

Załącznik 2

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

Autoreferat

Analiza molekularna i genetyczna tylnego płata przysadki
mózgowej w organizmie modelowym kręgowca -
danio pręgowanego

dr Savani Anbalagan

Wydział Biologii,

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Poznań

Spis treści

1. Imię i nazwisko	4
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe.....	4
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....	4
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy.....	5
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego	5
4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego	5
4.3. Opis osiągnięcia naukowego	9
4.3.1 Wstęp	9
4.3.2 Genetyka powstawania przepuszczalnych naczyń włosowatych w przysadce nerwowej (Publikacja 1)	11
4.3.3 Genetics underlying synaptogenesis in neurohypophysis (Publication 2 and 3)	15
4.3.4 Ukierunkowane narzędzia inżynierii genetycznej do badania genetyki rozwoju interfejsu nerwowo-naczyniowego przysadki mózgowej (publikacja 4 i publikacja 5)	21
4.3.5 <i>Wdrażanie zasady 3R w badaniach na zwierzętach w celu zbadania genetyki molekularnej przysadki nerwowej u danio przegowanego</i> (Publikacja 6)	22
4.3.6 Czynniki związane z gospodarzem leżące u podstaw rozwoju neuroprzysadki (przegląd rękopisu 1).....	28
Streszczenie.....	29
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej, w szczególności zagranicznej	32
5.1. Wyniki badań pochodzące z moich studiów doktoranckich na Uniwersytecie Milano-Bicocca we Włoszech.....	32
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.....	32
6.1. Zajęcia dydaktyczne.....	32
6.2. Opieka nad studentami	33
6.3. Działalność organizacyjna.....	34
6.4. Popularyzacja nauki.....	35
7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.....	36
8. Literatura	36

1. Imię i nazwisko

Savani Anbalagan

ORCID: [0000-0003-4839-9439](https://orcid.org/0000-0003-4839-9439)

Google Scholar: <https://scholar.google.com/citations?hl=en&user=LjISDzQAAAAJ>

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

2014: Doktor w dziedzinie biotechnologii przemysłowej, Wydział Biotechnologii i Nauk Biologicznych, Uniwersytet Milano-Bicocca, Mediolan, Włochy.

Praca doktorska pt: Role of Rif1 and Rif2 in telomere capping of *Saccharomyces cerevisiae*.

Promotor: prof. Maria Pia Longhese

2009: Magister technologii w dziedzinie biotechnologii przemysłowej, zintegrowany program studiów licencjackich i magisterskich, Uniwersytet SASTRA, Thanjavur, Indie.

Praca magisterska pt: Ag43 - a model for bacterial amyloid.

Promotor: prof. Daniel Otzen, Zakład Biologii Molekularnej, Uniwersytet Aarhus, Aarhus, Dania.

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- | | |
|-------------------|--|
| 2020-10 - obecnie | Adiunkt naukowo-dydaktyczny, Kierownik projektu
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Wydział Biologii,
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. |
| 2019-07 - 2020-09 | Adiunkt w Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu
Warszawskiego. |
| 2018-04 - 2019-03 | Starszy stażysta w laboratorium
prof. Gil Levkowitz z Wydziału Biologii Komórki Molekularnej,
Instytut Nauki Weizmanna, Rehovot, Izrael |
| 2016-10 - 2018-03 | Starszy uczony Koshland w laboratorium
prof. Gil Levkowitz z Wydziału Biologii Komórki Molekularnej,
Instytut Nauki Weizmanna, Rehovot, Izrael |
| 2015-10 - 2016-09 | Starszy Postdoc w laboratorium
prof. Gil Levkowitz z Wydziału Biologii Komórki Molekularnej,
Instytut Nauki Weizmanna, Rehovot, Izrael |
| 2012-12 - 2015-09 | Postdoc w laboratorium |

prof. Gil Levkowitz z Wydziału Biologii Komórki Molekularnej,
Instytut Nauki Weizmanna, Rehovot, Izrael

2009-12 - 2012-11 Doktorant w laboratorium
prof. Maria Pia Longhese, Wydział Biotechnologii i Nauk
Biologicznych, Uniwersytet Milano-Bicocca, Mediolan, Włochy

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Analiza molekularna i genetyczna tylnego płata przysadki mózgowej w organizmie modelowym kręgowca - danio pręgowanego

4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

Osiągnięciem naukowym jest seria publikacji wymienionych poniżej. Manuskrypty koncentrują się na 1) genetyce molekularnej leżącej u podstaw rozwoju przysadki nerwowej danio pręgowanego, głównego ewolucyjnie konserwowanego interfejsu neuroendokrynnego; 2) ustanowienie technik inżynierii genetycznej i narzędzi in silico do badania neuroprzysadki oraz 3) manuskrypt przeglądowy dotyczący czynników związanych z gospodarzem, które mogą potencjalnie regulować mechanizmy molekularne w neuroprzysadce¹⁻⁷. Rękopisy zostały opublikowane w latach 2018-2023. Manuskrypty opierają się na pracach prowadzonych podczas moich badań podoktoranckich w grupie prof. Gila Levkowitza w Weizmann Institute of Science w Izraelu oraz jako kierownik naukowy na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Publikacja 1 (* wspólne pierwsze autorstwo)

Anbalagan S*, Gordon L*, Blechman J, Matsuoka RL, Rajamannar P, Wircer E, Biran J, Reuveny A, Leshkowitz D, Stainier DYR, Levkowitz G.

Pituitary Cues Regulate the Development of Permeable Neuro-Vascular Interfaces.

Dev Cell. 2018 Dec 17;47(6):711-726.e5.

IF₂₀₁₈: 9.19; MNiSW pt. = 200; #Cytowanie (WoS - 06.2023) = 25

Główne pytanie naukowe rozwiązane lub ustalona technika: w przeciwieństwie do większości śródbłonnków mózgu, nieznane było, dlaczego naczynia nerwowo-przysadkowe tworzą przepuszczalne naczynia. Nasza praca wykazała, że wiele czynników z glejowych przysadek mózgowych (Vegfa, Tgfβ3 i Cyp26b1) promuje przepuszczalność neuroprzysadki in vivo.

Mój wkład w powstanie tej pracy jest następujący: Uczestniczyłem w konceptualizacji hipotez, przeglądzie literatury, projektowaniu eksperymentu, wykonaniu eksperymentu, analizie i interpretacji danych. Przeprowadziłem znaczną część perturbacji genetycznych, immunohistochemii, obrazowania konfokalnego, danych i analiz opartych na bioinformatyce. Warunki do znakowania glejowych pituicytów ustaliłem za pomocą β-Ala-Lys-AMCA na podstawie wcześniejszych prac dr. Jakoba Birana na temat ryb tilapia. Opierając się na protokołach ustalonych wcześniej dla dysocjacji larw przez

dr Einav Wircer, zoptymalizowałem protokół dysocjacji tkanki przysadki nerwowej dorosłego osobnika oraz izolację glejowych pituicytów w oparciu o FACS i RT-qPCR na wyizolowanych komórkach. Przeprowadziłem analizę danych transkryptomu pod kierunkiem dr Deny Leshkowitz. Konstrukty otrzymałem od dr Ryoty Matsuoki i prof. Didiera Stainiera (Instytut Maxa Plancka, Bad Nauheim, Niemcy) i wykonałem specyficzne dla przysadki zaburzenia Vegf. Współtworzyłem tekst manuskryptu oraz przygotowałem wszystkie ryciny i filmy. Uczestniczyłem w procesie składania manuskryptu, przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów. Moje wyniki są pokazane na ryc. 1 (C-G), ryc. 3 (A-E), ryc. 4 (A-H), ryc. 5 (E-G), ryc. 6 (D-I), rysunki uzupełniające S1, S2, S3 (A-C), Tabela S4. Ponadto wygenerowałem i zbadałem kilka mutantów pod kątem fenotypów morfogenezy naczyń nerwowo-przysadkowych. Jednak dane te nie zostały uwzględnione w manuskrypcie z powodu braku fenotypów naczyniowych.

Publikacja 2

Blechman J, **Anbalagan S**, Matthews GG, Levkowitz G.

Genome Editing Reveals Idiosyncrasy of CNGA2 Ion Channel-Directed Antibody Immunoreactivity Toward Oxytocin. *Front Cell Dev Biol.* 2018 Sep 20;6:117.

IF₂₀₁₈: 5.21; MNiSW pt.=70; #Cytowanie (WoS - 06.2023) = 5

Główne pytanie naukowe rozwiązane lub ustalona technika: specyficzność przeciwciała, którego używamy do barwienia immunologicznego oksytocyny danio pręgowanego, była nieznana. Nasza praca nad mutantami oksytocyny danio pręgowanego opartymi na CRISPR wykazała, że przeciwciała, którego używamy, jest wysoce specyficzne dla oksytocyny danio pręgowanego.

Mój wkład w tę pracę jest następujący: Dokonałem przeglądu literatury, zoptymalizowałem i ustanowiłem ukierunkowaną edycję genomu opartą na CRISPR-Cas9 i solidne techniki genotypowania w grupie Levkowitz w celu wygenerowania i genotypowania mutantów danio pręgowanego przenoszących linię zarodkową. Skontaktowałem się z prof. Garym Matthewsem (Stony Brook University, Nowy Jork, USA) i uzyskałem przeciwciała anti-Cnga2 do badania synaps neuroprzysadkowych (w ramach projektu związanego z Publikacją 3). Jednak ze względu na wspólne zainteresowanie i kłopotliwe wyniki immunohistochemiczne generowane przez przeciwciała anti-Cnga2, doprowadziło to grupę Levkowitza do zainicjowania projektu opartego na Cnga2 przez dr Blechmana. Korzystając z moich protokołów i przeciwciał, które uzyskałem, dr Blechman wygenerował i zbadał mutanty oxt i cnga2. Asystowałem również dr Blechmanowi w przygotowaniu rycin rękopisu.

Publikacja 3 (* wspólne pierwsze autorstwo)

Anbalagan S*, Blechman J*, Gliksberg M, Gordon L, Rotkopf R, Dadosh T, Shimoni E, Levkowitz G.

Robo2 regulates synaptic oxytocin content by affecting actin dynamics.

Elife. 2019 Jun 10;8. pii: e45650.

IF₂₀₁₉ 7.08; MNiSW pt. = 200; #Cytowanie (WoS - 06.2023) = 6

Główne pytanie naukowe rozwiązane lub ustalona technika: z wyjątkiem kilku czynników molekularnych mechanizmy regulujące poziomy oksytocyny synaptycznej in vivo w neuroprzysadce były w dużej mierze nieznane. Nasza praca wykazała, że szlak sygnałowy oparty na Robo2-Slit3-Cdc42 promuje poziomy oksytocyny synaptycznej in vivo w neuronach przysadki u danio pręgowanego.

Mój wkład w powstanie tej pracy jest następujący: Dokonałem przeglądu literatury, sformułowania problemu badawczego, wykonania eksperymentu, analizy i interpretacji danych. Opracowałem protokoły obrazowania i analizowania synaps oksytocyny neuroprzysadki. Zaprojektowałem i wykonałem wszystkie perturbacje genetyczne, immunohistochemię, obrazowanie konfokalne, eksperymenty FRAP oparte na mikroskopii wielofotonowej, kwantyfikację obrazu i analizę obrazu. Użyłem skryptów wygenerowanych przez dr Michaela Gliksberga i dr Rona Rotkopfa do analizy synaps oksytocyny we wszystkich zaburzeniach. Utrzymywałem, rozmnażałem i genotypowałem heterozygotyczne ryby robo2^{+/-} (mutacja punktowa A>T). Przeprowadziłem eksperymenty oparte na krzyżowaniu robo2^{+/-} i genotypowałem wszystkie larwy po eksperymencie. Wspólnie z dr Tali Dadosh współtworzyłem protokoły i współtworzyłem obrazowanie w super rozdzielczości neuroprzysadkowych synaps oksytocyny. Skontaktowałem się z prof. Naoki Mochizuki (National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute, Osaka, Japonia) i uzyskałem konstrukty cdc42 do przeprowadzania specyficznych dla neuronów zaburzeń oksytocyny Cdc42. Moje wyniki są pokazane na ryc. 1 (D-F), ryc. 2 (A-J), ryc. 3 (E-N), ryc. 4 (B-F), ryc. 5, ryc. 6 (C-I), ryc. 7. Rysunki uzupełniające Ryc.6-S1(D,E) Ryc.6-Wideo 1, Rys.7-S1. Ponadto wygenerowałem również mutanty mir218a-1 osadzone w intronie slit3 i slit3 do badania fenotypów morfogenezy synaptycznej neuroprzysadki. Jednak dane te nie zostały uwzględnione w manuskrypcie z powodu braku fenotypów naczyniowych.

Publikacja 4

Nunes AR, Carreira L, **Anbalagan S**, Blechman J, Levkowitz G, Oliveira RF.

Perceptual mechanisms of social affiliation in zebrafish.

Sci Rep. 2020 Feb 27;10(1):3642.

IF₂₀₂₀:4.38 ; MNiSW pt. = 140; #Cytowanie (WoS - 06.2023) = 17

Główne pytanie naukowe rozwiązane lub ustalona technika: W tamtym czasie laboratorium Levkowitz wykorzystywało tylko istniejące mutanty danio pręgowanego i brakowało mu solidnych protokołów ukierunkowanej mutagenезy w laboratorium. Opracowałem technikę ukierunkowanej mutagenезy w laboratorium Levkowitza i wygenerowałem mutantą oxtra opartego na TALEN.

Mój wkład w tę pracę jest następujący: Wygenerowałem mutantą oxtra przenoszącego linię zarodkową przy użyciu konstruktów TALEN. Zoptymalizowałem warunki do genotypowania mutantów (mutacja delecyjna 1bp), utrzymałem linię do badania roli Oxtra w morfogenezie nerwowo-naczyniowej nerwowo-przysadkowej. Udostępniłem również mutantą oxtra dr Ana Rita Nunes i prof. Rui Oliveira (Instituto Gulbenkian de

Ciência, Oieras, Portugalia) do badań behawioralnych. Mutanty były niezbędne do badań nad rolą oksytocyny w zachowaniach społecznych.

Publikacja 5

Swaminathan A, Gliksberg M, Wigoda N, **Anbalagan S**, Levkowitz G

Stress resilience is established during development and is regulated by complement factors. Cell Rep. 2023

IF₂₀₂₁:9.99 ; MNiSW pt. = 200; #Cytowanie (WoS - 06.2023) = 1

Główne pytanie naukowe rozwiązane lub ustalona technika: W tamtym czasie laboratorium Levkowitz wykorzystywało tylko istniejące mutanty danio pręgowanego i brakowało mu solidnych protokołów ukierunkowanej mutagenyzy w laboratorium. Opracowałem technikę ukierunkowanej mutagenyzy w laboratorium Levkowitza i wygenerowałem mutanta mir218a-1 opartego na CRISPR.

Mój wkład w tę pracę jest następujący: Mój wkład w tę pracę jest następujący: Wygenerowałem oparty na CRISPR mutant mir218a-1 linii zarodkowej przenoszący mutant mir218a-1, utrzymał linię do badania roli mir218a-1 w morfogenezie nerwowo-naczyniowej nerwowo-przysadkowej. Podzieliłem się nim również z moją koleżanką, dr Amrutha Swaminathan, w celu przeprowadzenia badań behawioralnych. Mutant był ważny dla potwierdzenia konserwatywnej roli mir218 w rozwojowej odporności na stres.

Publikacja 6 (* wspólne pierwsze autorstwo; # autorstwo korespondencyjne habilitantki)

Chodkowski M*, Zielezinski A, **Anbalagan S*#**

A ligand-receptor interactome atlas of the zebrafish. iScience. 2023

IF₂₀₂₂:5.8; MNiSW pt. = 20; #Cytowanie (WoS - 06.2023) = 0

Główne pytanie naukowe rozwiązane lub ustalona technika: W przeciwieństwie do narzędzi, takich jak CellPhoneDB dla naukowców zajmujących się organizmami ssaków, społeczność danio pręgowanego nie dysponowała podobnym narzędziem do analizowania i badania interakcji ligand-receptor w danych -omicznych danio pręgowanego. Opracowaliśmy DanioTalk, nowatorskie narzędzie typu open source dla społeczności danio pręgowanego. Zidentyfikowaliśmy również wszystkie domniemane interakcje ligand-receptor między glijowymi pituicytami a neuronami oksytocyny.

Mój wkład w tę pracę jest następujący: Jestem korespondencyjnym i udostępnionym pierwszym autorem. Współpracę zainicjowałem z dr Andrzejem Zielezińskim i współopiekowałem się Miłozem Chodkowskim w ramach jego pracy magisterskiej z bioinformatyki. Współtworzyłem przegląd literatury, współtworzyłem plany eksperymentów, testowałem skrypty wygenerowane przez Miłozę pod kątem błędów, współtworzyłem analizę danych, pisałem manuskrypt, przygotowywałem wszystkie ryciny, tabele, komunikowałem się z redaktorem, współtworzyłem odpowiedź na uwagi recenzentów.

Artykuł przeglądowy 1 (Autorstwo korespondencyjne habilitantki)**Anbalagan S.**

Endocrine crosstalk between the gut microbiome and glial cells in development and disease. *J. Neuroendocrinology*. 2021 May;33(5):e12924.

IF₂₀₂₁:3.87; MNiSW pt. = 100; #Cytowanie (WoS - 06.2023) = 1

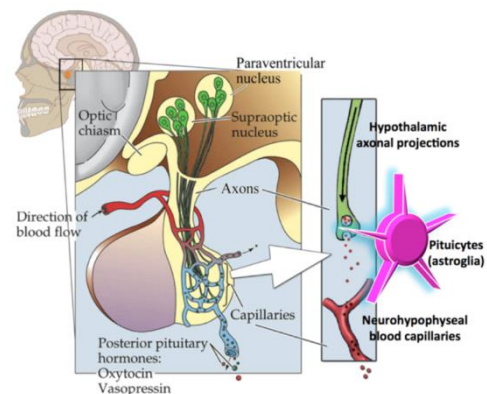
Główne pytanie naukowe rozwiązane lub ustalona technika: Molekularne ścieżki rozwoju mózgu mogą być regulowane przez mikrobiom jelitowy. Nie wiadomo jednak, czy rozwój przysadki mózgowej, głównego interfejsu neuroendokrynnego, jest również regulowany przez mikrobiom jelitowy. W tym manuskrypcie przeglądowym podsumowałem wszystkie możliwe mechanizmy, za pomocą których mikrobiom jelitowy może regulować główne komórki glejowe. Miałem nadzieję, że takie informacje pomogą zrozumieć czynniki, które mogą regulować genetykę molekularną neuroprzysadki.

Mój wkład w powstanie tej pracy jest następujący: Konceptualizowałem rękopis. Dokonałem przeglądu literatury i napisałem manuskrypt. Porozumiałem się z redakcją i przygotowałem odpowiedź na uwagi recenzentów.

4.3. Opis osiągnięcia naukowego**4.3.1 Wstęp**

Układ podwzgórzowo-neuroprzysadkowy, główny zachowany ewolucyjnie interfejs neuroendokrynnny

U kręgowców wysoce regulowana koordynacja narządów jest niezbędna do rozwoju, zachowania i funkcji⁸⁻¹⁰. Rozregulowana koordynacja między narządami może prowadzić do chorób lub lekooporności^{11,12}. Dla prawidłowego funkcjonowania zwierzęcia niezbędny jest prawidłowy rozwój składników komórkowych w tkankach i narządach¹³⁻¹⁶. Jedną z takich podstawowych tkanek jest układ podwzgórzowo-neuroprzysadkowy (UPN), główny zachowany ewolucyjnie interfejs neuroendokrynnny w mózgu (Ryc.1)¹⁷⁻²⁰. U ssaków UPN reguluje homeostazę wody, poród i wydzielanie mleka poprzez uwalnianie neuropeptydów oksytocyny i wazopresyny do obwodowego przepływu krwi^{21,22}. U ludzi rozregulowanie zawartości lub uwalniania wazopresyny związanej z neuroprzysadką z powodu mutacji genetycznych lub urazu fizycznego lub stanu zapalnego wiąże się z utratą homeostazy wody²³⁻²⁵. Zatem badanie genetyki rozwoju przysadki nerwowej pomoże nam zrozumieć ogólne zasady leżące u podstaw homeostazy wody, niezbędnej aktywności wymaganej do przetrwania człowieka.



Ryc. 1. Układ podwzgórzowo-neuroprzysadkowy jest interfejsem neuroendokrynnym składającym się z wypustek aksonalnych, naczyń włosowatych i komórek podobnych do astrogleju zwanych przysadkami.

UPN składa się głównie z glejowych przysadek mózgowych, przepuszczalnego śródbłonna i projekcji aksonalnych z podwzgórzowych neuronów oksytocyny i wazopresyny

^{22,26,27}. Podczas rozwoju UPN aksony z neuronów podwzgórza unerwiają przysadkę nerwową struktury linii środkowej i rozwijają liczne synapsy en passant, które głównie przechowują i wydzielają neuropeptydy, oksytocynę i wazopresynę²⁸⁻³¹. Równolegle rozwijają się naczynia przysadki, które stają się przepuszczalne, aby ułatwić przechodzenie neuropeptydów^{32,33}. Komunikacja międzykomórkowa między unerwiającymi aksonami, komórkami śródbłonna i przysadkami glejewymi jest wymagana do prawidłowej morfogenezy UPN^{1,3,30}.

