\text{m}$  [Harris i Stevens, 1989; Arellano i wsp., 2007]. Klasyfikacja kolców dendrytycznych opiera się na ich kształcie. Wśród najczęściej występujących wyróżnia się kolce grzybkowate, kolce przysadziste, kolce cienkie, kolce filopodialne, tzw. kolce SHP (ang. *spine head protrusion*), a także kolce rozgałęzione (Ryc. 3) [Harris i wsp., 1992; Harris i Kater, 1994; Fiala i wsp., 1998; Hering i Sheng, 2001; Jasinska i wsp., 2006; Verbich i wsp., 2012; Szepesi i wsp., 2013]. Kształt kolców dendrytycznych został powiązany z pełnioną przez nie funkcją [Kasai i wsp., 2003; Noguchi i wsp., 2011]. Około 65% kolców dendrytycznych w dojrzałym mózgu ma kształt grzybkowaty, 20% to kolce cienkie, a pozostałe 15% należy do innych typów [Zuo i wsp., 2005; Roo i wsp., 2008]. Kolce cienkie i kolce filopodialne wyróżniają się niewielką główką, która jest słabo wyodrębniona od szyjki. Kolce te są formami niedojrzałymi i niestabilnymi. Wykazują duży potencjał do zmian plastycznych. Uważa się, że są prekursorami kolców grzybkowatych, określanymi również jako kolce dojrzałe [Ziv i Smith, 1996; Bourne i Harris, 2007; Kayser i wsp., 2008].



**Ryc. 3. Schemat przedstawiający fragment dendrytu z najczęściej występującymi typami kolców dendrytycznych: (A) grzybkowaty, (B) przysadzisty, (C) SHP, (D) filopodialny, (E) cienki, (F) rozgałęziony. Utworzono częściowo w programie BioRender.com.**

Powszechnie uważa się, że kolce grzybkowate są kolcami dojrzałymi, odpowiedzialnymi za pamięć [Bourne i Harris, 2007]. Duża główka kolca osadzona jest na cienkiej szyjce. Kolce dendrytyczne, będące niewielkimi, ruchomymi wypustkami

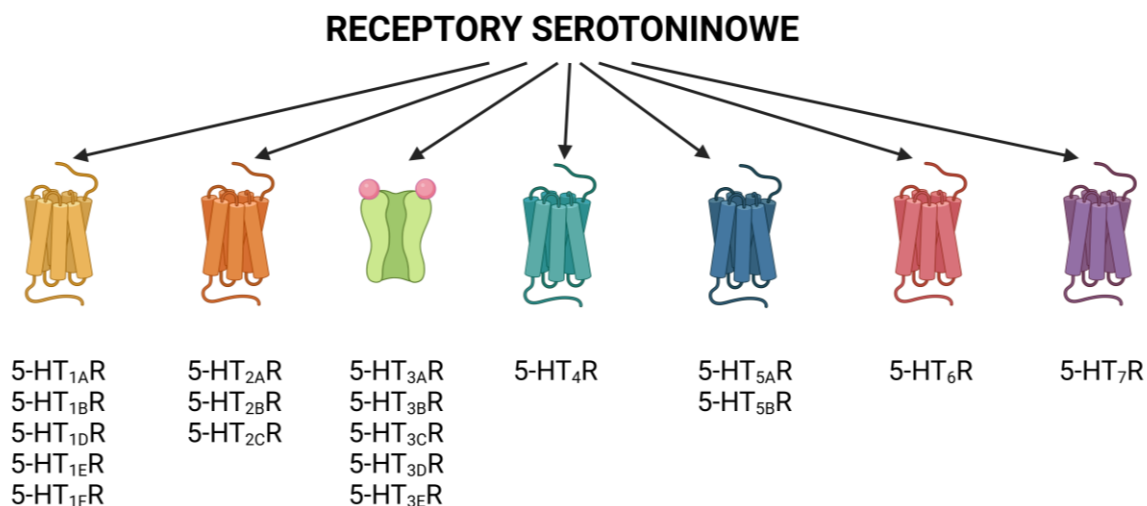
blonowymi neuronów, stanowią miejsce lokalizacji większości synaps pobudzających [Bourne i Harris, 2008]. Strukturą znajdującą się pod błoną postsynaptyczną, a odgrywającą kluczową rolę we wspomnianych synapsach pobudzających jest gęstość postsynaptyczna (ang. *postsynaptic density*, PSD). Zawiera ona między innymi receptory, kanały jonowe, białka sygnałowe, białka cytoszkieletu oraz białka adhezji komórkowej [Sheng i Kim, 2011; Harris i Weinberg, 2012]. Rozmiar główki kolca odpowiada liczbie receptorów AMPA (kwas amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopionowy) oraz NMDA (kwas N-metylo-D-asparaginowy) [Matsuzaki i wsp., 2001; Zito i wsp., 2009]. Liczne badania *in vivo* wskazały na nawet wielomiesięczną stabilność kolców dendrytycznych należących do tego typu [Grutzendler i wsp., 2002; Holtmaat i wsp., 2005].

Mimo szeroko opisanej klasyfikacji typów kształtów kolców dendrytycznych, należy pamiętać, że charakteryzują się one dynamiczną zmiennością swojej struktury [Yuste i Bonhoeffer, 2004; Ruszczycki i wsp., 2012; Pchitskaya i Bezprozvanny, 2020]. Szkielet kolców dendrytycznych złożony jest przede wszystkim z aktyny [Penzes i Rafalovich, 2012]. Kluczowym mechanizmem tych zmian jest reorganizacja cytoszkieletu aktynowego, który pełni fundamentalną rolę w tworzeniu, zmianach kształtu, stabilizacji oraz eliminacji kolców dendrytycznych. Modyfikacje dynamiki aktyny, budującej cytoszkielet, powodują zmiany w kształcie kolców dendrytycznych, co wpływa na siłę połączeń synaptycznych [Hlushchenko i wsp., 2016]. Zmiany kształtu i wielkości kolców dendrytycznych mogą zachodzić spontanicznie lub w odpowiedzi na informacje napływające do układu nerwowego. Zmiany obserwuje się zarówno w warunkach fizjologicznych, takich jak procesy uczenia się, jak i w stanach patologicznych, związanych z chorobami neurodegeneracyjnymi i neuropsychiatrycznymi [Fiala i wsp., 2002; Yang i wsp., 2009; Chidambaram i wsp., 2019; Bączyńska i wsp., 2021]. Dynamiczne zmiany zachodzą nieustannie i mogą być obecne również w życiu dorosłym [Holtmaat i wsp., 2005; Trachtenberg i wsp., 2002]. Znaczące zróżnicowanie strukturalne kolców dendrytycznych jest ściśle powiązane z siłą i funkcją ich połączeń synaptycznych [Nimchinsky i wsp., 2002; Rochefort i Konnerth, 2012].

## 1.2. Receptory serotoninowe

5-hydroktryptamina, znana powszechnie jako serotonina (5-HT) jest jednym z najstarszych, a równocześnie najczęściej występujących neurotransmiterów w mózgu [Dahlström i Fuxe, 1964; Steinbusch, 1981; Lesch i Waider, 2012]. Wykazuje wysokie powinowactwo do tzw. receptorów serotoninowych, z którymi wiążąc się wpływa na plastyczność synaptyczną. Podejrzewa się, że pierwsze receptory serotoninowe powstały nawet 700 milionów lat temu [Peroutka i Howell, 1994; Kroeze i Roth, 1998].

Klasyfikacja receptorów serotoninowych opiera się obecnie na ich budowie molekularnej, szlakach sygnałowych, które regulują, a także właściwościach farmakologicznych. Wyróżnia się siedem klas receptorów serotoninowych, a receptory 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> oraz 5-HT<sub>5</sub> są dodatkowo podzielone na podtypy (Ryc. 4). Receptory 5-HT są bardzo heterogenną grupą, a różnice opierają się nie tylko na odmiennej lokalizacji i funkcjach, ale również powinowactwie do serotoniny [Hoyer i wsp., 2002]. Receptory serotoninowe rozmieszczone są w całym organizmie, zarówno w układzie nerwowym ośrodkowym i obwodowym, ale również m. in. w przewodzie pokarmowym. Największe występowanie wykazano w ośrodkowym układzie nerwowym, przede wszystkim w hipokampie, korze czołowej, ciele migdałowatym, podwzgórzu i prądkowiu [McCorvy i Roth, 2015; Millan i wsp., 2008; Olivier, 2015]. Receptory 5-HT poprzez regulację serotoninowych szlaków sygnałowych ogrywają ważną rolę w procesach autonomicznych, zdolnościach poznawczych, regulacji emocji, przetwarzaniu sensorycznym oraz reakcjach motorycznych. Wykazano, że choroby neuropsychiatryczne oraz neurodegeneracyjne, takie jak depresja, autyzm czy schizofrenia, związane są z zaburzonym funkcjonowaniem receptorów serotoninowych [McCorvy i Roth, 2015; Olivier, 2015].



**Ryc. 4. Klasyfikacja receptorów serotoninowych na podstawie ekspresji genów.** Utworzono w programie BioRender.com.

Receptory serotoninowe należą do rodziny receptorów sprzężonych z białkiem G (GPCR), z wyjątkiem receptora 5-HT<sub>3</sub>, który jest kanałem jonowym selektywnym dla kationów Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> i Ca<sup>2+</sup> [Angers i wsp., 2002; Berger i wsp., 2009]. Strukturalną podstawą GPCR jest pojedynczy łańcuch polipeptydowy, który przechodzi siedmiokrotnie przez dwuwarstwę lipidową błony komórkowej. Obecne hydrofobowe domeny transbłonowe w formie  $\alpha$ -helis są połączone sześcioma pętlami, rozmieszczonymi symetrycznie po obu stronach błony komórkowej. Na zewnętrznej stronie błony komórkowej znajduje się tzw. N-koniec łańcucha białkowego, zawierający wolną grupę aminową, natomiast po wewnętrznej stronie umieszczony jest C-koniec z wolną grupą karboksylową. Stabilizacja struktury GPCR w błonie komórkowej jest możliwa dzięki obecności wiązań wodorowych pomiędzy  $\alpha$ -helisami oraz specyficznemu rozmieszczeniu aminokwasów - hydrofilowych na powierzchni receptora i hydrofobowych w błonie lipidowej [Warne i wsp., 2008; Park i wsp., 2008; Scheer i wsp., 2008; Rosenbaum i wsp., 2007; Rasmussen i wsp., 2007].

Stymulacja GPCR prowadzi do aktywacji białek wiążących nukleotydy guaninowe (tzw. białek G), które są heterotrimerycznymi kompleksami składającymi się z podjednostek  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  [Kobilka, 2007]. Po związaniu GTP, podjednostka  $\alpha$  ulega dysocjacji od podjednostek  $\beta$  i  $\gamma$ , co pozwala jej oddziaływać z wewnątrzkomórkowymi białkami sygnałowymi lub funkcjonalnymi. Typ podjednostki  $\alpha$  ( $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_{i/o}$ ,  $G\alpha_{q/11}$ ,  $G\alpha_{12/13}$ ) determinuje jej specyficzny wpływ na szlaki sygnałowe. Jednocześnie

podjednostki  $\beta$  i  $\gamma$  mogą oddziaływać niezależnie na efekторы sygnałowe, wspólnie modulując aktywność białek inicjujących komórkowe szlaki sygnałowe [Woehler i wsp., 2009].

Około 3-5% ludzkiego genomu stanowią geny kodujące receptory GPCR, co podkreśla ich kluczową rolę w procesach biologicznych [Takeda i wsp., 2002]. Ich wszechobecność w kluczowych szlakach sygnałowych czyni je jednym z najważniejszych celów w badaniach biomedycznych. Obecnie około 50% nowoczesnych leków jest ukierunkowana na modulowanie aktywności białek z rodziny GPCR [George i wsp., 2002; Horn i wsp., 2003].

Receptory serotoniny z rodziny 5-HT<sub>1</sub> wykazują wysokie powinowactwo do  $G\alpha_{i/o}$ , co skutkuje hamowaniem cykazy adenylowej i prowadzi do obniżenia stężenia cyklicznego monofosforanu adenylozyny (cAMP). W przeciwieństwie do receptorów 5-HT<sub>1</sub>, receptory 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub> oraz 5-HT<sub>7</sub> wiążą się z białkiem  $G\alpha_s$ , co prowadzi do zwiększenia syntezy cAMP poprzez aktywację cykazy adenylowej. Z kolei receptory 5-HT<sub>2</sub> wiążą się z  $G\alpha_{q/11}$ , co skutkuje aktywacją fosfolipazy C (PLC), która katalizuje hydrolizę fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu (PIP<sub>2</sub>) do inozytolo-1,4,5-trisfosforanu (IP<sub>3</sub>) oraz diacyloglicerolu (DAG). IP<sub>3</sub> powoduje uwolnienie jonów wapniowych ( $Ca^{2+}$ ) z retikulum endoplazmatycznego, przyczyniając się do wzrostu poziomu cytozolowego tego kationu. Natomiast DAG inicjuje aktywację kinazy białkowej C (PKC), co umożliwia fosforylację poszczególnych białek i uruchamia kolejne etapy szlaku sygnałowych [Hoyer i wsp., 2002]. Dodatkowo wykazano, że 5-HT<sub>7</sub>R może łączyć się z  $G\alpha_{12}$ , a 5-HT<sub>4</sub>R z  $G\alpha_{13}$ . Białka  $G\alpha_{12}$  oraz  $G\alpha_{13}$  regulują aktywność białek z rodziny małych GTPaz [Kvachnina i wsp., 2005; Ponimaskin i wsp., 2002].

Aktywność receptorów 5-HT jest również regulowana poprzez modyfikacje potranslacyjne białek, takie jak palmitoilacja, fosforylacja oraz glikozylacja [Millan i wsp., 2008]. Przykładowo, palmitoilacja 5-HT<sub>1A</sub>R umożliwia wiązanie się tego receptora z białkiem  $G\alpha_i$ , a sam proces palmitoilacji tego receptora jest nieodwracalny i niezależny od agonisty [Kobe i wsp., 2008; Papoucheva i wsp., 2004; Woehler i wsp., 2009]. Palmitoilacja 5-HT<sub>4</sub>R oraz 5-HT<sub>7</sub>R stabilizuje je w formie nieaktywnej i jest procesem dynamicznym, odwracalnym oraz zależnym od agonisty. 5-HT<sub>4</sub>R i 5-HT<sub>7</sub>R w formie niepalmitoilowanej wykazują zwiększoną konstytutywną aktywność szlaku zależnego od  $G\alpha_s$  niezależnie od agonistów, podczas gdy w przypadku 5-HT<sub>7</sub>R

aktywacja szlaku zależnego od  $G\alpha_{12}$  pozostaje niezmienna [Ponimaskin i wsp., 2001; Kvachnina i wsp., 2009; Guseva i wsp., 2014]. Proces glikozylacji odgrywa istotną rolę w transporcie oraz lokalizacji błonowej 5-HT<sub>5A</sub>R [Dutton i wsp., 2008]. Przewlekła stymulacja receptorów 5-HT może powodować ich fosforylację poprzez kinazę białkową A, kinazę białkową C, a także kinazy GRK (ang. *G protein-coupled receptor kinases*), co prowadzi do desensytyzacji, a także zmienia sygnalizację na niezależną od białek G poprzez promowanie wiązania  $\beta$ -arrestyny [Freedman i Lefkowitz, 1996; Krupnick i Benovic, 1998; Ferguson, 2001; Gehret i Hinkle, 2010].

### 1.2.1. Receptor 5-HT<sub>7</sub>

5-HT<sub>7</sub>R jest najpóźniej odkrytym receptorem serotoninowym. Po raz pierwszy został opisany w 1993 roku, równocześnie przez trzy niezależne grupy [Bard i wsp. 1993; Lovenberg i wsp., 1993; Ruat i wsp., 1993]. Analiza strukturalna wykazała istnienie pięciu izoform 5-HT<sub>7</sub>R, z których u ludzi występują izoformy: 5-HT<sub>7A</sub>R, 5-HT<sub>7B</sub>R, 5-HT<sub>7D</sub>R, natomiast u szczurów dodatkowo 5-HT<sub>7C</sub>R i 5-HT<sub>7E</sub>R. Isoformy te powstają na drodze alternatywnego składowania eksonów i różnią się one pod względem długości końca C, a także wykazują odmienną ekspresję w różnych tkankach [Heidmann i wsp., 1998; Krobert i wsp., 2001; Liu i wsp., 2001]. 5-HT<sub>7D</sub>R różni się od innych izoform sposobem wiązania ligandów i mechanizmami przekazywania sygnałów [Guthrie i wsp., 2005; Heidmann i wsp., 1998; Krobert i wsp., 2001].

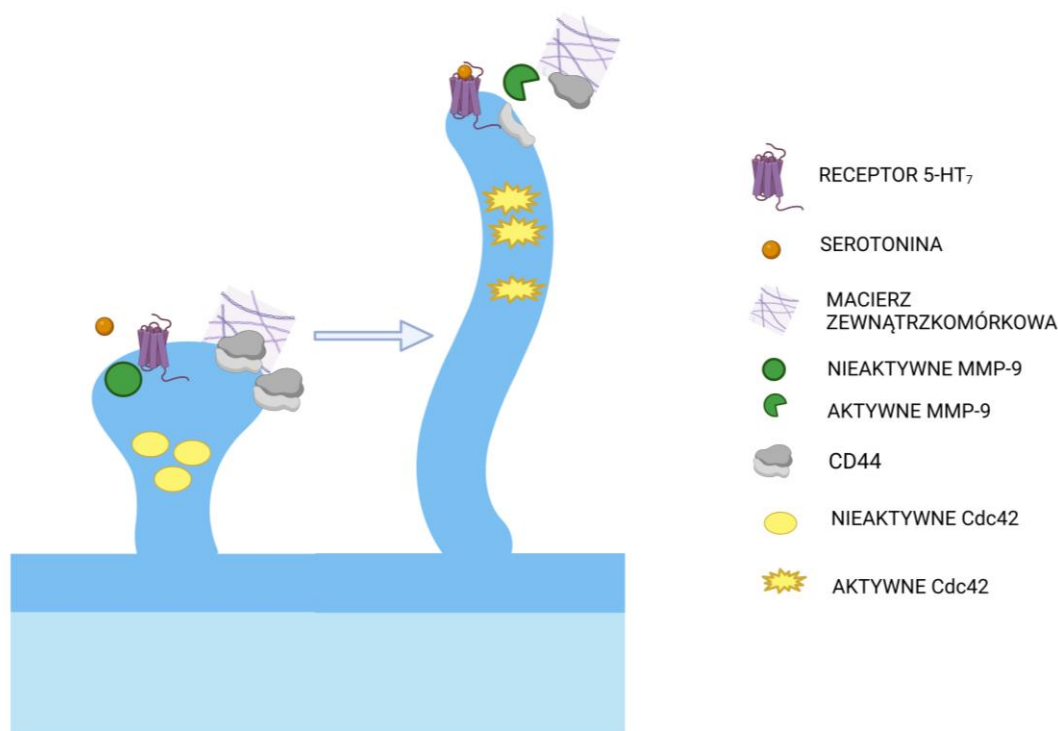
5-HT<sub>7</sub>R jest sprzężony zarówno z białkiem  $G\alpha_s$ , jak i  $G\alpha_{12}$  [Guseva i wsp., 2014; Wirth i wsp., 2017]. Już w 1993 roku wykazano, że zależna od 5-HT<sub>7</sub>R aktywacja  $G\alpha_s$  prowadzi do wzrostu poziomu cAMP poprzez aktywację cykazy adenylowej, co następnie skutkuje aktywacją kinazy białkowej A (PKA) [Shen i wsp., 1993, Norum i wsp., 2003]. PKA z kolei fosforyluje różne białka, modulując kaskady sygnałowe, takie jak szlaki kinazy regulowanej sygnałem zewnątrzkomórkowym (ang. *Extracellular Signal-Regulated Kinases*, ERK) oraz kinazy białkowej B (ang. *Protein Kinase B*, PKB) [Errico i wsp., 2001; Guseva i wsp., 2014; Johnson-Farley i wsp., 2005; Volpicelli i wsp., 2014]. Co istotne, aktywacja ERK za pośrednictwem białka  $G\alpha_s$  może być zarówno zależna, jak i niezależna od PKA. W tym drugim przypadku proces ten opiera się na aktywacji czynników wymiany nukleotydów guaninowych cAMP, takich jak Epac1 i Epac2 (ang. *Exchange proteins directly activated by cAMP*) [Bonsi i wsp., 2007; Chapin i Andrade, 2001; Lin i wsp., 2003].

Dodatkowo 5-HT<sub>7</sub>R jest sprzężony z białkiem G $\alpha_{12}$ , które aktywuje małe Rho GTPazy, takie jak Cdc42 oraz RhoA, wpływając na procesy związane z cytoszkieletem komórkowym [Kobe i wsp., 2012; Kvachnina i wsp., 2005]. Wykazano, że G $\alpha_q$ , G $\alpha_{12}$  i G $\alpha_{13}$  są kluczowymi mediatorami sygnalizacji GPCR, poprzez bezpośrednie oddziaływanie z białkami RhoGEF (ang. *Rho guanine nucleotide exchange factors*), które zawierają domenę regulatora sygnalizacji białek G (ang. *regulator of G protein signaling*, RGS) [Hiley i wsp., 2006]. G $\alpha_{12}$  powiązane zostało również funkcjonalnie z białkami kotwiczącymi kinazy A (AKAP-Lbc) [Diviani i wsp., 2007] i białkiem szoku cieplnego 90 (Hsp90) [Waheed i Jones, 2002]. Stymulacja 5-HT<sub>7</sub>R poprzez aktywację białka G $\alpha_{12}$  promuje synaptogenezę, co skutkuje zwiększoną spontaniczną aktywnością synaptyczną [Kobe i wsp., 2012]. Warto zauważyć, że aktywacja szlaku 5-HT<sub>7</sub>R prowadzi również do wzrostu neurytów w neuronach kory i prążkowie, co jest zależne od kinazy ERK i kinazy cyklinozależnej 5 (ang. *cyclin-dependent kinase 5*, Cdk5) [Speranza i wsp., 2013]. 5-HT<sub>7</sub>R, oprócz aktywacji białek G, inicjuje także alternatywne szlaki sygnałowe, w tym szlak  $\beta$ -arestyny. Stwierdzono, że  $\beta$ -arestyna także odgrywa kluczową rolę w procesie aktywacji ERK [El Khamlichi i wsp., 2022]. Oprócz tego wykazano, że po stymulacji receptora, C-koniec GPCR może stać się substratem do fosforylacji przez kinazy receptorowe sprzężone z białkiem G [Gehret i Hinkle, 2010]. Fosforylowane receptory wykazują wysokie powinowactwo do  $\beta$ -arestyny, która utrudnia interakcje między receptorem a heterotrimerycznym białkiem G. Prowadzi to do desensytyzacji i tłumienia sygnalizacji zależnych od białka G [Perry i wsp., 2002].

Warto zauważyć, że ligandy o właściwościach odwrotnego agonisty 5-HT<sub>7</sub>R mogą prowadzić do heterologicznej desensytyzacji innych rodzin receptorów sprzężonych z białkiem G [Krobert i wsp., 2006]. Stwierdzono również, że konstytutywna aktywność 5-HT<sub>7</sub>R podlega regulacji poprzez palmitoilację. Proces ten dotyczy reszt cysteinowych 404, 438 oraz 441, w C-końcowej domenie receptora i zachodzi w sposób zależny od agonisty [Guseva i wsp., 2014; Kvachnina i wsp., 2009].

W warunkach *in vitro*, w pierwotnych hodowlach neuronalnych uzyskanych z komórek hipokampalnych, wykazano aktywację szlaku sygnałowego 5-HT<sub>7</sub>R/MMP-9/CD44/Cdc42. Stymulacja 5-HT<sub>7</sub>R indukuje aktywację MMP-9, która jest odpowiedzialna za proteolizę białka transbłonowego CD44. W wyniku tego dochodzi do aktywacji białka Cdc42, co skutkuje wydłużeniem kolców dendrytycznych (Ryc. 5) [Bijata i wsp., 2017]. Natomiast badania *in vivo* wykazały, że ten szlak sygnałowy jest

aktywowany w odpowiedzi na przewlekły stres. Podanie agonisty 5-HT<sub>7</sub>R indukuje zachowania depresyjno-podobne. Co więcej, wyciszenie ekspresji genu kodującego receptor 5-HT<sub>7</sub>R w podregionie CA1 hipokampu zapobiegało występowaniu zachowań anhedonicznych u myszy poddanych chronicznemu stresowi, co sugeruje jego potencjalny udział w patogenezie zaburzeń depresyjnych [Bijata i wsp., 2022].



**Ryc. 5. Schemat szlaku sygnałowego zależnego od 5-HT<sub>7</sub>R.** Stymulacja 5-HT<sub>7</sub>R inicjuje aktywację MMP-9, która powoduje proteolizę CD44. W efekcie następuje wzrost aktywności białka Cdc42, co poprzez wpływ na cytoszkielet aktywny skutkuje wydłużaniem kolców dendrytycznych (Bijata i wsp., 2017).

5-HT<sub>7</sub>R ulega największej ekspresji w ośrodkowym układzie nerwowym. Największą koncentrację tego receptora wykryto w rdzeniu kręgowym, wzgórzcu oraz hipokampie [Gustafson i wsp., 1996], a także jądrach szwu i podwzgórzcu (w szczególności w jądrze nadskrzyżowaniowym) [Monti i wsp., 2006; Leopoldo i wsp., 2011]. Natomiast kora mózgowa, jądro migdałowe, mózdzek, jądro ogoniaste i skorupa wykazują stosunkowo niski poziom 5-HT<sub>7</sub>R [Barnes i Sharp, 1999; Horisawa i wsp., 2013]. Stwierdzono, że oprócz ośrodkowego układu nerwowego, 5-HT<sub>7</sub>R występuje również w przewodzie pokarmowym (przede wszystkim w jelitach), gdzie zaangażowany jest w regulację perystaltyki [Tuladhar i wsp., 2003], a także w komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych [Schoeffter i wsp., 1996]. 5-HT<sub>7</sub>R związany jest

z licznymi reakcjami fizjologicznymi oraz patologicznymi. Oprócz wpływu na wymienioną wcześniej perystaltykę czy komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych, obejmuje także regulację rytmu okołodobowego, zarówno poprzez indukowane serotoniną przesunięcie fazy rytmu okołodobowego [Lovenberg i wsp., 1993]. 5-HT<sub>7</sub>R istotnie wpływa na procesy pamięci [Cifariello i wsp., 2008], emocje [Stiedl i wsp., 2015], a także aktywność lokomotoryczną i eksploracyjną [Liu i Jordan, 2005; Takeda i wsp., 2005]. Potwierdzono również rolę tego receptora w patofizjologii chorób neurologicznych, takich jak ból neuropatyczny [Viguier i wsp., 2013; Santello i wsp., 2017] oraz epilepsja [Perić i Svob Strac, 2007; Yang i wsp., 2012]. Wiele dowodów wskazuje na zaangażowanie 5-HT<sub>7</sub>R w chorobach neuropsychiatrycznych, jakimi są depresja, zaburzenia lękowe oraz schizofrenia [Hedlund, 2009; Gellynck i wsp., 2013; Okubo i wsp., 2021]. Narażenie zwierząt na chroniczny stres powoduje aktywację 5-HT<sub>7</sub>R i ścieżki sygnałowej Cdc42/MMP-9, co prowadzi do zachowań przypominających depresję, charakteryzujących się anhedonią i podwyższonym poziomem kortykosteronu [Bijata i wsp., 2022]. Zahamowanie ekspresji genu *htr7* w podregionie CA1, który koduje 5-HT<sub>7</sub>R, przeciwdziało powstawaniu zachowań depresyjno-podobnych u zwierząt, wywoływanych w procedurze chronicznego nieprzewidywalnego stresu [Bijata i wsp., 2022]. Farmakologiczne zablokowanie 5-HT<sub>7</sub>R za pomocą selektywnego odwrotnego agonisty skutkuje działaniem przeciwdepresyjnym u zwierząt, co wykazano w teście zawieszenia za ogon [Hedlund i wsp., 2005; Bonaventure i wsp., 2007; Wesolowska i wsp., 2006] oraz teście wymuszonego pływania [Hedlund i wsp., 2005; Wesolowska i wsp., 2006; Wesolowska i wsp., 2008]. Antagonista tego receptora poprawiał również pamięć odniesienia oraz funkcje poznawcze w doświadczeniu wykorzystującym labirynt [Gasbarri i wsp., 2008]. Obecne na rynku leki przeciwdepresyjne i przeciwpsychotyczne opierają się między innymi na blokowaniu 5-HT<sub>7</sub>R. Wśród nich warto zwrócić uwagę na amisulpryd [Abbas i wsp., 2009], lurasidon [Fukuyama i wsp., 2022] i wortioksetynę [Sanchez i wsp., 2015].

### 1.3. Rodzina małych Rho GTPaz

Białka należące do rodziny małych Rho GTPaz są monomerami o niskiej masie cząsteczkowej, wynoszącej 20-30 kDa. Zazwyczaj składają się z maksymalnie 250 reszt aminokwasowych i zawierają krótkie sekwencje zarówno na C-końcu, jak i N-końcu. Ich cechą charakterystyczną jest obecność domeny GTPazowej, która umożliwia wiązanie oraz hydrolizę nukleotydów guaninowych, takich jak GTP

(guanozynotrifosforan) oraz GDP (guanozynodifosforan). Wiązanie GTP wprowadza białko w stan aktywny, wywołując zmiany konformacyjne w jego strukturze. Zmiany te umożliwiają interakcje z określonymi efektorami lub ligandami. Z kolei przyłączenie GDP prowadzi do inaktywacji białka. Proces przejścia pomiędzy stanem aktywnym i nieaktywnym jest kontrolowany przez białka regulatorowe. Kluczową rolę w tym procesie odgrywają trzy grupy białek regulatorowych: GDI (ang. *Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor*), GEF (ang. *Guanine nucleotide Exchange Factor*) oraz GAP (ang. *GTPase-Activating Protein*). Białka GDI, które w stanie nieaktywnym wiążą się z GTPazami, zapobiegają wymianie GDP na GTP i tym samym stabilizują formę nieaktywną białka. Białka GEF ułatwiają odłączenie białek GDI od GTPaz, umożliwiając wymianę GDP na GTP. Proces ten prowadzi do aktywacji GTPazy i jest kluczowy dla modulowania kierunku aktywacji szlaków sygnałowych aktywowanych przez Rho GTPazy. Natomiast białka GAP inicjują hydrolizę GTP do GDP, co skutkuje przejściem GTPaz w stan nieaktywny. W ten sposób GAP regulują czas trwania aktywności białka. Regulacja aktywności Rho GTPaz przez te białka pozwala na precyzyjne kontrolowanie procesów sygnałowych w komórce, co ma kluczowe znaczenie dla wielu aspektów jej funkcjonowania [Jaffe i Hall, 2005].

Rho GTPazy zaliczane są do nadrodziny małych białek G. W obrębie rodziny białek Rho występuje sześć podrodzin: Cdc42 (ang. *Cell division control protein 42*), RhoA (ang. *Ras homologous A*), Rac (ang. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate*), Rnd (ang. *Resistance-Nodulation-Cell Division*), RhoBTB (ang. *Rho-related BTB domain containing*) oraz Miro (ang. *Mitochondrial Rho GTPase*). Podział ten opiera się na podobieństwach strukturalnych i funkcjonalnych pomiędzy białkami. Obecnie znanych jest ponad 100 białek należących do rodziny Rho GTPaz, które odgrywają rolę w prawidłowym rozwoju i funkcjonowaniu organizmów eukariotycznych. Małe Rho GTPazy uczestniczą w wielu kluczowych procesach komórkowych, takich jak kontrola cyklu komórkowego [Olson i wsp., 1995], regulacja transkrypcji genów [Hill i wsp., 1995] oraz procesy związane z przeżyciem i śmiercią komórki [Heasman i Ridley, 2008; Linseman i Loucks, 2008].

Białka należące do rodziny małych Rho GTPaz są niezbędne dla właściwego funkcjonowania układu nerwowego. Ich zdolność do regulacji cytoszkieletu aktynowego i organizacji mikrotubul stanowi fundament wielu procesów, które wpływają na strukturę i funkcję komórek nerwowych. Rho GTPazy odgrywają istotną rolę w synaptogenezie

[Jontes i Smith, 2000] oraz przebudowie kolców dendrytycznych [Tashiro i wsp., 2000; Tashiro i Yuste, 2004; Murakoshi i wsp., 2011; Bijata i wsp., 2017; Schill i wsp., 2020]. Badania wykazały silną zależność między aktywnością białka RhoA a gęstością kolców dendrytycznych. Konstytutywnie aktywna forma RhoA, wprowadzona do komórek nerwowych w pierwotnej hodowli, powoduje redukcję gęstości kolców dendrytycznych [Tashiro i wsp., 2000; Nakayama i wsp., 2000; Pilpel i Segal, 2004]. Natomiast zahamowanie aktywności RhoA przy użyciu transferazy C3 pochodzącej z bakterii *Clostridium botulinum*, skutkuje wzrostem gęstości kolców dendrytycznych w neuronach kory mózgowej i hipokampu [Tashiro i wsp., 2000]. Ponadto w badaniach przyżyciowych skrawków mózgu wykazano, że miejscowe uwolnienie glutaminianu, wywołane wzbudzeniem dwufotonowym, stymuluje pojedynczy kolec dendrytyczny, prowadząc do szybkiej i silnej aktywacji białek RhoA i Cdc42. Proces ten wiąże się z wyraźnym zwiększeniem objętości kolca dendrytycznego. W miarę upływu czasu wszystkie trzy zmiany – zwiększona aktywność obu Rho GTPaz oraz powiększona objętość kolca – stopniowo wracają do stanu sprzed stymulacji. Co ciekawe, aktywność białka Cdc42 ogranicza się tylko do główki stymulowanego kolca dendrytycznego, podczas gdy aktywność białka RhoA może rozprzestrzeniać się nawet na odległość 4,5  $\mu\text{m}$  od miejsca stymulacji, obejmując zarówno dendryt, jak i sąsiednie kolce dendrytyczne. Białka Cdc42 i RhoA działają komplementarnie względem siebie. Wykazano, że białko RhoA jest niezbędne do zainicjowania wzrostu kolca dendrytycznego, natomiast białko Cdc42 jest kluczowe do utrzymania powstałych zmian morfologicznych [Yasuda i Murakoshi, 2011; Murakoshi i wsp., 2011]. Białka Cdc42, RhoA oraz Rac wpływają również na strukturę kolców dendrytycznych w sposób pośredni, kontrolując aktywność innych białek. Na przykład, RhoA aktywuje kinazę ROCK (ang. *Rho-associated coiled-coil kinase*), natomiast Cdc42 kinazę PAK (ang. *p21-activated kinase*). Oba te enzymy fosforylują kinazy LIM (LIMK, ang. *LIM kinase*), co prowadzi do ich aktywacji. Aktywne LIMK fosforylują kofilinę, co prowadzi do jej inaktywacji. W wyniku tego procesu zmniejsza się zdolność kofiliny do depolimeryzacji filamentów aktynowych, co stabilizuje istniejące struktury aktynowe. Ten mechanizm jest kluczowy dla regulacji dynamiki polimeryzacji aktyny, co bezpośrednio wpływa na kształt i strukturę kolców dendrytycznych [Ponimaskin i wsp., 2007; Woolfrey i Srivastava, 2016].

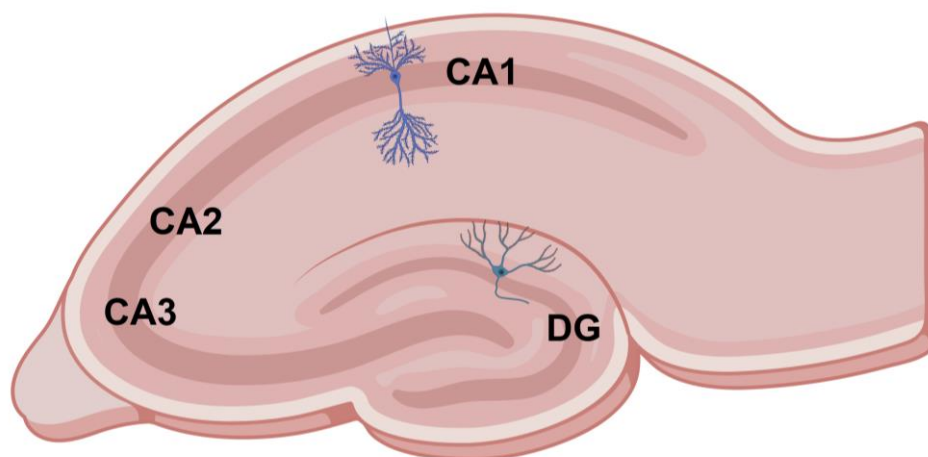
Wpływ białek z rodziny Rho GTPaz na liczne procesy fizjologiczne, zwłaszcza te związane z funkcjonowaniem układu nerwowego, stał się przedmiotem wielu badań mających na celu zrozumienie roli zaburzeń ich aktywności w rozwoju patologii i chorób.

Dysfunkcje przekazywania sygnałów regulowanego przez Cdc42 są związane m.in. z chorobą Alzheimera [Ma i wsp., 2008], epilepsją [Xiao i wsp., 2008] oraz schizofrenią [Ide i Lewis, 2010]. W kontekście zaburzeń związanych ze stresem zauważono, że zarówno obniżona ekspresja genu kodującego białko Cdc42, prowadząca do zmniejszenia jego ilości [Hanin i wsp., 2014], jak i nadmierna aktywacja tego białka [Bhattacharya i wsp., 1995], mogą prowadzić do zaburzeń nastroju. Z kolei, zaburzenia w sygnalizacji RhoA odgrywają kluczową rolę w rozwoju chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Parkinsona, choroba Alzheimera, choroba Huntingtona, stwardnienie zanikowe boczne [Schmidt i wsp. 2022]. RhoA jest również zaangażowane w patogenezę zaburzeń neuropsychiatrycznych, takich jak autyzm [Lin i wsp., 2015; Krey i wsp., 2013].

