



Dariusz Żurawek

Kraków, czerwiec 2017 r.

Podsumowanie Rozprawy Doktorskiej

„The role of microRNA and aminergic systems in the stress resilience in an animal model of depression”.

W skład prezentowanej Rozprawy Doktorskiej wchodzi następujące publikacje:

1. Żurawek D., Faron-Górecka A., Kuśmider M., Kolasa M., Gruca P., Papp M., Dziedzicka-Wasylewska M. (2013) Mesolimbic dopamine D₂ receptor plasticity contributes to stress resilience in rats subjected to chronic mild stress. *Psychopharmacology (Berl)*. 227(4):583-93.
2. Żurawek D., Faron-Górecka A., Kuśmider M., Solich J., Kolasa M., Szafran-Pilch K., Kmiotek K., Gruca P., Papp M., Dziedzicka-Wasylewska M. (2015) Dopamine D1 and D2 receptors in chronic mild stress: analysis of dynamic receptor changes in an animal model of depression using in situ hybridization and autoradiography. In: Tiberi M (ed) *Dopamine Receptor Technologies*. *Neuromethods 96* Springer Science + Business Media, New York, pp. 355–375.
3. Żurawek D., Kuśmider M., Faron-Górecka A., Gruca P., Pabian P., Kolasa M., Solich J., Szafran-Pilch K., Papp M., Dziedzicka-Wasylewska M. (2016) Time-dependent miR-16 serum fluctuations together with reciprocal changes in the expression level of miR-16 in mesocortical circuit contribute to stress resilient phenotype in chronic mild stress - An animal model of depression. *Eur Neuropsychopharmacol*. 26(1):23-36.
4. Żurawek D., Kuśmider M., Faron-Górecka A., Gruca P., Pabian P., Solich J., Kolasa M., Papp M., Dziedzicka-Wasylewska M. (2016) Reciprocal MicroRNA Expression in Mesocortical Circuit and Its Interplay with Serotonin Transporter Define Resilient Rats in the Chronic Mild Stress. *Mol Neurobiol*. 2016 Sep 22. [Epub ahead of print]

Długotrwałe działające czynniki stresowe zarówno biologiczne, jak i natury psychologicznej stanowią główną przyczynę powstawania zaburzeń depresyjnych. Jednym z osiowych objawów depresji jest anhedonia, którą zdefiniować można jako zaburzenie nastroju polegające na niemożności odczuwania przyjemności przez osobę dotkniętą depresją. Uważa się obecnie, że depresja związana jest z nieprawidłowościami w utrzymywaniu homeostazy oraz prawidłowej aktywności neuronalnej w wielu regionach mózgu (Krishnan i wsp., 2007). Nieprawidłowości te warunkują obniżoną biologiczną zdolność danej jednostki do „przeciwstawiania się” oraz aktywnego radzenia sobie z działającymi czynnikami stresowymi. Pomimo tego, że depresja zaliczana jest do chorób cywilizacyjnych, wciąż wiele osób doświadczających chronicznego stresu zachowuje optymizm, chęć do działania oraz ogólnie dobre psychiczne samopoczucie. Osoby takie w badaniach psychologicznych klasyfikowane są, jako odporne (z ang. *resilient*) na stres (Krishnan, 2007; Haglund, 2007).

W ciągu ostatnich kilku dekad przeprowadzono wiele interesujących badań podstawowych oraz klinicznych, które miały za zadanie wyjaśnić molekularne i fizjologiczne uwarunkowania depresji. Spośród nich jedynie garstka eksperymentów próbowała wyjaśnić molekularne mechanizmy leżące u podstaw psychologicznej oporności na stres. Przyczyną tak małej liczby badań nad fenomenem oporności ludzi na stres mogą być trudności metodologiczne oraz koncepcyjne, które pojawiają się podczas planowania doświadczenia. Badania biochemiczne na tkance mózgowej u ludzi mogą się odbywać prawie wyłącznie *post-mortem*. O ile tkanka pobrana od samobójcy nie budzi wątpliwości, co do fenotypu depresyjnego, o tyle zdefiniowanie *post-mortem* osoby odpornej na stres nie jest już tak oczywiste. Techniki psychologiczne oraz wywiad środowiskowy z pacjentem pozwalają na wyodrębnienie grupy osób charakteryzujących się podatnością oraz opornością na stres. Problem stanowi również grupa kontrolna, którą mogłyby być osoby nigdy niedoświadczające długotrwałego stresu. W populacji ludzkiej niemożliwym jest pełne kontrolowanie wpływu stresu na poszczególne jednostki, dlatego też badania nad opornością na stres są tak trudne koncepcyjnie. Oprócz tego metodologia, jaką obecnie się stosuje w badaniach wpływu stresu na aktywność biochemiczną czy fizjologiczną jest na tyle inwazyjna, że często niemożliwa do zastosowania w badaniach nad ludźmi. W tym kontekście idealnym rozwiązaniem w badaniach podstawowych nad fenotypem opornym na stres jest wykorzystanie procedury behawioralnej chronicznego łagodnego stresu (z ang. *chronic mild stress* – CMS). CMS jest uznanym zwierzęcym modelem depresji spełniającym wszystkie wymagania walidacyjne. W procedurze CMS u zwierząt stresowanych obserwuje się anhedonię – wyrażoną poprzez

