

Doktorant : **Mgr Ewelina Bator**

Zakład Farmakologii Pracownia Farmakologii i Biostruktury Mózgu

Tytuł rozprawy doktorskiej:

Regulacja mechanizmów epigenetycznych, metylacji i acetylacji histonu H3, w korze przedczołowej w neurorozwojowym modelu schizofrenii.

Promotorzy:

1. Dr hab. **Marzena Maćkowiak** – Pracownia Farmakologii i Biostruktury Mózgu, Instytut Farmakologii PAN
2. Prof. dr hab. n. med. **Janusz Marcinkiewicz** - Katedra Immunologii, Wydział Lekarski UJ CM

Recenzenci:

1. Prof. dr hab. n. med. Monika Puzianowska-Kuźnicka – Zespół Kliniczno – Badawczy Epigenetyki Człowieka, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN
2. Prof. dr hab. Władysław Lasoń – Zakład Neuroendokrynologii Doświadczalnej, Instytut Farmakologii PAN

Streszczenie Pracy Doktorskiej:

Schizofrenia jest chorobą o podłożu zarówno genetycznym jak i środowiskowym. Badania nad patomechanizmem tej choroby sugerują, że mechanizmy epigenetyczne mogą odgrywać istotną rolę w jej rozwoju, ponieważ środowisko wpływając na procesy epigenetyczne może oddziaływać na genom. Dysfunkcje epigenetyczne mogą prowadzić do zaburzeń w regulacji transkrypcji szeregu genów zaangażowanych w rozwój struktur mózgu, co może prowadzić do wystąpienia zaburzeń obserwowanych w schizofrenii. Badania epidemiologiczne wskazują, że schizofrenia jest chorobą neurorozwojową, ponieważ jej pierwsze objawy występują w dorosłości, jednakże czynniki ją wywołujące pojawiają się już na wczesnych etapach życia, w okresie pre- lub neonatalnym. Pomiędzy czasem zadziałania czynnika chorobotwórczego, a pojawieniem się pierwszych objawów schizofrenii występuje tzw. okres utajony choroby, szczególnie wrażliwy na działanie szeregu czynników, np. środowiskowych, które mogą nasilać lub hamować wystąpienie objawów schizofrenii w dorosłości.

W niniejszej pracy analizowano mechanizmy epigenetyczne w postnatalnym życiu zwierząt i ich rolę w rozwoju zaburzeń charakterystycznych dla schizofrenii. W tym celu wykorzystano opisany już w literaturze, neurorozwojowy model schizofrenii oparty na prenatalnym podaniu w 17 dniu ciąży samicom szczura substancji antymitotycznej octanu metylazoksymetanolu (MAM, 22 mg/kg, *ip*).

