

Magdalena Kolasa
Pracownia Farmakologii Biochemicznej
Zakład Farmakologii

Promotor:

prof. dr hab. Marta Dziedzicka-Wasylewska

Recenzenci:

prof. dr hab. Bożena Kamińska
prof. dr hab. Marek Sanak

Tytuł planowanej pracy doktorskiej:

Analiza dynamiki ekspresji genów w mózgu szczura po podaniach leków przeciwdepresyjnych

Streszczenie:

Praca miała na celu zbadanie mechanizmu działania dwóch leków przeciwdepresyjnych (LPD) o odmiennym profilu farmakologicznym poprzez analizę zmian w ekspresji genów w czterech obszarach mózgu zaangażowanych w etiopatogenezę depresji, tj. korze przedczołowej, korze obręczy, zawoju zębatym hipokampa i jądrach podstawno-bocznych amygdali.

Kolejne etapy wykonanych badań obejmowały: wybór na podstawie przeglądu literatury genów potencjalnie istotnych w rozwoju depresji i działaniu LPD; podanie zwierzętom doświadczalnym leków: dezipraminy (DMI) i citalopramu (CIT) przez 1, 3, 7, 14 i 21 dni; izolację materiału biologicznego metodą mikrodyssekcji laserowej wraz z kontrolą wyizolowanego RNA techniką elektroforezy mikrokapilarnej; określenie ekspresji 96 genów z użyciem techniki qPCR; bioinformatyczne analizy uzyskanych danych za pomocą klasteryzacji szeregów czasowych z wykorzystaniem programu STEM oraz globalnej analizy zmian ekspresji przy użyciu algorytmu ASCA; określenie ekspresji białek FOS, NGFIB i DBP metodą immunoenzymatyczną (ELISA); weryfikację ekspresji wybranych genów (*c-fos*, *Egr1*, *Nr4a1* i *Id1*) metodą hybrydyzacji mRNA *in situ* (ISH) na skrawkach mózgów; określenie zmian ekspresji genu *Dbp* w zwierzęcym modelu depresji (chronicznym łagodnym stresie, CMS) metodą ISH.

Oprócz określenia przebiegów czasowych ekspresji genów w czasie odpowiedzi na wielokrotne podania LPD dodatkowym aspektem wykonanej pracy było porównanie uzyskanych zmian z podaniami pojedynczymi w tych samych punktach czasowych co przy podaniach wielokrotnych. Miało to na celu weryfikację na poziomie molekularnym hipotezy zależnej od czasu sensytyzacji (TDS).

Jako że zbadano działanie 2 leków w 4 regionach mózgu przy 2 sposobach podań leków w 6 punktach czasowych (0, 1, 3, 7, 14 i 21 dni), uzyskane dane ekspresji dla każdego z 96 badanych genów zawierały 16 szeregów czasowych po 6 punktów każdy. Do analiz uzyskanych danych, oprócz tradycyjnego podejścia wykorzystującego dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA) uwzględniającą czynnik czasu i sposób podania leku, spośród dostępnych obecnie metod analizy danych wybrano takie, które uwzględniają specyfikę uzyskanych danych, tzn. ich ułożenie w szereg czasowy i potencjalne wzajemne zależności między kolejnymi punktami czasowymi oraz korelacje ekspresji między poszczególnymi genami. Analizy ASCA oraz STEM umożliwiły wyznaczenie globalnych przebiegów ekspresji z naciskiem na wyodrębnienie punktów czasowych kluczowych dla działania LPD, wizualizację i porównanie ekspresji genów dla poszczególnych warunków eksperymentalnych oraz znalezienie genów o ekspresji skorelowanej w czasie.

Najwięcej statystycznie istotnych zmian w ekspresji genów zaobserwowano w jądrach podstawno-bocznych amygdali i korze przedczołowej po podaniach DMI oraz w zawoju zębatym hipokampa po podaniach zarówno DMI jak i CIT. Co ciekawe, dla wszystkich regionów mózgu w analizie statystycznej najwięcej zmian w ekspresji genów zaobserwowano dla czynnika czasu, niezależnie czy były to podania wielokrotne czy pojedyncze leku. Oba leki na poziomie ekspresji genów wykazywały szybkie zmiany już po 1-3 dniach podawania LPD. Globalna analiza zmian ekspresji metodą ASCA wykazała dla obu leków istnienie największych ekstremów w poziomie ekspresji (wzrostów lub spadków) w 3. i 21. dniu podawania leków. Część genów wykazywała natomiast zmiany w ekspresji w 1. i 14. dniu podań leków.

