

Analiza ekspresji fosforylowanej formy histonu H3 po podaniach substancji psychozomimetycznej - MK-801

Rafał Guzik
Pracownia Farmakologii i Biostruktury Mózgu
Zakład Farmakologii
Instytut Farmakologii PAN w Krakowie
Kraków, 2014

(streszczenie pracy doktorskiej)

Schizofrenia jest chorobą o nieznanym etiologii. W jej przebiegu obserwuje się dysfunkcje w obrębie różnych układów neuroprzekaźnikowych, które mogą wynikać z zaburzeń neurozwojowych o podłożu genetycznym lub środowiskowym. Ostatnio w badaniach nad patomechanizmami schizofrenii coraz częściej zwraca się uwagę również na czynniki epigenetyczne mające odgrywać niezwykle istotną rolę w regulacji transkrypcji genów. Procesy epigenetyczne, wpływając na chromatynę, mogą sprzyjać aktywności transkrypcyjnej bądź ją uniemożliwiać. Wśród nich fosforylowanie histonu H3 przy S10 (H3S10ph), tak jak fosforylowanie przy S10 i acetylowanie przy K14 (H3S10phK14ac) lub samo acetylowanie przy K14 (H3K14ac), powoduje rozluźnienie struktury chromatyny, umożliwiając przyłączenie czynników transkrypcyjnych do DNA i aktywację transkrypcji genów. Uważa się, że za fosforylowanie H3S10 w mózgu szczura odpowiada głównie kinaza 1 aktywowana stresem i mitogenami (MSK1), która może być z kolei aktywowana przez kinazę 1 i 2 aktywowaną sygnałem zewnątrzkomórkowym (ERK1/2) lub kinazę białkową aktywowaną mitogenami p38 (p38 MAPK).

W niniejszej pracy, stosując farmakologiczny model schizofrenii - jednorazowe podanie MK-801 (0,4 mg/kg, *ip*) - postanowiono zbadać, czy w eksperymentalnie wywołanych psychozach dochodzi do zmian poziomu H3S10ph, H3S10phK14ac lub H3K14ac w przyśrodkowej korze przedczołowej (mPFC) lub grzbietowym prążkowiu (dSTR) szczura oraz czy zmiany te wrażliwe są na działanie neuroleptyków. Ponadto podjęto próbę zidentyfikowania wewnątrzkomórkowego szlaku sygnałowego mogącego odpowiadać za indukowaną MK-801 fosforylację H3S10 w mPFC, badając szlak ERK/MSK1. Badania przeprowadzono stosując metody immunohistochemiczne z użyciem analizy stereologicznej oraz mikroskopii konfokalnej, jak również, celem potwierdzenia zmian ilościowych w poziomie analizowanych białek, zastosowano technikę Western blot.

W mPFC wykazano, że podanie MK-801 w dawce 0,4 mg/kg (*ip*), wywołującej u szczurów silne objawy psychozomimetyczne, powodowało wzrost liczby komórek immunopozytywnych na obecność H3S10ph (H3S10ph+) 0,5 i 2 h po podaniu MK-801 w warstwach 2/3 oraz

