

Потенциальная роль белка BMAL1 в развитии гипомиелинизации и аффективных расстройств

Амстиславская Т.Г.^{1, 2*}, Смирнова К.В.^{1, 2**}, Бородина С.О.³, Ярных В.Л.⁴,
Смирнова Л.П.⁵

¹ НИИ нейронаук и медицины, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

⁴ НИИ биологии и биофизики Томского государственного университета, Томск, Россия

⁵ НИИ психического здоровья Томского НИМЦ, Томск, Россия

* amstislavskaytg@neuronm.ru; ** vedelina@mail.ru

Ключевые слова: disc1; bmal1; депрессия; гипомиелинизация

Мотивация и цель: Ген *DISC1* играет ключевую роль в работе нервной системы (НС). Белок *DISC1* регулирует пролиферацию и дифференцировку нейрональных стволовых клеток, миграцию и созревание нейронов, формирование их синапсов, транспорт веществ, клеточных компонент и работу сигнальных каскадов внутри клетки [1, 2]. Менее изучена роль *DISC1* в процессах глиагенеза, однако известно, что он участвует в развитии астроцитов, стимулируя астрогенезис, и олигодендроцитов, определяя правильное время и место дифференцировки их предшественников [3, 4]. При таком разнообразии функций мутации в гене *Disc1* являются ключевым предиктором развития патологических состояний, связанных с нарушениями нейроразвития, синаптической передачи, внутриклеточного сигналинга и циркадных ритмов, например, при психиатрических, нейродегенеративных и демиелинизирующих заболеваниях [5]. Недавно также показано участие *DISC1* в циркадных процессах, которые критически важны для функционирования НС. У мышей с нокаутом гена *Disc1* происходит ускоренная деградация циркадного белка *BMAL1* за счет усиления активности фермента гликоген синтазкиназы-3 (*GSK-3*), непосредственно входящего в интерактом *DISC1* [6]. Помимо циркадных функций, *BMAL1* играет ключевую роль в развитии и работе НС [7]. В мозге взрослых мышей показана высокая экспрессия *Bmal1* как в нейронах, так и в глиальных клетках, варьирующая в разных областях мозга. В том числе *BMAL1* играет важную роль в процессах миелинизации, и установлено, что нарушение ритма экспрессии *Bmal1* в предшественниках олигодендроцитов CA1 области гиппокампа и префронтальной коры приводит к развитию депрессивноподобного и тревожного поведения [8, 9]. Характерно, что у мышей с точечной мутацией Q31L в гене *Disc1*, проявляющих выраженный депрессивно-подобный фенотип, выявлено снижение взаимодействия *DISC1* и *GSK-3*, которое приводит к усилению энзиматической активности этого фермента [10–12]. Таким образом, изучение распределения белка *BMAL1* в ключевых областях мозга, вовлеченных в регуляцию поведения у мышей с мутацией Q31L в гене *Disc1*, поможет выявить новые механизмы патогенеза аффективных расстройств.

Методы и алгоритмы: В работе использовались самцы мышей в возрасте 2–4 месяцев двух генетических линий: C57BL/6 (далее WT) и гомозиготные мыши с точечной мутацией в гене *Disc1*: *Disc1*-Q31L^{-/-} (Q31L), по 15 мышей на группу.

Животные были получены из уникальной научной установки «Биологическая коллекция – генетические биомодели нейropsychических заболеваний» (№ 493387) Научно-исследовательского института нейронаук и медицины г. Новосибирска [13]. Мышей содержали в соответствии со стандартными требованиями ухода за лабораторными животными согласно руководству ГОСТ 33216-2014, при цикле освещенности 12:12 часов. Тестирование проводили по стандартным протоколам в следующем порядке: открытое поле, тест социальных предпочтений, тест принудительного плавания. Автоматический трекинг и сбор данных осуществляли с помощью оборудования и программного обеспечения Ethovision XT10 (Noldus International Technology). Иммуногистохимический анализ (ИГХ) проводили на замороженных срезах мозга по стандартной методике с использованием первичных антител против BMAL1 (1:800, NovusBio, NB100-2288SS) и вторичных – Alexa fluor 488 (1:500, ThermoFisher scientific, A-11008).

