



UNIwersytet Jagielloński
w Krakowie

Wydział Biologii
Neurobiologia

**Myszy z mutacją genu proenkefaliny jako model do badań
nad działaniem układu nagrody mózgu**

Klaudia Misiołek

Praca magisterska
wykonana pod opieką
dr. hab. Jana Rodrigueza Parkitny
w Zakładzie Neurofarmakologii Molekularnej
Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

Kraków 2020

Chciałabym złożyć ogromne podziękowania dr. hab. Janowi Rodriguezowi Parkitnie przede wszystkim za przekazywanie mi inspiracji do zagłębiania się w najdalsze zakątki neuronauki, służenie wiedzą i radą w każdej chwili oraz za całą pomoc i zaangażowanie włożone w stworzenie tej pracy, zarówno od strony merytorycznej jak i doświadczalnej, bez których napisanie niniejszego dyplomu byłoby niemożliwe.

Jednocześnie chciałabym podziękować Panu mgr. Łukaszowi Szumcowi za perfekcyjne przekazywanie wiedzy w dziedzinie technik laboratoryjnych, przy którym nigdy nie zabrakło dobrego humoru i ciekawych historii oraz Pani mgr Annie Radlickiej za wnikliwe wprowadzenie mnie w świat qPCR oraz zawsze pełną wesołych anegdot wymianę doświadczeń z przeprowadzania barwień immunofluorescencyjnych.

Składam także serdeczne podziękowania Panu dr. Przemysławowi Mielczarkowi z Środowiskowego Laboratorium Proteomiki i Spektrometrii Mas w IF PAN, w Krakowie za wykonanie analizy obecności peptydów wykorzystującą chromatografię połączoną ze spektrometrią mas oraz Pani mgr. Julicie Wesołowskiej ze Środowiskowego Laboratorium Obrazowania in vivo i in vitro w IF PAN, w Krakowie za wykonanie obrazowania fluorescencji z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej.

Szczerze podziękowania kieruję także w stronę Pana Wojciecha Romańskiego, który oprócz wsparcia sercem i kubkiem gorącej kawy w środku nocy, obdarzył mnie ogromnym wsparciem ze strony graficznej, bez którego nie powstałyby ryciny w niniejszej pracy.

SPIS TRESCI

Streszczenie	4
Abstract	5
Wykaz skrótów	6
1. Wstęp	7
1.1 Odkrycie endogennych enkefalin	7
1.2 Geny kodujące prekursory enkefalin	8
1.3 Enkefaliny – peptydy i receptory	10
1.4 Dystrybucja enkefalin w mózgu	12
1.5 Genetycznie modyfikowane myszy z inaktywacją genu <i>Penk</i>	13
1.6 Efekty działania enkefalin w mózgu	15
2. Cel i założenia pracy	17
3. Materiały i metody	18
3.1 Zwierzęta doświadczalne	18
3.2 Genotypowanie	18
3.3 Barwienia immunofluorescencji	19
3.4 Izolacja RNA	20
3.5 Odwrotna transkrypcja	21
3.6 Ilościowy PCR	21
3.7 Analiza spektrometrii mas (nanoLC-MS/MS)	22
3.8 Metody statystyczne	22
4. Wyniki	23
4.1 Wytworzenie modelu myszy z warunkową delecją genu <i>Penk</i>	23
4.2 Wyniki barwień immunofluorescencyjnych	26
4.3 Wyniki analizy pomiaru zawartości transkryptów genów	33
4.4 Analiza peptydów z wykorzystaniem spektrometrii mas	37
5. Dyskusja i wnioski	39
6. Bibliografia	43

Streszczenie

Enkefaliny pochodzące z genu *Penk* są najliczniej występującymi peptydami opioidowymi w przodomózgowiu i głównymi aktywatorami receptorów μ i δ opioidowych. W pracy opisano wytworzenie nowego szczepu genetycznie modyfikowanych myszy z inaktywacją genu proenkefaliny i ich wstępną charakterystykę. Myszy te zostały wygenerowane poprzez homologiczną rekombinację, za pomocą której wprowadzono miejsca loxP flankujące sekwencję kodującą białko znajdującą się w drugim eksonie genu. Prawidłowa rekombinacja została potwierdzona, jednak zaobserwowano również, że sama obecność miejsc loxP zaburzała ekspresję *Penk*, powodując poważne zmniejszenie abundancji mRNA i poziomów białka w prążkowiu i innych obszarach mózgu. W celu przekształcenia szczepu do pełnej inaktywacji genu skrzyżowano zwierzęta *Penk flox* ze zwierzętami z ekspresją zarodkową Cre (*SynCre*). Myszy „flox” były żywotne i nie wykazywały widocznych upośledzeń. Zbadano także poziomy Met- i Leu-enkefaliny z wykorzystaniem spektrometrii mas, aby sprawdzić, czy po inaktywacji genu *Penk* wykrywalna będzie Leu-enkefalina powstała z prodynorfiny. W dalszych badaniach model zostanie użyty do przetestowania roli enkefalin w zachowaniach związanych z działaniem układu nagrody mózgu.

Słowa kluczowe: układ opioidowy, enkefalina, *Penk*, układ nagrody

Abstract

Enkephalins derived from the *Penk* gene are the most abundant opioid peptides in the forebrain where they act as primary activators of the μ and δ opioid receptors. Here we describe generation of a novel genetically modified mouse with inactivation of the *Penk* gene and initial characterization of the new strain. LoxP sites flanking the preproenkephalin coding sequence were introduced by homologous recombination. Correct recombination of the floxed sequence was confirmed, however, we also observed that the presence of the loxP sites interfered with *Penk* expression causing severe reduction in mRNA and protein levels in the striatum and other brain areas. In order to generate a mouse with complete gene inactivation (KO) we crossed the animals with a germ-line expressed Cre (SynCre). ‘Flox’ mice were viable and showed no obvious impairments. We have also assessed the levels of Met- and Leu-enkephalin with mass spectrometry, to test if inactivation of the *Penk* gene could be to an extent compensated by Leu-enkephalin derived from prodynorphin. In the future, the model will be used to test the role of enkephalins in reward-driven behaviors.

Keywords: opioid system, enkephalin, *Penk*, reward system

Wykaz skrótów

SKRÓT	NAZWA ANGIELSKA	NAZWA POLSKA
wt	wild type	zwierzę bez mutacji genetycznych
KO	knock-out	zwierzę z inaktywacją genu
<i>Penk</i>	proenkephalin gene	gen proenkefaliny
NGS	normal goat serum	surowica kozia
ES	embryonic stem cells	embrionalne komórki macierzyste
CMS	chronic mild stress	łagodny przewlekły stres
δ, μ, κ	delta/mu/kappa opioid receptor	receptor opioidowy delta mu/kappa
DTA	diphtheria toxin fragment A	fragment A toksyny błoniczej
Neo	neomycin	neomycyna
GABA	gamma-Aminobutyric acid	kwasiem γ -aminomasłowy
MSN	medium spiny neurons	średnie neurony kolczyste
CID	collision induced dissociation	fragmentacja wywołana zderzeniowo
GPCR	G protein-coupled receptor	receptor sprzężony z białkiem G
Leu-enk; Met-enk	Leu-enkephalin, Met-enkephalin	Leu-enkefalina, Met-enkefalina

Wstęp

Pracy dyplomowa ma na celu charakteryzację myszy z inaktywacją genu proenkefaliny jako modelu do badań roli sygnalizacji enkefalinowej w mózgu. Gen *Penk* jest zachowany ewolucyjnie u ssaków; u myszy i człowieka występuje tylko jeden gen kodujący białko preproenkefaliny. Białko to, podobnie jak w przypadku genu - jest strukturalnie podobne u obu gatunków. Z dużym prawdopodobieństwem świadczy to o jego podobieństwie funkcjonalnym, co z kolei umożliwia odniesienie wyników uzyskanych u myszy w kontekście badań nad ludzkim mózgiem. Przedstawiona jest charakterystyka nowego szczepu genetycznie modyfikowanych myszy *Penk* flox oraz niektórych szczepów pochodnych. Analizę efektów mutacji przeprowadzono poprzez genotypowanie, analizę ekspresji genów, barwienia immunofluorescencyjne i analizę obecności peptydów wykorzystującą chromatografię cieczową połączoną ze spektrometrią mas.

Odkrycie endogennych enkefalin

Do początków badań nad enkefaliną doprowadziło pośrednio to, iż szukano substancji, która wchodziła w interakcje z receptorami dla morfiny - opiatu, który był już powszechnie wykorzystywany jako lek przy dolegliwościach bólowych. Jednym z pionierskich badań w tej dziedzinie było (Paton, 1957), w którym testowano wpływ działania morfiny i innych leków opioidowych na kurczliwość jelita krętego świnki morskiej i wydzielanie acetylocholino. Ponieważ wiadomym było już, że morfina hamuje skurcze zastymulowanego jelita krętego poprzez zmniejszenie uwalniania acetylocholino z zakończeń nerwów cholinergicznych, szukano innych substancji reprezentujących podobne działanie. W kolejnych latach badania prowadzone były coraz częściej na tkance mózgowej oraz skupiały się na ustaleniu charakteru chemicznego i znaczenia fizjologicznego potencjalnych endogennych agonistów receptorów opioidowych (Terenius i Wahlström, 1975). Potwierdzony został już nie tylko fakt, że leki podobne do morfiny lub naloksonu mają wysokie powinowactwo do receptorów opioidowych, ale również to, że wiele neuroprzekaźników takich jak: dopamina, noradrenalina, GABA, acetylocholina nie wchodzi z nimi w interakcje (Terenius, 1973; Wong i Horng, 1973).

W 1975 roku, po około 20 latach poszukiwań, dokonano odkrycia pierwszego endogennego opioidu – enkefaliny (John Hughes i in., 1975a). Z tkanki mózgowej świni na drodze chromatografii cieczowej o wysokiej wydajności wyizolowano peptyd o niskiej

masie molekularnej (800-1200Da). Analiza aminokwasów po hydrolizie 6M kwasem solnym i elektroforezie dała światło na skład aminokwasowy cząsteczki (2 reszty aminokwasowe glicyny, 1 metioniny, 1 fenyloalaniny, 1 tyrozyny), a badanie fizjologiczne pokazało, że enkefalina, podobnie jak morfina, hamuje wywołane nerwowo skurcze nasieniowodów mysich i splotu mitralnego świnki morskiej (John Hughes i in., 1975a). Tej samej grupie badawczej udało się także rozróżnić dwie strukturalne formy enkefaliny, naturalnie występującej w mózgu (J. Hughes i in., 1975b). Odkrycie oparte było o określenie sekwencji aminokwasowej pentapeptydu poprzez procedurę sekwencyjnej degradacji oraz spektrometrię mas. Enkefalinę wyizolowaną z mózgu świń poddano sekwencyjnej degradacji z zastosowaniem degradacji Edmana, dzięki której scharakteryzowano tę substancję jako peptyd o niskiej masie cząsteczkowej, o składzie aminokwasowym Tyr-Gly-Gly-Phe. Niepewności dotyczące długości łańcucha i sekwencji w pozycji 5 zostały rozwiązane przez niezależną analizę spektrometrii mas, gdzie ustalono dokładny skład aminokwasowy obu form: YGGFM (Met-enk) oraz YGGFL (Leu-enk). Potwierdzono, zgodnie z poprzednimi badaniami, że zarówno Met- jak i Leu-enkefaliny mają silne działanie agonistyczne dla receptorów opioidowych, ponieważ powodowały zależne od dawki hamowanie wywoływanych elektrycznie skurczów nasieniowodów u myszy i jelita krętego u świnki morskiej. Te działania hamujące mogły być całkowicie blokowane przez nalokson – nieselektywnego antagonistę receptorów opioidowych (J. Hughes i in., 1975b). Odkrycie endogennych enkefalin stało się początkiem intensywnych badań („Opioid Peptides”, 1986) które, do dnia dzisiejszego, należą do jednego z najaktywniejszych obszarów badawczych w dziedzinie neuronauki (MERRER i in., 2009).

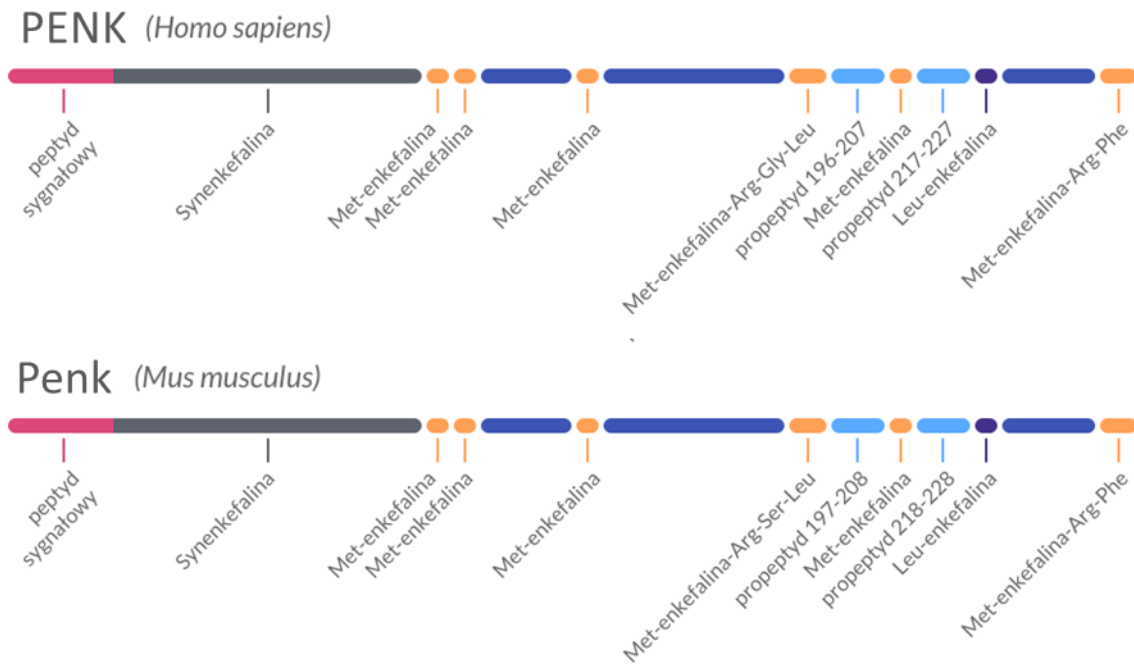
Geny kodujące prekursorzy enkefalin

Cechą wspólną dla wszystkich genów peptydów opioidowych jest to, że introny nie rozdzielają sekwencji kodujących prekursorzy polipeptydowe, co ma miejsce w przypadku innych białek (Douglass i wsp. 1984). Wszystkie prekursorzy białek opioidowych posiadają podobną długość sekwencji, a powstające z nich biologicznie aktywne peptydy powstają prawie wyłącznie z odcinka od połowy prekursora do końca domeny C-końcowej (Kakidani i in., 1982). Każdy prekursor posiada region N-końcowy bogaty w reszty cysteiny o podobnym rozkładzie, co wskazuje na powstawanie mostków disiarczkowych niezbędnych do stabilizacji prawidłowej konformacji białka (Kakidani i in., 1982). Prawie wszystkie biologicznie aktywne domeny prekursora są flankowane z

obu stron przez pary zasadowych aminokwasów, co umożliwia enzymom cięcia w procesie powstawania aktywnych peptydów („Opioid Peptides”, 1986).

Ogólna organizacja genu *Penk* myszy jest niezwykle podobna do ludzkiego *PENK*. Geny te posiadają główny ekson po stronie 3', na którym znajdują się sekwencje kodujące nukleotydy dla wszystkich biologicznie aktywnych peptydów i większości części N-końcowe prekursorów („Opioid Peptides”, 1986). U myszy i człowieka występuje tylko jeden gen kodujący preproenkefalinę). W przypadku człowieka gen *PENK* znajduje się na chromosomie 8, w miejscu 8q12.1, posiada 4 eksony i 9 transkryptów (z czego 6 koduje białko); u myszy *Penk* występuje na chromosomie 4, w miejscu 4 A1; 4 2.31 cM, zawiera 3 eksony oraz 2 transkrypty (dane z bazy Gene, NLM). Strukturalne podobieństwa między tymi dwoma genami sugerują, że mogły powstać poprzez wspólny ewolucyjny mechanizm. Wysoki stopień zachowania struktury genu preproenkefaliny wskazuje na jego ważną fizjologiczną rolę, zarówno u ssaków jak i niższych kręgowców (Martens & Herbert, 1984).

Peptydy opioidowe powstają poprzez proteolityczne cięcie znanych prekursorów dużych białek. Gen *Penk* koduje sekwencję białka prekursorowego enkefalin - preproenkefalinę. Białko to, podobnie jak gen proenkefaliny, cechuje się dużym podobieństwem u ssaków, w tym u ludzi i myszy (*Ryc. 1*). W wyniku cięcia białka *Penk* mogą powstać 4 cząsteczki Met-enkefaliny oraz jedna cząsteczka Leu-enkefaliny. Sekwencja kodująca Leu-enkefalinę wyrażana jest również przez gen *Pdyn* (prodynorfiny) i znajduje się na N-końcu dynorfiny A i alfa-neoendorfiny, z których mogą powstać 3 cząsteczki pentapeptydu Leu-enkefaliny. Gen *Pomc* (proopiomelanokortyny) zawiera również sekwencję met-enkefaliny na N-końcu β -endorfiny, ale fizjologicznie β -endorfina nie jest przetwarzana w Met-enkefalinę (Takei i in., 2015).