obniżenie poziomu spożywania słodkiego (i przyjemnego dla zwierząt) 1% roztworu sacharozy, co odzwierciedla zmniejszoną wrażliwość na bodźce nagradzające (Venzala, 2013). Zastosowanie klinicznie zaakceptowanych leków przeciwdepresyjnych, jak i elektrowstrząsów u chronicznie stresowanych zwierząt prowadzi do zniesienia anhedonii, co obrazuje ponowne zwiększenie poziomu picia sacharozy przez te zwierzęta. Podczas procedury CMS wykorzystuje się szereg łagodnych bodźców stresowych zadawanych w sposób niekontrolowany i nieprzewidywany przez zwierzę, co imituje naturalny wpływ stresorów oraz zapobiega wykształceniu przez zwierzęta habituacji. Ponadto zaobserwowano, że model ten generuje także populację zwierząt, które dużo lepiej behawioralnie radzą sobie z negatywnym wpływem stresu [Praca 1]. U tych zwierząt nie obserwuje się zmian w poziomie picia słodkiego roztworu sacharozy, pomimo iż doświadczają one chronicznego, łagodnego stresu. W klasycznym ujęciu metodologicznym modelu CMS zwierzęta niewykazujące zmian w poziomie picia sacharozy podczas doświadczania łagodnego stresu są odrzucane z eksperymentu, jako zwierzęta, które nie odpowiedziały na założenia modelu. Według koncepcji zaproponowanej w [Praca 1] i [Praca 2] należy tę grupę zwierząt zdefiniować, jako jednostki behawioralnie odporne na stres (z ang. *resilient*). Biorąc pod uwagę rozszerzenie założeń modelu CMS o kryteria oporności na stres możliwym jest badanie złożoności biochemicznej różnych typów odpowiedzi na stres w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych.

Nadrzędnym celem prezentowanej Rozprawy Doktorskiej było określenie uwarunkowań biochemicznych na poziomie układów aminergicznym i mikroRNA (miRNA) zarówno na obwodzie, jak i w ośrodkowym układzie nerwowym, które mogą leżeć u podstaw oraz pełnić rolę biomarkerów oporności na stres. Poznanie tych uwarunkowań pozwoli lepiej zrozumieć etiopatogenezę samej depresji i przyczynić się może do powstania nowych strategii leczenia, polegających na przywróceniu osobie dotkniętej depresją fenotypu opornego na stres.

W patogenezie zaburzeń depresyjnych powstałych w wyniku doświadczania długotrwałego stresu niewątpliwie ważną rolę odgrywają główne systemy neuromodulujące, tj. noradrenergiczny, serotoninowy oraz dopaminergiczny. Zarówno u osób cierpiących na depresję, jak i w zwierzęcych modelach depresji obserwuje się zaburzoną transmisję wyżej wymienionych neuroprzekaźników. Obserwacja ta doprowadziła do powstania wielu leków przeciwdepresyjnych skierowanych wobec tych systemów (m.in. inhibicja wychwytu zwrotnego, antagonizm wobec autoreceptorów). Efekty terapii antydepresyjnej lekami, które

