

Streszczenie

Rola stresu oksydacyjnego i nitracyjnego oraz szlaku katabolitów tryptofanu w patogenezie depresji

Depresja jest najczęstszą chorobą psychiczną, dotykającą około 350 mln ludzi na całym Świecie. Co więcej, według danych Światowej Organizacji Zdrowia depresja do 2040 roku będzie stanowić pierwsze miejsce na liście przyczyn niepełnosprawności społeczeństwa. Najpoważniejszą konsekwencją rozwoju depresji są próby samobójcze. Rocznie odnotowuje się około miliona zgonów z powodu depresji. Próby samobójcze są najczęściej spowodowane nieskutecznym leczeniem bądź jego brakiem. Około jedna trzecia pacjentów nie odpowiada na tradycyjne formy terapii przeciwdepresyjnej.

Depresja należy do grupy chorób o złożonej etiologii. Jej rozwój i przebieg może zależeć od czynników biologicznych, genetycznych oraz środowiskowych. Jednakże, pomimo intensywnych badań podłoże molekularne rozwoju depresji nadal pozostaje niejasne. Dotychczasowe badania sugerują udział powiązanych ze sobą szlaków biochemicznych, tj.: stresu oksydacyjnego i nitracyjnego oraz nieprawidłowości szlaku katabolitów tryptofanu (szlak TRYCATs, ang. *tryptophan catabolites pathway*) w rozwoju zaburzeń depresyjnych. Depresja związana jest z intensyfikacją procesów oksydacyjnych oraz niewydolnością systemów obrony antyoksydacyjnej. Co więcej, wykazano, że pacjenci z depresją cechują się obniżonym poziomem tryptofanu, a także zaburzeniami przemian tego egzogenego aminokwasu. Konsekwencją tych nieprawidłowości w szlaku TRYCATs, jest nadprodukcja neurotoksycznych i prooksydacyjnych metabolitów (kwasu chinolinowego, 3-hydroksykinureniny) oraz obniżenie poziomu związków o działaniu neuroprotekcynym (kwas kinureninowy).

W związku z tym celem niniejszej pracy było wyjaśnienie roli stresu oksydacyjnego i nitracyjnego oraz zaburzeń przebiegu szlaku katabolitów tryptofanu w molekularnym podłożu depresji. W niniejszej pracy podjęto próbę określenia roli polimorfizmów pojedynczego nukleotydu, zlokalizowanych genach, kodujących enzymy zaangażowane w stres oksydacyjny (*SOD2*, *GPx4*, *CAT*) i nitracyjny (*NOS1*, *NOS2*) oraz szlak TRYCATs (*TPH1*, *TPH2*, *IDO1*, *KATI*, *KATII*) na częstość występowania depresji. Ponadto, dokonano oceny wpływu procedury chronicznego łagodnego stresu na ekspresję na poziomie mRNA i białka oraz stopień metylacji regionów promotorowych genów kodujących enzymy zaangażowane w stres

oksydacyjny i nitracyjny (*SOD1*, *SOD2*, *GPx1*, *GPx4*, *CAT*, *NOS1*, *NOS2*) oraz szlak TRYCATs (*Tph1*, *Tph2*, *Ido1*, *KatI*, *KatII*, *Kynu*, *Kmo*).

Materiał do badań stanowiły próbki genomowego DNA wyizolowane z krwi obwodowej pobranej od pacjentów ze zdiagnozowaną depresją i od osób z grupy kontrolnej, u których wykluczono obecność tej choroby. Genomowy DNA i sondy TaqMan wykorzystano do analizy 6 polimorfizmów zlokalizowanych w genach zaangażowanych w stres oksydacyjny i w 10 w genach biorących udział w szlaku TRYCATs. Do genotypowania polimorfizmów zastosowano technikę łańcuchowej reakcji polimerazy z detekcją produktu specyficznego dla jednego allelu i/bądź drugiego allelu w czasie rzeczywistym (*real-time PCR*). Drugi rodzaj materiału badawczego stanowiły próbki genomowego DNA, RNA wyizolowane z krwi i struktur mózgowych oraz białka wyizolowanego ze struktur mózgowych szczurów poddanych procedurze chronicznego łagodnego stresu i terapii wenlafaksyną (inhibitory zwrotnego wychwytu noradrenaliny i serotoniny). Wyizolowane DNA, RNA oraz białko wykorzystano odpowiednio do analizy stopnia metylacji regionów promotorowych badanych genów, ekspresji na poziomie mRNA oraz białka. W tym celu zastosowano odpowiednio technikę łańcuchowej reakcji polimerazy z detekcją w czasie rzeczywistym (*real-time PCR*), metodę analizy topnienia DNA o wysokiej rozdzielczości (MS-HRM, ang. *methylation sensitive – high resolution melting*) oraz Western Blot.