У больных аффективными расстройствами, проходивших лечение в отделении аффективных состояний НИИ психического здоровья ТНИМЦ, оценивали содержание миелина в головном мозге с использованием метода быстрого МПФ-картирования. У пациентов были диагностированы биполярно-аффективное (БАР) и рекуррентное депрессивное расстройство (РДР); средний возраст больных 37.55 ± 15.58 года, длительность заболевания 11 [3.5; 16.5] лет, возраст пациентов к началу заболевания 22 [19; 31.5] лет. Было проведено магнитно-резонансное исследование головного мозга с использованием 1.5 Т МР-сканера (Ingenia Evolution, Philips, Netherland) с напряженностью магнитного поля 1.5 Т и амплитудой градиентов 45 мТ/м с использованием 20-канальной цифровой катушки для головы и шеи. Для картирования МПФ (молекулярной протонной фракции) применяли быстрый одноточечный протокол с синтетическим референтным изображением, аналогичный использованному ранее [14, 15]. Карты МПФ были реконструированы с помощью специального программного обеспечения, доступного по адресу <https://www.macromolecularmri.org/>. Для определения уровня миелинизации головного мозга использовали программу RadiAnt DICOM Viewer (64-bit).

Все полученные данные подвергали статистическому анализу с использованием программного обеспечения Jamovi для Windows. Для выборок с нормальным распределением данных использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA для независимых выборок, для зависимых выборок – ANOVA для повторных измерений. Post-hoc анализ проводили с применением критерия Фишера (LSD), где значения $p < 0.05$ указывают на статистически значимую разницу [16]. Для независимых выборок, распределение которых не соответствует нормальному, проводили тест Краскела–Уоллиса с последующим применением критерия Манна–Уитни (M-U) для попарных сравнений.

Результаты: Мыши с мутацией Q31L в сравнении с мышами дикого типа (WT) проявляют признаки депрессивноподобного фенотипа, что выражается в статистически значимом увеличении времени дрейфа в тесте принудительного плавания ($F[1; 9.44] = 5.83, p < 0.05$) и снижении социальной мотивации ($F[1; 16] = 6.51, p < 0.05$), без изменения социально обусловленного предпочтения места и проявления тревожности. Показано, что мутация Q31L значимо снижает иммунофлуоресценцию белка BMAL1 в CA1 области гиппокампа ($F[1; 7] = 35.0, p < 0.001$) и латеральной хабенулы ($F[1; 8.51] = 35.7, p < 0.001$). При этом не было выявлено изменений в иммунофлуоресценции BMAL1 в других областях

гиппокампа, медиальной хабенулы, миндалевидном комплексе и супрахиазматическом ядре мозга мышей.

Выявленные в исследованиях на мышах области головного мозга, показавшие снижение экспрессии белка BMAL1, могут указывать на снижение миелинизации в этих областях, сочетающееся с развитием депрессивноподобного поведения. И действительно, в проведенных исследованиях на больных рассеянным склерозом выявлено значимое снижение миелинизации, оцененное с помощью МПФ. В предварительных исследованиях изменения миелинизации у больных с БАР и РДР выявлено значимое (с высокой степенью достоверности $p < 0.0001$) снижение миелинизации, оцененное с помощью МПФ, белого вещества головного мозга больных. Процесс гипомиелинизации является диффузным, так как был значимо выражен во всех отделах больших полушарий головного мозга у пациентов с аффективными расстройствами, включая перивентрикулярную область, область базальных ядер (скорлупа и таламус), в сравнении со здоровыми лицами ($p < 0.05$). Эти результаты подтверждают роль подкорковых структур (и в частности таламуса) в формировании симптомов депрессивного расстройства и депрессивной фазы БАР, механизм развития которых может быть объяснен наличием проекционной связи между парафасцикулярными субпопуляциями таламуса и прилежащего ядра, хомогенетическое торможение которого вызывало депрессивное состояние у мышей [17].

Выводы: Таким образом, данные результаты указывают на наличие связи между гипомиелинизацией головного мозга и развитием депрессивноподобного поведения у мышей. У обследованных больных с диагностированными аффективными расстройствами БАР и РДР выявлено значимое, с высокой степенью достоверности, снижение миелинизации белого вещества головного мозга в сравнении со здоровыми лицами. В результате обобщения экспериментальных и литературных данных мы предполагаем, что с высокой степенью вероятности основным действующим фактором в развитии этих изменений является белок BMAL1.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РФФИ № 23-75-00023.

Potential role of BMAL1 protein in the development of hypomyelination and affective disorders

Amstislavskaya T.G.^{1, 2*}, Smirnova K.V.^{1, 2**}, Borodina S.O.³, Yarnykh V.L.⁴, Smirnova L.P.⁵

¹ Research Institute of Neuroscience and Medicine, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

⁴ Research Institute of Biology and Biophysics, Tomsk State University, Tomsk, Russia

⁵ Research Institute of Mental Health, Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, Russia

