

Mgr Katarzyna Rafa-Zabłocka
Zakład Biochemii Mózgu

Promotor: **prof. dr hab. Irena Nalepa**
Promotor pomocniczy: **dr Grzegorz Kreiner**

Recenzenci:

Prof. Anna Wesołowska
Zakład Farmacji Klinicznej, Wydział Farmaceutyczny Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński

Dr hab. Katarzyna Radwańska
Pracownia Molekularnych Podstaw Zachowania, Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego, PAN

Tytuł pracy doktorskiej:

Evaluation of the putative role of transcription factor CREB in the mechanisms of selected antidepressants – investigation on transgenic mice models with selective deletion of CREB in noradrenergic or serotonergic systems.

STRESZCZENIE

Pierwsze leki przeciwdepresyjne zostały odkryte w latach pięćdziesiątych ubiegłego wieku, jednak pomimo upływu czasu większość substancji stosowanych obecnie w praktyce leczenia depresji jest oparta na podobnym mechanizmie, czyli na zwiększaniu dostępności monoamin w szczelinie synaptycznej. Jednak od wielu lat trwają intensywne badania mające na celu identyfikację odroczonego w czasie molekularnych efektów adaptacyjnych leków przeciwdepresyjnych, aby w przyszłości móc projektować substancje oddziałujące bezpośrednio na określone białka. Jednym z białek będącym wspólnym punktem uchwytu dla różnych terapii przeciwdepresyjnych zarówno farmakologicznych jak i elektrowstrząsów, jest czynnik transkrypcyjny CREB. Badania wykazały, że wielokrotne podania leków przeciwdepresyjnych różnych klas powodują zwiększenie jego fosforylacji oraz aktywności w hipokampie czy korze przedczołowej zwierząt. Dodatkowo u pacjentów chorych na depresję zauważono obniżony poziom fosforylacji CREB, który ulega normalizacji pod wpływem terapii lekami przeciwdepresyjnymi. Jednak wyniki te nie znalazły odzwierciedlenia w badaniach na modelach zwierzęcych pozbawionych CREB, gdyż obserwowano w nich fenotyp przeciwdepresyjny

zwierząt. Mogło to być spowodowane m.in. kompensacyjnym wzrostem poziomu białka CREM, które może częściowo przejmować funkcję CREB w sytuacji jego braku lub nakładaniem się przeciwnych efektów delecji CREB z różnych struktur.

Celem badań przedstawionych w tej pracy była ocena jak delecja CREB ograniczona do neuronów noradrenergicznych (NA) lub serotoninowych (5-HT) – należących wciąż do najistotniejszych punktów uchwytu farmakoterapii depresji – wpłynie na efekty leków przeciwdepresyjnych działających pierwotnie poprzez te układy monoaminergiczne. W badaniach jako modele wykorzystano transgeniczne myszy oparte o system Cre/loxP – $Creb1^{DBHCre}$ oraz $Creb1^{TPH2CreERT2}$, w których dodatkowo usunięto gen kodujący CREM. Do badań wybrano dwa leki przeciwdepresyjne o dobrze udokumentowanym oddziaływaniu na ścieżkę sygnalizacyjną zależną od CREB – dezipraminę do badania efektów delecji CREB w układzie NA oraz fluoksetynę do badania efektów delecji CREB w układzie 5-HT. Wszystkie badania zostały przeprowadzone zarówno na zwierzętach pojedynczych mutantach pozbawionych wyłącznie CREB ($Creb1^{DBHCre}$ oraz $Creb1^{TPH2CreERT2}$), jak i mutantach podwójnych z dodatkową delecją CREM ($Creb1^{DBHCre}CreM^{-/-}$ oraz $Creb1^{TPH2CreERT2}CreM^{-/-}$). Ponadto we wszystkich eksperymentach osobno oceniano samce i samice.

W pierwszym etapie oba modele poddano ocenie pod kątem ich użyteczności do doświadczeń z wykorzystaniem leków przeciwdepresyjnych. Przeprowadzono zatem barwienia immunohistochemiczne potwierdzające skuteczność i selektywność mutacji, a następnie oceniono fenotyp podstawowy zwierząt. Jak się okazało wprowadzone mutacje nie wpływają na wagę, aktywność lokomotoryczną, koordynację ruchową, lękliwość (z wyjątkiem samic $Creb1^{TPH2CreERT2}$) czy występowanie zachowań o charakterze depresyjnym niezależnie od genotypu czy płci zwierząt. Dzięki temu oba modele stanowią odpowiednie narzędzie do badań roli CREB w mechanizmach działania leków przeciwdepresyjnych, nie posiadając fenotypu, który mógłby interferować z wynikami uzyskanymi po dodatkowej ekspozycji na lek.