Kilka wcześniejszych prac z wykorzystaniem myszy, szczurów i organizmów modelowych piskląt dotyczyło genetyki rozwoju UPN^{26,34}. Złożona zależność szlaków sygnałowych i czynników transkrypcyjnych, w tym szlaku Sonic hedgehog (Shh), szlaku sygnałowego Wnt oraz czynników transkrypcyjnych Pitx1 i Prop1, została powiązana z rozwojem UPN³⁵. A mutacje w takich genach mogą prowadzić do nieprawidłowości rozwojowych przysadki mózgowej, takich jak niedoczynność przysadki. Jednym z wyzwań w badaniu rozwoju UPN u ssaków jest rozwój embrionów in utero. Wymaga to chirurgicznego usunięcia zarodków i obróbki tkanek w celu zobrazowania elementów nerwowo-przysadkowych³⁶⁻³⁸. Uniemożliwia to również obrazowanie na żywo wysoce plastycznych składników komórkowych neuroprzysadki podczas rozwoju.

Optycznie przezroczyste larwy danio pręgowanego umożliwiają badanie rozwoju HNS bez interwencji chirurgicznej³⁰. Przed i w trakcie mojej pracy habilitacyjnej, 1) grupa Varga zidentyfikowała *crabp1a* jako marker neuroprzysadki danio pręgowanego{Toro, 2009 #149}, 2) grupa Levkowitz wykonała toto obrazowanie i zaburzenia genetyczne i stwierdziła, że oksytocyna (inaczej izotocyna u ryb) może promować morfogenezę przysadki nerwowej unaczynienie³⁹; 2) Zarówno grupa Levkowitz, jak i Soojin Ryu scharakteryzowały projekcje aksonalne aksonów oksytocyny, która jest jednym z głównych neuronów wystających przysadki nerwowej^{40,41}; 3) Grupa Hammerschmidta wykazała, że sygnalizacja Fgf jest wymagana do promowania prawidłowego rozwoju interfejsu nerwowo-naczyniowego w przysadce nerwowej⁴². Badania na modelowych organizmach ssaków scharakteryzowały dynamiczną naturę glejewych pituicytów podczas stadiów reprodukcyjnych lub stresu osmotycznego^{43,44}. Jednak sposób, w jaki glejewo pituicyty regulują rozwojową morfogenezę nerwowo-naczyniową i poziomy neuropeptydów synaptycznych, był w dużej mierze nieznan. Moje główne zainteresowania badawcze dotyczą genetyki molekularnej przysadki mózgowej ze szczególnym uwzględnieniem tożsamości i funkcji sygnalizacji międzykomórkowej między przysadkami glejewymi, zakończeniami aksonalnymi oksytocyny i komórkami śródbłonna w przysadce mózgowej.

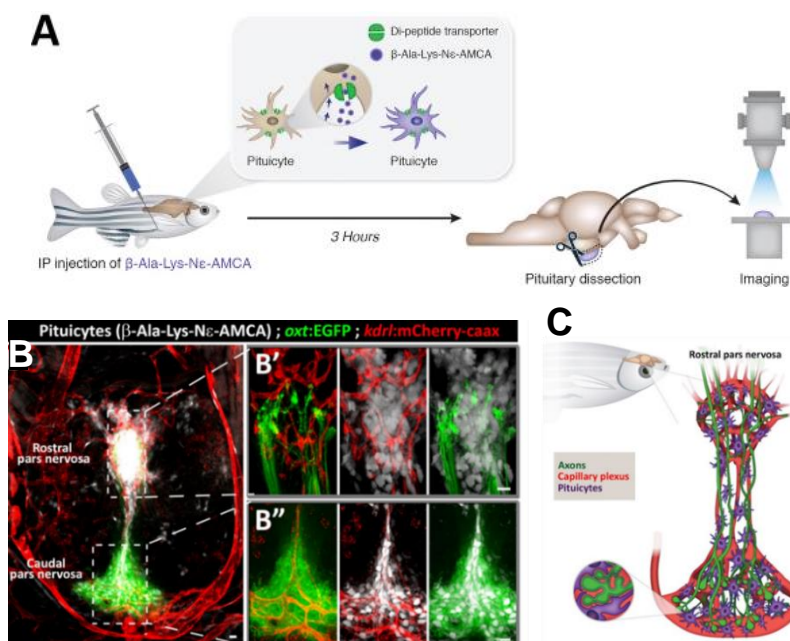
Poprzednie doniesienia na temat rozwoju przysadki mózgowej ssaków były w dużej mierze oparte na dwuwymiarowych badaniach opartych na mikroskopii świetlnej i elektronowej. Przezroczystość optyczna i narzędzia genetyczne u danio pręgowanego umożliwiają trójwymiarową charakterystykę parametrów nerwowo-naczyniowych przy użyciu zaawansowanych technik mikroskopii świetlnej^{39,42}. Jednak parametry nerwowo-naczyniowe UPN danio pręgowanego nie zostały wówczas scharakteryzowane³⁹. Aby zastosować podejście oparte na hipotezach do badania genetyki molekularnej rozwoju interfejsu nerwowo-naczyniowego przysadki mózgowej, potrzebowałam 1) zidentyfikować, które geny lub czynniki mogą potencjalnie przyczynić się do takich procesów oraz 2) narzędzi do obrazowania i kwantyfikacji w celu ilościowego określenia solidnych i powtarzalnych parametrów.

Na początku moich studiów podoktoranckich istniejące zestawy danych transkryptomu UPN były oparte na RNA wyizolowanym z całej tkanki (podwzgórza lub płata neuropośredniego), a nie specyficznie dla określonych typów komórek UPN⁴⁵. Co więcej, z wyjątkiem kilku genów markerowych neuroprzysadki danio pręgowanego, transkryptom składnika komórkowego UPN danio pręgowanego był również niedostępny e⁴⁶. Wreszcie, dostępna była tylko transgeniczna ryba oksytocyna, a ekspert FACS z laboratorium Levkowitz nie był w stanie posortować neuronów larwalnych oksytocyny za pomocą FACS przy użyciu tej transgenicznej ryby. Brakowało nam również transgenicznych ryb, które mogą specyficznie znakować przysadki glejowe i przepuszczalne naczynia krwionośne przysadki mózgowej³⁹. (Dopiero później dostępne były transgeniczne ryby znakujące pituicytes oparte na *cyp26b1* i transgeniczne ryby oparte na *plvap*, które oznaczają wszystkie przepuszczalne naczynia włosowate w mózgu i jednokomórkowe dane RNAseq dotyczące mózgu danio pręgowanego i neurohypofizy. Te wyzwania i eksperymenty, które je rozwiązały, przyczyniły się do powstania **publikacji 1 i 2** szczegółowo opisanych w kolejnych rozdziałach.

4.3.2 Genetyka powstawania przepuszczalnych naczyń włosowatych w przysadce nerwowej (Publikacja 1)

W **publikacji 1**, postawiliśmy hipotezę, że w przeciwieństwie do astrocytów, które promują utrzymanie bariery krew-mózg poprzez lokalne parakryne cząsteczki sygnałowe do komórek śródbłonna⁴⁷⁻⁴⁹, glejowe pituicyty wydzielają lokalne parakryne cząsteczki sygnalizacyjne do śródbłonna nerwowo-przysadkowego i promują lokalną przepuszczalność w przysadce nerwowej.

Ponieważ VEGF u ssaków jest głównym czynnikiem indukującym przepuszczalność naczyń^{50,51}, byliśmy świadomi, że również w neuroprzysadce danio pręgowanego Vegf (jeśli wyrażono) może odgrywać rolę indukującą przepuszczalność. Niemniej jednak

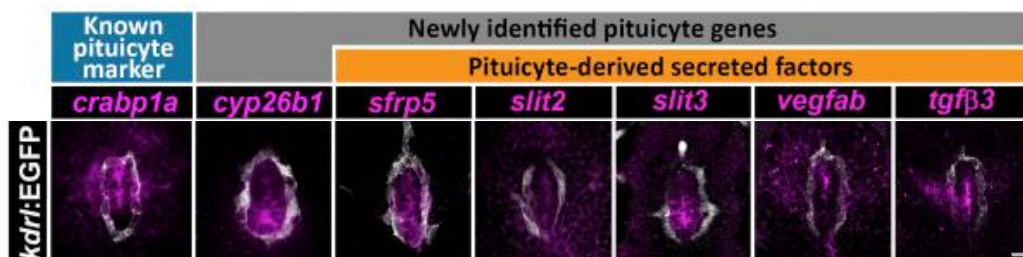


Ryc. 2. Pituicyty są związane z interfejsem nerwowo-naczyniowym. Obrazowanie całej przysadki wypreparowanej z 3-miesięcznego transgenicznego danio pręgowanego reportera, umożliwiające jednoczesną wizualizację aksonów neuroprzysadkowych, oznaczonych przez Tg (*oxt:EGFP*) i naczyń włosowatych krwi, oznaczonych przez Tg (*kdr1:mCherry-caax*), pokazuje Pituicyty znakowane β -Ala-Lys-Ne-AMCA. Pasek skali: 5 μ m. Interfejs akso-glejowo-naczyniowy jest widoczny zarówno w pars nervosa dziobowej (**B'**), jak i ogonowej (**B''**) przysadki mózgowej. Pasek skali: 10 μ m. Na podstawie Anbalagan S *et al.*, 2018.

postanowiliśmy najpierw zająć się kwestią braku transkryptomu glejowego pituicytu. Zamiast tworzyć nową transgeniczną rybę specyficzną dla glejowych pituicytów, przez uderzenie promotora *crabp1a* lub transgeniczną linię BAC opartą na *crabp1a* w celu sortowania pituicytów za pomocą FACS do badań transkryptomu, przyjęliśmy alternatywne podejście.

Ponieważ astrocyty ssaków wyrażają transportery peptydowe, które mogą wychwytywać β -Ala-Lys-AMCA - fluorescencyjny barwnik znakowany dipeptydem, przetestowaliśmy, czy glejowe pituicyty również będą wychwytywać i będą znakowane przez β -Ala-Lys-AMCA⁵². Przeprowadziliśmy dootrzewnowe wstrzyknięcie β -Ala-Lys-AMCA i zaobserwowaliśmy znakowanie komórek kontaktami axo-glejowymi i glejowo-naczyniowymi, jak wcześniej informowano u ssaków²⁹ (Ryc. 2). Zoptymalizowałem protokoły skutecznego znakowania i dysocjacji neuroprzysadki do FACS β -Ala-Lys-AMCA dodatnich glejowych komórek pituicytowych i β -Ala-Lys-AMCA ujemnych komórek innych niż przysadka mózgowa.

Opierając się na naszym transkryptomie wzbogaconym w pituicyty, zidentyfikowaliśmy nowe markery pituicytów i mnóstwo wydzielanych czynników (w tym Vegfab), które mogą potencjalnie wpływać na morfogenezę nerwowo-naczyniową. Nie było jednak wiadomo, czy te geny wzbogacone w pituicyty u dorosłych ulegają ekspresji w przysadce nerwowej podczas rozwoju.

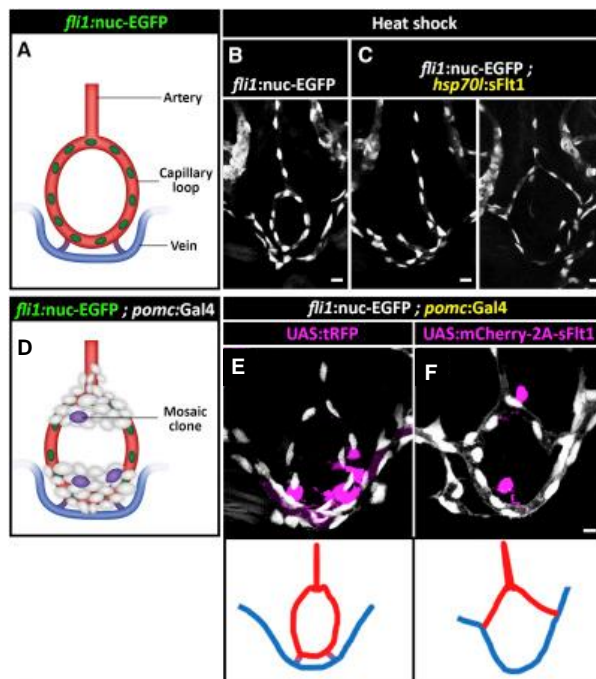


Ryc. 3. Ekspresja najlepszych genów wzbogaconych w pituicyty podczas rozwoju. Obrazy konfokalnego stosu Z przedstawiające fluorescencyjną hybrydyzację *in situ* (FISH) transgenicznych larw (5-8 dpf) przy użyciu sond skierowanych przeciwko mRNA znanych i wybranych nowych genów specyficznych dla pituicytów, a następnie barwienie anti-EGFP. Pokazano obszar nerwowo-przysadkowy, w którym oznaczono pętlę kapilarną [Tg(kdr1:EGFP)]. Pasek skali: 5 μ m. Na podstawie Anbalagan S i in., 2018.

Aby to przetestować, przeprowadziliśmy hybrydyzację *in situ* na larwach danio przęgwanego i zweryfikowaliśmy ekspresję kilku genów, które zostały zidentyfikowane w naszym dorosłym transkryptomie pituicytu. Zaobserwowaliśmy ekspresję genów kodujących kilka czynników (Vegf, Tgf β , Slit) wcześniej zaangażowanych w morfogenezę i przepuszczalność naczyń nerwowo-naczyniowych (Ryc. 3)^{50,53,54}. Następnie przyjęliśmy stroniczne podejście do zbadania roli niektórych z tych eksprymowanych genów w morfogenezie nerwowo-naczyniowej nerwowo-przysadkowej.

W niektórych narządach okołokomorowych myszy sygnalizacja Vegf i Tgf β sprzyja angiogenezie i przepuszczalności naczyń^{49,54-56}. Wykazano, że sygnalizacja Vegf i Tgf β reguluje ekspresję PLVAP i przejściowo wpływa na ekspresję białek połączeń ścisłych^{50,54}. Postawiliśmy hipotezę, Vegfab i Tgf β 3 promują angiogenezę nerwowo-przysadkową danio

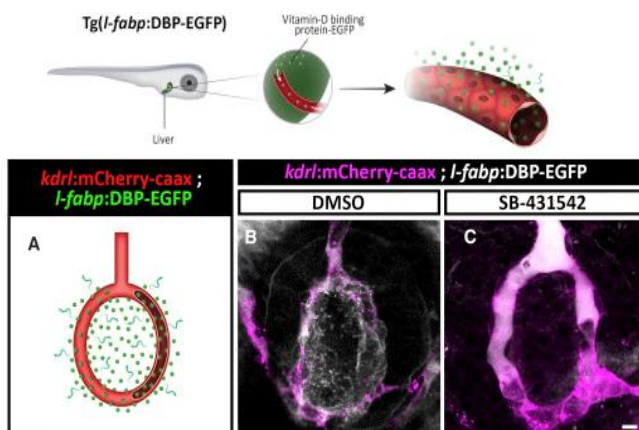
pręgowanego i przepuszczalność naczyń. Najpierw ustaliliśmy, że farmakologiczne zaburzenie sygnalizacji Vegf i Tgfβ doprowadziło do zależnego od stężenia wpływu na angiogenezę neuroprzysadkową (dane nie pokazane tutaj). Aby uzupełnić nasze badania



Ryc. 4. Rola sygnalizacji Vegf w morfogenezie naczyń nerwowo-przysadkowych.

(A-C) Analiza morfologiczna i liczba komórek tętnicy przysadki oraz pętli kapilarnej i żyły przy użyciu linii Tg(*fli1:nuc-EGFP*), która znakuje jądra komórek śródbłonka (A). Linie transgeniczną Tg(*hsp70l:sFlt1*) zastosowano do czasowego hamowania sygnalizacji Vegf/Vegfr2. Kontrolne (B) i larwy Tg (*hsp70l:sFlt1*) (C) poddano wielokrotnym zmianom temperatury o 28 °C do 37 °C między 3 dpf a 5 dpf. (D-F) Klony przysadki (E) z nadekspresją kontrolnego tRFP (F) lub rozpuszczalnego antagonisty sFlt1 (E i G). Podwójnie transgeniczne zarodki Tg (*pomc:Gal4; fli1:nuc-EGFP*) wstrzyknięto transpozonomowym transgenicznym wektorem ekspresyjnym zawierającym kontrolę UAS: tRFP lub UAS: mCherry-2A-sFlt1, umożliwiając ekspresję genu mozaiki w oddzielnych komórkach przysadki (fuksyna). Schematy pokazane na dole paneli przedstawiają normalną (F) i nienormalną (G) łączność pętli naczyń włosowatych przysadki w 5 larwach dpf z ekspresją mozaikową. Na podstawie Anbalagan S i in., 2018.

nad inhibitorami farmakologicznymi, współpracowaliśmy z grupą prof. Didiera Stainiera w Instytucie Maxa Plancka w Bad Nauheim. Grupa Stainiera opracowała wcześniej narzędzia genetyczne do czasoprzestrzennego zakłócenia sygnalizacji Vegf⁵⁷. Używając narzędzi transgenicznych, zakłóciliśmy sygnalizację Vegf na całym świecie, stosując ekspresję rozpuszczalnego Flt1 napędzaną szokiem cieplnym (podejście do receptora wabika) (Ryc. 4A-C) i stosując system Gal4-UAS napędzany promotorem specyficznym dla przysadki do ekspresji rozpuszczalnego Flt1 (Ryc. 4D- F)⁵⁸. Zakłócenie sygnalizacji Vegfa doprowadziło do wadliwej angiogenezy neuroprzysadkowej i dysmorficznych naczyń włosowatych (Ryc. 4).



Ryc. 5. Przepuszczalność naczyń neuroprzysadkowych można badać za pomocą reportera przepuszczalności *in vivo*.

Transgeniczne larwy Tg(*I-fabp:DBP-EGFP*; *kdr1:mCherry-caax*) traktowano DMSO (B) lub inhibitorem receptora TGF-β typu I, SB431542 (C), między 4 a 5 dpf. Pasek skali: 5 μm. Na podstawie Anbalagan S i in., 2018.

Oprócz sprawdzenia, czy Vegf i Tgf β 3 wpływają na przepuszczalność neuroprzysadki, użyliśmy transgenicznego reportera przepuszczalności naczyń opracowanego przez grupę dr Bela Anand-Apte Tg (Ifabp:DBP-GFP)⁵⁹ (Ryc. 5).

Ta transgeniczna ryba wykazuje ekspresję białka wiążącego witaminę D, kierowanego przez promotor specyficzny dla hepatocytów, połączonego z GFP, które jest konstytutywnie uwalniane do osocza krwi. Ostatnio grupa prof. Chengua Gu (Harvard Medical School, USA) wykazała, że ta transgeniczna ryba wykazuje aktywność przepuszczalności podobną do fluorescencyjnych barwników znacznikowych i w przeciwieństwie do fluorescencyjnych barwników znacznikowych, ze względu na konstytutywną ekspresję DBP-EGFP, unika się urazów związanych z iniekcją⁶⁰.

Korzystając z transgenicznego reportera przepuszczalności, przeprowadziliśmy czasowe zaburzenie sygnalizacji Vegf lub Tgf β 3 przy użyciu farmakologicznych inhibitorów przeciwko Vegfr i Tgf β r po ustanowieniu naczyń włosowatych neuroprzysadki^{61,62}. Zaobserwowaliśmy zmniejszoną wynaczynioną fluorescencję GFP w obszarze przysadki, co sugeruje, że sygnalizacja Vegf i Tgf β 3 promuje przepuszczalność naczyń nerwowo-przysadkowych (Ryc. 5).

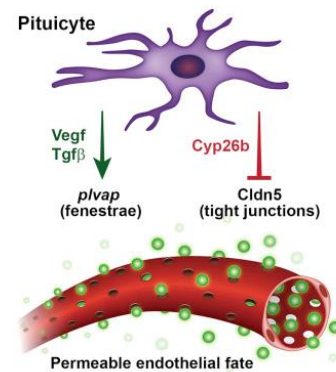
Przepuszczalne naczynia włosowate mózgu ssaków charakteryzują się obecnością markera fenestralnego - białka Plvap oraz brakiem lub nieciągłością białek połączeń ścisłych^{63,64}. Dlatego postawiliśmy hipotezę, że pituicyty wydzielają czynniki, które indukują przepuszczalny los naczyń włosowatych, promując i hamując odpowiednio ekspresję białek fenestralnych i połączeń ciasnych. Zaobserwowaliśmy również, że hamowanie Vegf / Vegfr2 lub Tgf β r zmniejszyło ekspresję *plvapb* markera fenestralnego, ale nie wpłynęło na ekspresję białka ścisłego połączenia - Claudin5 (dane pokazane tutaj). Jednak w przeciwieństwie do naczyń włosowatych splotu naczyniówkowego myszy, sygnalizacja Vegf i Tgf β może hamować przepuszczalność neuroprzysadki w niezależny sposób, przy czym sygnalizacja Tgf β odgrywa główną rolę.

