

Paulina Misztak

„Rola czynnika transkrypcyjnego MeCP2 w depresji”

STRESZCZENIE:

Depresja jest jedną z najpowszechniejszych chorób psychicznych dotyczących ludzi w różnym przedziale wiekowym i o statusie ekonomicznym. Częściej niż dotychczas depresja dotyka ludzi coraz młodszych, a leczenie farmakologiczne w tej grupie wiekowej nie jest łatwe. Pomimo licznych badań nad mechanizmem powstawania depresji nie udało się do końca wyjaśnić jej powstawania. Wiadomo jest że depresja towarzyszy licznym chorobom układu nerwowego przez co czasami utrudnione jest jej leczenie i diagnostyka. Ostatnie lata skupiają się nad wyznaczeniem potencjalnych genetycznych markerów tej choroby, jednakże wydaje się iż nie jest ona tak silnie skorelowana z genetyką jak inne choroby psychiczne. Poszukiwanie nowych mechanizmów łączących wszystkie dotychczasowe teorie depresji zaprowadziło do wskazania potencjalnej roli czynników epigenetycznych jako łączników między genami a oddziaływaniem środowiska. Nasze badania skupiły się na potencjalnej roli MeCP2 w regulacji genu BDNF oraz wpływu innych czynników epigenetycznych jak acH3K9/14, H3K27me2, Sin3a, HDAC2 i HDAC3 na mechanizm powstawania depresji oraz ich wpływ na farmakoterapie tej choroby. W pracy wykorzystano tkanki ludzkie *post mortem* oraz zwierzęce modele depresji: przewlekły łagodny stres (CMS) i usunięcie opuszek węchowych (OB).

W tkankach ludzkich wykonano oznaczenia białek metodą Western blot. Zarówno w korze czołowej jak i hipokampie poziom białka MeCP2 uległ podwyższeniu u osób które popełniły samobójstwo. Wzrosty MeCP2 skorelowane są z jednoczesnym spadkiem białka BDNF w badanych strukturach. Jedynie w hipokampie stwierdzono wzrost fosforylacji S421 dla MeCP2. W obydwóch strukturach stwierdzono wzrosty HDAC3 czynnika tworzącego kompleks represorowy z białkiem MeCP2. Ponadto w hipokampie jak i korze czołowej w grupie badanej odnotowano spadki acH3K9/14. Podwyższenie białka Sin3a w hipokampie i HDAC2 w korze czołowej może sugerować odmienny wpływ epigenomu w strukturach mózgu samobójców.

Model przewlekłego łagodnego stresu charakteryzował się brakiem zmian w poziomie białka i genu MeCP2 przy jednoczesnym spadku poziomu ekspresji genu *bdnf* i poziomu białka dla fosforylacji S421 w korze czołowej. Wśród oznaczonych czynników epigenetycznych w korze czołowej poziom acetylacji histonu H3 na lizynie 9/14 ulegał zmniejszeniu natomiast w hipokamp charakteryzował się zwiększonym poziomem dimetylacji H3K27. Podania escitalopramu powodowały spadek ekspresji genu *mecp2* w korze czołowej w grupie kontrolnej. Wzrost poziomu białka p-S421-MeCP2 w hipokampie jak i korze czołowej wywołany został przez podania imipraminy i escitalopramu. Również podania wenlafaksyny skutkowały wzrostem poziomu białka

p-S421-MeCP2 w korze czołowej w grupie stresowanej +lek. Podania imipraminy i wenlafaksyny w badanych strukturach zwiększały ekspresję genu *bdnf*. Podwyższony poziom genu *bdnf* w korze czołowej zanotowaliśmy po podaniach escitalopramu. Podania wenlafaksyny zwiększały poziom białka acH3K9/14 w korze czołowej oraz zmniejszały poziom białka HDAC2 w hipokampie. Stres wpływał na zwiększenie poziomu miRNA 132* i 212* w hipokampie. W korze czołowej podwyższeniu ulegała również ekspresja miRNA 212*. Podania leków escitalopramu, wenlafaksyny i olanzapiny regulowało poziom mir132* i 212* w hipokampie. Olanzapina wpływała na spadki miRNA 212* w korze czołowej.

W modelu usunięcia opuszek węchowych tylko w korze czołowej stwierdzono wzrosty białka MeCP2 oraz spadki jego fosforylacji. W korze czołowej również stwierdzono spadek poziomu białka acH3K9/14 i wzrost białka HDAC2. Podania amitryptyliny prowadziły do spadku poziomu białka MeCP2 w hipokampie, a podania fluoksetyny obniżały poziom tego białka w korze czołowej. Zmiany fosforylacji S421 stwierdzono w korze czołowej po podaniach amitryptyliny, fluoksetyny i wenlafaksyny. Podania wenlafaksyny i fluoksetyny wpływały na podwyższenie poziomu genu *bdnf* w hipokampie szczurów operowanych. Podania wenlafaksyny zmniejszały poziom białka acH3K9/14 w korze czołowej szczurów OB. Amitryptylina natomiast zmniejszała poziom białka HDAC2 w korze czołowej. Usunięcie opuszek węchowych skutkowało wzrostem ekspresji miR212* w hipokampie. Podania amitryptyliny, Wenlafaksyny i Olanzapiny zmniejszały ekspresję zarówno miRNA 212* jak i 132* w hipokampie szczurów modelowanych.