W drugim etapie projektu myszy z delecją CREB w neuronach monoaminergicznych poddano działaniu leków przeciwdepresyjnych. Przy użyciu testu zawieszenia za ogon przeprowadzonego po pojedynczej dawce dezipraminy czy fluoksetyny wykazano, że CREB zlokalizowany odpowiednio w neuronach NA oraz 5-HT odgrywa istotną rolę w działaniu obu leków, gdyż zwierzęta pozbawione tego czynnika nie wykazywały odpowiedzi na podane leki. Jednakże do zahamowania behawioralnej reakcji na dezipraminę konieczna była delecja zarówno

CREB z neuronów NA jak i pozbawienie zwierząt CREM, natomiast zahamowanie reakcji na fluoksetynę obserwowano już u pojedynczych mutantów z delecją CREB w neuronach 5-HT.

Efekty wielokrotnych podań leków przeciwdepresyjnych na poziomie molekularnym były mierzone w hipokampie i korze przedczołowej, strukturach do których docierają projekcje z jądra sinawego czy jądra szwu. Mierzono poziom ekspresji mRNA oraz białka dla genów zależnych od CREB, w tym BDNF i pozostałych neurotrofin, a także kinaz CaMKII α i ERK1/2. Oceniono także poziom neurotransmiterów w tych strukturach u podwójnych mutantów. Najważniejszą obserwacją w tej części rozprawy jest fakt, że brak CREB w układzie 5-HT hamuje wywoływany fluoksetyną wzrost BDNF w hipokampie (samce i samice) i korze przedczołowej (samice) u myszy. Podobny efekt obserwowano dla fosforylacji CaMKII α . Efekt mutacji w układzie 5-HT obserwowany dla BDNF oraz badanych kinaz pokazuje istotną rolę CREB zlokalizowanego w tych neuronach, a nie w strukturze docelowej jaką jest hipokamp. Wykazano także różnice płciowe w zakresie regulacji odpowiedzi na fluoksetynę na poziomie behawioralnym oraz molekularnym, a także w tkankowym poziomie neurotransmiterów. Dezipramina nie wywołała istotnych zmian w zakresie badanych ścieżek sygnałowych u zwierząt dzikich, a także brak CREB w układzie NA (myszy Creb1^{DBHCre}) miał nieznaczny wpływ na efekty leku.

Podsumowując, przeprowadzone badania po raz pierwszy pokazały, że obecność CREB w neuronach 5-HT i NA ma istotne znaczenie dla efektywności działania zastosowanych leków przeciwdepresyjnych. Ponadto wykazano, że CREB z neuronów 5-HT jest istotny dla zmian wywołanych fluoksetyną w strukturach docelowych dla tego układu, istotnie zaangażowanych w patomechanizm i leczenie depresji. Pokazano także, że CREM może odgrywać istotną rolę w kompensacji braku CREB, co przekłada się na ostateczny fenotyp zwierząt – czynnik często pomijany w tego typu badaniach spotykanych w piśmiennictwie. Wyniki tej pracy uzupełniają dotychczasową wiedzę na temat CREB i jego roli w mechanizmie działania leków przeciwdepresyjnych jednocześnie podkreślając jak wymagającym a jednocześnie istotnym zadaniem są badania udziału czynników transkrypcyjnych w efektach leków.

ABSTRACT

First antidepressant drugs were discovered in 1950s; however, since then most of currently used substances in the treatment of depression are based on similar mechanism, which is enhancement of monoaminergic transmission. The delayed molecular adaptive effects of prolonged treatment with antidepressant drugs are thoroughly studied to find the new and better defined targets for future more efficient antidepressants. A protein that could serve as a convergence point of different antidepressant treatment, including pharmacotherapy and electroconvulsive shock, is cAMP response element binding protein (CREB). Chronic administration of different classes of antidepressant drugs were often reported to enhance CREB phosphorylation and activity in the hippocampus and prefrontal cortex of rodents. Moreover it was shown that unmedicated depressive patients have lower phosphorylation of CREB in brain, which is recovered after antidepressant therapy. However these results were not reflected by the effects observed in mice knocked out for CREB, as these animals surprisingly showed antidepressive phenotype. This could have been caused due to compensatory increase of CREM upon CREB loss, as CREM is a transcription factor able to bind to the same DNA sequence and possibly overtake the function of CREB or puzzling effects of CREB deficiency in different brain areas.