regulują przekaźnictwo serotonergiczne czy noradrenergiczne występują dopiero po kilku tygodniach stosowania, natomiast leki wpływające na układ dopaminergiczny, ze względu na możliwość wystąpienia uzależnienia, są marginalnie stosowane. Niemniej jednak, przeprowadzone badania wskazują na istotne zaangażowanie receptorów dopaminowych D2 w układzie mezo limbicznym w patogenezie depresji oraz w szczególności w powstawaniu fenotypu opornego na stres. Zaobserwowano, że zwierzęta behawioralnie odporne na działanie czynników stresowych wykazywały dynamiczne zmiany w poziomie receptorów dopaminowych D2 w prążkowiu, jądrze półleżącym przegrody oraz polu brzusznej nakrywki. Te zmiany ściśle zależały od długości trwania czynników stresowych. W fenotypie „odpornym” na stres następuje w pierwszej fazie (po 2 tygodniach CMS) silny spadek ekspresji receptorów dopaminowych D2 w układzie mezo limbicznym, czego nie obserwuje się u zwierząt wykazujących anhedonię. Podczas długotrwałego działania stresu (po 5 tygodniach CMS) zaobserwowano efekt odwrotny: poziom receptorów dopaminowych D2 w układzie mezo limbicznym w grupie zwierząt opornych na stres nie różnił się od poziomu receptorów u zwierząt niestresowanych; ponadto, u zwierząt opornych wzrósł poziom mRNA kodującego receptor dopaminowy D2 w polu brzusznej nakrywki. Takich zmian nie zaobserwowano u zwierząt anhedonicznych; co więcej, w tej grupie zaobserwowano istotne spadki ekspresji receptora dopaminowego D2 we wszystkich badanych regionach mózgu podczas długotrwałego działania stresu. Wyniki te dowodzą istnienia, na poziomie układu mezo limbicznego u zwierząt opornych, mechanizmu aktywnego biochemicznego przeciwdziałania wpływom stresu. Silne zmiany gęstości receptorów dopaminowych D2 bez zmian w poziomie ekspresji mRNA kodującego ten receptor po 2 tyg. procedury CMS mogą wskazywać na zaangażowanie miRNA, jako posttranskrypcyjnych regulatorów ekspresji genów. Zaobserwowano ponadto, że u zwierząt z anhedonią ta biochemiczna odpowiedź jest opóźniona i nie ulega habituacji [**Praca 1**].

W publikacji [**Praca 2**], która ma charakter metodyczny, opisane są w sposób bardzo szczegółowy metodologiczne aspekty modelu CMS oraz jego nowej interpretacji, co jest dopełnieniem całości prac składających się na opisywaną Dysertację Doktorską. Ponadto, publikacja ta zawiera szczegółowy opis metodologiczny i koncepcyjny wykorzystania zjawiska specyficznego wiązania się znakowanych trytem radioligandów do różnych typów receptorów (autoradiografia) oraz wykorzystania hybrydyzacji znakowanych izotopem siarki sond oligonukleotydowych do komplementarnych odcinków badanego mRNA (hybrydyzacja in situ). Jest to równie ważne, jako że techniki opisane szczegółowo w [**Praca 2**]

wykorzystywane są we wszystkich publikacjach wchodzących w skład prezentowanej pracy doktorskiej.

Biorąc pod uwagę opóźnione efekty terapeutyczne leków przeciwdepresyjnych oraz fakt, iż depresja jest chorobą o zróżnicowanym profilu i dotyczy bardziej zaburzeń homeostazy organizmu, niż zaburzenia jednoczynnikowego, istotne wydaje się zbadanie szlaków biochemicznych, które mogą regulować homeostazę oraz oddziaływać z układami neuromodulującymi w mózgu.

Takim systemem, który ma potencjał do regulowania całych układów jest zjawisko interferencji RNA (RNAi). RNAi jest procesem epigenetycznym wykazującym bardzo niski poziom zróżnicowania ewolucyjnego i polega na posttranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów przy wykorzystaniu, w przypadku ssaków, krótkich (18-22 nukleotydów) i niekodujących transkryptów RNA nazwanych mikroRNA (miRNA). Regulacja transkrypcji genów przez miRNA zachodzi na drodze wiązania się dojrzałego miRNA do komplementarnej sekwencji w rejonie 3'UTR mRNA podlegającego regulacji. Następnie maszyneria białkowa związana w miRNA powoduje zahamowanie translacji danego mRNA, bądź jego enzymatyczną degradację. U ssaków miRNA odpowiadają za regulację ekspresji niemalże 70% wszystkich genów, zatem pełnią one ważną rolę w wielu podstawowych procesach biologicznych, takich jak rozwój czy różnicowanie komórkowe. Wyjaśnienie roli RNAi oraz klasyfikacja miRNA, jako nowej grupy posttranskrypcyjnych regulatorów ekspresji genów miało miejsce pod koniec XX wieku. To nowo opisane zjawisko jest obecnie przedmiotem intensywnych badań. Zaburzenia w funkcjonowaniu miRNA prowadzą do wielu patologii, takich jak nowotwory, zaburzenia dojrzewania, rozwoju osobniczego czy zaburzenia psychiczne. Obecnie trwają intensywne badania nad rolą dojrzałych miRNA w patogenezie depresji i innych schorzeń neuropsychiatrycznych. W zwierzęcych modelach stresu wykazano, iż dysfunkcje adaptacyjne do stresu związane są ze zmianami w ekspresji dojrzałych miRNA w hipokampie (Meerson, 2010) oraz korze czołowej (Rinaldi, 2010). Co więcej, ostatnie badania pokazują, że ekspresja dojrzałych miRNA jest zaburzona w tkance mózgowej samobójców, którzy cierpieli na depresję (Smalheiser, 2012). Pomimo prowadzonych badań nad rolą dojrzałych miRNA w patomechanizmach depresji, nieznana jest ich rola w powstawaniu fenotypu opornego na stres. Regulacyjna rola miRNA może mieć niebagatelne znaczenie w utrzymywaniu homeostatycznego balansu w odpowiedzi na stres dzięki plejotropizmowi działania dojrzałych cząsteczek miRNA. Jedno miRNA może regulować posttranskrypcyjnie ekspresję wielu różnych białek. Zatem każda zmiana na