Zarówno analiza ASCA, jak i klasteryzacja szeregów czasowych programem STEM wykazały zależne od warunków eksperymentalnych korelacje w przebiegu ekspresji wielu genów. W danym regionie mózgu dało się zauważyć większe podobieństwo między podaniami wielokrotnymi i pojedynczymi danego leku niż w tym samym regionie po podaniach innego leku. Uwidoczniała się także różnica w działaniu dwóch leków w poszczególnych regionach, już na początku ich podań. Istniała grupa genów, których ekspresja ulegała zmianie w danym regionie mózgu pod wpływem obu użytych leków, jednak najczęściej były to zmiany przeciwstawne. Obserwacja, że większość zmian w ekspresji genów zależała od czasu, a nie od sposobu podań leków oraz istnienie podobieństwa w przebiegu ekspresji wielu genów po podaniach chronicznych i pojedynczych częściowo potwierdzałoby istnienie zjawiska TDS.

Porównując przebiegi ekspresji pojedynczych genów wykryto wiele korelacji w ekspresji genów, które były charakterystyczne dla danych warunków eksperymentalnych (tzn. leku, sposobu jego

podania i regionu mózgu). Zdarzały się też geny, których przebiegi w czasie były podobne, niezależnie od zastosowanych warunków eksperymentalnych. Największe zmiany pod względem krotności zmian i jednocześnie najwięcej korelacji ekspresji w czasie wykryto dla genów wczesnej odpowiedzi (IEG), aczkolwiek DMI i CIT najczęściej powodowały zmiany w przeciwnych kierunkach. Dodatkowa weryfikacja i wizualizacja ekspresji genów IEG metodą ISH wykazała, że oprócz regionów badanych metodą qPCR zmiany w ekspresji IEG dotyczą także kory gruszkowatej.

Wiele z oznaczonych zmian ekspresji genów wykazywało oscylacje – tzn. minima bądź maksima ekspresji w różnych punktach czasowych, po których następował powrót do poziomu kontroli. Podobne przypadki zaobserwowano już wcześniej w literaturze i mogą one świadczyć o istnieniu ogólnego mechanizmu w regulacji ekspresji wielu genów po podaniach LPD. Po wielokrotnych podaniach DMI w korze przedczołowej zaobserwowano spadki ekspresji wielu genów, m.in. *Adra2a*, *Adra2c*, *Cebpb* i *Dbp* oraz IEG. Przy czym, o ile część z tych zmian wykazywała charakter przejściowy, tzn. w pewnym punkcie czasowym wracały one do poziomu kontroli, to dla genu *Dbp* w miarę upływu czasu zaobserwowano pogłębiające się spadki. Przeciwną sytuację zaobserwowano dla genu *Id1*. Gen *Dbp* wydaje się być regulowany jedynie przez leki z komponentą noradrenergiczną, gdyż po podaniach CIT nie zauważono zmian w ekspresji tego genu. Ekspresję genu *Dbp* zmierzono w zwierzęcym modelu depresji CMS i wykazano spadki ekspresji w jądrze nadskrzyżowaniowym i prążkowie pod wpływem stresu, które zostały odwrócone przez zastosowany lek - imipraminę.

Podsumowując, uzyskane wzory ekspresji badanych genów w czasie zależały od podanego leku (DMI lub CIT), sposobu podania leku (wielokrotne vs pojedyncze) i regionu mózgu. Niektóre obserwowanych zmian w ekspresji dotyczyły obu użytych leków, ale znalezienie wspólnej ścieżki działania obu LPD nie było możliwe. Otrzymane wyniki porównano z dostępnymi w literaturze, aczkolwiek było to zadanie utrudnione gdyż okazało się, że różnica w uzyskanych wartościach ekspresji zależy może w dużym stopniu od zastosowanego schematu eksperymentalnego, tj. sposobu, dawki i częstotliwości podania leków, gatunku i szczepu zwierząt oraz zastosowanej metodologii pomiaru ekspresji. Wiele z obserwacji znalazło jednak potwierdzenie we wcześniejszych danych literaturowych, a dodatkowo zidentyfikowano zmiany w ekspresji genów dotychczas nie wiązanych bezpośrednio z działaniem LPD, tj. *Dbp* i *Id1*, które wydają się ciekawym przedmiotem dalszych badań.