W naszych danych transkryptomicznych zaobserwowaliśmy, że glejowe pituicyty wyrażały geny związane z zapaleniem, co sugeruje, że przysadka wykazuje stan podobny do stanu zapalnego podczas rozwoju. Leczenie farmakologiczne deksametazonem, dobrze przebadanym agonistą glukokortykoidów i supresorem stanu zapalnego, spowodowało zmniejszenie przepuszczalności neuroprzysadki (dane nie pokazane tutaj)⁶⁵. Wstrzyknięcie deksametazonu szczurom może hamować ekspresję genów szlaku kwasu retinowego w płucach i wątrobie, regionie z przepuszczalnym układem naczyniowym⁶⁶ oraz ekspresję poziomów VEGF w mięśniach⁶⁷. Zbadaliśmy, czy deksametazon wpływa na geny szlaku kwasu retinowego i ekspresję vegf. Stwierdziliśmy, że leczenie deksametazonem zmniejszyło jedynie ekspresję *cyp26b1* (dane nie pokazane tutaj). Cyp26b to enzym z rodziny P450, o którym wiadomo, że metabolizuje kwas retinowy⁶⁸.

Chociaż kontrowersyjne, wykazano, że leczenie farmakologiczne kwasem retinowym promuje ekspresję ścisłego połączenia i właściwości barierowe w hodowanych mysich komórkach śródbłonna mózgu⁶⁹. Zaobserwowaliśmy, że farmakologiczne hamowanie enzymu Cyp26 doprowadziło do zmniejszenia przepuszczalności i ekspresji ciasnych połączeń w naczyniach włosowatych nerwowo-przysadkowych (dane nie pokazane tutaj)⁷⁰.

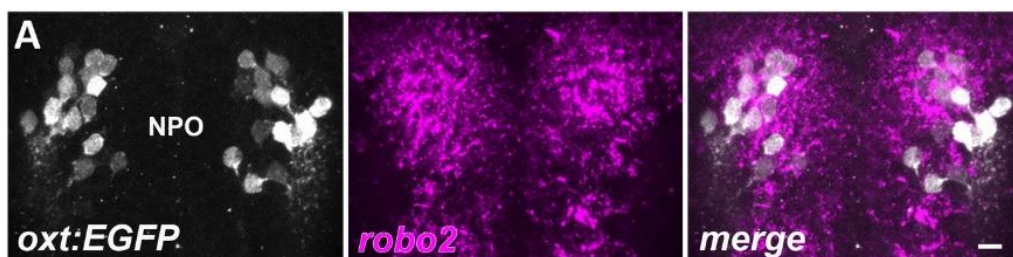
Ponieważ rola poziomów kwasu retinowego w BBB in vivo jest kontrowersyjna⁶⁹, wymagane będą dalsze badania in vivo ze specyficznymi tkankowo zaburzeniami genów szlaków kwasu retinowego, aby przetestować dokładną rolę kwasu retinowego w przepuszczalności neuroprzysadki. Po naszej pracy dwie grupy zgłosiły rolę lokalnych inhibitorów Wnt w hamowaniu przepuszczalności naczyń w narządach okołokomorowych myszy^{71,72}. Dlatego jest bardzo prawdopodobne, że podobne inhibitory Wnt mogą być zaangażowane w tłumienie przepuszczalności w przysadce nerwowej danio przegowanego.

Podsumowując, dochodzimy do wniosku, że czynniki pochodzące z pituicytów regulują „decyzję” komórek śródbłonka o przyjęciu przepuszczalnego losu śródbłonka zamiast tworzenia BBB. W szczególności glijowe pituicytes pituicytes wykorzystują podwójny mechanizm do instruowania i utrzymywania zlokalizowanego przepuszczalnego losu śródbłonka naczyniowego: sygnalizacja Vegf i Tgf β w celu utrzymania ekspresji p1vap, który jest molekularnym składnikiem przepony fenestralnej odpowiedzialnej za przezkomórkowe przejście białek. Równoległe enzym Cyp26b degradujący RA zapobiega nabywaniu losu naczyń mózgowych (tj. Nieprzepuszczalnego) poprzez hamowanie ekspresji białka ścisłego połączenia Cldn5 (**Ryc. 6**). Warto zauważyć, że mechanizm, dzięki któremu przepuszczalny los śródbłonka jest utrzymywany w rozwijającej się przysadce nerwowej, przypomina stany patofizjologiczne, takie jak ostre niedokrwienie mózgu, nowotwór mózgu i mysie modele choroby Parkinsona⁷³⁻⁷⁵. Zatem sposób, w jaki przysadka nerwowa ściśle reguluje przepuszczalność, może ujawnić ogólne zasady przepuszczalności naczyń w takich stanach patofizjologicznych.



Ryc. 6. Czynniki pochodzące od pituicytów regulują „decyzję” komórek śródbłonka o przyjęciu przepuszczalnego losu śródbłonka zamiast tworzenia BBB. Na podstawie Anbalagan S i in., 2018.

4.3.3 Genetics underlying synaptogenesis in neurohypophysis (Publication 2 and 3)



Ryc. 7. Ekspresja robo2 w neuronach oksytocyny podczas wczesnego rozwoju.

Konfokalne obrazy stosu Z przedstawiające fluorescencyjną hybrydyzację in situ (FISH) transgenicznych larw Tg (*oxt: EGFP*) (3 dni po zapłodnieniu (dpf)) przy użyciu sond skierowanych przeciwko mRNA *robo2* (fuksyna), a następnie barwienie anti-EGFP. Pokazano obszar preoptyczny neurosekrecji (NPO), w którym wyznakowano neurony OXT. Pasek skali: 20 μ m. Na podstawie Anbalagan S i in., 2019.

Następnie skupiliśmy się na genach regulujących morfogenezę synaptyczną neuroprzysadki. Opierając się na transkryptomie glejowym pituicytu, podjęliśmy kolejne badanie oparte na hipotezach. Konkretnie, śledziliśmy *slit3*, która była kolejnym silnie eksprymowanym genem przysadki mózgowej podczas rozwoju przysadki mózgowej (**Ryc. 3**). Gen kodujący receptor Slit3 - Robo2 był również eksprymowany w neuronach oksytocyny wystających z neuroprzysadki (**Ryc. 7**). Ponieważ sygnalizacja Robo-Slit jest dobrze znanym graczem w kierowaniu aksonami, synaptogenezie i dynamice aktywności⁵³, postawiliśmy hipotezę, że Robo2-Slit3 może odgrywać podobną rolę w aksonach lub synapsach neuroprzysadkowych. Ale nie zaobserwowaliśmy wyraźnie widocznego fenotypu aksonu lub synapsy nerwowo-przysadkowej u mutantów (dane nie pokazane tutaj). Musieliśmy też zaprojektować nowe protokoły obrazowania i oznaczania ilościowego w wysokiej rozdzielczości.

Oxytocin and vasopressin family	Sequence	Model organism
Oxytocin	CYIQNCPLG	Mammals
Vasopressin	CYFQNCPRG	Mammals
Mesotocin	CYIQNCPIG	Non-mammalian vertebrates (except fish)
Isotocin, Icthyotocin	CYISNCPIG	Teleost fish
Oxytocin	CYISNCPIG	Teleost - zebrafish
Vasotocin	CYIQNCPRG	Non-mammalian vertebrates

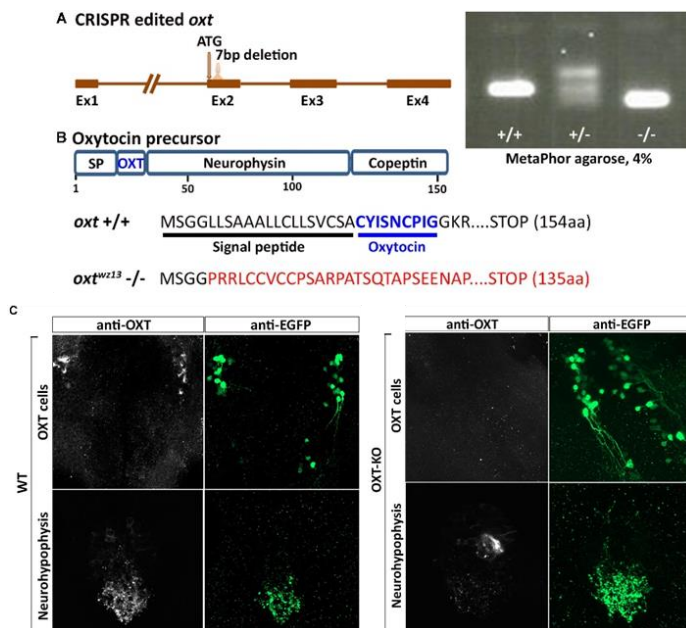
Tabela 1. Sekwencja peptydów neuroprzysadkowych. Oparte na *Wircer E et al.*, 2016.

Przysadka mózgowa ssaków zawiera liczne struktury zawierające neuropeptydy, zwane ciałami Herringa lub obrzękami aksonalnymi lub synapsami en passant i zakończeniami aksonalnymi^{29,37}. A większość badań na ssakach dotyczących synaps neuroprzysadkowych opierała się na mikroskopii elektronowej. Jednak takie struktury u danio pręgowanego nie zostały szczegółowo scharakteryzowane^{39,42}. Ze względu na przezroczystość optyczną larw danio pręgowanego, obecność linii transgenicznej znakującej oksytocynę i przeciwciał skierowanych przeciwko oksytocynie danio pręgowanego, zdecydowaliśmy się na wykonanie obrazowania przysadki nerwowej danio pręgowanego w oparciu o mikroskopię konfokalną w celu zidentyfikowania solidnych, policzalnych parametrów^{39,76}.

Ponieważ użyliśmy przeciwciał do ilościowego określenia zawartości neuropeptydu synaptycznego oksytocyny w neuroprzysadce danio pręgowanego, chcieliśmy mieć pewność co do jego specyficzności. Sama kolokalizacja z reporterem transgenicznym nie była dla nas zadowalająca, ponieważ wiadomo, że oksytocyna i wazopresyna kolokalizują w pewnych warunkach^{77,78,39}. Potrzebowaliśmy dodatkowego dowodu na jego specyficzność i aby mieć pewność, że nie reaguje krzyżowo z wazotocyną / wazopresyną danio pręgowanego, która różni się o 2 aminokwasy (**Tabela 1**)⁷⁹.

Najpierw wygenerowaliśmy nokaut oksytocyny danio pręgowanego przy użyciu ustalonych przeze mnie protokołów (**Ryc. 8 i publikacja 2**). Zaobserwowaliśmy całkowitą utratę i prawie całkowitą utratę barwienia immunologicznego oksytocyną odpowiednio w regionie nerwowo-wydzielniczym przedwzrokowym (neurosecretory preoptic area) i przysadce nerwowej (**Ryc. 8C**). Sugeruje to, że przeciwciało, którego używamy, jest specyficzne dla oksytocyny danio pręgowanego z jedynie niewielką reaktywnością na wazotocynę/wazopresynę. Warto zauważyć, że utrata oksytocyny nie spowodowała utraty

aktywności reporterowej ani utraty komórek aktywnych promotorowo oksytocyny u ryb transgenicznych.



Ryc. 8. Ekspresja *robo2* w neuronach oksytocyny podczas wczesnego rozwoju.

(A) Schematyczne przedstawienie genu oksytocyny (*oxt*). Miejsce startu translacji oksytocyny i miejsce docelowe sgRNA CRISPR zaznaczono strzałkami. Ryby niosące mutację indel 7-bp w genie *oxt* można wykryć za pomocą elektroforezy żelowej metaforę amplikonów *oxt*. (B) Schematyczne przedstawienie przewidywanych produktów translacji z alleli *oxt*^{+/+} and *oxt*^{-/-}. (C) Obrazy konfokalne przedstawiające reprezentatywne barwienie immunologiczne oksytocyną w *oxt*^{+/+} i *oxt*^{-/-} na tle transgenicznego reportera Tg (*oxt*: EGFP) (zielony). Paski skali: 10 μm. Na podstawie Blechman J et al., 2018.

Następnie nie było wiadomo, czy obrzęki aksonalne neuroprzysadki danio pręgowanego znakowane oksytocyną mają charakter synaptyczny. Najpierw potwierdziliśmy, że takie obciążone oksytocyną struktury w przysadce nerwowej danio pręgowanego są rzeczywiście synapsami, ponieważ zaobserwowaliśmy kolokalizację oksytocyny neuroprzysadkowej z reporterem pęcherzyków synaptycznych (dane nie pokazane tutaj). W mikroskopii elektronicznej zaobserwowaliśmy również zdarzenia fuzji dużych, gęstych pęcherzyków rdzeniowych, wskazujące na aktywność egzocytozy w synapsach neuroprzysadkowych (dane nie pokazane tutaj). Następnie, po porównaniu wielu programów do analizy obrazu (ImageJ, Imaris, Volocity), zdecydowaliśmy się użyć Volocity do solidnej ilości wybarwionych immunologicznie obrazów synaps neuroprzysadkowych z mikroskopii konfokalnej (Ryc. 9 i publikacja 3).

To pozwoliło nam określić ilościowo liczbę i objętość synaps dodatnich pod względem oksytocyny. Korzystając z naszych technik analizy obrazu, następnie przeanalizowaliśmy, czy morfanty szczeliny 3 lub mutant *robo2* - na manowce wykazują wadliwe aksony lub synapsy oksytocyny⁸⁰. W przeciwieństwie do błędów znajdowania ścieżki aksonalnej w innych obszarach mózgu, nie zaobserwowaliśmy żadnych defektów w liczbie wystających aksonów oksytocyny w przysadce nerwowej morfantów *slit3* i mutantów *robo2* (Ryc. 9B)⁸⁰. Zamiast tego zaobserwowaliśmy zmniejszoną liczbę synaps neuroprzysadkowych oksytocyny w morfantach *slit3* i larwach mutantu *robo2* (Ryc. 9B).

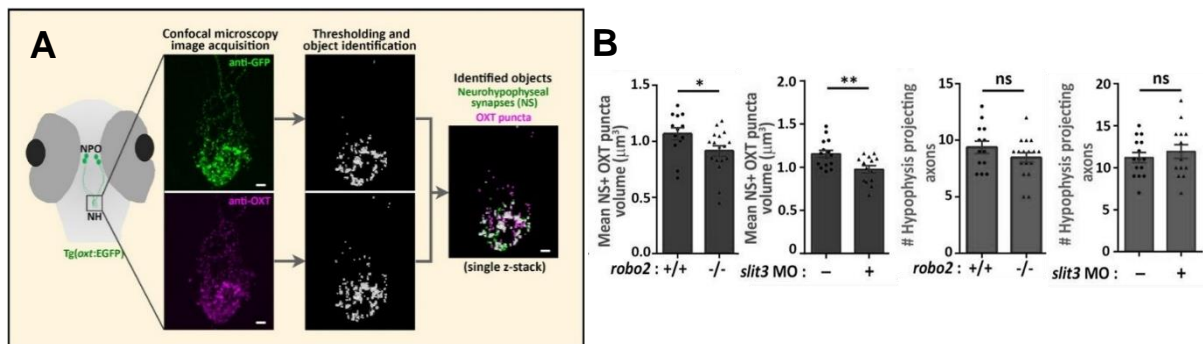


Fig. 9. Robo2 i Slit3 promują zawartość oksytocyny synaptycznej w neuroprzysadce.

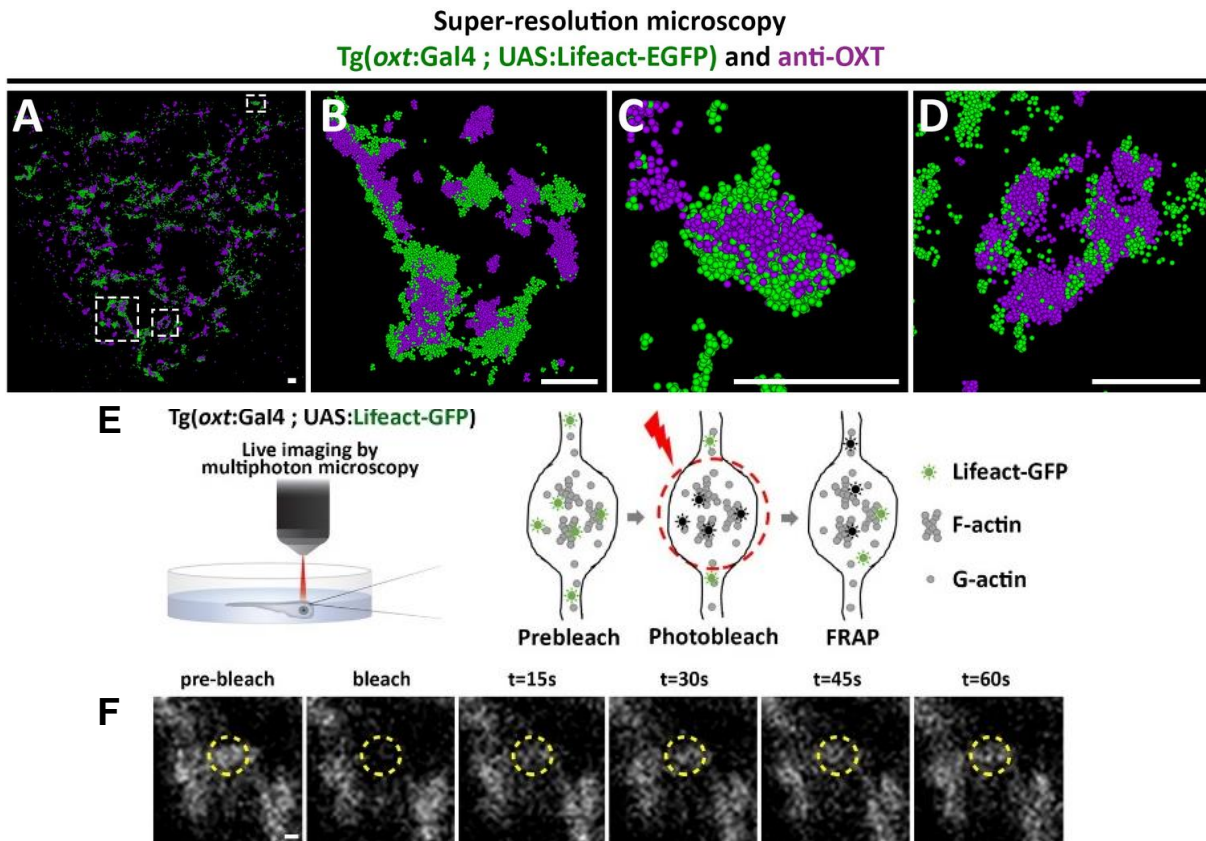
Obrazowanie za pomocą mikroskopu konfokalnego całego przysadki 5 dni po zapłodnieniu (dpf) transgenicznego reportera Tg (*oxt*: EGFP) danio pręgowanego po immunobarwieniu za pomocą anty-EGFP i swoistego przeciwciała przeciwko endogennemu białku oksytocyny. Analizę GFP-dodatnich synaps neuroprzysadkowych (NS) i oksytocyny punkta przeprowadzono przy użyciu funkcji „identyfikatora obiektu” w oprogramowaniu Volocity na poszczególnych kanałach. Skala: 5 μ m. **(B)** Wykresy przedstawiające wielkość synaps dodatnich pod względem oksytocyny w neuroprzysadce (NS) i liczbę aksonów wystających w neuroprzysadce w 8 dni po zapłodnieniu (dpf) *robo2*^{+/+} (n = 13) vs *robo2*^{-/-} (n = 17) larwy (* p < 0, 05 Student’s t-test z Cohen’s d = 0, 82; ns oznacza nieistotne) i po powaleniu *slit3*. Kontrola (n = 15) vs larwy, którym wstrzyknięto morfolino *slit3* (n = 14) (** p < 0, 05 z Cohen’s d = 1, 23; ns oznacza nieistotny, test t-Studenta). Zaadaptowane z Anbalagan S et al., 2019.

Ponieważ wiadomo, że sygnalizacja Robo2-Slit3 reguluje dynamikę aktyny⁵³, postawiliśmy hipotezę, że Robo2 może również regulować aktywną synaptyczną w synapsach oksytocyny. U szczurów badania oparte na EM wykazały, że neuroprzysadkowa aktywna synaptyczna to zależne od aktywności, dynamiczne struktury istniejące jako pule korowe związane z błoną i pule związane z cytoplazmatycznym LDCV (duże, gęste pęcherzyki rdzeniowe)⁸¹. Ale struktury aktywny nerwowo-przysadkowej danio pręgowanego nie były wcześniej scharakteryzowane.

Aby zbadać architekturę aktywny w neuroprzysadkowych synapsach oksytocyny, najpierw wykonaliśmy mikroskopię stochastycznej rekonstrukcji optycznej o super rozdzielczości (STORM). Było to możliwe przy użyciu transgenicznego ekspresji Lifeact-GFP, o której doniesiono, że znakuje większość F-aktyny in vivo⁸²⁻⁸⁴. Zaobserwowaliśmy, że sygnał Lifeact-EGFP wykazywał strukturę przypominającą klatkę otaczającą oksytocynę w synapsach neuroprzysadkowych (**Ryc. 10A**). Nasze wyniki są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami, że włókna aktynowe tworzą strukturę przypominającą klatkę związaną z pęcherzykami synaptycznymi⁸⁵.