Ryc.1 Schemat sekwencji kodującej genu proenkefaliny u człowieka (*Homo sapiens*) oraz myszy (*Mus musculus*).

Enkefaliny – peptydy i ich receptory

Enkefaliny są peptydami należącymi, obok dynorfin i β -endorfiny do cząsteczek wchodzących w skład układu opioidowego. Nazywane są także endogennymi opioidami, ponieważ są wytwarzane wewnątrzustrojowo i wiążą się z receptorami opioidowymi znajdującymi się w organizmie. Wspólną wszystkich peptydów opioidowych jest sekwencja aminokwasowa YGGF znajdująca się na N-końcu, która odgrywa kluczową rolę w oddziaływaniu z receptorami opioidowymi. Możemy wyróżnić dwa podstawowe peptydy należące do enkefalin, które różnią się w budowie jedną resztą aminokwasową: Met-enkefalinę (metionina) oraz Leu-enkefalinę (leucyna) (J. Hughes i in., 1975; Takei i in., 2015; Yang i in., 1977; Zamir i in., 1984). Enkefaliny są agonistami receptorów δ -opiodowych (Met-enkefalina $K_D = 3.2$; Leu-enkefalina $K_D = 2.7$) oraz z nieco mniejszym powinowactwem receptorów μ -opiodowych (Met-enkefalina $K_D = 6.2$; Leu-enkefalina $K_D = 15$) (Chang i Cuatrecasas, 1979).

Receptory opioidowe należą do rodziny GPCR i są sprzężone z białkami $G_{o/i}$ co oznacza, że mają hamujący wpływ na neurony. Każdy typ receptorów posiada pozakomórkowy N-koniec, 7 transbłonowych helis, 3 pętle pozakomórkowe i

wewnątrzkomórkowe oraz wewnątrzkomórkowy C-koniec. Po aktywacji receptora (związaniu ligandu), następuje zmiana jego konformacji. Następnie, w α -podjednostce białka $G_{o/i}$ zachodzi wymiana związanego GDP (difosforan guanozyny) na GTP (trójfosforan guanozyny), co następnie prowadzi do oddysocjowania tego białka od receptora oraz rozdysocjowania na podjednostki: α oraz kompleks podjednostek β i γ . Ta pierwsza wpływa na fosforylację białek poprzez hamowanie syntezy cyklicznego adenozymonofosforanu (cAMP), który jest częścią wtórnej kaskady sygnałów wewnątrz komórki. Prowadzi to do zahamowania aktywności szeregu podtypów kinazy białkowej A. Z kolei kompleks podjednostek β i γ hamuje bramkowane napięciem kanały wapniowe typu L oraz aktywację kilku rodzajów kanałów potasowych - co prowadzi do zahamowania aktywności neuronu. Mechanizm ten odpowiada za analgetyczne działanie układu opioidowego (Dembla i in., 2017; Williams i in., 2013). Ostatecznie podjednostka α białka $G_{o/i}$ hydrolizuje GTP, a powstające w wyniku tego GDP powodują zmianę konformacji białka, prowadzi to do odtworzenia heterotrimeru białka G oraz kompleksu receptora (Williams i in., 2013). Desensytyzacja, której funkcją jest ochrona komórki przed skutkami nadmiernej stymulacji receptora, następuje w wyniku: długiego czasu aktywacji receptora, wysokiego stężenia liganda i aktywacji dużej liczby receptorów jednocześnie. Możemy ją podzielić na szybką – następującą przez fosforylację receptora albo utratę połączenia receptorów z białkami G oraz wolną – endocytozę receptora. W kontekście tolerancji wywołanej przez leki opioidowe ważna jest ścieżka przekazywania sygnału zależna od arestyny. Proces internalizacji receptorów opioidowych w wyniku działania agonisty rozpoczyna się od fosforylacji tych receptorów. Ufosforylowany receptor jest zdolny do wiązania białka β -arestyny, które po przyłączeniu blokuje dalsze przekazywanie sygnałów za pośrednictwem białka G. Oprócz blokowania przekaźnictwa sygnałów arestyna przekierowuje sygnalizację komórkową na alternatywne szlaki niezależne od białka G, takie jak sygnalizacja zależna od β -arestyny. Prowadzi to do inicjacji procesów internalizacji receptorów. Opisane powyżej procesy skutkują mniejszą ilością dostępnych receptorów na powierzchni komórki oraz zmniejszonym powinowactwem agonisty do receptora, czego skutkiem jest wystąpienie tolerancji na leki opioidowe (Williams i in., 2013). W odwrócenie tego efektu i tym samym przywrócenie równowagi sygnalizacyjnej zaangażowany jest proces ponownego umieszczenia na błonie zewnątrzkomórkowej receptorów. Zinternalizowane receptory są wtedy defosforylowane i zawracane do błony komórkowej jako kompetentne receptory zdolne do aktywacji przez odpowiedni ligand (Williams i in., 2013; Zuo, 2005).

Dystrybucja enkefalin w mózgu

Większość neuronów zawierających enkefalinę ma krótkie aksony, co wskazuje, że działają one blisko swoich miejsc syntezy oraz że występowanie ich najczęściej pokrywa się z miejscami występowania ich receptorów (MERRER i in., 2009; „Opioid Peptides”, 1986). Ciała komórek wykazujące ekspresję genu *Penk* występują obficie w centralnym oraz obwodowym układzie nerwowym. Zaobserwowano je między innymi w: tylnym płacie przysadki, współczulnym układzie nerwowym, trzustce, jelitach, rdzeniu nadnerczy, układzie sercowo-naczyniowym, prążkowie, jądrze półleżącym czy jądrze łukowatym podwzgórza (Duque-Díaz i in., 2019; Przewlocki, 2009; Tang i in., 1983).

Jednym z kluczowych szlaków charakteryzujących się dużą ekspresją enkefalin są neurony szlaku prążkowiowo-czarnego, w tym przede wszystkim średnie kolczyste (MSN) należące do prążkowie. MSN stanowią ponad 90% tej struktury i charakteryzują się średnią wielkością somy oraz promienisto wyrastającymi dendrytami, które są gęsto wysadzone kolcami dendrytycznymi. Wszystkie MSN wykorzystują GABA jako neuroprzebiegacz, natomiast można je odróżnić przez miejsca do których posiadają projekcje, często oddaloną od miejsca syntezy, ekspresję receptorów dopaminowych oraz neuropeptydów. W pierwszej z grup MSN, wyrażającej receptory dopaminy D1 (szlak bezpośredni) oprócz GABA występują także substancja P i dynorfina. Część źródeł potwierdza występowanie obu typów receptorów opioidowych μ i δ na MSN D1 (2004 *Allen Institute for Brain Science. Allen Mouse Brain Atlas. Dostęp z: <https://mouse.brain-map.org/>*), z kolei inne donoszą tylko o μ (Banghart i in., 2015). Druga grupa MSN D2 (szlak pośredni) wyraża Met- i Leu-enkefalinę (Deutch i in., 2007) oraz wykazuje ekspresję receptorów μ i δ opioidowych (Banghart i in., 2015). Wykazano, że w prążkowie neurony wyrażające receptory dopaminy D1, należą do szlaku bezpośredniego, prowadzącego do aktywacji ruchu, z kolei D2 do szlaku pośredniego – hamującego ruch. W innych strukturach, przykładowo w jądrze półleżącym zarówno D1 jak i D2-MSN mogą hamować lub odhamowywać aktywność wzgórzową w zależności od ich projekcji (Kupchik i in., 2015). Innym istotnym szlakiem jest szlak pallido-striatalny. W gałce bladej występują komórki wykazujące ekspresję genu *Penk* oraz wyrażające preproenkefalinę (Hegeman i in., 2016; B. R Hoover i Marshall, 2002; Brian R. Hoover & Marshall, 1999). Są to neurony arkypalidalne, które stanowią ok. 20-25% wszystkich neuronów tej struktury (Hegeman i in., 2016). W przeciwieństwie do innych populacji neuronów znajdujących się w gałce bladej unerwiają tylko prążkowie,

stanowiąc największe zewnętrzne unerwienie GABA-ergiczne tej struktury, hamując zarówno neurony projekcyjne, jak i interneurony (Hegeman i in., 2016; Mallet i in., 2012). Zgodnie z obecną wiedzą anatomiczną na temat szlaku prążkowiowo-bladego (Hegeman i in., 2016; Kemp i in., 1971) połączenie obu struktur jest uporządkowane topograficznie, a neurony prążkowiego wchodzące do gałki bladej podlegają wysokiej konwergencji. Zakładając, że wszystkie średnie neurony kolczyste D2 w prążkowie posiadają zakończenia w gałce bladej zewnętrznej (GPe), to poszczególne neurony GPe muszą otrzymywać sygnały od średnio co najmniej 60 MSN-D2 (Oorschot, 1996).

Genetycznie modyfikowane myszy z inaktywacją genu *Penk*

Genetycznie modyfikowane zwierzęta są narzędziem pozwalającym na zbadanie roli działania genu w funkcjonowaniu organizmu. Wyłączenie genu definiowane jest jako mutacja, która powoduje, że działający gen (wskutek delecji lub innej zmiany uniemożliwiającej normalną transkrypcję/translację), traci swoją funkcjonalność.

Najczęściej dotąd wykorzystywany w badaniach szczep myszy z delecją genu *Penk* nie wykazywał istotnych zaburzeń. Zwierzęta *Penk* KO kongeniczne z C57BL/6 są zdrowe, ich rozmiar i waga są w normie, opiekują się swoim potomstwem oraz nie różnią się wyglądem od myszy bez mutacji (König i in., 1996). Charakteryzują się zmniejszoną wrażliwością na bodźce bólowe, o czym świadczy mniejsza liczba zachowań związanych z odczuwaniem bólu w teście formalinowym (König i in., 1996; Walwyn i in., 2016) i krótsze opóźnienie do pierwszego skoku w teście gorącej płytki (Bilkei-Gorzo i in., 2004; König i in., 1996).

Myszy *Penk* KO wykazują zwiększoną odpowiedź na stresujące bodźce środowiskowe. Przy braku preproenkefaliny podstawowy poziom kortykosteronu u myszy jest obniżony; gdy pojawia się bodziec powodujący stres, jego poziom wzrasta wolniej do szczytowej wartości, a jego powrót do normy zajmuje więcej czasu niż u kontroli (Melo i in., 2014). W modelu przewlekłego łagodnego stresu (CMS), u zwierząt [wt/wt] obserwowany jest wzrost stężenia kortykosteronu we krwi, podczas gdy nie zaobserwowano podobnej, wywołanej stresem zmiany u zwierząt *Penk* KO (Melo i in., 2014). Pomimo, iż poziom kortykosteronu jest wyższy u myszy z mutacją w warunkach wyjściowych, to nie występuje jego obniżenie po CMS w porównaniu do myszy bez mutacji genetycznych. U myszy *Penk* KO występuje niższa podstawowa temperatura

ciała niż u zwierząt kontrolnych. W wyniku hipertermii wywołanej stresem u mutantów nie zaobserwowano zmian temperatury, w porównaniu do zwierząt [wt/wt], u których wzrosła (Melo i in., 2014). W teście otwartego pola zwierzęta *Penk* KO wykazują zmniejszoną aktywność ruchową na otwartej przestrzeni, większą preferencję do poruszania się po obrzeżach klatki. Z kolei w uniesionym labiryncie krzyżowym spędzają mniej czasu w otwartych częściach (przy podobnej aktywności ogólnej) w porównaniu do myszy kontrolnych (Bilkei-Gorzo i in., 2004, 2008; Bilkei-Gorzó i in., 2008; König i in., 1996; Kung i in., 2010). Po zakończonym teście podniesionego labiryntu krzyżowego zaobserwowano spadek aktywności w ciele migdałowatym oraz w jądrze przykomorowym (immunoreaktywność c-Fos) (Bilkei-Gorzó i in., 2008). W teście warunkowania lękiem, drażnienie prądem powoduje większe nasilenie zamierania w miejscu (które jest miarą zachowań lękowych) u myszy *Penk* KO niż u zwierząt kontrolnych (Kung i in., 2010). Podobny wzrost częstotliwości zachowań związanych z lękiem opisano u zwierząt bez receptora opioidowego δ . Badania te wskazują, że receptory δ -opiodowe pośredniczą we wpływie peptydów pochodzących od białka preproenkefalin na zachowania emocjonalne (Filliol i in., 2000). Z kolei wyniki testu na anhedonię (preferencji sacharozy) pokazały, że CMS wywołał obniżone spożycie słodzonej wody u zwierząt [wt/wt], ale nie u myszy z wyłączonym genem proenkefalin (Melo i in., 2014).

Jednakże inaktywacja tego samego genu, u tego samego gatunku, może skutkować rozbieżnościami w opisanych fenotypach – wiemy o tym dzięki wytworzeniu różnych szczepów charakteryzujących się tym samym typem mutacji. Przyczynami takiego zjawiska mogą być: zajęcie mutacji z mniejszą wydajnością niż 100%, zaburzenie ekspresji genu powstałe niezależnie od zamierzonej mutacji, czy uszkodzenie sekwencji kodującej gen. Innym przykładem różnic fenotypowych, tym razem nie wynikających z niezamierzonych działań, u zwierząt z tą samą mutacją jest efekt tła genetycznego. W teście interakcji społecznych (samiec-samiec), myszy *Penk* KO na tle genetycznym C57BL/6J spędzały mniej czasu na interakcji społecznej (cechowały się wyższym poziomem lęklivosti) niż myszy *Penk* KO na tle DBA/2J (Bilkei-Gorzo i in., 2004). Mimo wyłączenia tego samego genu, z użyciem tej samej metody, możemy spotkać się różnicami w zachowaniu w zależności od tła genetycznego danej linii.

Efekty działania enkefalin w mózgu

O ogólnej funkcjonalnej roli cząsteczek sygnałowych można dywagować na podstawie miejsca ich występowania. Przykładowo enkefaliny występują w ciele migdałowatym (wpływ na reakcje emocjonalne), w jądrach podwzgórza i pnia mózgu (funkcje sercowo-naczyniowe lub oddechowe) czy w rdzeniu kręgowym, w okolicach istoty szarej okołowodociągowej (gdzie pośredniczą w odczuwaniu bólu) (Froehlich, 1997).

W przypadku funkcji enkefalin, jak i wielu innych neuropeptydów, kluczowe są eksperymenty badające efekty podań agonisty/antagonisty receptorów czy manipulacji genetycznych prowadzących do zmiany transkrypcji genów, których funkcja skorelowana jest z działaniem danej cząsteczki. W jednym z badań myszy pozbawione białek prekursorowych β -endorfiny i enkefaliny zostały przetestowane pod kątem preferencji słodkiego roztworu w teście wyboru między pić czystą wodę lub wody słodzonej sacharozą po podaniu antagonisty opioidowego - naloksonu (Hayward i in., 2002). Ilość spożywanej słodzonej i czystej wody oraz kompensacyjny spadek dziennego spożycia pokarmu były podobne dla wszystkich delecji genów i nie stwierdzono różnic względem myszy kontrolnych. Po podaniu antagonisty opioidowego nastąpiło zmniejszenie spożycia sacharozy o 50% jedynie u myszy pozbawionych β -endorfiny oraz myszy [wt/wt]. Dane te sugerują, że nalokson zmniejsza spożycie sacharozy u tych zwierząt poprzez blokowanie sygnalizacji endogennej enkefaliny i/lub dynorfiny, ale nie β -endorfiny (Hayward i in., 2002). Możliwe, że enkefalina i dynorfina wpływają na preferencję słodkiego smaku, ale nie są konieczne do podtrzymania spożywania słodkiej wody. Możliwe też, że nagradzające właściwości sacharozy są bardziej wrażliwe na działanie antagonisty, niż jej właściwości wzmacniające. Działanie stresorów (czyli czynników fizycznych lub psychicznych zaburzających homeostazę) również posiada swoje odbicie w funkcjonowaniu szlaków enkefalinowych. Łagodne drażnienie prądem i wymuszone pływanie obniżają poziom Leu-enkefaliny w podwzgórzu oraz Met-enkefaliny w prążkowie i podwzgórzu (Nam i in., 2019). W jądrze połączonej części mózgu poziom enkefaliny również jest zmniejszony u zwierząt, które doświadczyły przewlekłego łagodnego stresu, a jej poziom wrastał poprzez chroniczne leczenie antydepresantami. Dodatkowo wystawienie na zapach drapieźnika, stres w uniesionym labiryncie

krzyżowym oraz stres unieruchomienia obniża poziom Leu-enkefaliny w hipokampie (Nam i in., 2019).