poziomie miRNA ma zwielokrotnione działanie na poziomie regulacji ekspresji genów. Odnalezienie specyficznych zmian na poziomie miRNA charakteryzujących fenotyp oporny bądź podatny na stres może być niejako preludium dla nowych celów terapii antydepresyjnej. Zatem kolejnym celem niniejszej Rozprawy Doktorskiej było na podstawie wykorzystania modelu CMS i analiz przesiewowych wyłonienie miRNA zaangażowanych w odpowiedź na stres i mogących pełnić rolę biomarkerów podatności i oporności na stres. Ponadto postanowiono sprawdzić, czy wyselekcjonowane miRNA mogą regulować ekspresję genów należących do układów aminergicznych.

W dynamicznej odpowiedzi na stres bardzo istotną rolę odgrywają czynniki genetyczne oraz epigenetyczne. Badania ostatnich lat pokazują, że podatność na stres silnie koreluje ze zmianami w poziomie ekspresji miRNA. Zmiany te zaobserwowano w hipokampie i korze przedczołowej u stresowanych zwierząt w zwierzęcych modelach depresji. Co bardzo istotne, zmiany w ekspresji miRNA zaobserwowano także w badaniach *post-mortem*, w tkance mózgowej należącej do samobójców. Niemniej jednak bardzo mało wiadomo na temat roli regulacji miRNA w utrzymywaniu homeostatycznego balansu i allostazy w odpowiedzi na stres u osobników opornych. Na podstawie analizy przesiewowej profilowania 380 dojrzałych miRNA metodą RT-qPCR w niniejszej Rozprawie Doktorskiej wykazano, że zwierzęta behawioralnie odporne na łagodny stres mają istotnie statystycznie podwyższony poziom miR-16 w surowicy w pierwszym tygodniu trwania CMS oraz w odpowiedzi na długotrwały stres, tj. w 6 i 7 tygodniu trwania procedury CMS. Powyższa obwodowa zmiana została zaobserwowana także w mózgu, gdzie zwierzęta odporne na stres wykazywały podwyższony poziom ekspresji miR-16-5p w polu brzusznej nakrywki i jednocześnie obniżony poziom miR-16-5p w części przedczołowej kory mózgowej. Co więcej, zmiany w obu strukturach mózgu wykazały istotnie statystyczną, negatywną korelację, tzn. wzrost ekspresji miR-16-5p w polu brzusznej nakrywki towarzyszył jednocześnie spadkowi ekspresji miR-16-5p w korze przedczołowej zwierzęcia wykazującego behawioralną oporność na stres. Zmian tych nie zaobserwowano u zwierząt wykazujących anhedonię. miR-16-5p ma potencjał biochemicznego, obwodowego markera odpowiedzi na stres, jako że zmiany w jego poziomie widoczne były zarówno w strukturach mózgowych jak i w surowicy zwierząt wykazujących oporność na długotrwały, łagodny stres [**Praca 3**]. Analiza bioinformatyczna wykazała, że miR-16 jest zaangażowany w regulację prawidłowego funkcjonowania układu nerwowego oraz z wysokim prawdopodobieństwem reguluje poziom transportera dla serotoniny (SERT) [**Praca 3**]. Jako że najsilniejsze zmiany w poziomie