Następnie, aby zbadać, czy Robo2 reguluje dynamikę synaptycznej aktywny oksytocyny, użyłem mutantu *robo2* danio pręgowanego (*astray*) w połączeniu z sondą Lifeact-GFP^{80,86}. W szczególności przeprowadziliśmy odzyskiwanie fluorescencji po fotowybieleniu (FRAP) na poszczególnych synapsach oksytocyny wyrażających czujnik F-aktyny Tg(*oxt*: Gal4; UAS:Lifeact-EGFP) u zwierząt *robo2*^{+/+} lub *robo2*^{-/-} (**Ryc. 10E-F**). Odkryliśmy, że dynamika synaptyczna Lifeact-EGFP jest zaburzona w mutantach *robo2*. Mutanty *robo2* wykazywały zmniejszoną frakcję ruchomą Lifeact-EGFP i zwiększoną frakcję stabilną, co było skorelowane ze zmniejszoną zawartością oksytocyny w tych synapsach. Sugeruje to, że

sygnalizacja Robo2 reguluje dynamikę aktyny synaptycznej neuroprzysadkowych neuronów oksytocyny. Trzeba przyznać, że nadekspresja Lifeact-GFP przy użyciu niezwykle aktywnych promotorów może być szkodliwa dla endogennej organizacji F-aktyny⁸⁷. Niemniej jednak fakt, że obserwujemy defekty dynamiki Lifeact-GFP tylko w mutantach *robo2*, ale nie w typie dzikim, sugeruje, że mutanty *robo2* mają wpływ na dynamikę struktury aktyny opartej na artefaktach natywnych lub indukowanych przez Lifeact-GFP.

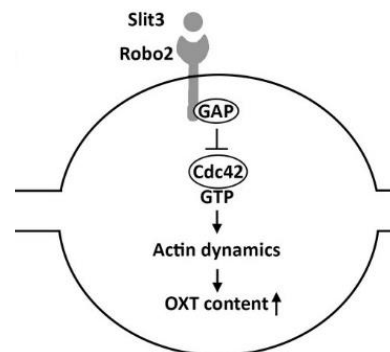


Ryc. 10. Neuroprzysadkowa lokalizacja i dynamika aktyny synaptycznej. (A) Obrazy z mikroskopii stochastycznej rekonstrukcji optycznej (STORM) obszaru neuroprzysadki 6 dni po zapłodnieniu (dpf) larw Tg(*oxt:gal4*; UAS:lifeact-EGFP) wybarwione przy użyciu przeciwciał anti-OXT i anti-GFP. (B-D) Powiększenia kwadratów obszarów. Paski skali: 1 μ m. (E) Monitorowanie w czasie rzeczywistym dynamiki aktyny synaptycznej w żywym transgenicznym reporterze Tg (*oxt:Gal4*; UAS:Lifeact-EGFP). Larwy osadzone w 0,1% niskotopliwej agarozie i zobrazowano przy użyciu mikroskopii wielofotonowej po odzyskaniu fluorescencji po fotowycielaniu (FRAP). (F) Obrazy szeregów czasowych eksperymentu FRAP w synapsie neuroprzysadkowej z ekspresją Lifeact-EGFP. Paski skali: 200 nm. Przyjęty z Anbalagan S et al., 2019.

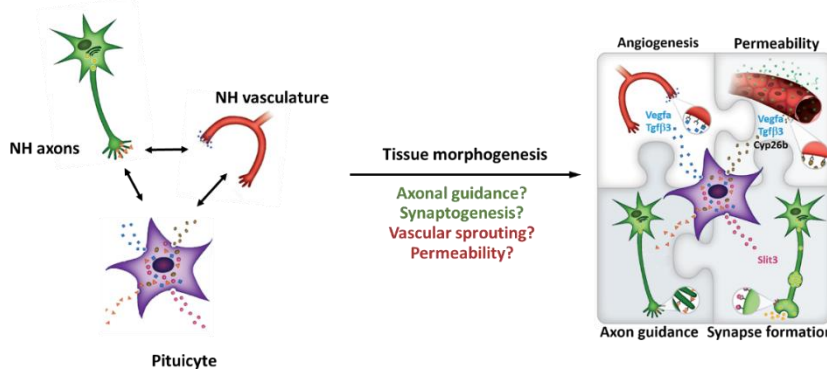
Następnie zapytaliśmy, czy Robo2 odgrywa rolę w akumulacji synaptycznej pęcherzyków obciążonych oksytocyną. W tym celu, korzystając z nowej transgenicznej linii fuzyjnej OXT-EGFP dano pręgowanego, opracowanej przez moją koleżankę, dr Jannę Blechman, przeprowadziłem eksperymenty FRAP przy użyciu mikroskopii wielofotonowej na żywych larwach. Umożliwiło to monitorowanie *in vivo* dynamiki pęcherzyków obciążonych OXT. Zauważyłem, że większość pęcherzyków była nieruchoma, ponieważ tylko 13% niewybielanych pęcherzyków fluorescencyjnych wymieniło się na synapsy wybielone światłem (dane pokazane tutaj). Trzeba przyznać, że znakowanie nonapeptydu za pomocą GFP może indukować artefakty, niemniej jednak takie praktyki są powszechne w dynamice żywych pęcherzyków, a nasze wyniki są podobne do wcześniejszych badań na neuroendokrynnych końcach *Drosophila*⁸⁸. Zaobserwowaliśmy, że Robo2 reguluje

gromadzenie się tranzytowych pęcherzyków obciążonych OXT w synapsach. To, czy ten fenotyp jest spowodowany zmniejszonym wychwytywaniem pęcherzyków, czy zwiększoną egzocytozą, wymaga dalszych badań.

Aby połączyć dynamikę aktywności synaptycznej z sygnalizacją Robo2 i regulacją zawartości neuropeptydów, skupiliśmy się na międzykomórkowej GTPazie Cdc42, która działa poniżej szlaku sygnałowego Robo, regulując dynamikę aktywności⁵³. W tym celu uzyskałem konstrukty związane z Cdc42 od prof. Naoki Mochizuki (National Cerebral and Cardiovascular Center, Osaka, Japonia) i przeprowadziłem eksperymenty z utratą i wzmocnieniem oksytocyny-neuronów funkcji Cdc42 przy użyciu systemu Gal4-UAS. Zaobserwowaliśmy, że ekspresja dominującego ujemnego (tj. związanego z GDP) Cdc42 (T17N) w synapsach oksytocyny doprowadziła do zwiększenia poziomu oksytocyny u ryb WT w sposób zależny od dawki, podczas gdy ekspresja konstytutywnie aktywnego (tj. związanego z GTP) mutantu forma CDC42 miała wzajemny efekt⁸⁹. Mutant *robo2* był oporny na wpływ Cdc42(T17N) na poziomy oksytocyny synaptycznej, co sugeruje, że Robo2 działa powyżej Cdc42 w kontekście zawartości oksytocyny synaptycznej. Podsumowując, nasze odkrycia ujawniają, że sygnalizacja Slit3-Robo2-Cdc42 moduluje dynamikę aktywności synaptycznej, aby utrzymać poziomy neuropeptydu oksytocyny w stanie ustalonym, który jest łatwo przygotowany do wydzielania na żądanie fizjologiczne. (Ryc. 11).



Ryc. 11. Model roli Robo2 w synapsach neuroprzysadkowych: Sygnalizacja synaptyczna Slit3-Robo inaktywuje Cdc42 przez GAP, wpływając na przejście białka Rho-GTPazy Cdc42 ze stanu związanego z GTP do GDP. Inaktywacja Cdc42 zmniejsza polimeryzację aktywności i zwiększa zawartość synaptycznego OXT. Przyjęty z Anbalagan S et al., 2019.

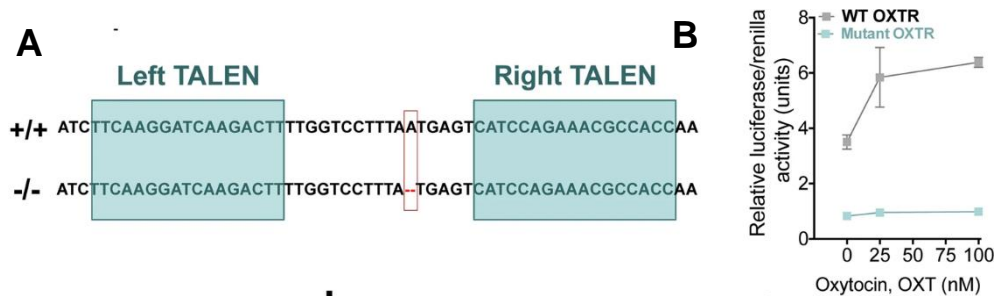


Ryc. 12. Podsumowując, nasze wyniki sugerują, że glijowe pituitarycyty regulują morfogenezę interfejsu nerwowo-naczyniowego poprzez wiele wydzielanych czynników.

Ogólnie rzecz biorąc, zidentyfikowaliśmy główne mechanizmy genetyczne i cząsteczki sygnałowe, za pomocą których morfogeneza nerwowo-naczyniowa jest ustalana u larw danio pręgowanego (ryc. 12). Ponieważ czynniki te są również zaangażowane w morfogenezę nerwowo-naczyniową ssaków, kuszące jest spekulowanie, że mutacje w regionach kodujących te geny będą związane z dysfunkcją neuroprzysadki^{53,56,90}. Dzięki większej liczbie danych genetyki populacji powinno być możliwe oszacowanie, czy SNP w tych genach obserwuje się u pacjentów z moczówką prostą^{53,56,90}.

4.3.4 Ukierunkowane narzędzia inżynierii genetycznej do badania genetyki rozwoju interfejsu nerwowo-naczyniowego przysadki mózgowej (publikacja 4 i publikacja 5)

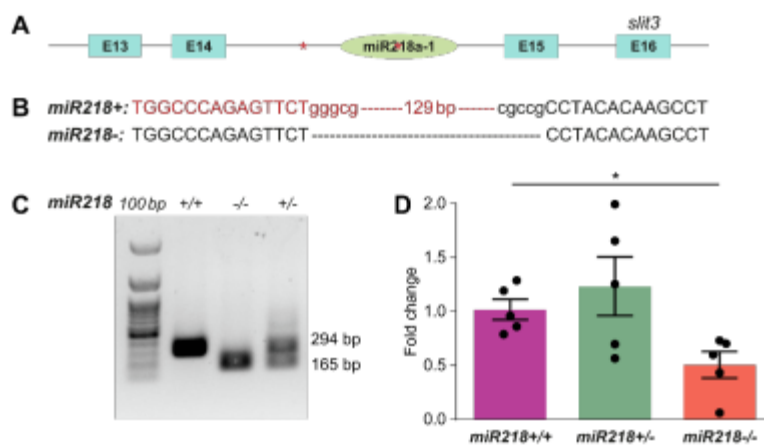
Dzięki dostępności naszych danych dotyczących transkryptomu glejowego pituicytu, mieliśmy teraz kilka genów do zbadania. Aby zbadać rozwój naczyń nerwowo-przysadkowych, potrzebowaliśmy eksperymentów utraty funkcji opartych na nokaucie genów, aby wesprzeć nasze wyniki utraty funkcji oparte na morfolinie. Najpierw zacząłem wdrażać technikę nokautu genu danio pręgowanego w laboratorium Levkowitza w oparciu o istniejące protokoły TALEN (nukleazy efektorowe podobne do aktywatorów transkrypcji) i CRISPR (zgrupowane regularnie przeplatane krótkie powtórzenia palindromiczne) dla danio pręgowanego^{91,92}.



Ryc. 13. (A) Generacja mutantu *oxtr* (obecnie *oxtra*) przenoszącego linię zarodkową. Miejsca TALEN ukierunkowane na pierwszy egzon genu *oxtra* doprowadziły do powstania mutacji Single bp indel, która będzie kodować skrócony receptor. **(B)** Różne stężenia syntetycznej oksytocyny, zwiększona aktywność reporterowa cAMP OXTR transfekowanego WT, ale nie mutantu. Przyjęty z Nunes A.R et al., 2020.

Jako pierwszy krok, używając nokautów, chcieliśmy przetestować geny roli, które były wcześniej zaangażowane w rozwój przysadki nerwowej. Wcześniej, korzystając z badań opartych na morfolinie, grupa Levkowitz wykazała, że receptor oksytocyny (*Oxtra*) jest wymagany do morfogenezy naczyń neuroprzysadkowych³⁹. Chcieliśmy sprawdzić, czy mutanty *oxtra* mogą odtwarzać fenotypy morfolino nerwowo-naczyniowe. Stworzyłem mutantu *oxtra* za pomocą TALEN, ale nie zaobserwowałem wyraźnie widocznego fenotypu na morfogenezie naczyń nerwowo-przysadkowych w larwach homozygotycznych *oxtra*^{-/-} (Ryc. 13, Publikacja 4 i dane tutaj nie pokazane). Niemniej jednak podzieliłem się zmutowaną rybą z dr Anną Ritą Nunes i prof. Rui Olivierą (Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugalia) do badań behawioralnych danio pręgowanego w ramach współpracy i stwierdzili, że *Oxtra* jest wymagana do biologicznego wykrywania ruchu w danio pręgowany⁴.

Ze względu na względną łatwość generowania sgRNA CRISPR do docelowych genów za pomocą Cas9, następnie opracowałem technikę nokautu genu CRISPR opartą na jednoczesnym wstrzyknięciu gRNA z białkiem Cas9 do zarodków w 1 stadium komórkowym. Było to możliwe dzięki szczegółowemu protokołowi dr Jamesa Gagona z grupy prof. Alexandra Schiera opublikowanemu w czasopiśmie PLoS One⁹¹. Przetestowałem również i zoptymalizowałem różne protokoły, aby szybko genotypować mutanty. W końcu, w zależności od mutacji, zdecydowałem się użyć różnych technik, takich jak RFLP - polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych, metaforyczna elektroforeza ampikonów na żelu agarozowym i analiza krzywej topnienia HRM w wysokiej rozdzielczości.



Rycina 14. nokaut *mir218a-1* przy użyciu CRISPR/Cas9.

(A) struktura genu *slit3* z *mir218a-1* osadzonym w intronie 14. (B) Schemat przedstawiający sekwencje usunięte w mutancie *mir218a-1* (sekwencje nasion usunięto). (C) Elektroforeza w żelu agarozowym regionu obejmującego *mir218a-1*. (D) Analiza ekspresji qRT-PCR poziomów *mir218*. Przyjęty z Swaminathan A et al., 2023.

Stworzyłem mutantą *slit3* w kierunku naszych wysiłków dla **Publikacji 3**, ale *slit3* zawierał również intronowy *mir218a-1* (ryc. 14A). Mir218 może regulować ekspresję Robo, a także promować morfogenezę naczyń siatkówki u myszy^{93,94}. Stworzyliśmy nokaut *mir218a-1*, aby przeanalizować rolę *mir218a-1* osadzonego w intronie *slit3* i *slit3* w neurogenie nerwowo-naczyniowej (ryc. 14B-C). Nie zaobserwowałem żadnych fenotypów nerwowo-naczyniowych u larw *mir218a-1*^{-/-} w naiwnych warunkach. Niemniej jednak podzieliłem linię *mir218a-1*^{-/-} z dr Kabashi Edorem (Paris Brain Institute - Institut du Cerveau) i dr Amrutha Swaminathan (postdoc w grupie Levkowitz, obecnie PI w IISER, Trivandrum, Indie). Dr Edor był zainteresowany testowaniem roli *mir218* w funkcjach neuronów ruchowych danio pręgowanego, ponieważ w mysie modele mutantów Mir218 wykazują dysfunkcje motoryczne⁹⁵. Podczas gdy dr Swaminathan była zainteresowana przetestowaniem, czy *mir218a-1* danio pręgowanego promuje odporność na stres, podobnie jak rola Mir218 w promowaniu odporności na stres u myszy⁹⁶. Praca dr Swaminathan doprowadziła do **publikacji 5** (Swaminathan A i in., 2023), w której ustaliła larwy danio pręgowanego jako model do badania odporności na stres, a także zauważyła, że *mir218a-1* promuje odporność na stres u danio pręgowanego⁵.

W końcu moje protokoły zostały zastosowane przez innych członków grupy Levkowitza. dr Jakob Biran, dr Michael Gliksberg i dr Ludmila Gordon wygenerowali odpowiednio mutanty *pac1*, *oxtrb* i *plvapa*^{97,98}. Ogólnie rzecz biorąc, korzystając z istniejących protokołów opartych na literaturze, wygenerowałem kilka nokautów genów danio pręgowanego, które można zastosować do badania genetyki molekularnej rozwoju przysadki mózgowej.






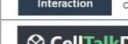
















Warto wspomnieć, że zaobserwowałem brak fenotypów morfogenezy nerwowo-naczyniowej w kilku homozygotycznych mutantach naszych genów kandydujących i byłem zakłopotany tymi wynikami. W końcu zdaliśmy sobie sprawę, że kompensacja genetyczna lub adaptacja transkrypcyjna może być jedną z przyczyn braku fenotypu u mutantów indel^{99,100}.

4.3.5 Wdrażanie zasady 3R w badaniach na zwierzętach w celu zbadania genetyki molekularnej przysadki nerwowej u danio pręgowanego (Publikacja 6)

Jednym z wyzwań stojących przed badaniami na zwierzętach jest etyczna i biurokratyczna polityka w zakresie badań na zwierzętach, która jest wymagana do

zapewnienia odpowiedniej opieki i ograniczenia szkód wyrządzanych zwierzętom. W rzeczywistości ostatnio pojawiły się sugestie, aby wycofać badania na zwierzętach do czasu udostępnienia odpowiednich alternatywnych systemów modelowych, a takie zmiany nie uwzględniają wyzwań stojących przed krajami rozwijającymi się¹⁰¹. I istnieje silny nacisk na wdrożenie zasady 3R (Zastąp, Zmniejsz i Udoskonal) w badaniach na zwierzętach. Chociaż społeczność naukowa zajmująca się badaniami na zwierzętach jest świadoma faktu, że nawet symulacje oparte na superkomputerach, przewidywania oparte na sztucznej inteligencji i badania oparte na organoidach mogą dać jedynie wgląd w ułamek prawdziwej złożoności i tajemnic życia zwierząt, wciąż musimy znaleźć alternatywne systemy modelowe. Jeśli musimy wdrożyć zasadę 3R w badaniach na zwierzętach i zająć się genetyką molekularną neuroprzysadki danio pręgowanego, potrzebujemy nowatorskich narzędzi in silico dostosowanych do danio pręgowanego. Postanowiliśmy je stworzyć i ta kwestia zaowocowała **Publikacją 6** (Chodkowski M et al., 2023).

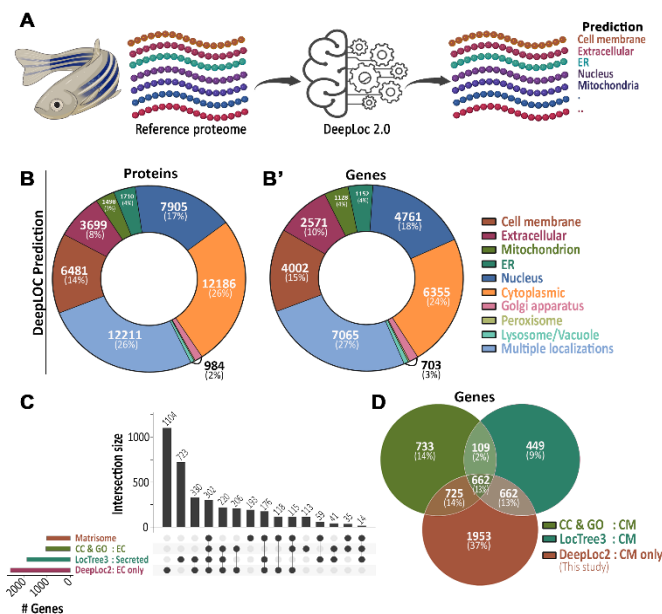
Najpierw postanowiliśmy zidentyfikować wszystkie geny, które mogą kodować pary ligand-receptor, które mogłyby regulować morfogenezę aksonalną neuroprzysadki. Stawiliśmy jednak czoła kilku wyzwaniom: 1). Brakowało nam neuroprzysadkowego transkryptomu aksonalnego lub danych proteomicznych, które mogłyby dostarczyć nam tożsamości ligandów opartych na białkach i receptorów błonowych w aksonach i synapsach neuroprzysadkowych; 2). Zdaliśmy sobie również sprawę, że nie było aktywnie utrzymywanych zbiorów danych dotyczących czynników wydzielanych przez danio pręgowane, receptorów i ich interakcji. Niewiele istniejących przewidywań dotyczących sekretomu i proteomu błonowego opiera się na niekompletnych danych adnotacyjnych^{102,103}.

Source	Ligands	Receptors	Interactome
 	  		
  	 	 	 
	  	  	  

Ryc. 15. Tabela przedstawiająca dostępną bazę danych i narzędzia do badania receptorów ligandów głównych organizmów modelowych kręgowców. Przyjęty z Chodkowski M et al., 2023.