## 1.4. Struktura i funkcje hipokampu

Hipokamp od dawna stanowi przedmiot intensywnych badań naukowych, które nie tracą na znaczeniu w międzynarodowym środowisku badawczym. Jest to struktura mózgu znajdująca się w płacie limbicznym, w zakręcie intralimbicznym, a dokładnie w przyśrodkowej części półkuli mózgu, gdzie oddzielona jest od kory mózgowej szczeliną limbiczną (Duvernoy, 2005; Nieuwenhuys i wsp., 2007; Paxinos i Franklin, 2008). Nazwa „hipokamp” wywodzi się z łaciny, pierwotnie oznaczając „konika morskiego” – odniesienie to nawiązuje do charakterystycznego kształtu tej struktury.

Hipokamp przypomina łuk, z rozszerzonym segmentem przednim i węższym segmentem tylnym. Zbudowany jest z dwóch ząbujących się blaszek kory heterotypowej: zakrętu zębatego (ang. *Dentate Gyrus*, DG) oraz rogu Amona (łac. *Cornu Ammonis*, CA), które zawinięte są względem siebie (Duvernoy, 2005) (Ryc. 6). Róg Amona dzieli się na kilka podregionów. U gryzoni są to: CA1, CA2 i CA3, natomiast u ludzi wyróżnia się także podregion CA4 (Hao i wsp., 2023). Podział na podregiony oparty jest na różnicach w morfologii neuronów.



**Ryc. 6. Schemat przekroju części grzbietowej hipokampu gryzoni z zaznaczonymi podregionami.** Utworzono w programie BioRender.com.

Hipokamp jest złożoną strukturą neuronalną, składającą się z różnorodnych typów komórek, które wspólnie warunkują jego szerokie spektrum funkcji. Neurony piramidowe, obecne w większości struktur przodomózgowia, takich jak hipokamp, kora mózgowa i ciało migdałowe, odgrywają kluczową rolę w realizacji zaawansowanych procesów poznawczych [Sancho-Balsells A i wsp., 2023]. W hipokampie neurony piramidowe pełnią funkcję głównych neuronów projekcyjnych, szczególnie dominujących w podregionach CA. Są one charakterystyczne ze względu na swój trójkątny kształt ciała komórki oraz rozbudowane drzewo dendrytyczne, obejmujące wierzchołkowe (ang. *apical*) i podstawne (ang. *basal*) dendryty. Pojedynczy akson każdego neuronu piramidowego wychodzi z podstawy ciała komórki i rozgałęzia się, tworząc wiele pobudzających glutaminergicznych kontaktów synaptycznych na całej swojej długości. Dendryty podstawne odchodzą od podstawnej części ciała neuronu, charakteryzują się kilkoma stosunkowo krótkimi dendrytami podstawnymi. Natomiast I-rzędowy dendryt wierzchołkowy odchodzi od wierzchołka somy i rozdziela się na mniejsze, dendryty II-rzędowe, które również mogą się rozwidlać na dendryty III-rzędowe [Bannister i Larkman, 1995; Ito i wsp., 1998; DeFelipe i Farinas, 1992]. Morfologia neuronów piramidowych różni się między regionami, ale także gatunkami. W CA3 hipokampu dendryty wierzchołkowe rozgałęziają się blisko ciała komórki i tworzą skupiska dużych kolców, podczas gdy neurony piramidowe CA1 mają bardziej wydłużone główne dendryty wierzchołkowe. Neurony CA2, choć podobne do CA3, charakteryzują się mniejszymi ciałami i prostszymi rozgałęzieniami dendrytycznymi [Benavides-Piccione i wsp., 2020; Fitch i wsp., 1989; Piskorowski i Vivien Chevalyre, 2011].

Aktywność neuronów piramidowych jest modulowana przez różnorodne interneurony hamujące, które odgrywają kluczową rolę w zachowaniu równowagi między pobudzeniem a hamowaniem, a także w precyzyjnej regulacji aktywności sieci neuronalnych. Wśród tych interneuronów szczególną uwagę zwracają komórki koszyczkowe, które, pomimo ich stosunkowo niskiej liczebności, mają kluczowe znaczenie dla precyzji i efektywności przetwarzania informacji w hipokampie [Booker i Vida, 2018; Lapray i wsp., 2012]. Aktywacja 5-HT<sub>7</sub>Rs, które zostały zlokalizowane na interneuronach, powoduje zwiększenie uwalniania GABA (kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego) [Tokarski i wsp., 2011].

Zakręt zębaty hipokampu składa się z trzech warstw. Pierwszą z nich jest warstwa drobinowa (molekularna), w której znajdują się dendryty komórek ziarnistych, włókna pochodzące z kory śródwęchowej, a także niewielka liczba interneuronów. Centralną część zakrętu zębatego stanowi warstwa komórek ziarnistych, będąca jego główną warstwą. Trzecią warstwą jest warstwa polimorficzna, otaczająca warstwę ziarnistą. Charakteryzuje się ona obecnością różnorodnych typów komórek, spośród których najbardziej charakterystyczne są komórki mszyste (ang. mossy cells). Na granicy warstwy ziarnistej i polimorficznej zlokalizowane są m.in. ciała komórek piramidowych zakrętu zębatego.

Głównymi komórkami zakrętu zębatego są wspomniane wcześniej komórki ziarniste, które znajdują się głównie w warstwie ziarnistej, o grubości do 8 rzędów komórek (Ramon y Cajal, 1911; Laatsch i Cowan, 1966; Lorente de No, 1934). Komórki te charakteryzują się małym okrągłym ciałem, okrągłym jądrem o średnicy około 10-12  $\mu\text{m}$  i cienką otoczką cytoplazmy okołokomórkowej. Tworzą zarówno symetryczne, jak i asymetryczne synapsy aksosomatyczne (Lubbers i Frotscher, 1987; Seress i Ribak, 1985). Akson komórki ziarnistej odchodzi od bieguna górnego ciała komórki ziarnistej (Ramon y Cajal, 1911), ale także może wywodzić się z dendrytu wierzchołkowego (Yan i wsp., 2001). Wierzchołkowe dendryty komórek ziarnistych przechodzą przez warstwę ziarnistą, sięgając warstwy drobinowej, a w niektórych przypadkach nawet warstwy polimorficznej. Dendryty wierzchołkowe posiadają liczne kolce dendrytyczne, które najczęściej lokalizują się w warstwie drobinowej (Blackstad, 1963; Laatsch i Cowan, 1966). Charakterystyczna budowa komórek ziarnistych pozwala na łatwe odróżnienie ich od innych typów komórek występujących w hipokampie.

Hipokamp jest jednym z kluczowych obszarów mózgu, zaangażowanym w procesy poznawcze i regulacyjne. Struktura ta odgrywa centralną rolę w integracji różnorodnych informacji: przestrzennych, czasowych oraz pojęciowych, umożliwiając tworzenie spójnych reprezentacji pamięci epizodycznej [Underwood, 1969; Eichenbaum i Cohen, 2004]. Szczególnie w trakcie snu w hipokampie zachodzą reaktywacje neuronalne powiązane z pamięcią epizodyczną, które inicjują proces konsolidacji systemowej. Podczas tego procesu wzmacniane są połączenia synaptyczne w korze mózgowej, co prowadzi do trwałego zapisania wspomnień jako pamięci długotrwałej [Diekelmann i Born, 2010].

Zmiany w hipokampie są powiązane z licznymi chorobami neurodegeneracyjnymi oraz neuropsychiatrycznymi. W chorobie Alzheimerera białka  $\beta$ -amyloidu mogą hamować LTP w hipokampie, które jest niezbędne w procesie tworzenia pamięci [Walsh i wsp., 2002]. W chorobie Parkinsona dysfunkcje występujące w różnych podregionach hipokampu wpływają na problemy poznawcze i pamięciowe w późnych stadiach choroby. Odkładanie ciał Lewy'ego jest najbardziej widoczne w podregionach CA2 i CA3, ale występuje również w CA1 [Dickson i wsp., 1991, Dickson i wsp., 1994, Churchyard i Lees 1997]. Dodatkowo badania z zastosowaniem MRI wykazały, że zmniejszenie objętości hipokampu jest skorelowane z pogorszeniem funkcji poznawczych. Pierwsze zmiany obserwowane są w CA1, a wraz z rozwojem choroby dotyczą również pozostałych podregionów [Foo i wsp., 2017]. Zmniejszenie objętości hipokampu zauważono również w schizofrenii [Nelson i wsp., 1998]. Hipokamp odgrywa także istotną rolę w regulacji stanów lękowych [Bannerman i wsp., 2004; Kjelstrup i wsp., 2002]. Odkryto, że w depresji zmiany w hipokampie mogą powstawać na wielu płaszczyznach. Przewlekły stres, wiążący się z rozwojem depresji, osłabia pamięć zależną od hipokampu [Fanselow i Dong, 2010]. Poza tym zauważono znaczące zmniejszenie objętości hipokampu u pacjentów cierpiących na depresję [Chan i wsp., 2016]. Kluczowym mechanizmem patofizjologicznym depresji jest upośledzenie neurogenezy w hipokampie [Jacobs i wsp., 2000; Petrik i wsp., 2012], szczególnie w podregionie DG [Gould i wsp., 1997].

## 2. Cele pracy

Dotychczas wykazano, że 5-HT<sub>7</sub>R odgrywa ważną rolę w układzie serotonergicznym, którego dysfunkcja jest związana z rozwojem zaburzeń depresyjnych. Jednym z potencjalnych mechanizmów leżących u podstaw tych zaburzeń są zmiany w kolcach dendrytycznych – strukturach kluczowych w plastyczności synaptycznej, które wpływają na funkcjonowanie sieci neuronalnych odpowiedzialnych za regulację nastroju. Zaburzenia w morfologii i funkcji kolców dendrytycznych mogą prowadzić do deficytów poznawczych, zmniejszonej zdolności adaptacji oraz trwałych zmian w strukturze neuronalnej, charakterystycznych dla depresji. Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było szczegółowe zbadanie molekularnych mechanizmów działania szlaku zależnego od 5-HT<sub>7</sub>R oraz jego wpływu na zmiany w morfologii i funkcji kolców dendrytycznych.

Cele szczegółowe:

- ❖ sprawdzenie, czy stymulacja 5-HT<sub>7</sub>R *in vivo* powoduje zmiany kształtu i gęstości kolców dendrytycznych w hipokampie;
- ❖ zbadanie mechanizmu aktywacji MMP-9 i określenie, czy jest on zależny od białek G $\alpha$ <sub>s</sub> lub G $\alpha$ <sub>12</sub>;
- ❖ zbadanie profilu aktywności białek RhoA oraz Cdc42 w poszczególnych podregionach hipokampu po stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R.

### 3. Materiały i metody

#### 3.1. Stosowane roztwory i odczynniki chemiczne

Lista i skład roztworów użytych w eksperymentach opisanych w niniejszej pracy doktorskiej została zawarta w poniższej tabeli (Tab. 1). Do przygotowania wszelkich roztworów została wykorzystana woda oczyszczona poprzez odwróconą osmozę oraz ultrafiltrację przez filtry Mili-Q Plus (Milipore).

**Tab. 1. Skład najczęściej używanych roztworów.**

Nazwa roztworu	Skład
10 x bufor do elektroforezy białek	0,25 M Tris pH 8,4; 2 M glicyna; 10% SDS
10 x TBS	0,5 M Tris pH 7,5; 1,5 M NaCl
4 x SB	0,25 M Tris pH 6,8; 40% glicerol; 8% SDS; 20% $\beta$ -merkaptotanol; 0,0125% błękit bromofenolowy
TBS-T	0,05 M Tris pH 7,5; 0,15 M NaCl; 0,1% Tween 20
PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 1,8 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; pH 7,4
Bufor do transferu	0,025 M Tris Base; 0,192 M glicyna; 20% methanol
Roztwór czerwieni Ponceau S	5% kwas octowy; 0,2% czerwień Ponceau S
Bufor do blokowania wolnych miejsc wiązania białek na błonie nitrocelulozowej	10% mleko odtłuszczone (lub 5% BSA) w 1x TBS-T

Bufor do wywoływania zymografii	0,05 M Tris pH 7,5; 0,2 M NaCl; 5 mM CaCl <sub>2</sub> ; 0,0066% Brij 35; 0,001 mM ZnCl <sub>2</sub> ; 0,02% NaN <sub>3</sub>
Bufor do homogenizacji tkanki (bufor WB)	50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 5 mM CaCl <sub>2</sub> ; 1% Triton X-100; 0,02% NaN <sub>3</sub>
Bufor Ringera	0,119 M NaCl; 5 mM KCl; 2 mM CaCl <sub>2</sub> ; 2 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,025 M HEPES; pH 7,3
Roztwór utrwalający	4% PFA w PBS
Roztwór enzymatyczny	2 mg cysteiny; 10 ml DMEM; 0,1 ml 100 mM CaCl <sub>2</sub> ; 0,1 ml 50 mM EDTA; 250 U papainy
Roztwór inaktywujący	25 mg BSA; 25 mg inhibitora trypsyny z białka jaja kurzego; 10 ml pożywki DMEM + 10% FBS + 1% antybiotyków P/S
Pożywka hodowlana	Neurobasal-A; 20 mM GlutaMAX suplement; 2% B-27 suplement; 1% P/S

W poniższej tabeli (Tab. 2.) wymieniono najczęściej stosowane odczynniki chemiczne.

**Tab. 2. Lista podstawowych odczynników chemicznych.**

Nazwa odczynnika	Producent i numer katalogowy
Akrylamid/bis-akrylamid, 30% roztwór	Sigma, A3699
Albumina surowicy bydlęcej (BSA)	Sigma, A7030-10G
Alkohol etylowy 96,6%	POCh, 396420420

Alkohol etylowy bezwodny 99,8%	POCh, 396480427
Alkohol metylowy	POCh, 621990426
$\beta$ -merkaptoetanol	Sigma, M6250
Błękit bromofenolowy	Carl Rock, T116
Brij 35	Sigma, 101894
Bufor do strippingu	Thermo Fischer Scientific, 46430
Chlorek magnezu ( $MgCl_2$ )	Sigma, M8266
Chlorek potas (KCl)	Chempur, 363-117397402
Chlorek sodu (NaCl)	Chempur, 363-117941206
Chlorek wapnia ( $CaCl_2$ )	Sigma, C1016
Cysteina	Sigma-Aldrich, W326-305
Czerwień Ponceau S	Lab Empire, PON001
Dimetylosulfotlenek (DMSO)	Sigma, 67-68-5
Dodecylosiarczan (VI) sodu (SDS)	Lab Empire, SDS9999
Glicerol	POCh, 44332013
Glicyna	Lab Empire, GLN002
GlutaMAX suplement	Gibco, 35050-061
Inhibitor trypsyny z białka kurzego	Sigma, 10109878001
Izopropanol	Chempur, 363-117515002

Kwas azotowy 65%	Chempur, 363-325296031
Kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA)	Sigma, E6758-500G
Kwas octowy	Chempur, 363-115687330
Lipofectamine 2000	Invitrogen, 101668019
LP-211 (LP)	Sigma, SML1561-5MG
Monolurynian polioksyetylenosorbitolu (Tween 20)	Sigma, P9416
N,N,N',N'-tetrametylo-1,2-diamina (TEMED)	Sigma, T9281
Nadtlenosiarczan diamonu (APS)	Sigma, A3678
Papaina	Worthington, 9001-73-4
Paraformaldehyd 4% w PBS (PFA)	Santa Cruz, sc-281692
Tris-(hydroksymetylo)-aminometan (Tris)	PoCh, 853470115
Triton X-100	Sigma, T8787
Zbuforowany roztwór soli fizjologicznej, pH 7,4 (PBS)	Thermo Fischer Scientific, 18912014

### 3.2. Zwierzęta

Dwumiesięczne samce myszy szczepu C57BL/6J o fenotypie dzikim (Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie, Instytut Farmakologii im. J. Maja PAN w Krakowie) zostały wykorzystane do wykonania badań behawioralnych, analiz kolców dendrytycznych oraz analiz biochemicznych. Procedury na zwierzętach zostały przeprowadzone z uwzględnieniem wytycznych Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach oraz po otrzymaniu zgody tejże Komisji na przeprowadzenie poszczególnych eksperymentów (zgoda 927/2019 wydana przez I Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie). Zwierzęta

miały nieograniczony dostęp do wody oraz paszy, z wyjątkiem eksperymentów, których procedury tego wymagały. Zwierzęta znajdowały się w pokojach Zwierzętarni, w kontrolowanych warunkach: wilgotność 50-60%, temperatura 21-23°C, 10-15 wymian powietrza na godzinę, ściółka z włókna drzewnego topoli (Lignocel Select).

### **3.3. Dootrzewnowe iniekcje u myszy**

W celu stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R myszy 8 - 10 tygodniowe otrzymały iniekcję dootrzewnową roztworu agonisty 5-HT<sub>7</sub>R – LP-211 lub AGH-194. Zarówno LP-211, jak i AGH-194 były podawane w dawce 10 mg/kg. LP-211 został uprzednio rozpuszczony w 3,4% dimetylosulfotlenku (DMSO) w soli fizjologicznej, a grupę kontrolną stanowiły myszy, które podczas iniekcji dootrzewnowej otrzymały roztwór soli fizjologicznej z 3,4% DMSO. Natomiast w przypadku myszy otrzymujących AGH-194 kontrolę stanowiły myszy, które otrzymały iniekcje z roztworu soli fizjologicznej. Grupy kontrolne zapewniały wykluczenie efektu wynikającego z samej iniekcji dootrzewnowej.

Przed wykonaniem iniekcji dootrzewnowych myszy zostały wprowadzone w narkozę za pomocą izofluranu. Po 30 minutach od podania iniekcji przeprowadzono badania behawioralne lub dokonano eutanazji poprzez przerwanie rdzenia kręgowego. Po eutanazji izolowano mózgi myszy, które utrwalano w celu obrazowania kolców dendrytycznych lub przeprowadzano dysekcję hipokampu, a otrzymane tkanki poddawano homogenizacji i oczyszczaniu, po czym przeprowadzano analizy biochemiczne.

### **3.4. Operacje stereotaktyczne**

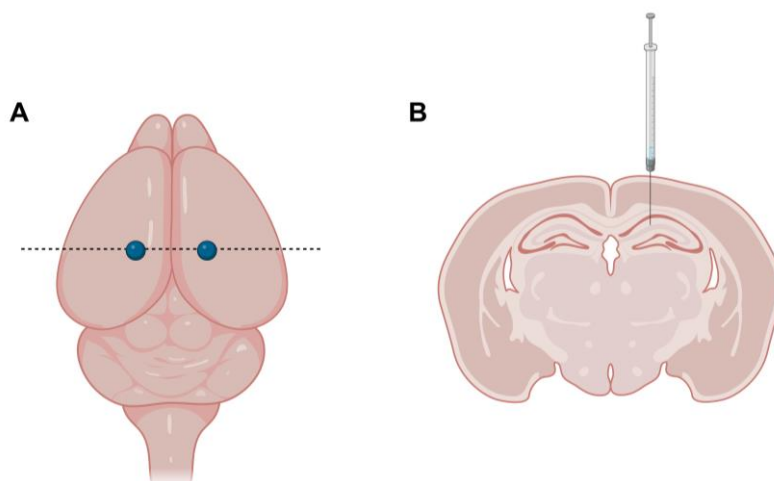
Dwumiesięczne samce myszy szczepu C57BL/6 o fenotypie dzikim zostały poddane chirurgii stereotaktycznej. Myszy zostały przeniesione w pojedynczych klatkach do pokoju przedoperacyjnego na godzinę przed rozpoczęciem procedury. Operacje odbywały się w specjalnie przeznaczonych do tego sali, wysterylizowanej przy pomocy UV. Na sali operacyjnej myszy zostały poddane wstępnej anestezji ogólnej za pomocą 3% izofluranu. Następnie podano dootrzewnowo iniekcję ze środkiem przeciwbólowym - butorfanolem (Butomidol), a w celu zapobiegania stanom zapalnym i infekcjom, dootrzewnowo podano iniekcję z enrofloksacyną (Baytril) oraz podskórnie iniekcję z kwasem tofienamowym (Tolfedine). Myszy były umieszczane i stabilizowane w ramie

stereotaktycznej. Operacje przeprowadzane były w znieczuleniu ogólnym (1,5% izofluranu), a oddech myszy był stale monitorowany. W celu podtrzymania odpowiedniej temperatury organizmu, zwierzęta w czasie operacji znajdowały się na macie grzewczej. W celu ograniczenia wysychania rogówek, użyto maści do oczu z witaminą A (Vita-Pos). Powierzchnię głowy oczyszczono środkiem antyseptycznym (Octeniseptem), następnie sierść ogolono, ponownie oczyszczono skórę głowy przy użyciu jodyny 3%, a następnie miejscowo znieczulono 2% lidokainą w żelu (Lignocainum Jelfa typu A). Na tak przygotowanej skórze głowy wykonano skalpelem ok. 0,5 cm nacięcie, a następnie delikatnie oczyszczono powierzchnię czaszki celem usunięcia okostnej. Zlokalizowano punkt bregmy, będący miejscem, gdzie spotykają się trzy szwy czaszkowe: szew czołowy, szew wieńcowy i szew strzałkowy. W odniesieniu do punktu bregmy zostały wyznaczone koordynaty określające hipokamp czołowy (CA1 oraz DG). Koordynaty te zostały określone na podstawie zdjęć anatomicznych z atlasu [Paxinos i Franklin, 2008] i wynosiły odpowiednio:

- współrzędne przód/tył: - 1,90 mm,
- współrzędne lewo/prawo (boczne): +/- 1,50 mm,
- współrzędne wzdłużne (głębokość): - 1,65 mm (Ryc. 7A-B).

Oprócz tego zlokalizowano punkt lambdy, czyli miejsce, gdzie spotykają się szew strzałkowy i szew węglowy. Porównując czy punkty bregmy i lambdy leżą w jednej płaszczyźnie można określić, czy głowa myszy znajduje się w odpowiedniej pozycji do operacji. W celu wykonania kraniotomii użyto wiertła dentystycznego. Do otrzymanego 1-2 mm otworu powoli wprowadzono strzykawkę Nanofil z precyzyjną igłą (Nanofil 33g BVLD Needle 2PK). Strzykawka zawierała zawiesinę nośników wirusów związanych z adenowirusami (AAV). W niniejszej pracy wykorzystywane były AAV niosące sekwencje shRNA wyciszające ekspresję genów kodujących białka  $G\alpha_s$  lub  $G\alpha_{12}$ , a także AAV niosące sekwencje kodujące biosensory aktywności RhoA lub Cdc42 zawierające również białko niebieskiej (CFP) i żółtej (YFP) fluorescencji. Kontrolnie użyto AAV shRNA scramble zawierającego sekwencję nukleotydów nie wyciszającą ekspresji żadnego genu. Następnie używając pompy infuzyjnej, dokonano wstrzyknięcia 300 nl wyżej opisanej zawiesiny do hipokampu z prędkością 100 nl/min. Oczekano 8 minut, aby wstrzyknięty wirus zdążył ulec absorpcji do tkanek hipokampu. Bardzo delikatnie usunięto igłę z mózgu, zwilżono skórę głowy solą fizjologiczną, zszyto ranę

niemi chirurgicznymi niewchłanialnymi (Amifil 3/0 CE-3 16 mm), a ranę posmarowano ponownie żelem znieczulającym miejscowo (Lignocainum Jelfa typu A). Po skończeniu 40-minutowej operacji, myszy były przenoszone z powrotem do sali przedoperacyjnej i umieszczane pojedynczo w klatkach znajdujących się na poduszce grzewczej na około 1 godzinę.



**Ryc. 7. Schemat mózgu myszy z zaznaczonymi (A) miejscami iniekcji, (B) hipokampem.** Utworzono w programie BioRender.com.

Przez kolejne dni zwierzęta były regularnie monitorowane w celu szybkiego wykrycia ewentualnej infekcji, złego gojenia się ran, nietypowego zachowania, czy ogólnego pogorszenia się stanu zdrowia. Rekonwalescencja wynosiła 3 tygodnie, co zapewniało możliwość ekspresji wektorów wirusowych wprowadzonych do tkanki hipokampu. Po upływie tego czasu myszy otrzymywały iniekcje dootrzewnowe z agonistą 5-HT<sub>7</sub>R lub odpowiednią kontrolą (opisane w podrozdziale 3.3), a następnie przeprowadzano dyssekcję hipokampów.

## 3.5. Testy behawioralne

### 3.5.1. Test preferencji sacharozy (SPT)

Do badania zostały wykorzystane dziewięciodniowe samce myszy szczepu C57BL/6J, które przez 7 dni przed wykonaniem badania były przyzwyczajane do odwróconego cyklu dobowego. Test wykonywany był w fazie ciemnej. W pierwszym dniu badania myszy otrzymały dwie identyczne butelki – jedną z wodą, natomiast drugą z przygotowanym wcześniej 1% roztworem sacharozy. Po upływie 24 godzin butelki zostały zamienione miejscami w celu uniknięcia preferencji stron. Po kolejnych 24 godzinach obie butelki zostały zabrane. Po około 14 godzinach wykonano iniekcje dootrzewnowe. Myszy kontrolne otrzymały iniekcje dootrzewnowe z solą fizjologiczną. Natomiast pozostałe myszy otrzymały iniekcje dootrzewnowe z wcześniej przygotowanym roztworem agonisty AGH-194. Po 30 minutach od wykonania iniekcji myszy otrzymały z powrotem butelki z wodą oraz 1% roztworem sacharozy na kolejne 2 godziny (po 1 godzinie butelki były zamieniane miejscami). Każda butelka została ważona zarówno przed jak i po upływie 2 godzin (eksperyment właściwy), dzięki czemu możliwe było oszacowanie spożycia każdego roztworu, wskazanie preferencji oraz ocena stanu anhedonicznego danego zwierzęcia.

Test preferencji sacharozy został również wykorzystany do oceny wpływu chronicznego (14-dniowego) podawania AGH-194 myszom. Zwierzęta kontrolne otrzymywały iniekcje z roztworem soli fizjologicznej. Do badania zostały wykorzystane ośmiotygodniowe samce myszy szczepu C57BL/6J, które przez 7 dni przed wykonaniem badania były przyzwyczajane do odwróconego cyklu dobowego. Test wykonywany był zawsze w fazie ciemnej. Przez kolejne 7 dni zwierzęta poddawane były tzw. handlingowi, czyli były przyzwyczajane do dotyku i obecności eksperymentatora. Przed badaniem właściwym został wykonany pretest, czyli podanie zwierzętom 2,5% roztworu sacharozy w celu oswojenia ich z nowym smakiem. Kolejnego dnia (SPT<sub>0</sub>) każdej myszy podano butelkę z wodą i butelkę zawierającą 1% roztwór sacharozy na kolejne 8 godzin, przy czym po upływie 4 godzin butelki były zamieniane miejscami w celu uniknięcia wystąpienia preferencji stron. Zarówno przed, jak i po badaniu każda butelka była ważona. Przez kolejne 14 dni każda mysz otrzymywała iniekcje dootrzewnowe z roztworem agonisty lub substancją kontrolną. Kolejne testy preferencji sacharozy były przeprowadzane po 9 godzinach od pierwszej iniekcji (SPT<sub>1</sub>) - butelki zostały podane

po 1 godzinie od wykonania iniekcji, oraz po 14 dniach od pierwszej iniekcji (SPT<sub>2</sub>). Następnie przerwano podawanie iniekcji dootrzewnowych, a myszy zostały poddane rekonwalescencji.

### **3.5.1. Test zawieszenia za ogon (TST)**

Dziewięciodniowe samce myszy szczepu C57BL/6J, które przez 7 dni przed wykonaniem badania były przyzwyczajane do odwróconego cyklu dobowego, otrzymały iniekcje dootrzewnową z wcześniej przygotowanym roztworem agonisty AGH-194. Myszy kontrolne otrzymały iniekcje dootrzewnowe z solą fizjologiczną. Test wykonywany był w fazie ciemnej. Po 30 minutach od wykonania iniekcji myszy zostały powieszono za ogon za pomocą taśmy samoprzylepnej jednostronnej. Myszy zostały przymocowane w taki sposób, aby nie mogły upaść, podciągnąć się ani uciec. Za pomocą kamery rejestrowano zachowanie zwierząt przez kolejne 6 minut. Zapis z kamery został poddany ocenie retrospektywnej polegającej na dokładnym pomiarze czasu bezruchu, przy pomocy stopera, każdej z badanych myszy. Test zawieszenia za ogon miał na celu zbadanie wpływu podanej dootrzewnowo substancji na zwierzę, poprzez ocenę zachowań anhedonicznych (apatia, bezruch).

### **3.5.2. Badanie lokomotoryczne**

Dziewięciodniowe samce myszy szczepu C57BL/6J, które przez 7 dni przed wykonaniem badania były przyzwyczajane do odwróconego cyklu dobowego, otrzymały iniekcje dootrzewnowe z wcześniej przygotowanym agonistą AGH-194. Test wykonywany był w fazie ciemnej, w odwróconym cyklu dnia i nocy. Myszy kontrolne otrzymały iniekcje dootrzewnowe z solą fizjologiczną. Po 30 minutach od wykonania iniekcji myszy zostały umieszczone pojedynczo w przezroczystej komorze wykonanej z tworzywa sztucznego o wymiarach 27 cm x 27 cm. Pomiarzy były prowadzone przez kolejne 6 minut w aktometrze Opto-Varimex 4. Czujniki ruchu rejestrowały aktywność zwierząt (przede wszystkim całkowitą przebytą drogę [mm]), a następnie zgromadzone dane zostały poddane ocenie retrospektywnej w programie Opto-Varimex 4 AutoTrack System 4.41. Badanie lokomotoryczne miało na celu ocenę wpływu podanej dootrzewnowo substancji na podstawową ruchliwość.

## 3.6. Techniki biochemiczne

### 3.6.1. Oczyszczanie żelatynaz

Tkanka hipokampalna pozyskana z myszy została zhomogenizowana w szklanym homogenizatorze w zimnym buforze WB z dodatkiem tabletki inhibitorów proteaz (Roche Complete EDTA-free). Otrzymane homogenaty odwirowano przez 15 minut przy przyspieszeniu 14000 g w temperaturze 4°C. Supernatant przeniesiono do nowych probówek jednorazowych. Przy użyciu zestawu Pierce<sup>TM</sup> BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) przeprowadzono oznaczenie stężenia białka, wykonując trzy powtórzenia dla każdej próbki. Na podstawie uzyskanych wyników dokonano odpowiednich rozcieńczeń buforem WB. W celu oczyszczenia supernatantów oraz izolacji MMP-2 i MMP-9, mających zdolność do wiązania się z żelatyną, wykorzystano złożo Gelatin Sepharose 4B (Amersham Biosciences). Złożo zostało uprzednio stosownie przygotowane poprzez trzykrotne przepłukanie w buforze WB w proporcjach 1 : 1 i wirowaniu przez 3 minuty przy przyspieszeniu 6000 g w temperaturze 4°C. Po ostatnim wirowaniu supernatant usunięto, a złożo zawieszono w buforze WB w stosunku 1 : 1, otrzymując 50% stężenie kulek żelatynowych. Takie przygotowanie złoża miało na celu usunięcie potencjalnych zanieczyszczeń oraz równoważenie złoża w buforze roboczym. Do 300 µl rozcieńczonych próbek dodano po 100 µl przygotowanej wcześniej zawiesiny złoża. Wszystkie próbki umieszczono na noc (ok. 16 godzin) na rotorze w temperaturze 4°C. Kolejnego dnia próbki wirowano przy przyspieszeniu 8000 g w temperaturze 4°C przez 3 minuty, usunięto supernatant, a pozostałe złożo przepłukano dwukrotnie buforem WB. Przy każdym płukaniu próbki były wirowane jak powyżej. Po całkowitym odciągnięciu roztworu z nad złoża, do złoża dodano 90 µl buforu WB z 10% DMSO. W celu elucji próbki wytrząsano przez 3 godziny przy przyspieszeniu 1500 rpm w temperaturze 4°C.

### 3.6.2. Elektroforeza białek w żelu denaturującym

Do rozdzielenia białek wykorzystano elektroforezę białek w żelu denaturującym (SDS-PAGE). Procedura ta została po raz pierwszy opisana w 1970 roku przez Ulricha Laemmliego. Do tego celu wykorzystano system do elektroforezy pionowej Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad). Dla zapewnienia dobrej polimeryzacji, dzień wcześniej przygotowano dwuwarstwowe żełe poliakrylamidowe o wymiarach 68 mm x 86 mm x 1

mm. Dolną warstwę stanowił żel rozdzielający o stężeniu 8-12% mieszaniny akrylamid/bis-akrylamid (29:1), 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 0,05% APS, 0,1% TEMED. Górna warstwa, będąca żelem zagęszczającym, składała się z 5% mieszaniny akrylamid/bis-akrylamid (29:1), 0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 0,05% APS oraz 0,1% TEMED. Do wcześniej przygotowanych próbek, przed nałożeniem na żel poliakrylamidowy, dodano 4x stężony bufor obciążający (SB) z 20%  $\beta$ -merkaptopetanolu. Następnie próbki wymieszano i poddano denaturacji w 95°C przez 5 minut. Próbki nakładano do odpowiednich studzienek w żelu poliakrylamidowym. Rozdział elektroforetyczny był prowadzony w temperaturze 4°C przy napięciu 50 V przy zagęszczaniu próbek, a następnie 120 V podczas rozdzielania białek. Białka były rozdzielane na podstawie ich mas cząsteczkowych. Do identyfikacji białek wykorzystano standardy mas cząsteczkowych, które umożliwiły porównanie ich migracji z prążkami białek o znanych masach cząsteczkowych (nr kat. 26616, Thermo Scientific).

### 3.6.3. Zymografia żelowa

Próbki uzyskane w wyniku homogenizacji i oczyszczania żelatynaz na złożu zmieszano z buforem 4x SB (bez  $\beta$ -merkaptopetanolu). W celu zapewnienia dobrej polimeryzacji, dzień wcześniej przygotowano dwuwarstwowe żełe poliakrylamidowe w rozmiarze 68 mm x 86 mm x 1 mm. Dolną warstwę stanowił żel rozdzielający o stężeniu 8% mieszaniny akrylamid/bis-akrylamid (29:1). Na każde 5 ml żelu rozdzielającego dodawano 50  $\mu$ l żelatyny sprzężonej z fluoresceiną izotiocyjanianową (FITC) w stężeniu 20 mg/ml, otrzymując stężenie końcowe żelatyny w żelu 0,2 mg/ml. Niskie stężenie żelatyny-FITC w żelu zwiększało czułość metody, umożliwiając uwidocznienie nawet niewielkich stężeń badanych żelatynaz. Górna warstwę żelu stanowił żel zagęszczający w niezmienionej postaci. Rozdział białek został wykonany jak opisano w rozdziale 3.6.2. zatytułowanym *Elektroforeza białek w żelu denaturującym*. Po przeprowadzeniu rozdziału elektroforetycznego, żel umieszczono w 2,5% Triton X-100 na 30 minut w temperaturze pokojowej, wytrząsano przy około 600 rpm. Procedurę powtórzono dwukrotnie. Żel umieszczono w buforze wywołującym i inkubowano w temperaturze 37°C przy delikatnym wytrząsaniu (około 200 – 300 rpm) przez noc, czyli około 16 godzin. Kolejnego dnia żel obrazowano przy użyciu aparatu G:Box.

### 3.6.4. Western blot

Po zakończonej elektroforezie w żelu denaturującym (rozdział 3.6.2. *Elektroforeza białek w żelu denaturującym*) dokonano przeniesienia białek z żelu na błonę membranę z polifluorku winylidenu (PVDF Immobilon P, Milipore) poprzez mokry elektrotransfer w buforze do transferu (bufor Towbin'a). W tym celu wykorzystano system Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad). Elektrotransfer był prowadzony w temperaturze 4°C, przez 1 godzinę, przy prądzie o stałym natężeniu 350 mA. Wydajność transferu oceniono barwiąc membranę PVDF roztworem Ponceau S. Błonę wypłukano w buforze TBS-T, a następnie blokowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej, używając buforu blokującego (5% BSA w TBS-T lub 10% mleko w TBS-T). Membranę inkubowano z odpowiednio rozcieńczonym przeciwciałem I-rzędowym (3% BSA w TBS-T lub 5% mleko w TBS-T) przez noc (ok. 16 godzin) w temperaturze 4°C.

**Tab. 3. Spis używanych przeciwciał I-rzędowych i ich rozcieńczenie.**

Rozpoznawany antygen	Firma, numer katalogowy	Rozcieńczenie	Bufor blokujący
G $\alpha$ <sub>s</sub>	Santa Cruz, sc-1359	1:500	3% BSA w TBST
G $\alpha$ <sub>12</sub>	Santa Cruz, sc-515445	1:500	3% BSA w TBST
GAPDH	Milipore, MAB374	1:5000	5% mleko w TBST
RhoA	Cell Signaling, 2117	1:500	3% BSA w TBST
Cdc42	Cell Signaling, 2466	1:500	3% BSA w TBST

Kolejnego dnia membranę płukano przez 15-minut buforem TBS-T. Błonę PVDF ze związanym przeciwciałem I-rzędowym inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej, z odpowiednio dobranym przeciwciałem II-rzędowym, ze stężeniem dobranym indywidualnie do każdego przeciwciała. PVDF płukano trzykrotnie po 15 minut buforem TBS-T. Każde przeciwciało II-rzędowe było sprzężone z enzymem peroksydazą chrzanową (HRP), co zostało wykorzystane w detekcji reakcji

immunologicznej. W tym celu użyto gotowych zestawów odczynników do chemiluminescencji (m.in. SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Thermo Scientific). Białka na membranie obrazowano przy użyciu aparatu G:Box.