* amstislavskaytg@neuronm.ru; ** vedelina@mail.ru

Key words: disc1; bmal1; depression; hypomyelination

Motivation and Aim: The *DISC1* gene plays a key role in the nervous system (NS) functioning. The DISC1 protein regulates proliferation and differentiation of neuronal

stem cells, neurons migration and maturation, synapses formation and maintenance, transport of substances and cellular components, also involved in signaling cascades within cells [1, 2]. Less studied DISC1 functions in gliogenesis, anyway it is known DISC1 stimulate astrogenesis and determine time and place of the oligodendrocyte progenitors differentiation [3, 4]. With such variety of functions, mutations in the *Disc1* gene are a key predictor of pathological conditions associated with neurodevelopmental disorders, disruption of synaptic transmission, intracellular signaling and circadian rhythms, for example, in psychiatric, neurodegenerative and demyelinating diseases [5]. Recently was shown involvement of DISC1 in circadian processes which are critically important for NS functioning. *Disc1*-knockout in mice leads to accelerated degradation of BMAL1 circadian protein through the increased activity of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) which is an DISC1 interacting protein [6]. Besides circadian rhythms, BMAL1 play a key role in the NS development and functioning [7]. In the adult mice brain was shown high *Bmal1* expression in neurons and glial cells. Especially BMAL1 play an important role in the myelinisation and it is determined that disrupted rhythm of *Bmal1* expression in hippocampal CA1 and prefrontal cortex oligodendrocyte progenitor cells leads to depressive like and anxious behavior [8, 9]. Interesting that mice with Q31L point mutation in *Disc1* gene characterized with decreased DISC1-GSK-3 interaction and increased enzymatic activity of GSK-3 [10–12]. Thus study of BMAL1 abundance in the key brain structures involved in Q31L mice behavior may provide new mechanisms of mood disorders pathogenesis.

Methods and Algorithms: In that work male mice aged 2–4 months of two genetic lines: C57BL/6 (hereinafter WT) and homozygous mice with a point mutation in the *Disc1* gene: *Disc1*-Q31L^{-/-} (Q31L) were used in 15 mice per group. Animals were obtained from the unique scientific guideline “Biological collection – genetic biomodels of neuropsychiatric diseases” (No. 493387) of the Research Institute of Neuroscience and Medicine in Novosibirsk [13]. Mice were housed according standard requirements for the care of laboratory animals according to the guidelines of GOST 33216-2014, with a light cycle of 12:12 hours. Testing was carried out according to standard protocols in the following order: open field, social preference test, forced swimming test. Automatic tracking and data collection were carried out using Ethovision XT10 hardware and software (Noldus International Technology). Immunohistochemical analysis (IHC) was performed on frozen brain sections using standard methods with primary antibodies against BMAL1 (1:800, NovusBio, NB100-2288SS), and secondary antibodies – Alexa fluor 488 (1:500, ThermoFisher scientific, A-11008).

In patients with affective disorders who were treated in the department of affective states of the Research Institute of Mental Health TNRMC, the myelin content in the brain was assessed using the fast MPF mapping method. The patients were diagnosed with bipolar affective disorder (BD) and recurrent depressive disorder (RDD), with an average age of patients 37.55±15.58 years, disease duration 11 [3.5; 16.5] years and the age of the patients at the onset of the disease was 22 [19; 31.5] years. MRI data were acquired on a 1.5 T clinical scanner (Ingenia Evolution, Philips, Netherland), 45 mT/m gradient amplitude, using a 20-channel digital head and neck coil. The fast MPF mapping protocol was implemented using a standard manufacturer’s 3D spoiled gradient-echo sequence according to the single-point synthetic reference method [14, 15]. MPF maps were reconstructed using custom C++ language software (available at <https://www.macromolecularmri.org/>) based on the single-point synthetic reference

algorithm. The level of brain myelination was determined using software RadiAnt DICOM Viewer (64-bit).

All obtained data were subjected to statistical analysis using Jamovi software for Windows. For samples with normal data distribution, one-way ANOVA analysis of variance was used for independent samples; for dependent samples – repeated measures ANOVA. Post-hoc analysis was performed using Fisher's test (LSD), where $p < 0.05$ indicate a statistically significant difference [16]. For independent samples not normally distributed, the Kruskal–Wallis test was performed, followed by the Mann–Whitney (M-U) test for pairwise comparisons.