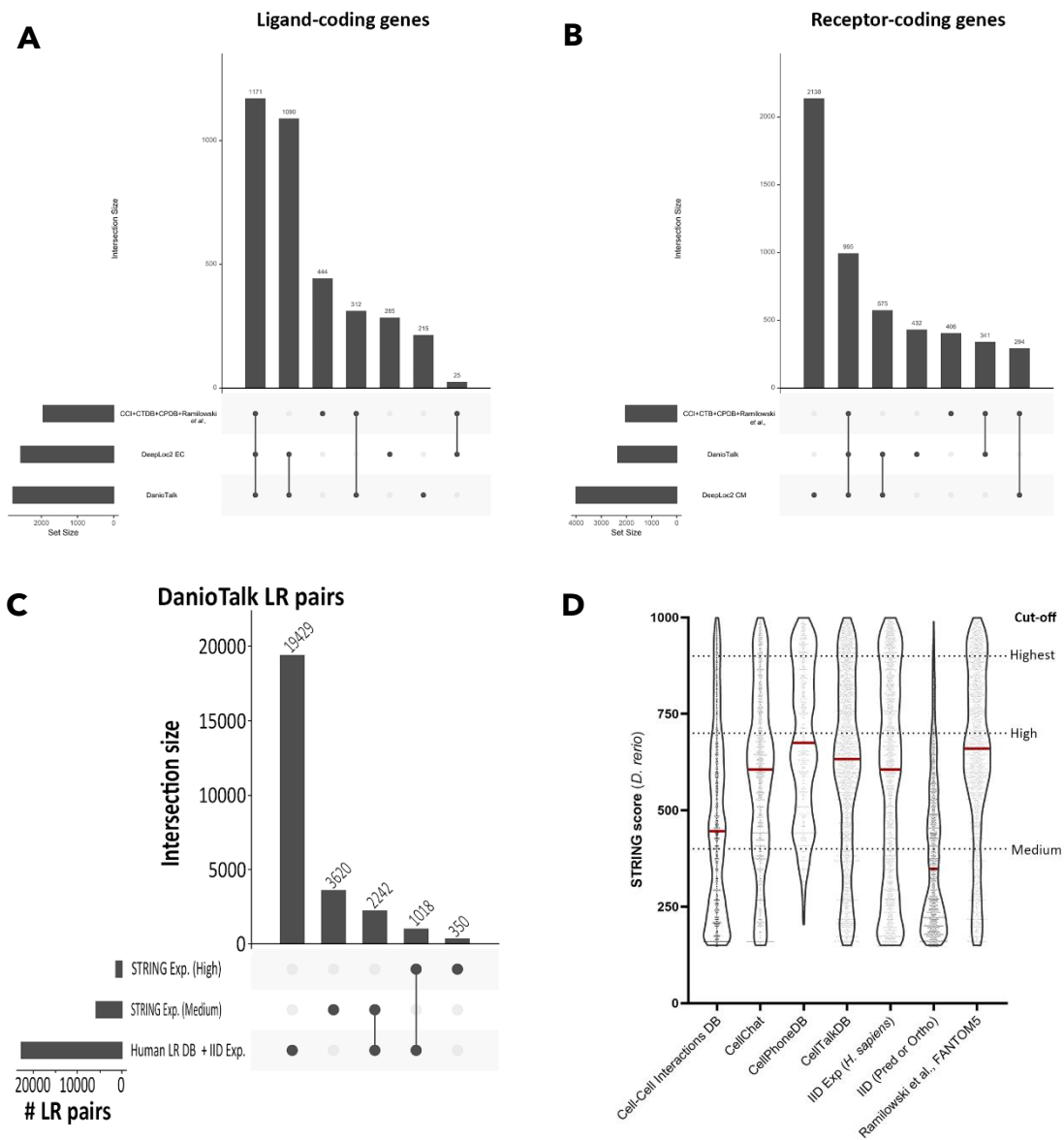
Mimo, że narzędzia zbudowane na zapisach interakcji ssaków zostały zastosowane do mapowania interakcji ligand-receptor danio pręgowanego, takie narzędzia pominią geny danio pręgowanego z niekompletnymi zapisami ortologicznymi¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. W związku z tym konieczne było zbudowanie bazy danych ligandów i receptorów danio pręgowanego, która zawiera również informacje o genach bez ortologów i genach z niepełnymi danymi adnotacyjnymi (ryc. 15).

Ze względu na brak dowodów eksperymentalnych adnotacje dotyczące lokalizacji komórkowej białek danio pręgowanego były częściowe. Dlatego też, gdybyśmy zastosowali podobne podejście do budowy baz danych ligand-receptor ssaków, najprawdopodobniej przegapilibyśmy wiele genów pozbawionych adnotacji¹⁰⁷. Współpracowałem z dr Andrzejem Zielezińskim w naszym Instytucie i podeszliśmy do tego problemu w sposób systemowy. Po raz pierwszy użyliśmy DeepLoc 2.0, algorytmu głębokiego uczenia opartego na sekwencjach, który może przewidywać lokalizację białek w komórce z dużą dokładnością¹⁰⁸. Poddaliśmy obecny proteom referencyjny danio pręgowanego (UP000000437) opartemu na DeepLoc 2.0 przewidywaniu lokalizacji komórkowej całego proteomu danio pręgowanego (ryc. 16). DeepLoc 2.0 przewidywał, że 3699 (8%) i 6481 (14%) białek było zlokalizowanych odpowiednio wyłącznie na zewnątrz komórki i w błonie komórkowej. Odpowiada to 2571 (10%) i 4002 (15%) genom, które kodują odpowiednio białka zewnątrzkomórkowe i zlokalizowane w błonie. W porównaniu z poprzednimi zapisami, DeepLoc 2.0 zidentyfikował dodatkowe geny 1104 i 1953 kodujące odpowiednio białka zewnątrzkomórkowe i błonowe (ryc. 16).



Ryc. 16. Przewidywanie lokalizacji komórkowej proteomu referencyjnego danio pręgowanego

(A) Grafika przedstawiająca oparte na DeepLoc 2.0 przewidywanie lokalizacji komórkowej referencyjnego proteomu danio pręgowanego. (B) Wykres pierścieniowy przedstawiający główne przewidywania DeepLoc 2.0 dotyczące proteomu danio pręgowanego. Pokazano liczbę białek (B) i genów kodujących białka (B'). (C) Wykres typu Upset porównujący liczbę genów z istniejącymi zapisami adnotacji zewnątrzkomórkowych i przewidywaniami „zewnątrzkomórkowymi” opartymi na DeepLoc 2.0. CC & GO wskazuje odpowiednio lokalizację komórkową i rekordy terminów GO, dostępne w bazie danych UniprotKB. (D) Diagram Venna porównujący geny z istniejącymi zapisami adnotacji lokalizacji błony komórkowej i przewidywaniami „błony komórkowej” opartymi na DeepLoc. Przyjęty z Chodkowski M et al., 2022.

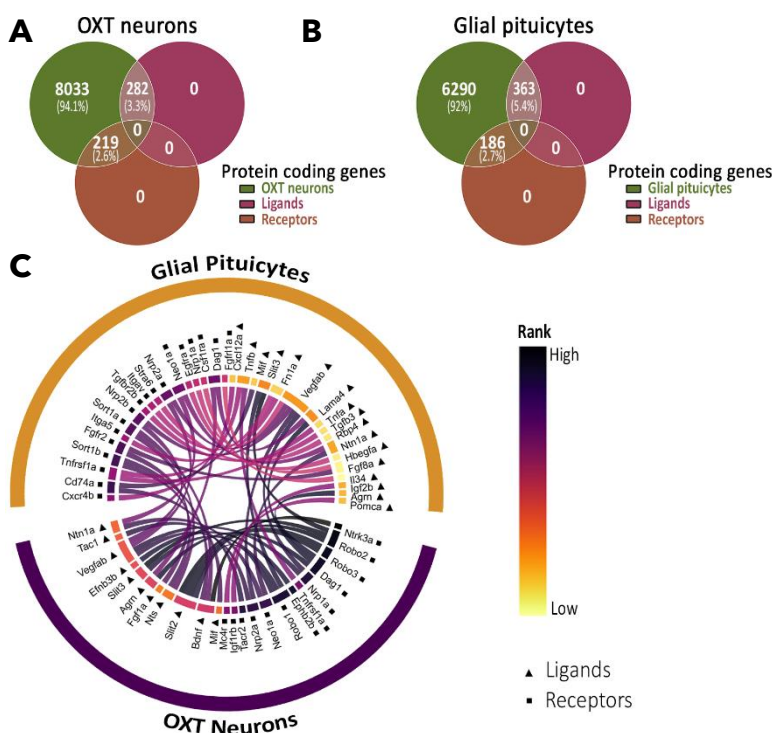


Ryc. 17. Wartości ilościowe bazy danych DanioTalk (A) Wykres typu Upset porównujący liczbę genów kodujących ligandy kurowane z przewidywanymi przez DeepLoc2 białkami i ligandami tylko zewnątrzkomórkowymi w bazach danych ludzkiego liganda-receptora. **(B)** Wykres typu Upset porównujący liczbę genów kodujących wylczone receptory z przewidywanymi przez DeepLoc2 białkami i receptorami zawierającymi tylko błonę komórkową i receptory w bazach danych ludzkich ligand-receptor (połączone). **(C)** Wykres typu Upset porównujący liczbę genów bazy danych par ligand-receptor DanioTalk pochodzących z bazy danych STRING danio pręgowanego (wysokie lub średnie odcięcie) lub ortologicznych par ligand-receptor w bazach danych ludzkiego ligand-receptor. **(D)** Wykres typu skrzypiec porównujący wynik STRING PPI danio pręgowanego dla ortologicznych par LR w ludzkich bazach danych LR i ludzkich bazach danych IID. Przyjęty z *Chodkowski M et al., 2022.*

Aby poradzić sobie z ograniczeniami DeepLoc w przewidywaniu białek bez peptydów sygnałowych, przeprowadziliśmy również ręczną kurację opartą na adnotacjach (terminy ontologii genów) i lokalizacji komórkowej (UniprotKB) danio pręgowanego i ortologicznych białek ssaków¹⁰⁹. Nasza baza danych ligandów i receptorów błony komórkowej zawiera odpowiednio 2,788 (10,5%) i 2343 (8,8%) genów kodujących białka. W porównaniu z zestawem danych matrisomów danio pręgowanego, nasze wyselekcjonowane listy ligandów zawierają 1,848 dodatkowych genów (1,566 prognoz DeepLoc 2 i 282 ręcznie

wyselekcjonowanych genów kodujących zewnątrzkomórkowo) (ryc. 16). Ponadto porównaliśmy naszą wyselekcjonowaną bazę danych ligandów, receptorów z ortologami ligandów i receptorów z baz danych ludzkich ligand-receptor (CellChatDB, CellPhoneDB, Ramilowski JA i in., CellTalkDB i baza danych Cell-Cell Interactions)¹¹⁰⁻¹¹⁵. Spośród 2788 genów kodujących ligandy kurowane, 1,482 tj. 53% genów jest wspólnych z bazami danych ludzkich ligandów (ryc. 17A). Podobnie, z 2344 genów kodujących receptor w naszej bazie danych receptorów DanioTalk, 1337 tj. 57% jest wspólnych z bazami danych ludzkich receptorów (ryc. 17B).

Następnie, aby zmapować interakcje ligand-receptor, zidentyfikowaliśmy wszystkie interakcje parami między naszym ligandem a białkami receptora w fizycznych zapisach interakcji białko-białko danio pręgowanego STRING (v11.5)¹¹⁶. Wynik eksperymentalny w bazie danych STRING przewiduje pewność fizycznej bliskości dwóch białek. Pary ligand-receptor z wynikami o wysokim poziomie ufności z dużym prawdopodobieństwem będą wchodzić w interakcje fizyczne i skutkować powiązanymi działaniami sygnalizacyjnymi w dół. Ponieważ obserwowaliśmy wysoce zmienne wyniki interakcji fizycznych STRING dla eksperymentalnie potwierdzonych par ortologicznych ludzkich ligand-receptor, włączyliśmy również pary o średnim rankingu i ortologiczne pary ludzkich ligand-receptory dostępne w bazie danych interakcji białko-białko IID (ryc. 17D). Nasza baza danych ligand-receptor zawiera 3970 nowych par ligand-receptor specyficzny dla danio pręgowanego (350 par o wysokim poziomie pewności + 3620 par o średnim poziomie pewności) (ryc. 17C).



Ryc. 18. Pary ligand-receptor między neuronami oksytocyny a glejowymi pituicytami.

(A-B) Diagram Venna przedstawiający liczbę i procent genów kodujących ligandy i receptory zidentyfikowanych w zbiorze danych o różnej ekspresji oksytocyny scRNA-seq ($\log_2FC > 2$, $p\text{-adj} < 0,05$) i zbiorze danych o różnej ekspresji glejowych pituicytów ($\log_2FC > 2$, $p\text{-adj} < 0,05$, średnia liczba odczytów AMCA+ > 50). (C) Wykres kołowy przedstawiający najwyżej ocenione interakcje ligand-receptor między neuronami oksytocyny a glejowymi przysadkami mózgowymi. Interakcje uszeregowano na podstawie quasi-percentyla ekspresji genów. Wykreślono 50 najwyżej sklasyfikowanych interakcji przy najwyższym poziomie ufności (>900). Przyjęty z Chodkowski M et al., 2022.

Następnie zmapowaliśmy interakcję akso-glejową neuronów oksytocyny danio pręgowanego i glejowych pituicytów. Ze względu na brak neuronalnego transkryptomu aksonalnego oksytocyny, wykorzystaliśmy dane scRNA-seq neuronu oksytocyny i dane seq RNA glejowego pituicytu^{1,117} (**ryc. 18**). Korzystając z różnie wyrażonej listy genów z tych zestawów danych, zidentyfikowaliśmy tylko 3 interakcje ligand-receptor między neuronami oksytocyny a glejowymi pituicytami z dużą pewnością (Nts-Sort1a, Bdnf-Ngrfb / Sort1a). Aby włączyć wszystkie geny wyrażane w neuronach oksytocyny, wykorzystaliśmy pseudo-masowe dane dotyczące ekspresji klastra wzbogaconego w neurony oksytocyny. Doprowadziło to do zidentyfikowania 282 ligandów i 219 receptorów w neuronach oksytocyny. Podczas gdy w transkryptomie glejowym pituicytów zidentyfikowaliśmy 363 ligandy i 186 receptorów ze średnią liczbą odczytów > 50 (**ryc. 18A-B**). Analiza par ligand-receptor w tym zbiorze danych doprowadziła do identyfikacji 38 oddziaływań oksytocyny neuron-glejowy ligand pituicytowy-receptor przy najwyższym wyniku odcięcia ufności (>=900). Najwyżej ocenionymi interakcjami ligandu pituicytu z receptorem neuronu oksytocyny były Slit3-Robo2/Robo1, Lama4-Dag1 i Vegfab-Nrp1a. Podczas gdy najwyżej sklasyfikowanymi receptorami ligandu neuronu oksytocyny-pituicytu były Mif-Cd74a, Nts-Sort1a/Sort1b i Bdnf-Sort1a/Sort1b. Zaobserwowaliśmy również kilka autokrynych interakcji sygnalizacyjnych w glejowych pituicytach (Cxcl12a-Cxcr4b, Tnfb-Tnfrsf1a i Fgf8a / Fgf10a-Fgfr2) oraz w neuronach oksytocyny (Slit3 / Slit2-Robo2 / Robo1 / Robo3, Bdnf-Ntrk3a / Sort1a i Agrn- Dag1) (**ryc. 18C**).

Pomimo ograniczeń związanych z porównywaniem danych transkryptomicznych z dwóch różnych opublikowanych zestawów danych, byliśmy w stanie zidentyfikować parę Slit3-Robo2 glejowy pituicyte-ligand-receptor neuronu oksytocyny, którą wcześniej zidentyfikowaliśmy w celu promowania synaptycznych poziomów oksytocyny u danio pręgowanego (**publikacja 3**). Jednak zaobserwowaliśmy również autokryne interakcje szczelina-robot w neuronach oksytocyny. Wykazano, że autokryna sygnalizacja SLIT-ROBO w neuronach ruchowych myszy sprzyja fascykulacji aksonów; jednakże nie zaobserwowaliśmy defektów pęczków w neuroprzysadce larw 8-dpf (w Publikacji 3).

Oprócz sygnalizacji glejowej do neuronalnej, sygnalizacja neuronowa do glejowej jest również głównym graczem w sygnalizacji neuroglejowej¹¹⁸. Odkryliśmy, że neurotensyna (Nts) pochodząca z neuronów oksytocyny potencjalnie sygnalizuje glejowe pituicyty poprzez receptor Sortilin (Sort1b). Wykazano, że w mózgach szczurów i teleostów neurotensyna jest zlokalizowana w neuronach podwzgórza i przysadce¹¹⁹⁻¹²¹. Neurotensyna może regulować wewnątrzkomórkowe poziomy wapnia w hodowlach astrocytów in vitro z brzuszego obszaru nakrywki szczura¹²². Jednak rola neurotensyny pochodzącej z neuronów oksytocyny w funkcji glejowych przysadek mózgowych lub wapniu wewnątrzkomórkowym jest nieznaną¹²³.

Zaobserwowaliśmy również potencjalne autokryne interakcje oparte na Cxcl12a-Cxcr4b i Fgf10a-Fgfr2 w przysadkach glejowych¹²⁴. CXCL12-CXCR4 działa jako chemokina i neuroprzekaźnik podczas rozwoju mózgu myszy oraz jako mitogen dla astrocytów korowych szczura in vitro¹²⁵⁻¹²⁸. Chociaż wiadomo, że interakcja CXCL12-CXCR4 moduluje wzorec odpalania neuronów wazopresyny projekcji NH u szczurów, rola interakcji CXCL12-CXCR4 w glejowych przysadkach mózgowych nie została jeszcze opisana^{129,130}.

Zaobserwowaliśmy również oparte na Fgf10a-Fgfr2 interakcje autokrynne w przysadkach glejowych, co sugeruje, że Fgf10a może pełnić dodatkowe funkcje autokrynne w przysadkach glejowych, takie jak reaktywność i/lub proliferacja^{42,131-134}.

Ogólnie rzecz biorąc, w procesie mapowania interakcji ligand-receptor między glejowymi pituicytami a neuronami oksytocyny stworzyliśmy narzędzie typu open source, które przyniesie korzyści naukowcom z danio pręgowanego zainteresowanym funkcjami ligandów i receptorów. Ponadto udostępniliśmy w naszym narzędziu dodatkowe funkcje, które są podobne do niektórych możliwości oprogramowania komercyjnego, takiego jak Ingenuity (powiązania chorób ludzkich, celowanie w leki, adnotacje ontologii genów itp.).

4.3.6 Czynniki związane z gospodarzem leżące u podstaw rozwoju neuroprzysadki (przegląd rękopisu 1)

Od czasu studiów doktoranckich koncentrowałem się na genetyce leżącej u podstaw procesów komórkowych i morfogenezy tkanek. Jednak dobrze wiadomo, że oprócz genetyki żywiciela, na rozwój i zachowanie zwierząt mogą również wpływać czynniki pochodzenia organizmów związanych z żywicielem. Na przykład endosymbiont *Wolbachia* może kontrolować zachowanie much, płęć i zygocytowość¹³⁵, BefA jest białkiem bakteryjnym jelit, które może promować rozwój trzustki u danio pręgowanego¹³⁶, bakterie zamieszkujące nowotwory mogą promować nowotwory odporne na leki¹³⁷, a metabolity pochodzące z mikrobiomu jelitowego mogą regulować rozwój mózgu myszy¹³⁸. Prace te sugerują również, że 1) badanie genetyki gospodarza ujawni tylko częściowy obraz morfogenezy neuroprzysadki, 2) jeśli na funkcje korowe chronione przez BBB może wpływać mikrobiom związany z gospodarzem, struktura naszego zainteresowania - przysadka nerwowa - przepuszczalny interfejs neuroendokryny, który jest stale narażony na cząsteczki przenoszone przez krew pochodzące od żywiciela (o wielkości co najmniej 80 kDa^{60,139}) jest bardzo prawdopodobne, że mają na niego wpływ czynniki krwiopochodne związane z żywicielem. Aby uzyskać pełne zrozumienie morfogenezy neuroprzysadki, wymagane jest również zrozumienie roli takich czynników związanych z gospodarzem.

Wiadomo, że czynniki pochodzące od żywiciela przenoszone przez krew regulują funkcję przysadki mózgowej i sprzężenie zwrotne¹⁴⁰. Nie wiadomo jednak, czy czynniki związane z gospodarzem mogą wpływać na morfogenezę neuroprzysadki. Jedyne dane sugerujące, że takie czynniki mogą regulować neuroprzysadkę, opierały się na egzogennym ogólnoustrojowym podawaniu lipopolisacharydów u szczurów, co, jak wykazano, indukuje ekspresję cytokin i Fos w komórkach neuroprzysadki i ułatwia uwalnianie wazopresyny pod wpływem stymulacji osmotycznej¹⁴¹⁻¹⁴³. Postawiłem więc **hipotezę**, że elementy komórkowe neuroprzysadki mogą być najprawdopodobniej regulowane przez inne czynniki krwiopochodne związane z gospodarzem. Jednym z takich czynników, na który ostatnio zwrócono większą uwagę, są metabolity pochodzące z mikrobiomu jelitowego¹³⁸.

Chociaż było niewiele prac na temat tego, jak mikrobiom jelitowy może wpływać na ekspresję oksytocyny w podwzgórzu i poziomy oksytocyny w osoczu w badaniach na ssakach¹⁴⁴, nie było prac na temat sygnalizacji między mikrobiomem jelitowym a przysadką

nerwową. Ponieważ glejowe przysadki mózgowe są jednymi z głównych komórek neuroprzysadki^{27,29}, postanowiłem skupić się tylko na tym, jak metabolity drobnoustrojów jelitowych mogą wpływać na komórki glejowe. Postawiłem **hipotezę**, że ze względu na podobieństwa sygnatury molekularnej glejowych pituicytów z innymi komórkami glejowymi jest bardzo prawdopodobne, że glejowe pituicyty również wyrażają odpowiednie transportery i receptory, które mogą wychwytywać lub być regulowane przez takie metabolity^{1,27}. Moje wysiłki w celu zebrania informacji na temat takich metabolitów doprowadziły do **artykułu przeglądowego 1**.