Uważa się, że podłożem działania substancji uzależniających jest niewłaściwe zaangażowanie ścieżek neuronalnych reagujących na nagrodę. Istotną rolę odgrywa tutaj układ dopaminergiczny, który jest pośrednikiem w nagradzającym działaniu opioidów. Przykładowym doświadczeniem dotyczącym tego zagadnienia są badania, w których myszy z wyłączonym genem *Penk* otrzymują możliwość picia roztworów alkoholu. Myszy z niedoborem enkefaliny nie wykazywały żadnej różnicy pod względem preferencji 12% (wg./obj.) etanolu oraz nie wykazywały wywołanego stresem wzrostu spożycia etanolu w porównaniu z myszami [wt/wt] (Racz i in., 2008). Podobne wyniki uzyskano w doświadczeniu, gdzie badano uzależniające działanie nikotyny u myszy *Penk* KO. Nikotyna indukowała warunkową preferencję miejsca u zwierząt kontrolnych, ale tego efektu nie było u myszy *Penk* KO. Zaobserwowano, że zwiększony poziom dopaminy w jądrze półleżącym indukowany przez nikotynę był również zmniejszony u tych myszy (Berrendero i in., 2005).

Powyższe dane wskazują na szereg funkcji, w które zaangażowana jest sygnalizacja enkefalinowa. Endogenne peptydy opioidowe pochodzące z preproenkefaliny biorą udział między innymi w nagradzających właściwościach substancji uzależniających, pośredniczą w odczuwaniu bólu, regulują reakcje emocjonalne, biorą udział w regulacji preferencji pokarmów bogatych w tłuszcze i cukry czy procesach nauki i pamięci (Berrendero i in., 2005; Duque-Díaz i in., 2019; Meilandt i in., 2008; MERRER i in., 2009; Przewlocki, 2009; Wang i in., 2018). Mnogość funkcji oraz niepełna wiedza dotycząca mechanizmów działania enkefalin czynią je ważnym podmiotem dalszych badań.

Cel i założenia pracy

Celem pracy jest charakterystyka genetycznie modyfikowanych myszy z inaktywacją genu *Penk*. Opisu efektów mutacji genu *Penk* dokonano poprzez analizę wyników: barwień immunofluorescencyjnych, genotypowania, względnej ekspresji transkryptów genów (qPCR) i chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrią mas (LC-MSI). Głównym założeniem było opisanie wytworzenia i własności szczepu *Penk* KO oraz wykazanie różnic pomiędzy poszczególnymi genotypami w kontekście do przeprowadzanych doświadczeń.

Materiały i metody

Zwierzęta doświadczalne

W doświadczeniach wykorzystano myszy (*Mus musculus L.*) *Penk flox*, które wytworzone zostały przez firmę Cyagen, a następnie hodowane były w Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie.

Myszy B6.Cg-Tg(Syn1-cre)671Jxm/J u których rekombinaza Cre jest wyrażana pod promotorem genu synapsyny zostały sprowadzone z IBD PAN w Warszawie, a szczep został wytworzony 19 lat temu i opisany przez (Zhu i in., 2001). U myszy SynCre zintegrowany transgen („knock-in”) znajduje się na chromosomie 6. Myszy homozygotyczne pod względem wstawki transgenicznej są żywe i płodne, jednak rozmiar miotu i mnogość potomstwa pochodzącego z homozygotycznych kojarzeń są małe, a większość szczeniąt nie przeżywa – dlatego utrzymywana jest heterozygotyczność.

Na jednym z etapów skorzystano także zwierzęta *Drd2Cre* (Tg(*Drd2-cre*)ER44Gsat. Myszy zostały stworzone w projekcie GENSAT (Gerfen i in., 2013). U myszy *Drd2Cre* zintegrowany transgen znajduje się na chromosomie 9. Transgen ten koduje rekombinazę *nlsCre* pod kontrolą promotora genu *Drd2* (receptora dopaminy D2). U myszy *Drd2Cre* aktywność rekombinazy jest najsilniejsza w neuronach prążkowiowo-białych, ale występuje również w neuronach dopaminergicznych oraz niektórych neuronach dopaminoceptywnych w korze mózgowej.

Myszy były trzymane w grupach (minimum 2/klatkę) ze dostępem do pokarmu (Labofeed H, WPiK) oraz wody *ad libitum*. W zwierzętarni utrzymywano stałe warunki oświetlenia (cykl 12 godz. światło/ciemność, 7:00 – 19:00), temperatury ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). Wszystkie analizy zostały wykonane post-mortem.

Genotypowanie

Procedurę rozpoczęto od lizy biopsji końcówek ogona w roztworze DirectPCR® (tail) (Viagen; #102-T) w objętości 0,2ml w 50°C przez noc, następnie próbki inkubowane były 45minut w 85°C w celu inaktywacja proteiny K. Do genotypowania wykorzystano 1 μl lizatów. U myszy *Penk flox* PCR przeprowadzono z wykorzystaniem par starterów: F1 CTACAGGCGCGTTCTTCTCT i R1 TAGCTGCATTTAGCGCAGTC oraz w

przypadku zwierząt *Penk* KO: F1 CTACAGGCGCGTTCTTCTCT i R2 GGATGGAGCAGGTAGTGG. Reakcje PCR miały 40 cykli w następujących warunkach: wstępna denaturacja (95 °C, 3min), denaturacja nici (95 °C, 30s), przyłączanie starterów (58°C, 30s), elongacja (72°C, 1min; x40 cykli). Analizę wyników PCR przeprowadzono za pomocą elektroforezy (60min) w żelu agarozowym (2% wg./obj.) w buforze 50xTAE (2M Tris pH 8,3; 1M octan sodu oraz 50 mM EDTA (wersenian disodu) pH 8) z dodatkiem bromku etydyny, przy napięciu 120V.

Barwienie immunofluorescencji

Zwierzęta zostały uśmiercone przez podanie śmiertelnej dawki morbitalu (ok. 0,1ml/20g masy ciała). W kolejnym kroku poddano je perfuzji przez podanie ok. 10ml zimnego 10xPBS (buforowana fosforanem sól fizjologiczna) do lewej komory (przy przecięciu prawego przedsionka), a następnie ok. 20-30ml 4% (wg./obj.) paraformaldehydu. Pozyskane mózgi utrwalono w tym samym roztworze przez noc w 4°C. Kolejnym krokiem była utwalenie mózgow poprzez umieszczenie ich w 30% (wg./obj.) roztworze sacharozy w PBS przez 48h, aż opadły na dno probówek. Następnie na wibratomie (Leica VT1299) wykonano skrawki o grubości 40µm. Selekcja skrawków, które w kolejnych etapach poddane zostały barwieniu immunofluorescencyjnemu mającemu na celu zobrazowanie białka preproenkefaliny lub Leu-enkefaliny, została dokonana z wykorzystaniem binokularu StemiDV4 (Zeiss). Wszystkie etapy barwienia zostały przeprowadzone na kołysce. W celu zablokowania wiązań niespecyficznych tkankę inkubowano przez godzinę w 5% (wg./obj.) roztworze normalnej surowicy koziej (NGS) z PBST (0,25% (wg./obj.) Triton X-100 w PBS). Następnie skrawki inkubowano przez noc w temperaturze pokojowej razem z pierwszorzędowym przeciwciałem: króliczym anti-preproenkefalina (1:500; Neuromics, #14124;) lub króliczym anti-Leu-enkefalina (1:100; Neuromics; # RA21007). Następnie po odpłukaniu skrawków z nadmiaru przeciwciała I rzędowego w PBS (3x 5min), przeprowadzono inkubację z przeciwciałem drugorzędowym: koza anti-królik Alexa Fluor 488 (1:500 oraz 1:200; Thermofisher, # A-11070) przez 2h w temperaturze pokojowej. Po 3-krotnym przepłukaniu roztworem PBS, skrawki nałożono na dodatnio naładowane szkiełka. Użyto serum zamykającego "HardSet with DAPI" (VECTASHIELD; #H-1500-1) i zamknięto szkiełkiem nakrywkowym. Obrazowanie preparatów na mikroskopie konfokalnym (Leica TCS SP8 WLL) z zastosowaniem przybliżeń 10- lub 40- krotnym przeprowadzone zostało przez Środowiskowe Laboratorium Obrazowania in vivo i in vitro w IF PAN, w

Krakowie. Scalenie oraz obróbkę zdjęć wykonano w programie LASX. Na wszystkich zdjęciach zastosowano ujednoczenie parametrów na wszystkich kanałach: 61 niebieski, 79 zielony.

Izolacja RNA

Zwierzęta zostały uśmiercone przez zerwanie kręgów szyjnych, po czym mózgi zostały przeniesione do RNAlater Stabilization Solution (Invitrogen) i utrwalone przez 24h w 4°C. Następnie pod binokulem StemiDV4 (Zeiss) z utrwalonych mózgowi igłami aptecznymi jednorazowego użytku, wyizolowane zostało prążkowie wraz z jądrem półleżącym. Wypreparowana tkanka została zamrożona w -20°C. Pierwszym krokiem izolacji RNA była homogenizacja tkanki. Próbkę rozmrożono, usunięto RNAlater i w probówkach umieszczono pęsetą 1 stalową kulkę, która potem posłużyła do homogenizacji tkanki w aparacie TissueLyser II (Qiagen). Próbkę umieszczono w kasetach do TissueLysera II, następnie pod dygestorium do każdej próbki dodano 1ml TRIzolu (Invitrogen). Wszystkie procedury odbywały się na lodzie. Po umieszczeniu kaset w statywie aparatu, próbki zostały poddane homogenizacji przez 3 minuty. Następnie obrócono sam statyw o 180° w poziomie i powtórzono proces przez kolejne 3 minuty. Zhomogenizowane próbki krótko zworteksowano i dodano do każdej po 200µl chloroformu, po czym ponownie krótko zworteksowano. W kolejnym kroku zwirowano próbki w 4°C przez 20 minut (12 000 g). Zebrano górną frakcję (wodną z RNA) – 450-500µl, przeniesiono do nowych probówek 1,5ml, dodano izopropanolu (450µl), przepipetowano (w celu dokładnego wymieszania), krótko zworteksowano. Przełożono do -70°C (20min), wirowano 4°C, (30min). Następnie nadsącz odciągnięto pipetą. Do osadu dodano 1ml 70% (wg./obj.) etanolu i zwirowano w 4°C przez 20 min (12 000 g). Ponownie odciągnięto nadsącz i zworteksowano. Próbkę były suszone przez 5 minut, zastosowano dodatkowe wirowanie w temperaturze pokojowej. Dalszym działaniem było dodanie 50µl wody wolnej od nukleaz, przeniesienie próbek do termobloku 65°C na 5 minut, zworteksowanie i przechowywanie w -20°C

W celu pomiaru stężenia RNA próbki rozmrożono na lodzie zworteksowano i krótko zwirowano. Uruchomiono program NanoDrop 1000, nałożono 1,5µl wody na urządzenie NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc.) w celu kalibracji. Następnie dokonano pomiarów stężeń wszystkich próbek. W tym celu w programie

NanoDrop 1000 wybrano ustawiania do analizy stężeń RNA; absorbancja równa 1 przy 260 nm odpowiada stężeniu RNA 40 µg/ml.

Odwrotna transkrypcja

Z każdej próbki pobrano taką objętość roztworu oraz dodano tyle wody aptecznej (Polpharma) aby w nowej probówce 1,5ml znalazło się po 2µg RNA w łącznej objętości 13µl. Przygotowano mieszaninę do reakcji odwrotnej transkrypcji (ilość na 1 próbkę: 2µl buforu RT i 2µl dNTPs z zestawu Omniscript RT Kit (200) (Quiagen), 2µl Oligo(dT)12-18 primer (Invitrogen), wodę wolną od nukleaz RNase-free water z zestawu Omniscript (Qiagen) - objętość zależna od stężenia RNA w próbce. Następnie do eppendorfów z próbkami z RNA dodano przygotowany roztwór oraz na koniec dodano enzym - odwrotną transkryptazę z zestawu Omniscript RT Kit (200) (Qiagen); łączna objętość mieszaniny 20µl. Próbki włożono do ciepłarki w 37°C (60 min). Po inkubacji dodano 380µl wody (20x rozcieńczenie) i zworteksowano.

Ilościowy PCR

Próbki z cDNA trzymano na lodzie. Z zamrażarki wyjęto sondy TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems): Mm01212875_m1 *Penk*, Mm00457573_m1 *Pdyn*, Mm00443063_m1 *Oprd1*, Mm01188089_m1 *Oprm1*, Mm01230885_m1 *Oprk1*, Mm02620146_s1 *Drd1a*, Mm00802131_m1 *Aqp4*, Mm00446968_m1 *Hprt1* i rozmrażano je osłonięte od światła, na lodzie. Do każdej probówki 1,5ml dodano TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) po 10µl × ilość próbek, następnie dodano po 1µl × ilość próbek sond. Kilkukrotnie delikatnie przepipetowano, krótko zworteksowano. W kolejnym kroku przepipetowano do każdego dołka na płytce Hard-Shell 96-Well PCR Plates (Bio-Rad) po 11µl mieszaniny MasterMix z odpowiednią sondą i na koniec dodano po 9µl cDNA. Płytkę zakleiono naklejką Microseal 'B' Adhesive Seals, Optical (Bio-Rad), wygładzono gładką, zabezpieczono brzegi przed odklejeniem i zwirowano krótko przy 2250 g. Następnie płytkę odpowiednio zorientowaną umieszczono w termocyklerze CFX96 Real-Time system (Bio-Rad). Na komputerze uruchomiono program Bio-Rad i wybrano procedurę RT-PCR, gdzie mierzono poziom fluorescencji FAM (karboksylfluoresceina) o maksymalnej fali absorpcji przydługości 495nm i emisji przy 517nm. Po przeprowadzeniu 45 cykli RT-PCR (50°C, 2min; 90°C, 10min; 45x (90°C, 15s; 60°C 1min), a następnie wyeksportowano wyniki do późniejszej analizy. Ustawiono próg (z ang. *threshold*) na

automatyczny, który wyniósł 151.40. Na jego podstawie wyliczane były wartości cykli progowych (C_t). Zastosowano normalizację danych do średniej wartości z grupy kontrolnej.

Analiza spektrometrii mas (nanoLC-MS/MS)

Zwierzęta zostały uśmiercone przez zerwanie kręgow szyjnych, po czym mózgi zostały pocięte na skrawki grubości ok. 1mm żyłkami w Mouse Brain matrix. Następnie pod binokulem StemiDV4 (Zeiss), z pojedynczych skrawków igłami wyizolowana została gałka biała, przełożona do probówki 1,5ml w której znajdowało się 500 μ l roztworu 10xTBS (20 mM Tris, 137 mM NaCl) o pH 7,4. Próbkę zhomogenizowano krótko za pomocą rotora-statora Ultra Turrax T8 (IKA) i od razu zamrożono w suchym lodzie. Całość procedury zajęła około 3-3,5minuty.

Kolejny etap został zlecony do wykonania przez Środowiskowe Laboratorium Proteomiki i Spektrometrii Mas Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie. Analizę Nano Chromatografii cieczonej w połączeniu z tandemową analizą spektrometrii mas (nanoLC-MS/MS) zastosowaną do rozdzielania peptydów przeprowadzono przy użyciu systemu chromatografii nanokapilarnej UltiMate 3000 Nano LC. Rozdziały zostały wykonane z wykorzystaniem kolumny PepMap (1 cm długości, 75 μ m ID, C18, 3 μ m rozmiar cząstek, rozmiar porów 100 Å, Thermo-Scientific) przy użyciu 0,1% HCOOH w wodzie (rozpuszczalnik A) i 0,1% HCOOH w 80% acetonitrylu (rozpuszczalnik B), przy prędkości przepływu 300 nL/min. System kontrolowany był przez oprogramowanie Hystar (Bruker Daltonics). Gradient wytworzono z 4 do 45% roztworu B przez 100 minut, aż do 90% przez 10 minut i ponownie zredukowany do 4% aż do upływu 120min. System chromatograficzny był bezpośrednio sprzężony ze Spektrometrem mas AmazonSL (Bruker Daltonics). Instrument działał w trybie jonów dodatnich. Podczas analizy dwa najbardziej intensywne piki (próg powyżej 400 000) w zakresie 300–1600 m/z zostały automatycznie sfragmentowane przy użyciu CID (widm fragmentacji wywołanej zderzeniowo) w trybie akwizycji zależnej od danych.