Prenatalne podanie MAM w tym okresie życia powoduje u dorosłych zwierząt deficyty na poziomie anatomicznym, behawioralnym oraz funkcjonalnym, co odzwierciedla zarówno zmiany obserwowane w schizofrenii, jak i dynamikę ich rozwoju. W niniejszej pracy również analizowano dynamikę rozwoju objawów choroby na poziomie behawioralnym (sprawność procesu sensorymotorycznego bramkowania) oraz neuroanatomicznym w przyśrodkowej korze przedczołowej (mPFC), i dlatego badania przeprowadzono w okresie postnatalnym u zwierząt młodocianych (P30) i dorosłych (P60 i P70). Badania prowadzono w mPFC ze względu na fakt, że okres dojrzewania tej struktury trwa aż do dorosłości, a zaburzenia jej funkcji prowadzą do wystąpienia objawów kognitywnych i negatywnych schizofrenii. Ponadto analizowano zmiany w potranslacyjnych modyfikacjach histonu H3 w mPFC w życiu postnatalnym szczurów, zarówno w okresie adolescencji (P15, P30 oraz P45), jak i dorosłości (P60, P70), ze względu na opisane w literaturze zaangażowanie potranslacyjnych modyfikacji histonu H3 w patomechanizm schizofrenii. Badano markery metylacji histonu H3 przy lizynie 4 i 9 (H3K4me3, H3K4me2, H3K9me3, H3K9me2) i acetylacji przy lizynie 9 (H3K9ac), jak również enzymy regulujące te procesy: metylotransferazy (ASH2L, G9a), demetylazy (JARID1c, LSD1) oraz acetylotransferazy (GCN5L2, PCAF) i deacetylazy (HDAC1, HDAC2). Poziom powyższych białek analizowano przy użyciu techniki Western blot, a także prowadzono badania z wykorzystaniem technik immunohistochemicznych wykorzystujących analizę stereologiczną, mikroskopię konfokalną oraz cytometrię przepływową w celu określenia liczby oraz fenotypu komórek. Ponadto badano również ekspresję GAD67 w mPFC na poziomie ekspresji mRNA (qRT-PCR) i białka we frakcji cytoplazmatycznej i membranowej (Western blot) oraz regulację promotora genu Gad1 przez wybrane markery epigenetyczne (H3K4me3, H3K9ac) z zastosowaniem immunoprecypitacji chromatyny. Ponadto badano, czy mechanizmy epigenetyczne w okresie poprzedzającym wystąpienie symptomów schizofrenii na poziomie behawioralnym, mogą być zaangażowana w ich rozwój. W tym celu analizowano wpływ podań kwasu walproinowego (VPA), inhibitora deacetylaz histonu (w dawce 250 mg/kg, dwa razy dziennie), podawanego w okresie wczesnej adolescencji (23-29 dzień życia) lub wczesnej dorosłości (63-69 dzień życia), na deficyty behawioralne oraz zmiany epigenetyczne wywołane prenatalnym podaniem MAM. Interesującym wydawało się również sprawdzenie roli czynników środowiskowych (wzbogacone środowisko), w okresie utajonym, we wczesnej adolescencji (23-29 dzień życia) lub wczesnej dorosłości (63-69 dzień życia) na wystąpienie objawów behawioralnych i wykazanych zmian epigenetycznych oraz zaburzeń ekspresji GAD67 u zwierząt dorosłych.

W badaniach behawioralnych wykazano deficyt sensorymotorycznego bramkowania u zwierząt dorosłych (P70), ale nie młodocianych traktowanych prenatalnie MAM. Ponadto w badanym neurorozwojowym modelu schizofrenii stwierdzono spadki masy mózgu utrzymujące się u zwierząt od okresu adolescencji aż do dorosłości. Jednakże badania immunohistochemiczne wykazały, że

prenatalnie podanie MAM powodowało zmniejszenie objętości i gęstości neuronów w mPFC dopiero u zwierząt dorosłych (P60).

W postnatalnym okresie życia zwierząt stwierdzono zaburzenia mechanizmów epigenetycznych wywołane prenatalnym podaniem MAM, związanych z metylacją i acetylacją histonu H3 w mPFC. Zaobserwowano odmienną dynamikę zmian w poziomie białek markerów metylacji histonu H3. W okresie adolescencji wykazano zmiany u szczurów traktowanych prenatalnie MAM związane z markerem H3K9me2 (modyfikacja histonu H3 hamująca ekspresję genów), które mogą być zależne od poziomu demetylazy LSD1. Natomiast w okresie dorosłości stwierdzono u tych zwierząt spadki poziomu H3K4me3 (marker aktywacji procesów transkrypcyjnych), które mogą być związane z obserwowanymi już w okresie późnej adolescencji spadkami poziomu metylotransferazy ASH2L. Ponadto prenatalne podanie MAM w całym analizowanym okresie życia szczurów obniżało poziom H3K9ac, przy czym wydaje się, że obserwowany powyżej efekt we wczesnej adolescencji mógł zależeć od poziomu acetylotransferazy GCN5L2, a w dorosłości prawdopodobnie od poziomu HDAC2.