W manuskrypcie przeglądowym podkreśliłem główne metabolity pochodzące z mikrobiomu jelitowego, o których wiadomo, że wpływają na rozwój komórek glejowych i są zaangażowane w patofizjologię (**Tabela 2**). Ponadto skupiłem się na receptorach glejowych i transporterach, które mogą wyczuwać i pobierać metabolity pochodzące z mikrobiomu (dane nie pokazane tutaj).

Podczas pisania tego manuskryptu stało się dla mnie bardzo jasne, że zarówno komórki glejowe gospodarza, jak i mikrobiom jelitowy wytwarzają podobne metabolity. Nie jest jasne, czy istnieje funkcjonalna symbioza oparta na równowadze między metabolitami pochodzącymi z gleju i mikrobiomu¹⁴⁵. Tak więc, aby zbadać rolę takich związanych z gospodarzem, potrzebowalibyśmy nowych narzędzi transgenicznych i biosensorowych, aby przeanalizować rolę gospodarza w porównaniu z metabolitami drobnoustrojów jelitowych w morfogenezie nerwowo-naczyniowej nerwowo-przysadkowej.

Streszczenie

Publikacja 1 (* wspólne pierwsze autorstwo)

Anbalagan S*, Gordon L*, Blechman J, Matsuoka RL, Rajamannar P, Wircer E, Biran J, Reuveny A, Leshkowitz D, Stainier DYR, Levkowitz G.

Pituicyte Cues Regulate the Development of Permeable Neuro-Vascular Interfaces.
Dev Cell. 2018 Dec 17;47(6):711-726.e5.

IF₂₀₁₈: 9.19; MNiSW pt. = 200; #Cytowanie (WoS - 06.2023) = 29

Scharakteryzowaliśmy struktury anatomiczne przepuszczalnych interfejsów nerwowo-naczyniowych danio pręgowanego i zidentyfikowaliśmy transkryptom glejowych przysadek mózgowych. Odkryliśmy nowe markery glejowe i wydzielane czynniki, które regulują morfogenezę nerwowo-naczyniową. Wykorzystaliśmy narzędzia transgeniczne i zbadaliśmy rolę genetyki leżącej u podstaw morfogenezy naczyń. Wyniki tych badań sugerują, że mechanizmy utrzymywania przepuszczalnych naczyń włosowatych

Glial cell type	Microbial metabolite	Effect on glial cell
Astrocyte	Indole-3-propionic acid	Activate Aryl hydrocarbon receptor and promote anti-inflammatory activity <i>in vivo</i>
	Niacin	Inhibit degeneration <i>in vivo</i>
	Cobalamin	Promote cell proliferation <i>in vitro</i>
	Thiamine	Promote glutamate transporter expression <i>in vitro</i>
	Polysulfides	Induce Ca ²⁺ waves
Oligodendrocyte	Acetate	Promote differentiation and maturation <i>in vitro</i>
	Folate	Promote survival and differentiation of embryonic oligodendrocytes
	Nitric oxide	Promote arborisation, differentiation and growth <i>ex vivo</i>
Microglia	SCFA-mix	Inhibit hyperproliferation, promote immune maturation and structural ramifications <i>in vivo</i>
	H ₂ S	Trigger rise in intracellular Ca ²⁺
Enteric glia	Niacin	Inhibit degeneration <i>in vivo</i>

Tabela 2. Podsumowanie badań nad wpływem metabolitów na różne typy komórek glejowych.

neuroprzysadki przypominają w rozwijającej się neuroprzysadce stany patofizjologiczne w ostrym niedokrwieniu mózgu i nowotworze mózgu. Ustaliliśmy, że naczynia włosowate nerwowo-przysadkowe danio pręgowanego są idealnym modelem do badania genetyki przepuszczalnych naczyń włosowatych mózgu.

Publikacja 2

Blechman J, **Anbalagan S**, Matthews GG, Levkowitz G.
Genome Editing Reveals Idiosyncrasy of CNGA2 Ion Channel-Directed Antibody Immunoreactivity Toward Oxytocin. *Front Cell Dev Biol.* 2018 Sep 20;6:117.
IF₂₀₁₈: 5.21; MNiSW pt.=70; #Cytowanie (WoS - 06.2023) = 7

Nie wiadomo, czy przeciwciało, którego używamy do ilościowego określania zawartości oksytocyny neuroprzysadkowej, jest specyficzne dla oksytocyny danio pręgowanego. Wygenerowaliśmy mutanty oksytocyny i zaobserwowaliśmy utratę barwienia oksytocyną w mózgu. Ustaliliśmy, że przeciwciało, którego używamy, jest wysoce specyficzne dla oksytocyny danio pręgowanego.

Publikacja 3 (* wspólne pierwsze autorstwo)

Anbalagan S*, Blechman J*, Gliksberg M, Gordon L, Rotkopf R, Dadosh T, Shimoni E, Levkowitz G.

Robo2 regulates synaptic oxytocin content by affecting actin dynamics.

Elife. 2019 Jun 10;8. pii: e45650.

IF₂₀₁₉ 7.08; MNiSW pt. = 200; #Cytowanie (WoS - 06.2023) = 8

Scharakteryzowaliśmy neuropeptyd synapsy nerwowo-przysadkowej danio pręgowanego i mikroskopię superrozdzielczości aktyny. Podjęliśmy podejście oparte na hipotezach, aby zbadać rolę sygnalizacji Robo2-Slit3 w rozwoju synaps neuroprzysadkowych. W trakcie tego procesu opracowaliśmy nowatorski protokół obrazowania i oznaczania ilościowego w wysokiej rozdzielczości do ilościowego określania zawartości neuroprzysadki in vivo. Stwierdziliśmy, że Slit3-Robo2-Cdc42 kontroluje lokalną dynamikę aktyny synaptycznej i poziomy neuropeptydów. Ustaliliśmy, że synapsy neuroprzysadkowe danio pręgowanego są idealnym modelem do badania genetyki rozwojowej morfogenezy synaps..

Publikacja 4 and 5

Nunes AR, Carreira L, **Anbalagan S**, Blechman J, Levkowitz G, Oliveira RF.

Perceptual mechanisms of social affiliation in zebrafish.

Sci Rep. 2020 Feb 27;10(1):3642.

IF₂₀₂₀:4.38 ; MNiSW pt. = 140; #Cytowanie (WoS - 06.2023) = 19

Swaminathan A, Gliksberg M, Wigoda N, **Anbalagan S**, Levkowitz G

Stress resilience is established during development and is regulated by complement factors. *Cell Rep.* 2023

IF₂₀₂₁:9.99 ; MNiSW pt. = 200; #Cytowanie (WoS - 06.2023) = 1

Ukierunkowane narzędzia inżynierii genetycznej, takie jak TALEN lub CRISPR dla danio pręgowanego, mogą pomóc w badaniu genetyki rozwojowej przysadki mózgowej. W

oparciu o istniejące protokoły ustaliłem protokół TALEN i CRISPR w grupie Levkowitz. Wygenerowałem kilka mutantów do badania morfogenezy nerwowo-naczyniowej. Ku naszemu zdziwieniu i ze względu na kompensację genetyczną, kilka mutantów, w tym *oxtra*^{-/-} i *mir218a-1*^{-/-}, nie miało fenotypu morfogenezy nerwowo-naczyniowej nerwowo-przysadkowej. Jednak dr Nunes i dr Swaminathan badali mutanty *oxtra* i *mir218a-1* i stwierdzili, że były one wadliwe odpowiednio w biologicznym wykrywaniu ruchu i odporności na stres. Opracowaliśmy solidne protokoły do generowania nokautów danio pręgowanego w celu zbadania roli genów kandydujących w morfogenezie nerwowo-naczyniowej nerwowo-przysadkowej.

Publikacja 6 (* wspólne pierwsze autorstwo; # autor korespondujący)

Chodkowski M*, Zielezinski A, **Anbalagan S***#

A ligand-receptor interactome atlas of the zebrafish. iScience. 2023

IF₂₀₂₂:5.8; MNiSW pt. = 20; #Cytowanie (WoS - 06.2023) = 0

Wdrożenie zasady 3R w badaniach na zwierzętach w celu zbadania genetyki molekularnej neuroprzysadki danio pręgowanego wymaga nowych narzędzi. Takie narzędzia pomogą w ustalaniu priorytetów kandydatów na geny z wysokoprzepustowych danych omicznych. Brakowało nam jednak takich narzędzi dla danio pręgowanego. W szczególności brakowało nam narzędzi do uszeregowania par ligand-receptor między typami komórek HNS, które mogłyby być potencjalnie zaangażowane w neuroprzysadkowy interfejs nerwowo-naczyniowy. Wykorzystując przewidywania lokalizacji białek, ręczną kurację, bazę danych interakcji danio pręgowanego i ludzkich białek, stworzyliśmy interakcję ligand-receptor danio pręgowanego. Opracowaliśmy nowatorskie skrypty oparte na R, które pozwalają użytkownikom zidentyfikować interakcje ligand-receptor danio pręgowanego. Stosując nasze skrypty do istniejących zestawów danych transkryptomu neuronu oksytocyny i gleyowego pituicytu, zidentyfikowaliśmy nowe i wcześniej zweryfikowane pary ligand-receptor. Stworzyliśmy nowe oprogramowanie specyficzne dla danio pręgowanego do generowania nokautów danio pręgowanego w celu zbadania roli genów kandydujących w morfogenezie nerwowo-naczyniowej nerwowo-przysadkowej. Udostępniliśmy nasze zasoby jako oprogramowanie typu open source dla społeczności badawczej danio pręgowanego.

Artykuł przeglądowy 1 (# Autor korespondujący)

Anbalagan S#.

Endocrine crosstalk between the gut microbiome and glial cells in development and disease. J. Neuroendocrinology. 2021 May;33(5):e12924.

IF₂₀₂₀:3.63; MNiSW pt. = 100; #Cytowanie (WoS - 06.2023) = 1

Oprócz czynników genetycznych gospodarza, na rozwój tkanki mózgowej mogą wpływać czynniki inne niż gospodarz, niegenetyczne, takie jak metabolity drobnoustrojów jelitowych. W tym przeglądzie podsumowałem rolę głównych metabolitów drobnoustrojów, które mogą regulować rozwój i funkcję komórek gleyowych. Nowe narzędzia genetyczne, czujniki i wykorzystanie zwierzęcych organizmów modelowych, takich jak optycznie przezroczysty danio pręgowany, będą

potrzebne do przeanalizowania funkcjonalnej symbiozy między metabolitami pochodzącymi z gleju i mikrobiomu.

Podsumowując, odkrycia pokazują, w jaki sposób przysadka nerwowa danio pręgowanego może być idealną tkanką modelową do badań genetyki rozwojowej. A genetyka przysadki mózgowej danio pręgowanego może ujawnić ogólne zasady synaptogenezy i przepuszczalnej morfogenezy naczyń. Narzędzia inżynierii genetycznej można zastosować do badania nowych par ligand-receptor zidentyfikowanych za pomocą naszych narzędzi *in silico*. Dzięki postępowi w zakresie narzędzi powinniśmy być w stanie zbadać nie-gospodarza, czynniki niegenetyczne, które mogą regulować rozwój przysadki mózgowej.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej, w szczególności zagranicznej

5.1. Wyniki badań pochodzące z moich studiów doktoranckich na Uniwersytecie Milano-Bicocca we Włoszech

W ramach studiów doktoranckich dołączyłem do grupy prof. Marii Pia Longhese i studiowałam genetykę biologii telomerów z wykorzystaniem pączkujących drożdży jako organizmu modelowego. W szczególności badałem rolę białek telomerowych w ochronie telomerowego DNA. Stwierdziliśmy, że białka telomerowe Rap1, Rif2 i Yku specyficznie hamują degradację egzonukleolityczną¹⁴⁶. Podczas tej pracy nieoczekiwanie stwierdziłem, że brak Rif1, ale nie Rif2, wykazywał syntetyczną interakcję genetyczną z kompleksem czapeczek CST. Było to zaskakujące, ponieważ taka syntetyczna interakcja genetyczna nie została zgłoszona w wysokoprzepustowym badaniu genetycznym przeprowadzonym w niższej temperaturze¹⁴⁷. W ten sposób zidentyfikowaliśmy, że dwa kompleksy telomerowe, podobne do schronienia i CST, mają funkcjonalne powiązanie w ochronie telomerów (Anbalagan i in., 2011)¹⁴⁸. Nasze wyniki zostały odtworzone przez grupę dr Laury Maringele (Uniwersytet w Newcastle, Wielka Brytania) przy użyciu technik alternatywnych¹⁴⁹. Wspólnie zidentyfikowaliśmy wszystkie kluczowe telomerowe białka drożdży, które są niezbędne do ochrony telomerowego DNA¹⁵⁰.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę

6.1. Zajęcia dydaktyczne

Na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza opracowałem i wygłosiłem kilka poniższych wykładów (Język angielski):

W ramach zajęć obowiązkowych dla studentów studiów magisterskich na kierunku Biotechnologia:

- Modele zwierzęce w chorobach ludzi
 - Genetyczne strategie generowania modeli zwierzęcych

- Zwierzęce modele zaburzeń neurorozwojowych i neurodegeneracyjnych
- Badania przesiewowe i opracowywanie leków na modelach zwierzęcych
- Komunikacja naukowa
 - Prezentacja danych badawczych na konferencjach
 - Napisanie opinii na temat badań dla osób niebędących specjalistami
 - Promowanie wyników badań naukowych za pomocą mediów społecznościowych

W ramach zajęć fakultatywnych dla studentów studiów licencjackich na kierunku life science:

- AMU-PIE - Od cząsteczek do komórek:
 - Komunikacja międzykomórkowa za pośrednictwem ligandu i receptora
 - Danio pręgowany modelowy organizm kręgowca w rozwoju i chorobie

Ankieta wśród uczniów brzmiała: "nigdy wcześniej nie spotkaliśmy nauczyciela z taką pasją". Prowadzenie zajęć pozwoliło mi spotkać się ze studentami, którzy chcieli porozmawiać o swoich planach zawodowych i wyzwaniach związanych z nauką.

6.2. Opieka nad studentami

Opieka naukowa nad trzema magistrantami UAM (2021-):

1. Agata Gonicka (2023).
2. Miłosz Chodkowski (2023). Wspólna pracę z dr Andrzejem Zielezińskim z Wydziału Biologii UAM, zaowocowała Publikacją 6.
3. Justyna Frątczak (2024*).

Opieka nad studentami prac licencjackich nad projektem eksperymentalnym na UAM:

1. David Kaszuba (2022).
2. Paula Oklińska (2023).

Opieka naukowa nad doktorantami i postdocami:

1. Naveen Nedunchezian (2022 -) w ramach grantu NCN SONATA BIS.
2. dr Hasan Ali (2022 -) w ramach grantu NCN SONTA.

Opieka naukowa laboranta w UAM:

1. Emilia Wysocka (2021-2023).

Opieka naukowa nad studentami w trakcie studiów podoktoranckich:

1. Sarah Lacombe (2013). Instytut Nauki Weizmanna - stażysta.
2. Sriram, (2015). Instytut Nauki Weizmanna - Student rotacji pracy magisterskiej.
3. Preethi Rajamannar (2017). Instytut Nauki Weizmanna - praca magisterska.

Udział w Radzie Doktorskiej:

1. Członek komisji doktorskiej Ruchi Jain z Laboratorium Neurodegeneracji Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie.

Osiągnięcia naukowe studentów:

1. Pani Emilia Wysocka przedstawiła prezentację ustną w polskim stowarzyszeniu danio pręgowanego I Konferencji Studenckiej „Danio pręgowany jako model zwierzęcy” (2022).
2. Pani Agata Gonicka odbyła letni staż w Junker Group, Max Delbrück Center for Molecular Medicine, Berlin, Niemcy.
3. Pan Naveen Nedunchezian przedstawił prezentację ustną na forum Szkoły Doktorskiej UAM (2023).
4. Pani Preethi Rajamannar kontynuowała studia doktoranckie w laboratorium Levkowitza w Instytucie Nauki Weizmanna w Izraelu.
5. Pan Sriram kontynuował studia doktoranckie w USA.

Inne osiągnięcia studentów i pracowników laboratorium:

1. Promocja badań danio pręgowanego w mediach społecznościowych przez Panią Emilię Wysocką:
https://www.tiktok.com/@uam_poznan/video/7194769567787371782

6.3. Działalność organizacyjna

W ramach Instytutu cykl seminariów KNOW RNA oraz cykl wykładów zapraszanych przez ID-UB, zaprosiłem i gościłem niżej wymienionych prelegentów. Moje role obejmowały zapraszanie prelegentów, komunikowanie się z pracownikami Instytutu w celu reklamowania i promowania wykładu za pośrednictwem poczty elektronicznej i mediów społecznościowych (Twitter). Komunikowałem się również z kolegami, aby zapewnić możliwość spotkania z prelegentem podczas ich wizyty.

2021:

1. dr Nikolas Nikolaou (Uniwersytet w Bath, Wielka Brytania), Motor connectivity requires local transcriptome modulation by cytoplasmic pool of U1 spliceosome protein SNRNP70. (*Seminarium internetowe*).

2022:

1. prof. Didiera Stainiera (Instytut Badań Serca i Płuc im. Maxa Plancka, Niemcy), Lessons from Zebrafish: Transcriptional adaptation - a mechanism underlying genetic robustness.
2. prof. Aleksandra Schiera (Uniwersytet w Bazylei, Szwajcaria), Cellular Biographies: insights from zebrafish. (*Seminarium internetowe*).
3. prof. Lalita Ramakrishnan (Uniwersytet Cambridge, Wielka Brytania), Mechanisms underlying tuberculosis resistance and nerve-damage in leprosy. (*Seminarium internetowe*).
4. dr Urszula McClurg (Uniwersytet w Liverpoolu, Wielka Brytania), Meiosis, mitosis and 'the in between' - what happens when gene expression regulation goes wrong. (*Seminarium internetowe*).

5. dr Amrutha Swaminathan (Instytut Nauki Weizmanna, Izrael), What makes some individuals fitter than others: The developmental underpinnings of stress resilience. (*Seminarium internetowe*).
6. dr Macieja Cieśla (Międzynarodowy Instytut Mechanizmów i Maszyn Molekularnych PAN - IMoL, Warszawa), At a flick of a switch: alternative splicing in stem cells.

2023:

1. prof. em. Gareth Leng (Uniwersytet w Edynburgu, Szkocja), Facts and Myths: travels in Neuroendocrinology. (*Seminarium internetowe*).
2. prof. Marta B Wiśniewska (Centrum Nowych Technologii - CeNT, Uniwersytet Warszawski), Diabetes associated gene TCF7L2 links brain energy metabolism with social deficits.
3. dr. Priti Agarwal (Uniwersytet w Tel Awiwie, Izrael), Pulling or Pushing? Revisiting the mechanics of *C. elegans* gonad morphogenesis. (*Seminarium internetowe*).
4. prof. Piotr Garstecki (Scope Fluidics, Warszawa), Scope Fluidics: From an Idea to a Product for Medical Diagnostics.
5. dr. Aleksandra Kołodziejczyk (Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie) - Host-microbiota interactions in health and disease.
6. dr. Ewa Chrostek (Uniwersytet Jagielloński, Kraków, Polska) - Uncovering the mechanisms of action of an antiviral bacterium. (*Seminarium internetowe*).

6.4. Popularyzacja nauki

- W związku z planowanymi ostatnio zmianami w przepisach dotyczących wykorzystywania zwierząt do badań i badań nad bezpieczeństwem leków, napisałem artykuł o znaczeniu i potrzebie modeli zwierzęcych. Artykuł jest dostępny jako preprint.
 - Anbalagan, S. OSF Preprints 2023, July 17. 'Blind men and an elephant', the need for animals in research and drug safety studies in developing countries. <https://doi.org/10.31219/osf.io/dwsvt>
- W ramach działań promocyjnych Instytutu Nauki Weizmanna byłem współautorem artykułów wyjaśniających opinii publicznej nasze manuskrypty.
 - 2019 Where the Blood-Brain Barrier Breaks Down, Weizmann Wonder Wander. <https://wis-wander.weizmann.ac.il/life-sciences/where-blood-brain-barrier-breaks-down>
 - 2019 Loaded with Love - and Other Signals, Weizmann Wonder Wander. <https://wis-wander.weizmann.ac.il/life-sciences/loaded-love-%E2%80%93-and-other-signals>
- W ramach wolontariatu dla społeczności badawczej danio pręgowanego i dla ogółu społeczeństwa, aby być na bieżąco z badaniami nad danio pręgowanym, stworzyłem konta botów w mediach społecznościowych, które regularnie tweetują najnowsze preprinty, artykuły na temat artykułów związanych z biologią rozwoju danio pręgowanego i oferty pracy związane z danio pręgowanym. Udostępniłem na GitHubie listę botów i sposób ich tworzenia. <https://github.com/savanbalagan/zebrafishpapers>

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej

Trwające badania finansowane z grantów NCN:

Rola Sfrp5 w morfogenezie aksonalnej neuroprzysadki:

W naszym glejowym transkryptomie pituicytu zaobserwowaliśmy wzbogaconą ekspresję *sfrp5*, która koduje regulator sygnalizacji Wnt¹⁵¹. Pomimo znaczenia sygnalizacji Wnt i regulatorów Wnt w rozwoju przysadki mózgowej i innych narządów okołokomorowych, rola *Sfrp5* w rozwoju neuroprzysadki nie została do tej pory opisana^{26,34,71}. Aby konkretnie przetestować, w jaki sposób *Sfrp5* może regulować morfogenezę aksonalną neuroprzysadki, będziemy przeprowadzać eksperymenty genetycznego zwiększania i utraty funkcji u danio pręgowanego. Badania są finansowane z grantu NCN SONATA BIS. W ramach tego projektu współpracujemy również z prof. Gilbertem Weidingerem z Uniwersytetu w Ulm w Niemczech.