Metody statystyczne

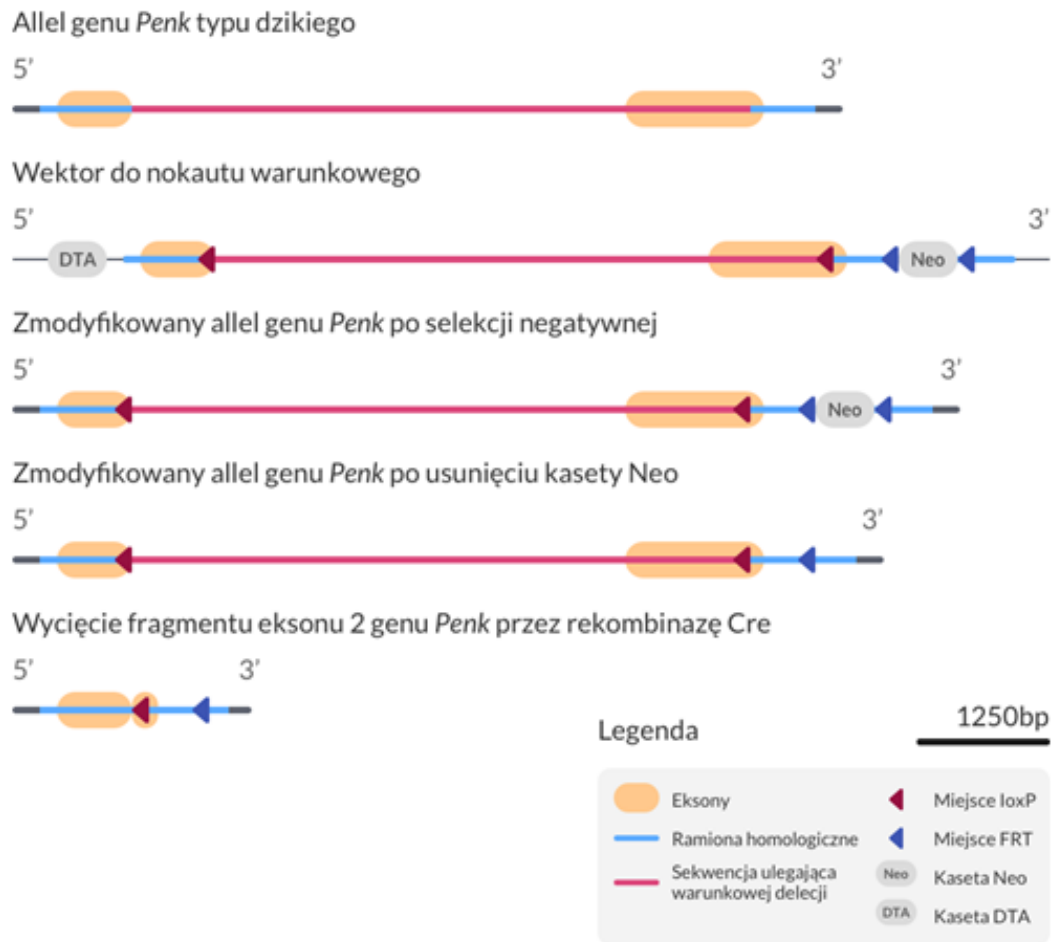
Analizę statystyczną przeprowadzono w programie GraphPad Prism 8 oraz Microsoft Excel z pakietu Microsoft Office. Do porównań wykorzystano test Kruskala-Wallisa oraz test wielokrotnych porównań Dunn'a.

Wyniki

Wytworzenie modelu myszy z warunkową delecją genu *Penk*

Pierwszym etapem, wykonanym w ramach zlecenia przez firmę Cyagen, było utworzenie modelu myszy z wprowadzonymi sekwencjami loxP w genie *Penk* (Ensembl: ENSMUSG00000045573), który znajduje się na chromosomie 4. W kanonicznej transkrypcji genu występują 2 eksony; z kodonem start ATG w egzonie 1 i kodonem stop TGA w egzonie 2 (Transkrypt: ENSMUST00000070375). Do opracowania konstruktów wariantu genu flox wykorzystano region egzonu drugiego. Rekombinacja genu powoduje usunięcie całej sekwencji kodującej preproenkefalinę.

W tym celu utworzono konstrukt wykorzystując sekwencję genu *Penk* zawartą na konstrukcjach BAC RP23-402E21 i RP23-76M24. Konstrukt zawierał: sekwencję kodującą genu *Penk*, homologiczne sekwencje flankujące gen oraz sekwencje loxP wyznaczające obszar ulegający warunkowej delecji. Dodatkowo, na konstrukcie umieszczono geny pozwalające na negatywną (DTA – fragment A toksyny błoniczej) i pozytywną (Neo – neomycyna) selekcję. Wektor został wprowadzony do mysich embrionalnych komórek macierzystych z linii 5C11 za pomocą elektroporacji. Konstrukt został wbudowany do genomu na drodze homologicznej rekombinacji. Wbudowanie się konstruktów potwierdzono dzięki selekcji pozytywnej – w hodowli pozostały jedynie komórki zawierające gen neomycyny znajdujący się w regionie homologicznym. Wykluczono zajście rekombinacji niehomologicznej dzięki selekcji negatywnej – u pozostałych w hodowli komórek sekwencja DTA z racji, iż nie znajdowała się w regionie homologii, nie ulegała wbudowaniu w genom (Ryc.2).



Ryc.2 Schemat przedstawiający etapy modyfikacji genetycznych prowadzących do wytworzenia myszy *Penk* KO.

Następnie za pomocą mikroiniekcji wprowadzono komórki ES do mysiej blastocysty, którą wszczepiono się pseudociężarnej samicy, w celu uzyskania założyciela linii flox. Z potomstwa wyselekcjonowano chimerę, którą skrzyżowano ze zwierzęciem [wt/wt] (Ryc.3). Kolejne etapy zostały przeprowadzone w IF PAN, w Krakowie. Pojawienie się w potomstwie zwierzęcia z wariantem flox genu *Penk* potwierdzono poprzez genotypowanie z wykorzystaniem techniki PCR na lizowanych biopsjach końcówki ogona (Ryc.4). Przeprowadzono kilka pokoleń krzyżowań.

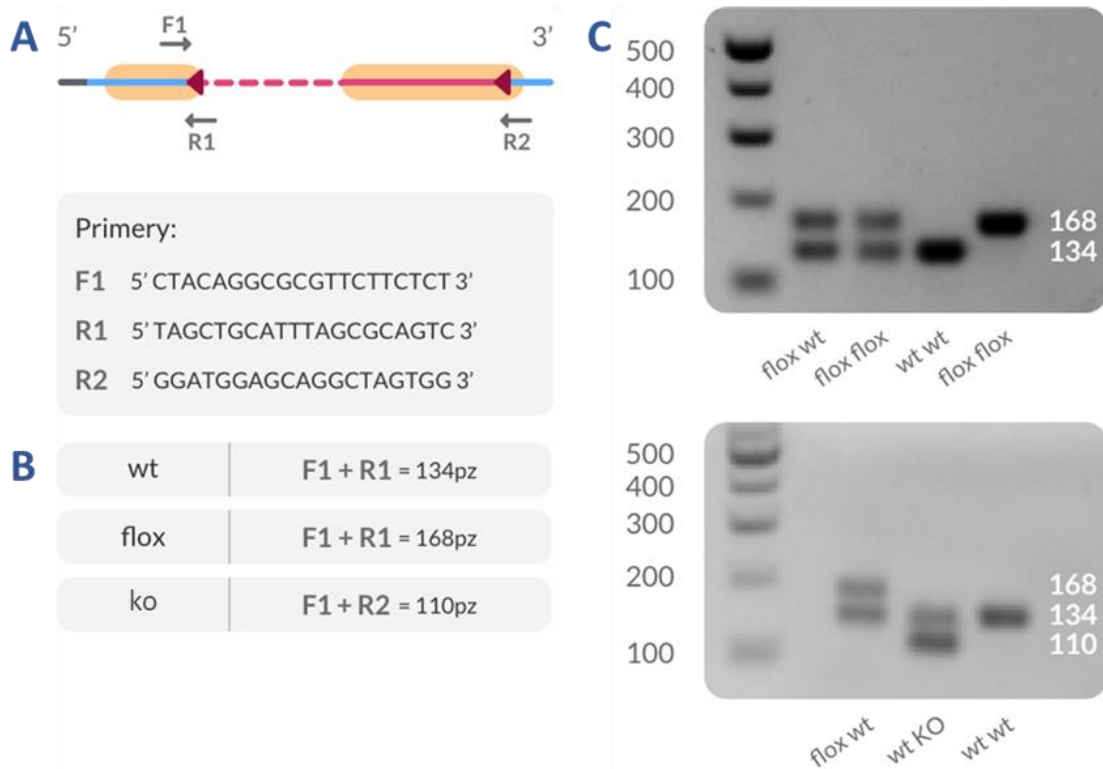
Kolejnym etapem było wytworzenie myszy z delecją genu *Penk*. W tym celu skrzyżowano zwierzęta: [wt/flox] x SynCre [Tg/wt] (Ryc.3). Ponownie przeprowadzono kilka pokoleń krzyżowań. Najbardziej pożądanym zwierzęciem z urodzonego potomstwa



Ryc.3 Schemat krzyżowań prowadzący do wytworzenia myszy *Penk flox/flox*, *Drd2Cre [Tg/0]*; *Penk flox/flox* i *Penk wt/KO*.

był samiec SynCre [Tg/wt]; [flox/wt]. Przyczyną takiego doboru genotypów jest fakt, iż ekspresja transgeny jest aktywna w męskiej linii zarodkowej i może powodować rekombinację tej linii u potomstwa – w tym przypadku umożliwi to zajęcie wycięcia miejsca flankowanego sekwencjami loxP w genie *Penk* przez rekombinazę Cre (*Ryc.2*). Opisanego samca skrzyżowano z samicą bez mutacji genetycznych na tym samym tle genetycznym (C57BL/6N) (*Ryc.2*). Wśród potomstwa potwierdzono występowanie myszy *Penk KO* (*Ryc.4*).

Alternatywnie przeprowadzono krzyżówki myszy [wt/flox] x *Drd2Cre [Tg/0]*. Po uzyskaniu zwierzęcia heterozygotycznego pod względem obu cech, przeprowadzono kilka pokoleń krzyżowań (*Ryc.3*). W ten sposób wytworzono mysz *Drd2Cre [Tg/0]*; [flox/flox].

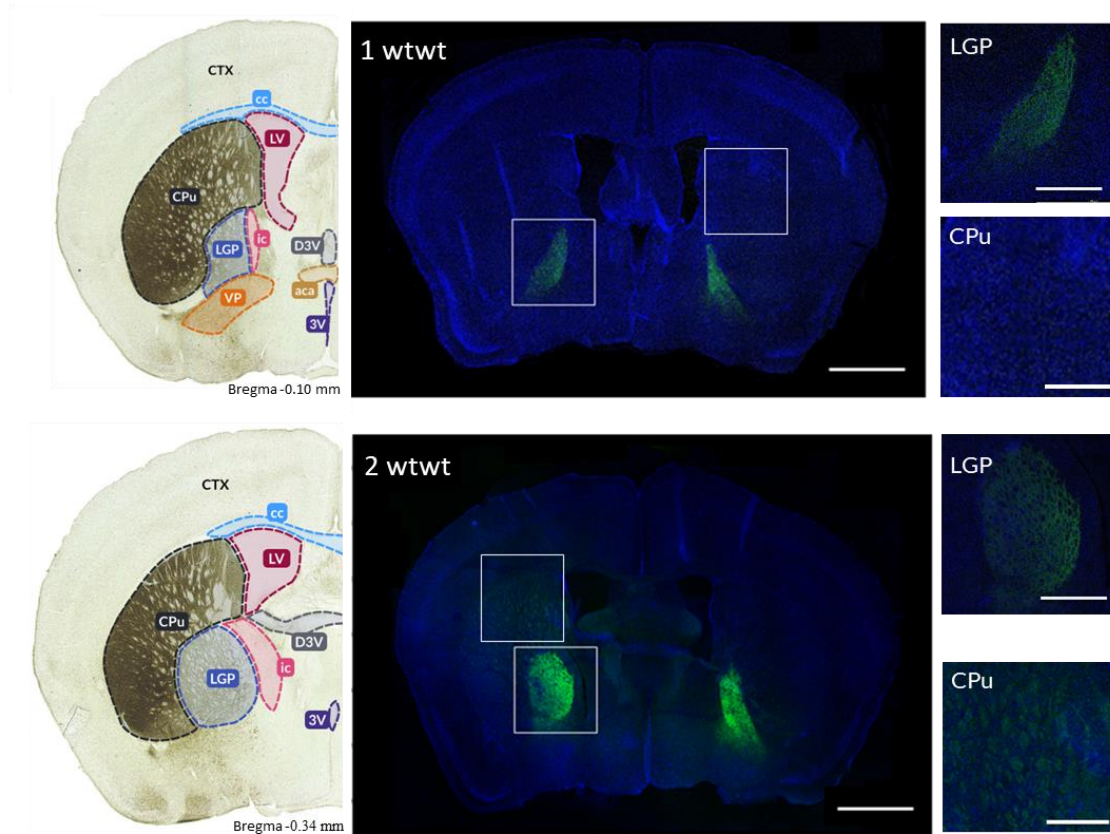


Ryc.4 Wynik analizy PCR dla poszczególnych genotypów. **A)** Schematyczne przedstawienie miejsc przyłączania się primerów w obszarze genu *Penk*. **B)** Przykładowy wynik genotypowania zwierząt z allelem *flox*. Obecność dwóch prążków (pierwsze dwa ślady) wskazuje na heterozygotyczność, jeden prążek przy ~168pz to *flox/flox*, kolejny prążek przy ~134pz odpowiada myszy [*wt/wt*], prążek ~110pz jest charakterystyczny dla *Penk* KO. **C)** Wizualizacja produktów PCR na żelu agarozowym.

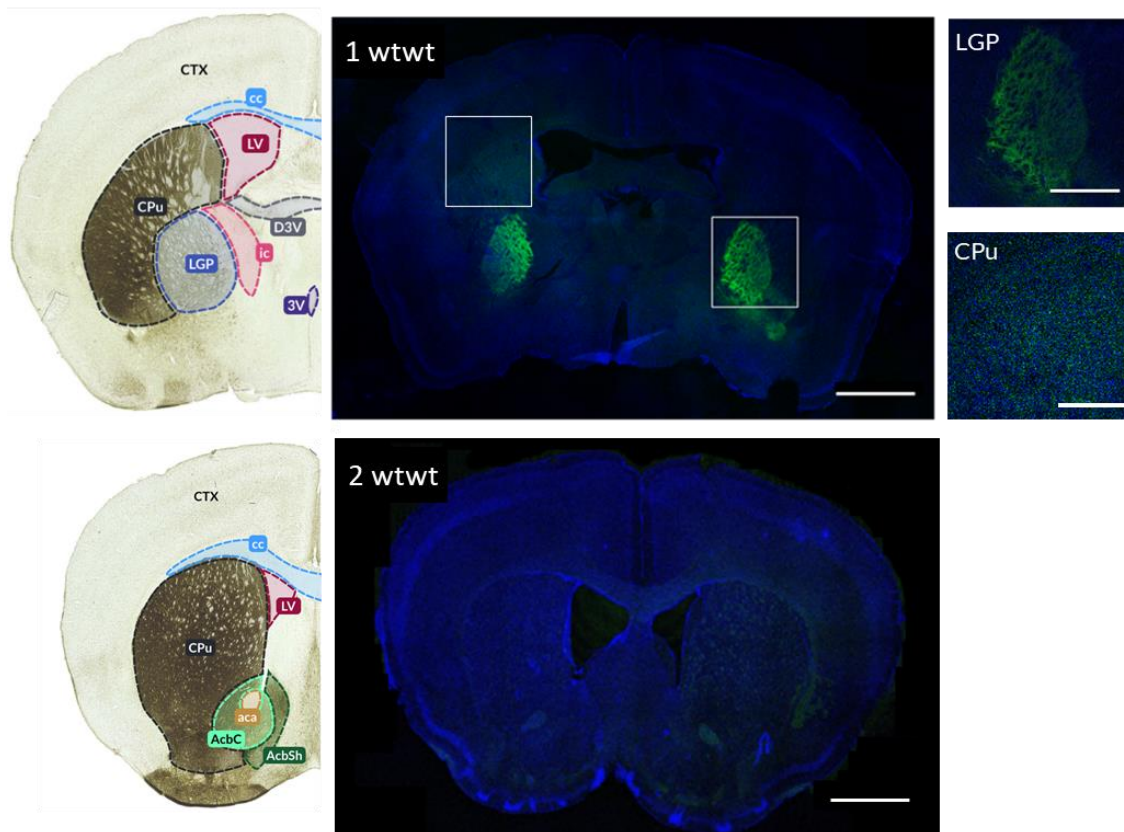
Wyniki barwień immunofluorescencyjnych

W celu weryfikacji efektów wprowadzenia mutacji *flox* w genie *Penk*, przeprowadzone zostały barwienia immunofluorescencyjne z wykorzystaniem przeciwciał skierowanych przeciwko preproenkefalinie. Przeprowadzone barwienie miało charakter jakościowy. Obrazowanie wyników przeprowadzone zostało przez Środowiskowe Laboratorium Obrazowania *in vivo* i *in vitro* w IF PAN, w Krakowie. Najbardziej powtarzalnym wynikiem u zwierząt bez mutacji genetycznych okazały się sygnały pochodzące z gałki bladej oraz prążkowia (Ryc.5, 6). Podobne wyniki akumulacji białka preproenkefaliny w gałce bladej (w części zewnętrznej) zaobserwowano w badaniach z wykorzystaniem analizy MALDI-TOF-MSI (Hulme i in., 2020); potwierdza się to także z obszarami występowania RNA białka preproenkefaliny (2004 Allen Institute for Brain Science. Allen Mouse Brain Atlas. Dostęp z: <https://mouse.brain->

map.org/). W mniejszym stopniu zaobserwowano fluorescencję w jądrze pólężącym oraz w I rzędowej korze motorycznej. Obserwowany sygnał był wyraźnie silniejszy w istocie białej prążkowiecia i gałki bladej.