### **3.6.5. Test aktywności RhoA/Cdc42**

Dziesięciodniowym samcom myszy zostały podane dootrzewnowo iniekcje z agonistą 5-HT<sub>7</sub>R LP-211 lub roztworem 3,4% DMSO w soli fizjologicznej (jak opisano w rozdziale 3.3. *Dootrzewnowe iniekcje u myszy*). Po przeprowadzeniu eutanazji, wyizolowano mózg, a następnie podregiony CA1 oraz DG hipokampu. Następnie dokonano homogenizacji tkanki w roztworze lizującym Assay/Lysis Buffer zawartym w zestawie RhoA Pulldown Activation Assay Biochem Kit (New East Bio) lub Cdc42 Activation Assay (Cell Biolabs, Inc.). Próbkę wirowano w temperaturze 4°C przy przyspieszeniu 12000 g przez 10 minut. Przeprowadzono oznaczenia zawartości białka w próbkach przy użyciu zestawu Pierce<sup>TM</sup> BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Wyrównano stężenia białek w otrzymanych homogenatach, rozcieńczając je odpowiednio buforem lizującym. Część otrzymanych lizatów wykorzystano do analizy całkowitej ekspresji białka RhoA lub Cdc42 metodą western blot. Pozostałe próbki inkubowano ze złożem specyficznie wiążącym jedynie aktywne formy badanych białek. Do badania RhoA wykorzystano mysie przeciwciało monoklonalne specyficzne dla RhoA-GTP. Natomiast do badania Cdc42 zastosowano białko fuzyjne GST-PAK-PBD.

Zarówno oczyszczone aktywne formy RhoA i Cdc42, jak i próbki zawierające całkowitą pulę białek RhoA i Cdc42, najpierw poddano elektroforezie w żelu poliakrylamidowym, (rozdział 3.6.2. *Elektroforeza w żelu denaturującym*), a następnie analizowano z użyciem techniki western blot (rozdział 3.6.4. *Western blot*) i odpowiednich specyficznych przeciwciał.

## **3.7. Badanie struktury kolców dendrytycznych**

### **3.7.1. Znakowanie neuronów**

Do znakowania neuronów wykorzystano barwnik fluorescencyjny, nadchloran 1,1'-dioktadecylo-3,3,3',3'-tetrametaindokarbocyaniny (DiI, Invitrogen). Fluorofor ten, dzięki swoim właściwościom lipofilowym, wbudowuje się do błon komórkowych. Zawiesina DiI w mieszaninie dichlorometanu i metanolu posłużyła do przygotowania

tw. naboju do działu genowego. Jako nośnik barwnika wykorzystano kulki wolframowe (Tungsten M-20, 1,3  $\mu$ M Biorad), z których na szkiełku podstawowym stworzono monowarstwę, następnie trzykrotnie polewano ją zawiesiną DiI. Po całkowitym wyschnięciu, kulki zawieszono w wodzie destylowanej i poddano 30-minutowej sonifikacji. W tym czasie rurkę do przygotowania naboju (Tefzel Tubing, Biorad) oczyszczono 99,8% alkoholem etylowym. Rurkę pokryto roztworem poliwinylpirolidonu (PVP, roztwór wodny 20 mg/ml) w etanolu w stosunku 1:200, a następnie osuszono. Wypełniono rurkę zsonifikowaną zawiesiną DiI i mieszano przez 25 minut, wstrzymując mieszanie co 3 minuty, w celu lepszego pokrycia ścianek rurki zawiesiną DiI. Po tym czasie delikatnie usunięto roztwór, a rurkę suszono przez 30 minut azotem o przepływie 0,1 LPM AIR, a następnie przez 1 godzinę azotem, a przepływie 0,4 LPM AIR. Po zakończonej procedurze rurkę do przygotowania naboju pocięto gilotyną, tworząc naboje o długości 1 cm. Otrzymane naboje przechowywano zabezpieczone przed dostępem światła, w temperaturze pokojowej.

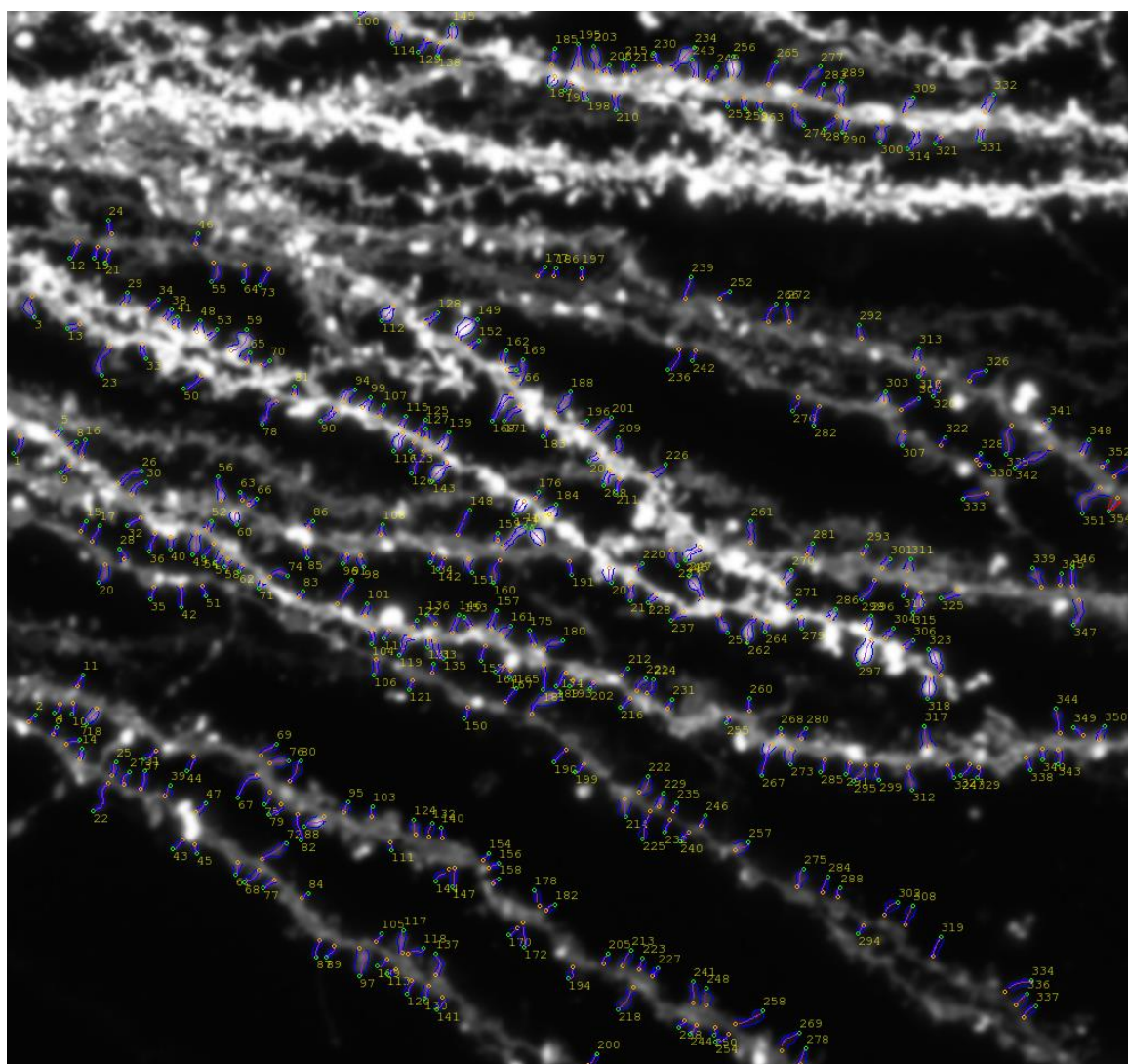
Zwierzęta po dootrzewnowej iniekcji agonistą lub roztworem 3,4% DMSO w soli fizjologicznej i wykonanym wcześniej badaniu, zostały poddane eutanazji z użyciem perfuzji 4% PFA w PBS. Po wyizolowaniu mózgow, zostały one przepłukane w PBS, a następnie umieszczone w 4% PFA. Następnie mózgi zostały pokrojone na wibratomie (Leica) na skrawki o grubości 140  $\mu$ m, w PBS w temperaturze 4°C. Pozostawiono je w PBS w temperaturze pokojowej przez kolejną 1 godzinę w celu umożliwienia regeneracji tkanek po krojeniu. Tak przygotowane skrawki zawierające struktury hipokampu oraz kory przedczołowej znakowano z użyciem wcześniej przygotowanych naboju z barwnikiem DiI. W celu bombardowania działem genowym (Helios, GeneGunSystem, Bio-Rad) wykorzystuje się nagły wzrost ciśnienia helu do 100 psi. Wystrzelone w ten sposób kulki wolframowe z naboju zapewniają penetrację komórek barwnikiem DiI. Po wykonaniu tej procedury tkanki pozostawiono na 12 godzin w temperaturze 4°C, umożliwiając DiI dyfuzję w błonach komórkowych. Kolejnego dnia utrwalono skrawki w 1,5% PFA w PBS przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej, a następnie usunięto pozostałości PFA za pomocą trzykrotnego 10-minutowego płukania w PBS. Skrawki ułożono na szkiełkach podstawowych i zamykano szkiełkiem nakrywkowym w odczynniku Fluoromount-G (Invitrogen), przystosowanym do obrazowania z użyciem mikroskopii fluorescencyjnej i konfokalnej.

### 3.7.2. Obrazowanie kolców dendrytycznych

Obrazowanie kolców dendrytycznych w skrawkach mózgu wybarwionych DiI (rozdział 3.7.1. *Znakowanie neuronów*) zostało wykonane z użyciem mikroskopu konfokalnego Zeiss LSM800 Airyscan. Szczególną uwagę poświęcono podregionom hipokampu CA1, CA3 i zakrętowi zębatemu (DG) oraz korze przedczołowej. Zdjęcia obejmowały drugo- i trzeciorzędowe dendryty neuronów. W celu wzbudzenia fluoroforu DiI zastosowano światło lasera o długości 561 nm. Obrazowanie polegało na zbieraniu serii obrazów w osi Z, w odstępach co 0,4  $\mu\text{m}$ . Rozdzielczość obrazu wynosiła 1024 x 1024 pikseli. Dodatkowo zastosowano 2-krotne powiększenie. Parametry te pozwoliły uzyskać wielkość piksela 0,07  $\mu\text{m}$  x 0,07  $\mu\text{m}$ . Użyto obiektywu immersyjnego o powiększeniu 63x i aperturze numerycznej 1,4 NA. Wszystkie obrazy uzyskane w ten sposób zostały następnie przetworzone za pomocą programu ImageJ (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA), z wykorzystaniem techniki maksymalnej projekcji intensywności.

### 3.7.3. Analiza kolców dendrytycznych

Szczegółową analizę kolców dendrytycznych na obrazach uzyskanych za pomocą mikroskopu konfokalnego przeprowadzono przy użyciu oprogramowania bioinformatycznego SpineMagick (patent nr WO/2013/021001) (Ryc. 8). Analiza była półautomatyczna i obejmowała pomiary takich parametrów jak: długość kolca, szerokość główki, stosunek długości kolca do szerokości główki kolca dendrytycznego, a także gęstość kolców na dendrycie. Długość kolców dendrytycznych wyznaczana była wzdłuż osi szkieletu kolca. Szerokość główki kolca dendrytycznego wyznaczono w jego najszerszym miejscu, jednakże powyżej 1/3 długości kolca od jego podstawy. Stosunek długości kolca do szerokości główki uwzględniono jako parametr wskazujący na kierunek zmian morfologicznych kolców dendrytycznych. Niższe wartości tego stosunku mogą sugerować obecność dojrzałych kolców, podczas gdy wyższe wartości wskazują na obecność długich, cienkich kolców (niedojrzałych). Gęstość kolców dendrytycznych obliczono mierząc długość dendrytu (SpineMagick) oraz zliczając liczbę kolców na danym dendrycie (ImageJ). Analizowane kolce pochodziły z dendrytów drugo- i trzeciorzędowych. Miało to na celu wyeliminowanie błędów statystycznych wynikających z różnic kształtu i wielkości kolców w poszczególnych rzędach.



**Ryc. 8. Reprezentatywne zdjęcie po analizie kolców dendrytycznych metodą półautomatyczną w programie SpineMagick.**

### **3.8. Pierwotna hodowla neuronalna**

Na 48 godzin przed przygotowaniem hodowli komórek nerwowych, sterylne szalki ze szklanym dnem o średnicy 15 mm pokryto mieszaniną poli-D-lizyny (0,05 mg/ml) oraz poli-L-lizyny (0,25 mg/ml) w buforze boranowym. Szalki inkubowano przez noc w temperaturze pokojowej, a następnie czterokrotnie płukano sterylną wodą destylowaną. Następnie szklane dno szalek pokrywano roztworem lamininy (0,25 mg/ml) w PBS z 0,5 mM MgCl<sub>2</sub> i 1 mM CaCl<sub>2</sub>, po czym szalki inkubowano przez noc w temperaturze pokojowej. Kolejnego dnia szalki płukano delikatnie sterylną wodą destylowaną i pozostawiono do wysuszenia.

Do założenia dysocjowanej hodowli hipokampalnej użyto osesków mysich w wieku P0-P1 dla hodowli komórek piramidowych oraz P4-P5 dla hodowli komórek ziarnistych. Przez eutanazją zwierzęta były schładzane w lodzie, a następnie poddawane dekapitacji. Izolację hipokampów prowadzono na lodzie w schłodzonym buforowanym roztworze soli Hanksa (HBSS), po czym tkankę przeniesiono do probówki typu Falcon z HBSS. Po usunięciu roztworu HBSS, hipokampy inkubowano w roztworze zawierającym papainę w łaźni wodnej, w temperaturze 37°C przez 20 minut. Po trawieniu, usunięto roztwór enzymatyczny, dodano roztwór inaktywujący, aby zahamować aktywność papainy i inkubowano 5 minut w temperaturze pokojowej. Następnie roztwór usunięto, a tkankę przepłukano 1 ml pożywki DMEM z 10% FBS. Dodano świeży DMEM z 10% FBS oraz 1% P/S i rozdrabniano tkankę za pomocą pipety 1 ml, a następnie z użyciem pipety o pojemności 200 µl. Po każdym dysocjowaniu pozwalano tkankom opaść na dno, a roztwór przenoszono do nowej probówki. Otrzymaną jednorodną zawiesinę komórek wysiewano na przygotowane wcześniej szalki, nakładając krople o stałej objętości. Po 1 godzinie do każdej szalki dodawano po 2 ml zbuforowanej pożywki hodowlanej. Hodowlę komórek prowadzono w sterylnym inkubatorze w temperaturze 37°C przy 5% dwutlenku węgla.

W DIV 7 komórki w hodowli transfekowano plazmidem niosącym sekwencję kodującą GFP pod promotorem synapsyny z użyciem Lipofectamine 2000. Zarówno 1,0 µg DNA plazmidowego jak i 2 µl Lipofectamine 2000 zawieszono w Neurobasal A bez żadnych dodatków. Po 5-minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej obie mieszaniny połączono i inkubowano 15 minut, również w temperaturze pokojowej. W tym czasie z każdej szalki odebrano połowę pożywki znad komórek. Następnie do pozostałej pożywki podawano kroplami po 100 µl przygotowanej wcześniej mieszaniny Lipofectamine-DNA. Komórki inkubowano przez godzinę w temperaturze 37°C. Zebrana wcześniej pożywka została zmieszana w stosunku 1 : 1 ze świeżą pożywką przygotowaną w analogiczny sposób, po czym delikatnie usunięto inkubowaną mieszaninę znad komórek i zastąpiono ją przygotowaną mieszaniną pożywek hodowlanych.

### **3.9. Obrazowanie przyżyciowe neuronów hipokampu *in vitro***

Pierwotną dysocjowaną hodowlę komórek nerwowych (rozdział 3.8. *Pierwotna hodowla neuronalna*) obrazowano przyżyciowo w 13-16 DIV. Przed obrazowaniem

zmierzono osmolarność buforu Ringera oraz pożywki hodowlanej znad komórek. W przypadku różnic w osmolarności, dostosowywano bufor Ringera poprzez dodanie odpowiedniej ilości glukozy (przy zbyt niskiej osmolarności buforu) lub dodaniu wody destylowanej (przy zbyt wysokiej osmolarności buforu). Za dopuszczalne przyjęto maksymalne odchylenie  $\pm 15$  mOsm. Pożywkę wymieniano na roztwór Ringera bezpośrednio przed obrazowaniem.

Komórki obrazowano w temperaturze 30°C. Białko fluorescencyjne wzbudzano laserem o długości fali 488 nm. Pomiarów wykonywano w odstępach czasowych co 5 minut. Dwa pomiary zostały dokonane przed stymulacją, a cztery kolejne po stymulacji 10 mM LP-211 lub 3,4% DMSO w przypadku komórek kontrolnych. Obrazowanie przyżyciowe kolców dendrytycznych zostało wykonane przy użyciu mikroskopu konfokalnego Leica SP8. Obrazowanie polegało na zbieraniu serii obrazów w osi Z, w odstępach co 0,4  $\mu\text{m}$ . Rozdzielczość obrazu wynosiła 1024 x 1024 pikseli. Dodatkowo zastosowano powiększenie cyfrowe 2,62x. Parametry te pozwoliły osiągnąć wielkość piksela 0,07  $\mu\text{m}$  x 0,07  $\mu\text{m}$ . Użyto wodnego obiektywu immersyjnego wodnego o powiększeniu 63x i aperturze numerycznej 1,2 NA. Wszystkie obrazy otrzymane w ten sposób zostały następnie przekształcone programem Leica LAS AF Lite.

Następnie przeprowadzono szczegółową analizę morfometryczną kolców dendrytycznych, analogicznie do analizy opisanej w rozdziale 3.7.3. (*Analiza kolców dendrytycznych*). Te same kolce dendrytyczne były oznaczane na obrazach przed, jak i po stymulacji, a następnie porównywano oraz liczono względne zmiany morfometryczne wyrażone przez porównywane parametry. Przy analizie zostały usunięte wyniki znacząco różniące się od pozostałych z grupy (Q=1%).

### **3.10. Obrazowanie i pomiar zmian aktywności białek metodą FLIM**

Technika obrazowania czasu życia fluorescencji (FLIM) posłużyła do pomiaru zmian aktywności białek z grup małych Rho-GTPaz – RhoA oraz Cdc42.

Ośmiotygodniowe samce myszy poddano operacjom stereotaktycznym z użyciem wirusów AAV niosących sekwencje kodujące biosensory aktywności RhoA lub Cdc42 (rozdział 3.4. *Operacje stereotaktyczne*). Po upływie 3 tygodni wykonano iniekcje dootrzewnowe (jak opisano w rozdziale 3.3. *Dootrzewnowe iniekcje u myszy*).

Po 20 minutach od iniekcji przeprowadzono eutanazję poprzez podanie dootrzewnowe morbitalu, a następnie perfuzję z użyciem PBS oraz 4% PFA w PBS. Po wyizolowaniu mózgow, przepłukano je w PBS, a następnie umieszczono w 4% PFA w PBS w temperaturze 4°C na 48 godzin. Mózgi przepłukano w roztworze PBS, a następnie przełożono do 10% roztworu sacharozy w PBS na 1 dobę, po czym do 20% roztworu sacharozy w PBS na 2 doby, do 30% roztworu sacharozy w PBS na 3 doby, a następnie zamrożono w OCT na suchym lodzie i przechowywano w -70°C. Preparaty mikroskopowe o grubości 30 µm przygotowano z użyciem kriostatu, w temperaturze -20°C.

Do obrazowania czasu życia fluorescencji wykorzystano system Picoquant połączony z mikroskopem Leica SP8. Pomiar fluorescencji donora CFP przeprowadzono wzbudzając białko laserem o długości fali 405 nm z częstotliwością 20 MHz, kontrolowaną przez impulsowe diody laserowe 8000B. Aby wyeliminować wpływ fluorescencji akceptora YFP, emitowane światło zbierano przy użyciu kostki filtrowej, przepuszczającej fale o długości 467-499 nm. Fotony zliczano przez 30 minut. Obrazy rejestrowano obiektywem suchym o powiększeniu 10x i aperturze numerycznej 0,4 NA. Rozdzielczość obrazu wynosiła 504 x 250 pikseli, a wielkość piksela 2,31 µm x 2,31 µm. Program SymPhoTime (Picoquant, Niemcy) został użyty do szczegółowej analizy czasu życia fluorescencji. Krzywe zaniku intensywności fluorescencji opisano za pomocą funkcji dwuekspotencjalnej, na podstawie której obliczono średni czas życia fluorescencji dla każdego piksela. Średnią wartość czasu życia fluorescencji wyznaczono na podstawie histogramu dla każdego podregionu hipokampu. Jakość dopasowania sprawdzono testem Chi-kwadrat.

### **3.11. Analiza statystyczna wyników**

Eksperymenty przeprowadzone w niniejszej pracy doktorskiej zostały poddane analizie statystycznej. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne badanego parametru uzyskane ze wszystkich powtórzeń, wraz z błędem standardowym średniej (SEM). Pierwszym etapem analizy statystycznej było sprawdzenie normalności rozkładu za pomocą testu Shapiro-Wilka. Następnie jednorodność wariancji oceniono przy użyciu testu Fischera. Do oceny istotności statystycznej różnic pomiędzy dwoma grupami zastosowano test parametryczny t-Studenta dla danych o jednorodnych wariancjach, a w przypadku nierównych wariancji użyto poprawki Welcha. Dla danych, które nie

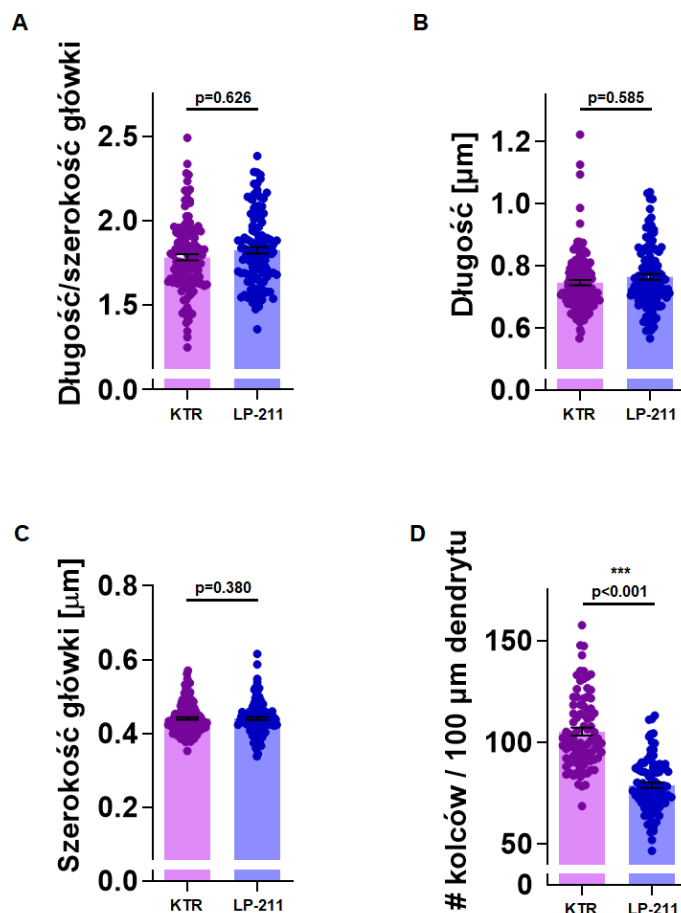
spełniały założeń normalności rozkładu, zastosowano nieparametryczny test Manna-Whitneya. Porównanie trzech grup dokonano za pomocą testu ANOVA. Poziomy istotności statystycznej określono jako  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$  oraz  $***p < 0,001$ . Obliczenia oraz wizualizację wyników przeprowadzono przy użyciu programu GraphPad Prism 8.

## 4. Wyniki

### 4.1. Wpływ stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R *in vivo* na zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych w podregionach hipokampu

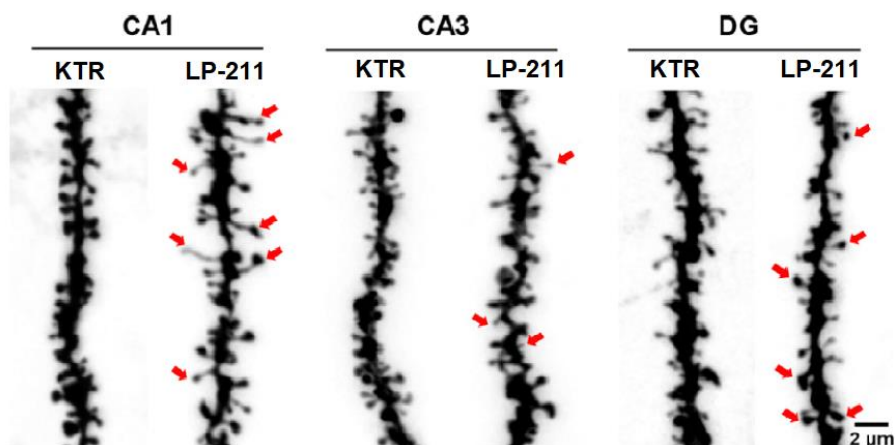
W 2017 roku Bijata i wsp. opisali wydłużanie kolców dendrytycznych neuronów w pierwotnych hodowlach komórek hipokampu na skutek aktywacji ścieżki sygnałowej 5-HT<sub>7</sub>R/MMP-9/Cdc42 [Bijata i wsp., 2017].

Aby sprawdzić czy podobne zmiany morfologiczne pojawiają się również *in vivo* w mózgu, wykonano iniekcje dootrzewnowe myszy agonistą 5-HT<sub>7</sub>R (roztworem LP-211), a następnie przeprowadzono półautomatyczną analizę struktury kolców dendrytycznych w hipokampie. Analiza morfometryczna nie wykazała istotnych różnic w długości, szerokości główki ani stosunku długości do szerokości główki pomiędzy grupą myszy, które otrzymały iniekcję z roztworem agonisty a grupą kontrolną, która otrzymała iniekcję z soli fizjologicznej (Ryc. 9A-C). Przeprowadzono również analizę gęstości kolców w hipokampie, która wykazała obniżenie gęstości kolców u myszy traktowanych agonistą 5-HT<sub>7</sub>R w porównaniu do grupy myszy kontrolnych (Ryc. 9D).



**Ryc. 9. Analiza parametrów morfometrycznych kolców dendrytycznych w hipokampie po stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R** (grupa myszy kontrolnych poddanych iniekcji solą fizjologiczną (KTR)  $n_{\text{myszy}} = 4$ ;  $n_{\text{dendrytów}} = 133$ ;  $n_{\text{kolców}} = 20349$ ; grupa myszy poddanych iniekcji LP-211  $n_{\text{myszy}} = 5$ ;  $n_{\text{dendrytów}} = 118$ ;  $n_{\text{kolców}} = 19979$ ) (**A**) stosunek długości do szerokości główki, (**B**) długość kolców, (**C**) szerokość główki. (**D**) Gęstość kolców dendrytycznych wyrażona jako liczba kolców na 100  $\mu\text{m}$  dendrytu (grupa myszy kontrolnych poddanych iniekcji solą fizjologiczną  $n_{\text{myszy}} = 4$ ;  $n_{\text{dendrytów}} = 133$ ; grupa myszy poddanych iniekcji LP-211  $n_{\text{myszy}} = 5$ ;  $n_{\text{dendrytów}} = 109$ ). Każdy punkt na wykresach przedstawia fragment dendrytu pochodzący z pojedynczego neuronu. Dane zostały przedstawione jako średnie wartości  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

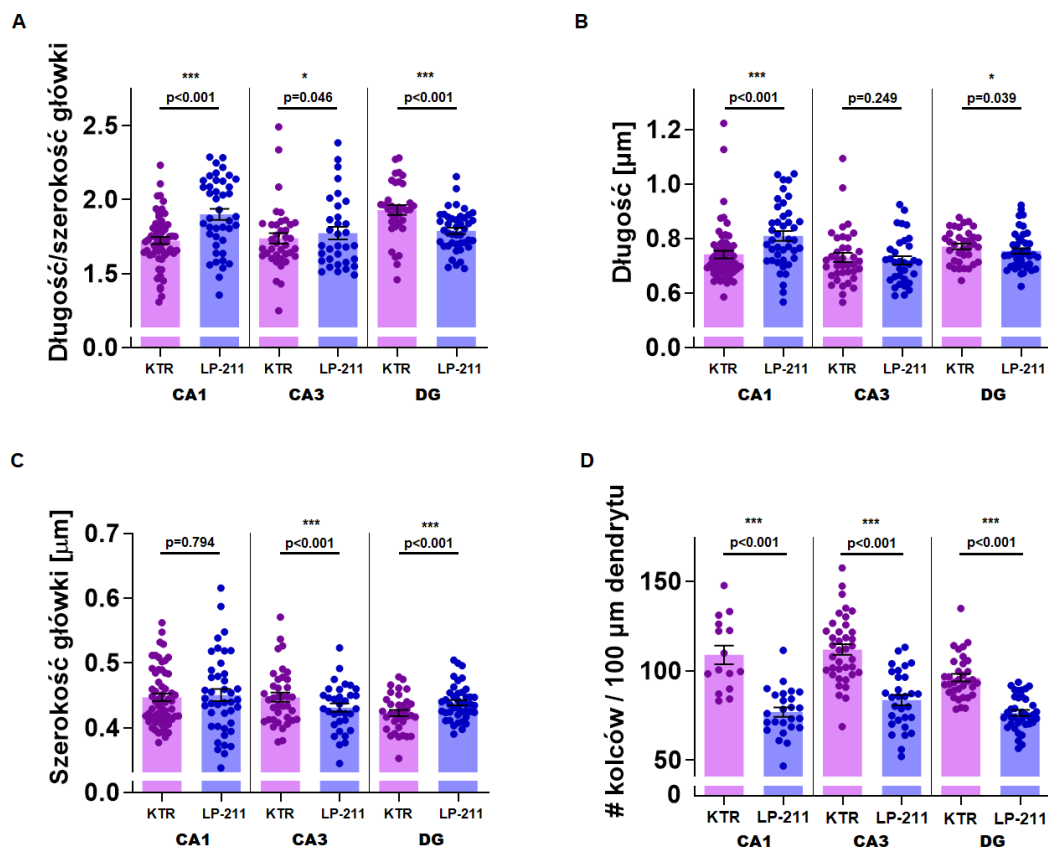
Po ponownej analizie morfologicznej kolców dendrytycznych, która uwzględniała podział na podregiony hipokampu tj. CA1, CA3 oraz DG, zaobserwowano istotne różnice w kształcie kolców w poszczególnych podregionach (Ryc. 10).



**Ryc. 10.** Reprezentatywne obrazy uzyskane za pomocą mikroskopu konfokalnego przedstawiające fragmenty dendrytów pochodzących z podregionów CA1, CA3 oraz DG w grupie myszy kontrolnych, poddanych iniekcji solą fizjologiczną (KTR) oraz myszy poddanych iniekcji LP-211. Skala 2  $\mu\text{m}$ . Strzałki wskazują zmiany morfologiczne kolców w stosunku do grupy kontrolnej.

Zaobserwowano wydłużenie kolców dendrytycznych w podregionach CA1 oraz CA3, szczególnie widoczne w zwiększonym stosunku długości do szerokości główki kolca. Natomiast w podregionie DG zauważono dojrzewanie kolców dendrytycznych, które manifestuje się zmniejszeniem stosunku długości do szerokości główki kolca (Ryc. 11A).

Oprócz analizy morfometrycznej przeprowadzono również analizę gęstości kolców dendrytycznych. Wykazała ona, że po aktywacji 5-HT<sub>7</sub>R we wszystkich badanych podregionach doszło do istotnego zmniejszenia gęstości kolców dendrytycznych (Ryc. 11D).



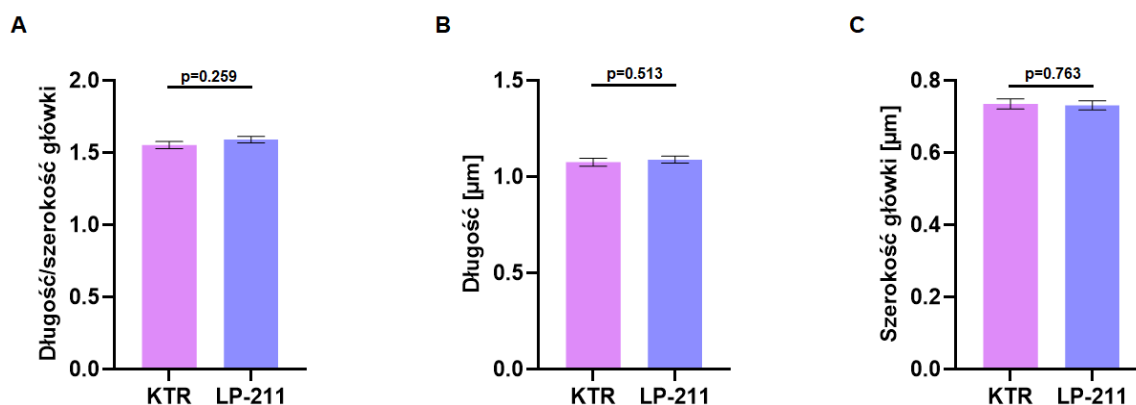
**Ryc. 11. Analiza parametrów morfometrycznych kolców dendrytycznych w poszczególnych podregionach hipokampu (CA1, CA3, DG) po stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R.** (A) Stosunek długości do szerokości główki, (B) długość kolca, (C) szerokość główki. Dla myszy poddanych iniekcji solą fizjologiczną (KTR)  $n_{\text{myszy}} = 4$ ; CA1  $n_{\text{dendrytów}} = 60$ ;  $n_{\text{kolców}} = 7235$ ; CA3  $n_{\text{dendrytów}} = 38$ ;  $n_{\text{kolców}} = 6601$ ; DG  $n_{\text{dendrytów}} = 35$ ;  $n_{\text{kolców}} = 6513$ ; dla myszy poddanych iniekcji LP-211  $n_{\text{myszy}} = 5$ ; CA1  $n_{\text{dendrytów}} = 42$ ;  $n_{\text{kolców}} = 6175$ ; CA3  $n_{\text{dendrytów}} = 33$ ;  $n_{\text{kolców}} = 6064$ ; DG  $n_{\text{dendrytów}} = 43$ ;  $n_{\text{kolców}} = 7740$ . (D) Analiza gęstości kolców dendrytycznych w poszczególnych podregionach hipokampu po stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R (dla myszy poddanych iniekcji solą fizjologiczną  $n_{\text{myszy}} = 4$ ; CA1  $n_{\text{dendrytów}} = 61$ ; CA3  $n_{\text{dendrytów}} = 38$ ; DG  $n_{\text{dendrytów}} = 34$ ; dla myszy poddanych iniekcji LP-211  $n_{\text{myszy}} = 5$ ; CA1  $n_{\text{dendrytów}} = 42$ ; CA3  $n_{\text{dendrytów}} = 30$ ; DG  $n_{\text{dendrytów}} = 37$ ). Każdy punkt na wykresach przedstawia fragment dendrytu pochodzący z pojedynczego neuronu. Dane zostały przedstawione jako średnie wartości  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

## 4.2. Wpływ stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R *in vitro* na zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych komórek ziarnistych hipokampu

Ze względu na to, że zaobserwowano istotne różnice w odpowiedzi morfologicznej kolców dendrytycznych w poszczególnych podregionach hipokampu po stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R *in vivo*, postanowiono zbadać, czy analogiczne zmiany będą widoczne w warunkach *in vitro*. W cytowanej wcześniej publikacji Bijata i wsp. (2017) wykazano, że stymulacja 5-HT<sub>7</sub>R prowadzi do wydłużenia kolców dendrytycznych w neuronach pochodzących z podregionów CA1 i CA3. Izolacja hipokampu we wspomnianym badaniu była przeprowadzana u noworodków myszy (P0 - P1). Na tak wczesnym etapie rozwoju zwierząt obszar DG nie jest jeszcze uformowany, a neurony ziarniste nie są obecne. Dlatego też badania te skupiały się na analizie zmian głównie w neuronach piramidowych. Podregion DG oraz neurony ziarniste pojawiają się około czwartego dnia po urodzeniu (P4) [Altman i Bayer, 1990].

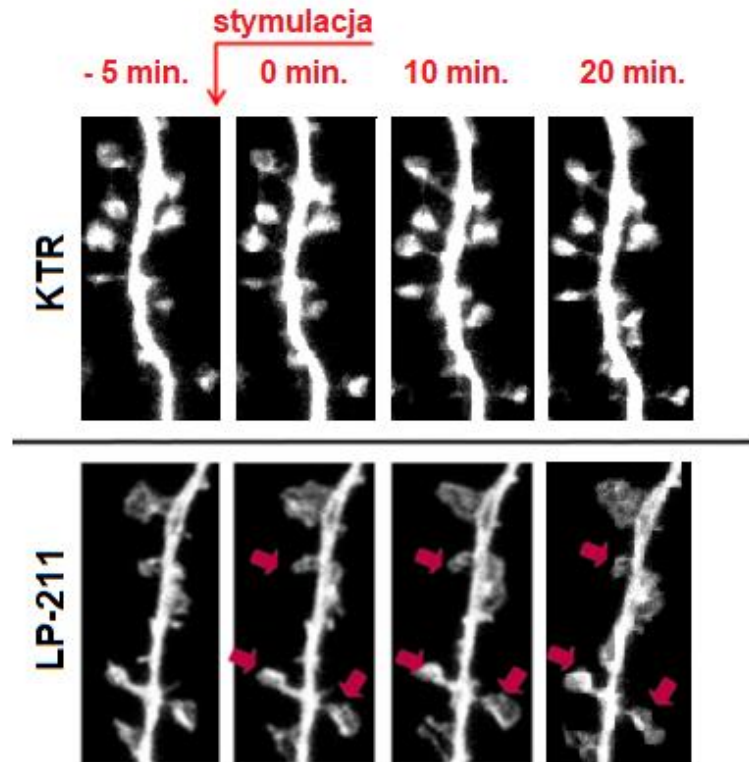
W kolejnym doświadczeniu sprawdzono, czy zmiany zaobserwowane w podregionie DG po stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R *in vivo* pojawią się również po stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R w hodowli neuronów ziarnistych *in vitro*. W celu uzyskania hodowli neuronów ziarnistych wyizolowano podregiony DG osesków w wieku P4 - P5. Neurony ziarniste z DG są łatwe do odróżnienia od innych neuronów hipokampu, nawet w przypadku kontaminacji domieszką neuronów z obszaru CA3 podczas izolacji. Charakteryzują się małym, okrągłym ciałem komórkowym oraz drzewkiem dendrytycznym rozgałęziającym się tylko w jedną stronę [Lubbers i Frotscher, 1987; Seress i Ribak, 1985].