Badano również ekspresję GAD67, zarówno na poziomie mRNA jak i białka oraz analizowano wpływ badanych modyfikacji histonu H3 na poziom GAD67 w mPFC. Wykazano obniżoną ekspresję mRNA GAD67 oraz spadki poziomu białka GAD67 we frakcji membranowej, ale nie cytoplazmatycznej dopiero u zwierząt dorosłych prenatalnie traktowanych MAM. Nie wykazano natomiast zmiany w liczbie komórek GAD67 – immunopozytywnych w tym punkcie czasowym. Stwierdzono natomiast, że prenatalne podanie MAM powodowało osłabienie regulacji promotora genu *Gad1* przez białko H3K4me3, ale nie H3K9ac przy promotorze genu *Gad1*.

Wykazano, że VPA stosowany w okresie wczesnej adolescencji, jak i wczesnej dorosłości, tuż przed wystąpieniem pierwszych objawów behawioralnych hamował deficyty sensorymotorycznego bramkowania wywołane u dorosłych zwierząt prenatalnym podaniem MAM. Ponadto VPA podany w okresie wczesnej adolescencji zapobiegał spadkom poziomu H3K4me3 w mPFC dorosłych szczurów z grupy MAM (P60 i P70), natomiast tego efektu nie obserwowano w P70, gdy był podawany we wczesnej dorosłości. Ponadto podania VPA zarówno we wczesnej adolescencji, jak i wczesnej dorosłości, nie hamowały obniżonego poziomu H3K9ac w mPFC dorosłych zwierząt po prenatalnym podaniu MAM, chociaż normalizowały do obserwowanego u kontroli zwiększony poziom HDAC2.

Ekspozycja na wzbogacone środowisko w okresie wczesnej adolescencji lub wczesnej dorosłości hamowała wystąpienie deficytów procesu sensorymotorycznego bramkowania wywołanych prenatalnym podaniem MAM u dorosłych szczurów. Ponadto wzbogacone środowisko stosowane zarówno w adolescencji, jak i wczesnej dorosłości zapobiega spadkom poziomu H3K4me3 oraz H3K9ac u dorosłych szczurów, którym prenatalnie podawano MAM. Badania ekspresji GAD67 wykazały, że wzbogacone środowisko wprowadzone w okresie wczesnej adolescencji hamuje spadki

ekspresji mRNA oraz poziomu białka GAD67 we frakcji membranowej u zwierząt dorosłych prenatalnie traktowanych MAM, co prawdopodobnie jest wynikiem przywrócenia poziomu H3K4me3 związanego z promotorem genu Gad1 do obserwowanego u kontroli. Nie wykazano natomiast wpływu wzbogaconego środowiska stosowanego we wczesnej dorosłości na ekspresję mRNA GAD67, co może być wynikiem braku efektu na obniżony poziom białka HK4me3 przy promotorze Gad1. Jednak obserwowano zahamowanie spadku poziomu białka GAD67 we frakcji membranowej, co prawdopodobnie jest związane z obserwowanym jednocześnie obniżeniem poziomu tego białka we frakcji cytoplazmatycznej.

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki wskazują, że w zastosowanym neurozwojowym modelu schizofrenii, obserwujemy zaburzenia na poziomie behawioralnym oraz neuroanatomicznym w mPFC dopiero u zwierząt dorosłych. Do rozwoju objawów chorobowych mogą przyczyniać się analizowane zmiany w potranslacyjnych modyfikacjach histonu H3 występujące już we wczesnym okresie życia postnatalnego. Ponadto zarówno ingerencja farmakologiczna (podanie VPA), jak i wprowadzenie wzbogaconego środowiska w okresie adolescencji lub wczesnej dorosłości może zapobiegać zmianom w potranslacyjnych modyfikacjach histonu H3 obserwowanych w mPFC zwierząt dorosłych, którym prenatalnie podawano MAM, co może z kolei zapobiegać nieprawidłowej ekspresji genów zaangażowanych w rozwój mózgu i w konsekwencji hamować wystąpienie objawów typowych dla schizofrenii.