CZYNNIK TRANSKRYPCYJNY MeCP2 – KRYTYCZNY REGULATOR EPIGENETYCZNY W MÓZGU

TRANSCRIPTION FACTOR MeCP2 – A CRITICAL EPIGENETIC REGULATOR IN THE BRAIN

Katarzyna SZMYT[1], Maciej SUPERSON[1],
Patrycja PAŃCZYSZYN-TRZEWIK[2],
Ruslan ZAVATSKYI[2], Magdalena SOWA-KUĆMA[2]

[1]Studenckie Koło Naukowe Fizjologii „Neuron", Kolegium Nauk Medycznych, Uniwersytet Rzeszowski
[2]Zakład Fizjologii Człowieka, Kolegium Nauk Medycznych, Uniwersytet Rzeszowski

Streszczenie: MeCP2 to białko powszechnie występujące w różnych tkankach ludzkiego organizmu, którego najwyższy poziom odnotowuje się w mózgu. Ze względu na jego zdolność do wiązania się zarówno z metylowanym DNA jak i do kompleksów modyfikujących chromatynę, MeCP2 może zarówno odczytywać wzory modyfikacji epigenetycznych jak i brać udział w powstawaniu nowych. Najwyższą ekspresję osiąga w dojrzałych neuronach i pozostaje wysoka przez całe życie, co podkreśla jego ważną funkcję w dorosłym mózgu. Konsekwencją niedoborów tego białka są nieprawidłowości w rozwoju aksonów i dendrytów, a także neurotoksyczność. Mutacje *MECP2* mogą manifestować się w postaci występowania wielu zaburzeń (w większości choroby o podłożu neurobiologicznym), jak np. zespół Retta, czy ciężka encefalopatia noworodkowa. Poza tym, MeCP2 może odgrywać ważną rolę w rozwoju uzależnień oraz zaburzeń depresyjnych, a także nowotworów.

Słowa kluczowe: MeCP2, regulacja epigenetyczna, czynnik transkrypcyjny, choroby neurologiczne, rozwój mózgu

Summary: MeCP2 protein is distributed in various tissues of the human body, with the highest level recorded in the brain. MeCP2 can act as a transcription factor capable of either activating or repressing transcription. It can bind to both methylated DNA and chromatin-modifying complexes. *MECP2* expression increase during development and remain high throughout life which underlines its important function in the adult brain. It is know, that MeCP2 is responsible for the proper

maturation of neuron cells, synaptogenesis and general development of the nervous system. The consequence of its deficiencies are abnormalities in the development of axons and dendrites, as well as neurotoxicity. Mutations in the *MECP2* gene can result in many disorders. Most of them are neurobiological diseases, such as Rett syndrome or neonatal encephalopathy. In addition, MeCP2 may play an important role in the pathomechanisms of addiction and depressive disorders as well as cancer.

Keywords: MeCP2, epigenetic regulation, transcription factor, neurobiological disease, brain development

WPROWADZENIE

W ciągu ostatnich lat zainteresowanie epigenetyką znacznie wzrosło, a termin ten coraz częściej pojawia się nie tylko w kontekście badań molekularnych, ale również i tych z zakresu fizjologii, czy nawet ekologii. Został on zaproponowany w 1942 r. przez Waddingtona i definiuje dziedzinę nauki zajmującą się badaniem zmian zachodzących w ekspresji/funkcji genów, które nie wynikają bezpośrednio ze zmian sekwencji nukleotydów (mutacji) w DNA [14]. Pod wpływem działania różnych czynników zewnętrznych (np. stres, dieta, styl życia) dochodzi do licznych modyfikacji DNA oraz białek histonowych prowadzących do zmian w strukturze chromatyny. Konsekwencją tego jest zmiana dostępności promotorów genów dla czynników transkrypcyjnych i białek enzymatycznych, co prowadzi do modyfikacji procesów transkrypcji DNA na RNA, a tym samym zmian ekspresji określonych genów. Co ciekawe zmiany epigenomu mogą być dziedziczone międzypokoleniowo i coraz częściej łączone są z patogenezą wielu chorób, w tym nowotworów i zaburzeń o podłożu neurobiologicznym [47].

Do najważniejszych mechanizmów epigenetycznych zaliczamy: metylację/demetylację DNA, biochemiczne modyfikacje (w tym acetylacja/deacetylacja, fosforylacja/defosforylacja, metylacja/demetylacja, sumoilacja) białek chromatyny, oraz oddziaływanie małych niekodujących (mikro) RNA Wśród najczęściej badanych, szczególnie w kontekście patomechanizmów chorób, są zmiany profilu metylacji DNA oraz acetylacji i metylacji białek histonowych [9, 10].

Proces metylacji DNA katalizowany jest przez enzymy z rodziny DNA metylotransferaz (ang. *DNA methyltransferases*, DNMTs), które są odpowiedzialne za przyłączanie grupy metylowej (-CH_3) do piątego węgla cytozyny (powstaje 5-metylocytozyna, 5mC) w miejscach określanych jako wyspy CpG (regiony w genomie o podwyższonej zawartości dinukleotydów CpG). Procesem przeciwnym do metylacji jest reakcja demetylacji katalizowana przez DNA demetylazy takie jak: glikozydaza tyminy (ang. *Thymine-DNA glycosylase,* TDG), deaminaza cytozyny (*ang. cytosine deaminase,* AID) czy białka TET (ang. *Ten-eleven Translocation*)

[54]. Jak wskazują liczne badania, metylacja DNA odgrywa istotną rolę w rozwoju i przebiegu chorób nowotworowych (np. nowotwory piersi, płuc, prostaty, okrężnicy czy białaczki) [9], chorób psychicznych (np. schizofrenia) [40], neurodegenaracyjnych [18, 43] oraz w procesach starzenia się ludzkiego organizmu [26].

Kolejną ważną grupę zmian epigenetycznych stanowią modyfikacje histonów. Histony to grupa białek zasadowych tworzących rdzenie, na które nawinięta jest nić DNA, formując strukturę chromatyny. Wyróżnia się 5 typów histonów: H1, H2A, H2B, H3 i H4. Trzy pierwsze są szczególnie bogate w aminokwas lizynę, zaś dwa kolejne, najbardziej konserwatywne, w argininę. Końce białek (tzw. ogony histonowe) ulegają licznym modyfikacjom potranslacyjnych polegających najczęściej na przyłączaniu niewielkich grup metylowych, bądź acetylowych [6]. Reakcje acetylacji/deacetylacji możliwe są dzięki zaangażowaniu enzymów, odpowiednio acetylotransferaz histonów (ang. *histone acetyltransferase*, HAT) i deacetylaz histonów (ang. *histone deacetylase*, HDAC 1-11 podzielone na trzy klasy) [38]. Metylacja białek histonowych jest z reguły procesem bardziej złożonym, polegającym na dołączaniu jednej, dwu lub trzech grup metylowych (odpowiednio: mono-, di- lub trimetylacja) do aminokwasu lizyny przy aktywności metylotransferaz histonów. Zasadniczo konsekwencją acetylacji histonów jest aktywacja ekspresji genów, zaś deacetylacja wiąże się z jej zahamowaniem. Metylacja histonów, w zależności od ilości przyłączonych grup metylowych i miejsca ich przyłączenia, może wywierać efekt aktywujący lub hamujący [6].