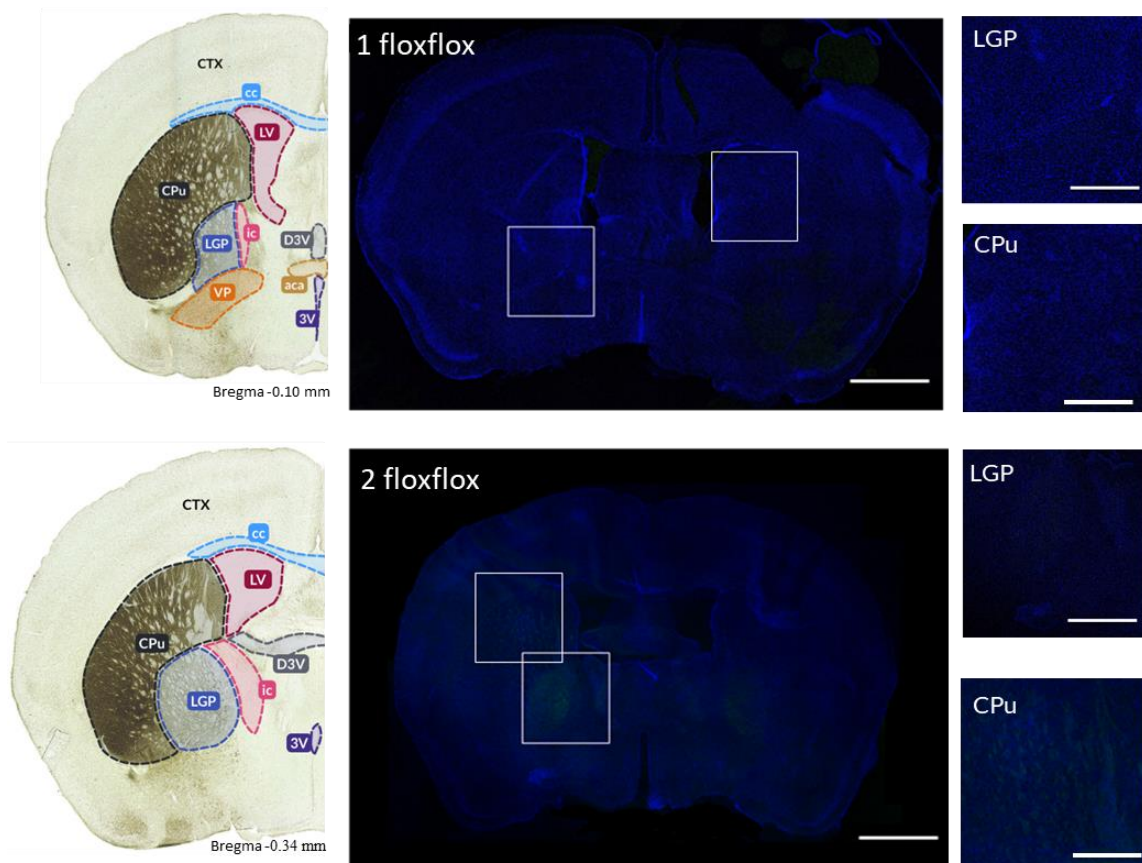
Ryc.5 Ekspresja preproenkefaliny u myszy o genotypie: 1) 5582 wt/wt; 2) 5966 wt/wt; na tle C57BL/6N. Od lewej: referencyjne fragmenty atlasu (*The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Paxinos i Franklin); konfokalne obrazy przedstawiające cięcia czołowe mysiego mózgu zabarwionego DAPI (jądra komórkowe) i Alexa 488 (preproenkefalina) w powiększeniach kolejno kolumnami: 10x cały skrawek, 40x poszczególne struktury LGP lub CPu. Zielony barwnik ma długość fali absorpcji, która osiąga wartości szczytowe około 496 nm., i maksymalną emisję około 519 nm. Zielona fluorescencja widoczna jest przede wszystkim w gałce bladej oraz w mniejszym stopniu w prążkowieciu. Powiększenie 10x pasek skali 1000 μm ., powiększenie 40x pasek skali 500 μm . **LGP**, boczna gałka bladej; **VP**, brzuszna gałka bladej; **CPu**, jądro ogoniaste; **CTX**, kora mózgowa; **cc**, ciało modzelowate; **aca**, spoidło przednie; **ic**, torebka wewnętrzna; **LV**, boczna komora; **D3V**, grzbietowa komora trzecia; **3V**, komora trzecia.



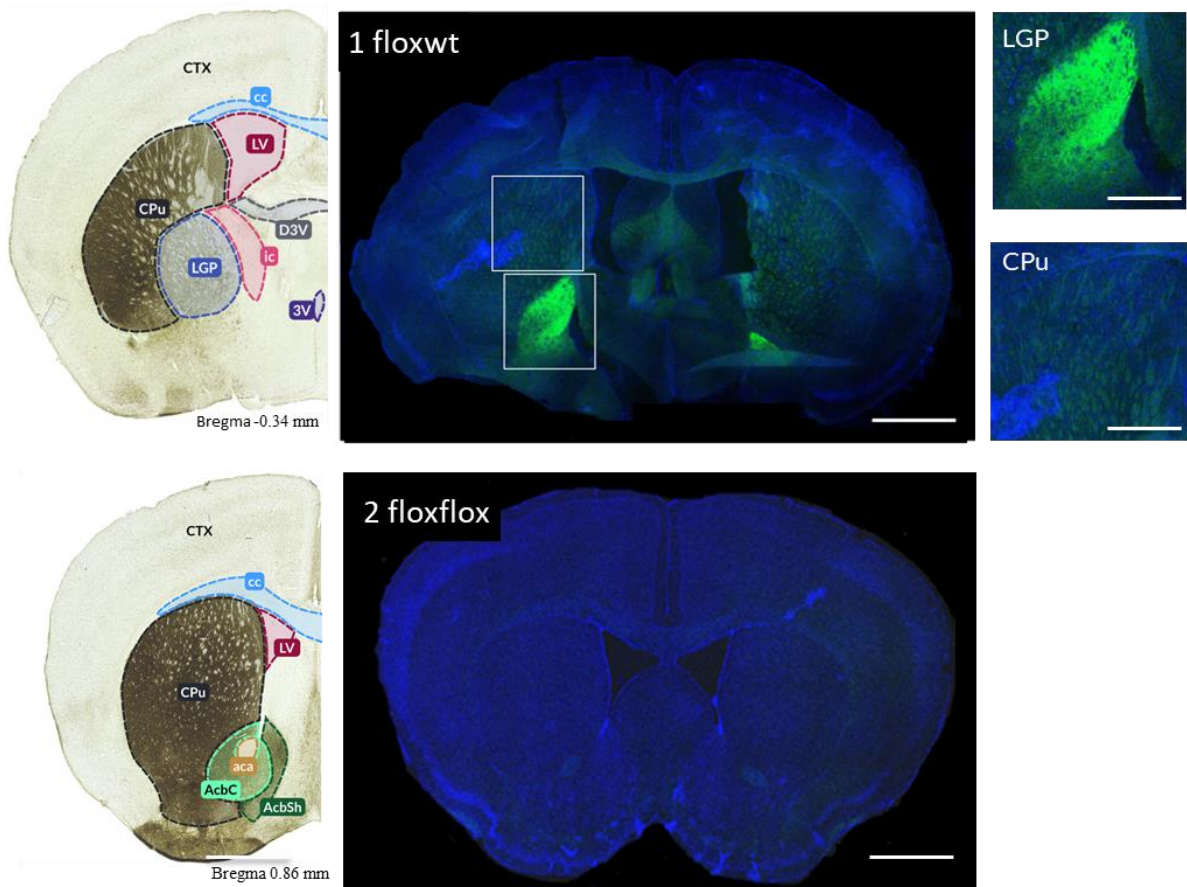
Ryc.6 Ekspresja preproenkefaliny u myszy o genotypie: 1) 5967 wt/wt; 2) 5181 wt/wt; na tle C57BL/6N. Od lewej: referencyjne fragmenty atlasu (*The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Paxinos i Franklin); konfokalne obrazy przedstawiające cięcia czołowe mysiego mózgu zabarwionego **DAPI** (jądra komórkowe) i **Alexa 488** (preproenkefalina) w powiększeniach kolejno kolumnami: 10x cały skrawek, 40x poszczególne struktury LGP lub CPu. Zielony barwnik ma długość fali absorpcji, która osiąga wartości szczytowe około 496 nm., i maksymalną emisję około 519 nm. Zielona fluorescencja widoczna jest przede wszystkim w gałce bladej oraz w mniejszym stopniu w prążkowiu. Powiększenie 10x pasek skali 1000 μm ., powiększenie 40x pasek skali 500 μm . **LGP**, boczna gałka bladej; **VP**, brzuszna gałka bladej; **CPu**, jądro ogoniaste; CTX, kora mózgowa; **cc**, ciało modzelowate; **aca**, spoidło przednie; **ic**, torebka wewnętrzna; **LV**, boczna komora; **D3V**, grzbietowa komora trzecia; **3V**, komora trzecia; **AcbC**, jądro półleżące, rdzeń; **AcbSh**, jądro półleżące, skorupa.

U myszy heterozygotycznych pod względem cechy występowania sekwencji loxP zauważono fluorescencję podobną do wyników otrzymanych dla myszy o genotypie [wt/wt] w prążkowiu oraz w gałce bladej (Ryc.8). Wynik ten oznacza, że obecność jednego allelu *Penk flox* nie miała zauważalnego wpływu na ekspresję preproenkefaliny. Wystąpienie niespecyficznego fluorescencji w takich strukturach jak ciało modzelowate czy spoidło przednie (Ryc.8) najprawdopodobniej jest spowodowane niecałkowitym odpłukaniem przeciwciała II rzędowego podczas przeprowadzania procedury. Z kolei w

przypadku zwierząt o genotypie [flox/flox] barwienie jest bardzo słabo widoczne lub nieobserwowalne, włączając w to gałkę bladą oraz prążkowie (Ryc.7, 8). Wynik ten świadczy o silnym zahamowaniu ekspresji genu *Penk* przez obecność wprowadzonych sekwencji flox.



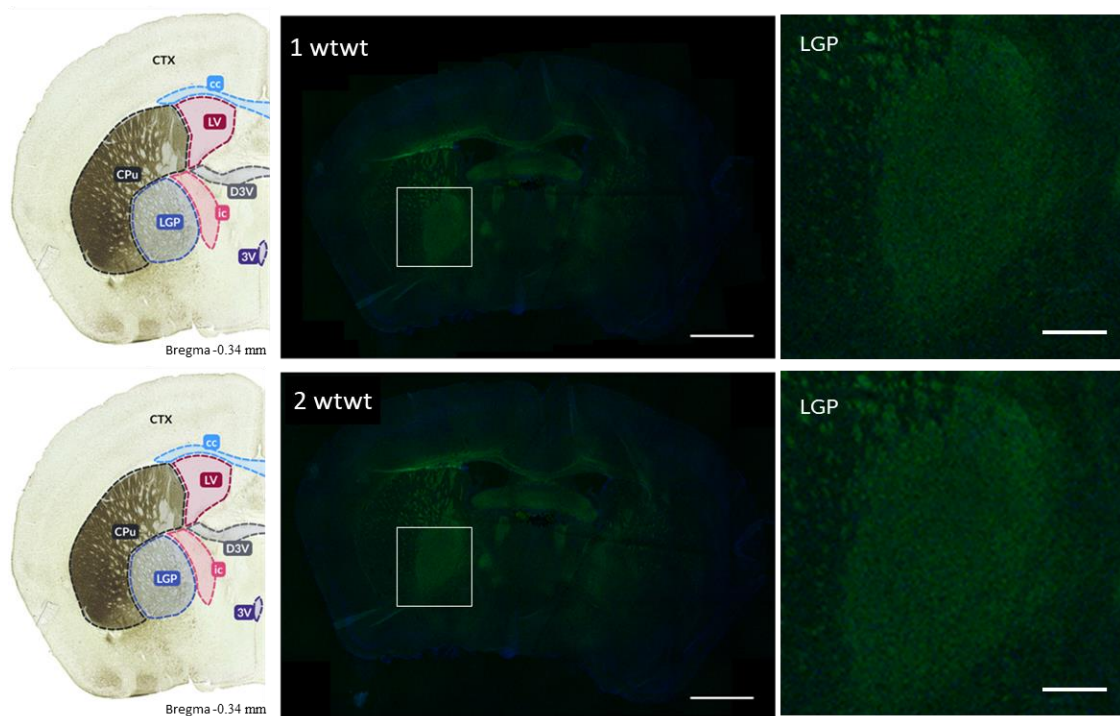
Ryc.7 Ekspresja preproenkefaliny u myszy o genotypie 1) 5581 flox/flox; 2) 5835 flox/flox; na tle C57BL/6N. Od lewej: referencyjne fragmenty atlasu (*The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Paxinos i Franklin); konfokalne obrazy przedstawiające cięcia czołowe mysiego mózgu zabarwionego DAPI (jądra komórkowe) i Alexa 488 (preproenkefalina) w powiększeniach kolejno kolumnami: 10x cały skrawek, 40x poszczególne struktury LGP lub CPu. Każdy skrawek pochodzi z innego zwierzęcia. Zielony barwnik ma długość fali absorpcji, która osiąga wartości szczytowe około 496 nm., i maksymalną emisję około 519 nm. Zielona fluorescencja widoczna jest przede wszystkim w gałce bladej oraz w mniejszym stopniu w prążkowie. Powiększenie 10x pasek skali 1000 μm ., powiększenie 40x pasek skali 500 μm . LGP, boczna gałka bladej; VP, brzuszna gałka bladej; CPu, jądro ogoniaste; CTX, kora mózgowa; cc, ciało modzelowate; aca, spoidło przednie; ic, torebka wewnętrzna; LV, boczna komora; D3V, grzbietowa komora trzecia; 3V, komora trzecia.



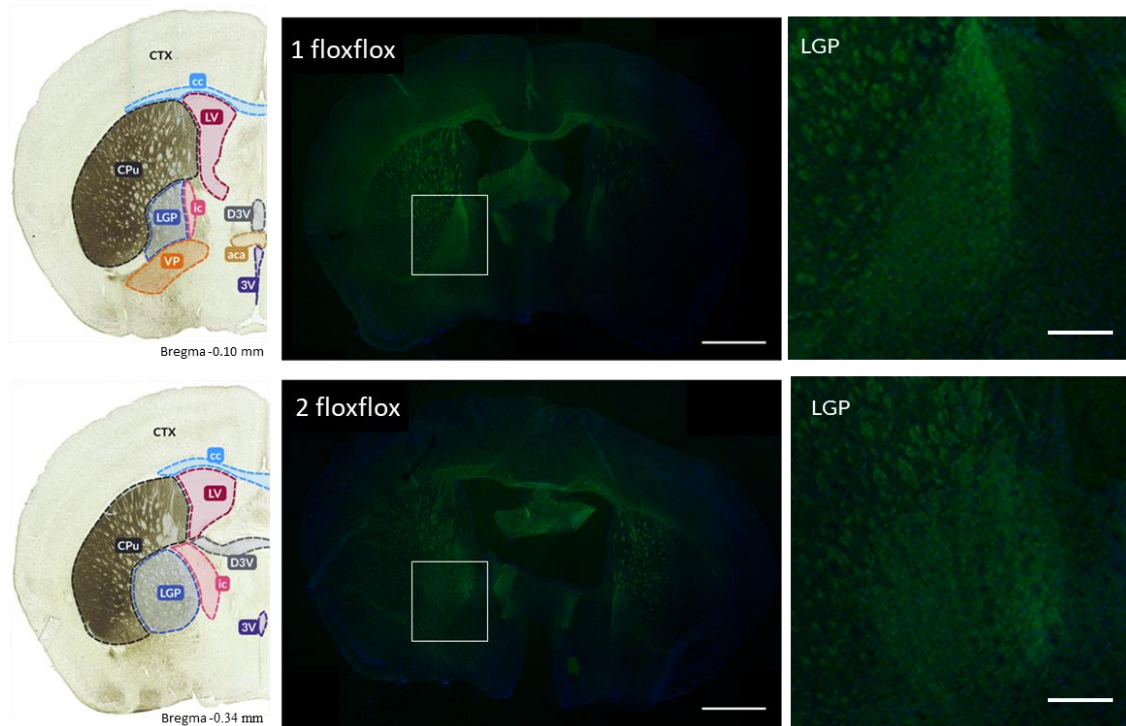
Ryc.8 Ekspresja preproenkefaliny u myszy o genotypie 1) 5060 flox/wt; 2) 5144 flox/flox; na tle C57BL/6N. Od lewej: referencyjne fragmenty atlasu (*The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Paxinos i Franklin); konfokalne obrazy przedstawiające cięcia czołowe mysiego mózgu zabarwionego DAPI (jądra komórkowe) i Alexa 488 (preproenkefalina) w powiększeniach kolejno kolumnami: 10x cały skrawek, 40x poszczególne struktury LGP lub CPu. Każdy skrawek pochodzi z innego zwierzęcia. Zielony barwnik ma długość fali absorpcji, która osiąga wartości szczytowe około 496 nm., i maksymalną emisję około 519 nm. Zielona fluorescencja widoczna jest przede wszystkim w gałce bladej oraz w mniejszym stopniu w prążkowiu. Powiększenie 10x pasek skali 1000 μm ., powiększenie 40x pasek skali 500 μm . **LGP**, boczna gałka bladej; **VP**, brzuszna gałka bladej; **CPu**, jądro ogoniaste; **CTX**, kora mózgowa; **cc**, ciało modzelowate; **aca**, spoidło przednie; **ic**, torebka wewnętrzna; **LV**, boczna komora; **D3V**, grzbietowa komora trzecia; **3V**, komora trzecia; **AcbC**, jądro półleżące, rdzeń; **AcbSh**, jądro półleżące, skorupa.