Wyniki otrzymane w toku przeprowadzonych badań z udziałem ludzi wykazały, że polimorfizm c.47T>C (p.Val16Ala) genu *SOD2*, c.-89A>T genu *CAT*, c.660T>C genu *GPx4*, c.804-7C>A, c.-1668T>A, c.803+221C>A, c.-173A>T genu *TPH1*, c.-1449C>A, c.-844G>T (rs4570625) genu *TPH2*, c.*456G > A genu *KATI* mogą wpływać na częstość występowania depresji w zależności od genotypu. Co więcej, polimorfizm c.975-7T>C (rs1480544) zlokalizowany w genie *KATII* może wpływać na skuteczność terapii lekami z grupy inhibitorów zwrotnego wychwytu serotoniny.

Badania na zwierzętach wykazały, że poziom ekspresji i stopień metylacji regionów promotorowych wszystkich badanych genów zależy od rodzaju tkanki i struktury mózgu. Procedura chronicznego łagodnego stresu może modulować ekspresję na poziomie mRNA genów *CAT*, *Gpx1*, *Gpx4*, *NOS1* jedynie w tkance mózkowej, podczas gdy terapia wenlafaksyną zmieniała poziom ekspresji *SOD1*, *SOD2*, *NOS1* zarówno w komórkach PBMCs jak i tkance mózkowej. Ponadto, stopień metylacji regionów promotorowych genów *Gpx1*, *Gpx4*, *SOD1*, *SOD2* ulegał zmianie na skutek bodźców stresowych zarówno w tkance mózkowej jak i komórkach PBMCs. Z kolei, ekspresja na poziomie białka dla *CAT* i *Gpx4*

w tkance mózgowej była modulowana zarówno na skutek bodźców stresowych, jak i terapii wenlafaksyną. Na skutek procedury chronicznego łagodnego stresu i terapii wenlafaksyną ekspresja genów *Tph2*, *KatI* i *KatII* uległa zmianie jedynie w tkance mózgowej. Ponadto, procedura chronicznego łagodnego stresu wpływała na zmianę stopnia metylacji regionów promotorowych *Ido1* w tkance mózgowej, podczas gdy terapia wenlafaksyną genu *Kmo* w komórkach PBMCs. Terapia wenlafaksyną powodowała również zmianę poziomu białka Tph1 i Ido1 w tkance mózgowej.

Podsumowując, wyniki uzyskane w toku realizacji niniejszej pracy doktorskiej wskazują na udział stres oksydacyjnego i nitracyjnego, a także zaburzeń w przebiegu szlaku katabolitów tryptofanu w molekularnym mechanizmie rozwoju depresji.

Pauline Wesner

Summary

The role of oxidative and nitrosative stress and the tryptophan catabolites pathway in the pathogenesis of depression

Depression is the most common mental illness affecting around 350 million people around the world. Moreover, according to data from the World Health Organization, by 2040 depression will take first place on the list of causes of disability in society. Suicide attempts are the most serious consequence of the development of depression. Annually, there are about a million deaths a year from depression. Attempts at suicide are most often caused by ineffective or no treatment. About a third of patients do not respond to traditional forms of antidepressant therapy.

Depression belongs to the group of diseases with a complex aetiology. The development and course of this disease may depend on biological, genetic and environmental factors. However, despite extensive research, the molecular basis for the development of depression remains unclear. Research to date suggests the involvement of interrelated biochemical pathways, i.e. oxidative and nitrosative stress, and abnormalities of the tryptophan catabolites pathway (TRYCATs pathway) in the development of depressive disorders. Depression is associated with the intensification of oxidative processes and the failure of antioxidative defence systems. What's more, depressed patients have been shown to have reduced levels of tryptophan as well as disorders of the transformation of this exogenous amino acid. The consequence of these abnormalities in the TRYCATs pathway is the overproduction of neurotoxic and pro-oxidative metabolites (quinolinic acid, 3-hydroxykynurenine) and a decrease in the level of neuroprotective compounds (kynurenic acid).