Uważa się, że modyfikacje epigenetyczne białek wpływają na strukturę chromatyny w dwojaki sposób. Po pierwsze zmieniają (nasilają lub osłabiają) oddziaływanie histon-histon bądź histon-DNA, przez co w istotny sposób modulują stopień kondensacji chromatyny. Rozluźnienie chromatyny ułatwia przyłączenie się polimerazy RNA oraz czynników transkrypcyjnych do promotora genów i aktywację procesu transkrypcji. Przeciwnie jej kompresja prowadzi do zahamowania ekspresji genów. Drugi mechanizm działania modyfikacji związany jest z ich aktywującym lub hamującym wpływem na wiązanie białek regulujących strukturę chromatyny. Białka te odczytują znaczenie danego wzoru modyfikacji i powodują dalsze modyfikacje chromatyny – samodzielnie lub poprzez rekrutację innych czynników [18]. Przykładem może być czynnik MeCP2 (ang. *Methyl-CpG binding protein 2*), który jest wielofunkcyjnym białkiem zaangażowanym w regulację licznych procesów zachodzących w jądrze komórkowym. Ze względu na fakt, że MeCP2 może aktywnie wiązać 5mC w DNA, początkowo przypisano mu rolę represyjną. Niedawno wykazano, że białko może również oddziaływać z 5-hydroksymetylowanymi cytozynami (5hmC) w regionach wydłużania aktywnych transkrypcyjnie genów oraz uczestniczy w rekrutacji zarówno korepresorów jak i koaktywatorów transkrypcji. W związku z tym MeCP2 postrzegany jest obecnie jako (pozytywny lub negatywny) regulator transkrypcji genów [41].

ZNACZENIE MeCP2 W ROZWOJU I FUNKCJONOWANIU MÓZGU

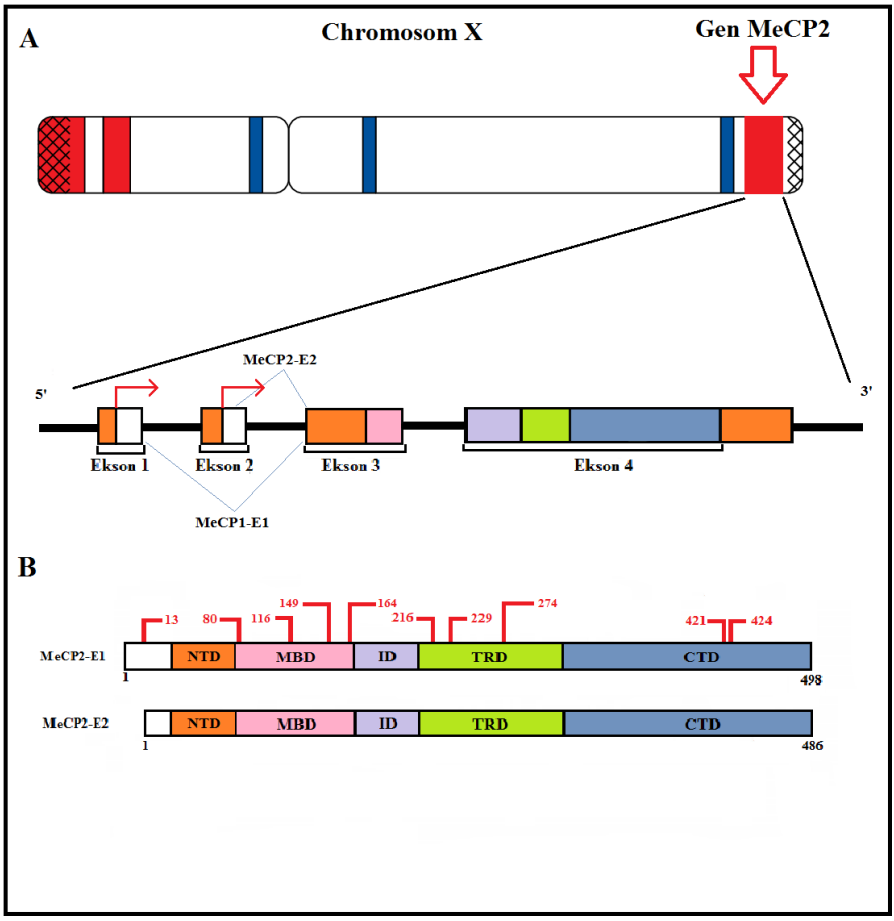
OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA MeCP2

Białko MeCP2 występuje powszechnie w różnych tkankach ludzkiego organizmu, jednakże nie z taką samą intensywnością. W płucach, śledzionie, a przede wszystkim w mózgu (głównie w neuronach, w mniejszym stopniu w komórkach glejowych) obserwuje się jego najwyższą ekspresję. Z drugiej strony w wątrobie, sercu, nerkach, czy jelicie cienkim notuje się niższe niż średnia, poziomy białka MeCP2 [23, 11, 44]. We wczesnych stadiach rozwoju zarodkowego u myszy poziom MeCP2 jest niski, wzrasta natomiast w późniejszych jego etapach. Najwyższą ekspresję osiąga w dojrzałych neuronach i pozostaje wysoki przez całe dorosłe życie, co podkreśla jego ważną funkcję w dorosłym mózgu. U ludzi widoczny wzrost ekspresji MeCP2 następuje od połowy ciąży i stopniowo zwiększa się aż do 10 roku życia. Wiadomo, że ten czynnik transkrypcyjny odgrywa kluczową rolę w dojrzewaniu i różnicowaniu neuronów, synaptogenezie i rozwoju układu nerwowego [23]. Brak lub obniżenie aktywności MeCP2 skutkuje nieprawidłowym rozwojem dendrytów i aksonów (w konsekwencji zaburzeniami w rozwoju mózgowia) oraz nasileniem procesów neurotoksyczności wynikających z nadmiernego uwalniania kwasu glutaminowego [31].