Podsumowując u osób które popełniły samobójstwo jak i u szczurów z usuniętymi opuszkami węchowymi stwierdzono wzrost poziomu MeCP2 oraz HDAC2 przy spadku acetylacji histonu 3 na lizynie 9/14 i białka BDNF. Model CMS rzutował spadkami acetylacji histonu 3 na lizynie 9/14 i białka BDNF przy braku zmian w poziomie białka MeCP2. Zależność ta sugeruje podobny mechanizm działania wytworzenia zachowań depresyjnych w modelu OB i samobójców. Ponadto wykazano iż czynniki epigenetyczne, a w szczególności acetylacji histonu H3 odgrywają istotną rolę w mechanizmach powstawania depresji. MeCP2 bierze udział w regulacji BDNF, a badania jego fosforylacji mogą być kolejnym krokiem do wyznaczenia biomarkerów skuteczności terapii przeciwdepresyjnej.

SUMMARY:

Depression is one of the most common mental diseases affecting people of different ages and economic status. Moreover, depression affects younger and younger people, and pharmacological treatment in this group is not easy. Despite of numerous studies on the mechanism of depression, it is not fully understand and explained yet. It is known that depression accompanies many diseases of the nervous system, which sometimes makes its treatment and diagnostics difficult. Recent years have focused on the determination of potential genetic markers of this disease, however, it seems that it is not as strongly correlated with genetics as other mental diseases. The search for new mechanisms combining all current theories of depression led to the indication of the potential role of epigenetic factors as linkers between genes and the impact of the environment. Our research focused on the potential role of MeCP2 in the regulation of the BDNF gene and the influence of other epigenetic factors like acH3K9/14, H3K27me2, Sin3a, HDAC2 and HDAC3 on the mechanism of depression and their effect on the pharmacotherapy of this disease. Human post-mortem and animal models of depression like: chronic mild stress (CMS) and removal of olfactory bulbs (OB) were used in the work.

In human tissues, Western blot protein determinations were performed. Both in the frontal cortex and the hippocampus, the level of MeCP2 protein was increased in people who committed suicide. MeCP2 increases are correlated with the simultaneous decrease of BDNF protein in the examined structures. Only in the hippocampus was the increase in phosphorylation of S421 for MeCP2. In both structures, the HDAC3 the factor forming the repressor complex with the MeCP2 protein was increase. Moreover, in the hippocampus and frontal cortex, the acH3K9/14 was decreased in the study group. The increase of the Sin3a protein in the hippocampus and HDAC2 in the frontal cortex may suggest a different effect of the epigenome in this structures of the suicide brain.

The model of chronic mild stress was characterized by the lack of changes in the protein and MeCP2 gene levels with a simultaneous decrease in the expression level of the *bdnf* gene and the protein level for phosphorylation of S421 in the frontal cortex. Among the exanimated epigenetic factors in the frontal cortex, the level of histone H3 acetylation on lysine 9/14 was decreased while the hippocampus was characterized by an increased level of H3K27 dimethylation. Administration of escitalopram caused a downregulation *mecp2* gene expression in the frontal cortex in the control group.

The increase protein level of p-S421-MeCP2 in the hippocampus and frontal cortex was caused by administration of imipramine and escitalopram. Also, venlafaxine administration resulted in an increase in p-S421-MeCP2 protein in the frontal cortex in the stress group + drug. Administration of imipramine and venlafaxine in the examined structures upregulate the expression of the *bdnf* gene. The elevated level of the *bdnf* gene in the frontal cortex was noted after the administration of escitalopram. Venlafaxine administration increased the level of acH3K9/14 protein

in the frontal cortex and decreased HDAC2 protein in the hippocampus. Stress influenced the increase of 132 * and 212 * miRNA levels in the hippocampus. In the frontal cortex, miRNA 212 * expression was also increased. Administration of drugs escitalopram, venlafaxine and olanzapine regulated the level of mir132 * and 212 * in the hippocampus. Olanzapine affected the 212 * miRNA declines in the frontal cortex.

In the model of removal of olfactory bulbs only in the frontal cortex, increases in MeCP2 protein and decreases in its phosphorylation were found. In the frontal cortex, the protein level of acH3K9/14 and HDAC2 was increased. Administration of amitriptyline led to a decrease protein level of MeCP2 in the hippocampus, and administration of fluoxetine reduced the level of this protein in the frontal cortex. Changes in phosphorylation of S421 were found in the frontal cortex after administration of amitriptyline, fluoxetine and venlafaxine. Administration of venlafaxine and fluoxetine upregulate the level of the *bdnf* gene in the hippocampus of operated rats. Venlafaxine dosing reduced the level of acH3K9/14 in the frontal cortex of OB rats. Amitriptyline, on the other hand, reduced the HDAC2 protein level in the frontal cortex. Removal of the olfactory bulbs resulted in an increase in miR212* expression in the hippocampus. Administration of amitriptyline, venlafaxine and olanzapine reduced the expression of both 212* and 132* miRNAs in the hippocampus of modeled rats.

In summary, in suicide as well as in rats with removed of olfactory bulbs there was increase protein level of MeCP2 and HDAC2 with decrease protein of histone 3 acetylation on 9/14 and BDNF. The CMS model was influenced by the decreases in acetylation of histone 3 on 9/14 and BDNF protein in the absence of changes in the level of MeCP2 protein. This dependence suggests a similar mechanism of action for depressive behaviors in the OB model and suicides. In addition, it has been demonstrated that epigenetic factors, in particular histone H3 acetylation, play an important role in the mechanisms of depression. MeCP2 is involved in the regulation of BDNF, and studies on its phosphorylation may be the next step to determine the biomarkers of the effectiveness of antidepressant therapy.