Rola Slit3/mir218 w morfogenezie aksonalnej neuroprzysadki:

Badając rolę *Robo2* i *Slit3* w morfogenezie neuroprzysadki, dokonałem nieoczekiwanej obserwacji, że w przeciwieństwie do morfolino ukierunkowanego na kodon start, morfolino ukierunkowane na miejsce składania *slit3* spowodowało silny fenotyp. Zauważyłem, że *mir218* osadzony w intronie *slit3* jest potencjalną przyczyną tego fenotypu i obecnie badamy to bardziej szczegółowo. Badania są finansowane w ramach grantu NCN SONATA.

8. Literatura

1. Anbalagan, S., Gordon, L., Blechman, J., Matsuoka, R.L., Rajamannar, P., Wircer, E., Biran, J., Reuveny, A., Leshkowitz, D., Stainier, D.Y.R., et al. (2018). Pituicyte Cues Regulate the Development of Permeable Neuro-Vascular Interfaces. *Dev Cell* 47, 711-726.e5. 10.1016/j.devcel.2018.10.017.
2. Blechman, J., Anbalagan, S., Matthews, G.G., and Levkowitz, G. (2018). Genome Editing Reveals Idiosyncrasy of CNGA2 Ion Channel-Directed Antibody Immunoreactivity Toward Oxytocin. *Front Cell Dev Biol* 6, 117. 10.3389/fcell.2018.00117.
3. Anbalagan, S., Blechman, J., Gliksberg, M., Gordon, L., Rotkopf, R., Dadosh, T., Shimoni, E., and Levkowitz, G. (2019). *Robo2* regulates synaptic oxytocin content by affecting actin dynamics. *Elife* 8, e45650. 10.7554/eLife.45650.
4. Nunes, A.R., Carreira, L., Anbalagan, S., Blechman, J., Levkowitz, G., and Oliveira, R.F. (2020). Perceptual mechanisms of social affiliation in zebrafish. *Sci Rep* 10, 3642. 10.1038/s41598-020-60154-8.
5. Swaminathan, A., Gliksberg, M., Anbalagan, S., Wigoda, N., and Levkowitz, G. (2023). Stress resilience is established during development and is regulated by complement factors. *Cell Rep* 42, 111973. 10.1016/j.celrep.2022.111973.
6. Chodkowski, M., Zielezinski, A., and Anbalagan, S. (2022). A ligand-receptor interactome atlas of the zebrafish. 2022.12.15.520415. 10.1101/2022.12.15.520415.
7. Anbalagan, S. (2021). Endocrine cross-talk between the gut microbiome and glial cells in development and disease. *J Neuroendocrinol* 33, e12924. 10.1111/jne.12924.
8. Alvarez-Ochoa, E., Froidi, F., and Cheng, L.Y. (2021). Interorgan communication in development and cancer. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 10, e394. 10.1002/wdev.394.
9. Acevedo-Rodriguez, A., Kauffman, A.S., Cherrington, B.D., Borges, C.S., Roepke, T.A., and Laconi, M. (2018). Emerging insights into Hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG)

- axis regulation and interaction with stress signaling. *J Neuroendocrinol* 30, e12590. 10.1111/jne.12590.
10. Huh, J.R., and Veiga-Fernandes, H. (2020). Neuroimmune circuits in inter-organ communication. *Nat Rev Immunol* 20, 217-228. 10.1038/s41577-019-0247-z.
 11. Priest, C., and Tontonoz, P. (2019). Inter-organ cross-talk in metabolic syndrome. *Nat Metab* 1, 1177-1188. 10.1038/s42255-019-0145-5.
 12. Gancheva, S., Jelenik, T., Álvarez-Hernández, E., and Roden, M. (2018). Interorgan Metabolic Crosstalk in Human Insulin Resistance. *Physiol Rev* 98, 1371-1415. 10.1152/physrev.00015.2017.
 13. McMahon, A.P. (2016). Development of the Mammalian Kidney. *Curr Top Dev Biol* 117, 31-64. 10.1016/bs.ctdb.2015.10.010.
 14. Tanabe, K., Wada, J., and Sato, Y. (2020). Targeting angiogenesis and lymphangiogenesis in kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 16, 289-303. 10.1038/s41581-020-0260-2.
 15. Kelley, K.W., and Paşca, S.P. (2022). Human brain organogenesis: Toward a cellular understanding of development and disease. *Cell* 185, 42-61. 10.1016/j.cell.2021.10.003.
 16. Parenti, I., Rabaneda, L.G., Schoen, H., and Novarino, G. (2020). Neurodevelopmental Disorders: From Genetics to Functional Pathways. *Trends Neurosci* 43, 608-621. 10.1016/j.tins.2020.05.004.
 17. Sawyer, W.H. (1965). EVOLUTION OF NEUROHYPOPHYSIAL PRINCIPLES. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 54, 295-312.
 18. Kiecker, C. (2018). The origins of the circumventricular organs. *J Anat* 232, 540-553. 10.1111/joa.12771.
 19. Leng, G., and Russell, J.A. (2019). The osmoresponsiveness of oxytocin and vasopressin neurones: Mechanisms, allostasis and evolution. *J Neuroendocrinol* 31, e12662. 10.1111/jne.12662.
 20. Tessmar-Raible, K. (2007). The evolution of neurosecretory centers in bilaterian forebrains: insights from protostomes. *Semin Cell Dev Biol* 18, 492-501. 10.1016/j.semcdb.2007.04.007.
 21. Leng, G., Pineda, R., Sabatier, N., and Ludwig, M. (2015). 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: The posterior pituitary, from Geoffrey Harris to our present understanding. *J Endocrinol* 226, T173-185. 10.1530/JOE-15-0087.
 22. Brown, C.H. (2016). Magnocellular Neurons and Posterior Pituitary Function. *Compr Physiol* 6, 1701-1741. 10.1002/cphy.c150053.
 23. Verbalis, J.G. (2020). Acquired forms of central diabetes insipidus: Mechanisms of disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 34, 101449. 10.1016/j.beem.2020.101449.
 24. Bartter, F.C., and Schwartz, W.B. (1967). The syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone. *The American Journal of Medicine* 42, 790-806. 10.1016/0002-9343(67)90096-4.
 25. Scherbaum, W.A. (2021). Autoimmune diabetes insipidus. *Handb Clin Neurol* 181, 193-204. 10.1016/B978-0-12-820683-6.00015-4.
 26. Pearson, C.A., and Placzek, M. (2013). Development of the medial hypothalamus: forming a functional hypothalamic-neurohypophyseal interface. *Curr Top Dev Biol* 106, 49-88. 10.1016/B978-0-12-416021-7.00002-X.
 27. Chen, Q., Leshkowitz, D., Blechman, J., and Levkowitz, G. (2020). Single-Cell Molecular and Cellular Architecture of the Mouse Neurohypophysis. *eNeuro* 7, ENEURO.0345-19.2019. 10.1523/ENEURO.0345-19.2019.
 28. Dellmann, H.D., Castel, M., and Linner, J.G. (1978). Ultrastructure of peptidergic neurosecretory axons in the developing neural lobe of the rat. *Gen Comp Endocrinol* 36, 477-486. 10.1016/0016-6480(78)90086-2.

29. Hatton, G.I. (1988). Pituicytes, glia and control of terminal secretion. *J Exp Biol* 139, 67-79. 10.1242/jeb.139.1.67.
30. Gutnick, A., and Levkowitz, G. (2012). The neurohypophysis: fishing for new insights. *J Neuroendocrinol* 24, 973-974. 10.1111/j.1365-2826.2012.02292.x.
31. Stopa, E.G., LeBlanc, V.K., Hill, D.H., and Anthony, E.L. (1993). A general overview of the anatomy of the neurohypophysis. *Ann N Y Acad Sci* 689, 6-15. 10.1111/j.1749-6632.1993.tb55533.x.
32. Galabov, P.G., and Schiebler, T.H. (1983). Development of the capillary system in the neurohypophysis of the rat. *Cell Tissue Res* 228, 685-696. 10.1007/BF00211484.
33. Palacios-Prü, E.L., Zambrano, E., and Mendoza, R.V. (1995). Development of the neurogliohemal complex in the mouse neurohypophysis. *J Submicrosc Cytol Pathol* 27, 217-225.
34. Pogoda, H.-M., and Hammerschmidt, M. (2007). Molecular genetics of pituitary development in zebrafish. *Semin Cell Dev Biol* 18, 543-558. 10.1016/j.semcdb.2007.04.004.
35. Davis, S.W., Ellsworth, B.S., Pérez Millan, M.I., Gergics, P., Schade, V., Foyouzi, N., Brinkmeier, M.L., Mortensen, A.H., and Camper, S.A. (2013). Pituitary gland development and disease: from stem cell to hormone production. *Curr Top Dev Biol* 106, 1-47. 10.1016/B978-0-12-416021-7.00001-8.
36. Wittkowski, W. (1998). Tanycytes and pituicytes: morphological and functional aspects of neuroglial interaction. *Microsc Res Tech* 41, 29-42. 10.1002/(SICI)1097-0029(19980401)41:1<29::AID-JEMT4>3.0.CO;2-P.
37. Tweedle, C.D., Smithson, K.G., and Hatton, G.I. (1989). Neurosecretory endings in the rat neurohypophysis are en passant. *Exp Neurol* 106, 20-26. 10.1016/0014-4886(89)90140-4.
38. Miyata, S. (2017). Advances in Understanding of Structural Reorganization in the Hypothalamic Neurosecretory System. *Front Endocrinol (Lausanne)* 8, 275. 10.3389/fendo.2017.00275.
39. Gutnick, A., Blechman, J., Kaslin, J., Herwig, L., Belting, H.-G., Affolter, M., Bonkowsky, J.L., and Levkowitz, G. (2011). The hypothalamic neuropeptide oxytocin is required for formation of the neurovascular interface of the pituitary. *Dev Cell* 21, 642-654. 10.1016/j.devcel.2011.09.004.
40. Wircer, E., Blechman, J., Borodovsky, N., Tsoory, M., Nunes, A.R., Oliveira, R.F., and Levkowitz, G. (2017). Homeodomain protein Otp affects developmental neuropeptide switching in oxytocin neurons associated with a long-term effect on social behavior. *Elife* 6, e22170. 10.7554/eLife.22170.
41. Herget, U., Gutierrez-Triana, J.A., Salazar Thula, O., Knerr, B., and Ryu, S. (2017). Single-Cell Reconstruction of Oxytocinergic Neurons Reveals Separate Hypophysiotropic and Encephalotropic Subtypes in Larval Zebrafish. *eNeuro* 4, ENEURO.0278-16.2016. 10.1523/ENEURO.0278-16.2016.
42. Liu, F., Pogoda, H.-M., Pearson, C.A., Ohyama, K., Löhr, H., Hammerschmidt, M., and Placzek, M. (2013). Direct and indirect roles of Fgf3 and Fgf10 in innervation and vascularisation of the vertebrate hypothalamic neurohypophysis. *Development* 140, 1111-1122. 10.1242/dev.080226.
43. Theodosis, D.T. (2002). Oxytocin-secreting neurons: A physiological model of morphological neuronal and glial plasticity in the adult hypothalamus. *Front Neuroendocrinol* 23, 101-135. 10.1006/frne.2001.0226.
44. Hatton, G.I. (2002). Glial-neuronal interactions in the mammalian brain. *Adv Physiol Educ* 26, 225-237. 10.1152/advan.00038.2002.
45. Hindmarch, C., Yao, S., Beighton, G., Paton, J., and Murphy, D. (2006). A comprehensive description of the transcriptome of the hypothalamoneurohypophyseal

- system in euhydrated and dehydrated rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1609-1614. 10.1073/pnas.0507450103.
46. Toro, S., Wegner, J., Muller, M., Westerfield, M., and Varga, Z.M. (2009). Identification of differentially expressed genes in the zebrafish hypothalamic-pituitary axis. *Gene Expr Patterns* 9, 200-208. 10.1016/j.gep.2008.12.007.
 47. Abbott, N.J., Rönnbäck, L., and Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7, 41-53. 10.1038/nrn1824.
 48. Heithoff, B.P., George, K.K., Phares, A.N., Zuidhoek, I.A., Munoz-Ballester, C., and Robel, S. (2021). Astrocytes are necessary for blood-brain barrier maintenance in the adult mouse brain. *Glia* 69, 436-472. 10.1002/glia.23908.
 49. Ben-Zvi, A., and Liebner, S. (2022). Developmental regulation of barrier- and non-barrier blood vessels in the CNS. *J Intern Med* 292, 31-46. 10.1111/joim.13263.
 50. Ribatti, D. (2019). The discovery of the fundamental role of VEGF in the development of the vascular system. *Mechanisms of Development* 160, 103579. 10.1016/j.mod.2019.103579.
 51. Ferrara, N., Gerber, H.-P., and LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9, 669-676. 10.1038/nm0603-669.
 52. Dieck, S.T., Heuer, H., Ehrchen, J., Otto, C., and Bauer, K. (1999). The peptide transporter PepT2 is expressed in rat brain and mediates the accumulation of the fluorescent dipeptide derivative beta-Ala-Lys-Nepsilon-AMCA in astrocytes. *Glia* 25, 10-20. 10.1002/(sici)1098-1136(19990101)25:1<10::aid-glia2>3.0.co;2-y.
 53. Blockus, H., and Chédotal, A. (2016). Slit-Robo signaling. *Development* 143, 3037-3044. 10.1242/dev.132829.
 54. Maharaj, A.S., Walshe, T.E., Saint-Geniez, M., Venkatesha, S., Maldonado, A.E., Himes, N.C., Matharu, K.S., Karumanchi, S.A., and D'Amore, P.A. (2008). VEGF and TGF-beta are required for the maintenance of the choroid plexus and ependyma. *J Exp Med* 205, 491-501. 10.1084/jem.20072041.
 55. Morita, S., Furube, E., Mannari, T., Okuda, H., Tatsumi, K., Wanaka, A., and Miyata, S. (2015). Vascular endothelial growth factor-dependent angiogenesis and dynamic vascular plasticity in the sensory circumventricular organs of adult mouse brain. *Cell Tissue Res* 359, 865-884. 10.1007/s00441-014-2080-9.
 56. Furube, E., Mannari, T., Morita, S., Nishikawa, K., Yoshida, A., Itoh, M., and Miyata, S. (2014). VEGF-dependent and PDGF-dependent dynamic neurovascular reconstruction in the neurohypophysis of adult mice. *J Endocrinol* 222, 161-179. 10.1530/JOE-14-0075.
 57. Matsuoka, R.L., Rossi, A., Stone, O.A., and Stainier, D.Y.R. (2017). CNS-resident progenitors direct the vascularization of neighboring tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, 10137-10142. 10.1073/pnas.1619300114.
 58. Kawakami, K., Asakawa, K., Hibi, M., Itoh, M., Muto, A., and Wada, H. (2016). Gal4 Driver Transgenic Zebrafish: Powerful Tools to Study Developmental Biology, Organogenesis, and Neuroscience. *Adv Genet* 95, 65-87. 10.1016/bs.adgen.2016.04.002.
 59. Xie, J., Farage, E., Sugimoto, M., and Anand-Apte, B. (2010). A novel transgenic zebrafish model for blood-brain and blood-retinal barrier development. *BMC Dev Biol* 10, 76. 10.1186/1471-213X-10-76.
 60. O'Brown, N.M., Megason, S.G., and Gu, C. (2019). Suppression of transcytosis regulates zebrafish blood-brain barrier function. *Elife* 8, e47326. 10.7554/eLife.47326.
 61. Inman, G.J., Nicolás, F.J., Callahan, J.F., Harling, J.D., Gaster, L.M., Reith, A.D., Laping, N.J., and Hill, C.S. (2002). SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol Pharmacol* 62, 65-74. 10.1124/mol.62.1.65.
 62. Fong, T.A., Shawver, L.K., Sun, L., Tang, C., App, H., Powell, T.J., Kim, Y.H., Schreck, R., Wang, X., Risau, W., et al. (1999). SU5416 is a potent and selective inhibitor of the

- vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Res* 59, 99-106.
63. Duvernoy, H.M., and Risold, P.-Y. (2007). The circumventricular organs: an atlas of comparative anatomy and vascularization. *Brain Res Rev* 56, 119-147. 10.1016/j.brainresrev.2007.06.002.
64. Wilhelm, I., Nyúl-Tóth, Á., Suciú, M., Hermenean, A., and Krizbai, I.A. (2016). Heterogeneity of the blood-brain barrier. *Tissue Barriers* 4, e1143544. 10.1080/21688370.2016.1143544.
65. Zen, M., Canova, M., Campana, C., Bettio, S., Nalotto, L., Rampudda, M., Ramonda, R., Iaccarino, L., and Doria, A. (2011). The kaleidoscope of glucocorticoid effects on immune system. *Autoimmun Rev* 10, 305-310. 10.1016/j.autrev.2010.11.009.
66. Rush, M.G., Ul-Haq, R., and Chytil, F. (1991). Opposing effects of retinoic acid and dexamethasone on cellular retinol-binding protein ribonucleic acid levels in the rat. *Endocrinology* 129, 705-709. 10.1210/endo-129-2-705.
67. Amaral, S.L., Souza, L.M., Constantino, P.B., and Martuscelli, A.M. (2013). Characterization of different Dexamethasone side effects along time and its possible mechanisms. *The FASEB Journal* 27, lb643-lb643. 10.1096/fasebj.27.1_supplement.lb643.
68. Ghyselinck, N.B., and Duester, G. (2019). Retinoic acid signaling pathways. *Development* 146, dev167502. 10.1242/dev.167502.
69. Bonney, S., and Siegenthaler, J.A. (2017). Differential Effects of Retinoic Acid Concentrations in Regulating Blood-Brain Barrier Properties. *eNeuro* 4, ENEURO.0378-16.2017. 10.1523/ENEURO.0378-16.2017.
70. Geria, A.N., and Scheinfeld, N.S. (2008). Talarozole, a selective inhibitor of P450-mediated all-trans retinoic acid for the treatment of psoriasis and acne. *Curr Opin Investig Drugs* 9, 1228-1237.
71. Benz, F., Wichitnaowarat, V., Lehmann, M., Germano, R.F., Mihova, D., Macas, J., Adams, R.H., Taketo, M.M., Plate, K.-H., Guérit, S., et al. (2019). Low wnt/ β -catenin signaling determines leaky vessels in the subfornical organ and affects water homeostasis in mice. *Elife* 8, e43818. 10.7554/eLife.43818.
72. Wang, Y., Sabbagh, M.F., Gu, X., Rattner, A., Williams, J., and Nathans, J. (2019). Beta-catenin signaling regulates barrier-specific gene expression in circumventricular organ and ocular vasculatures. *Elife* 8, e43257. 10.7554/eLife.43257.
73. Carson-Walter, E.B., Hampton, J., Shue, E., Geynisman, D.M., Pillai, P.K., Sathanoori, R., Madden, S.L., Hamilton, R.L., and Walter, K.A. (2005). Plasmalemmal vesicle associated protein-1 is a novel marker implicated in brain tumor angiogenesis. *Clin Cancer Res* 11, 7643-7650. 10.1158/1078-0432.CCR-05-1099.
74. Shue, E.H., Carson-Walter, E.B., Liu, Y., Winans, B.N., Ali, Z.S., Chen, J., and Walter, K.A. (2008). Plasmalemmal vesicle associated protein-1 (PV-1) is a marker of blood-brain barrier disruption in rodent models. *BMC Neurosci* 9, 29. 10.1186/1471-2202-9-29.
75. Lan, G., Wang, P., Chan, R.B., Liu, Z., Yu, Z., Liu, X., Yang, Y., and Zhang, J. (2022). Astrocytic VEGFA: An essential mediator in blood-brain-barrier disruption in Parkinson's disease. *Glia* 70, 337-353. 10.1002/glia.24109.
76. Blechman, J., Amir-Zilberstein, L., Gutnick, A., Ben-Dor, S., and Levkowitz, G. (2011). The metabolic regulator PGC-1 α directly controls the expression of the hypothalamic neuropeptide oxytocin. *J Neurosci* 31, 14835-14840. 10.1523/JNEUROSCI.1798-11.2011.
77. Jirikowski, G.F., Ramalho-Ortigao, F.J., and Caldwell, J.D. (1991). Transitory coexistence of oxytocin and vasopressin in the hypothalamo neurohypophysial system of parturient rats. *Horm Metab Res* 23, 476-480. 10.1055/s-2007-1003733.