ekspresji miRNA zaobserwowano po dwóch tygodniach trwania modelu CMS, ten punkt czasowy postanowiono wykorzystać do dalszych analiz biochemicznych. Bazując na wynikach z analiz profilowania miRNA zawartych w **[Praca 3]** oraz opierając się o dane literaturowe skonstruowano panel analityczny 7 miRNA, które związane są z odpowiedzią na stres i z funkcjonowaniem ośrodkowego układu nerwowego. Oprócz przebadanego wcześniej miR-16-5p w panelu analitycznym znalazły się następujące miRNA: miR-18a-5p, miR-34a-5p, miR-135a-5p, miR-195-5p, miR-320-3p, miR-674-3p, miR-872,5p **[Praca 4]**. Analiza RT-qPCR wykazała, że większość spośród przebadanych miRNA wykazuje zmiany w poziomie ekspresji w polu brzusznej nakrywki i korze przedczołowej podobne do tych, jakie zaobserwowano w przypadku miR-16-5p. Zaobserwowano wzrost ekspresji wszystkich, za wyjątkiem miR-135a-5p, miRNA w polu brzusznej nakrywki u zwierząt opornych na stres. Ponadto wszystkie badane miRNA, za wyjątkiem miR-34a-5p, wykazywały obniżony poziom ekspresji w korze przedczołowej u zwierząt opornych na stres **[Praca 4]**. Analiza bioinformatyczna wykorzystująca kompilację czterech różnych algorytmów przewidujących potencjał do regulowania genów miRNA wykazała, że badane miRNA mają wspólny mianownik w postaci potencjału do regulowania ekspresji SERT **[Praca 4]**. Dalsza analiza biochemiczna wykorzystująca technikę wiązania trytowanej paroksetyny do SERT wykazała obniżony poziom SERT w polu brzusznej nakrywki u zwierząt opornych na stres, co potwierdza, że poziom SERT i odpowiedź na stres mogą być regulowane przez badane miRNA **[Praca 4]**.

Sama koncepcja poszukiwania molekularnych markerów oporności na stres poprzez badanie zmian na poziomie miRNA jest nowatorska. Ponadto połączenie zaawansowanego modelu behawioralnego – dobrze modelującego jeden z głównych objawów depresji, jakim jest anhedonia oraz dostępnego w niewielu laboratoriach na świecie – z technikami badawczymi z zakresu neurochemii, biologii molekularnej i bioinformatyki, które zostały wykorzystane w przedstawionych wynikach badań pozwalają lepiej zrozumieć etiopatogenezę samej depresji. Przyczynić się to może do powstania nowych strategii leczenia polegających na przywróceniu osobie dotkniętej depresją „fenotypu opornego” na stres. Otrzymane wyniki pokazują nową ścieżkę biochemiczną na poziomie ekspresji miRNA, która jest istotnie zaangażowana w odpowiedź organizmu na czynniki stresowe i wpływa na regulację układów aminergiczych (w szczególności układu serotoninowego, który obecnie jest głównym celem terapeutycznym stosowanych leków przeciwdepresyjnych). Należy jeszcze dodać, iż miRNA cechuje niesamowita wręcz konserwatywność ewolucyjna, co sprawia, że wnioski z badań

nad rolę zjawiska interferencji RNA w utrzymywaniu allostazy w odpowiedzi na stres mają dużą szansę by z powodzeniem być przetransponowane do badań klinicznych.

Bibliografia

Haglund M.E., Nestadt P.S., Cooper N.S., Southwick S.M., Charney D.S. 2007. Psychobiological mechanisms of resilience: relevance to prevention and treatment of stress-related psychopathology. *Dev Psychopathol* 19(3):889–920.

Krishnan V., Han M.H., Graham D.L., Berton O., Renthal W., Russo S.J., Laplant Q., Graham A., Lutter M., Lagace D.C., Ghose S., Reister R., Tannous P., Green T.A., Neve R.L., Chakravarty S., Kumar A., Eisch A.J., Self D.W., Lee F.S., Tamminga C.A., Cooper D.C., Gershenfeld H.K., Nestler E.J. 2007. Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell* 131(2):391–404.

Meerson A., Cacheaux L., Goosens K.A., Sapolsky R.M., Soreq H., Kaufer D., 2010. Changes in brain MicroRNAs contribute to cholinergic stress reactions. *J Mol Neurosci* 40(1-2):47-55.

Rinaldi A., Vincenti S., De Vito F., Bozzoni I., Oliverio A., Presutti C., Fragapane P., Mele A., 2010. Stress induces region specific alterations in microRNAs expression in mice. *Behav Brain Res* 208(1):265-9.

Smalheiser N.R., Lugli G., Rizavi H.S., Torvik V.I., Turecki G., Dwivedi Y., 2012. MicroRNA expression is down-regulated and reorganized in prefrontal cortex of depressed suicide subjects. *PLoS One* 7(3):e33201

Venzala E., García-García AL., Elizalde N., Tordera RM. 2013. Social vs. environmental stress models of depression from a behavioural and neurochemical approach. *Eur Neuropsychopharmacol.* 23(7):697-708.