MeCP2 to prawdopodobnie jedno z najlepiej oraz najdokładniej opisanych białek jądrowych należących do rodziny MBD (zawierają specyficzne domeny wiążące grupy metylowe; ang. *methyl-CpG-binding domain*, MBD). W ludzkim organizmie kodowane jest przez składający się z około 76 tysięcy par zasad (kpz) gen *MECP2,* który zlokalizowany jest przy końcu długiego ramienia chromosomu X w regionie q28. Zbudowany jest z czterech eksonów (kodujące części genów) oraz trzech intronów (niekodujące części genów) (Ryc. 1A). Gen *MECP2* jest regulowany negatywnie przez wiązanie niehistonowych białek chromosomalnych HMGN (ang. *High Mobility Group Nucleosome*) oraz pozytywnie przez czynnik wzmacniający 2C miocytów (ang. *Myocyte-specific Enhancer Factor* 2C, MEF2C). Istotną rolę w regulacji ekspresji genu odgrywają również mikroRNA, takie jak miR-132, rmiR-7b, miR-483-5p, miR-155/miR-802 oraz miR-181 [3].

U myszy i ludzi alternatywne składanie genu *mecp2/MECP2* prowadzi do wytworzenia dwóch izoform białkowych (MeCP2E1 – 498 aminokwasów i MeCP2E2 – 468 aminokwasów) [2, 49]. Obydwie izoformy różnią się przede wszystkim okresem półtrwania (E1 – 4 godziny, E2 – 100 godzin). Izoforma E1 to główna forma MeCP2 i ta, która jest silniej ekspresjonowana (ok. 90% całkowitego MeCP2) w mózgu [3], stąd będzie ona przedmiotem dalszych rozważań.

Białko MeCP2, którego łączna masa wynosi ok. 53 kDa, utworzone jest przez 5 ułożonych kolejno charakterystycznych części: domena N-końcowa (ang. *N-terminal domain*, NTD), domena odpowiadająca za wiązanie metylowanego DNA



RYCINA 1. A. Lokalizacja genu MeCP2 na chromosomie X, oraz jego organizacja z zaznaczeniem miejsc rozpoczęcia transkrypcji izoformy E1 oraz E2 białka MeCP2 (czerwone strzałki), **B.** Schematyczna organizacja budowy białka MeCP2 z uwzględnieniem jego 5 domen oraz poglądowym oznaczeniem miejsc potranslacyjnej fosforylacji (czerwone kreski wraz z numerami oznaczającymi numer modyfikowanego aminokwasu). Opracowano na podstawie [3]

FIGURE 1. A. Localization of the MeCP2 gene on the X chromosome, and its organization with marking of transcription start points for the E1 and E2 isoforms (red arrows), **B.** Schematic organization of the MeCP2 protein structure, including its 5 domains and an illustrative designation of post-translational phosphorylation sites (red lines with numbers denoting the number of the modified aminoacids). Based on [3]

(ang *Methyl-CpG-binding domain*, MBD), domena pośrednia (ID) stabilizująca MBD, domena odpowiadająca za represję transkrypcji DNA (ang. *transcriptional repression domain*, TRD) oraz domena C-końcowa (ang. *carboxy terminal domain,* CTD) [35] (Ryc. 1B). Spośród wymienionych, dwie domeny – MBD oraz TRD

związane są z represją transkrypcji, która odbywa się poprzez interakcje z metylowanym DNA, pozostałe zaś biorą udział w innych oddziaływaniach MeCP2 [2].

Analiza budowy przestrzenną białka pozwala stwierdzić, że składa się ono w: 4% z α-helis, 21% z β-harmonijek, a w 13% z β-zakrętów. Co bardzo interesujące, aż 60% białka MeCP2 nie tworzy żadnych struktur, które można by jasno przyporządkować do którejś konkretnej grupy [1]. Stwierdzono również, że jedynie domena MBD wykazuje obecność zdefiniowanych, wyraźnych struktur III-rzędowych. Pozostałe fragmenty MeCP2 są natomiast jednym z najlepszych przykładów wewnętrznie nieuporządkowanego białka [2].

AKTYWACJA MeCP2

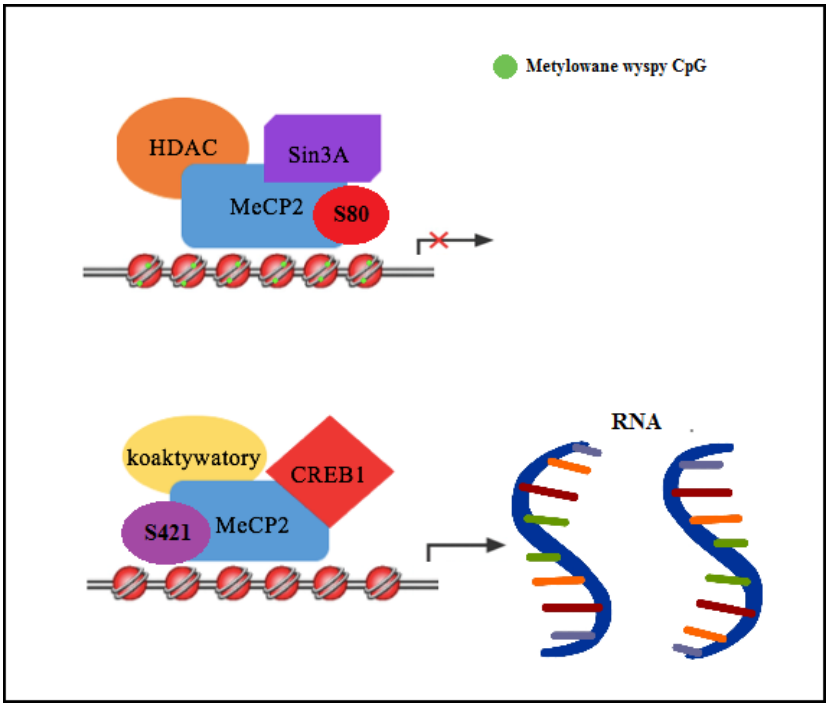
Jak większość białek pełniących istotne funkcje w organizmie żywym, tak i białko MeCP2 podlega ścisłej regulacji, której zadaniem jest dostosowanie jego aktywności do obecnych potrzeb ustroju. Aktywacja oraz inaktywacja białek zachodzi na drodze licznych modyfikacji potranslacyjnych, które często tworzą wielopoziomowe sprzężone łańcuchy wspólnych korelacji i dzięki temu umożliwiają zachowanie równowagi ustroju [5].

W neuronach niepobudzonych MeCP2 reguluje ekspresję genów poprzez wiązanie się z dinukleotydami CpG w promotorach różnych genów, gdzie jest również związany z innymi represorami takimi jak: deacetylaza histonów (np. HDAC1, HDAC2) i metylotransferaza histonów oraz ko-represor Sin3a (znaczenie domeny TRD) (Ryc. 2). W rezultacie dochodzi do kondensacji chromatyny i zablokowania dostępu dla maszynerii transkrypcyjnej. Aktywacja neuronu indukuje zmiany w cząsteczce MeCP2, co prowadzi do jej uwolnienia z regionu promotora i dysocjacji kompleksu korepresora. Dochodzi do hiperacetylacji chromatyny, która umożliwia transkrypcję właściwych genów [15].