Z kolei wyniki barwienia z wykorzystaniem przeciwciał skierowanych przeciw peptydowi Leu-enkefalinie dały trudne do zinterpretowania wyniki. Ze względu na trudności techniczne barwienia tego peptydu, koniecznym krokiem było zastosowanie wysokich stężeń przeciwciał pierwszo- i drugorzędowych, co w rezultacie dało wyraźne barwienie niespecyficzne. Miejsce szczególnie wyróżniające się natężeniem sygnału w

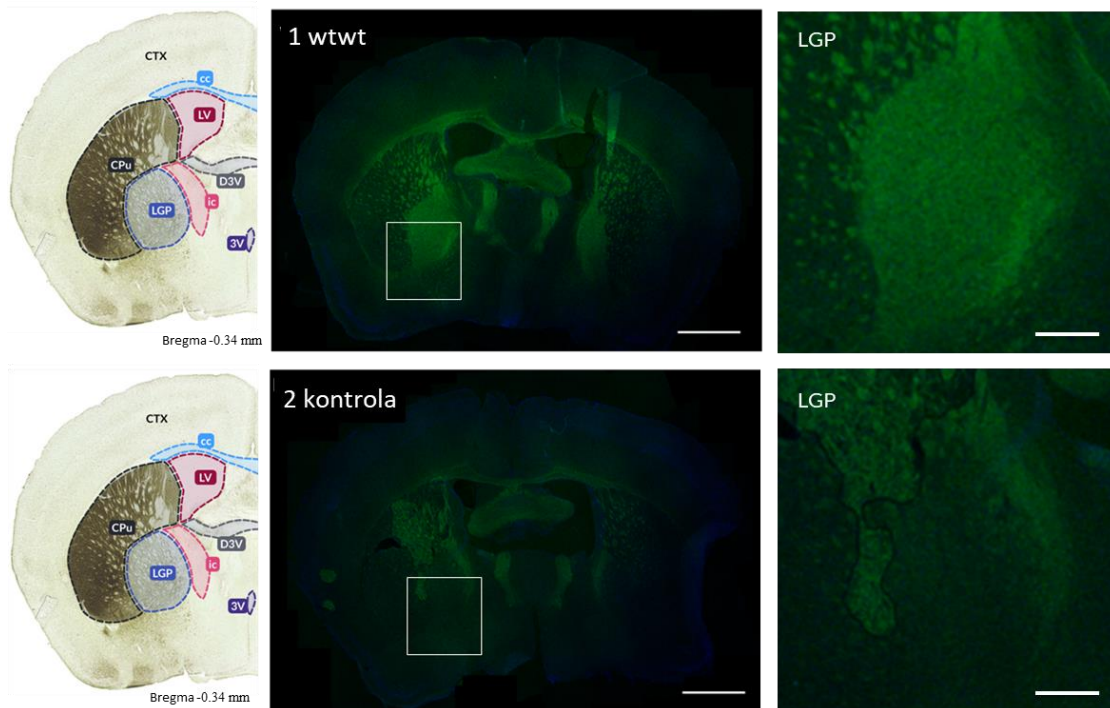
porównaniu do kontroli, gdzie zastosowano jedynie przeciwciało II rzędowe (w takim samym stężeniu jak w przypadku doświadczalnym, bez przeciwciała I rzędowego) jest gałka błada (Ryc.9, 10, 11). W tym wyniku nie zaobserwowano wyraźnych różnic pomiędzy genotypami [flox/flox] oraz [wt/wt]. Ze względu na to, że białko preproenkefaliny jest głównym prekursorem peptydu Leu-enkefaliny, a jego ekspresja prawdopodobnie została zaburzona przez sekwencje loxP, stąd oczekiwane były zmiany w wynikach fluorescencji. Ze względu na brak pewności co do swoistości obserwowanego sygnału, nie można postawić jednoznacznych wniosków.



Ryc.9 Ekspresja Leu-enkefaliny w prążkowiu u myszy o genotypie **1**) 5967 wt/wt; **2**) 5966 wt/wt, na tle C57BL/6N. Od lewej: referencyjne fragmenty atlasu (*The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Paxinos i Franklin); konfokalne obrazy przedstawiające cięcia koronalne mysiego mózgu zabarwionego DAPI (jądra komórkowe) i Alexa 488 (Leu-enkefalina) w powiększeniach kolejno kolumnami: 10x, 40x, 10x. Ze względu na duże tło, referencyjnie zaprezentowano skrawek, który potraktowano tylko przeciwciałami II rzędowymi. Zielona fluorescencja będąca potencjalnie specyficznym sygnałem dla przeciwciał anti-Leu-enk widoczna jest przede wszystkim w gałce bladej. Powiększenie 10x pasek skali 1000 μm ., powiększenie 40x pasek skali 500 μm . **LGP**, boczna gałka błada; **VP**, brzuszna gałka błada; **CPu**, jądro ogoniaste; **CTX**, kora mózgowa; **cc**, ciało modzelowate; **aca**, spoidło przednie; **ic**, torebka wewnętrzna; **LV**, boczna komora; **D3V**, grzbietowa komora trzecia; **3V**, komora trzecia.



Ryc.10 Ekspresja Leu-enkefaliny w prążkowiu u myszy o genotypie **1)** 5835 flox/flox; **2)** 5834 flox/flox, na tle C57BL/6N. Od lewej: referencyjne fragmenty atlasu (*The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Paxinos i Franklin); konfokalne obrazy przedstawiające cięcia koronalne mysiego mózgu zabarwionego DAPI (jądra komórkowe) i Alexa 488 (Leu-enkefalina) w powiększeniach kolejno kolumnami: 10x, 40x, 10x. Ze względu na duże tło, referencyjnie zaprezentowano skrawek, który potraktowano tylko przeciwciałami II rzędowymi. Zielona fluorescencja będąca potencjalnie specyficznym sygnałem dla przeciwciał anti-Leu-enk widoczna jest przede wszystkim w gałce bladej. Powiększenie 10x pasek skali 1000 μm ., powiększenie 40x pasek skali 500 μm . **LGP**, boczna gałka bladej; **VP**, brzuszna gałka bladej; **CPu**, jądro ogoniaste; **CTX**, kora mózgowa; **cc**, ciało modzelowate; **aca**, spoidło przednie; **ic**, torebka wewnętrzna; **LV**, boczna komora; **D3V**, grzbietowa komora trzecia; **3V**, komora trzecia.



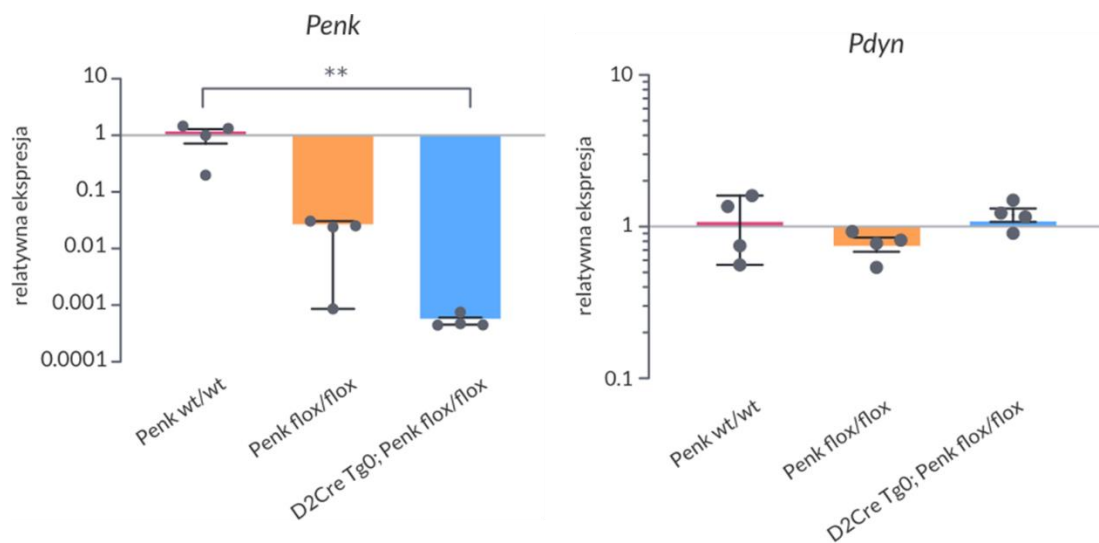
Ryc.11 Ekspresja Leu-enkefaliny w prążkowie u myszy o genotypie **1)** 5966 wt/wt; **2)** 5967 wt/wt, na tle C57BL/6N. Od lewej: referencyjne fragmenty atlasu (*The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Paxinos i Franklin); konfokalne obrazy przedstawiające cięcia koronalne mysiego mózgu zabarwionego DAPI (jądra komórkowe) i Alexa 488 (Leu-enkefalina) w powiększeniach kolejno kolumnami: 10x, 40x, 10x. Ze względu na duże tło, referencyjnie zaprezentowano skrawek, który potraktowano tylko przeciwciałami II rzędowymi. Zielona fluorescencja będąca potencjalnie specyficznym sygnałem dla przeciwciał anti-Leu-enk widoczna jest przede wszystkim w gałce bladej. Powiększenie 10x pasek skali 1000 μm ., powiększenie 40x pasek skali 500 μm . **LGP**, boczna gałka bladej; **VP**, brzuszna gałka bladej; **CPu**, jądro ogoniaste; **CTX**, kora mózgowa; **cc**, ciało modzelowate; **aca**, spoidło przednie; **ic**, torebka wewnętrzna; **LV**, boczna komora; **D3V**, grzbietowa komora trzecia; **3V**, komora trzecia.

Wyniki analizy pomiaru zawartości transkryptów genów

W celu dalszej weryfikacji fenotypu jaki niesie ze sobą mutacja w genie *Penk* przeprowadzono ilościową analizę ekspresji genów qPCR w prążkowie z wykorzystaniem myszy *Penk* [flox/flox] i *Drd2Cre*; *Penk* [flox/flox] oraz myszy kontrolnych. U myszy *Penk* [flox/flox] zaobserwowano około 50-krotnie mniejszą względną abundancję transkryptu *Penk* w porównaniu do kontroli, a u zwierząt *Drd2Cre*; *Penk* [flox/flox] około 1900-krotnie mniejszą (Ryc.12). Znamienna była jedynie różnica w poziomie transkryptu *Penk* między myszami kontrolnymi D2, niemniej niezależne doświadczenie (niezaprezentowane w pracy) pokazało podobną do zaobserwowanej

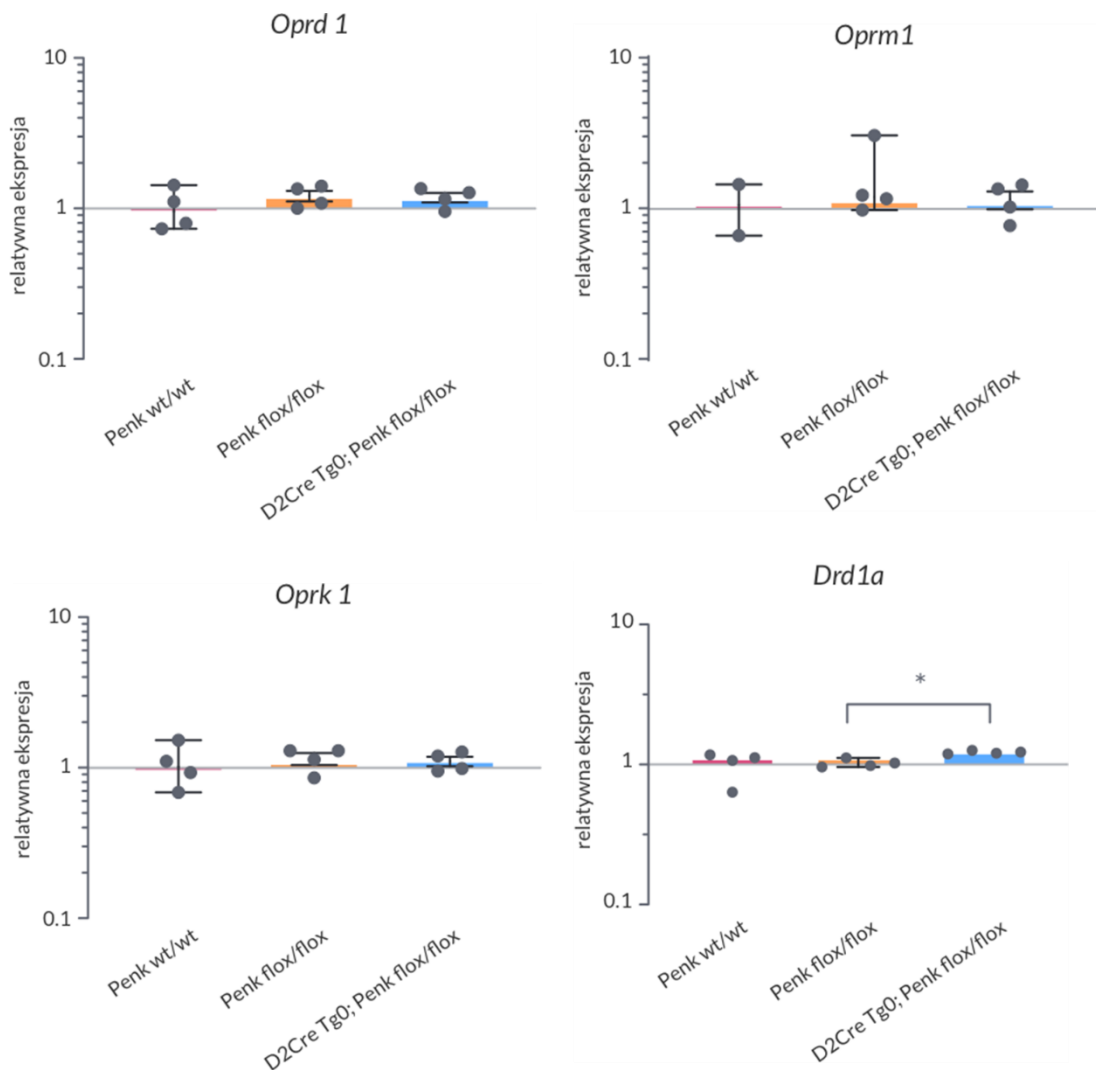
różnicę między flox i wt, stąd też wynik ten jest interpretowany jako potwierdzenie, że obecność miejsc loxP zaburzyła ekspresję genu. Świadczy to o różnicach w ekspresji genu *Penk* pomiędzy poszczególnymi genotypami, w przypadku występowania sekwencji loxP w genie *Penk* w całym mózgu oraz selektywnie w komórkach D2 prążkowie.

Populacje neuronów prążkowie w 90% stanowią MSN, które ze względu na projekcje można podzielić neurony ścieżki pośredniej (D2) i bezpośredniej (D1). Niezależnie od rodzaju genotypu z mutacją, dotykała ona głównie komórek D2, nie D1, w których jest produkowana prodynorfina. Ponieważ zaobserwowano zmniejszoną ekspresję białka preproenkefaliny (główny prekursor Leu-enkefaliny), postanowiono sprawdzić, czy w wyniku zmian kompensacyjnych wystąpiła zwiększona ekspresja genu innego białka prekursorowego dla tego peptydu – prodynorfiny. Nie zaobserwowano jednak różnic pomiędzy grupami w ekspresji genów kodujących to białko (*Ryc.12*).