W hodowli pierwotnej neuronów ziarnistych przeprowadzono obrazowanie przyżyciowe i wykonano pomiary morfometryczne przed stymulacją, 10 minut po stymulacji oraz 20 minut po stymulacji z użyciem LP-211. Aby zapewnić miarodajność wyników, przed analizą zmian w czasie zweryfikowano homogenność grup przed stymulacją. Miało to na celu wyeliminowanie potencjalnych różnic, które mogłyby zniekształcić wynik analizy (Ryc. 12).

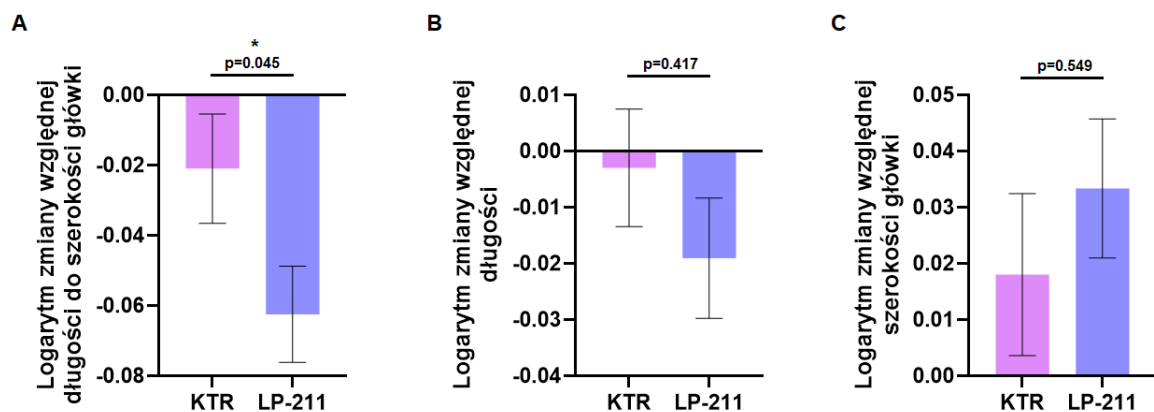


**Ryc. 12. Analiza parametrów morfometrycznych kolców dendrytycznych neuronów ziarnistych przed stymulacją 5-HT<sub>7</sub>R** (dla komórek, które w kolejnym etapie eksperymentu były stymulowane przy pomocy DMSO (KTR)  $n_{\text{dendrytów}} = 474$ ;  $n_{\text{kolców}} = 14428$ ; dla komórek, które w kolejnym etapie eksperymentu były stymulowane przy pomocy LP-211  $n_{\text{dendrytów}} = 597$ ;  $n_{\text{kolców}} = 19144$ ) (A) Stosunek długości do szerokości główki, (B) długości, (C) szerokości główki kolca. Dane zostały przedstawione jako średnie wartości  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Po stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R wykonano analizę morfometryczną kolców dendrytycznych. W tym przypadku analizowany był każdy kolec przed, w trakcie i po stymulacji. Miało to na celu zminimalizować efekty wynikające z różnorodności kolców i spontanicznych fluktuacji ich kształtu [Yasamatsu i wsp., 2008]. Te same kolce zidentyfikowano w różnych punktach czasowych, a względne zmiany przedstawiono na wykresie w skali logarymicznej. Po 10 minutach od stymulacji z użyciem LP-211 zaobserwowano dojrzewanie kolców dendrytycznych (Ryc. 13A i 14A), objawiające się zmniejszeniem wartości logarytmu względnej zmiany długości do szerokości główki w porównaniu z grupą kontrolną. Zmiany te były więc analogiczne do zmian zaobserwowanych w podregionie DG po stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R *in vivo* (Ryc. 11A).



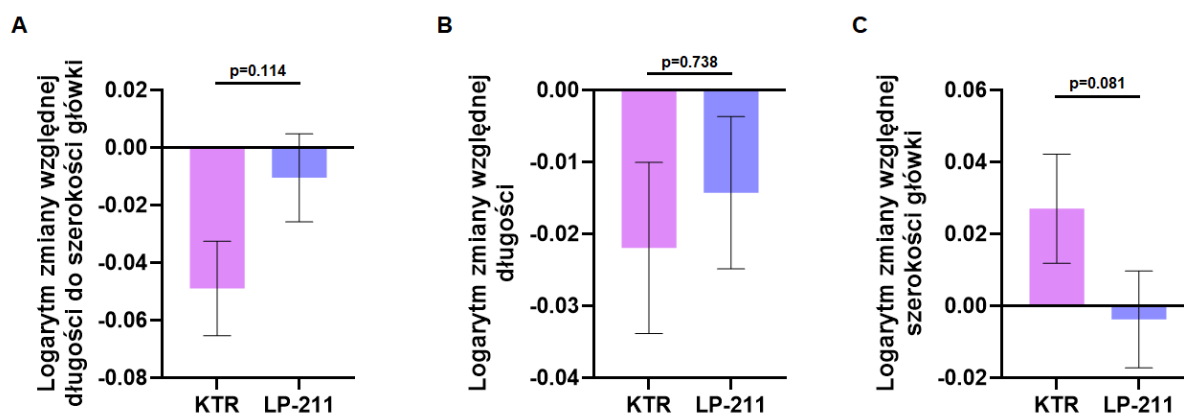
Ryc. 13. Porównanie kolców dendrytycznych, fragmenty dendrytów komórek ziarnistych w hodowli dysocjowanej P4-P5 przed stymulacją oraz po 10 i 20 minutach od stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R za pomocą LP-211.



Ryc. 14. Analiza parametrów morfometrycznych kolców dendrytycznych w hodowli neuronów ziarnistych po 10 minutach od stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R przedstawiona jako logarytm względnych zmian (dla neuronów stymulowanych z użyciem DMSO (KTR)  $n_{\text{dendrytów}} = 474$ ;  $n_{\text{kolców}} = 14428$ ; dla komórek stymulowanych LP-211  $n_{\text{dendrytów}} = 597$ ;  $n_{\text{kolców}} = 19144$ ) (A) Stosunek długości do szerokości główki, (B) długość, (C) szerokość główki kolca. Dane zostały przedstawione jako średnie wartości  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Co ciekawe, po 20 minutach od stymulacji zauważono odwrotny efekt działania agonisty na kształt kolców neuronów DG. Było to szczególnie widoczne w wartościach logarytmu względnej zmiany długości do szerokości główki ( $p = 0,11$ , Ryc. 15A). Równocześnie zaobserwowano silny trend ( $p = 0,08$ ) wskazujący na zmniejszanie się szerokości główki kolca w porównaniu z grupą kontrolną (Ryc. 15C).

Podsumowując, badania przeprowadzone w warunkach *in vitro* potwierdziły, że stymulacja 5-HT<sub>7</sub>R prowadzi do dynamicznych zmian morfologicznych kolców dendrytycznych neuronów ziarnistych, które przypominają obserwacje z eksperymentów *in vivo*. Zaobserwowane przejściowe dojrzewanie kolców po stymulacji z użyciem LP-211 oraz późniejszy zanik tego efektu wskazują na złożoność mechanizmów regulacyjnych morfologii dendrytów w odpowiedzi na aktywację 5-HT<sub>7</sub>R.



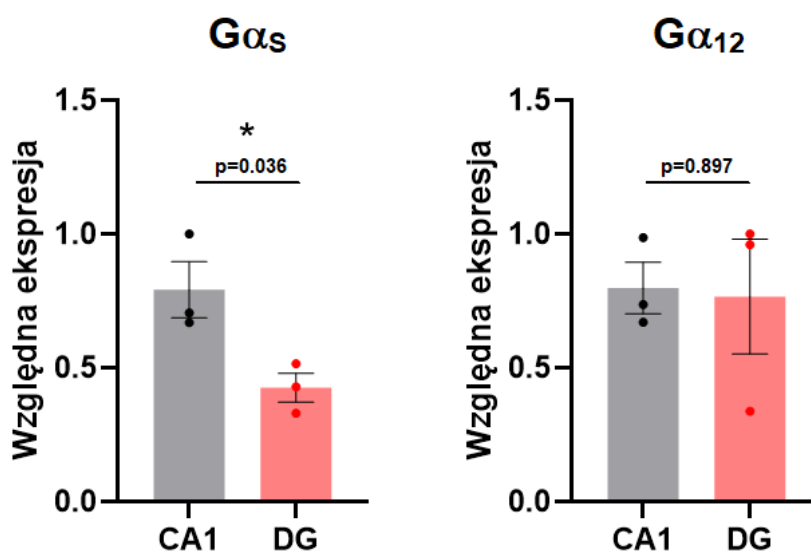
**Ryc. 15. Analiza parametrów morfometrycznych kolców dendrytycznych w hodowli neuronów ziarnistych po 20 minutach od stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R przedstawiona jako logarytm względny zmian (dla neuronów stymulowanych DMSO (KTR)  $n_{\text{dendrytów}} = 474$ ;  $n_{\text{kolców}} = 14428$ ; dla komórek stymulowanych LP-211  $n_{\text{dendrytów}} = 597$ ;  $n_{\text{kolców}} = 19144$ ) (A) Stosunek długości do szerokości główki, (B) długość, (C) szerokość główki kolca. Dane zostały przedstawione jako średnie wartości  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .**

### 4.3. Wpływ wyciszenia białek G $\alpha_s$ oraz G $\alpha_{12}$ na aktywność MMP-9

W każdym z wyżej opisanych eksperymentów szczególnie widać różnice w zmianach zachodzących w kolcach dendrytycznych neuronów zlokalizowanych w podregionach CA1 oraz DG hipokampu. Kolce neuronów piramidowych w podregionie CA1 ulegają wydłużeniu po stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R z użyciem LP-211,

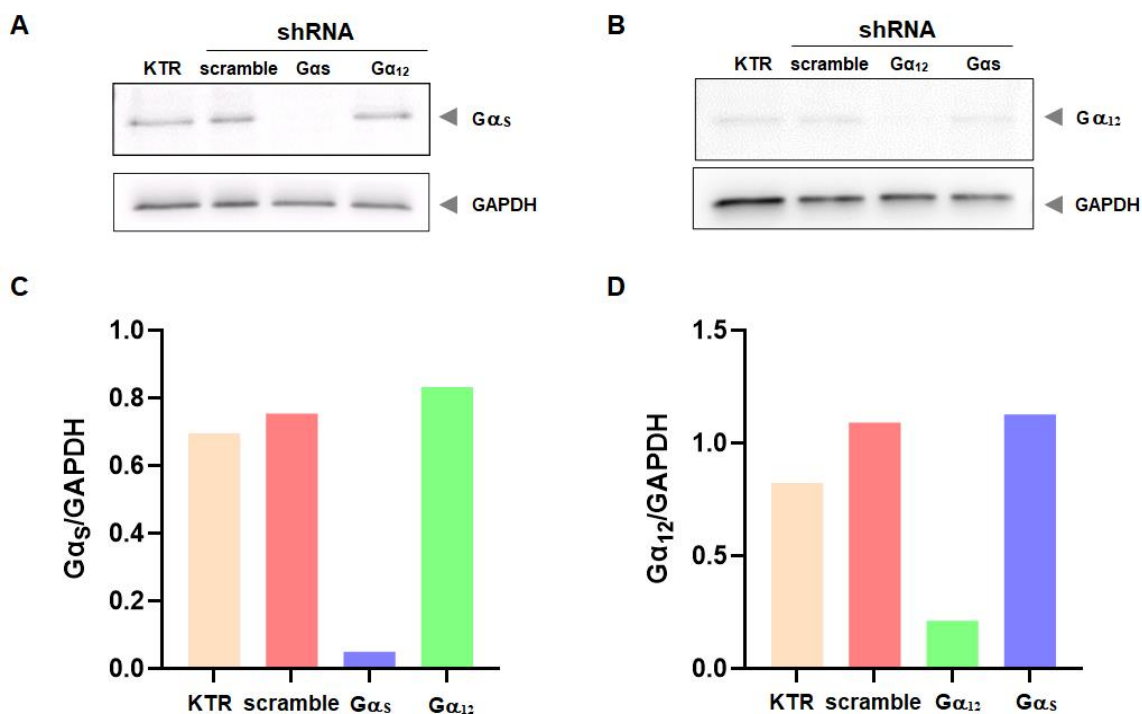
podczas gdy kolce neuronów ziarnistych w podregionie DG hipokampu dojrzewają, co objawia się zmniejszeniem stosunku długości do szerokości główki kolca. Istotne jest ustalenie przyczyny tej zróżnicowanej odpowiedzi różnych typów neuronów na stymulację 5-HT<sub>7</sub>R.

Otwarta baza *Hippocampus RNA-seq Atlas* (<https://hipposeq.janelia.org>) dostarcza wielu istotnych informacji na temat ekspresji genów w populacjach neuronów piramidowych oraz neuronów ziarnistych DG. Po przeanalizowaniu danych dostępnych w tej bazie, szczególną uwagę zwrócono na ekspresję genów kodujących białka G $\alpha$ <sub>s</sub> oraz G $\alpha$ <sub>12</sub>, które są kluczowymi elementami szlaków sygnałowych związanych z 5-HT<sub>7</sub>R. Analiza wykazała, że geny kodujące białka G $\alpha$ <sub>s</sub> i G $\alpha$ <sub>12</sub> mają różne poziomy ekspresji w podregionach CA1 i DG, przy czym gen kodujący białko G $\alpha$ <sub>s</sub> charakteryzuje się znacząco wyższą względną ekspresją w podregionie CA1 niż w podregionie DG hipokampu (Ryc. 16). Ta obserwacja sugeruje, że różnice w odpowiedzi kolców dendrytycznych na stymulację 5-HT<sub>7</sub>R mogą wynikać z preferencyjnej aktywacji ścieżek zależnych od białek G $\alpha$ <sub>s</sub> lub G $\alpha$ <sub>12</sub>, w zależności od ich względnej ekspresji. Na przykład wysoki poziom białka G $\alpha$ <sub>s</sub> może skutkować dominacją szlaków sygnałowych związanych z jego aktywacją, podczas gdy niższa ekspresja G $\alpha$ <sub>s</sub> mogłaby sprzyjać aktywacji ścieżek zależnych od białka G $\alpha$ <sub>12</sub>.



**Ryc. 16. Względna ekspresja białek G $\alpha$ <sub>s</sub> oraz G $\alpha$ <sub>12</sub> w podregionach hipokampu CA1 oraz DG (*Hippocampus RNA-seq Atlas* <https://hipposeq.janelia.org/>). Dane zostały przedstawione jako średnie wartości  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .**

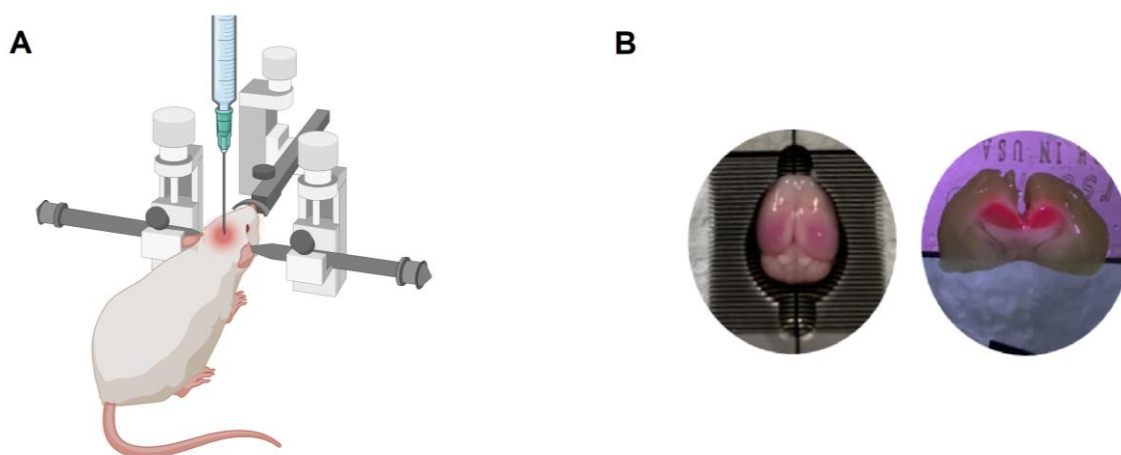
Z danych literaturowych wynika, że szlak sygnałowy związany z białkiem  $G\alpha_{12}$  jest powiązany z aktywacją małych GTPaz takich jak Cdc42 i RhoA, co odgrywa kluczową rolę w reorganizacji cytoszkieletu aktynowego. Jak wykazano wcześniej (Bijata i wsp. 2017), zarówno Cdc42, jak i MMP-9 są niezbędne do wydłużania kolców dendrytycznych po stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R. W przeciwieństwie do dobrze poznanej aktywacji małych GTPaz, mechanizm aktywacji MMP-9 po stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R pozostaje nieznan. Dlatego w kolejnym etapie badań postanowiono sprawdzić, czy aktywacja MMP-9 indukowana stymulacją 5-HT<sub>7</sub>R jest zależna od białek  $G\alpha_s$  i  $G\alpha_{12}$ . W tym celu zaprojektowano wirusy niosące sekwencje wyciszające ekspresję genów kodujących białka  $G\alpha_s$  lub  $G\alpha_{12}$ . Przed przystąpieniem do eksperymentów na zwierzętach przeprowadzono test na pierwotnej hodowli neuronów, aby sprawdzić czy wyżej opisane wirusy są w stanie zainfekować komórki i selektywnie wyciszyć ekspresję wybranych białek. Jak pokazano na rycinie 17, wirusy te bardzo efektywnie i specyficjnie wyciszały ekspresję genów kodujących białka  $G\alpha_s$  oraz  $G\alpha_{12}$ .



**Ryc. 17. Wyciszenie ekspresji genów kodujących białka  $G\alpha_s$  oraz  $G\alpha_{12}$  w pierwotnej hodowli neuronów.** (A) Western blot przedstawiający poziom  $G\alpha_s$  i GAPDH w hodowli neuronów nieinfekowanych (KTR), infekowanych wirusem AAV niosącym sekwencję scramble, sekwencję wyciszającą ekspresję genu kodującego białko  $G\alpha_s$  oraz sekwencję wyciszającą ekspresję genu kodującego białko  $G\alpha_{12}$ . (B) Western blot przedstawiający poziom  $G\alpha_{12}$  i GAPDH w hodowli neuronów nieinfekowanych (KTR), infekowanych wirusem AAV niosącym sekwencję shRNA scramble, sekwencję wyciszającą ekspresję

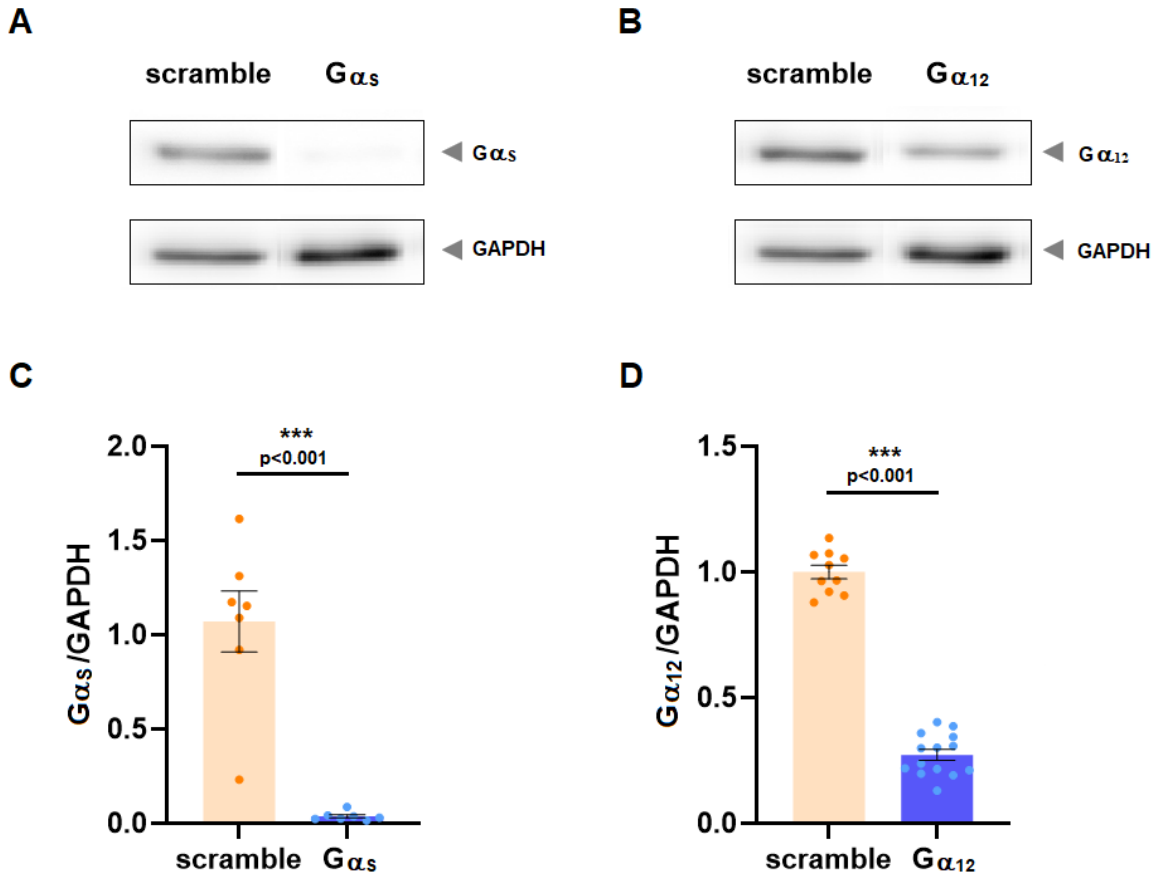
genu kodującego białko  $G\alpha_s$  oraz sekwencję wyciszającą ekspresję genu kodującego białko  $G\alpha_{12}$ . **(C, D)** Analizy ilościowe przedstawiające kwantyfikację poziomu białka **(C)**  $G\alpha_s$  oraz **(D)**  $G\alpha_{12}$ , wyrażonego jako stosunek sygnału  $G\alpha_s/GAPDH$  i  $G\alpha_{12}/GAPDH$ , odpowiednio.

Kolejnym etapem było ustalenie odpowiednich koordynatów dla wprowadzenia roztworów zawierających cząsteczki wirusów do hipokampów myszy. Koordynaty zostały ustalone na podstawie atlasu mózgu [Paxinos i Franklin, 2008], a następnie potwierdzone eksperymentalnie poprzez wprowadzenie błękitu krezolowego do mózgu zwierząt podczas operacji stereotaktycznych (Ryc. 18).



**Ryc. 18. Operacje stereotaktyczne myszy.** **(A)** Ilustracja prezentująca ułożenie myszy w trakcie operacji stereotaktycznej. Utworzono w programie BioRender.com. **(B)** Zdjęcie mózgu myszy po operacji stereotaktycznej z widoczną ekspresją wirusa w hipokampie.

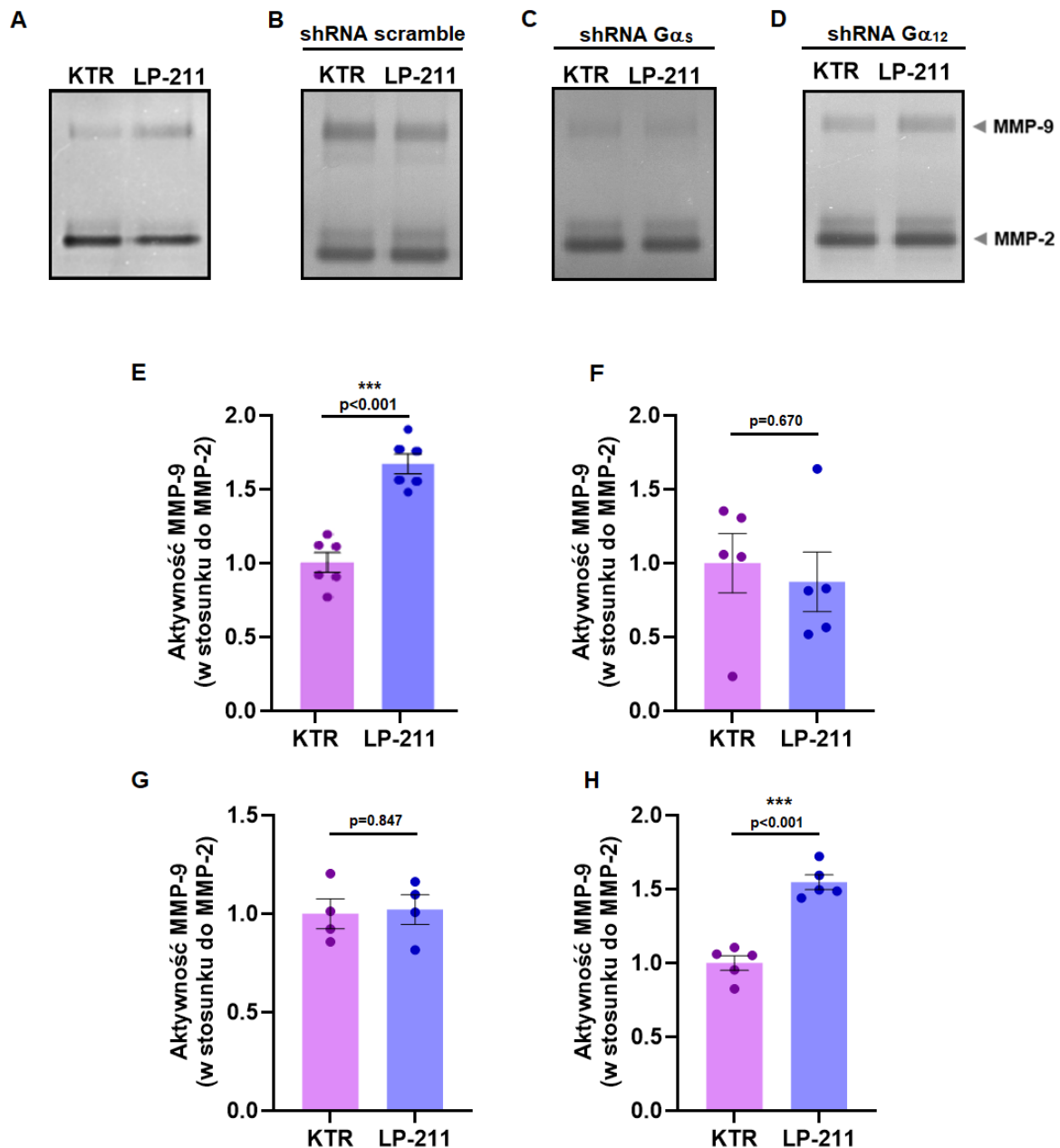
Po upewnieniu się, że koordynaty są prawidłowe, przystąpiono do wprowadzenia roztworów zawierających cząsteczki poszczególnych wirusów do hipokampów (Ryc. 18A). Następnie, po okresie rekonwalescencji, wyizolowano zainfekowane obszary hipokampów (Ryc. 18B), przeprowadzono homogenizację i wykonano analizę western blot z użyciem przeciwciał rozpoznających białka  $G\alpha_s$  i  $G\alpha_{12}$ . Analiza ta wykazała, że nastąpiło niemal całkowite zmniejszenie poziomu białka  $G\alpha_s$  (Ryc. 19A, C) oraz znaczne zmniejszenie poziomu białka  $G\alpha_{12}$  (Ryc. 19B, D) w grupie poddanej ekspozycji na specyficzne shRNA ( $G\alpha_s$  lub  $G\alpha_{12}$ ) w porównaniu z grupą kontrolną, w której zastosowano shRNA scramble.



**Ryc. 19.** Wyciszenie ekspresji genów kodujących białka  $G\alpha_s$  oraz  $G\alpha_{12}$  w tkankach zainfekowanych wirusem. **(A)** Western blot przedstawiający poziom  $G\alpha_s$  i GAPDH infekowanych wirusem AAV niosącym sekwencję scramble, sekwencję wyciszającą ekspresję genu kodującego białko  $G\alpha_s$ . **(B)** Western blot przedstawiający poziom  $G\alpha_{12}$  i GAPDH infekowanych wirusem AAV niosącym sekwencję scramble, sekwencję wyciszającą ekspresję genu kodującego białko  $G\alpha_{12}$ . **(C, D)** Analizy ilościowe przedstawiające kwantyfikację poziomu białka **(C)**  $G\alpha_s$  (dla myszy zainfekowanych wirusem AAV niosącym sekwencję scramble  $n_{\text{myszy}} = 6$ ; sekwencją wyciszającą  $G\alpha_s$   $n_{\text{myszy}} = 7$ ) oraz **(D)**  $G\alpha_{12}$  (dla myszy zainfekowanych wirusem AAV niosącym sekwencję scramble  $n_{\text{myszy}} = 10$ ; sekwencją wyciszającą  $G\alpha_{12}$   $n_{\text{myszy}} = 14$ ), wyrażonego jako stosunek sygnału  $G\alpha_s$ /GAPDH i  $G\alpha_{12}$ /GAPDH, odpowiednio. Dane zostały przedstawione jako średnie wartości  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

W dalszej kolejności przystąpiono do właściwego eksperymentu, którego celem było zbadanie czy białka  $G\alpha_s$  lub  $G\alpha_{12}$  pośredniczą w procesie zależnej od 5-HT<sub>7</sub>R aktywacji MMP-9. W eksperymencie wykorzystano myszy niepoddane operacjom oraz myszy, którym wprowadzone zostały wirusy niosące shRNA scramble, shRNA  $G\alpha_s$  lub shRNA  $G\alpha_{12}$ . Myszy otrzymały iniekcję LP-211 lub roztworu soli fizjologicznej (w grupie kontrolnej), a następnie po 30 minutach, zostały poddane eutanazji. Wyizolowano zainfekowane obszary hipokampów, a uzyskane z nich białka użyto

w zymografii żelowej w celu oceny poziomu aktywności żelatynaz. W hipokampach myszy niepoddanych operacjom, które otrzymały iniekcję LP-211, zaobserwowano wzrost aktywności MMP-9 w porównaniu do grupy kontrolnej, która otrzymała sól fizjologiczną (Ryc. 20A, E). Natomiast w przypadku myszy z grupy shRNA scramble nie zaobserwowano różnic w aktywności MMP-9 po iniekcji LP-211 w stosunku do grupy kontrolnej, która otrzymała iniekcję z solą fizjologiczną (Ryc. 20B, F). W tej grupie zaobserwowano dużą zmienność odpowiedzi na stymulację, jednak nie udało się ustalić przyczyny tej niejednorodności. U myszy, którym wprowadzono wirusy shRNA  $G\alpha_s$ , nie zaobserwowano różnic w aktywności MMP-9 po stymulacji z użyciem LP-211, w porównaniu z grupą kontrolną (Ryc. 20C, G). Natomiast zymografia żelowa tkanek pochodzących z myszy zainfekowanych wirusem shRNA  $G\alpha_{12}$  wykazała wzrost aktywności MMP-9 na poziomie podobnym do wyników uzyskanych u myszy niepoddanych operacjom w stosunku do myszy, które otrzymały sól fizjologiczną (Ryc. 20D, H).

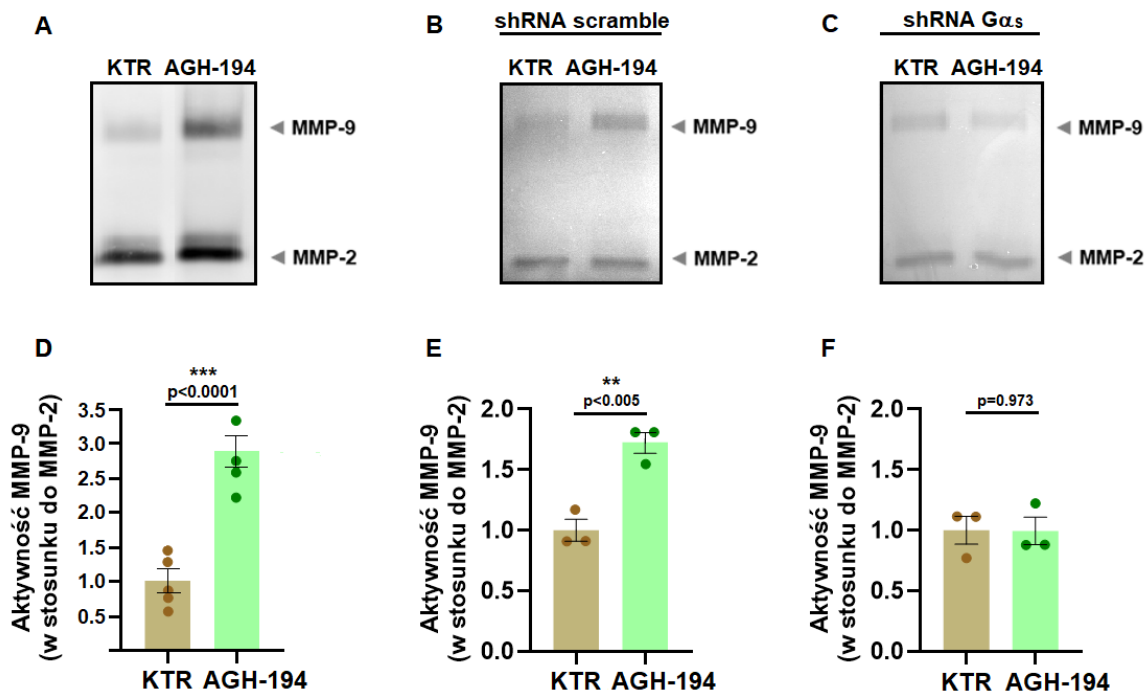


**Ryc. 20.** Aktywność MMP-9 jako stosunek do MMP-2 określonych na podstawie zymografii żelowej po 30 minutach od stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R agonistą LP-211 w porównaniu z grupą kontrolną po iniekcji solą fizjologiczną (KTR). Zymografia przeprowadzona na tkankach (A) nieinfekowanych, zainfekowanych wirusem (B) shRNA scramble, (C) wyciszającym ekspresję białka  $G\alpha_s$ , (D) wyciszającym ekspresję białka  $G\alpha_{12}$ . (E-H) Analizy ilościowe przedstawiające kwantyfikację aktywności MMP-9 jako stosunek do MMP-2 dla tkanek (E) nieinfekowanych, zainfekowanych wirusem (F) shRNA scramble, (G) wyciszającym ekspresję białka  $G\alpha_s$ , (H) wyciszającym ekspresję białka  $G\alpha_{12}$  (dla myszy nieinfekowanych  $n_{\text{myszy}} = 6$  dla myszy otrzymujących iniekcje soli fizjologicznej (KTR) i  $n_{\text{myszy}} = 6$  dla myszy otrzymujących LP-211; dla myszy zainfekowanych wirusem shRNA scramble  $n_{\text{myszy}} = 5$  dla myszy otrzymujących iniekcje soli fizjologicznej (KTR) i  $n_{\text{myszy}} = 5$  dla myszy otrzymujących LP-211; dla

myszy infekowanych wirusem wyciszającym ekspresję białka  $G\alpha_s$   $n_{myszy} = 4$  dla myszy otrzymujących iniekcje soli fizjologicznej (KTR) i  $n_{myszy} = 4$  dla myszy otrzymujących LP-211; dla myszy infekowanych wirusem wyciszającym ekspresję białka  $G\alpha_{12}$   $n_{myszy} = 5$  dla myszy otrzymujących iniekcje soli fizjologicznej (KTR) i  $n_{myszy} = 5$  dla myszy otrzymujących LP-211). Dane zostały przedstawione jako średnie wartości  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Powyższe wyniki sugerują, że białko  $G\alpha_s$  może uczestniczyć w zależności od 5-HT<sub>7</sub>R aktywacji MMP-9. Jednak ze względu na problemy techniczne i dużą zmienność w grupie shRNA scramble, nie uzyskano jednoznacznych dowodów. Aby zweryfikować tę hipotezę, przeprowadzono analogiczny eksperyment z użyciem innego specyficznego agonisty 5-HT<sub>7</sub>R, AGH-194. W eksperymencie wykorzystano myszy niepoddane operacjom oraz myszy, którym wprowadzone zostały wirusy niosące shRNA scramble lub shRNA  $G\alpha_s$ .

W hipokampach myszy niepoddanych operacjom, które otrzymały iniekcję AGH-194, zaobserwowano wzrost aktywności MMP-9 w porównaniu do grupy kontrolnej, która otrzymała sól fizjologiczną (Ryc. 21A, D). Na podstawie analizy zymografii żelowej zaobserwowano statystycznie istotny wzrost aktywności MMP-9 w grupie zwierząt, której hipokampy zostały zainfekowane wirusem shRNA scramble, po podaniu dootrzewnowym roztworu AGH-194 w porównaniu do grupy, która otrzymała iniekcję soli fizjologicznej (Ryc. 21B, E). W przypadku myszy, których hipokampy zainfekowano wirusem shRNA  $G\alpha_s$ , podanie roztworu AGH-194 nie wywołało istotnych zmian w aktywności MMP-9 w stosunku do grupy zwierząt, która otrzymała dootrzewnowo sól fizjologiczną (Ryc. 21C, F). Wyniki te wskazują, że obecność białka  $G\alpha_s$  może być kluczowa dla aktywacji MMP-9 indukowanej przez 5-HT<sub>7</sub>R.