Mechanizm regulacji aktywności białka MeCP2 opiera się zasadniczo na 6 procesach chemicznych, do których zalicza się: fosforylację, acetylację, acylację, metylację, ubikwintynację oraz sumoilację. Obecnie wiedza na temat możliwych modyfikacji potranslacyjnych białka MeCP2 jest bardzo obszerna, stąd w tym artykule autorzy skupią się wyłącznie na zjawisku fosforylacji, które jest kluczowe dla prawidłowej regulacji epigenetycznej w mózgu.

Główne miejsca fosforylacji MeCP2 znajdują się na aminokwasie seryna w pozycjach: 13, 80, 116, 149, 164, 216, 229, 274, 421 a także 424 łańcucha polipeptydowego i dotyczą różnych domen (Ryc. 1B), przy czym z, punktu widzenia prawidłowego rozwoju oraz funkcjonowania mózgu najważniejsze wydaje się dodanie grupy fosforanowej w pozycjach S80 oraz S421 [13].

W neuronach niepobudzonych MeCP2 jest ściśle związany z trzecim promotorem genu kodującego czynnik transkrypcyjny pochodzenia mózgowego (ang. *brain-derived nurotrophic factor,* BDNF), czyli białko kluczowe dla prawidłowego rozwoju i funkcjonowania mózgu, w tym procesu synatogenezy. Aktywacja



RYCINA 2. MeCP2 jako pozytywny lub negatywny regulator transkrypcji genów.
W represji transkrypcyjnej (u góry) MeCP2 wiąże metylowane wyspy CpG, rekrutuje deacetylazy histonowe i korepresory (np. Sin3A) indukując wyciszenie genów. Podczas aktywacji (u dołu) MeCP2, wiąże niemetylowane promotory, rekrutuje CREB1 i koaktywatory. Opracowano na podstawie [15]
FIGURE 2. MeCP2 as a positive or negative gene transcription regulator.
In transcriptional repression (top), MeCP2 binds methylated CpG islands, recruits histone deacetylases and co-repressors (e.g. Sin3A) inducing gene silencing. During transcriptional activation (bottom), MeCP2 binds unmethylated promoters, recruits CREB1 and co-activators. Based on [15]

neuronów wiąże się z depolaryzacją błony komórkowej i napływem jonów wapnia do komórki, co skutkuje fosforylacją MeCP2 S421 w mechanizmie zależnym od kinazy zależnej od jonów wapnia i kalmoduliny II/IV (ang. *Ca2+/calmodulin--dependent protein kinase II/IV*, CaMKII/IV). Kolejno dochodzi do uwolnienia MeCP2 z promotora genu BDNF, dzięki czemu możliwa jest transkrypcja i synteza tego białka. Wskazuje się, że fosforylacja w pozycji S421 jest kluczowa dla prawidłowego rozwoju i funkcji synapsy. Dodatkowo odgrywa istotną rolę w regulowaniu procesów uczenia się i pamięci oraz procesu zwanego skalowaniem synaptycznym, czyli sytuacji w której synapsy w ośrodkowym układzie nerwowym same regulują swoją aktywność i stan pobudzenia proporcjonalnie do stymulacji, którą otrzymują od sąsiadujących neuronów dzięki istnieniu pętli ujemnych

sprzężeń zwrotnych [12]. Wyniki badań przeprowadzonych na myszach wskazują, że mutacja białka MeCP2 w miejscu S421 uniemożliwiająca jego fosforylację może negatywnie wpływać na przetwarzanie nowych doświadczeń [13].

Pod wpływem depolaryzacji neuronu dochodzi również do defosforylacji MeCP2 w pozycji S80, co umożliwia dysocjację białka od chromatyny. Z kolei jego ponowna fosforylacja przez kinazę białkową 2 oddziałującą z homeodomeną (ang. *Homeodomain-interacting protein kinase 2*, HIPK2) przyczynia się do indukcji apoptozy. Z przeprowadzonych badań z wykorzystaniem myszy genetycznie modyfikowanych wynika, że powstanie mutacji w pozycji 80 może prowadzić do zaburzeń lokomotoryki [13, 50].

Prócz zaprezentowanej przeciwstawnej regulacji MeCP2 przez aktywność neuronów, która sugeruje, że fosforylacja S421 odgrywa większą rolę w aktywnych neuronach, zaś S80 ma większe znaczenie w neuronach spoczynkowych, niedawno zidentyfikowano kolejną modyfikację, tym razem dotyczącą treoniny w pozycji 308. Pod wpływem depolaryzacji neuronów dochodzi do fosforylacji w domenie TRD MeCP2, czego konsekwencją jest blokada interakcji białka z kompleksem ko-represorowym receptora jądrowego (ang. *nuclear receptor co--repressor*, NCoR), co skutkuje aktywacją transkrypcji m.in. genu kodującego czynnik transkrypcyjny Npas4 (ang. *Neuronal PAS Domain Protein*, czynnik który promuje rozwój synaps hamujących na neuronach pobudzających) i związaną z tym aktywację transkrypcji BDNF [3]. Istotnym elementem kontroli poziomu i aktywności białka MeCP2 jest oddziaływanie transkryptu genu z mikroRNA (zwłaszcza miR132/212) oraz wzajemna relacja pomiędzy MeCP2 a czynnikiem transkrypcyjnym CREB (ang. *cAMP response element-binding protein*) [4]. Biosynteza obydwu białek jest bowiem wzajemnie zależna. Mysie białko MeCP2 indukuje aktywność genu *creb*, natomiast nadmiar białka CREB hamuje biosyntezę MeCP2 [8].

ZNACZENIE MeCP2 W PATOMECHANIZMIE CHORÓB

MeCP2 to kluczowy czynnik zaangażowany w prawidłowy rozwój mózgu, w związku z tym zaburzenia jego funkcji, będące najczęściej wynikiem zmian ekspresji (utrata ekspresji lub nadekspresja) kodującego go genu, mogą prowadzić do bardzo poważnych konsekwencji, wśród których dominują choroby o podłożu neurobiologicznym. Spośród opisywanych w literaturze, zespół Retta wydaje się być najważniejszym ze schorzeń bezpośrednio związanym z mutacjami występującymi w genie *MECP2.* Do innych możemy zaliczyć np. ciężką encefalopatię noworodkową, zaburzenia ze spektrum autyzmu (ang. *autism spectrum disorder,* ASD) oraz upośledzenia umysłowe sprzężone z chromosomem X (ang. *X-linked mental retardation, XLMR*) [32, 33, 52]. Prócz tego, MeCP2 może odgrywać ważną rolę w rozwoju uzależnień oraz zaburzeń depresyjnych [3].

***Zespół Retta* (*ang. Rett syndrome*, *Rett's disorder*, *RTT*)**

Zespół zaburzeń neurorozwojowych, którego nazwa pochodzi od nazwiska austriackiego pediatry Andreasa Retta, który po raz pierwszy opisał je w 1965 r., a następnie uczestniczył w pracach nad opracowaniem kryteriów diagnostycznych schorzenia [24].