5/6, jak również wzrost komórek H3S10phK14ac+ 0,5 h po podaniu MK-801 w warstwie 2/3 lub 0,5 i 2 h po podaniu MK-801 w warstwach 5/6. Ponadto badania fenotypu komórek H3S10ph+ lub H3S10phK14ac+ prowadzone 0,5 h po podaniach pokazały, że MK-801 indukuje fosforylację H3S10 oraz fosfo-acetylację H3S10K14 wyłącznie w neuronach glutaminianergicznych (Glu-ergicznych). W przypadku H3K14ac obserwowano statystycznie istotny wzrost liczby komórek immunopozytywnych 4h po podaniu MK-801 (0,4 mg/kg, *ip*) w warstwach 2/3. Dodatkowo 0,5 h po podaniu MK-801 (0,4 mg/kg, *ip*) obserwowano spadek liczby astrocytów H3K14ac+, chociaż globalna ilość komórek H3K14ac+, jak i ilość samego białka H3K14ac, nie ulegały w tym czasie zmianom. Efekty MK-801 związane z indukcją fosforylacji H3S10 były hamowane przez risperidon (RIS; 0,2 lub 1,0 mg/kg, *ip*) lub haloperidol (HAL; 0,5 lub 1,0 mg/kg, *ip*) podawane, odpowiednio, 1 lub 0,5 h przed MK-801. W zakresie stosowanych dawek RIS był bardziej skuteczny w warstwie 3, natomiast w warstwach 5/6 oba neuroleptyki były równie efektywne. W neuronach Glu-ergicznych 5 min po podaniu MK-801 dochodziło do wzrostu poziomu fosforylowanej przy S360 formy MSK1 [p(S360)MSK1] zaangażowanej w autofosforylację MSK1, przy czym nie zmieniał się on w neuronach GABA-ergicznych. Pozostałe badane enzymy, jak p(S376)MSK1 - bezpośrednio uczestnicząca w fosforylacji H3S10 - czy fosforylowane formy ERK1/2, nie ulegały w tym czasie zmianom, a 15 lub 30 min po podaniu MK-801 ich poziom, jak i poziom p(S360)MSK1, znacznie malał. SL-327 (20 mg/kg, *ip*) - selektywny inhibitor kinaz aktywujących ERK1/2 - hamował zaindukowany przez MK-801 wzrost poziomu H3S10ph obserwowany 0,5 h po podaniu psychozomimetyku, ponadto obniżał w tym czasie poziom białka p(S360)MSK1 do poziomu obserwowanego również po podaniu MK-801.

W dSTR MK-801 wywoływał spadek liczby komórek H3S10ph+ oraz H3S10phK14ac+ tylko 0,5 h po podaniu, nie wpływając na poziom acetylacji H3K14 w badanych punktach czasowych (0,5, 2 lub 4 h po podaniach). Ponadto RIS (tylko w dawce 1,0 mg/kg) lub HAL (w obu zastosowanych dawkach) powodowały znaczny wzrost liczby komórek H3S10ph+ zarówno u zwierząt kontrolnych, jak i traktowanych MK-801.

Wyniki badań własnych wskazują, że w eksperymentalnie wywołanych psychozach (jednorazowe podanie MK-801) dochodzi do wzrostu aktywności neuronów Glu-ergicznych mPFC, co obserwowano jako nasilenie fosforylacji H3S10. Wyniki te sugerują ponadto udział innych potranslacyjnych modyfikacji (PTM) histonu H3 (H3S10phK14ac i H3K14ac) w występowaniu objawów psychozomimetycznych. Hamowanie obserwowanych efektów MK-801

w mPFC przez HAL lub RIS może wskazywać na udział, obok transmisji Glu-ergicznej, również dopaminergicznej oraz serotoninerdycznej w regulacji zmian poziomu H3S10ph indukowanych podaniem MK-801. Ponadto nie można jednoznacznie stwierdzić, czy w procesie fosforylacji H3S10 obserwowanym w mPFC po podaniu MK-801 dochodzi do aktywacji analizowanego szlaku ERK/MSK1.

Niniejsza praca wskazuje na potencjalny udział PTM białek histonowych w procesach leżących u podstaw rozwoju psychoz.

Część przedstawionych wyników badań własnych prezentowano na konferencjach międzynarodowych w formie posteru (Guzik i wsp., 2009a) oraz doniesienia ustnego (Guzik i wsp., 2009b), a także zawarto w pracy oryginalnej:

Maćkowiak M., Guzik R., Dudys D., Bator E., Wędzony K., 2013. MK-801, a NMDA receptor antagonist, increases phosphorylation of histone H3 in the rat medial prefrontal cortex. *Pharmacol Rep.* 65, 1112-1123.

PIŚMIENNICTWO

Guzik R., Maćkowiak M., Dudys D., Wędzony K., 2009a. P.1.15 Transient expression of phospho-acetylated form of histone H3 in medial prefrontal cortex of rats treated with MK-801. *Eur Neuropsychopharmacol.* 19 Suppl 1, 14-15.

Guzik R., Maćkowiak M., Dudys D., Wędzony K., 2009b. S.04.04 Transient expression of phospho-acetylated form of histone H3 in medial prefrontal cortex of rats treated with MK-801. *Eur Neuropsychopharmacol.* 19 Suppl 3, 181.