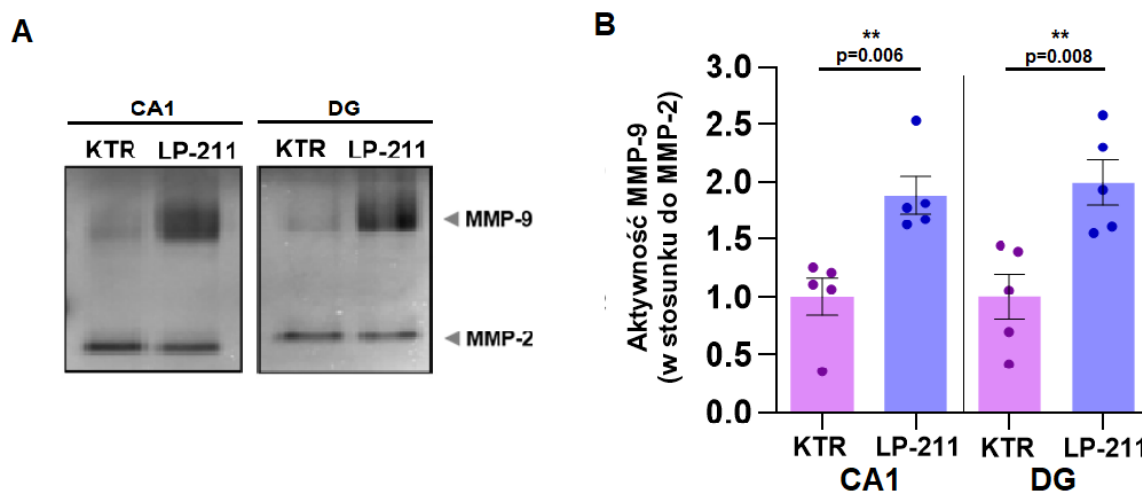


**Ryc. 21. Aktywność MMP-9 jako stosunek do MMP-2 określonych na podstawie zymografii żelowej po 30 minutach od stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R agonistą AGH-194 w porównaniu z grupą kontrolną po iniekcji solą fizjologiczną (KTR). Zymografia przeprowadzona na tkankach (A) nieinfekowanych, zainfekowanych wirusem (B) shRNA scramble, (C) wyciszającym ekspresję białka Gα<sub>s</sub>. (D-F) Analizy ilościowe przedstawiające kwantyfikację aktywności MMP-9 jako stosunek do MMP-2 dla tkanek (D) nieinfekowanych, zainfekowanych wirusem (E) shRNA scramble, (F) wyciszającym ekspresję białka Gα<sub>s</sub> (dla myszy nieinfekowanych n<sub>myszy</sub> = 5 dla myszy otrzymujących iniekcje soli fizjologicznej (KTR) i n<sub>myszy</sub> = 4 dla myszy otrzymujących AGH-194; dla myszy infekowanych wirusem shRNA scramble n<sub>myszy</sub> = 3 dla myszy otrzymujących iniekcje soli fizjologicznej (KTR) i n<sub>myszy</sub> = 3 dla myszy otrzymujących AGH-194; dla myszy infekowanych wirusem wyciszającym ekspresję białka Gα<sub>s</sub> n<sub>myszy</sub> = 3 dla myszy otrzymujących iniekcje soli fizjologicznej (KTR) i n<sub>myszy</sub> = 3 dla myszy otrzymujących AGH-194). Dane zostały przedstawione jako średnie wartości ± SEM. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001. Część analiz biochemicznych zostało przeprowadzonych we współpracy z mgr. Krystianem Bijatą (Pracownia Biofizyki Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN).**

#### **4.4. Wpływ stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R na aktywność MMP-9 w poszczególnych podregionach hipokampu**

Wyniki przedstawione w poprzednim rozdziale wskazują na zależność aktywacji MMP-9 od Gα<sub>s</sub>. Rodzi się pytanie, czy zróżnicowane kierunki zmian morfologii kolców dendrytycznych w poszczególnych podregionach hipokampu mogą być związane z różnicami w poziomie aktywacji MMP-9.

Aby zweryfikować tę hipotezę, przeanalizowano zmiany aktywności MMP-9 w podregionach hipokampu po iniekcji agonisty 5-HT<sub>7</sub>R, LP-211, w porównaniu z grupą kontrolną. Wyizolowano podregiony CA1 oraz DG hipokampu, a następnie przeprowadzono zymografię żelową. Ze względu na ograniczoną ilość białka, do badania zostały połączone tkanki pochodzące z odpowiedniego podregionu (CA1 lub DG) uzyskane od trzech zwierząt z tej samej grupy. Analiza wykazała wzrost aktywności MMP-9 w obu badanych podregionach u zwierząt poddanych iniekcji LP-211, w porównaniu z grupą kontrolną, która otrzymała sól fizjologiczną (Ryc. 22A-B). Zaobserwowany wzrost aktywności MMP-9 w obu podregionach hipokampu po stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R sugeruje, że MMP-9 może odgrywać ważną rolę w modulowaniu dwóch typów zmian morfologicznych kolców dendrytycznych, takich jak ich wydłużanie i dojrzewanie.



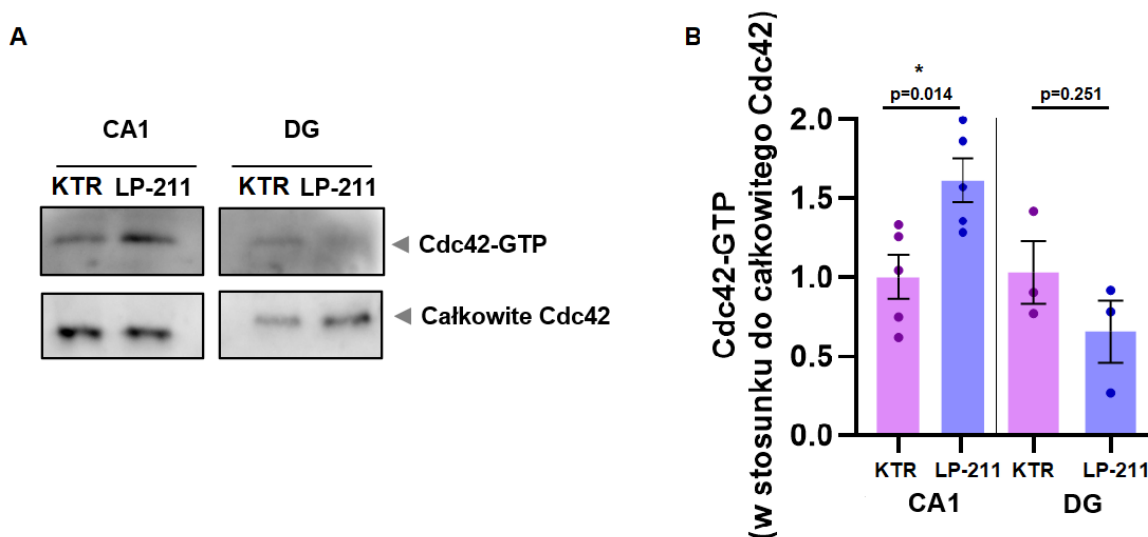
**Ryc. 22. Aktywność MMP-9 jako stosunek do MMP-2 określonych na podstawie zymografii żelowej po 30 minutach od stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R agonistą LP-211 w porównaniu z grupą kontrolną po iniekcji solą fizjologiczną (KTR) w podregionach hipokampu.** (A) Zymografia przeprowadzona na tkankach nieinfekowanych w podregionie CA1 oraz DG. (B) Analizy ilościowe przedstawiające kwantyfikację aktywności MMP-9 jako stosunek do MMP-2 dla tkanek pochodzących z podregionu CA1 oraz DG (dla myszy otrzymujących iniekcje soli fizjologicznej (KTR)  $n_{\text{myszy}} = 5$  w CA1 i  $n_{\text{myszy}} = 5$  w DG; dla myszy otrzymujących LP-211  $n_{\text{myszy}} = 5$  w CA1 i  $n_{\text{myszy}} = 5$  w DG). Dane zostały przedstawione jako średnie wartości  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . Część analiz biochemicznych zostało przeprowadzonych we współpracy z mgr. Krystianem Bijatą (Pracownia Biofizyki Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN).

## 4.5. Wpływ stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R na aktywność białek Cdc42 oraz RhoA w poszczególnych podregionach hipokampu

Białka Cdc42 oraz RhoA, kluczowe regulatory cytoszkieletu aktynowego, odgrywają istotną rolę w mechanizmach plastyczności synaptycznej takich jak zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych (Hall, 1998). Na podstawie wyników uzyskanych w niniejszej rozprawie doktorskiej wykazano, że stymulacja 5-HT<sub>7</sub>R wpływa na kształt kolców dendrytycznych w hipokampie, powodując wydłużanie kolców dendrytycznych w podregionie CA1 oraz dojrzewanie kolców w podregionie DG. Dlatego kolejne eksperymenty zostały zaprojektowane w celu określenia wpływu stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R na aktywność białek Cdc42 oraz RhoA w tych podregionach hipokampu oraz próby powiązania uzyskanych wyników z obserwowanymi zmianami morfologicznymi. Hipoteza badawcza zakładała, że stymulacja 5-HT<sub>7</sub>R moduluje aktywność tych białek w sposób zależny od jego lokalizacji w hipokampie, co może wpływać na różnice w plastyczności strukturalnej w tych podregionach.

Zwierzętom doświadczalnym podano dootrzewnowo agonistę 5-HT<sub>7</sub>R (tj. LP-211) lub sól fizjologiczną jako kontrolę. Po 30 minutach od podania przeprowadzono analizę aktywności białek w podregionach CA1 oraz DG hipokampu za pomocą testów biochemicznych (podrozdział 3.6.5. *Test aktywności RhoA/Cdc42*). Aktywność białka Cdc42 oceniano przy użyciu techniki pull-down, która umożliwia selektywne wytrącanie aktywnych form białka (Cdc42-GTP). Następnie poziomy Cdc42-GTP oraz całkowitego białka Cdc42 analizowano techniką western blot.

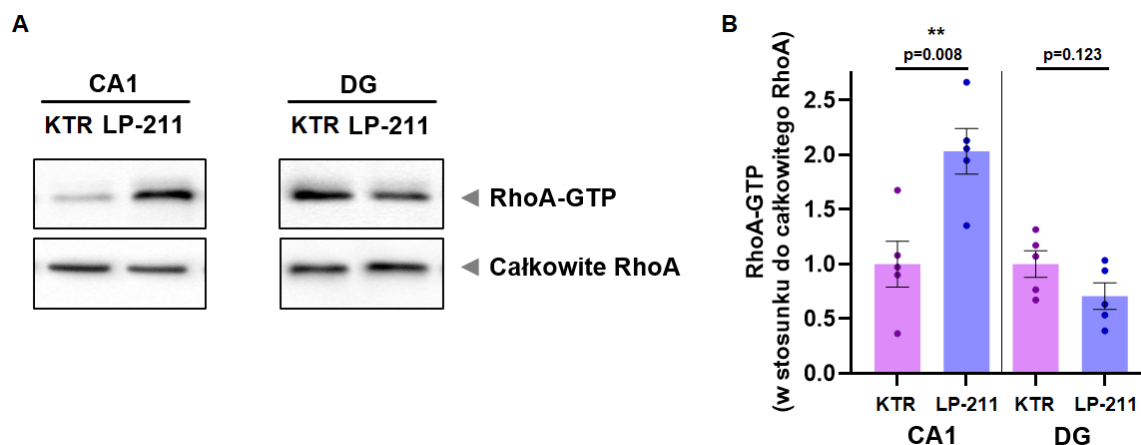
Analiza biochemiczna wykazała, że podanie agonisty LP-211 znacząco zwiększyło poziom aktywowanej formy białka Cdc42 (stosunek Cdc42-GTP do całkowitego poziomu Cdc42) w podregionie CA1 hipokampu w stosunku do grupy kontrolnej (Ryc. 23). W podregionie DG hipokampu nie zaobserwowano istotnych zmian w poziomie aktywnej GTPazy Cdc42. Wyniki te wskazują na zróżnicowaną modulację aktywacji Cdc42 pod wpływem agonisty 5-HT<sub>7</sub>R, w zależności od podregionu hipokampu.



**Ryc. 23. Analiza zmian aktywności białka Cdc42 po 30 minutach od stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R w porównaniu z grupą kontrolną po iniekcji solą fizjologiczną (KTR). (A)** Wynik analizy western blot przedstawiający poziom Cdc42-GTP oraz całkowity poziom Cdc42 w podregionach hipokampu (CA1, DG). **(B)** Kwantyfikacja aktywności Cdc42 mierzona jako stosunek Cdc42-GTP do całkowitych poziomów Cdc42 (dla myszy otrzymujących iniekcje soli fizjologicznej (KTR) n = 5 w CA1 i n = 3 w DG; natomiast dla myszy otrzymujących LP-211 n = 5 w CA1 i n = 3 w DG). Dane zostały przedstawione jako średnie wartości ± SEM. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001.

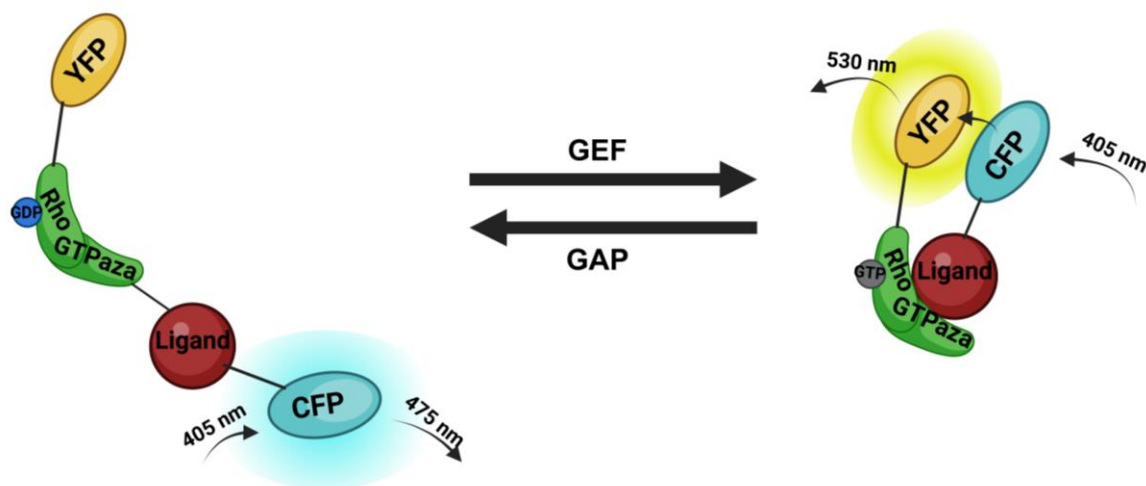
Następnie przeprowadzono badanie mające na celu określenie zmian aktywności białka RhoA w podregionach hipokampu. Podobnie jak w poprzednim doświadczeniu, zwierzętom doświadczalnym podano dootrzewnowo agonistę 5-HT<sub>7</sub>R (tj. LP-211) lub sól fizjologiczną jako kontrolę. Po 30 minutach od podania przeprowadzono analizę aktywności białek w podregionach CA1 oraz DG hipokampu za pomocą testów biochemicznych (podrozdział 3.6.5. *Test aktywności RhoA/Cdc42*). Aktywność białka RhoA oceniano przy użyciu immunoprecypitacji z przeciwciałem rozpoznającym aktywowaną formę RhoA (tj. RhoA-GTP). Następnie poziomy RhoA-GTP oraz całkowitego białka RhoA analizowano techniką western blot. Stymulacja 5-HT<sub>7</sub>R za pomocą agonisty LP-211 doprowadziła do znaczącego wzrostu poziomu aktywnej formy białka RhoA (stosunek RhoA-GTP do całkowitego poziomu RhoA) wyłącznie w podregionie CA1 (Ryc. 24), w stosunku do grupy kontrolnej. W podregionie DG hipokampu aktywność RhoA pozostała na podobnym poziomie jak w grupie kontrolnej, która otrzymała iniekcje dootrzewnowe z solą fizjologiczną. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że stymulacja 5-HT<sub>7</sub>R selektywnie wpływa na aktywność białek Cdc42 i RhoA w podregionie CA1 hipokampu, powodując jej znaczący wzrost, podczas gdy w podregionie DG nie zaobserwowano istotnych zmian aktywności obu GTPaz.

Otrzymane dane sugerują, że modulacja aktywności tych białek w sposób zależny od lokalizacji może odgrywać kluczową rolę w różnicowaniu plastyczności strukturalnej w hipokampie.



**Ryc. 24. Analiza zmian aktywności białka RhoA po 30 minutach od stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R w porównaniu z grupą kontrolną po iniekcji solą fizjologiczną (KTR). A)** Analizy metodą western blot przedstawiająca poziom RhoA-GTP oraz całkowite RhoA w podregionach hipokampu (CA1, DG). **B)** Kwantyfikacja aktywności RhoA mierzona jako stosunek RhoA-GTP do całkowitych poziomów RhoA (dla myszy otrzymujących iniekcje soli fizjologicznej (KTR) n = 5 w CA1 i n = 5 w DG; dla myszy otrzymujących LP-211 n = 5 w CA1 i n = 5 w DG). Dane zostały przedstawione jako średnie wartości ± SEM. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001.

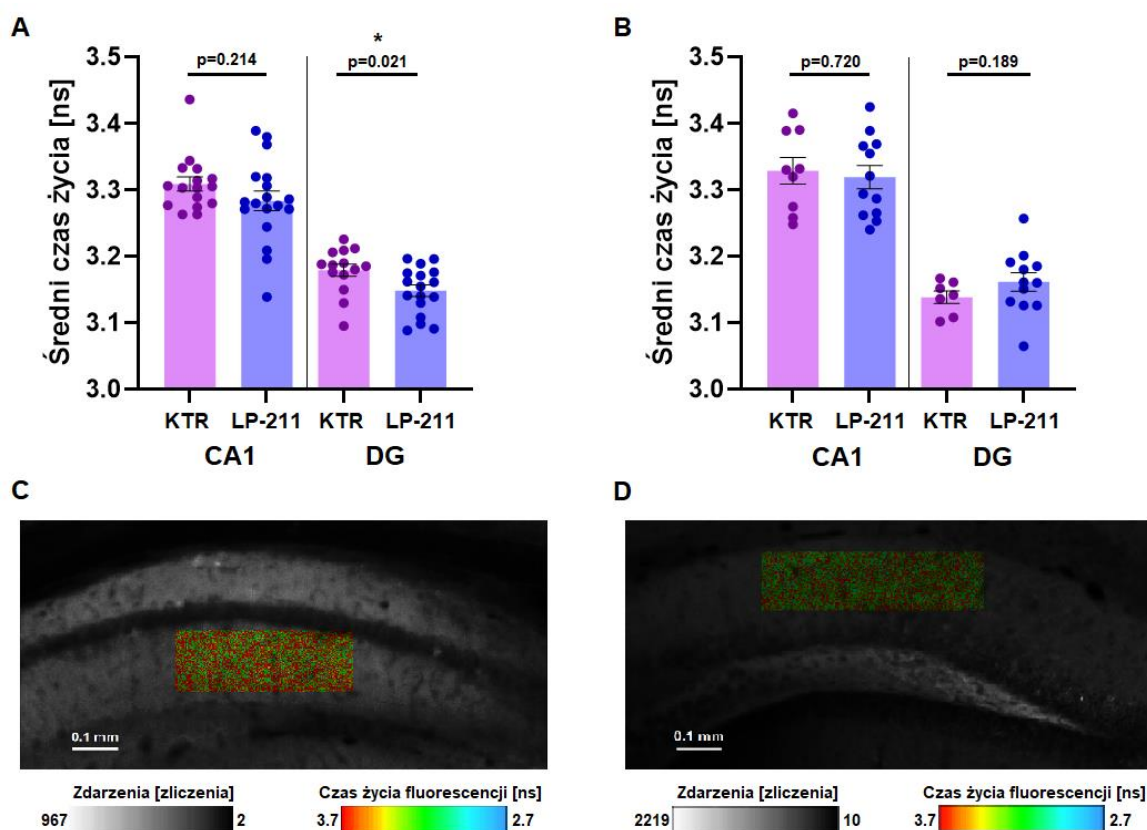
W celu uzyskania bardziej szczegółowych informacji na temat aktywności białek Cdc42 i RhoA w podregionach hipokampu, zastosowano zaawansowaną technikę obrazowania czasu życia fluorescencji (FLIM). Przeprowadzono operacje stereotaktyczne, w trakcie których do hipokampów myszy wprowadzono wirusy niosące sekwencje kodujące biosensory aktywności RhoA lub Cdc42 (Ryc. 25). Następnie wykonano iniekcje dootrzewnowe agonisty 5-HT<sub>7</sub>R lub soli fizjologicznej (grupa kontrolna). Po zakończeniu eksperymentu przeprowadzono perfuzję zwierząt, a następnie dysekcję mózgów, które odpowiednio utrwalono i pocięto na skrawki. Wykorzystując zjawisko Försterowskiego rezonansowego transferu energii (FRET) zmierzono czas życia donora fluorescencji, co umożliwiło ocenę poziomu aktywności białek na poziomie molekularnym.



**Ryc. 25. Schemat działania biosensora aktywności Rho GTPazy (RhoA lub Cdc42).**

Po wymianie GDP na GTP, badana Rho GTPaza (RhoA lub Cdc42) wiąże się z odpowiednim ligandem (PKN dla RhoA lub Pak1 dla Cdc42). Proces ten skutkuje zbliżeniem się cząsteczek donora (CFP) i akceptora (YFP) fluorescencji, umożliwiając przekazanie energii (FRET).

Analiza czasu życia fluorescencji wykazała brak istotnie statystycznych zmian w aktywności białek Cdc42 i RhoA w podregionie CA1 hipokampu po iniekcji LP-211 w porównaniu z grupą kontrolną, która otrzymała iniekcję soli fizjologicznej. W podregionie DG zaobserwowano jednak istotne statystycznie obniżenie czasu życia donora fluorescencji sensora aktywności Cdc42, co świadczy o zwiększeniu aktywności Cdc42 (Ryc. 26). Wyniki uzyskane za pomocą techniki FLIM i metod biochemicznych wykazały rozbieżności w analizie aktywności białek Cdc42 i RhoA w podregionach hipokampu. FLIM bazował na biosensorach aktywności pod kontrolą promotora synapsynowego, który zapewniał ekspresję biosensora jedynie w neuronach. Z kolei metody biochemiczne, które integrują efekty z całej homogenizowanej tkanki, mogły uwzględniać globalne zmiany obejmujące różne typy komórek. Wyniki te wskazują na potrzebę dalszych badań nad mechanizmami molekularnymi odpowiedzialnymi za te zróżnicowane efekty w podregionach hipokampu.



**Ryc. 26. Wyniki obrazowania czasu życia fluorescencji uzyskane metodą FLIM. (A)** Analiza zmian czasu życia fluorescencji po stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R dla białka Cdc42 w podregionach hipokampu (CA1, DG) (dla myszy otrzymujących iniekcje soli fizjologicznej (KTR) w CA1 n = 16; w DG n = 18; natomiast dla myszy otrzymujących LP-211 w CA1 n = 14; w CA1 n = 17). **(B)** Analiza zmian czasu życia fluorescencji po stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R dla białka RhoA w podregionach hipokampu (C1, DG) (dla myszy otrzymujących iniekcje soli fizjologicznej (KTR) w CA1 n = 9; w DG n = 12; natomiast dla myszy otrzymujących LP-211 w CA1 n = 7; w CA1 n = 12). **(C, D)** Reprezentatywne obrazy z mikroskopu konfokalnego przedstawiające sposób wyboru obszaru zainteresowania (ROI) do analizy w obszarze **(C)** CA1 oraz **(D)** DG. Dane zostały przedstawione jako średnie wartości ± SEM. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001.

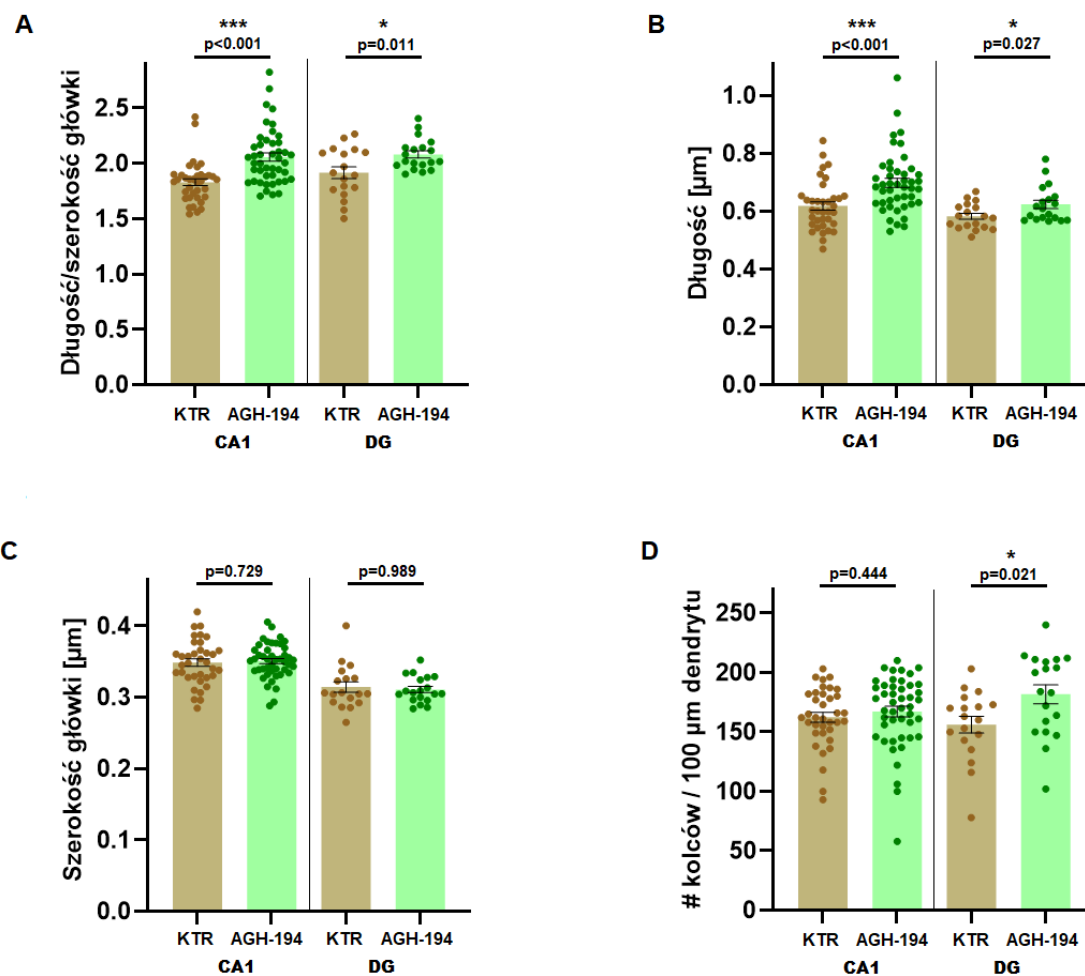
#### 4.6. Wpływ chronicznej stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R na zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych w podregionach hipokampu

Do badań nad chroniczną aktywacją 5-HT<sub>7</sub>R zastosowano specyficznego agonistę tego receptora, AGH-194, który jest rozpuszczalny w wodzie. Wybór tego agonisty był podyktowany specyficznym metabolizmem LP-211 oraz koniecznością stosowania rozpuszczalników takich jak DMSO, które w przypadku wielokrotnego podawania mogą

wywoływać toksyczne działanie na badany organizm. Wcześniejsze doświadczenia z zastosowaniem LP-211 zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*, wykazały zmiany w morfologii kolców dendrytycznych w odpowiedzi na jednorazową, pojedynczą stymulację 5-HT<sub>7</sub>R. W związku z tym, pierwszym krokiem było przeprowadzenie analogicznego eksperymentu z użyciem agonisty AGH-194, w celu porównania uzyskanych wyników z wynikami otrzymanymi po iniekcjach LP-211.

Do analizy morfologicznej wybrano dwa podregiony hipokampu: CA1 i DG, które w poprzednich badaniach z jednorazową stymulacją 5-HT<sub>7</sub>R wykazywały największe zmiany w strukturze kolców dendrytycznych. Stymulacja AGH-194 spowodowała wydłużenie kolców (Ryc. 27B) oraz wzrost stosunku długości do szerokości główki kolców (Ryc. 27A) w obu badanych podregionach hipokampu: CA1 oraz DG, w porównaniu z grupą kontrolną poddaną iniekcji soli fizjologicznej. Wyniki w podregionie CA1 były zbieżne z wcześniejszymi obserwacjami uzyskanymi dla LP-211, gdzie również zaobserwowano wydłużenie kolców dendrytycznych i wzrost stosunku długości do szerokości główki (Ryc. 10A). Natomiast w podregionie DG wyniki różniły się — dla LP-211 obserwowano dojrzewanie kolców dendrytycznych, podczas gdy stymulacja AGH-194 prowadziła do wydłużenia kolców dendrytycznych, podobnie jak w CA1.

Analiza gęstości kolców dendrytycznych w podregionach hipokampu po zastosowaniu AGH-194, w porównaniu z grupą kontrolną poddaną iniekcji soli fizjologicznej, wykazała brak zmian w podregionie CA1 oraz znaczący wzrost tego parametru w podregionie DG (Ryc. 27D). Wyniki te różnią się od obserwacji uzyskanych w badaniu z użyciem agonisty LP-211, w których odnotowano istotny spadek gęstości kolców dendrytycznych zarówno w podregionie CA1, jak i DG (Ryc. 10D). Różnice te sugerują odmienny mechanizm działania obu agonistów, wynikający prawdopodobnie z różnic w ich metabolizmie oraz z ich stronniczości w aktywacji szlaków sygnałowych regulujących morfogenezę kolców dendrytycznych.

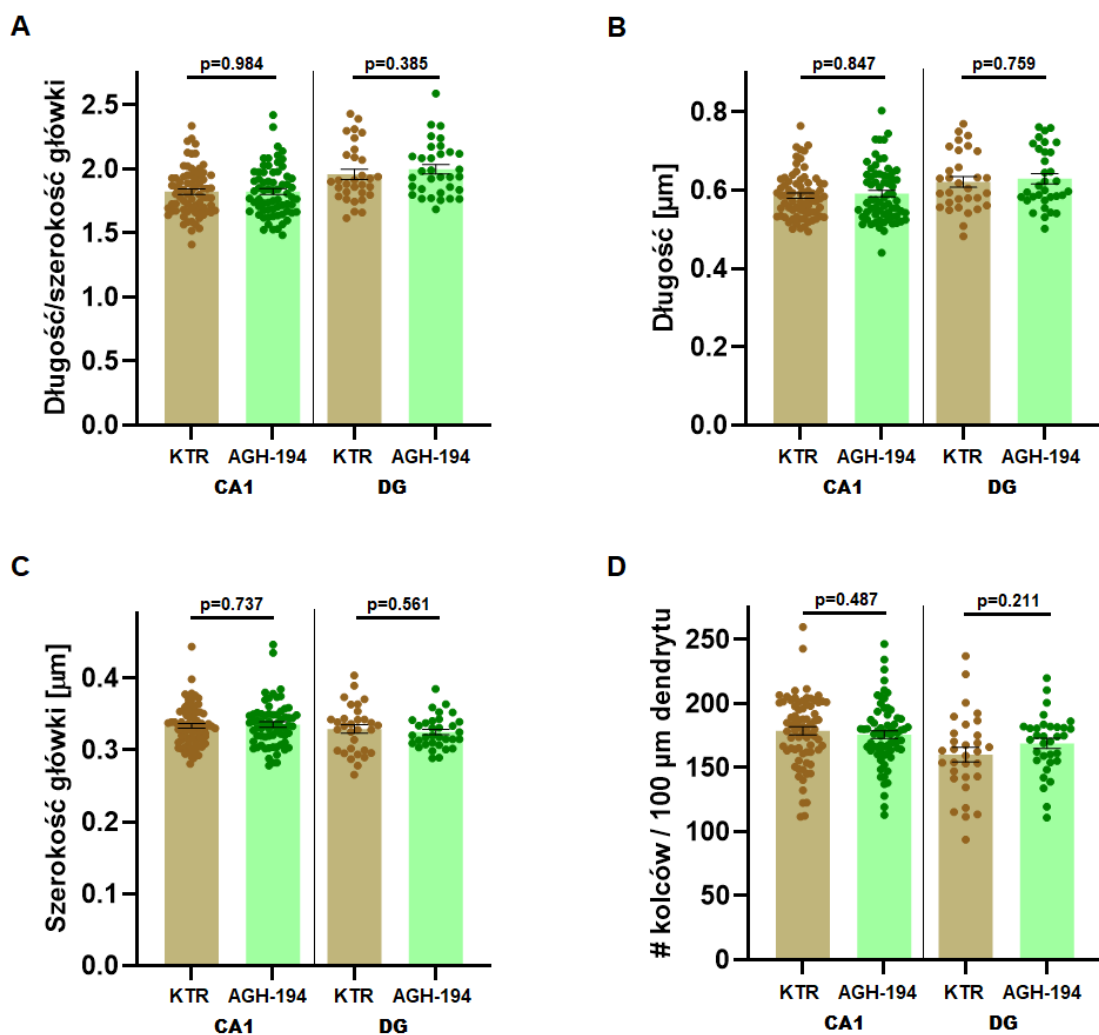


**Ryc. 27. Analiza parametrów morfometrycznych kolców dendrytycznych w poszczególnych podregionach hipokampu (CA1, DG) po stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R agonistą AGH-194. (A) Stosunek długości do szerokości główki, (B) długość kolca, (C) szerokość główki (dla myszy otrzymujących iniekcje z solą fizjologiczną (KTR)  $n_{\text{myszy}} = 4$ ; dla CA1  $n_{\text{dendrytów}} = 36$ ;  $n_{\text{kolców}} = 2232$ ; dla DG  $n_{\text{dendrytów}} = 18$ ;  $n_{\text{kolców}} = 1132$ ; dla myszy otrzymujących AGH-194  $n_{\text{myszy}} = 4$ ; dla CA1  $n_{\text{dendrytów}} = 45$ ;  $n_{\text{kolców}} = 2579$ ; dla DG  $n_{\text{dendrytów}} = 19$ ;  $n_{\text{kolców}} = 1828$ ) po jednorazowej stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R agonistą AGH-194 lub solą fizjologiczną. (D) Analiza gęstości kolców dendrytycznych w poszczególnych podregionach (dla myszy otrzymujących iniekcje z solą fizjologiczną (KTR)  $n_{\text{myszy}} = 4$ ; dla CA1  $n_{\text{dendrytów}} = 36$ ; dla DG  $n_{\text{dendrytów}} = 18$ ; dla myszy otrzymujących AGH-194  $n_{\text{myszy}} = 4$ ; dla CA1  $n_{\text{dendrytów}} = 46$ ; dla DG  $n_{\text{dendrytów}} = 19$ ) po jednorazowej stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R agonistą AGH-194. Każdy punkt na wykresach przedstawia fragment dendrytu pochodzący z pojedynczego neuronu. Dane zostały przedstawione jako średnie wartości  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .**

W celu oceny zmian morfologicznych i gęstości kolców dendrytycznych po chronicznej aktywacji 5-HT<sub>7</sub>R, przeprowadzono badania na myszach poddanych 14-dniowym, codziennym iniekcjom dootrzewnowym roztworu agonisty AGH-194 lub soli fizjologicznej (grupa kontrolna). W podregionie CA1 przeanalizowano kolce

zlokalizowane zarówno na dendrytach podstawnych, jak i wierzchołkowych. Jednakże, z uwagi na brak istotnych różnic w wynikach między tymi typami dendrytów, dane zostały połączone dla końcowej analizy. Przeprowadzona analiza morfologii i gęstości kolców dendrytycznych wykazała brak istotnych zmian w odpowiedzi na chroniczną stymulację 5-HT<sub>7</sub>R agonistą AGH-194, które wcześniej zaobserwowano po jednorazowej aktywacji tego receptora (Ryc. 27A-D). Dotyczyło to zarówno parametrów morfologicznych kolców dendrytycznych takich jak długość oraz stosunek długości do szerokości główki kolców (Ryc. 28A-C), jak i gęstości kolców dendrytycznych (Ryc. 28D). Wyniki te sugerują, że zmiany w strukturze kolców dendrytycznych zaobserwowane po jednorazowej stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R są przejściowe i nie utrzymują się po przewlekłej stymulacji *in vivo* w badanych podregionach hipokampu.

Przeprowadzone badania wskazują, że aktywacja 5-HT<sub>7</sub>R za pomocą specyficznego agonisty indukuje zmiany morfologiczne w podregionach hipokampu wyłącznie w odpowiedzi na krótkotrwałą, jednorazową stymulację. Brak trwałych zmian po przewlekłej aktywacji 5-HT<sub>7</sub>R może wynikać z procesów adaptacyjnych w ośrodkowym układzie nerwowym, które ograniczają efekty długotrwałej stymulacji receptora. Wyniki te wskazują na wpływ dynamiki czasowej stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R w modulacji plastyczności synaptycznej. Powyższe wyniki wskazują na wpływ dynamiki czasowej stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R na modulację plastyczności strukturalnej kolców dendrytycznych.