RTT charakteryzuje się stosunkowo normalnym rozwojem przez pierwsze 6 do 18 miesięcy życia, po czym następuje stopniowa utrata wyuczonych umiejętności, która prowadzi do ciężkiej niepełnosprawność intelektualnej oraz utraty mowy. Osoby z RTT cierpią z powodu ataksji, czyli zaburzeń koordynacji ruchowej, niekontrolowanych ruchów rąk, problemów z oddychaniem, lęków i niepokojów (częsty płacz), czy napadów padaczkowych [22].

Przez długi okres czasu nie znane były przyczyny rozwoju RTT. Wiadomo było jednak, że pojawia się głównie u dziewczynek (częstotliwość ok. 1:10.000 żywych urodzeń), co pozwalało przypuszczać, iż jego występowanie może mieć związek z chromosomem X. W 1999 r. opisano pierwszą mutację genu związanego z zespołem Retta, która dotyczyła *MECP2*. Jak się okazuje zmiany w sekwencji DNA tego genu są z reguły niewielkie i mogą dotyczyć różnych miejsc. Zachodzą one najczęściej *de novo* (rodzinne występowanie RTT bardzo rzadkie) i występują u ponad 95% pacjentów z typową i u ok. 40% osób z atypową postacią Zespołu Retta [51]. Co warto podkreślić, prace mające na celu wyjaśnienie roli MeCP2 w patofizjologii RTT przyczyniły się do znacznego rozwoju wiedzy na temat struktury i natury tego białka. Aktualnie znanych jest blisko 300 mutacji w genie kodującym białko MeCP2, które mogą mieć związek z występowaniem RTT. W tym, ponad 60% stanowią mutacje punktowe polegające na zamianie nukleotydu C na T w obrębie 8 dinukleotydów CpG, szczególnie zlokalizowanych w trzecim i czwartym eksonie genu [48]. Prócz tego stwierdza się delecje (utrata części genu), rzadziej insercje (wstawienie dodatkowych nukleotydów) lub duplikacje (zwielokrotnienie sekwencji nukleotydów) [22]. U pacjentów z nietypowym przebiegiem RTT zidentyfikowano również mutacje innych genów, w tym cyklinozależnej kinazy 5 (CDKL5), Netryny G1, czy FOXG1 [17, 20].

Znaczenia mutacji genu *MECP2* oraz powstającego na jego matrycy białka upatruje się przede wszystkim w kontekście zaburzonej ekspresji genów, w których transkrypcję jest zaangażowane. Do chwili obecnej opisano kilka genów regulowanych przez MeCP2, jednakże szczególnego znaczenia nadaje się regulacji ekspresji *A2BP1* (ang. *ataxin 2-binding protein 1*), *GAMT* (ang. *guanidinoacetate N-methyltransferase*) i przede wszystkim *BDNF*. Nieprawidłowe funkcjonowanie dwóch pierwszych genów determinuje występowanie poważnych zaburzeń intelektualnych, rozwoju mowy, czy padaczki, co wydaje się bezpośrednio wiązać z RTT [22]. Szczególną rolę przypisuje się możliwości regulacji ekspresji BDNF, czyli kluczowego czynnika neurotroficznego występującego w mózgu odpowie-

dzialnego przede wszystkim za prawidłowe kształtowanie się połączeń nerwowych [30]. U pacjentek z zespołem Retta obserwuje się również zmniejszoną ekspresję genu *GABR3* kodującego podjednostkę β3 receptora $GABA_A$ (receptor głównego neuroprzekaźnika hamującego w mózgu – kw. γ-aminomasłowego, GABA). Z drugiej strony obserwuje się nadmierne uwalnianie glutaminianu przez komórki mikrogleju, prawdopodobnie na skutek nasilonej aktywacji transporterów aminokwasów pobudzających EAAT 1 i 2 (ang. *Na^+-dependent glutamate transporters 1, 2*) oraz wzrost poziomu receptora AMPA (receptor jonotropowy dla głównego aminokwasu pobudzającego w mózgu – kw. glutaminowego) [45]. Wszystko to w konsekwencji może prowadzić do zaburzenia równowagi pomiędzy GABA i kw. glutaminowym prowadzącej do nadmiernego pobudzenia w mózgu. W efekcie dochodzi do obserwowanego w przebiegu RTT, nasilenia procesów oksydacyjnych w komórce (produkcja wolnych rodników tlenowych) prowadzących do oksydacyjnych uszkodzeń lipidów i białek. Co istotne, aktywacja powyższych procesów może skutkować również obniżoną syntezą BDNF w mózgu [34].

Pomimo intensywnych badań, etiologia zespołu Retta wciąż jest zbyt słabo poznana, co znajduje odbicie w braku skutecznych terapii. Obecnie stosowane leczenie objawowe nacelowane jest na łagodzenie skutków, a nie zlikwidowanie przyczyny choroby. Najatrakcyjniejszą strategią terapeutyczną wydaje się być przywrócenie prawidłowej ekspresji *MECP2* poprzez wstawienie dodatkowych kopii genu, jednak podejmowane próby kończą się z reguły niepowodzeniem. Wynika to z faktu, że tak jak niedobory białka MeCP2 niosą ze sobą poważne konsekwencje, podobnie jego nadmiar (obserwowany np. w zespole duplikacji MeCP2, ang. *MECP2 duplication syndrome*) powoduje zaburzenia charakteryzujące się dysfunkcją neurologiczną, niepełnosprawnością intelektualną i niektórymi cechami podobnymi do RTT. U myszy nadekspresja MECP2 powoduje hipoaktywność i drgawki [51].

Uzależnienia

Uzależnienie jest zaburzeniem psychicznym, które charakteryzuje się kompulsywnym (nawracającym) szukaniem i przyjmowaniem narkotyku lub innej substancji uzależniającej, pomimo poważnych konsekwencji, jakie niesie za sobą ich przyjmowanie [25]. Długa ekspozycja na substancje uzależniające zmienia wzór ekspresji genów w mózgu, co uważa się za podstawę występowania w/w objawów psychopatologicznych. Wykazano, że indukowane narkotykami długotrwałe neuroadaptacje powstałe w mózgu są częściowo zależne od mechanizmów epigenetycznych, w tym aktywności MeCP2. Na przykład przedłużone, nieograniczone, samopodawanie kokainy zwiększa ekspresję MeCP2 w wielu obszarach mózgu, podczas gdy indukowane lentiwirusem obniżenie ekspresji MeCP2 w prążkowiu (struktura mózgowa) skutkowało ograniczeniem spożycia kokainy, co sugeruje udział tego białka w niekontrolowanym przyjmowaniu narkotyków [7, 29]. Indu-

