

## Rola białka Mbd3 w procesie epileptogenezy

Karolina Nizińska-Smolińska

Promotor pracy: prof dr hab. Katarzyna Łukasiuk

Słowa kluczone: Mbd3, epileptogeneza, padaczka, napad drgawkowy, PTZ

### Streszczenie

Białko MBD3 (ang. *methyl CpG binding domain 3*) należy do rodziny białek MBD, odpowiedzialnych za odczytywanie wzoru metylacji DNA. Białka rodziny MBD wiążą domenę metylo-CpG, a także biorą udział w tworzeniu heterochromatyny. Co ciekawe, białko MBD3 nie ma zdolności do selektywnego rozpoznawania wysp metylo-CpG, jednakże jego charakterystyczną cechą jest zdolność wiązania do 5-hydroksymetylocytozyny i niemetylowanego DNA.

Badania przeprowadzone przez Bednarczyk i współpracowników (Bednarczyk i wsp. 2016) z zastosowaniem modelu padaczki skroniowej, wywołanej elektryczną stymulacją ciała migdałowatego, u szczura, wykazały wzrost poziomu białek kompleksu NuRD, w tym białka Mbd3 w mózgu zwierząt z padaczką. Zaobserwowano również większą liczbę regionów DNA, do których przyłącza się kompleks NuRD, zawierający białko Mbd3, u zwierząt stymulowanych, w porównaniu do grupy zwierząt kontrolnych.

Celem doświadczeń przeprowadzonych w niniejszej rozprawie było zbadanie, czy białko Mbd3 uczestniczy w procesach prowadzących do zmiany progu drgawkowego.

Zbadano wpływ drgawek wywołanych pentylenetetrazolem (PTZ) na poziom białka Mbd3 oraz ekspresję mRNA *Mbd3 in vivo*. Wykazano wzrost poziomu białka Mbd3 w korze śródwęchowej i ciele migdałowatym szczurów 4 godziny po wywołanej drgawce.

W dalszej części pracy oceniono wpływ obniżenia i podwyższenia poziomu białka Mbd3 na próg drgawkowy *in vivo*. W celu modyfikacji poziomu Mbd3 wykorzystano komercyjnie zaprojektowane wektory wirusowe AAV. Wykazano, że obniżenie poziomu Mbd3 wydłuża czas latencji do pojawienia się drgawki indukowanej iniekcją PTZ.

Przeprowadzone doświadczenia behawioralne wykazały, że obniżenie poziomu białka MBD3 zwiększa poziom lęku u zwierząt. Z kolei nadekspresja Mbd3 zmniejsza reakcje lękowe u zwierząt i nasila ich pobudliwość oraz zwiększa aktywność w teście otwartego pola.

Zbadano również wpływ obniżenia i podwyższenia poziomu białka Mbd3 na epileptogenezę w modelu rozniecania (ang. *kindling*) przy użyciu PTZ. Wykazano, że podwyższenie poziomu białka Mbd3 przyspiesza proces epileptogenezy i rozwój drgawek toniczno-klonicznych.

W celu identyfikacji roli białka Mbd3 w regulacji ekspresji genów przeprowadzono doświadczenia *in vitro*, z zastosowaniem modelu wyładowań epileptopodobnych wywołanych niedoborem magnezu. Wykazano, że nadekspresja Mbd3 *in vitro* wywołuje zmiany w ekspresji genów w sposób specyficzny dla czasu i stanu neuronów.

Dane otrzymane w wyniku realizacji tego projektu wskazują na udział białka Mbd3 w patologii padaczki.

## The role of Mbd3 in epileptogenesis

Karolina Nizińska-Smolińska

Supervisor: prof dr hab. Katarzyna Łukasiuk

Key words: Mbd3, epileptogenesis, epilepsy, seizure, PTZ

### Summary

MBD3 (methyl CpG binding domain 3) protein belongs to the MBD family of proteins, responsible for reading the DNA methylation pattern. MBD family proteins bind the methyl-CpG domain and are also involved in heterochromatin formation. Interestingly, MBD3 protein does not have the ability to selectively recognize methyl-CpG islands, however, its characteristic feature is the ability to bind to 5-hydroxymethylcytosine and unmethylated DNA.

A study by Bednarczyk and colleagues (Bednarczyk et al. 2016) using a rat model of temporal epilepsy induced by electrical stimulation of the amygdala showed an increase in NuRD complex proteins, including Mbd3 protein, in the brain of epileptic animals. A greater number of regions of DNA to which the NuRD complex, containing the Mbd3 protein, attaches was also observed in stimulated animals, compared to a group of control animals.

The aim of the experiments conducted in this dissertation was to investigate whether the Mbd3 protein participates in the processes leading to changes in the seizure threshold.

The effects of pentylenetetrazole (PTZ)-induced convulsions on Mbd3 protein levels and *Mbd3* mRNA expression *in vivo* were investigated. An increase in Mbd3 protein levels was demonstrated in the entorhinal cortex and amygdala of rats 4 hours after the induced convulsion.

The effects of decreasing and increasing Mbd3 protein levels on seizure threshold *in vivo* were further evaluated. Commercially designed AAV viral vectors were used to modify Mbd3 levels. It was shown that lowering the level of Mbd3 prolongs the latency time to the onset of a convulsion induced by PTZ injection.

Behavioral experiments have shown that downregulation of MBD3 protein increases anxiety in animals. In contrast, overexpression of Mbd3 decreases anxiety responses in animals and increases their excitability and activity in the open field test.

The effects of decreasing and increasing Mbd3 protein levels on epileptogenesis were also investigated in a kindling model using PTZ. Elevation of Mbd3 protein levels was shown to accelerate epileptogenesis and the development of tonic-clonic seizures.

In order to identify the role of Mbd3 protein in the regulation of gene expression, in vitro experiments were conducted using a model of magnesium deficiency-induced epileptic-like discharges. Overexpression of Mbd3 in vitro was shown to induce changes in gene expression in a time- and state-specific manner in neurons.

The data obtained from this project indicate the involvement of the Mbd3 protein in epilepsy pathology.