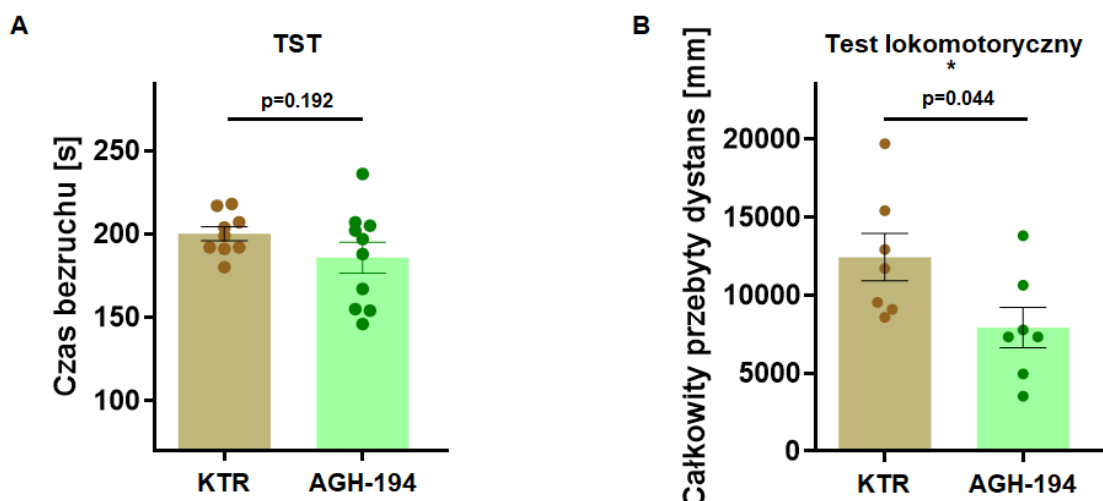


**Ryc. 28.** Analiza parametrów morfometrycznych kolców dendrytycznych w poszczególnych podregionach hipokampu (CA1, DG) po chronicznej stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R. (A) stosunek długości do szerokości główki, (B) długość kolca, (C) w podregionach CA1 oraz DG hipokampu (dla myszy otrzymujących iniekcje soli fizjologicznej (KTR)  $n_{\text{myszy}} = 6$ ; dla CA1  $n_{\text{dendrytów}} = 74$ ;  $n_{\text{kolców}} = 5334$ ; dla DG  $n_{\text{dendrytów}} = 31$ ;  $n_{\text{kolców}} = 2535$ ; dla myszy otrzymujących AGH-194  $n_{\text{myszy}} = 5$ ; dla CA1  $n_{\text{dendrytów}} = 68$ ;  $n_{\text{kolców}} = 47265$ ; dla DG  $n_{\text{dendrytów}} = 33$ ;  $n_{\text{kolców}} = 3091$ ) po chronicznej stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R agonistą AGH-194 lub solą fizjologiczną. (D) Analiza gęstości kolców dendrytycznych w poszczególnych podregionach (dla myszy otrzymujących iniekcje soli fizjologicznej (KTR)  $n_{\text{myszy}} = 6$ ; dla CA1  $n_{\text{dendrytów}} = 75$ ; dla DG  $n_{\text{dendrytów}} = 31$ ; dla myszy otrzymujących AGH-194  $n_{\text{myszy}} = 5$ ; dla CA1  $n_{\text{dendrytów}} = 68$ ; dla DG  $n_{\text{dendrytów}} = 33$ ) po chronicznej stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R agonistą AGH-194. Każdy punkt na wykresach przedstawia fragment dendrytu pochodzący z pojedynczego neuronu. Dane zostały przedstawione jako średnie wartości  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

## 4.7. Wpływ stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R na zmiany behawioralne

W poprzednich badaniach opisanych w niniejszej rozprawie wykazano, że mimo iż LP-211, jak i AGH-194 są wysoce selektywnymi agonistami 5-HT<sub>7</sub>R, ich wpływ na morfologię i gęstość kolców dendrytycznych w podregionach hipokampu CA1 oraz DG, różni się istotnie. W związku z tym postanowiono zbadać, czy obserwowane różnice w działaniu obu agonistów przekładają się również na odmienne efekty behawioralne u zwierząt. Wpływ LP-211 na zachowania behawioralne został wcześniej opisany przez Bijata i wsp. (2022), dlatego w niniejszej pracy skoncentrowano się na analizie efektów wywołanych przez AGH-194.

Aby ocenić wpływ AGH-194 na zachowania depresyjne, przeprowadzono test zawieszania za ogon. Po 30 minutach od podania dootrzewnowej iniekcji AGH-194 lub soli fizjologicznej (grupa kontrolna) wykonano test zawieszania za ogon mierząc czas bezruchu, co pozwalało na ocenę wpływu agonisty 5-HT<sub>7</sub>R na zachowania depresyjne. Następnie przeprowadzono test lokomotoryczny, w którym zmierzono dystans przebyty przez myszy po podaniu agonisty 5-HT<sub>7</sub>R lub soli fizjologicznej, w celu oceny jego wpływu na aktywność ruchową zwierząt. W teście zawieszania za ogon nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy grupą badaną (myszy poddanie iniekcjom AGH-194) a grupą kontrolną (Ryc. 29A), co sugeruje, że podanie AGH-194 nie wpływa na zachowania depresyjne u myszy. Jednak w teście lokomotorycznym wykazano, że zwierzęta, które otrzymały iniekcję AGH-194, charakteryzowały się znacząco mniejszą ruchliwością w porównaniu z grupą kontrolną (Ryc. 29B). Wyniki te wskazują na hamujący wpływ agonisty AGH-194 na aktywność lokomotoryczną.



**Ryc. 29. Wyniki badań behawioralnych po stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R agonistą AGH-194.** (A) Czas bezruchu w teście zawieszania za ogon (TST) po 30 minutach od iniekcji dootrzewnowej soli fizjologicznej (KTR) lub roztworu AGH-194 (dla myszy otrzymujących iniekcje soli fizjologicznej (KTR)  $n_{\text{myszy}} = 9$ ; dla myszy otrzymujących AGH-194  $n_{\text{myszy}} = 10$ ). (B) Całkowity przebyty dystans w teście lokomotorycznym po 30 min. od iniekcji dootrzewnowej soli fizjologicznej (KTR) lub roztworu agonisty AGH-194 (dla myszy otrzymujących iniekcje soli fizjologicznej (KTR)  $n_{\text{myszy}} = 7$ ; dla myszy otrzymujących AGH-194  $n_{\text{myszy}} = 7$ ). Dane zostały przedstawione jako średnie wartości  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

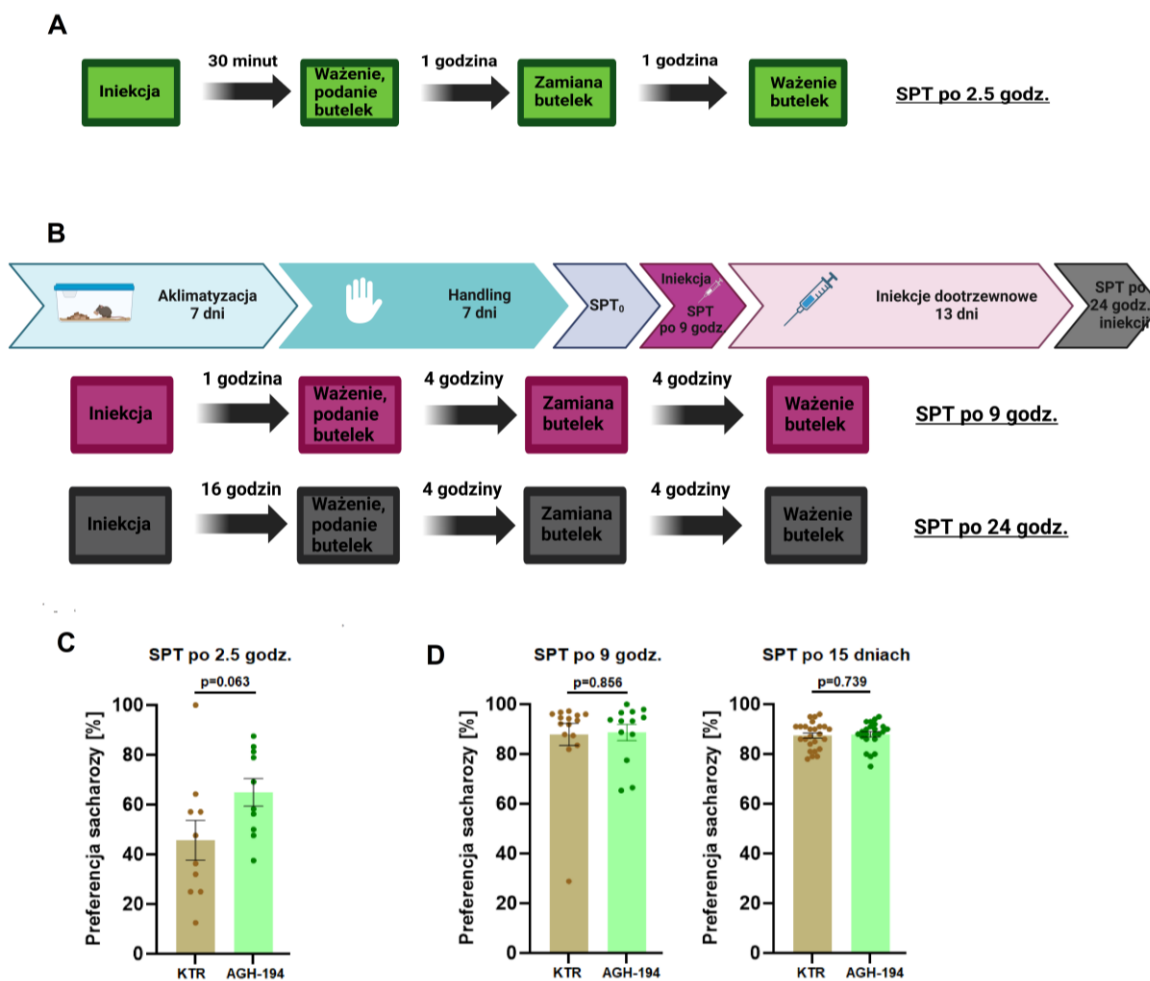
Ze względu na znaczący wpływ AGH-194 na aktywność lokomotoryczną, który mógł zakłócić interpretację wyników testów opartych na ruchu zwierząt takich jak test zawieszania za ogon, jednoznaczne określenie wpływu agonisty na zachowania depresyjno-podobne okazało się trudne. W związku z tym, w celu lepszego zrozumienia potencjalnego działania AGH-194 na zachowania depresyjne, przeprowadzono test preferencji sacharozy (SPT), który bada anhedonię i jest niezależny od aktywności ruchowej zwierząt. Zwierzętom podawano iniekcje dootrzewnowe roztworu AGH-194 lub soli fizjologicznej (w grupie kontrolnej), a następnie oceniano spożycie roztworu sacharozy w odniesieniu do całkowitego spożycia płynów. Eksperyment przeprowadzono badając jednorazową stymulację 5-HT<sub>7</sub>R, a test SPT przeprowadzono po upływie 2,5 godziny od podania pojedynczej iniekcji agonisty lub iniekcji soli fizjologicznej (Ryc. 30A). W drugim doświadczeniu badano wpływ przewlekłej stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R na preferencję sacharozy, w porównaniu z grupą kontrolną otrzymującą iniekcje soli fizjologicznej. Zwierzęta otrzymywały codzienne iniekcje przez 14 dni, a test SPT wykonano dwukrotnie – 9 godzin po podaniu pierwszej iniekcji oraz 24 godziny po podaniu ostatniej iniekcji (Ryc. 30B). Eksperyment ten został zaprojektowany

analogicznie do badań morfologicznych kolców dendrytycznych, przeprowadzonych w ramach tej rozprawy.

Analiza wyników SPT po jednorazowej stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R nie wykazała istotnych statystycznie różnic w preferencji sacharozy między grupą badaną a kontrolną. Jednakże w grupie zwierząt otrzymujących AGH-194 zaobserwowano nieistotne statystycznie trendy wskazujące na zwiększoną preferencję sacharozy w stosunku do wody (Ryc. 30C). Wyniki te sugerują potencjalny, krótkoterminowy wpływ agonisty na mechanizmy związane ze wzrostem zachowań anhedonicznych.

Wyniki testu SPT przeprowadzonego po przewlekłej, 14-dniowej stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R nie wykazały żadnych różnic w preferencji sacharozy w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 30D). Brak zmian zaobserwowano zarówno po pierwszej iniekcji (9 godzin po podaniu), jak i 24 godziny po ostatniej iniekcji, co wskazuje na brak wpływu przewlekłego działania AGH-194 na zachowania związane z anhedonią.

Uzyskane wyniki wskazują, że jednorazowe podanie agonisty AGH-194 może wywoływać krótkoterminowe zmiany w zachowaniach anhedonicznych, choć obserwowane trendy nie osiągnęły istotności statystycznej. Natomiast przewlekła stymulacja 5-HT<sub>7</sub>R za pomocą AGH-194 nie wywołuje zauważalnych zmian w zachowaniach związanych z anhedonią, co sugeruje przejściowy charakter tego efektu.



**Ryc. 30. Badanie preferencji sacharozy myszy po stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R agonistą AGH-194.** (A) Schemat badania SPT po 2,5 godz. od pojedynczej iniekcji soli fizjologicznej lub roztworu agonisty 5-HT<sub>7</sub>R. (B) Schemat badania SPT po chronicznym podawaniu iniekcji soli fizjologicznej lub roztworu agonisty 5-HT<sub>7</sub>R. (C) Preferencja sacharozy w teście preferencji sacharozy (SPT) po 30 minutach od pojedynczej iniekcji soli fizjologicznej (KTR) lub roztworu agonisty 5-HT<sub>7</sub>R (dla myszy otrzymujących iniekcje soli fizjologicznej (KTR)  $n_{\text{myszy}} = 10$ ; dla myszy otrzymujących AGH-194  $n_{\text{myszy}} = 10$ ). (D) Preferencja sacharozy w teście preferencji sacharozy (SPT) po 9 godzinach od pierwszej iniekcji oraz po 24 godzinach od ostatniej (czternastej) iniekcji soli fizjologicznej (KTR) lub roztworu agonisty 5-HT<sub>7</sub>R (dla myszy otrzymujących iniekcje soli fizjologicznej (KTR) dla SPT po 9 godzinach  $n_{\text{myszy}} = 15$ ; dla myszy otrzymujących AGH-194  $n_{\text{myszy}} = 13$ ; natomiast dla myszy otrzymujących iniekcje soli fizjologicznej (KTR) dla SPT po 15 dniach  $n_{\text{myszy}} = 25$ ; dla myszy otrzymujących AGH-194  $n_{\text{myszy}} = 23$ ). Dane zostały przedstawione jako średnie wartości  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

## 5. Dyskusja

5-HT<sub>7</sub>R odkryty w 1993 roku [Bard i wsp., 1993; Lovenberg i wsp., 1993; Ruat i wsp., 1993], od lat budzi zainteresowanie naukowców na całym świecie, szczególnie ze względu na swoją rolę w regulacji licznych procesów fizjologicznych, takich jak pamięć, odczuwanie bólu czy rytm dobowy [Ciranna i Catania, 2014]. W kontekście plastyczności synaptycznej receptor ten odgrywa szczególnie ważną rolę w modulacji dynamicznych procesów strukturalnych, obejmujących zarówno synaptogenezę, jak i zmiany w morfologii kolców dendrytycznych [Kvachnina i wsp., 2005; Kobe i wsp., 2012]. Liczne badania wskazują, że 5-HT<sub>7</sub>R, działając poprzez zależne od siebie szlaki sygnałowe, kontroluje kluczowe procesy molekularne wpływające na strukturę i funkcję synaps. Jednym z najważniejszych mechanizmów molekularnych aktywowanych przez 5-HT<sub>7</sub>R jest jego wpływ na aktywność białek, takich jak MMP-9 [Bijata i wsp., 2017] i Cdc42 [Kvachnina i wsp., 2005]. MMP-9, enzym należący do rodziny metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej, odgrywa istotną rolę w reorganizacji macierzy zewnątrzkomórkowej, co jest kluczowe dla procesów synaptogenezy i plastyczności strukturalnej. W stanie aktywnym MMP-9 umożliwia przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej, co wspomaga adaptacyjne zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych w odpowiedzi na bodźce synaptyczne [Stawarski i wsp., 2014; Magnowska i wsp., 2016]. Jednocześnie Cdc42, należące do rodziny małych GTPaz, reguluje polimeryzację aktyny, wpływając w ten sposób na synaptogenezę [Jontes i Smith, 2000] oraz zmiany kształtu kolców dendrytycznych [Tashiro i wsp., 2000; Tashiro i Yuste, 2004; Murakoshi i wsp., 2011; Bijata i wsp., 2017; Schill i wsp., 2020]. Mimo licznych odkryć dotyczących 5-HT<sub>7</sub>R, mechanizmy molekularne związane z jego działaniem wciąż nie są w pełni poznane, co czyni ten obszar szczególnie interesującym dla badaczy.

Hipokamp, kluczowy dla procesów pamięci i uczenia się, jest często badany jako jednolita struktura, szczególnie w analizach biochemicznych. Jednak warto zauważyć, że jego poszczególne podregiony różnią się organizacją komórkową, strukturą sieci połączeń oraz posiadają odrębne funkcje. Różnice te obejmują struktury komórek, charakter połączeń neuronalnych, wzorce aktywności oraz reakcje na różnorodne bodźce [Knowles, 1992; Booker i Vida, 2018; Cembrowski i Spruston, 2019; Senzai, 2019]. W przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej badaniach nad strukturą kolców dendrytycznych *in vivo* wykazano, że aktywacja 5-HT<sub>7</sub>R moduluje plastyczność

strukturalną w sposób zależny od podregionu hipokampu. Na dendrytach neuronów piramidowych w obszarze CA1 zaobserwowano wydłużanie kolców, co odzwierciedlało się poprzez zwiększenie stosunku długości do szerokości główki. Wyniki te były zgodne z wcześniejszymi badaniami *in vitro*, które wykazały, że stymulacja 5-HT<sub>7</sub>R prowadzi do wydłużania kolców dendrytycznych w neuronach piramidowych [Bijata i wsp., 2017]. Natomiast na dendrytach neuronów ziarnistych w podregionie DG kierunek zmian wskazywał na dojrzewanie kolców, manifestujące się zmniejszeniem tego stosunku.

Aby dokładniej zrozumieć mechanizmy plastyczności w DG zależne od 5-HT<sub>7</sub>R, szczególną uwagę poświęcono badaniom *in vitro* w hodowlach pierwotnych neuronów ziarnistych. Taki model nie tylko pozwolił na kontrolowaną analizę zmian w strukturze kolców dendrytycznych pod wpływem stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R, ale również umożliwił wykorzystanie obrazowania przyżyciowego, co pozwoliło na śledzenie tych zmian w czasie rzeczywistym. Dzięki tej metodzie możliwe było zarejestrowanie procesów dojrzewania i reorganizacji kolców dendrytycznych w precyzyjnie określonych momentach czasowych, co dostarczyło unikalnych danych, niedostępnych w badaniach *in vivo*. Badania w hodowlach pierwotnych neuronów ziarnistych hipokampu przeprowadzono analogicznie do eksperymentu opisanego przez Bijata i wsp. w 2017, wykorzystując neurony wyizolowane z podregionu DG mózgow myszy w wieku P3-P5 [Figiel i Kaczmarek, 1997]. Po stymulacji agonistą LP-211 zaobserwowano dojrzewanie kolców dendrytycznych po 10 minutach, co było zgodne z wynikami uzyskanymi *in vivo* po 30 minutach. Jednakże, w przeciwieństwie do wyników otrzymanych *in vivo*, po kolejnych 10 minutach od stymulacji zaobserwowano cofanie się zmian morfologicznych w kolcach dendrytycznych badanych w hodowli *in vitro*, co sugeruje możliwą dynamikę zmian *in vivo* w późniejszych punktach czasowych, wymagającą dalszych badań. Pojawia się więc pytanie, co sprawia, że zmiany te zanikają z czasem.

Przejściowy charakter zmian obserwowanych w hodowlach *in vitro* neuronów ziarnistych może wynikać z ograniczeń tego środowiska badawczego. Chociaż model *in vitro* umożliwia precyzyjną i kontrolowaną analizę molekularnych mechanizmów plastyczności neuronalnej, nie odzwierciedla w pełni złożoności warunków fizjologicznych *in vivo*. Kluczowym ograniczeniem jest brak w pełni rozwiniętych interakcji między neuronami a astrocytami, które w tkankach *in vivo* odgrywają fundamentalną rolę w utrzymaniu homeostazy synaptycznej [Kim i wsp., 2024]. Może to znacząco wpływać na stabilność morfologiczną kolców dendrytycznych obserwowaną

w hodowlach. Dodatkowo w warunkach *in vitro* dostępność neurotrofin, takich jak BDNF, jest prawdopodobnie niższa w porównaniu do naturalnego środowiska neuronalnego, co może ograniczać zdolność neuronów do utrzymania zmian plastycznych. Brak interakcji z innymi typami komórek, takimi jak mikroglej, oraz brak wpływu czynników humoralnych i sygnałów systemowych również może przyczyniać się do różnic w dynamice i stabilności procesów plastycznych między modelami *in vitro* a *in vivo*. Aby jednoznacznie wyjaśnić te zjawiska, konieczne są dalsze badania obejmujące analizę zmian w różnych punktach czasowych zarówno w modelach *in vitro*, jak i *in vivo*.

Zmiany morfologiczne obserwowane zarówno w modelach *in vitro*, jak i *in vivo* po stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R wskazują na odmienny charakter plastyczności strukturalnej w podregionach CA1 i DG hipokampu. Wyniki sugerują, że mechanizmy molekularne regulujące plastyczność w neuronach piramidowych CA1 mogą znacząco różnić się od tych aktywnych w neuronach ziarnistych DG. Różnice te mogą wynikać z wewnętrznych właściwości komórkowych poszczególnych typów neuronów, np. specyficznej ekspresji białek sygnałowych oraz odmiennych sposobów aktywacji tych szlaków przez 5-HT<sub>7</sub>R. Jakie białka mogą być zaangażowane w te procesy? 5-HT<sub>7</sub>R aktywuje cyklazę adenylową poprzez interakcję z białkiem G<sub>αs</sub>, co prowadzi do zwiększenia poziomu cAMP [Norum i wsp., 2003]. Dodatkowo 5-HT<sub>7</sub>R oddziałuje z białkiem G<sub>α12</sub>, co aktywuje małe Rho GTPazy, takie jak RhoA i Cdc42, kluczowe w reorganizacji cytoszkieletu aktynowego [Kobe i wsp., 2012; Kvachnina i wsp., 2005; Bijata i wsp., 2017]. Analiza danych z *Hippocampus RNA-seq Atlas* wykazała znacząco wyższą ekspresję genu kodującego białko G<sub>αs</sub> w regionie CA1 w porównaniu z DG, podczas gdy ekspresja białka G<sub>α12</sub> pozostawała na podobnym poziomie w obu podregionach. Wyniki te sugerują, że różnice w morfologii kolców dendrytycznych, takie jak wydłużanie w CA1 oraz dojrzewanie w DG po aktywacji 5-HT<sub>7</sub>R, mogłyby wynikać z większej dostępności białka G<sub>αs</sub> w CA1, co sprzyja częstszej aktywacji ścieżek sygnałowych zależnych od tego białka w tym regionie. Istnieją liczne przesłanki wskazujące, że szlak sygnałowy G<sub>αs</sub> może odgrywać kluczową rolę w aktywacji MMP-9 w odpowiedzi na stymulację 5-HT<sub>7</sub>R. W badaniach, w których wykazano aktywację MMP-9 po stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R, użyto agonisty 5-CT [Bijata i wsp., 2017]. W późniejszych badaniach wykazano, że 5-CT działa jako stroniczy agonista, preferencyjnie aktywując szlak zależny od G<sub>αs</sub>, a nie od G<sub>α12</sub> [El Khamlichi i wsp., 2022]. Ten wynik wyraźnie podkreśla potencjalne znaczenie szlaku G<sub>αs</sub> w regulacji

aktywności MMP-9 w kontekście stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R. Badania nad receptorem 5-HT<sub>4</sub>R, również związanym z G $\alpha$ <sub>s</sub>, wykazały, że jego aktywacja prowadzi do zwiększenia aktywności MMP-9 [Hashimoto i wsp., 2012]. W innych badaniach wzrost cAMP indukowany forskoliną skutkował zwiększoną aktywnością MMP-9 [Szepesi i wsp., 2013]. Mechanizm ten może być powiązany z aktywacją kinazy białkowej A (PKA) i dalszą fosforylacją ERK1/2, co z kolei stymuluje wzrost ekspresji MMP-9 [Errico i wsp., 2001; Norum i wsp., 2003]. Jednakże istnieją także prace sugerujące przeciwny efekt szlaku G $\alpha$ <sub>s</sub> na MMP-9. Badania Ernens i wsp. wskazują, że wzrost cAMP może hamować ekspresję MMP-9, co zaobserwowano na przykład w macierzy mięśnia sercowego [Ernens i wsp., 2006]. Różnice te mogą być związane z odmiennym mikrośrodowiskiem tkankowym, specyfiką różnych typów komórek lub zróżnicowaną aktywnością współdziałających ścieżek molekularnych. W związku z powyższymi przesłankami, w ramach niniejszej pracy doktorskiej podjęto próbę wyjaśnienia mechanizmu aktywacji MMP-9 w hipokampie. W grupach zwierząt, w których wyciszono ekspresję genu kodującego białko G $\alpha$ <sub>s</sub> nie zaobserwowano wzrostu aktywności MMP-9 w hipokampie po stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R agonistami LP-211 i AGH-194. Przeciwnie, w grupach, w których wyciszono ekspresję genu *Gna12* kodującego białko G $\alpha$ <sub>12</sub> oraz w grupach kontrolnych odnotowano znaczący wzrost aktywności MMP-9. Wyniki te wskazują na kluczową rolę G $\alpha$ <sub>s</sub> w inicjacji aktywności proteolitycznej MMP-9 w odpowiedzi na stymulację 5-HT<sub>7</sub>R w hipokampie. W jednej z grup kontrolnych (shRNA scramble) stymulacja 5-HT<sub>7</sub>R agonistą LP-211 nie wywołała spodziewanego wzrostu aktywności MMP-9. Wynik ten może wskazywać na potencjalny wpływ czynników biologicznych, takich jak zmienność odpowiedzi zwierząt na wirusy lub różnice w warunkach eksperymentalnych. Chociaż obserwacje te były powtarzalne, wymagają dalszych badań, aby wyjaśnić mechanizmy stojące za tymi niespodziewanymi rezultatami.

Dane literaturowe wskazują, że zwiększona aktywność MMP-9 jest związana z procesem wydłużania kolców dendrytycznych, natomiast jej blokowanie sprzyja dojrzewaniu tych struktur [Michaluk i wsp., 2011; Magnowska i wsp., 2016]. Ponadto, neurony piramidowe w podregionie CA1 charakteryzują się wyższą ekspresją genu *Gnas*, kodującego białko G $\alpha$ <sub>s</sub>, które odgrywa kluczową rolę w aktywacji MMP-9. W związku z tym podjęto badania nad poziomem aktywności tego enzymu w różnych podregionach hipokampu po stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R. Analiza biochemiczna, oparta na zymografii żelowej, wykazała znacząco podwyższoną aktywność MMP-9 zarówno w CA1, jak i w DG, gdzie

zaobserwowano zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych po stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R, w porównaniu do grupy kontrolnej. Proces dojrzewania kolców dendrytycznych, jak pokazano w badaniach Magnowskiej i wsp. (2016), jest dwustopniowy. W pierwszym etapie aktywność MMP-9 wzrasta, promując wydłużanie kolców, natomiast w drugim etapie następuje blokowanie aktywności tego enzymu przez inhibitor TIMP1, co prowadzi do stabilizacji tych struktur w procesie dojrzewania [Magnowska i wsp., 2016]. Należy mieć na uwadze, że badanie przeprowadzone metodą zymografii żelowej ma swoje ograniczenia, które mogą wpływać na interpretację wyników. Analizując aktywność MMP-9, szczególnie w podregionie DG, warto rozważyć czy jej podwyższony poziom wynika z aktywności MMP-9 w neuronach ziarnistych, czy w pozostałych komórkach obecnych w tym podregionie. DG jest podregionem o dużej heterogeniczności komórkowej, obejmującym neurony ziarniste, komórki mszyste, astrocyty i mikroglej. Uśredniona analiza aktywności enzymu w całej populacji komórek metodą zymografii żelowej może maskować potencjalny brak zmian, bądź nawet wskazywać na obniżenie aktywności MMP-9 w neuronach ziarnistych. Dodatkowo blokowanie aktywności proteolitycznej przez TIMP1 nie jest wykrywane w tej metodzie, ponieważ kompleksy MMP-9/TIMP1 ulegają rozpadowi pod wpływem działania SDS, co może prowadzić do pozornie wyższej aktywności enzymu. Zymografia wskazuje więc czy enzym uległ aktywacji *in vivo*, ale nie pozwala określić, jaka aktywność została wykazana przez tę formę w obecności TIMP1 [Woessner, 1995]. Zymografia żelowa może również ujawniać aktywność enzymatyczną proformy MMP-9, ponieważ propeptyd MMP-9 podczas elektroforezy może ulegać zmianom konformacyjnym, nadając enzymowi pewien poziom aktywności [Cauwe i Opdenakker, 2010]. Pomimo, że wyniki zymografii nie zawsze odzwierciedlają rzeczywistą aktywność enzymu w warunkach fizjologicznych, dostarczają cennych wskazówek na temat jego potencjalnej aktywności. Aby lepiej zbadać specyfikę aktywności MMP-9 w neuronach ziarnistych, należałoby zastosować bardziej zaawansowane techniki. Przykładem może być sensor aktywności MMP-9 oparty na zjawisku FRET, który umożliwia monitorowanie aktywności enzymatycznej na poziomie pojedynczych komórek, czy nawet kolców dendrytycznych, w czasie rzeczywistym [Stawarski i wsp., 2014]. Sensor ten może być skutecznie wykorzystywany do badań nad aktywnością MMP-9 zarówno w hodowlach *in vitro* oraz w tkankach mózgowych *in vivo*. Innym podejściem mogłaby być izolacja neuronów ziarnistych za pomocą sortowania komórek aktywowanego fluorescencją (FACS) i przeprowadzenie analizy biochemicznej wyłącznie w tej populacji.

Aby lepiej zrozumieć mechanizmy regulujące obserwowane zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych, szczególną uwagę zwrócono również na małe GTPazy z rodziny Rho, takie jak RhoA oraz Cdc42. Odgrywają one kluczową rolę w plastyczności strukturalnej kolców dendrytycznych w odpowiedzi na stymulację 5-HT<sub>7</sub>R. Badania przeprowadzone na liniach komórkowych NIH3T3 wykazały, że aktywacja receptora 5-HT<sub>7</sub>R inicjuje dwa odrębne procesy: formowanie filopodiów, poprzez mechanizm zależny od białka Cdc42 oraz zmianę kształtu komórek na bardziej kulisty, co jest kontrolowane przez szlak sygnałowy RhoA [Kvachnina i wsp., 2005]. Wyniki te znajdują odzwierciedlenie również w badaniach neuronów, gdzie wykazano kluczową rolę Cdc42 w generowaniu kolców filopodialnych [Bijata i wsp., 2017]. Jednocześnie aktywacja RhoA została powiązana z dojrzewaniem kolców dendrytycznych, co zaobserwowano w kontekście ścieżki sygnałowej 5-HT<sub>4</sub>R [Schill i wsp., 2020]. Te przeciwstawne efekty działania RhoA i Cdc42 sugerują, że szlaki sygnałowe Rho GTPaz pełnią istotną rolę w regulacji kształtu kolców dendrytycznych w odpowiedzi na stymulację receptorów serotoninowych, w tym 5-HT<sub>7</sub>R. W szczególności, odpowiedź na stymulację receptorów serotoninowych, takich jak 5-HT<sub>7</sub>R, wydaje się być skoordynowanym procesem, w którym oba białka uczestniczą w różnych etapach formowania i dojrzewania struktur dendrytycznych. Obserwacje te stanowiły podstawę do hipotezy, że podobne mechanizmy mogą działać w hipokampie, szczególnie w regionach CA1 i DG, gdzie dochodzi do zmian w morfologii kolców synaptycznych.

Analiza przeprowadzona z wykorzystaniem testów biochemicznych, oceniających globalną aktywność białek Cdc42 i RhoA w homogenatach uzyskanych z podregionu CA1, wykazała wzrost aktywności obu białek w odpowiedzi na stymulację 5-HT<sub>7</sub>R. Wyniki te mogą wskazywać, że proces wydłużania kolców dendrytycznych w tym obszarze jest głównie wynikiem aktywności białka Cdc42, które wspomaga polimeryzację aktyny poprzez aktywację szlaków zależnych od WASP oraz Arp2/3. Prowadzi to do powstawania nowych kolców oraz wydłużania już istniejących, co potencjalnie może przygotowywać kolce do dalszego dojrzewania [Saneyoshi i Hayashi, 2012; Penzes i Rafalovich, 2012]. Z kolei aktywacja RhoA wpływa destabilizująco na fibrylarną aktynę, prowadząc nie tylko do wspomnianego wcześniej dojrzewania, ale również do eliminacji kolców dendrytycznych [Saneyoshi i Hayashi, 2012], co może tłumaczyć spadek gęstości kolców dendrytycznych zaobserwowany w tym podregionie. Natomiast w DG, mimo że stymulacja 5-HT<sub>7</sub>R prowadziła

do dojrzewania kolców, nie odnotowano ani spodziewanego wzrostu aktywności RhoA, ani Cdc42.

Porównanie wyników uzyskanych za pomocą techniki FRET FLIM z wynikami analizy biochemicznej dostarczyło dodatkowych, interesujących wniosków. Sensor FRET FLIM, specyficzny dla neuronów dzięki promotorowi synapsynowemu, ujawnił subtelny wzrost aktywności Cdc42 w podregionie DG, który różnił się od uśrednionych wyników uzyskanych w testach biochemicznych. Wyniki te sugerują, że to zmiany aktywności Cdc42 w DG mogą być kluczowe dla zrozumienia mechanizmów molekularnych leżących u podstaw dojrzewania kolców dendrytycznych w tym podregionie hipokampu. Tak jak wspomniano powyżej, analiza biochemiczna, polegająca na izolacji aktywnych form białek wiążących GTP, mierzy globalną aktywność w homogenatach. Uzyskane wyniki testów biochemicznych mogą odzwierciedlać aktywność białek Cdc42 i RhoA również w innych typach komórek, takich jak astrocyty czy mikroglej, które są licznie obecne w hipokampie. Komórki te również mogą aktywować ścieżkę sygnałową zależną od 5-HT<sub>7</sub>R, co może potencjalnie maskować zmiany zachodzące w neuronach, będących głównym przedmiotem zainteresowania niniejszej rozprawy. Warto podkreślić, że obserwowane zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych mogą wynikać ze złożonego współdziałania różnych mechanizmów molekularnych, obejmujących zarówno bezpośrednią aktywność białek Cdc42 i RhoA w neuronach, jak i pośredni wpływ otaczających komórek takich jak astrocyty. Astrocyty, które również wykazują ekspresję 5-HT<sub>7</sub>R [Shimizu i wsp., 1996; Hirst i wsp., 1997], odgrywają istotną rolę w modulacji plastyczności synaptycznej. Przykładowo, wykazano, że stymulacja 5-HT<sub>4</sub>R prowadzi do aktywacji RhoA w astrocytach, co wpływa na funkcjonalną regulację pobudzających obwodów synaptycznych [Müller i wsp., 2021]. Istnieje również możliwość, że w podregionie CA1 hipokampu, gdzie zaobserwowano aktywację zarówno Cdc42, jak i RhoA, aktywacja tych białek może dotyczyć różnych populacji komórek, co sugeruje potencjalne komplementarne role tych populacji w regulacji morfologii kolców dendrytycznych. Nie można również pominąć, że przypisywanie RhoA wyłącznie roli w dojrzewaniu i eliminacji kolców dendrytycznych, a Cdc42 w ich wydłużaniu, stanowi duże uproszczenie. Działanie tych białek jest prawdopodobnie bardzo złożone i może obejmować dodatkowe mechanizmy regulacji przebudowy cytoszkieletu aktynowego, takie jak interakcje z innymi szlakami molekularnymi lub białkami regulatorowymi [Runge i wsp., 2020]. Badania wskazują, że małe GTPazy z rodziny Rho często współdziałają w kaskadach sygnałowych, w których ich aktywność jest

dynamicznie regulowana. Na przykład Cdc42 może aktywować Rac1, który następnie aktywuje RhoA [Nobes i Hall, 1995]. Z kolei aktywacja RhoA może być nasiloną przez Rac1 i jednocześnie hamowana przez Cdc42, podczas gdy Rac1 jest blokowany w wyniku aktywacji RhoA [Li i wsp., 2002]. Te obserwacje podkreślają dynamiczny i kontekstowy charakter tych procesów. Złożoność tych interakcji sugeruje, że efekty aktywacji 5-HT<sub>7</sub>R mogą być wynikiem współdziałania wielu GTPaz. Wykazano również, że RhoA odpowiada za inicjację wzrostu kolców dendrytycznych, tworząc fundament dla dalszej reorganizacji cytoszkieletu, podczas gdy Cdc42 stabilizuje i utrwała te zmiany morfologiczne, wspierając stabilizację nowych połączeń synaptycznych [Yasuda i Murakoshi, 2011; Murakoshi i wsp., 2011]. Takie synergistyczne działanie obu białek pozwala na precyzyjną regulację procesów plastyczności strukturalnej, co może tłumaczyć zaobserwowane różnice w odpowiedziach na stymulację 5-HT<sub>7</sub>R w różnych podregionach hipokampu.

Zarówno technika FLIM, jak i testy biochemiczne użyte w niniejszej rozprawie dostarczają istotnych informacji, ale różnią się pod względem specyficzności, zakresu analizy oraz ograniczeń. Warto zauważyć, że FLIM to bardzo zaawansowana technika obrazowania, która wyróżnia się szeregiem istotnych zalet, szczególnie w kontekście precyzyjnych pomiarów czasu życia fluorescencji. Czas życia fluorescencji jest charakterystyczny dla konkretnych fluoroforów i ich lokalnego środowiska molekularnego, co czyni FLIM niezwykle precyzyjnym narzędziem. Dzięki tej właściwości FLIM umożliwia wykrywanie subtelnych zmian aktywności białek poprzez biosensory, nawet w bardzo lokalnych obszarach komórek. Jednym z najważniejszych aspektów tej metody jest też jej niezależność od intensywności światła wzbudzającego. Dzięki temu eliminowane są artefakty wynikające z nierównomiernego rozłożenia intensywności w próbce. Dodatkowo, metoda ta jest niezależna od stężenia barwnika oraz poziomu jego wypalenia (*photobleaching*), a czas życia fluorescencji pozostaje niezależny od tych czynników, co pozwala na prowadzenie długotrwałych eksperymentów bez ryzyka utraty jakości danych. Metoda ta dostarcza ilościowych danych o wysokiej precyzji, umożliwiając wiarygodne porównania pomiędzy różnymi eksperymentami.