kowana kokainą ekspresja MeCP2 może wpływać na powstające po ekspozycji na narkotyk adaptacje komórkowe za pomocą różnych mechanizmów. Wielokrotne podania kokainy prowadzą do hipermetylacji promotora genu CDKL5 (ang. *cyclin dependent kinase like 5*), przez co obserwuje się zwiększone wiązanie MeCP2 i osłabienie ekspresji genu skutkujące zmianami plastycznymi w jądrze półleżącym w mózgu [16]. Z drugiej strony kokaina powoduje represję transkrypcji poprzez aktywację miR-212 i miR-132 [13]. Co istotne, jednorazowe podania kokainy oraz amfetaminy powodowały wzrost fosforylacji MeCP2 S421 w prążkowiu [16]. Wnikliwa analiza wykazała, że MeCP2 jest fosforylowany wyłącznie w małej populacji szybko rosnących interneuronów GABA-ergicznych. Zaobserwowano również wzajemną korelację między poziomami ekspresji MeCP2 w sytuacji spożywania kokainy, a zmianami acetylacji białek histonowych [6, 42]. Przy powtarzającej się ekspozycji na kokainę zauważono zmniejszający się poziom acetylacji histonów w neuronach GABA-ergicznych. Prócz tego obserwowano inne zmiany w poszczególnych histonach, które były uwarunkowane okresem podawania (podania jednorazowe lub długotrwałe) kokainy. Na przykład, po 10-dniowym, 2-godzinnym podawaniu kokainy poziom MeCP2 zwiększył się, co pozytywnie korelowało z poziomem BDNF w hipokampie i prążkowiu [37].

Zaburzenia nastroju

W społeczeństwach wysokorozwiniętych zaburzenia nastroju stanowią wiodącą przyczyną niesprawności i niezdolności do pracy. Do najważniejszych zaliczamy depresję, która obecnie jest najczęściej diagnozowanym zaburzeniem psychicznym [21]. Pomimo kilkudziesięciu lat badań mających na celu wyjaśnienie patomechanizmu depresji, nasza wiedza na ten temat jest w dalszym ciągu niewystarczająca, co przekłada się na brak laboratoryjnych markerów diagnostycznych oraz niską skuteczność dostępnych form farmakoterapii. Nowe kierunki badań nad zaburzeniami depresyjnymi wskazują, że istotną rolę w etiopatogenezie depresji mogą odgrywać mechanizmy epigenetyczne (włącznie z MeCP2), indukowane przez działanie różnych czynników środowiskowych (np. stres) [10].

W kontroli zachowania i emocji kluczową rolę odgrywa serotonina i związana z nią transmisja serotoninergiczna w mózgu. Pacjentom z zespołem Retta bardzo często towarzyszy występowanie zachowań agresywnych i lękowych oraz zmiennych stanów emocjonalnych, którym towarzyszą zmiany aktywności neuronów aminergicznych i obniżone poziomy serotoniny. U myszy pozbawionych genu MeCP2 (ang. *mecp2 knock-out*) obserwowano obniżone poziomy zarówno serotoniny jak i dopaminy w mózgu [13]. W kontekście zaburzeń depresyjnych, dyskutuje się przede wszystkim znaczenie fosforylacji MeCP2 S421.

W 2012 r. zostały opublikowane dwie prace amerykańskiego zespołu, które przypisują kluczową rolę fosforylacji czynnika MeCP2 w przeciwdepresyjnym działaniu citalopramu (leku z grupy selektywnych inhibitorów wychwytu zwrot-

nego serotoniny, SSRI) oraz imipraminy (z grupy trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych, TLPD). Badania behawioralne przeprowadzone na myszach szczepu dzikiego oraz z genetycznym knock-in (KI; zamiana seryny w pozycji 421 na alaninę, która uniemożliwia fosforylację p-S421-MeCP2; MeCP2S421A), wykazały zwiększoną wrażliwość myszy z mutacją na działanie środowiskowych czynników stresogennych i brak odpowiedzi na długotrwałe podania imipraminy po przewlekłym stresie socjalnym. Ponadto wykazano wzrost poziomu p-S-421-MeCP2 w mózgu po chronicznych podaniach imipraminy u myszy typu dzikiego, poddanych procedurze przewlekłego stresu socjalnego. Podobne zmiany w lokalizacji ufosforylowanej formy białka MeCP2 odnotowano również w jądrze półleżącym po podaniach citalopramu. Wyniki tych badań wskazują, że fosforylacja MeCP2 jest niezbędna do adaptacji behawioralnej indukowanej antydepresantem, ponieważ myszy z mutacją MeCP2S421A nie zareagowały na przewlekłe leczenie przeciwdepresyjne [27, 28].

Inne schorzenia

W kontekście zaburzeń związanych z regulacją MeCP2 obecnie najczęściej badane są zaburzenia o podłożu neurobiologicznym. Białko to jednak ze względu na swą lokalizację, może odgrywać również istotną rolę w patomechanizmie innych zaburzeń. Wykazano między innymi związek pomiędzy MeCP2, a chorobami nowotworowymi. W procesach nowotworowych, takich jak rak płuc, wątroby, piersi czy jelita grubego, funkcja MeCP2 jest związana z regulacją epigenetyczną genów związanych z rakiem, w szczególności z mechanizmami obejmującymi hipermetylację promotorów tych genów [39]. W raku żołądka wykazano, że głębokość nacieku miejscowego jest związana z poziomem białka MeCP2, który podlega ścisłej regulacji przez miR-212 [53]. W przypadku raka prostaty, który jest najczęstszym rakiem występującym u mężczyzn, MeCP2 kontroluje różnicowanie się komórek oraz ich apoptozę [46]. Ponadto MeCP2 wiąże się także z innymi nowotworami, takimi jak szpiczak, nowotwory krwi czy rak szyjki macicy [19].

PODSUMOWANIE

Białko MeCP2 to jeden z najważniejszych czynników transkrypcyjnych w organizmie człowieka (w szczególności w mózgu), który ze względu na możliwość wszechstronnego oddziaływania na epigenom komórki, określane jest mianem krytycznego regulatora epigenetycznego. Prócz możliwości wiązania się z metylowanym DNA w jądrze komórkowym, posiada również zdolność rekrutowania innych czynników transkrypcyjnych, białek represorowych czy aktywatorów transkrypcji. Ponadto może również oddziaływać z innymi czynnikami modyfikującymi białka chromatyny (np. HDAC). W związku z tym, MeCP2 jako jedno z nielicznych białek w komórce,