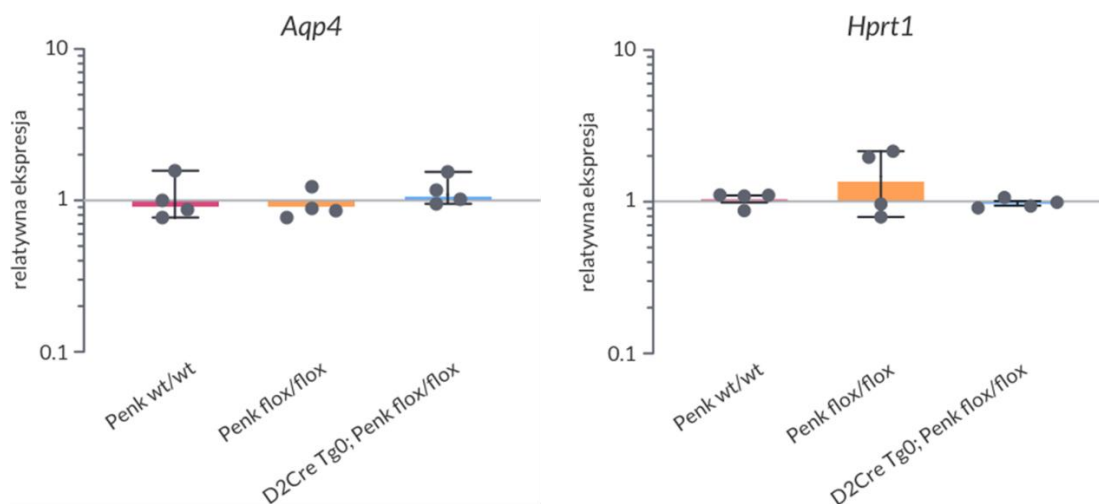
Ryc.12 Względne ilości transkryptów genów *Penk*, *Pdyn* dla myszy o genotypach [wt/wt], [flox/flox], D2Cre [Tg/0]; *Penk* [flox/flox], *Penk* [wt/wt]. Słupki odpowiadają medianie \pm 95% przedział ufności (n = 4), a wartości reprezentują względne ilości transkryptów genów po normalizacji względem średniego poziomu ekspresji u zwierząt *Penk* [wt/wt]. Do analizy statystycznej zastosowano test Kruskala-Wallisa oraz jako post-hoc test wielokrotnych porównań Dunn'a. $**p < 0.01$.

Oznaczone zostały również poziomy transkryptów kodujących receptory opioidowe δ , μ i κ (*Ryc.7C, D, E*). Nie zaobserwowano różnic pomiędzy grupami; warto zaznaczyć, iż przy *Oprm1* w dwóch próbkach reakcja nie dała produktów. We względnej ekspresji genu *Drd1a* będącym markerowym dla neuronów dopaminowych D1 wykryto istotną statystycznie różnicę pomiędzy genotypem [flox/flox] (mediana 1,01), a [Tg/0; flox/flox] (mediana 1,22) (*Ryc.13*). Warto zaznaczyć, że różnica była bardzo niewielka oraz grupy badawcze były nieliczne.



Ryc.13 Względne ilości transkryptów genów *Oprd1*, *Oprm1*, *Oprk1*, *Drd1a* dla myszy o genotypach [wt/wt], [flox/flox], D2Cre [Tg/0]; *Penk* [flox/flox], *Penk* [wt/wt]. Słupki odpowiadają medianie \pm 95% przedział ufności (n = 4), a wartości reprezentują względne ilości transkryptów genów po normalizacji względem średniego poziomu ekspresji u zwierząt *Penk* [wt/wt]. Do analizy statystycznej zastosowano test Kruskala-Wallisa oraz jako post-hoc test wielokrotnych porównań Dunn'a. * $p < 0.05$.

Nie zauważono istotnych różnic w ekspresji genu *Aqp4*, który jest genem swoistym dla astrogleju (*Ryc.14*). Zmiana jego ekspresji mogłaby świadczyć o zaburzonej przez mutację proporcji różnych rodzajów komórek. Gen *Hprt1* koduje fosforybozylotransferazę hipoksantynowo-guaninową, która odgrywa centralną rolę w wytwarzaniu nukleotydów purynowych poprzez szlak odzyskiwania puryn. Gen ten jest wykorzystywany jako kontrola w qPCR, ze względu na małą zmienność ekspresji. Brak różnic w ekspresji *Hprt1* potwierdza poprawność techniczną przeprowadzonej analizy (*Ryc.14*).

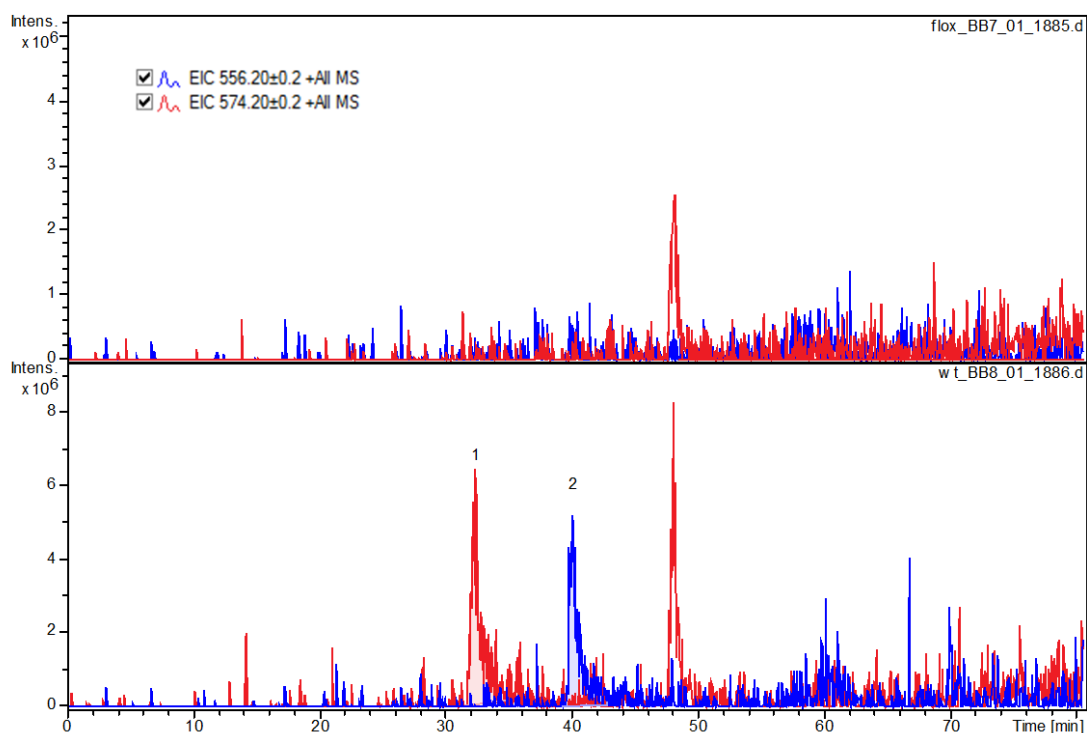


Ryc.14 Względne ilości transkryptów genów *Aqp4*, *Hprt* dla myszy o genotypach [wt/wt], [flox/flox], D2Cre [Tg/0]; *Penk* [flox/flox], *Penk* [wt/wt]. Słupki odpowiadają medianie \pm 95% przedział ufności (n = 4), a wartości reprezentują względne ilości transkryptów genów po normalizacji względem średniego poziomu ekspresji u zwierząt *Penk* [wt/wt]. Do analizy statystycznej zastosowano test Kruskala-Wallisa oraz jako post-hoc test wielokrotnych porównań Dunn'a.

Podsumowując analizy pomiaru zawartości względnych ilości transkryptów genów *Penk*, *Pdyn*, *Oprd1*, *Oprm1*, *Oprk1*, *Drd1a*, *Aqp4*, najistotniejszym wynikiem jest różnica w transkrypcje preproenkefaliny. Wskazuje to, że sama obecność miejsc loxP zaburza ekspresję genu *Penk*, powodując znaczne zmniejszenie mRNA i poziomów białka w prążkowie i innych obszarach mózgu. Zaobserwowano wyraźną różnicę między genotypami, co pokrywa się z wynikami dotyczącymi fluorescencji. Nie zaobserwowano zmian kompensacyjnych objawiających się w zwiększonej ekspresji transkryptu prodynorfiny.

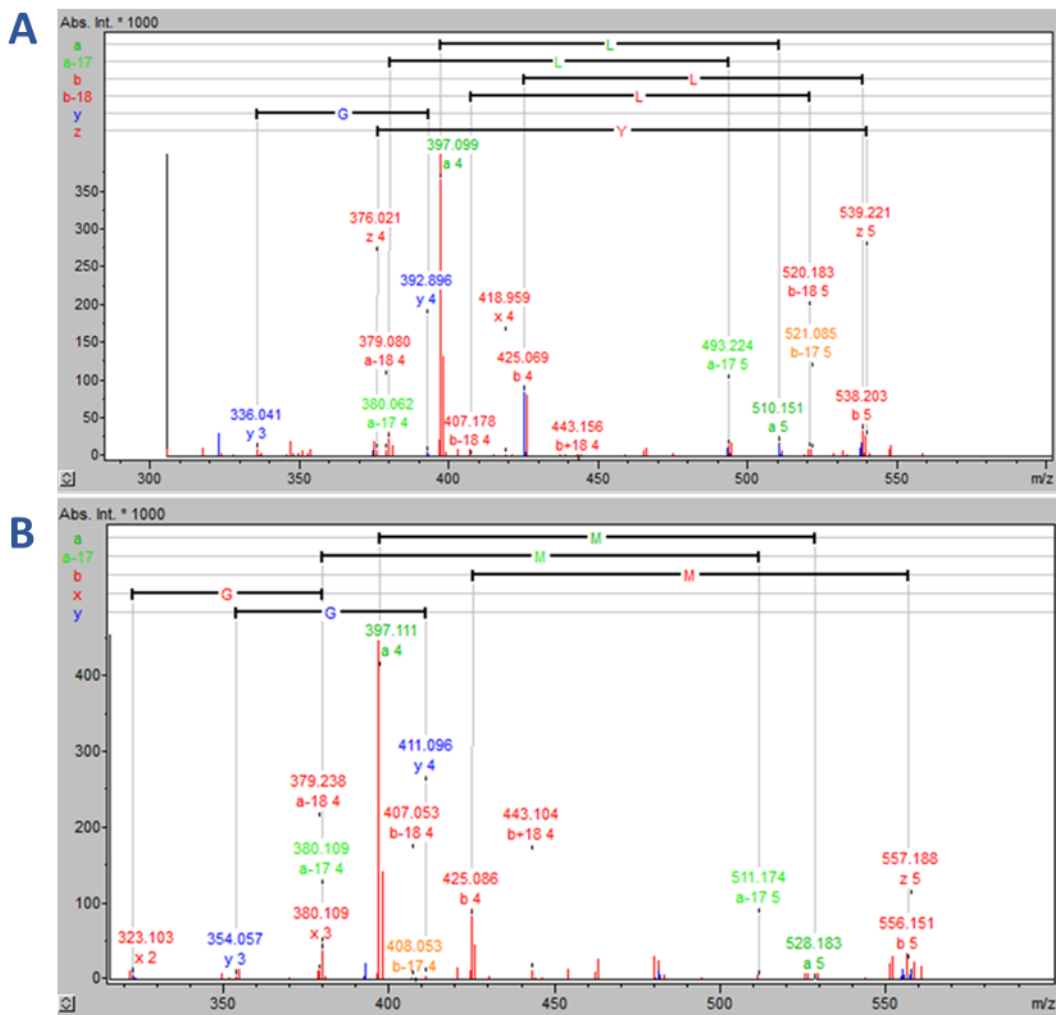
Analiza peptydów z wykorzystaniem spektrometrii mas

W kontekście wyników barwień immunofluorescencyjnych z wykorzystaniem przeciwciał skierowanych przeciw preproenkefalinie, postanowiono sprawdzić stężenie i stosunek peptydów pochodzących z tego białka prekursorowego: Met- i Leu-enkefalinę w tej strukturze, która cechowała się największym natężeniem sygnału – gałce bladej. Etap ten został wykonany przez Środowiskowe Laboratorium Proteomiki i Spektrometrii Mas Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie. Ze względu na trudności z uzyskaniem wyników z poszczególnych próbek w poprzednich doświadczeniach (wynikających prawdopodobnie z ograniczeń technicznych) połączono ze sobą próbki homogenatów pochodzących z 3 różnych zwierząt o tym samym genotypie [wt/wt] lub [flox/flox]. Na chromatogramie u zwierząt kontrolnych zaobserwowano wyraźne dwa piki odpowiadające jonom stosunku m/z równym masie $574,2 \pm 0,2$ i $556,2 \pm 0,2$ g/mol (Ryc.15). Z kolei na chromatogramie prezentującym wyniki LC-MSI u mutantów nie zaobserwowano podobnych pików (Ryc.8A).



Ryc.15 Chromatogramy przedstawiające widma fragmentacyjne dla połączonych 3 próbek pochodzących od zwierząt A) *Penk* [flox/flox], B) [wt/wt]. Pik 1 – oznacza wykryty jonem o stosunku m/z odpowiadającym masie $574,2 \pm 0,2$ g/mol; pik 2 - jon o masie $556,2 \pm 0,2$ g/mol.

Fragmentacja związków metodą CID prowadzi do powstania jonów fragmentacyjnych z wybranych pików widocznych na widmie masowym. W wyniku tej reakcji dochodzi do rozerwania wiązań w cząsteczce z utworzeniem odpowiednich jonów potomnych, w których skład wchodzi reszty aminokwasowe o charakterystycznych masach monoizotopowych. Analiza widm fragmentacyjnych poszczególnych jonów potwierdziła, że zaobserwowanymi peptydami są Leu-enkefalina (YGGFL) oraz Met-enkefalina (YGGFM) (Ryc.16).



Ryc.16 Widma fragmentacyjne odpowiadające pikom 1 i 2 z ryciny 8. Na podstawie wykrytego składu aminokwasowego przyporządkowano **A)** pik 1 o masie $574,2 \pm 0,2$ g/mol cząsteczki o sekwencji YGGFL (Leu-enkefalina); **B)** pik 2 o masie $556,2 \pm 0,2$ g/mol cząsteczki YGGFM (Met-enkefalina).

Dyskusja i wnioski

W niniejszej pracy opisano wytworzenie modelu myszy z zaburzoną ekspresją genu proenkefaliny i wykonano ich wstępną charakterystykę. Przeprowadzone badania wskazują, że u zwierząt *Penk* [flox/flox] występuje: 1) zaburzenie ekspresji transkryptu genu proenkefaliny w prążkowiu; 2) znacznie obniżony poziom białka preproenkefaliny w prążkowiu, jądrze półleżącym, gałce bladej; 3) obniżony poziom lub brak Leu- i Met-enkefaliny w gałce bladej. Przyczyną tego mogło być uszkodzenie sekwencji kodującej gen. Alternatywnie, mogło dojść do zakłócenia zapoczątkowania transkrypcji przez sekwencje loxP zlokalizowane pomiędzy sekwencją 5' UTR eksonu 1, a sekwencją start. W strukturze genów szczególne znaczenie mają sekwencje, które znajdują się powyżej miejsca startu transkrypcji, ponieważ mogą potencjalnie zmienić jej poziom. W konsekwencji, mogło dojść do destabilizacji transkrybowanego mRNA, jego szybkiej degradacji i w efekcie objawić się brakiem translacji białka. Jednakże wyniki ilościowej analizy PCR oraz immunofluorescencji pokazują, że nawet jeśli tak się stało, to gen nie jest zupełnie uszkodzony – zaobserwowano śladowe, niezerowe poziomy względnej ekspresji transkryptu genu *Penk* w prążkowiu oraz niski poziom fluorescencji w obszarach mózgu, w których powinna znajdować się preproenkefalina. Biorąc pod uwagę obniżoną względną ekspresję transkryptu genu *Penk* w prążkowiu u mutantów i badania dotyczące łączności obu struktur (Hegeman i in., 2016; B. R Hoover & Marshall, 2002; Oorschot, 1996) możliwe, iż słaby sygnał fluorescencyjny oraz brak wykrycia Leu- i Met-enkefalin w gałce bladej jest niebezpośrednim skutkiem zaburzonej ekspresji genu w prążkowiu. W ten sposób zaburzona enkefalinowa sygnalizacja stria-pallidalna doprowadza do obniżonej ekspresji białka preproenkefaliny oraz Leu- i Met-enkefaliny w gałce bladej. Niezależnie od przyczyn, wyniki potwierdzają, że ekspresja enkefalin u zwierząt *Penk* [flox/flox] jest niemal całkowicie zahamowana.

Z kolei u myszy u *Drd2Cre* [Tg/0]; *Penk* [flox/flox] nie oczekiwano wykrycia transkryptu *Penk* w analizie qPCR. Niemniej, zaobserwowano u tych zwierząt ekspresję genu proenkefaliny na niskim poziomie. Jedną z prawdopodobnych przyczyn niezerowego poziomu transkryptu u *Drd2Cre* [Tg/0]; *Penk* [flox/flox] jest zachodzenie ekspresji tego genu w innych komórkach w tej strukturze. Interneurony w prążkowiu stanowią 5% wszystkich neuronów; łącznie zdefiniowano 7 klas, z czego jedna to neurony cholinergiczne, a pozostałe 6 to neurony GABA-ergiczne wyrażające

preproenkefelinę (Muñoz-Manchado i in., 2018). Nie można wykluczyć, że są one odpowiedzialne za niski poziom ekspresji genu *Penk* w prążkowie. Należy też rozważyć możliwość, że mutacja nie zaszła z maksymalną wydajnością, co oznaczałoby, że w nielicznej części komórek D2 nie występuje delecja kodującego fragmentu w genie preproenkefaliny i białko jest wciąż przez nie wyrażane. Wyjaśnieniem takiej sytuacji może być fakt, że niektóre geny łatwiej się rekombinują niż inne (Vooijs i in., 2001). Istnieje szansa, że w niektórych komórkach D2 stan kondensacji chromatyny uniemożliwia rekombinazie Cre dostęp do miejsc loxP i nie może dojść do wycięcia ofloksowanej sekwencji.