78. Telleria-Diaz, A., Grinevich, V.V., and Jirikowski, G.F. (2001). Colocalization of vasopressin and oxytocin in hypothalamic magnocellular neurons in water-deprived rats. *Neuropeptides* 35, 162-167. 10.1054/npep.2001.0859.
79. Wircer, E., Ben-Dor, S., and Levkowitz, G. (2016). Non-Mammalian Models for Neurohypophysial Peptides. In *Molecular Neuroendocrinology* (John Wiley & Sons, Ltd), pp. 301-328. 10.1002/9781118760369.ch14.
80. Fricke, C., Lee, J.-S., Geiger-Rudolph, S., Bonhoeffer, F., and Chien, C.-B. (2001). *astray*, a Zebrafish roundabout Homolog Required for Retinal Axon Guidance. *Science* 292, 507-510. 10.1126/science.1059496.
81. Alonso, G., Gabrion, J., Travers, E., and Assenmacher, I. (1981). Ultrastructural organization of actin filaments in neurosecretory axons of the rat. *Cell and Tissue Research* 214. 10.1007/bf00249215.
82. Riedl, J., Crevenna, A.H., Kessenbrock, K., Yu, J.H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T.A., Werb, Z., et al. (2008). Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods* 5, 605-607. 10.1038/nmeth.1220.
83. Munsie, L.N., Caron, N., Desmond, C.R., and Truant, R. (2009). Lifeact cannot visualize some forms of stress-induced twisted F-actin. *Nat Methods* 6, 317. 10.1038/nmeth0509-317.
84. Riedl, J., Flynn, K.C., Raducanu, A., Gärtner, F., Beck, G., Bösl, M., Bradke, F., Massberg, S., Aszodi, A., Sixt, M., et al. (2010). Lifeact mice for studying F-actin dynamics. *Nat Methods* 7, 168-169. 10.1038/nmeth0310-168.
85. Cingolani, L.A., and Goda, Y. (2008). Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nat Rev Neurosci* 9, 344-356. 10.1038/nrn2373.
86. Helker, C.S.M., Schuermann, A., Karpanen, T., Zeuschner, D., Belting, H.-G., Affolter, M., Schulte-Merker, S., and Herzog, W. (2013). The zebrafish common cardinal veins develop by a novel mechanism: lumen ensheathment. *Development* 140, 2776-2786. 10.1242/dev.091876.
87. Xu, R., and Du, S. (2021). Overexpression of Lifeact-GFP Disrupts F-Actin Organization in Cardiomyocytes and Impairs Cardiac Function. *Front Cell Dev Biol* 9, 746818. 10.3389/fcell.2021.746818.
88. Bulgari, D., Zhou, C., Hewes, R.S., Deitcher, D.L., and Levitan, E.S. (2014). Vesicle capture, not delivery, scales up neuropeptide storage in neuroendocrine terminals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 3597-3601. 10.1073/pnas.1322170111.
89. Ando, K., Fukuhara, S., Moriya, T., Obara, Y., Nakahata, N., and Mochizuki, N. (2013). Rap1 potentiates endothelial cell junctions by spatially controlling myosin II activity and actin organization. *Journal of Cell Biology* 202, 901-916. 10.1083/jcb.201301115.
90. Christ-Crain, M., and Gaisl, O. (2021). Diabetes insipidus. *Presse Med* 50, 104093. 10.1016/j.lpm.2021.104093.
91. Gagnon, J.A., Valen, E., Thyme, S.B., Huang, P., Akhmetova, L., Pauli, A., Montague, T.G., Zimmerman, S., Richter, C., and Schier, A.F. (2014). Efficient mutagenesis by Cas9 protein-mediated oligonucleotide insertion and large-scale assessment of single-guide RNAs. *PLoS One* 9, e98186. 10.1371/journal.pone.0098186.
92. Bedell, V.M., Wang, Y., Campbell, J.M., Poshusta, T.L., Starker, C.G., Krug, R.G., Tan, W., Penheiter, S.G., Ma, A.C., Leung, A.Y.H., et al. (2012). In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature* 491, 114-118. 10.1038/nature11537.
93. Fish, J.E., Wythe, J.D., Xiao, T., Bruneau, B.G., Stainier, D.Y.R., Srivastava, D., and Woo, S. (2011). A Slit/miR-218/Robo regulatory loop is required during heart tube formation in zebrafish. *Development* 138, 1409-1419. 10.1242/dev.060046.
94. Small, E.M., Sutherland, L.B., Rajagopalan, K.N., Wang, S., and Olson, E.N. (2010). MicroRNA-218 regulates vascular patterning by modulation of Slit-Robo signaling. *Circ Res* 107, 1336-1344. 10.1161/CIRCRESAHA.110.227926.

95. Amin, N.D., Bai, G., Klug, J.R., Bonanomi, D., Pankratz, M.T., Gifford, W.D., Hinckley, C.A., Sternfeld, M.J., Driscoll, S.P., Dominguez, B., et al. (2015). Loss of motoneuron-specific microRNA-218 causes systemic neuromuscular failure. *Science* 350, 1525-1529. 10.1126/science.aad2509.
96. Torres-Berrió, A., Lopez, J.P., Bagot, R.C., Nouel, D., Dal Bo, G., Cuesta, S., Zhu, L., Manitt, C., Eng, C., Cooper, H.M., et al. (2017). DCC Confers Susceptibility to Depression-like Behaviors in Humans and Mice and Is Regulated by miR-218. *Biological Psychiatry* 81, 306-315. 10.1016/j.biopsych.2016.08.017.
97. Gordon, L., Blechman, J., Shimoni, E., Gur, D., Anand-Apte, B., and Levkowitz, G. (2019). The fenestrae-associated protein Plvap regulates the rate of blood-borne protein passage into the hypophysis. *Development* 146. 10.1242/dev.177790.
98. Biran, J., Gliksberg, M., Shirat, I., Swaminathan, A., Levitas-Djerbi, T., Appelbaum, L., and Levkowitz, G. (2020). Splice-specific deficiency of the PTSD-associated gene PAC1 leads to a paradoxical age-dependent stress behavior. *Sci Rep* 10, 9559. 10.1038/s41598-020-66447-2.
99. Kontarakis, Z., and Stainier, D.Y.R. (2020). Genetics in Light of Transcriptional Adaptation. *Trends Genet* 36, 926-935. 10.1016/j.tig.2020.08.008.
100. Sztal, T.E., and Stainier, D.Y.R. (2020). Transcriptional adaptation: a mechanism underlying genetic robustness. *Development* 147, dev186452. 10.1242/dev.186452.
101. Anbalagan, S. (2023). "Blind men and an elephant", the need for animals in research and drug safety studies in developing countries. 10.31219/osf.io/dwsvt.
102. Nauroy, P., Hughes, S., Naba, A., and Ruggiero, F. (2018). The in-silico zebrafish matrisome: A new tool to study extracellular matrix gene and protein functions. *Matrix Biol* 65, 5-13. 10.1016/j.matbio.2017.07.001.
103. Goldberg, T., Hecht, M., Hamp, T., Karl, T., Yachdav, G., Ahmed, N., Altermann, U., Angerer, P., Ansorge, S., Balasz, K., et al. (2014). LocTree3 prediction of localization. *Nucleic Acids Res* 42, W350-355. 10.1093/nar/gku396.
104. Campbell, N.R., Rao, A., Hunter, M.V., Sznurkowska, M.K., Briker, L., Zhang, M., Baron, M., Heilmann, S., Deforet, M., Kenny, C., et al. (2021). Cooperation between melanoma cell states promotes metastasis through heterotypic cluster formation. *Developmental Cell* 56, 2808-2825.e10. 10.1016/j.devcel.2021.08.018.
105. Holler, K., Neuschulz, A., Drewe-Boß, P., Mintcheva, J., Spanjaard, B., Arsiè, R., Ohler, U., Landthaler, M., and Junker, J.P. (2021). Spatio-temporal mRNA tracking in the early zebrafish embryo. *Nat Commun* 12, 3358. 10.1038/s41467-021-23834-1.
106. Hu, B., Lelek, S., Spanjaard, B., El-Sammak, H., Simões, M.G., Mintcheva, J., Aliee, H., Schäfer, R., Meyer, A.M., Theis, F., et al. (2022). Origin and function of activated fibroblast states during zebrafish heart regeneration. *Nat Genet* 54, 1227-1237. 10.1038/s41588-022-01129-5.
107. Ximerakis, M., Lipnick, S.L., Innes, B.T., Simmons, S.K., Adiconis, X., Dionne, D., Mayweather, B.A., Nguyen, L., Niziolek, Z., Ozek, C., et al. (2019). Single-cell transcriptomic profiling of the aging mouse brain. *Nat Neurosci* 22, 1696-1708. 10.1038/s41593-019-0491-3.
108. Thumuluri, V., Almagro Armenteros, J.J., Johansen, A.R., Nielsen, H., and Winther, O. (2022). DeepLoc 2.0: multi-label subcellular localization prediction using protein language models. *Nucleic Acids Res*, gkac278. 10.1093/nar/gkac278.
109. The UniProt Consortium (2021). UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research* 49, D480-D489. 10.1093/nar/gkaa1100.
110. Garcia-Alonso, L., Lorenzi, V., Mazzeo, C.I., Alves-Lopes, J.P., Roberts, K., Sancho-Serra, C., Engelbert, J., Marečková, M., Gruhn, W.H., Botting, R.A., et al. (2022). Single-cell roadmap of human gonadal development. *Nature* 607, 540-547. 10.1038/s41586-022-04918-4.

111. Shao, X., Liao, J., Li, C., Lu, X., Cheng, J., and Fan, X. (2021). CellTalkDB: a manually curated database of ligand-receptor interactions in humans and mice. *Brief Bioinform* 22, bbaa269. 10.1093/bib/bbaa269.
112. Jin, S., Guerrero-Juarez, C.F., Zhang, L., Chang, I., Ramos, R., Kuan, C.-H., Myung, P., Plikus, M.V., and Nie, Q. (2021). Inference and analysis of cell-cell communication using CellChat. *Nat Commun* 12, 1088. 10.1038/s41467-021-21246-9.
113. Kotlyar, M., Pastrello, C., Ahmed, Z., Chee, J., Varyova, Z., and Jurisica, I. (2022). IID 2021: towards context-specific protein interaction analyses by increased coverage, enhanced annotation and enrichment analysis. *Nucleic Acids Res* 50, D640-D647. 10.1093/nar/gkab1034.
114. Ramilowski, J.A., Goldberg, T., Harshbarger, J., Kloppmann, E., Lizio, M., Satagopam, V.P., Itoh, M., Kawaji, H., Carninci, P., Rost, B., et al. (2015). A draft network of ligand-receptor-mediated multicellular signalling in human. *Nat Commun* 6, 7866. 10.1038/ncomms8866.
115. Efremova, M., Vento-Tormo, M., Teichmann, S.A., and Vento-Tormo, R. (2020). CellPhoneDB: inferring cell-cell communication from combined expression of multi-subunit ligand-receptor complexes. *Nat Protoc* 15, 1484-1506. 10.1038/s41596-020-0292-x.
116. Szklarczyk, D., Gable, A.L., Nastou, K.C., Lyon, D., Kirsch, R., Pyysalo, S., Doncheva, N.T., Legeay, M., Fang, T., Bork, P., et al. (2021). The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Res* 49, D605-D612. 10.1093/nar/gkaa1074.
117. Shafer, M.E.R., Sawh, A.N., and Schier, A.F. (2022). Gene family evolution underlies cell-type diversification in the hypothalamus of teleosts. *Nat Ecol Evol* 6, 63-76. 10.1038/s41559-021-01580-3.
118. Allen, N.J., and Eroglu, C. (2017). Cell Biology of Astrocyte-Synapse Interactions. *Neuron* 96, 697-708. 10.1016/j.neuron.2017.09.056.
119. Goedert, M., Lightman, S.L., Mantyh, P.W., Hunt, S.P., and Emson, P.C. (1985). Neurotensin-like immunoreactivity and neurotensin receptors in the rat hypothalamus and in the neurointermediate lobe of the pituitary gland. *Brain Res* 358, 59-69. 10.1016/0006-8993(85)90948-5.
120. Batten, T.F., Marivoet, S., and Vandesande, F. (1987). Neurotensin-like immunoreactivity in the pituitary and hypothalamus of bony fishes. *Peptides* 8, 135-143. 10.1016/0196-9781(87)90177-x.
121. Muraki, K., Okahata, H., Nishi, Y., Usui, T., Yamada, H., Fujita, S., Miyachi, Y., Yanaihara, N., and Yajima, H. (1985). Distribution of neurotensin-like immunoreactivity in the hypothalamus, pituitary gland, and gastro-intestinal tract of rats. *Acta Endocrinol (Copenh)* 110, 1-5. 10.1530/acta.0.1100001.
122. Trudeau, L.E. (2000). Neurotensin regulates intracellular calcium in ventral tegmental area astrocytes: evidence for the involvement of multiple receptors. *Neuroscience* 97, 293-302. 10.1016/s0306-4522(99)00597-7.
123. Hatton, G.I., Bicknell, R.J., Hoyland, J., Bunting, R., and Mason, W.T. (1992). Arginine vasopressin mobilises intracellular calcium via V1-receptor activation in astrocytes (pituicytes) cultured from adult rat neural lobes. *Brain Res* 588, 75-83. 10.1016/0006-8993(92)91346-g.
124. Hickey, K.N., Grassi, S.M., Caplan, M.R., and Stabenfeldt, S.E. (2021). Stromal Cell-Derived Factor-1a Autocrine/Paracrine Signaling Contributes to Spatiotemporal Gradients in the Brain. *Cell Mol Bioeng* 14, 75-87. 10.1007/s12195-020-00643-y.
125. Barbero, S., Bajetto, A., Bonavia, R., Porcile, C., Piccioli, P., Pirani, P., Ravetti, J.L., Zona, G., Spaziante, R., Florio, T., et al. (2002). Expression of the chemokine receptor CXCR4 and its ligand stromal cell-derived factor 1 in human brain tumors and their

- involvement in glial proliferation in vitro. *Ann N Y Acad Sci* 973, 60–69. 10.1111/j.1749-6632.2002.tb04607.x.
126. Lazarini, F., Tham, T.N., Casanova, P., Arenzana-Seisdedos, F., and Dubois-Dalcq, M. (2003). Role of the alpha-chemokine stromal cell-derived factor (SDF-1) in the developing and mature central nervous system. *Glia* 42, 139–148. 10.1002/glia.10139.
 127. Bhattacharyya, B.J., Banisadr, G., Jung, H., Ren, D., Cronshaw, D.G., Zou, Y., and Miller, R.J. (2008). The chemokine stromal cell-derived factor-1 regulates GABAergic inputs to neural progenitors in the postnatal dentate gyrus. *J Neurosci* 28, 6720–6730. 10.1523/JNEUROSCI.1677-08.2008.
 128. Miyasaka, N., Knaut, H., and Yoshihara, Y. (2007). Cxcl12/Cxcr4 chemokine signaling is required for placode assembly and sensory axon pathfinding in the zebrafish olfactory system. *Development* 134, 2459–2468. 10.1242/dev.001958.
 129. Callewaere, C., Banisadr, G., Desarménien, M.G., Mechighel, P., Kitabgi, P., Rostène, W.H., and Mélik Parsadaniantz, S. (2006). The chemokine SDF-1/CXCL12 modulates the firing pattern of vasopressin neurons and counteracts induced vasopressin release through CXCR4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8221–8226. 10.1073/pnas.0602620103.
 130. Callewaere, C., Fernet, B., Raison, D., Mechighel, P., Burlet, A., Calas, A., Kitabgi, P., Parsadaniantz, S.M., and Rostène, W. (2008). Cellular and subcellular evidence for neuronal interaction between the chemokine stromal cell-derived factor-1/CXCL 12 and vasopressin: regulation in the hypothalamo-neurohypophysial system of the Brattleboro rats. *Endocrinology* 149, 310–319. 10.1210/en.2007-1097.
 131. Gómez-Pinilla, F., Vu, L., and Cotman, C.W. (1995). Regulation of astrocyte proliferation by FGF-2 and heparan sulfate in vivo. *J Neurosci* 15, 2021–2029. 10.1523/JNEUROSCI.15-03-02021.1995.
 132. Goodman, T., Nayar, S.G., Clare, S., Mikolajczak, M., Rice, R., Mansour, S., Bellusci, S., and Hajihosseini, M.K. (2020). Fibroblast growth factor 10 is a negative regulator of postnatal neurogenesis in the mouse hypothalamus. *Development* 147, dev180950. 10.1242/dev.180950.
 133. Haan, N., Goodman, T., Najdi-Samiei, A., Stratford, C.M., Rice, R., El Agha, E., Bellusci, S., and Hajihosseini, M.K. (2013). Fgf10-expressing tanycytes add new neurons to the appetite/energy-balance regulating centers of the postnatal and adult hypothalamus. *J Neurosci* 33, 6170–6180. 10.1523/JNEUROSCI.2437-12.2013.
 134. Zhang, X., Ibrahimi, O.A., Olsen, S.K., Umemori, H., Mohammadi, M., and Ornitz, D.M. (2006). Receptor Specificity of the Fibroblast Growth Factor Family: THE COMPLETE MAMMALIAN FGF FAMILY *. *Journal of Biological Chemistry* 281, 15694–15700. 10.1074/jbc.M601252200.
 135. Kaur, R., Shropshire, J.D., Cross, K.L., Leigh, B., Mansueto, A.J., Stewart, V., Bordenstein, S.R., and Bordenstein, S.R. (2021). Living in the endosymbiotic world of Wolbachia: A centennial review. *Cell Host Microbe* 29, 879–893. 10.1016/j.chom.2021.03.006.
 136. Hill, J.H., Massaquoi, M.S., Sweeney, E.G., Wall, E.S., Jahl, P., Bell, R., Kallio, K., Derrick, D., Murtaugh, L.C., Parthasarathy, R., et al. (2022). BefA, a microbiota-secreted membrane disrupter, disseminates to the pancreas and increases β cell mass. *Cell Metab* 34, 1779–1791.e9. 10.1016/j.cmet.2022.09.001.
 137. Sepich-Poore, G.D., Zitvogel, L., Straussman, R., Hasty, J., Wargo, J.A., and Knight, R. (2021). The microbiome and human cancer. *Science* 371, eabc4552. 10.1126/science.abc4552.
 138. Sampson, T.R., and Mazmanian, S.K. (2015). Control of brain development, function, and behavior by the microbiome. *Cell Host Microbe* 17, 565–576. 10.1016/j.chom.2015.04.011.

139. Morita, S., and Miyata, S. (2012). Different vascular permeability between the sensory and secretory circumventricular organs of adult mouse brain. *Cell Tissue Res* 349, 589-603. 10.1007/s00441-012-1421-9.
140. Toufexis, D., Rivarola, M.A., Lara, H., and Viau, V. (2014). Stress and the reproductive axis. *J Neuroendocrinol* 26, 573-586. 10.1111/jne.12179.
141. Whiteside, M.B., Quan, N., and Herkenharn, M. (1999). Induction of pituitary cytokine transcripts by peripheral lipopolysaccharide. *J Neuroendocrinol* 11, 115-120. 10.1046/j.1365-2826.1999.00297.x.
142. Matsunaga, W., Osawa, S., Miyata, S., and Kiyohara, T. (2001). Astrocytic Fos expression in the rat posterior pituitary following LPS administration. *Brain Res* 898, 215-223. 10.1016/s0006-8993(01)02185-0.
143. Grinevich, V., Ma, X.-M., Jirikowski, G., Verbalis, J., and Aguilera, G. (2003). Lipopolysaccharide endotoxin potentiates the effect of osmotic stimulation on vasopressin synthesis and secretion in the rat hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 15, 141-149. 10.1046/j.1365-2826.2003.00967.x.
144. Cuesta-Marti, C., Uhlig, F., Muguerza, B., Hyland, N., Clarke, G., and Schellekens, H. (2023). Microbes, oxytocin and stress: Converging players regulating eating behavior. *J Neuroendocrinol*, e13243. 10.1111/jne.13243.
145. Hentschel, U. (2021). Harnessing the power of host-microbe symbioses to address grand challenges. *Nat Rev Microbiol* 19, 615-616. 10.1038/s41579-021-00619-3.
146. Bonetti, D., Clerici, M., Anbalagan, S., Martina, M., Lucchini, G., and Longhese, M.P. (2010). Shelterin-like proteins and Yku inhibit nucleolytic processing of *Saccharomyces cerevisiae* telomeres. *PLoS Genet* 6, e1000966. 10.1371/journal.pgen.1000966.
147. Downey, M., Houlsworth, R., Maringele, L., Rollie, A., Brehme, M., Galicia, S., Guillard, S., Partington, M., Zubko, M.K., Krogan, N.J., et al. (2006). A genome-wide screen identifies the evolutionarily conserved KEOPS complex as a telomere regulator. *Cell* 124, 1155-1168. 10.1016/j.cell.2005.12.044.
148. Anbalagan, S., Bonetti, D., Lucchini, G., and Longhese, M.P. (2011). Rif1 supports the function of the CST complex in yeast telomere capping. *PLoS Genet* 7, e1002024. 10.1371/journal.pgen.1002024.
149. Biggins, S., Xue, Y., Rushton, M.D., and Maringele, L. (2011). A Novel Checkpoint and RPA Inhibitory Pathway Regulated by Rif1. *PLoS Genetics* 7. 10.1371/journal.pgen.1002417.
150. Longhese, M.P., Anbalagan, S., Martina, M., and Bonetti, D. (2012). The role of shelterin in maintaining telomere integrity. *Front Biosci (Landmark Ed)* 17, 1715-1728. 10.2741/4014.
151. Bovolenta, P., Esteve, P., Ruiz, J.M., Cisneros, E., and Lopez-Rios, J. (2008). Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J Cell Sci* 121, 737-746. 10.1242/jcs.026096.

(Podpis wnioskodawcy)