może uczestniczyć zarówno w odczycie jak powstawaniu nowych wzorów epigenetycznych. Aktualnie wiedza na temat MeCP2 jest stosunkowo duża, a do lepszego poznania zarówno jego struktury jak i funkcji, niewątpliwie przyczyniła się identyfikacja mutacji w genie *MECP2* jako głównej przyczyny zespołu *Retta*. Białko MeCP2 odpowiada za prawidłowy wzrost oraz funkcjonowanie mózgu, szczególnie poprzez udział w aktywacji syntezy czynnika BDNF w neuronach. Zarówno ekspresja *MECP2* jak i aktywność powstałego na jego matrycy białka, podlega wielowymiarowej regulacji w komórce. Do najważniejszych mechanizmów, które mogą przyczyniać się do aktywacji/dezaktywacji białka należy zaliczyć katalizowane przez różne kinazy białkowe procesy fosforylacji/defosforylacji indukowane w momencie pobudzenia komórki. Badania ostatnich lat wskazują, że nieprawidłowości w ekspresji genu lub aktywności białka MeCP2 mogą przyczyniać się do rozwoju licznych chorób o podłożu neurobiologicznych, w tym wspomnianego już zespołu *Retta*. Ponadto MeCP2 może pełnić znacząca rolę w rozwoju uzależnień od substancji psychoaktywnych, zaburzeń depresyjnych, czy innych schorzeń neurorozwojowych. Ponadto stwierdzono również związek pomiędzy MeCP2 a niektórymi typami nowotworów u ludzi. Co ważne, nadmierna ekspresja MECP2 jest równie niebezpieczna jak i jego niedobór, co znacznie ogranicza możliwość stosowania terapii genowych polegających na włączeniu dodatkowych kopii do kodującego genu.

Niewątpliwie MeCP2 jest istotnym i krytycznym czynnikiem dla prawidłowego rozwoju i funkcjonowania mózgu, stąd dokładniejsze poznanie jego natury może w przyszłości przyczynić się do lepszego poznania mechanizmów wielu chorób, być może w przyszłości wyznaczyć również nowe kierunki poszukiwania skutecznych terapii różnych zaburzeń, szczególnie tych związanych z układem nerwowym.

PODZIĘKOWANIA

Praca została częściowo sfinansowana z grantu Narodowego Centrum Nauki (UMO-2013/09/D/NZ7/02520; Kierownik projektu: dr hab. M. Sowa-Kućma, prof. UR) oraz działalności statutowej Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego.

LITERATURA

[1] Adams VH, Mcbryan SJ, Wade PA, Woodcock CL, Hansen JC. Intrinsic disorder and autonomous domain function in the multifunctional nuclear protein, MeCP2. *J Biol Chem* 2007; **282**: 15057-15064.

[2] Adkins NL, Georgel PT. MeCP2: structure and function This paper is one of a selection of papers published in a Special Issue entitled 31st Annual International Asilomar Chromatin and Chromosomes Conference, and has undergone the Journal's usual peer review process. *Biochem Cell Biol* 2011; **89**: 1- 11.

[3] Ausió J. MeCP2 and the enigmatic organization of brain chromatin. Implications for depression and cocaine addiction. *Clin Epigenetics* 2016; **8**: 58.
[4] Ausió J. Role of MeCP2 in neurological disorders: current status and future perspectives. *Epigenomics* 2018; **10**: 5- 8.
[5] Bellini E, Pavesi G, Barbiero I, Bergo A, Chandola C, Nawaz Ms, Rusconi L, Stefanelli G, Strollo M, Valente Mm, Kilstrup-Nielsen C, Landsberger N. MeCP2 post-translational modifications: a mechanism to control its involvement in synaptic plasticity and homeostasis*? Front Cell Neurosci* 2014; **13**: 236.
[6] Carlberg C, Molnár F. The histone code. *In Human Epigenomics*. Springer, Singapore 2018; 75-88.
[7] Cassel S, Carouge D, Gensburger C, Anglard P, Burgun C, Dietrich Jb, Zwiller J. Fluoxetine and cocaine induce the epigenetic factors MeCP2 and MBD1 in adult rat brain. *Mol Pharmacology* 2006; **70**: 487-492.
[8] Chahrour M, Jung Sy, Shaw C, Zhou X, Wong St, Qin J, Zoghbi Hy. MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription. *Science* 2008; **320:** 1224-1229.
[9] Cheng Y, He C, Wang M, Ma X, Mo F, Yang S, Han J, Wei X. Targeting epigenetic regulators for cancer therapy: mechanisms and advances in clinical trials*. Signal Transduct Target Ther* 2019; **17:** 62.
[10] Chmielewska N, Szyndler J, Maciejak P, Płaźnik A. Epigenetic mechanisms of stress and depression. *Psychiatr Pol* 2019; **53**: 1413-1428.
[11] Cobolli Gigli C, Pozzi D, Rossi Rl, Scaramuzza L, Rossetti G, Pagani M, Kilstrup-Nielsen C, Matteoli M, Landsberger N. Defects During Mecp2 Null Embryonic Cortex Development Precede the Onset of Overt Neurological Symptoms. *Cereb Cortex* 2016; **26**: 2517- 2529.
[12] Czajkowski R. Receptory nukleotydowe w uczeniu i plastyczności neuronalnej. *Postępy Biochemii* 2014; **60**: 506-513.
[13] Damen D, Heumann R. MeCP2 phosphorylation in the brain: from transcription to behavior. *Biol Chem* 2013; **394**: 1595- 1605.
[14] Deans C, Maggert Ka. What do you mean,"epigenetic"?. Genetics 2015; **199**: 887-896.
[15] Della Ragione F, Filosa S, Scalabrì F, D'esposito M. MeCP2 as a genome-wide modulator: the renewal of an old story. *Front Genet* 2012; **3**: 181.
[16] Deng Jv, Rodriguiz Rm, Hutchinson An, Kim Ih, Wetsel Wc, West Ae. MeCP2 in the nucleus accumbens contributes to neural and behavioral responses to psychostimulants. *Nat Neurosci* 2010; **13**: 1128-1136.
[17] Dziwota E, Fałkowska U, Adamczyk K, Adamczyk D, Stefańska A, Pawęzka J, Olajossy M. Silent angels the genetic and clinical aspects of Rett syndrome. *Curr Problems Psychiatry* 2016; **17**: 282-296.
[18] Esposito M, Sherr Gl. Epigenetic Modifications in Alzheimer's Neuropathology and Therapeutics. *Front Neurosci* 2019;**13**: 476.
[19] Ezeonwuka Cd, Rastegar M. MeCP2-related diseases and animal models. *Diseases* 2014; **2**: 45-70.
[20] Fahmi M, Yasui G, Seki K, Katayama S, Kaneko-Kawano T, Inazu T, Kubota Y, Ito M. In Silico Study of Rett Syndrome Treatment-Related Genes, *MECP2*, *CDKL5*, and *FOXG1*, by Evolutionary Classification and Disordered Region Assessment. *Int J Mol Sci* 2019; **8**: 20.
[21] GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990- 2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 2018; **392**: 1789-1858.
[22] Gomathi M, Padmapriya S, Balachandar V. Drug Studies on Rett Syndrome: From Bench to Bedside. *J Autism Dev Disord* 2020. doi: 10.1007/s10803-020-04381-y.
[23] Gulmez Karaca K, Brito Dv, Oliveira Am. MeCP2: A Critical Regulator of Chromatin in Neurodevelopment and Adult Brain Function. *Int J Mol Sci* 2019; **20**: 4577.
[24] Hagberg B, Goutières F, Hanefeld F, Rett A, Wilson J. Rett syndrome: criteria for inclusion and exclusion. *Brain Develop* 1985; **7**: 372-373.
[25] Heinbockel T, Csoka Ab. Epigenetic Effects of Drugs of Abuse. *Int J Environ Res Public Health* 2018; **25**: E2098.