Technika FLIM umożliwia badanie wyłącznie komórek ekspresujących sensor, dzięki czemu możliwe jest wyeliminowanie wpływu sygnałów pochodzących z innych typów komórek obecnych w badanym obszarze. Stanowi to istotną przewagę nad metodami biochemicznymi, które dostarczają uśrednionych wyników dla całej

populacji komórek występujących w wyizolowanej tkance, co może maskować zmiany specyficzne dla wybranych typów komórek. Dodatkową zaletą zastosowania metody FLIM w opisywanych badaniach, była możliwość przeprowadzenia analizy w konkretnych skrawkach części grzbietowej hipokampu, co umożliwiło szczegółową ocenę aktywności białek Cdc42 i RhoA w podregionach tego obszaru. W przeciwieństwie do FLIM, metody biochemiczne mierzą globalną aktywność białek Cdc42 i RhoA w wyizolowanych fragmentach tkanek. Dodatkowo precyzyjna izolacja małych fragmentów tkanki, wolnych od zanieczyszczeń pochodzących z sąsiednich obszarów, stanowi istotne wyzwanie, zwłaszcza w kontekście konieczności szybkiego zamrożenia próbki w celu zachowania aktywności badanych GTPaz.

Jednakże metoda FLIM, pomimo licznych zalet, posiada również istotne ograniczenia, które ujawniają się już na etapie przygotowywania próbek. W przypadku zastosowania metod biochemicznych tkanki izolowano natychmiast po eutanazji zwierząt i przenoszono na lód w celu zachowania aktywności białek. Natomiast metoda FLIM wymaga czasochłonnej perfuzji, co mogło wpływać na aktywność RhoA i Cdc42, które charakteryzują się przejściową aktywnością. Uwzględniając również przejściowy charakter zmian morfologicznych zaobserwowany podczas badań *in vitro*, czas niezbędny do przygotowania próbek do FLIM mógł negatywnie wpływać na aktywność badanych białek oraz uzyskane wyniki. Ponadto aktywność zarówno RhoA, jak i Cdc42 może być ograniczona do określonych lokalnych obszarów, a nie występować w całym analizowanym rejonie. Ze względu na gęsto rozmieszczone komórki nerwowe oraz stosunkowo niską ekspresję sensora, analiza metodą FLIM musiała obejmować dość duży obszar, co mogło prowadzić do uśrednienia sygnału i wprowadzać dodatkowe błędy pomiarowe, ograniczając możliwość uchwycenia subtelnych zmian aktywności, zlokalizowanych na pojedynczych kolcach. Wstępne badania *in vitro* sugerowały, że silna nadekspresja zastosowanego sensora może patologicznie wpływać na strukturę komórek nerwowych, co również mogło zniekształcać uzyskane wyniki. Z tego względu zastosowano umiarkowany poziom ekspresji sensora, co miało na celu zminimalizowanie ryzyka wprowadzenia artefaktów wynikających z jego nadmiernej obecności w komórkach. Przy uwzględnieniu specyfiki i ograniczeń obu zastosowanych metod, interpretacja wyników wymaga szczególnej ostrożności, zwłaszcza w odniesieniu do różnic w aktywności GTPaz pomiędzy poszczególnymi podregionami hipokampu. Uwzględniając powyższe ograniczenia oraz złożoność procesów regulujących aktywność GTPaz, szczególnie ich dynamiczny i lokalny charakter, konieczne wydaje się

zastosowanie dodatkowych podejść badawczych, które pozwolą lepiej uchwycić subtelne zmiany czasowe i przestrzenne w badanych podregionach hipokampu. Aby pogłębić wiedzę na temat dynamiki aktywacji RhoA oraz Cdc42 w podregionach hipokampu, konieczne byłoby przeprowadzenie badań w dodatkowych punktach czasowych. Takie badania umożliwiłyby szczegółowe poznanie profilu aktywności badanych białek. Ponieważ RhoA oraz Cdc42 są związane z dynamicznymi procesami, takimi jak reorganizacja szkieletu aktynowego czy wydłużanie kolców dendrytycznych [Bijata i wsp., 2017], ich aktywność zazwyczaj ma charakter przejściowy. Dlatego wykorzystanie obrazowania przyżyciowego lub analizy w różnych punktach czasowych mogłoby uchwycić ten dynamiczny charakter zmian. Ciekawym rozwiązaniem byłoby rozszerzenie badań z wykorzystaniem FLIM na hodowle organotypowe, które pozwoliłyby odzwierciedlać dynamiczne i lokalne zmiany w przestrzeni subkomórkowej. W rezultacie umożliwiłoby to obserwowanie interakcji molekularnych w czasie rzeczywistym w żywych komórkach. Dodatkowo warto rozważyć ekspresję sensorów w innych typach komórek, takich jak astrocyty i mikroglej. Komórki te pełnią kluczowe role w regulacji funkcji synaptycznych i procesach plastyczności. Interakcje między komórkami glejowymi a neuronami mogą istotnie wpływać na dynamikę procesów związanych z reorganizacją kolców dendrytycznych, co może dostarczyć cennych informacji na temat roli receptorów 5-HT<sub>7</sub>R w regulacji tych mechanizmów.

Kolejnym istotnym zagadnieniem badanym w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej było ustalenie, czy chroniczna stymulacja 5-HT<sub>7</sub>R może indukować zmiany strukturalne w kolcach dendrytycznych i jak różnią się one od efektów wywołanych pojedynczą stymulacją. W celu oceny wpływu wielodniowej, regularnej stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R na plastyczność strukturalną, przeprowadzono eksperymenty z wykorzystaniem agonisty AGH-194. Zastosowanie tego związku, zamiast używanego wcześniej LP-211, wynikało z jego rozpuszczalności w wodzie, co pozwalało na uniknięcie potencjalnych efektów toksycznych związanych z długotrwałym stosowaniem DMSO - rozpuszczalnika LP-211. Badania przeprowadzone przez Hanslick i wsp. wykazały, że DMSO może indukować apoptozę w rozwijającym się mózgu myszy w różnych grupach wiekowych [Hanslick i wsp., 2009]. Wyniki te podkreślają ryzyko związane z przewlekłym stosowaniem tego rozpuszczalnika *in vivo*. W związku z tym wybór agonisty rozpuszczalnego w wodzie uznano za bezpieczniejszą i bardziej efektywną alternatywę w kontekście badań długoterminowych, ograniczającą wpływ rozpuszczalnika na badane struktury. Agonista AGH-194 został przetestowany zarówno

w warunkach pojedynczego podania, jak i w modelu chronicznej stymulacji. Po pojedynczym podaniu AGH-194 zaobserwowano znaczące wydłużenie kolców dendrytycznych zarówno w podregionie CA1, jak i DG. Wynik ten różnił się od efektów uzyskanych dla LP-211, gdzie zmiany morfologiczne zależały od podregionu – wydłużanie kolców w CA1 oraz dojrzewanie w DG. Wyniki te sugerują potencjalnie odmienny wpływ obu agonistów związanych z 5-HT<sub>7</sub>R na plastyczność synaptyczną oraz różnice w mechanizmach ich działania. Różnice te mogą być związane z właściwościami farmakokinetycznymi i molekularnymi obu związków. AGH-194 należy do grupy indoloimidazoli, będących selektywnymi agonistami 5-HT<sub>7</sub>R. Związki te zostały zsyntetyzowane w Zakładzie Chemii Leków Instytutu Farmakologii PAN. Choć szczegółowe dane dotyczące AGH-194 nie zostały jeszcze opublikowane, wiadomo, że związek ten wykazuje stosunkowo wysokie powinowactwo do 5-HT<sub>7</sub>R ( $K_i = 2$  nM) [Jakubowska i wsp., 2024]. AGH-192 oraz AH-494, związki strukturalnie zbliżone do AGH-194, opisano jako wysoce selektywne, charakteryzujące się wysoką stabilnością metaboliczną i niską toksycznością. Dodatkowo, związki te oraz AGH-194 są szybko wchłaniane do krwiobiegu i efektywnie przenikanie przez barierę krew - mózg oraz bardzo wysokie stężenie szczytowe w tkance mózgowej [Hogendorf i wsp., 2017; dane nieopublikowane]. W porównaniu do LP-211, AGH-194, jako znacznie mniejsza cząsteczka, może łatwiej przenikać przez barierę krew-mózg, co jest zgodne z wiedzą, iż szybkość tego procesu jest odwrotnie proporcjonalna do wielkości cząsteczek [Profaci i wsp., 2020]. W konsekwencji szybsze działanie AGH-194 na 5-HT<sub>7</sub>R w miejscu docelowym – hipokampie – może prowadzić do różnic obserwowanych w wynikach *in vivo*. Z kolei LP-211 wykazuje umiarkowaną zdolność przenikania do tkanki mózgowej (średni stosunek dystrybucji w mózgu do osocza około 0,3–0,4). Dodatkowo w trakcie metabolizmu LP-211 zachodzi proces N-dealkilacji łańcucha alifatycznego przyłączonego do azotu piperazyny, prowadząc do powstania 1-(2-difenylo)piperazyny (RA-7). RA-7 wykazuje wysokie powinowactwo do 5-HT<sub>7</sub>R, ale działa jako antagonistą tego receptora [Lacivita i wsp., 2012]. RA-7 charakteryzuje się około 10-krotnie większym powinowactwem do tego receptora ( $K_i = 1,4$  nM) w porównaniu z LP-211 ( $K_i = 15$  nM) [Hedlund i wsp., 2010]. RA-7 charakteryzuje się długotrwałym wpływem na 5-HT<sub>7</sub>R, co może modyfikować odpowiedzi receptorowe w późniejszych etapach badań.

Biorąc pod uwagę potencjalnie szybsze działanie AGH-194, różnice w obserwowanych efektach w DG mogą sugerować, że zmiany wywołane przez

AGH-194 reprezentują późniejszy etap procesu plastyczności strukturalnej zależnej od 5-HT<sub>7</sub>R, w porównaniu z efektami uzyskanymi po stymulacji LP-211. Odwołując się do wyników *in vitro*, które wskazywały na przejściowy charakter zmian morfologicznych w neuronach ziarnistych, można zauważyć, że wyniki otrzymane po 30 minutach stymulacji receptora *in vivo* za pomocą LP-211, odpowiadałyby pierwszym wynikom otrzymanym *in vitro* (po 10 minutach od stymulacji) w komórkach ziarnistych, kiedy proces dojrzewania kolców był najbardziej widoczny. Natomiast wyniki uzyskane po stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R z użyciem AGH-194 *in vivo* mogą odzwierciedlać etap rozpoczęcia procesu wysmuklania i pocieniania kolców dendrytycznych (zwiększenie stosunku długości kolca do szerokości jego główki), obserwowanego w hodowlach *in vitro* po 20 minutach od stymulacji. Jednakże aby potwierdzić te wnioski i lepiej zrozumieć dynamikę tych procesów, konieczne byłyby dalsze analizy w dodatkowych punktach czasowych, zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*, co pozwoliłoby jednoznacznie określić czasowe aspekty odpowiedzi neuronów ziarnistych na stymulację 5-HT<sub>7</sub>R.

Przy obecnym stanie wiedzy jako potencjalne źródło różnic pomiędzy efektami stymulacji agonistami 5-HT<sub>7</sub>R nie można jednak wykluczyć, że AGH-194 bądź LP-211 są stroniczymi agonistami tego receptora. Ten specyficzny rodzaj agonisty faworyzuje jedną z wielu aktywnych konformacji receptora i selektywnie aktywuje jedynie określoną ścieżkę sygnałową, mimo kilku powiązanych z danym receptorem. Przykładem może być serodolina, która wykazuje unikalny mechanizm działania jako antagonistą lub odwrotny agonista sygnalizacji białka G<sub>αs</sub>, a równocześnie zachowuje się jako agonista sygnalizacji β-arestyny oraz 5-CT, dla którego wykazano preferencyjne wiązanie z białkiem G<sub>αs</sub>, a nie z G<sub>α<sub>12</sub></sub> [El Khalimchi i wsp., 2022]. Wskazuje to na możliwość wystąpienia unikalnych profili farmakologicznych poszczególnych agonistów oraz antagonistów 5-HT<sub>7</sub>R.

Podczas przeprowadzonych badań wykazano, że choć pojedyncza stymulacja 5-HT<sub>7</sub>R prowadziła do wyraźnych zmian morfologicznych w kolcach dendrytycznych, chroniczna stymulacja 5-HT<sub>7</sub>R prowadzi do cofania się tych zmian. Taki wynik sugeruje obecność adaptacyjnych mechanizmów kompensacyjnych, które odwracają początkowe efekty stymulacji, obejmując potencjalnie zmniejszoną wrażliwość szlaków sygnałowych zależnych od 5-HT<sub>7</sub>R. Przyczyną obserwowanych różnic może być proces internalizacji lub desensytyzacji receptora. W literaturze podkreśla się, że 5-HT<sub>7</sub>R różni się pod względem mechanizmów regulacyjnych od innych receptorów sprzężonych z białkami G.

Badania Krobert i wsp. (2006) wykazały, że długotrwała ekspozycja 5-HT<sub>7</sub>R na agonistów nie prowadzi do klasycznej desensytyzacji ani regulacji w dół (ang. *down-regulation*), co jest charakterystyczne dla wielu innych receptorów sprzężonych z białkami G, takich jak 5-HT<sub>1A</sub>R. Co więcej, obserwacje wskazują, że mechanizmy desensytyzacji 5-HT<sub>7</sub>R mogą opierać się na funkcjonalnych zmianach w aktywności receptorów, bez ich degradacji czy endocytozy. Stabilność 5-HT<sub>7</sub>R w odpowiedzi na długotrwałą stymulację agonistą sugeruje, że ich regulacja różni się istotnie od innych receptorów serotoniny [Krobert i wsp., 2006]. Drugim mechanizmem mogącym wpływać na zmniejszenie wrażliwości receptorów 5-HT<sub>7</sub>R jest ich internalizacja. W badaniach przeprowadzonych przez Guthrie i wsp. (2005) wykazano, że różne izoformy 5-HT<sub>7</sub>R, powstałe w wyniku alternatywnego składowania (ang. *splicing*), różnią się zdolnością do internalizacji. Izofорма 5-HT<sub>7d</sub>R charakteryzuje się konstytutywną internalizacją w warunkach braku agonisty, co prowadzi do przewagi receptorów zlokalizowanych wewnątrz komórki. Efektem tego jest spadek zdolności izoformy 5-HT<sub>7d</sub>R do aktywacji szlaków sygnałowych. Z kolei pozostałe izoformy wykazują internalizację głównie w odpowiedzi na obecność agonisty, co ogranicza liczbę receptorów dostępnych na powierzchni błony komórkowej i w konsekwencji zmniejsza aktywność szlaków sygnałowych. Taki mechanizm może odpowiadać za adaptację 5-HT<sub>7</sub>R do przewlekłej stymulacji [Guthrie i wsp., 2005]. Możliwe jest zatem, że efekty adaptacyjne są zależne od specyficznego aktywowanego szlaku sygnałowego i związane są z internalizacją badanego receptora. W tym kontekście istotne wydaje się więc przeprowadzenie bardziej szczegółowych badań porównujących działanie różnych agonistów 5-HT<sub>7</sub>R.

Ze względu na odmienny wpływ agonistów AGH-194 i LP-211 na morfologię kolców dendrytycznych postanowiono porównać ich działanie na zachowania depresyjne u zwierząt. Badania przeprowadzone przez Bijata i wsp. wykazały, że aktywacja 5-HT<sub>7</sub>R za pomocą LP-211 prowadziła do wydłużenia czasu bezruchu w teście zawieszenia za ogon (TST) oraz obniżenia preferencji sacharozy w teście preferencji sacharozy (SPT). Co istotne, po podaniu LP-211 nie zaobserwowano zmian w aktywności lokomotorycznej, co umożliwiało precyzyjną interpretację wyników TST w kontekście działania na zachowania depresyjne. Wyniki te sugerują efekt prodepresyjny [Bijata i wsp., 2022]. Natomiast, aktywacja 5-HT<sub>7</sub>R za pomocą agonisty AGH-194, nie wywołała znaczących zmian w TST, jednak zaobserwowano istotny spadek aktywności lokomotorycznej. To działanie uspokajające lub zmniejszenie motywacji do ruchu

w przypadku AGH-194, komplikuje interpretację wyników w TST, gdyż niższa aktywność lokomotoryczna może maskować subtelne efekty behawioralne. Uwzględnienie spadku ruchliwości w teście otwartego pola oraz normalizacja czasu bezruchu w TST do poziomu aktywności motorycznej, mogłoby pozwolić lepiej ocenić rzeczywisty efekt behawioralny, który w przypadku AGH-194 może sugerować efekt przeciwdepresyjny, a nie prodepresyjny, jak w przypadku LP-211. Dodatkowo, w teście SPT zaobserwowano wzrost preferencji sacharozy po pojedynczej stymulacji receptora, co również sugeruje potencjalne działanie przeciwdepresyjne. Efekt ten był jednak przejściowy i po upływie 9 godzin od stymulacji nie był już obserwowany, co sugeruje, że zanikał w ciągu tego czasu. Podobne wyniki uzyskano po chronicznej stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R, co było zgodne z analizą morfologiczną kolców dendrytycznych po chronicznej stymulacji z użyciem AGH-194, wskazującą na cofnięcie się zmian strukturalnych widocznych po pojedynczej stymulacji tego receptora. Efekty obserwowane po zastosowaniu agonisty AGH-194 są szczególnie interesujące, ponieważ dotychczasowe badania wskazywały przede wszystkim na przeciwdepresyjne działanie antagonistów 5-HT<sub>7</sub>R [Mnie-Filali i wsp., 2006]. Wyniki te podkreślają potrzebę zrozumienia precyzyjnych szlaków sygnałowych aktywowanych przez LP-211 i AGH-194, co mogłoby dostarczyć istotnych informacji na temat molekularnych podstaw depresji oraz potencjalnych mechanizmów terapeutycznych.

W kontekście analiz zachowań depresyjnych warto przywołać badania przeprowadzone z użyciem modelu przewlekłego, nieprzewidywalnego stresu, które wykazały, że kolce dendrytyczne u myszy anhedonicznych, pod wpływem stresu ulegają silnemu wydłużaniu w podregionie CA1, podczas gdy w DG pozostają bez zmian. Wyniki te sugerują, że zmiany kształtu kolców w podregionie CA1 mogą odgrywać kluczową rolę w rozwoju objawów depresyjnych [Bijata i wsp., 2022; Bączyńska i wsp., 2024]. Jednakże wyniki niniejszej pracy dostarczają istotnej obserwacji, że samo wydłużenie kolców w podregionie CA1 nie jest wystarczające do wywołania zmian o charakterze prodepresyjnym, co wskazuje na bardziej złożony mechanizm molekularny leżący u podstaw tych zachowań. Warto również podkreślić, że zarówno w wyniku stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R z użyciem LP-211, jak i po przewlekłym stresie, zaobserwowano spadek gęstości kolców dendrytycznych w podregionach CA1 i DG [Bijata i wsp. 2022]. W przypadku stymulacji agonistą AGH-194 taki spadek nie wystąpił. Co więcej, w podregionie DG zaobserwowano jednoczesne wydłużenie kolców dendrytycznych oraz delikatny trend wskazujący na zwiększenie ich gęstości. Wyniki te mogą sugerować,

że oba procesy – wydłużanie kolców oraz wzrost ich gęstości – mogą pełnić funkcję kompensacyjną, wspierając prawidłowe funkcjonowanie neuronów w odpowiedzi na stymulację 5-HT<sub>7</sub>R agonistą AGH-194. Wydłużenie kolców dendrytycznych może wskazywać na ich większy potencjał do tworzenia nowych synaps lub na adaptację do zmieniających się warunków, takich jak stres lub zmiany aktywności neuronalnej. Jednocześnie subtelny wzrost gęstości kolców może świadczyć o aktywacji procesów synaptogenezy lub stabilizacji połączeń synaptycznych, co potencjalnie może przeciwdziałać negatywnym skutkom utraty kolców, obserwowanym po stymulacji innymi agonistami, takimi jak LP-211. Zjawisko to można interpretować jako współistniejąca adaptacja morfologiczna, w której wydłużenie i zwiększenie liczby kolców dendrytycznych wzajemnie się uzupełniają, tworząc efektywny mechanizm kompensacyjny. Zrozumienie tego dualnego procesu może dostarczyć cennych informacji na temat plastyczności synaptycznej w DG oraz jej roli w rozwoju i potencjalnym leczeniu zaburzeń depresyjnych. Różnica ta wydaje się szczególnie istotna w kontekście odmiennych efektów behawioralnych wywoływanych przez obu agonistów, co podkreśla ich zróżnicowane działanie, szczególnie w badaniach nad zachowaniami depresyjnymi.

W przyszłości interesującym kierunkiem badań byłoby szczegółowe zbadanie mechanizmów działania LP-211 i AGH-194, ich preferencji wobec określonych szlaków sygnałowych oraz potencjalnych interakcji z innymi receptorami. Zrozumienie różnic w specyfice działania obu agonistów mogłoby pomóc w identyfikacji preferencyjnych szlaków i umożliwić celowane terapie zaburzeń neurologicznych, takich jak depresja, stany lękowe czy deficyty poznawcze wynikające z nieprawidłowej plastyczności synaptycznej. Dodatkowo badania nad zależnościami między strukturą chemiczną agonistów a ich stronniczością wobec różnych konformacji 5-HT<sub>7</sub>R, mogą przyczynić się do rozwoju bardziej precyzyjnych strategii terapeutycznych, które minimalizowałyby skutki uboczne, a jednocześnie maksymalizowałyby skuteczność leczenia.

## 6. Podsumowanie i wnioski

Podsumowując wyniki otrzymane na potrzeby poniższej rozprawy doktorskiej, aktywacja 5-HT<sub>7</sub>R odgrywa kluczową rolę w modulowaniu plastyczności strukturalnej w hipokampie. Przeprowadzone badania pozwoliły na głębsze zrozumienie wpływu aktywacji 5-HT<sub>7</sub>R na zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych, aktywność kluczowych białek zaangażowanych w reorganizację cytoszkieletu oraz zachowania zwierząt. Uzyskane wyniki dostarczyły nowych danych na temat molekularnych mechanizmów związanych z regulacją plastyczności synaptycznej. Główne wnioski z pracy to:

- **Zmiany morfologiczne:** Jednorazowa stymulacja 5-HT<sub>7</sub>R powoduje wydłużanie kolców neuronów piramidowych w CA1 oraz dojrzewanie lub wydłużanie kolców neuronów ziarnistych w DG, zależnie od zastosowanego agonisty. Chroniczna stymulacja nie wpływa istotnie na morfologię ani gęstość kolców dendrytycznych.
- **Aktywność MMP-9:** Aktywacja 5-HT<sub>7</sub>R indukuje wzrost aktywności MMP-9, zależny od obecności białka Gα<sub>s</sub>. Analiza aktywności MMP-9 w podregionach hipokampu (CA1 i DG) wykazała, że stymulacja 5-HT<sub>7</sub>R wywołuje porównywalny wzrost aktywności tego enzymu w obu badanych podregionach, bez istotnych różnic między nimi.
- **Aktywność małych Rho GTPaz:** Wyniki stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R różniły się w zależności od zastosowanej metody w obu podregionach hipokampu. W badaniach biochemicznych aktywacja 5-HT<sub>7</sub>R zwiększała aktywność Cdc42 i RhoA w CA1, co korelowało z obserwowanymi zmianami morfologicznymi w tym podregionie. Natomiast obrazowanie FLIM nie wykazało zmian w aktywności tych białek w CA1. W DG metody biochemiczne nie ujawniły zmian aktywności Rho GTPaz, podczas gdy obrazowanie FLIM wskazało na wzrost aktywności Cdc42.

- **Behawior:** Stymulacja 5-HT<sub>7</sub>R z użyciem AGH-194 wpływa na aktywność lokomotoryczną zwierząt, ale nie wywołuje zmian w zachowaniach depresyjno-podobnych.
- **Różnice między agonistami:** Agoniści LP-211 i AGH-194 różnią się mechanizmem działania, co prawdopodobnie wynika z ich odmiennych właściwości farmakologicznych i metabolizmu.

## 7. Bibliografia

1. Abbas AI, Hedlund PB, Huang XP, Tran TB, Meltzer HY, Roth BL. (2009) Amisulpride is a potent 5-HT<sub>7</sub> antagonist: relevance for antidepressant actions in vivo. *Psychopharmacology*. 205(1):119-28.
2. Altman J, Bayer SA. (1990) Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *The Journal of Comparative Neurology*. 301(3):365-381.
3. Angers S, Salahpour A, Bouvier M. (2002) Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. *Annu Rev of Pharmacol Toxicol*. 42, 409–435.
4. Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci*. 22(5):208-15.
5. Arellano JI, Benavides-Piccione R, Defelipe J, Yuste R. (2007) Ultrastructure of dendritic spines: correlation between synaptic and spine morphologies. *Front Neurosci*. 15;1(1):131-43.
6. Bączyńska E, Pels KK, Basu S, Włodarczyk J, Ruszczycki B. (2021) Quantification of Dendritic Spines Remodeling under Physiological Stimuli and in Pathological Conditions. *Int J Mol Sci*. 22(8):4053.
7. Bandtlow CE, Zimmermann DR. (2000) Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiol Rev*. 80(4):1267-90.
8. Bannerman DM, Rawlins JN, McHugh SB, Deacon RM, Yee BK, Bast T, Zhang WN, Pothuizen HH, Feldon J. (2004) Regional dissociations within the hippocampus—memory and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*. 28:273–283.
9. Bannister NJ, Larkman AU. (1995) Dendritic morphology of CA1 pyramidal neurones from the rat hippocampus: I. Branching patterns. *J. Comp. Neurol*. 360, 150–160.
10. Bard JA, Zgombick J, Adham N, Vaysse P, Branchek TA, Weinshank RL. (1993) Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT<sub>7</sub>) positively linked to adenylate cyclase. *J Biol Chem* 268:23422-23426.
11. Barnes NM, Sharp T. (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*. 38, 1083–1152.
12. Benavides-Piccione R, Regalado-Reyes M, Fernaud-Espinosa I, Kastanauskaite A, Tapia-González S, León-Espinosa G, Rojo C, Insausti R, Segev I, DeFelipe J. Differential Structure of Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons in the Human and Mouse. (2020) *Cereb Cortex*. 21;30(2):730-752.

13. Berardi N, Pizzorusso T, Maffei L. (2000) Critical periods during sensory development. *Curr Opin Neurobiol.* 10(1):138-45.
14. Berger M, Gray JA, Roth BL. (2009). *The expanded biology of serotonin.* *Annu Rev. Med* 60, 355–366.
15. Bhattacharya SK, Mohan Rao PJ, Sen AP. (1995) Anxiogenic activity of intraventricularly administered bradykinin in rats. *J Psychopharmacol.* 9:348-354.
16. Bi GQ, Poo MM. (1998) Synaptic modifications in cultured hippocampal neurons: dependence on spike timing, synaptic strength, and postsynaptic cell type. *J Neurosci.* 15;18(24):10464-72.
17. Bianchi-Smiraglia A, Wolff DW, Marston DJ, Deng Z, Han Z, Moparthy S, Wombacher RM, Mussell AL, Shen S, Chen J, Yun DH, O'Brien Cox A, Furdui CM, Hurley E, Feltri ML, QU J, Hollis T, Kengne JBN, Fongang B, Sousa RJ, Kandel ME, Kandel ES, Hahn KM, Nikiforov MA. (2001) Regulation of local GTP availability controls RAC1 activity and cell invasion. *Nat Commun.* 12, 6091.
18. Bijata M, Bączyńska E, Muller FE, Bijata K, Masternak J, Krzystyniak A, Szewczyk B, Siwiec M, Antoniuk S, Roszkowska M, Figiel I, Magnowska M, Olszynski KH, Wardak AD, Hogendorf A, Ruszczycki B, Gorinski N, Labus J, Stepień T, Tarka S, Bojarski AJ, Tokarski K, Filipkowski RK, Ponimaskin E, Włodarczyk J. (2022) Activation of the 5-HT<sub>7</sub> receptor and MMP-9 signaling module in the hippocampal CA1 region is necessary for the development of depressive-like behavior. *Cell Reports.* 15;38(11):110532.
19. Bijata M, Labus J, Guseva D, Stawarski M, Butzlaff M, Dzwonek J, Schneeberg J, Böhm K, Michaluk P, Rusakov DA, Dityatev A, Wilczyński G, Włodarczyk J, Ponimarskin E. (2017) Synaptic remodeling depends of signaling between serotonin receptors and the extracellular matrix. *Cell Reports.* 19( 9): 1767 – 1782.
20. Blackstad T. (1963) Ultrastructural studies on the hippocampal region. *Prog. Brain Res.* 3: 122–148.
21. Bliss TV, 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.
22. Bonaventure P, Kelly L, Aluisio L, Shelton J, Lord B, Galici R, Miller K, Atack J, Lovenberg TW, Dugovic C. (2007) Selective blockade of 5-hydroxytryptamine (5-HT)<sub>7</sub> receptors enhances 5-HT transmission, antidepressant-like behavior, and rapid eye movement sleep suppression induced by citalopram in rodents. *J Pharmacol Exp Ther.* 321(2):690–8.

23. Booker SA, Vida I. (2018) Morphological diversity and connectivity of hippocampal interneurons. *Cell Tissue Res.* 373(3):619-641. Erratum in: *Cell Tissue Res.* 2019. 376(3):485-486.
24. Bourne J, Harris KM. (2007) Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr Opin Neurobiol.* 17:381-386.
25. Bourne JN, Harris KM. (2008) Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu Rev Neurosci.* 31:47-67.
26. Cauwe B, Opdenakker G. (2010) Intracellular substrate cleavage: a novel dimension in the biochemistry, biology and pathology of matrix metalloproteinases. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 45(5):351-423.
27. Cembrowski MS, Spruston N. (2019) Heterogeneity within classical cell types is the rule: lessons from hippocampal pyramidal neurons. *Nat Rev Neurosci.* 20(4):193-204.
28. Chan SWY, Harmer CJ, Norbury R, O'Sullivan U, Goodwin GM, Portella MJ. Hippocampal volume in vulnerability and resilience to depression, (2016) *Journal of Affective Disorders.* Vol. 189, pp. 199–202.
29. Chapin EM, Andrade R. (2001) A 5-HT(7) receptor-mediated depolarization in the antero-dorsal thalamus. I. Pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther.* 297:395-402.
30. Chidambaram SB, Rathipriya AG, Bolla SR, Bhat A, Ray B, Mahalakshmi AM, Manivasagam T, Thenmozhi AJ, Essa MM, Guillemin GJ, Chandra R, Sakharkar MK. (2019) Dendritic spines: Revisiting the physiological role. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 8;92:161-193.
31. Churchyard A, Lees AJ. (1997) The relationship between dementia and direct involvement of the hippocampus and amygdala in Parkinson's disease. *Neurology.* 49: 1570-6.
32. Cifariello A, Pompili A, Gasbarri A. (2008) 5-HT(7) receptors in the modulation of cognitive processes. *Behav Brain Res.* 195, 171–179.
33. Ciranna L, Catania MV. (2014) 5-HT7 receptors as modulators of neuronal excitability, synaptic transmission and plasticity: physiological role and possible implications in autism spectrum disorders. *Front Cell Neurosci.* 27;8:250.
34. Chung WS, Allen NJ, Eroglu C. Astrocytes Control Synapse Formation, Function, and Elimination. (2015) *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 6;7(9):a020370.
35. Dahlström A, Fuxe K. (1964) Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia.* 20 (7), 398–399.

36. DeFelipe J, Farinas I. (1992) The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog. Neurobiol.* 39, 563–607.
37. Dickson DW, Ruan D, Crystal H, Mark MH, Davies P, Kress Y, Yen SH. Hippocampal degeneration differentiates diffuse Lewy body disease (DLBD) from Alzheimer's disease: light and electron microscopic immunocytochemistry of CA2-3 neurites specific to DLBD. *Neurology.* 41: 1402-9.
38. Dickson DW, Schmidt ML, Lee VM, Zhao ML, Yen SH, Trojanowski JQ. (1994) Immunoreactivity profile of hippocampal CA2/3 neurites in diffuse Lewy body disease. *Acta Neuropathol* 87: 269-76.
39. Diekelmann S., Born, J. (2010) The memory function of sleep. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 114–126.
40. Dityatev A, Frischknecht R, Seidenbecher CI. (2006) Extracellular matrix and synaptic functions. *Results Probl Cell Differ.* 43:69-97.
41. Dityatev A, Rusakov DA. (2011) Molecular signals of plasticity at the tetrapartite synapse. *Curr Opin Neurobiol.* 21(2):353-9.
42. Dityatev A, Schachner M. (2003) Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci.* 4(6):456-68.
43. Diviani D, Soderling J, Scott JD. (2001) AKAP-Lbc anchors protein kinase A and nucleates Galpha 12-selective Rho-mediated stress fiber formation. *J Biol Chem.* 23;276(47):44247-57.
44. Dutton AC, Massoura AN, Dover TJ, Andrews NA, Barnes NM. (2008) Identification and functional significance of N-glycosylation of the 5-HT<sub>5A</sub> receptor. *Neurochem Int.* 52:419–425.
45. Duvernoy H. (2005) The Human Hippocampus. Functional Anatomy, Vascularization and Serial Sections with MRI. *Springer.* Wyd. 3, Berlin.
46. Eichenbaum H, Cohen NJ. (2004) From Conditioning to Conscious Recollection: Memory Systems of the Brain. *Oxford University Press.*
47. El Khamlichi C, Reverchon F, Hervouet-Coste N, Robin E, Chopin N, Deau E, Madouri F, Guimpied C, Colas C, Menuet A, Inoue A, Bojarski AJ, Guillaumet G, Suzenet F, Reiter E, Morisset-Lopez S. (2022) Serodolin, a  $\beta$ -arrestin-biased ligand of 5-HT<sub>7</sub> receptor, attenuates pain-related behaviors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 119 (21), e2118847119.
48. Engert F, Bonhoeffer T. (1999) Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature.* 6;399(6731):66-70.

49. Ernens I, Rouy D, Velot E, Devaux Y, Wagner DR. (2006) Adenosine inhibits matrix metalloproteinase-9 secretion by neutrophils: implication of A2a receptor and cAMP/PKA/Ca<sup>2+</sup> pathway. *Circ Res.* 15;99(6):590-7.
50. Errico M, Crozier RA, Plummer MR, Cowen DS. (2001) 5-HT(7) receptors activate the mitogen activated protein kinase extracellular signal related kinase in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience.* 102:361-367.
51. Ferguson SS. (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev.* 53:1-24.
52. Fiala JC, Spacek J, Harris KM. (2002) Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? *Brain Res Brain Res Rev.*39(1):29-54.
53. Figiel I, Kaczmarek L. (1997) Cellular and molecular correlates of glutamate-evoked neuronal programmed cell death in the in vitro cultures of rat hippocampal dentate gyrus. *Neurochem Int.* 31(2):229-40.
54. Figiel I, Kruk PK, Zaręba-Kozioł M, Rybak P, Bijata M, Włodarczyk J, Dzwonek J. (2021) MMP-9 Signaling Pathways That Engage Rho GTPases in Brain Plasticity. *Cells.* 10(1):166
55. Fitch JM, Juraska JM, Washington LW. (1989) The dendritic morphology of pyramidal neurons in the rat hippocampal CA3 area. I. *Cell types. Brain Res.* 6;479(1):105-14.
56. Foo H, Mak E, ChandervRJ, Ng A, Au WL, Sitoh YY, Tan LCS, Kandiah N. (2017) Associations of hippocampal subfields in the progression of cognitive decline related to Parkinson's disease. *Neuroimage Clin.* 14: 37-42.
57. Freedman NJ, Lefkowitz RJ. (1996) Desensitization of G protein-coupled receptors. *Recent Prog Horm Res.* 51:319-351.
58. Fukuyama K, Motomura E, Okada M. (2023) Therapeutic Potential and Limitation of Serotonin Type 7 Receptor Modulation. *International Journal of Molecular Sciences.* 24(3):2070.
59. Fukuyama K, Motomura E, Shiroyama T, Okada M. (2022) Impact of 5-HT7 receptor inverse agonism of lurasidone on monoaminergic tripartite synaptic transmission and pathophysiology of lower risk of weight gain. *Biomed Pharmacother.* 148:112750.
60. Gasbarri A, Cifariello A, Pompili A, Meneses A. (2008) Effect of 5-HT(7) antagonist SB-269970 in the modulation of working and reference memory in the rat. *Behav Brain Res.* 195(1): 164–70.
61. Gehret AU, Hinkle PM. (2010) Importance of regions outside the cytoplasmic tail of G-protein-coupled receptors for phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem J.* 428:235-245.

62. Gellynck E, Heyninck K, Andressen KW, Haegeman G, Levy FO, Vanhoenacker P, Van Craenenbroeck K. (2013) The serotonin 5-HT7 receptors: two decades of research. *Exp Brain Res.* 230, 555–568.
63. George SR, O'Dowd BF, Lee SP. (2002) G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 1(10): p. 808-20.
64. Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E. (1997) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci.* 1;17(7):2492-8.
65. Graupner M, Brunel N. (2012) Calcium-based plasticity model explains sensitivity of synaptic changes to spike pattern, rate, and dendritic location. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 6;109(10):3991-6.
66. Grutzendler, J., Kasthuri, N., Gan, W.-B. (2002). Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. *Nature*, 420(6917), 812–816.
67. Guseva D, Wirth A, Ponimaskin E. (2014) Cellular mechanisms of the 5-HT7 receptor-mediated signaling. *Front Behav Neurosci.* 8:306.
68. Gustafson EL, Durkin MM, Bard JA, Zgombick J, Branchek TA. (1996) A receptor autoradiographic and in situ hybridization analysis of the distribution of the 5-ht7 receptor in rat brain. *Br J Pharmacol.* 117(4):657-66.
69. Guthrie CR, Murray AT, Franklin AA, Hamblin MW. (2005) Differential agonist-mediated internalization of the human 5-hydroxytryptamine 7 receptor isoforms. *J Pharmacol Exp Ther.* 313:1003-1010.
70. Hall A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science.* 279(5350): 509-514.
71. Hanin G, Shenhar-Tsarfaty S, Yayon N, Yau YH, Bennett ER, Sklan EH, Rao DC, Ran-kinen T, Bouchard C, Geifman-Shochat S, Shifman S, Greenberg DS, Soreq H. (2014) Competing targets of microRNA-608 affect anxiety and hypertension. *Hum Mol Genet.* 23:4569-4580.
72. Hanslick JL, Lau K, Noguchi KK, Olney JW, Zorumski CF, Mennerick S, Farber NB. (2009) Dimethyl sulfoxide (DMSO) produces widespread apoptosis in the developing central nervous system. *Neurobiol Dis.* 34(1):1-10.
73. Hao F, Behnisch T. (2023) The Enigmatic CA2: Exploring the Understudied Region of the Hippocampus and Its Involvement in Parkinson's Disease. *Biomedicines.* 11(7):1996.
74. Harris KM, Jensen FE, Tsao B. (1992) Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages:

implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J Neurosci.* 12:2685-2705.