Results: Mice with the Q31L mutation, compared to wild-type WT, show signs of a depressive-like phenotype, which is expressed significant floating time increase in the forced swim test ($F[1;9.44] = 5.83, p < 0.05$) and a decrease of social motivation ($F[1; 16] = 6.51, p < 0.05$), without changes in social conditioned place preference and anxiety. It was shown that the Q31L mutation significantly reduces the immunofluorescence of the BMAL1 protein in the CA1 region of the hippocampus ($F[1;7] = 35.0, p < 0.001$) and the lateral habenula ($F[1;8.51] = 35.7, p < 0.001$). However, no changes were detected in BMAL1 immunofluorescence in other areas of the hippocampus, medial habenula, amygdala complex and suprachiasmatic nucleus of the mouse brain. The areas of the brain identified in mouse studies that showed decreased expression of the BMAL1 protein may indicate decreased myelination in these areas, combined with the development of depressive-like behavior. Indeed, studies conducted on patients with multiple sclerosis have revealed a significant decrease in myelination, assessed using MPF. Preliminary studies of changes in myelination in patients with bipolar disorder and RDD revealed a significant ($p < 0.0001$) decrease in myelination the white matter of the brain, assessed using MPF. The process of hypomyelination is diffuse, as it was significantly expressed in all parts of the cerebral hemispheres in patients with affective disorders, including the periventricular region, the region of the basal ganglia (putamen and thalamus), in comparison with healthy individuals ($p < 0.05$). These results confirm the role of subcortical structures (and in particular the thalamus) in the formation of symptoms of depressive disorder and the depressive phase of bipolar disorder. The mechanism of development of these disorders can be explained by the presence of a connection between subpopulations of the thalamus and nucleus accumbens, the chemogenetic inhibition of which caused a depressive state in mice [17].

Conclusion: Thus, these results indicate a link between brain hypomyelination and the development of depressive-like behavior in mice. In the examined patients with diagnosed affective disorders: bipolar disorder and RDD, a significant, with a high degree of reliability, decrease in myelination of the white matter of the brain was revealed in comparison with healthy individuals. As a result of a generalization of experimental and literary data, we assume that with a high degree of probability, the main active factor in the development of these changes is the BMAL1 protein.

Funding: The study is supported the Russian Science Foundation No. 23-75-00023.

Список литературы/References

1. Tomoda T., Hikida T., Sakurai T. Role of DISC1 in Neuronal Trafficking and its Implication in Neuropsychiatric Manifestation and Neurotherapeutics. *Neurotherapeutics*. 2017;14(3):623-629
2. Tropea D. et al. Mechanisms underlying the role of DISC1 in synaptic plasticity. *J Physiol*. 2018;596(14):2747-2771
3. Wang S. et al. DISC1 regulates astrogenesis in the embryonic brain via modulation of RAS/MEK/ERK signaling through RASSF7. *Development*. 2016;143(15):2732-2740. doi 10.1242/dev.133066

4. Katsel P. et al. Overexpression of truncated human DISC1 induces appearance of hindbrain oligodendroglia in the forebrain during development. *Schizophr Bull.* 2018;44(3):515-524
5. Rusznák Z. et al. Adult neurogenesis and gliogenesis: possible mechanisms for neurorestoration. *Exp Neurobiol.* 2016;25(3):103-112
6. Lee S.B. et al. Disrupted-in-schizophrenia 1 enhances the quality of circadian rhythm by stabilizing BMAL1. *Transl Psychiatry.* 2021;11(1):110
7. Zheng Y. et al. Neural function of Bmal1: an overview. *Cell Biosci.* 2023;13(1):1
8. Huang S. et al. Demyelination regulates the circadian transcription factor Bmal1 to signal adult neural stem cells to initiate oligodendrogenesis. *Cell Rep.* 2020;33(7):108394
9. Zuo Y. et al. Circadian misalignment impairs oligodendrocyte myelination via Bmal1 overexpression leading to anxiety and depression-like behaviors. *J Pineal Res.* 2024;76(1):e12935
10. Lipina T.V. et al. Synergistic interactions between PDE4B and GSK-3: DISC1 mutant mice. *Neuropharmacology.* 2012;62(3):1252-1262
11. Clapcote S.J. et al. Behavioral phenotypes of disc1 missense mutations in mice. *Neuron.* 2007;54(3):387-402
12. Lipina T.V. et al. Genetic and pharmacological evidence for schizophrenia-related Disc1 interaction with GSK-3. *Synapse.* 2011;65(3):234-248
13. Petrova E. et al. Maintenance of genetically modified mouse lines: input to the development of bio-collections in Russia. *Lab Anim Sci.* 2018;2. doi 10.29296/2618723X-2018-02-01
14. Yarnykh V.L. Time-efficient, high-resolution, whole brain three-dimensional macromolecular proton fraction mapping. *Magn Reson Med.* 2016;75(5):2100-2106
15. Smirnova L.P. et al. Global hypomyelination of the brain white and gray matter in schizophrenia: quantitative imaging using macromolecular proton fraction. *Transl Psychiatry.* 2021;11(1):365
16. Azizi F., Ghasemi R., Ardalan M. Two common mistakes in applying ANOVA test: Guide for biological researchers. Available ft SSRN. https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=4221619
17. Zhang Y. et al. Targeting thalamic circuits rescues motor and mood deficits in PD mice. *Nature.* 2022;607(7918):321-329