[26] Horvath S, Raj K. DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nat Rev Gen* 2018; 19: 371-384.
[27] Hutchinson An, Deng Jv, Aryal Dk, Wetsel Wc, West Ae. Differential regulation of MeCP2 phosphorylation in the CNS by dopamine and serotonin. *Neuropsychopharmacology* 2012; **37**: 321-337.
[28] Hutchinson An, Deng Jv, Cohen S,West Ae. Phosphorylation of MeCP2 at Ser421 contributes to chronic antidepressant action. *J Neurosci* 2012; **32***:* 14355-14363.
[29] Im Hi, Hollander Ja, Bali P, Kenny Pj. MeCP2 controls BDNF expression and cocaine intake through homeostatic interactions with microRNA-212. *Nat Neurosci* 2010; **13**: 1120-1127.
[30] Jin W. Regulation of BDNF-TrkB Signaling and Potential Therapeutic Strategies for Parkinson's Disease. *J Clin Med* 2020; **17**: E257.
[31] Jin Xr, Chen Xs, Xiao L. MeCP2 Deficiency in Neuroglia: New Progress in the Pathogenesis of Rett Syndrome. *Front Mol Neurosci* 2017; **10**: 316.
[32] Kadam Sd, Sullivan Bj, Goyal A, Blue Me, Smith-Hicks C. Rett Syndrome and CDKL5 Deficiency Disorder: From Bench to Clinic. *Int J Mol Sci* 2019; **15**: E5098.
[33] Kong Y, Zhou W, Sun Z. Nuclear receptor corepressors in intellectual disability and autism. *Mol Psychiatry* 2020. doi: 10.1038/s41380-020-0667-y.
[34] Li W, Pozzo-Miller L. BDNF deregulation in Rett syndrome. *Neuropharmacology* 2014; **76**: 737-746.
[35] Liyanage Vr, Rastegar M. Rett syndrome and MeCP2. *Neuromol Med* 2014; **16**: 231-264.
[36] Lotti F, Geronzi U, Grosso S. Electroencephalographic and epilepsy findings in mecp2 duplication syndrome. A family study. Brain Dev 2019; **41**: 456-459.
[37] Mcginty Jf, Whitfield Jr Tw, Berglind Wj. Brain-derived neurotrophic factor and cocaine addiction. *Brain Res* 2010; **1314**: 183-193.
[38] Misztak P, Pańczyszyn-Trzewik P, Sowa-Kućma M. Histone deacetylases (HDACs) as therapeutic target for depressive disorders. Pharmacol Rep 2018; **70**: 398-408.
[39] Parry L, Clarke Ar. The roles of the methyl-CpG binding proteins in cancer. *Genes & cancer* 2011; **2**: 618-630.
[40] Pries Lk, Gülöksüz S, Kenis G. DNA Methylation in Schizophrenia. *Neuroepigenomics in Aging and Disease*. Springer 2017; 211- 236.
[41] Qu Y, Yang Q, Sui F, Lu R, Dang S, Ji M, Hou P. A strategy for accurate quantification of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine at CpG sites within gene promoter. *J Biomed Nanotech* 2015; **11**: 1016-1026.
[42] Rogge Ga, Wood Ma.The role of histone acetylation in cocaine-induced neural plasticity and behavior. *Neuropsychopharmacology* 2013; **38**: 94-110.
[43] Saldi Tk, Gonzales Pk, Larocca Tj, Link Cd. Neurodegeneration, Heterochromatin, and Double-Stranded RNA. *J Exp Neurosci* 2019; **13**: 179069519830697.
[44] Shahbazian Md, Antalffy B, Armstrong Dl, Zoghbi Hy. Insight into Rett syndrome: MeCP2 levels display tissue- and cell-specific differences and correlate with neuronal maturation. *Hum Mol Genet* 2002; **11**: 115- 124.
[45] Shovlin S, Tropea D. Transcriptome level analysis in Rett syndrome using human samples from different tissues. *Orphanet J Rare Dis* 2018; **13**: 113.
[46] SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* 2015; **65**: 5-29.
[47] Skinner Mk, Guerrero-Bosagna C. Role of CpG deserts in the epigenetic transgenerational inheritance of differential DNA methylation regions. *BMC Genomics* 2014; **15**: 692.
[48] Stembalska A, Gil J, Pesz Ka. Rett syndrome. Classical form and preserved speech variant as a different phenotype effect of deletion with the same starting point in MeCP2 gene-report of 2 cases. *Med Wieku Rozwoj* 2011; **15**: 445-450.
[49] Takeguchi R, Takahashi S, Kuroda M, Tanaka R, Suzuki N, Tomonoh Y, Ihara Y, Sugiyama N, Itoh M. MeCP2_e2 partially compensates for lack of MeCP2_e1: A male case of Rett syndrome. *Mol Genet Genomic Med* 2020; **8**: e1088
[50] Tao J, Hu K, Chang Q, Wu H, Sherman N E, Martinowich K, Sun Ye. Phosphorylation of MeCP2 at Serine 80 regulates its chromatin association and neurological function. *PNAS* 2009; **106**: 4882-4887.

[51] Vashi N, Justice Mj. Treating Rett syndrome: from mouse models to human therapies. *Mamm Genome* 2019; **30**: 90-110.
[52] Vidal S, Xiol C, Pascual-Alonso A, O'callaghan M, Pineda M, Armstrong J. Genetic Landscape of Rett Syndrome Spectrum: Improvements and Challenges. Int J Mol Sci 2019; **12**: 3925.
[53] Wada R, Akiyama Y, Hashimoto Y, Fukamachi H, Yuasa Y. miR-212 is downregulated and suppresses methyl-CpG-binding protein MeCP2 in human gastric cancer. *Int J Cancer* 2010; **127**: 1106-1114.
[54] Zhang X, Witzig Te, Wu X. DNA Demethylation and Epigenetics. Handbook of Nutrition, Diet, and Epigenetics. Springer 2019; 281-292.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 04.03.2020
Przyjęto: 15.04.2020
Magdalena Sowa-Kućma
Zakładu Fizjologii Człowieka, Instytut Nauk Medycznych
Uniwersytet Rzeszowski
e-mail: msowa@ur.edu.pl, magda.sowa.kucma@gmail.com