W dalszych analizach została podjęta próba oceny zajścia mechanizmów kompensujących brak białka preproenkefaliny w mózgu. Nie zaobserwowano wpływu mutacji genu *Penk* na zmianę w dystrybucji receptorów opioidowych oraz komórek MSN-D1 w prążkowie. Świadczyć to może nie tyle o tym, że mutacja ta nie wpłynęła na opisane powyżej elementy, ile o tym, że nie miała bezpośredniego wpływu na ekspresję ich transkryptów. W celu rozszerzenia badań, warto wzbogacić aktualną analizę o dodatkowe geny – przykładowo, geny markerowe dla neuronów GABA-ergicznych, *Drd2*, cholinergicznym. Można również zastosować podobną ilościową analizę ekspresji genów qPCR gałki bladej oraz zwiększyć liczbę badanych próbek. Postawiono także hipotezę mówiącą o tym, że spowodowane mutacją obniżone stężenie Leu-enkefaliny może zostać częściowo wyrównane poprzez zwiększenie jego powstawania z innego białka prekursorowego – prodynorfiny. Analiza qPCR nie wskazuje na zwiększoną ekspresję genu *Pdyn*. Ponadto, wyniki obrazowania immunofluorescencji z przeciwciałami skierowanymi przeciw Leu-enkefalinie nie wykazały różnic w sile sygnału w gałce bladej w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi, co może świadczyć o relatywnie podobnym stężeniu tego peptydu u obu genotypów. Tu warto podkreślić dane z analizy LC-MS, w której nie wykryto peptydów Leu- i Met-enkefaliny u mutantów, co jest argumentem podważającym wyniki opisywanego barwienia. Nie można wykluczyć, iż stężenie Leu-enkefaliny zostało zwiększone u mutantów w wyniku innych, nie sprawdzonych w badaniu mechanizmów kompensacyjnych. Przykładami takich zjawisk, mogą być: nasiloną translacja białka prodynorfiny, zwiększona szybkość przetwarzania cząsteczek prekursorowych, zwiększony transport lub wydzielanie peptydów.

Warto zaznaczyć, że wszystkie wyniki dotyczące Leu-enkefaliny należy interpretować z pewną dozą ostrożności. Ze względu na trudności techniczne związane ze słabą wydajnością przyłączania przeciwciała I-rzędowego do cząsteczek Leu-enkefaliny zastosowano wysokie stężenia przeciwciała I- i II-rzędowego, czego skutkiem było uzyskanie dużego tła. Met- i Leu-enkefaliny mają bardzo zbliżoną strukturę, co, w przypadku wysokich stężeń przeciwciała I-rzędowego, może prowadzić do reaktywności krzyżowej (średnio na poziomie 10%) i nieprawidłowej interpretacji wyników. Jednakże, porównując wyniki obrazowania u zwierząt *Penk* [flox/flox] (u których występuje obniżona ekspresja genu dla jedyne białka prekursorowego Met-enkefaliny) ze zwierzętami kontrolnymi nie zaobserwowano istotnych różnic. W związku z powyższymi danymi, wydaje się mało prawdopodobnym, aby sygnał zaobserwowany w wyniku barwienia immunofluorescencyjnego u zwierząt [wt/wt] oraz *Penk* [flox/flox] nie pochodził z wybarwionej fluoroforem Leu-enkefaliny. W celu rozwikłania niejasności związanych z uzyskanymi zdjęciami, wykonano barwienia kontrolne. Zostały one przeprowadzone na skrawkach zwierząt [wt/wt] wykonanych na podobnej głębokości, co preparaty eksperymentalne i zastosowano tylko przeciwciała II-rzędowe, w takim samym stężeniu. Przy porównaniu zdjęć pochodzących z preparatów kontrolnych i skrawków eksperymentalnych [wt/wt] zauważono wyraźną różnicę w sile sygnału fluorescencji w gałce bladej. Był to jedyny obszar znacznie odróżniający oba preparaty. Występowanie peptydu Leu-enkefaliny w gałce bladej potwierdzono u naczelnych z użyciem techniki MALDI-TOF (Hulme i in., 2020). Technika ta posiada jednak ograniczoną moc rozdzielczą masy i dokładność jej pomiaru, co utrudnia przypisywanie tożsamości pikom w przypadku niskich stężeń badanych cząsteczek. W zacytowanej pracy, prawdopodobnie ze względu na stosunkowo niewielkie stężenie Leu-enkefaliny w preparacie pochodzącym z mózgu szczura, wykorzystano technikę MALDI-FTICR, która ma znacząco wyższą czułość niż dostępna podczas badań aparatura. Jeśli u mutantów występuje Leu-enkefalina, lecz w stężeniu o wiele niższym niż u zwierząt kontrolnych, możliwe, iż ze względu na niedostateczną czułość techniki, zastosowana analiza LC-MSI nie była w stanie ich wykryć. W rezultacie, uzyskanie odpowiedzi na pytania dotyczące stężeń oraz dystrybucji anatomicznej Leu-enkefaliny u myszy *Penk* [flox/flox] wymaga przeprowadzenia dalszych badań.

Podsumowując, w zaprezentowanym modelu myszy wprowadzenie warunkowej mutacji genu *Penk* nie zaszło wedle założeń eksperymentalnych. Stąd też wytworzone zwierzęta *Penk* KO, będące pełnym nokautem genu preproenkefaliny, będą wykorzystywane jako model do dalszych badań. Dokładna rola endogennych opioidów, w tym enkefalin i mechanizmów leżących u podstaw ich działania, nie jest jasna. Drogą do wyjaśnienia nieścisłości są doświadczenia z wykorzystaniem wektorów wirusowych, substancji oddziałujących na konkretne receptory, doświadczeń behawioralnych czy, jak opisano powyżej, badań z wykorzystaniem zwierząt transgenicznych.

Bibliografía

- Banghart, M. R., Neufeld, S. Q., Wong, N. C., & Sabatini, B. L. (2015). Enkephalin disinhibits mu opioid receptor rich striatal patches via delta opioid receptors. *Neuron*, 88(6), 1227–1239.
- Berrendero, F., Mendizábal, V., Robledo, P., Galeote, L., Bilkei-Gorzo, A., Zimmer, A., & Maldonado, R. (2005). Nicotine-induced antinociception, rewarding effects, and physical dependence are decreased in mice lacking the preproenkephalin gene. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(5), 1103–1112.
- Bilkei-Gorzo, A., Racz, I., Michel, K., Mauer, D., Zimmer, A., Klingmüller, D., & Zimmer, A. (2008). Control of hormonal stress reactivity by the endogenous opioid system. *Psychoneuroendocrinology*, 33(4), 425–436.
- Bilkei-Gorzo, A., Racz, I., Michel, K., Zimmer, A., Klingmüller, D., & Zimmer, A. (2004). Behavioral phenotype of pre-proenkephalin-deficient mice on diverse congenic backgrounds. *Psychopharmacology*, 176(3–4), 343–352.
- Bilkei-Gorzó, A., Otto, M., & Zimmer, A. (2008). Environmental modulation of anxiety-related neuronal activity and behaviors. *Behavioural Brain Research*,
- Chang, K. J., & Cuatrecasas, P. (1979). Multiple opiate receptors. Enkephalins and morphine bind to receptors of different specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 254(8), 2610–2618.
- Coding the direct/indirect pathways by D1 and D2 receptors is not valid for accumbens projections* / *Nature Neuroscience*. (b.d.).
- Dembla, S., Behrendt, M., Mohr, F., Goecke, C., Sondermann, J., Schneider, F. M., Schmidt, M., Stab, J., Enzeroth, R., Leitner, M. G., Nuñez-Badinez, P., Schwenk, J., Nürnberg, B., Cohen, A., Philipp, S. E., Greffrath, W., Bünemann,

- M., Oliver, D., Zakharian, E., ... Oberwinkler, J. (2017). Anti-nociceptive action of peripheral mu-opioid receptors by G-beta-gamma protein-mediated inhibition of TRPM3 channels. *ELife*, 6.
- Deutch, A. Y., Colbran, R. J., & Winder, D. J. (2007). Striatal plasticity and medium spiny neuron dendritic remodeling in parkinsonism. *Parkinsonism & Related Disorders*, 13 Suppl 3, S251-258.
- Duque-Díaz, E., Alvarez-Ojeda, O., & Coveñas, R. (2019). Enkephalins and ACTH in the mammalian nervous system. *Vitamins and Hormones*, 111, 147–193.
- Filliol, D., Ghozland, S., Chluba, J., Martin, M., Matthes, H. W. D., Simonin, F., Befort, K., Gavériaux-Ruff, C., Dierich, A., LeMeur, M., Valverde, O., Maldonado, R., & Kieffer, B. L. (2000). Mice deficient for δ - and μ -opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses. *Nature Genetics*, 25(2), 195–200.
- Gerfen, C. R., Paletzki, R., & Heintz, N. (2013). GENSAT BAC Cre-recombinase driver lines to study the functional organization of cerebral cortical and basal ganglia circuits. *Neuron*, 80(6).
- Hayward, M. D., Pintar, J. E., & Low, M. J. (2002). Selective reward deficit in mice lacking beta-endorphin and enkephalin. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(18), 8251–8258.
- Hughes, J., Smith, T. W., Kosterlitz, H. W., Fothergill, L. A., Morgan, B. A., & Morris, H. R. (1975). Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature*, 258(5536), 577–580.
- Hughes, John, Smith, T., Morgan, B., & Fothergill, L. (1975). Purification and properties of enkephalin—The possible endogenous ligand for the morphine receptor. *Life Sciences*, 16(12), 1753–1758.

- Kakidani, H., Furutani, Y., Takahashi, H., Noda, M., Morimoto, Y., Hirose, T., Asai, M., Inayama, S., Nakanishi, S., & Numa, S. (1982). Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine beta-neo-endorphin/dynorphin precursor. *Nature*, 298(5871), 245–249.
- König, M., Zimmer, A. M., Steiner, H., Holmes, P. V., Crawley, J. N., Brownstein, M. J., & Zimmer, A. (1996). Pain responses, anxiety and aggression in mice deficient in pre-proenkephalin. *Nature*, 383(6600), 535–538.
- Kung, J.-C., Chen, T.-C., Shyu, B.-C., Hsiao, S., & Huang, A. C. W. (2010). Anxiety- and depressive-like responses and c-fos activity in preproenkephalin knockout mice: Oversensitivity hypothesis of enkephalin deficit-induced posttraumatic stress disorder. *Journal of Biomedical Science*, 17, 29.
- Kupchik, Y. M., Brown, R. M., Heinsbroek, J. A., Lobo, M. K., Schwartz, D. J., & Kalivas, P. W. (2015). Coding the direct/indirect pathways by D1 and D2 receptors is not valid for accumbens projections. *Nature Neuroscience*, 18(9), 1230–1232.
- Martens, G. J., & Herbert, E. (1984). Polymorphism and absence of Leu-enkephalin sequences in proenkephalin genes in *Xenopus laevis*. *Nature*, 310(5974), 251–254.
- Meilandt, W. J., Yu, G.-Q., Chin, J., Roberson, E. D., Palop, J. J., Wu, T., Scarse-
Levie, K., & Mucke, L. (2008). Enkephalin Elevations Contribute to Neuronal and Behavioral Impairments in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience*, 28(19), 5007–5017.
- Melo, I., Drews, E., Zimmer, A., & Bilkei-Gorzo, A. (2014). Enkephalin knockout male mice are resistant to chronic mild stress. *Genes, Brain and Behavior*, 13(6), 550–558.

- MERRER, J. L., BECKER, J. A. J., BEFORT, K., & KIEFFER, B. L. (2009). Reward Processing by the Opioid System in the Brain. *Physiological reviews*, 89(4), 1379–1412.
- Muñoz-Manchado, A. B., Bengtsson Gonzales, C., Zeisel, A., Munguba, H., Bekkouche, B., Skene, N. G., Lönnerberg, P., Ryge, J., Harris, K. D., Linnarsson, S., & Hjerling-Leffler, J. (2018). Diversity of Interneurons in the Dorsal Striatum Revealed by Single-Cell RNA Sequencing and PatchSeq. *Cell Reports*, 24(8), 2179-2190.e7.
- Nam, H., Chandra, R., Francis, T. C., Dias, C., Cheer, J. F., & Lobo, M. K. (2019). Reduced nucleus accumbens enkephalins underlie vulnerability to social defeat stress. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 44(11), 1876–1885.
- Opioid peptides: Molecular pharmacology, biosynthesis, and analysis. (1986). *NIDA Research Monograph*, 70, 1–414.
- Paton, W. D. M. (1957). The action of morphine and related substances on contraction and on acetylcholine output of coaxially stimulated guinea-pig ileum. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, 12(1), 119–127.
- Przewlocki, R. (2009). 8—Stress, Opioid Peptides, and Their Receptors. W D. W. Pfaff, A. P. Arnold, A. M. Etgen, S. E. Fahrbach, & R. T. Rubin (Red.), *Hormones, Brain and Behavior (Second Edition)* (s. 289–332). Academic Press.
- Racz, I., Schürmann, B., Karpushova, A., Reuter, M., Cichon, S., Montag, C., Furst, R., Schütz, C., Franke, P. E., Strohmaier, J., Wienker, T. F., Terenius, L., Ösby, U., Gunnar, A., Maier, W., Bilkei-Gorzó, A., Nöthen, M., & Zimmer, A. (2008). The opioid peptides enkephalin and β -endorphin in alcohol dependence. *Biological psychiatry*, 64(11), 989–997.

- Takei, Y., Ando, H., & Tsutsui, K. (2015). *Handbook of Hormones: Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research*. Academic Press.
- Tang, F., Costa, E., & Schwartz, J. P. (1983). Increase of proenkephalin mRNA and enkephalin content of rat striatum after daily injection of haloperidol for 2 to 3 weeks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(12), 3841–3844.
- Terenius, L. (1973). Characteristics of the “Receptor” for Narcotic Analgesics in Synaptic Plasma Membrane Fraction from Rat Brain. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 33(5–6), 377–384.
- The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Compact—3rd Edition*.
- Vooijs, M., Jonkers, J., & Berns, A. (2001). A highly efficient ligand-regulated Cre recombinase mouse line shows that LoxP recombination is position dependent. *EMBO Reports*, 2(4), 292–297.
- Walwyn, W. M., Chen, W., Kim, H., Minasyan, A., Ennes, H. S., McRoberts, J. A., & Marvizón, J. C. G. (2016). Sustained Suppression of Hyperalgesia during Latent Sensitization by μ -, δ -, and κ -opioid receptors and α 2A Adrenergic Receptors: Role of Constitutive Activity. *The Journal of Neuroscience*, 36(1), 204–221.
- Wang, D., Tawfik, V. L., Corder, G., Low, S. A., François, A., Basbaum, A. I., & Scherrer, G. (2018). Functional Divergence of Delta and Mu Opioid Receptor Organization in CNS Pain Circuits. *Neuron*, 98(1), 90-108.e5.
- Williams, J. T., Ingram, S. L., Henderson, G., Chavkin, C., von Zastrow, M., Schulz, S., Koch, T., Evans, C. J., & Christie, M. J. (2013). Regulation of μ -Opioid Receptors: Desensitization, Phosphorylation, Internalization, and Tolerance. *Pharmacological Reviews*, 65(1), 223–254.

- Wong, D. T., & Horng, J. S. (1973). Stereospecific interaction of opiate narcotics in binding of 3H-dihydromorphine to membranes of rat brain. *Life Sciences*, *13*(11), 1543–1556.
- Yang, H.-Y., Hong, J. S., & Costa, E. (1977). Regional distribution of leu and met enkephalin in rat brain. *Neuropharmacology*, *16*(4), 303–307.
- Zamir, N., Palkovits, M., Weber, E., Mezey, É., & Brownstein, M. J. (1984). A dynorphinergic pathway of Leu-enkephalin production in rat substantia nigra. *Nature*, *307*(5952), 643–645.
- Zhu, Y., Romero, M. I., Ghosh, P., Ye, Z., Charnay, P., Rushing, E. J., Marth, J. D., & Parada, L. F. (2001). Ablation of NF1 function in neurons induces abnormal development of cerebral cortex and reactive gliosis in the brain. *Genes & Development*, *15*(7), 859–876.
- Zuo, Z. (2005). The role of opioid receptor internalization and beta-arrestins in the development of opioid tolerance. *Anesthesia and Analgesia*, *101*(3), 728–734, table of contents.