Therefore, the aim of this study was to explain the role of oxidative and nitrosative stress and disorders of the tryptophan catabolites pathway in the molecular basis of depression. In this work, an attempt was made to determine the role of single nucleotide polymorphisms, localized genes, encoding enzymes involved in oxidative (*SOD2*, *GPx4*, *CAT*) and nitrosative stresses (*NOS1*, *NOS2*) and the TRYCATs pathway (*TPH1*, *TPH2*, *IDO1*, *KATI*, *KATII*) on the incidence of depression. In addition, the impact of the chronic mild stress procedure on expression at mRNA and protein levels and the degree of methylation of gene promoter regions were assessed, enzymes involved in oxidative and nitrosative stress (*SOD1*, *SOD2*, *GPx1*,

GPx4, *CAT*, *NOS1*, *NOS2*) and the TRYCATs pathway (*Tph1*, *Tph2*, *Ido1*, *KatI*, *KatII*, *Kynu*, *Kmo*).

The material for the study consisted of genomic DNA samples isolated from peripheral blood collected from patients diagnosed with depression and from control people in whom the presence of this disease was excluded. Genomic DNA samples and TaqMan probes were used to analyse 6 polymorphisms located in genes involved in oxidative stress and in 10 in genes involved in the TRYCATs pathway. Polymerase chain reaction technique was used for genotyping polymorphisms with detection of a product-specific for one allele and/or the other allele in real-time (real-time PCR). The second type of research material were samples of genomic DNA, RNA isolated from blood and brain structures, and protein isolated from the brain structures of rats subjected to the procedure of chronic mild stress and venlafaxine therapy (Serotonin–norepinephrine reuptake inhibitors). The isolated DNA, RNA and protein were used respectively to analyse the degree of methylation of the promoter regions of the studied genes, expression at the level of mRNA and protein. To this end, respectively, the polymerase chain reaction technique with methylation-sensitive high resolution melting, real-time PCR detection and Western Blot were used.

The results obtained in the course of conducted studies in humans showed that the c.47T> C (p.Val16Ala) polymorphism of the *SOD2* gene, c.-89A> T of the *CAT* gene, c.660T> C of the *GPx4* gene, c.804-7C> A, c.-1668T> A, c.803 + 221C> A, c.-173A> T of the *TPHI* gene, c.-1449C> A, c.-844G> T (rs4570625) of the *TPH2* gene, c. * 456G> A of the *KATI* gene may affect the incidence of depression depending on the genotype. Furthermore, the c.975-7T> C polymorphism (rs1480544) located in the *KATII* gene may affect the effectiveness of treatment with drugs from the group of serotonin reuptake inhibitors.

Animal studies have shown that the level of expression and methylation of the promoter regions of all tested genes depends on tissue type and brain structure. The chronic mild stress procedure can modulate mRNA expression of *CAT*, *Gpx1*, *Gpx4*, *NOS1* genes only in brain tissue, while venlafaxine treatment altered the expression level of *SOD1*, *SOD2*, *NOS1* in both PBMCs and brain tissue. In addition, the degree of methylation of the promoter regions of the *Gpx1*, *Gpx4*, *SOD1*, *SOD2* genes changed due to stress stimuli in both brain tissue and PBMCs. In turn, expression at the protein level for *CAT* and *Gpx4* in brain tissue was modulated due to both stress stimuli and venlafaxine therapy. Due to the procedure of chronic mild stress and venlafaxine therapy, expression of the *Tph2*, *KatI* and *KatII* genes changed only in brain tissue. In addition, the chronic mild stress procedure changed the degree

of methylation of the *Ido1* promoter regions in brain tissue, while venlafaxine therapy with the *Kmo* gene in PBMCs cells. Venlafaxine treatment also changed the levels of Tph1 and Ido1 protein in brain tissue.

To sum up, the results obtained in the course of this doctoral thesis indicate the participation of oxidative and nitrative stress, as well as disorders in the course of the tryptophan catabolites pathway in the molecular mechanism of depression development.

Pauline Desper