75. Harris KM, Kater SB. (1994) Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu Rev Neurosci.* 17:341-71.
76. Harris KM, Stevens JK. (1989) Dendritic spines of CA1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J Neurosci.* 9:2982-2997.
77. Harris KM, Weinberg RJ. (2012) Ultrastructure of synapses in the mammalian brain. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1;4(5):a005587.
78. Hashimoto G, Sakurai M, Teich AF, Saeed F, Aziz F, Arancio O. (2012) 5-HT<sub>4</sub> receptor stimulation leads to soluble A $\beta$ PP $\alpha$  production through MMP-9 upregulation. *J Alzheimers Dis.* 32(2):437-45.
79. Heasman SJ, Ridley AJ. (2008) Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:690-701.
80. Hedlund PB. (2009) The 5-HT<sub>7</sub> receptor and disorders of the nervous system: an overview. *Psychopharmacology (Berl).* 206, 345–354.
81. Hedlund PB, Huitron-Resendiz S, Henriksen SJ, Sutcliffe JG. 5-HT<sub>7</sub> receptor inhibition and inactivation induce antidepressant like behavior and sleep pattern. *Biol Psychiatry.* 2005;58(10): 831–7.
82. Hedlund PB, Leopoldo M, Caccia S, Sarkisyan G, Fracasso C, Martelli G, Lacivita E, Berardi F, Perrone R. (2010) LP-211 is a brain penetrant selective agonist for the serotonin 5-HT<sub>7</sub> receptor. *Neuroscience Letters.* 481(1), 12–16.
83. Hedrick NG, Yasuda R. (2017) Regulation of Rho GTPase proteins during spine structural plasticity for the control of local dendritic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology.* 45: 193-201.
84. Heidmann DE, Szot P, Kohen R, Hamblin MW. (1998) Function and distribution of three rat 5-hydroxytryptamine<sub>7</sub> (5-HT<sub>7</sub>) receptor isoforms produced by alternative splicing. *Neuropharmacology.* 37 (12), 1621–1632.
85. Hering H, Sheng M. (2001) Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nat Rev Neurosci.* 2:880-888.
86. Hiley E, McMullan R, Nurrish SJ. (2006) The Galphal2-RGS RhoGEF-RhoA signalling pathway regulates neurotransmitter release in *C. elegans*. *EMBO J.* 25, 5884–5895.
87. Hill CS, Wynne J, Treisman R. (1995) The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell.* 81:1159-1170.

88. Hirst WD, Price GW, Rattray M, Wilkin GP. (1997) Identification of 5-hydroxytryptamine receptors positively coupled to adenylyl cyclase in rat cultured astrocytes. *Br J Pharmacol.* 120(3):509-15.
89. Hlushchenko, I., Koskinen, M., Hotulainen, P. (2016). Dendritic spine actin dynamics in neuronal maturation and synaptic plasticity. *Cytoskeleton.* 73 (9), 435–441.
90. Hogendorf AS, Hogendorf A, Kurczab R, Satała G, Lenda T, Walczak M, Latacz G, Handzlik J, Kieć-Kononowicz K, Wierońska JM, Woźniak M, Cieślik P, Bugno R, Staroń J, Bojarski AJ. (2017) Low-basicity 5-HT<sub>7</sub> Receptor Agonists Synthesized Using the van Leusen Multicomponent Protocol. *Sci Rep.* 4;7(1):1444.
91. Holtmaat AJ, Trachtenberg JT, Wilbrecht L, Shepherd GM, Zhang X, Knott GW, Svoboda K. (2005) Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo. *Neuron.* 20;45(2):279-91.
92. Holtmaat A, Svoboda K. (2009) Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat Rev Neurosci.* 10(9):647-58.
93. Horisawa T, Ishiyama T, Ono M, Ishibash, T, Taiji M. (2013) Binding of lurasidone, a novel antipsychotic, to rat 5-HT<sub>7</sub> receptor: analysis by [<sup>3</sup>H]SB-269970 autoradiography. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 40, 132–137.
94. Horn F, Bettler E, Oliveira L, Campagne F, Cohen FE, Vriend G. (2003) GPCRDB information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic Acids Res.* 1;31(1):294-7.
95. Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. (2002) Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior.* 71 (4), 533–554.
96. Ide M, Lewis DA. (2010) Altered cortical CDC42 signaling pathways in schizophrenia: implications for dendritic spine deficits. *Biol Psychiatry.* 68:25-32.
97. Ito M, Kato M, Kawabata M. (1998) Premature bifurcation of the apical dendritic trunk of vibrissa-responding pyramidal neurones of X-irradiated rat neocortex. *J. Physiol.* 512, 543–553.
98. Jacobs BL, Van Praag H, Gage FH. (2000) Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression, *Molecular Psychiatry.* Vol. 5, no. 3, pp. 262–269.
99. Jaffe AB, Hall A. (2005) Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21:247-269.
100. Jakubowska K, Hogendorf AS, Gołda S, Jantas D. (2024) Neuroprotective and Neurite Outgrowth Stimulating Effects of New Low-Basicity 5-HT<sub>7</sub> Receptor

Agonists: In Vitro Study in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Neurochem Res.* 49(8):2179-2196.

101. Jasińska M, Siucińska E, Głazewski S, Pyza E, Kossut M. (2006) Characterization and plasticity of the double synapse spines in the barrel cortex of the mouse. *Acta Neurobiol Exp.* 66:99-104.
102. Johnson-Farley NN, Kertesy SB, Dubyak GR, Cowen DS. (2005) Enhanced activation of Akt and extracellular-regulated kinase pathways by simultaneous occupancy of Gq-coupled 5-HT<sub>2A</sub> receptors and Gs-coupled 5-HT<sub>7A</sub> receptors in PC12 cells. *J Neurochem.* 92:72-82.
103. Jontes JD, Smith SJ. (2000). Filopodia, spines, and the generation of synaptic diversity. *Neuron.* 27 (1), 11–14.
104. Kasai H, Matsuzaki M, Noguchi J, Yasumatsu N, Nakahara H. (2003) Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci.* 26:360-368.
105. Kayser MS, Nolt MJ, Dalva MB. (2008) EphB receptors couple dendritic filopodia motility to synapse formation. *Neuron.* 59:56-69.
106. Kim JH, Michiko N, Choi IS, Kim Y, Jeong JY, Lee MG, Jang IS, Suk K. (2024) Aberrant activation of hippocampal astrocytes causes neuroinflammation and cognitive decline in mice. *PLoS Biol.* 11;22(7):e3002687.
107. Kjelstrup KG, Tuvnes FA, Steffenach HA, Murison R, Moser EI, Moser MB. (2002) Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:10825– 10830.
108. Knowles WD. (1992) Normal anatomy and neurophysiology of the hippocampal formation. *J. Clin. Neurophysiol.* 9, 252–263.
109. Kobe F, Guseva D, Jensen TP, Wirth A, Renner U, Hess D, Müller M, Medrihan L, Zhang W, Zhang M, Braun K, Westerholz S, Herzog A, Radyushkin K, El-Kordi A, Ehrenreich H, Richter DW, Rusakov DA, Ponimaskin E. (2012) 5-HT<sub>7R</sub>/G12 signaling regulates neuronal morphology and function in an age-dependent manner. *J Neurosci* 32:2915-2930.
110. Kobe F, Renner U, Woehler A, Wlodarczyk J, Papusheva E, Bao G, Zeug A, Richter DW, Neher E, Ponimaskin E. (2008) Stimulation- and palmitoylation-dependent changes in oligomeric conformation of serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Biochim Biophys Acta.* 1783:1503-1516.
111. Kobilka BK. (2007) G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim Biophys Acta.* 1768, 794–807.
112. Konorski J. (1948) Conditioned reflexes and neuron organization. *Cambridge University Press.*

113. Krey JF, Paşca SP, Shcheglovitov A, Yazawa M, Schwemberger R, Rasmusson R, Dolmetsch RE. (2013) Timothy syndrome is associated with activity-dependent dendritic retraction in rodent and human neurons. *Nat Neurosci.* 16:201-209.
114. Krobert KA, Andressen KW, Levy FO. (2006) Heterologous desensitization is evoked by both agonist and antagonist stimulation of the human 5-HT<sub>7</sub> serotonin receptor. *Eur J Pharmacol.* 532, 1–10.
115. Krobert KA, Bach T, Syversveen T, Kvingedal AM, Levy FO. (2001) The cloned human 5 HT<sub>7</sub> receptor splice variants: a comparative characterization of their pharmacology, function and distribution. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 363:620-632.
116. Kroeze WK, Roth BL. (1998) The molecular biology of serotonin receptors: therapeutic implications for the interface of mood and psychosis. *Biol Psychiatry.* 44:1128-1142.
117. Krupnick JG, Benovic JL. (1998) The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 38:289-319.
118. Kvachnina E, Dumuis A, Wlodarczyk J, Renner U, Cochet M, Richter DW, Ponimaskin E. (2009) Constitutive G<sub>s</sub>-mediated, but not G<sub>12</sub>-mediated, activity of the 5 hydroxytryptamine 5-HT<sub>7</sub>(a) receptor is modulated by the palmitoylation of its C-terminal domain. *Biochim Biophys Acta.* 1793:1646-1655.
119. Kvachnina E, Liu G, Dityatev A, Renner U, Dumuis A, Richter DW, Dityateva G, Schachner M, Voyno-Yasenetskaya TA, Ponimaskin EG. (2005) 5-HT<sub>7</sub> receptor is co-upled to G alpha subunits of heterotrimeric G<sub>12</sub>-protein to regulate gene transcription and neuronal morphology. *J Neurosci* 25:7821-7830.
120. Laatsch RH, Cowan WM. (1966) Electron microscopic studies of the dentate gyrus of the rat. I. Normal structure with special reference to synaptic organization. *J. Comp. Neurol.* 128: 359–396.
121. Lacivita E, Patarnello D, Stroth N, Caroli A, Niso M, Contino M, De Giorgio P, Di Pilato P, Colabufo NA, Berardi F, Perrone R Svenningsson P, Hedlund PB, Leopoldo M. (2012) Investigations on the 1-(2-Biphenyl)piperazine Motif: Identification of New Potent and Selective Ligands for the Serotonin<sub>7</sub> (5-HT<sub>7</sub>) Receptor with Agonist or Antagonist Action in Vitro or ex Vivo. *Journal of Medicinal Chemistry.* 55 (14), 6375-6380.
122. Leopoldo M, Lacivita E, Berardi F, Perrone R, Hedlund PB. (2011) Serotonin 5-HT<sub>7</sub> receptor agents: structure-activity relationships and potential therapeutic applications in central nervous system disorders. *Pharmacol Ther.* 129, 120–148.

123. Lesch KP, Waider J. (2012) Serotonin in the Modulation of Neural Plasticity and Networks: Implications for Neurodevelopmental Disorders. *Neuron*. 76 (1), 175–191.
124. Li Z, Aizenman CD, Cline HT. (2002) Regulation of rho GTPases by crosstalk and neuronal activity in vivo. *Neuron*. 28;33(5):741-50.
125. Lin GN, Corominas R, Lemmens I, Yang X, Tavernier J, Hill DE, Vidal M, Sebat J, Iakoucheva LM. (2015) Spatiotemporal 16p11.2 protein network implicates cortical late midfetal brain development and KCTD13-Cul3-RhoA pathway in psychiatric diseases. *Neuron*. 85:742-754.
126. Lin SL, Johnson-Farley NN, Lubinsky DR, Cowen DS. (2003) Coupling of neuronal 5-HT7 receptors to activation of extracellular-regulated kinase through a protein kinase A-independent pathway that can utilize Epac. *J Neurochem*. 87:1076-1085.
127. Linseman DA, Loucks FA. (2008) Diverse roles of Rho family GTPases in neuronal development, survival, and death. *Front Biosci*. 13:657-676.
128. Liu H, Irving HR, Coupar IM. (2001) Expression patterns of 5-HT7 receptor isoforms in the rat digestive tract. *Life Sci*. 69:2467-2475.
129. Liu J, Jordan LM. (2005) Stimulation of the parapyramidal region of the neonatal rat brain stem produces locomotor-like activity involving spinal 5-HT7 and 5-HT2A receptors. *J Neurophysiol*. 94, 1392–1404.
130. Lorente de No' R. (1934) Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *J. Psychol. Neurol. Lpz.* 46: 113–177.
131. Lovenberg TW, Baron BM, de Lecea L, Miller JD, Prosser RA, Rea MA, Foye PE, Racke M, Slone AL, Siegel BW, Danielson PE, Sutcliffe JG, Erlander MG. (1993) A novel adenylyl cyclase-activating serotonin receptor (5-HT7) implicated in the regulation of mammalian circadian rhythms. *Neuron* 11:449-458.
132. Lubbers K, Frotscher, M. (1987) Fine structure and synaptic connections of identified neurons in the rat fascia dentata. *Anat. Embryol.* (Berl.) 177: 1–14.
133. Ma QL, Yang F, Calon F, Ubeda OJ, Hansen JE, Weisbart RH, Beech W, Frautschy SA, Cole GM. (2008) p21-activated kinase-aberrant activation and translocation in Alzheimer disease pathogenesis. *J Biol Chem*. 283:14132-14143.
134. Magee JC, Johnston D. (1997) A synaptically controlled, associative signal for Hebbian plasticity in hippocampal neurons. *Science*. 10;275(5297):209-13.

135. Magnowska M, Gorkiewicz T, Suska A, Wawrzyniak M, Rutkowska-Włodarczyk I, Kaczmarek L, Włodarczyk J. Transient ECM protease activity promotes synaptic plasticity. (2016) *Sci Rep.* 10;6:27757.
136. Martin BS, Huntsman MM. (2012) Pathological plasticity in fragile X syndrome. *Neural Plast.* 2012:275630.
137. Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GC, Kasai H. (2004) Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature.* 429:761-766.
138. Matsuzaki M, Ellis-Davies GC, Nemoto T, Miyashita Y, Iino M, Kasai H. (2001) Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nature Neuroscience.* 4 (11), 1086–1092.
139. Mayford M, Siegelbaum SA, Kandel ER. (2012) Synapses and memory storage. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1;4(6):a005751.
140. McCorvy JD, Roth BL. (2015) Structure and function of serotonin G protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther.* 150:129-142.
141. Michaluk P, Wawrzyniak M, Alot P, Szczot M, Wyrembek P, Mercik K, Medvedev N, Wilczek E, De Roo M, Zuschratter W, Muller D, Wilczynski GM, Mozrzymas JW, Stewart MG, Kaczmarek L, Włodarczyk J. (2011) Influence of matrix metalloproteinase MMP-9 on dendritic spine morphology. *J Cell Sci.* 124:3369-3380.
142. Millan MJ, Marin P, Bockaert J, Mannoury la Cour C. (2008) Signaling at G-protein-coupled serotonin receptors: recent advances and future research directions. *Trends Pharmacol Sci.* 29:454-464.
143. Mnie-Filali O, Lambás-Señas L, Zimmer L, Haddjeri N. (2007) 5-HT7 receptor antagonists as a new class of antidepressants. *Drug News Perspect.* 20(10):613-8.
144. Monti JM, Jantos H. Effects of the 5-HT(7) receptor antagonist SB-269970 microinjected into the dorsal raphe nucleus on REM sleep in the rat. (2006) *Behav Brain Res.* 28;167(2):245-50.
145. Müller FE, Schade SK, Cherkas V, Stopper L, Breithausen B, Minge D, Varbanov H, Wahl-Schott C, Antoniuk S, Domingos C, Compan V, Kirchhoff F, Henneberger C, Ponimaskin E, Zeug A. (2021) Serotonin receptor 4 regulates hippocampal astrocyte morphology and function. *Glia.* 69(4):872-889.
146. Murakoshi H, Wang H, Yasuda R. (2011). Local, persistent activation of Rho GTPases during plasticity of single dendritic spines. *Nature.* 472 (7341).
147. Murphy TH, Corbett D. (2009) Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. *Nat Rev Neurosci.* 10(12):861-72.

148. Nakayama AY, Harms MB, Luo L. (2000) Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci.* 20:5329-5338.
149. Nelson MD, Saykin AJ, Flashman LA, Riordan HJ. (1998) Hippocampal volume reduction in schizophrenia as assessed by magnetic resonance imaging: a meta-analytic study. *Arch Gen Psychiatry.* 55:433-440.
150. Nieuwenhuys R, Voogd J, van Huijzen C. (2007) The Human Central Nervous System. A Synopsis and Atlas. *Springer.* Wyd. 4, Berlin.
151. Nimchinsky EA, Sabatini BL, Svoboda K. (2002) Structure and function of dendritic spines. *Annu Rev Physiol.* 64:313-53.
152. Nobes CD, Hall A. (1995) Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell.* 7;81(1):53-62.
153. Noguchi J, Matsuzaki M, Ellis-Davies GC, Kasai H. (2005) Spine-neck geometry determines NMDA receptor-dependent Ca<sup>2+</sup> signaling in dendrites. *Neuron.* 46:609-622.
154. Noguchi J, Nagaoka A, Watanabe S, Ellis-Davies GC, Kitamura K, Kano M, Matsuzaki M, Kasai H. (2011) In vivo two-photon uncaging of glutamate revealing the structure-function relationships of dendritic spines in the neocortex of adult mice. *J Physiol.* 15;589(Pt 10):2447-57.
155. Norum JH, Hart K., Levy FO. (2003) Ras-dependent ERK Activation by the Human Gs-coupled Serotonin Receptors 5-HT<sub>4(b)</sub> and 5-HT<sub>7(a)</sub>. *J. Biol. Chem.* 278, 3098-3104.
156. Olivier B. (2015) Serotonin: a never-ending story. *Eur J Pharmacol.* 753:2-18.
157. Okubo R, Hasegawa T, Fukuyama K, Shiroyama T, Okada M. (2021) Current Limitations and Candidate Potential of 5-HT<sub>7</sub> Receptor Antagonism in Psychiatric Pharmacotherapy. *Frontiers in Psychiatry.* 12, 623684.
158. Olson MF, Ashworth A, Hall A. (1995) An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science.* 269:1270-1272.
159. Papoucheva E, Dumuis A, Sebben M, Richter DW, Ponimaskin EG. (2004) The 5-hydroxytryptamine(1A) receptor is stably palmitoylated, and acylation is critical for communication of receptor with Gi protein. *J Biol Chem.* 279:3280-3291
160. Park JH, Scheerer P, Hofmann KP, Choe HW, Ernst OP. (2008) Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature.* 10;454(7201):183-7.

161. Pascual-Leone, A., Amedi, A., Fregni, F., Merabet, L. B. (2005). The plastic human brain cortex. *Annual Review of Neuroscience*, 28, 377–401.
162. Paxinos G, Franklin KBJ. (2008) The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. *Elsevier Science*.
163. Pchitskaya E, Bezprozvanny I. (2020) Dendritic Spines Shape Analysis—Classification or Clusterization? Perspective. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*. 12, 31.
164. Penzes P, Cahill ME, Jones KA, VanLeeuwen JE, Woolfrey KM. (2011) Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci*. 14(3):285-93.
165. Penzes P, Rafalovich I. (2012) Regulation of the Actin Cytoskeleton in Dendritic Spines. In: Kreutz M, Sala C. *Synaptic Plasticity. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 970. Springer, Vienna.
166. Perić D, Svob Strac D. (2007) The role of 5-HT(7) receptors in the control of seizures. *Brain Research*. 1141, 48–55.
167. Peroutka SJ, Howell TA. (1994) The molecular evolution of G protein-coupled receptors: focus on 5-hydroxytryptamine receptors. *Neuropharmacology*. 33:319-324.
168. Perry SJ, Baillie GS, Kohout TA, McPhee I, Magiera MM, Ang KL, Miller WE, McLean AJ, Conti M, Houslay MD, Lefkowitz RJ. (2002) Targeting of cyclic AMP degradation to beta 2-adrenergic receptors by beta-arrestins. *Science*. 25;298(5594):834-6.
169. Petrik D, Lagace DC, Eisch AJ. (2012) The neurogenesis hypothesis of affective and anxiety disorders: are we mistaking the scaffolding for the building? *Neuropharmacology*. Vol. 62, no. 1, pp. 21–34, 2012.
170. Pilpel Y, Segal M. (2004) Activation of PKC induces rapid morphological plasticity in dendrites of hippocampal neurons via Rac and Rho-dependent mechanisms. *Eur J Neurosci*. 19:3151-3164.
171. Piskorowski RA, Chevaleyre V. (2012) Synaptic integration by different dendritic compartments of hippocampal CA1 and CA2 pyramidal neurons. *Cell Mol Life Sci*. 69(1):75-88.
172. Ponimaskin E, Dumuis A, Gaven F, Barthet G, Heine M, Glebov K, Richter DW, Oppermann M. (2005) Palmitoylation of the 5-hydroxytryptamine4a receptor regulates receptor phosphorylation, desensitization, and beta-arrestin-mediated endocytosis. *Mol Pharmacol*. 67:1434-1443.
173. Ponimaskin EG, Profirovic J, Vaiskunaite R, Richter DW, Voynov-Yasenetskaya TA. (2002) 5-Hydroxytryptamine 4(a) receptor is coupled to the Galpha subunit of heterotrimeric G13 protein. *J Biol Chem*. 277:20812-20819.

174. Ponimaskin E, Voyno-Yasenetskaya T, Richter DW, Schachner M, Dityatev A. (2007) Morphogenic signaling in neurons via neurotransmitter receptors and small GTPases. *Molecular Neurobiology*. 35 (3), 278–287.
175. Profaci CP, Munji RN, Pulido RS, Daneman R. (2020) The blood-brain barrier in health and disease: Important unanswered questions. *J Exp Med*. 6;217(4):e20190062.
176. Rakic P. (2002) Neurogenesis in adult primate neocortex: An evaluation of the evidence. *Nature Reviews. Neuroscience*, 3 (1), 65–71.
177. Ramon y Cajal S. (1911) *Histologie du Systeme Nerveux del’Homme et des Vertebres, Maloine*. Vol. 2, Paris.
178. Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM, Kobilka TS, Thian FS, Edwards PC, Burghammer M, Ratnala VR, Sanishvili R, Fischetti RF, Schertler GF, Weis WI, Kobilka BK. (2007) Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*. 15;450(7168):383-7.
179. Rochefort NL, Konnerth A. (2012) Dendritic spines: from structure to in vivo function. *EMBO Rep*. 13(8):699-708.
180. Roo MD, Klauser P, Muller D. (2008) LTP Promotes a Selective Long-Term Stabilization and Clustering of Dendritic Spines. *PLOS Biology*. 6 (9), e219.
181. Rosenbaum DM, Cherezov V, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS, Choi HJ, Yao XJ, Weis WI, Stevens RC, Kobilka BK. (2007) GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. *Science*. 23;318(5854):1266-73.
182. Ruat M, Traiffort E, Leurs R, Tardivel-Lacombe J, Diaz J, Arrang JM, Schwartz JC. (1993) Molecular cloning, characterization, and localization of a high-affinity seroto-nin receptor (5-HT7) activating cAMP formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:8547-8551.
183. Runge K, Cardoso C, de Chevigny A. (2020) Dendritic Spine Plasticity: Function and Mechanisms. *Front. Synaptic Neurosci*. 12: 1663-3563.
184. Ruszczycki B, Szepesi Z, Wilczynski GM, Bijata M, Kalita K, Kaczmarek L, Wlodarczyk J. (2012) Sampling issues in quantitative analysis of dendritic spines morphology. *BMC Bioinformatics*. 13 (1), 213.
185. Ryu HH, Kim T, Kim JW, Kang M, Park P, Kim YG, Kim H, Ha J, Choi JE, Lee J, Lim CS, Kim CH, Kim SJ, Silva AJ, Kaang BK, Lee YS. (2019) Excitatory neuron-specific SHP2-ERK signaling network regulates synaptic plasticity and memory. *Science signaling*. 12 (571), eaau5755.
186. Sala C, Segal M. Dendritic spines: the locus of structural and functional plasticity. (2014) *Physiol Rev*. 94(1):141-88.

187. Sanchez C, Asin KE, Artigas F. [2015] Vortioxetine, a novel antidepressant with multimodal activity: review of preclinical and clinical data. *Pharmacol Ther.* 145:43-57.
188. Sancho-Balsells A, Borràs-Pernas S, Brito V, Alberch J, Girault JA, Giralt A. (2023) Cognitive and Emotional Symptoms Induced by Chronic Stress Are Regulated by EGR1 in a Subpopulation of Hippocampal Pyramidal Neurons. *Int J Mol Sci.* 14;24(4):3833.
189. Saneyoshi T, Hayashi Y. (2012) The Ca<sup>2+</sup> and Rho GTPase signaling pathways underlying activity-dependent actin remodeling at dendritic spines. *Cytoskeleton.* 69(8):545-54.
190. Santello M, Bisco A, Nevian NE, Lacivita E, Leopoldo M, Nevian T. (2017) The brain-penetrant 5-HT<sub>7</sub> receptor agonist LP-211 reduces the sensory and affective components of neuropathic pain. *Neurobiol Dis.* 106:214-221.
191. Scheerer P, Park J, Hildebrand PW, Kim YJ, Krauß N, Choe HW, Hofmann KP, Ernst OP. (2008) Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature.* 455, 497–502.
192. Schoeffter P, Ullmer C, Bobirnac I, Gabbiani G, Lübbert H. (1996) Functional, endogenously expressed 5-hydroxytryptamine 5-HT<sub>7</sub> receptors in human vascular smooth muscle cells. *British Journal of Pharmacology.* 117 (6), 993–994.
193. Schill Y, Bijata, M, Kopach O, Cherkas V, Abdel-Galil D, Böhm K, Schwab MH, Matsuda M, Compan V, Basu S, Bijata K, Wlodarczyk J, Bard L, Cole N, Dityatev A, Zeug A, Rusakov DA, Ponimaskin E. (2020) Serotonin 5-HT<sub>4</sub> receptor boosts functional maturation of dendritic spines via RhoA-dependent control of F-actin. *Communications Biology.* 3, 76.
194. Schmidt SI, Blaabjerg M, Freude K, Meyer M. (2022) RhoA Signaling in Neurodegenerative Diseases. *Cells.* 11(9):1520.
195. Senzai Y. (2019) Function of local circuits in the hippocampal dentate gyrus-CA3 system. *Neurosci Res.* 140:43-52.
196. Shen Y, Monsma FJ, Metcalf MA, Jose PA, Hamblin MW, Sibley DR. (1993) Molecular cloning and expression of a 5-hydroxytryptamine<sub>7</sub> serotonin receptor subtype. *J Biol Chem.* 268, 18200–18204.
197. Sheng M, Kim E. (2011) The postsynaptic organization of synapses. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1;3(12):a005678.
198. Shimizu M, Nishida A, Zensho H, Yamawaki S. (1996) Chronic antidepressant exposure enhances 5-hydroxytryptamine<sub>7</sub> receptor-mediated cyclic adenosine monophosphate accumulation in rat frontocortical astrocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 279(3):1551-8.

199. Szepesi Z, Bijata M, Ruszczycki 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:e63314.
200. Szepesi Z, Hosy E, Ruszczycki B, Bijata M, Pyskaty M, Bikbaev A, Heine M, Choquet D, Kaczmarek L, Wlodarczyk J. (2014) Synaptically released matrix metalloproteinase activity in control of structural plasticity and the cell surface distribution of GluA1-AMPA receptors. *PLoS One*. 9:e98274.
201. Sjöström PJ, Turrigiano GG, Nelson SB. (2001) Rate, timing, and cooperativity jointly determine cortical synaptic plasticity. *Neuron*. 20;32(6):1149-64.
202. Song I, Dityatev A. Crosstalk between glia, extracellular matrix and neurons. (2018) *Brain Res Bull*. 136:101-108.
203. Speranza, L., Chambery, A., Di Domenico, M., Crispino, M., Severino, V., Volpicelli, F., Leopoldo M, Bellenchi GC, di Porzio U, Perrone-Capano C. (2013) The serotonin receptor 7 promotes neurite outgrowth via ERK and Cdk5 signaling pathways. *Neuropharmacology*. 67, 155–167.
204. Stawarski M, Rutkowska-Wlodarczyk I, Zeug A, Bijata M, Madej H, Kaczmarek L, Wlodarczyk J. (2014) Genetically encoded FRET-based biosensor for imaging MMP-9 activity. *Biomaterials*. 35:1402-1410.
205. Steinbusch HW. (1981) Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Neuroscience*. 6:557-618.
206. Stiedl O, Pappa E, Konradsson-Geuken Å, Ögren SO. (2015) The role of the serotonin receptor subtypes 5-HT1A and 5-HT7 and its interaction in emotional learning and memory. *Frontiers in Pharmacology*. 6, 162.
207. Takeda S, Kadowaki S, Haga T, Takaesu H, Mitaku S. (2002) Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence. *FEBS Lett*. 5;520(1-3):97-101.
208. Takeda H, Tsuji M, Ikoshi H, Yamada T, Masuya J, Iimori M, Matsumiya T. (2005) Effects of a 5-HT7 receptor antagonist DR4004 on the exploratory behavior in a novel environment and on brain monoamine dynamics in mice. *Eur J Pharmacol*. 518, 30–39.
209. Tashiro A, Minden A, Yuste R. (2000) Regulation of dendritic spine morphology by the Rho family of small GTPases: antagonistic roles of Rac and Rho. *Cereb Cortex*. 10:927-938.
210. Tashiro A, Minden A, Yuste R. (2000) Regulation of dendritic spine morphology by the rho family of small GTPases: Antagonistic roles of Rac and Rho. *Cerebral Cortex*. 10 (10), 927–938.

211. Tashiro A, Yuste R. (2004) Regulation of dendritic spine motility and stability by Rac1 and Rho kinase: Evidence for two forms of spine motility. *Molecular and Cellular Neurosciences*. 26 (3), 429–440.
212. Trachtenberg JT, Chen BE, Knott GW, Feng G, Sanes JR, Welker E, Svoboda K. (2002) Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature*. 19-26;420(6917):788-94.
213. Tuladhar BR, Ge L, Naylor RJ. (2003) 5-HT<sub>7</sub> receptors mediate the inhibitory effect of 5-HT on peristalsis in the isolated guinea-pig ileum. *British Journal of Pharmacology*. 138 (7), 1210–1214.
214. Underwood BJ. (1969) Attributes of memory. *Psychol. Rev.* 76, 559–573.
215. Ventura R, Harris KM. (1999) Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J Neurosci*. 15;19(16):6897-906.
216. Verbich D, Prenosil GA, Chang PK, Murai KK, McKinney RA. (2012) Glial glutamate transport modulates dendritic spine head protrusions in the hippocampus. *Glia*. 60:1067-1077.
217. Viguier F, Michot B, Hamon M, Bourgoin S. (2013) Multiple roles of serotonin in pain control mechanisms--implications of 5-HT<sub>7</sub> and other 5-HT receptor types. *Eur J Pharmacol*. 15;716(1-3):8-16.
218. Volpicelli F, Speranza L, di Porzio U, Crispino M, Perrone-Capano C. (2014) The serotonin receptor 7 and the structural plasticity of brain circuits. *Front Behav Neurosci*. 8:318.
219. Waheed AA, Jones TL. Hsp90 interactions and acylation target the G protein Galpha 12 but not Galpha 13 to lipid rafts. (2002) *J Biol Chem*. 6;277(36):32409-12.
220. Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ. (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*. Apr 4;416(6880):535-9.
221. Warne T, Serrano-Vega MJ, Baker JG, Moukhametzianov R, Edwards PC, Henderson R, Leslie AG, Tate CG, Schertler GF. (2008) Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 24;454(7203):486-91.
222. Weisskopf MG, Nicoll RA. (1995) Presynaptic changes during mossy fibre LTP revealed by NMDA receptor-mediated synaptic responses. *Nature*. 20;376(6537):256-9.
223. Wesolowska A, Kowalska M. (2008) Influence of serotonin 5-HT(7) receptor blockade on the behavioral and neurochemical effects of imipramine in rats. *Pharmacol Rep*. 60(4):464–74.

224. Wesolowska A, Nikiforuk A, Stachowicz K, Tatarczynska E. (2006) Effect of the selective 5-HT<sub>7</sub> receptor antagonist SB 269970 in animal models of anxiety and depression. *Neuropharmacology*. 51(3):578–86.
225. Wirth A, Holst K, Ponimaskin E. (2017) How serotonin receptors regulate morphogenic signalling in neurons. *Prog Neurobiol*. 151, 35–56.
226. Wlodarczyk J, Mukhina I, Kaczmarek L, Dityatev A. (2011) Extracellular matrix molecules, their receptors, and secreted proteases in synaptic plasticity. *Dev Neurobiol*. 71(11):1040-53.
227. Woehler A, Wlodarczyk J, Ponimaskin EG. (2009) Specific oligomerization of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor in the plasma membrane. *Glycoconj J*. 26:749-756.
228. Woessner JF Jr. (1995) Quantification of matrix metalloproteinases in tissue samples. *Methods Enzymol*. 248:510-28.
229. Woolfrey KM, Srivastava DP. (2016) Control of Dendritic Spine Morphological and Functional Plasticity by Small GTPases. *Neural Plasticity*. 2016, 3025948.
230. Xiao F, Wang XF, Li JM, Xi ZQ, Lu Y, Wang L, Zeng Y, Guan LF, Yuan J. (2008) Overexpression of N-WASP in the brain of human epilepsy. *Brain Res*. 1233:168-175.
231. Yang Z, Liu X, Yin Y, Sun S, Deng X. (2012) Involvement of 5-HT<sub>7</sub> receptors in the pathogenesis of temporal lobe epilepsy. *European Journal of Pharmacology*. 685 (1–3), 52–58.
232. Yang YX, Wood NW, Latchman DS. (2009) Molecular basis of Parkinson's disease. *Neuroreport*. 28;20(2):150-6.
233. Yasuda R, Murakoshi H. (2011) The mechanisms underlying the spatial spreading of signaling activity. *Curr Opin Neurobiol*. 21:313-321.
234. Yasumatsu N, Matsuzaki M, Miyazaki T, Noguchi J, Kasai H. (2008) Principles of long-term dynamics of dendritic spines. *J Neurosci*. 28: 13592–13608.
235. Yuste R, Bonhoeffer T. (2004). Genesis of dendritic spines: Insights from ultrastructural and imaging studies. *Nature Reviews Neuroscience*. 5 (1), 24–34.
236. Zito K, Scheuss, V, Knott G, Hill T, Svoboda K. (2009). Rapid functional maturation of nascent dendritic spines. *Neuron*. 61 (2), 247–258.
237. Ziv NE, Smith SJ. (1996) Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron*. 17:91-102.

238. Zuo Y, Lin A, Chang P, Gan WB. (2005) Development of long-term dendritic spine stability in diverse regions of cerebral cortex. *Neuron*. 46:181-189.

## 8. Spis publikacji własnych

Publikacja wchodząca w skład rozprawy doktorskiej została podkreślona.

1. Baczyńska E, Zareba-Koziol M, Ruszczycki B, Krzystyniak A, Wojtowicz T, Bijata K, Pochwat B, Magnowska M, Roszkowska M, Figiel I, **Masternak J**, Pytys A, Dzwonek J, Worch R, Olszyński KH, Wardak AD, Szymczak P, Labus J, Radwańska K, Jahołkowski P, Hogendorf A, Ponimaskin E, Filipkowski RK, Szewczyk B, Bijata M, Włodarczyk J. (2024) Stress resilience in an active and multifactorial multifactorial process manifested by structural, functional, and molecular changes in synapses. *Neurobiology of Stress*. DOI: 10.1016/j.ynstr.2024.100683
2. Pochwat B, Misztak P, **Masternak J**, Bączyńska E, Bijata K, Roszkowska M, Bijata M, Włodarczyk J, Szafarz M, Wyska E, Muszyńska B, Krakowska A, Opoka W, Nowak G, Szewczyk B. (2022) Combined hyperforin and lanicemine treatment instead of ketamine or imipramine restores behavioral deficits induced by chronic restraint stress and dietary zinc restriction in mice. *Frontiers in Pharmacology*. 13:933364. DOI: 10.3389/fphar.2022.933364
3. Bijata M, Bączyńska E, Muller FE, Bijata K, **Masternak J**, Krzystyniak A, Szewczyk B, Siwiec M, Antoniuk S, Roszkowska M, Figiel I, Magnowska M, Olszyński KH, Wardak AD, Hogendorf A, Ruszczycki B, Gorinski N, Labus J, Stępień T, Tarka S, Bojarski AJ, Tokarski K, Filipkowski RK, Ponimaskin E, Włodarczyk J. (2022) Activation of the 5-HT<sub>7</sub> receptor and MMP-9 signaling module in the hippocampal CA1 region is necessary for the development of depressive-like behavior. *Cell Reports*. 15:38(11):110532. DOI: 10.1016/j.celrep.2022.110532
4. Dembska A, **Masternak J**, Prochota M. (2020) Spectroscopic studies upon chimeric molecular beacons with i-motif forming sequence in the loop. *Journal of Molecular Structure*. 1217:128436. DOI: 10.1016/j.molstruc.2020.128436
5. Blaszcak W, Barczak W, **Masternak J**, Kopczyński P, Zhitkovich A, Rubiś B. (2019) Vitamin C as a Modulator of the Response to Cancer Therapy. *Molecules*. 24(3):453. DOI: 10.3390/molecules24030453