The aim of this thesis was to evaluate the role of CREB localized in the noradrenergic (NA) and serotonergic (5-HT) neurons in the effects of antidepressant drugs, which primarily act on these monoaminergic systems. The study was performed on transgenic mice created with the use of Cre/loxP system, which were CREB deficient in NA ($\text{Creb1}^{\text{DBHCre}}$) or 5-HT neurons ($\text{Creb1}^{\text{TPH2CreERT2}}$), additionally kept in $\text{CREM}^{-/-}$ background. Two antidepressants were chosen, which previously were shown to influence CREB signaling pathway: desipramine was used to study the effects of CREB deletion in NA neurons and fluoxetine to study the effects of CREB deletion in 5-HT neurons. All experiments were carried out on single mutants devoid of CREB only ($\text{Creb1}^{\text{DBHCre}}$ and $\text{Creb1}^{\text{TPH2CreERT2}}$) and double mutants with additional deletion of CREM ($\text{Creb1}^{\text{DBHCre}}\text{CreM}^{-/-}$ and $\text{Creb1}^{\text{TPH2CreERT2}}\text{CreM}^{-/-}$). In addition female and male mice were analyzed separately.

At first both studied models were evaluated for their utility in further experiments with antidepressants. Immunofluorescent staining confirmed the specificity and selectivity of both mutations. Next, basal behavioral phenotyping failed to reveal any differences in weight,

locomotor activity, motor coordination, anxiety (apart from decreased anxiety in $\text{Creb1}^{\text{TPH2CreERT2}}$ females) or depressive-like behavior irrelevant of genotype or sex of animals. Hence, both models were suitable tool to study the effects of antidepressants on CREB. In the second part of the project both models were exploited in experiments towards the investigation of the role of CREB following antidepressant treatment. Acute dose of desipramine or fluoxetine was ineffective to evoke behavioral response in mice devoid of CREB in NA and 5-HT neurons, respectively. However, inhibition of response to desipramine required deletion of both CREB and CREM, while to abolish the effects of fluoxetine deletion of only CREB was sufficient.

The effects of chronic administration of antidepressants were measured in the hippocampus and prefrontal cortex, the areas profoundly innervated by projections originating in locus coeruleus and raphe nuclei. The mRNA and protein levels of genes dependent on CREB, including BDNF and other neurotrophins as well as $\text{CaMKII}\alpha$ and ERK1/2 were evaluated. In addition, neurotransmitters content in these structures were assessed in double mutant mice. The most interesting result coming out from this part of thesis is the discovery that deletion of CREB in 5-HT neurons counteracted fluoxetine evoked BDNF-upregulation in the hippocampus (females and males) and prefrontal cortex (females). Moreover, CREB deletion in 5-HT neurons caused similar effect on $\text{CaMKII}\alpha$ in hippocampus of male mice; also ERK1/2 phosphorylation was found to be decreased after fluoxetine in $\text{Creb1}^{\text{TPH2CreERT2}}$ male mice, which supported the data of BDNF study. In addition, we noted sex specific dependence of the behavioral and molecular effects evoked by fluoxetine in $\text{Creb1}^{\text{TPH2CreERT2}}$ mice. On the other hand, desipramine did not induce any significant changes in studied molecules in wild-type mice, similar as CREB deficiency in NA neurons modulated the effects of desipramine very mildly.

Taken together the data presented in this thesis are the first to show, that CREB localized in 5-HT and NA neurons plays crucial role in efficacy of studied antidepressant drugs. Moreover CREB originated from 5-HT cells, plays an important role in molecular changes (BDNF, $\text{CaMKII}\alpha$) induced in the brain structures targeted by serotonergic projections. Further, the results of this study support the thesis that CREM upregulation may play important compensatory role in absence of CREB, which can influence the final phenotype observed in mutant animals. The effects observed in this research expand the current knowledge on CREB role in the mechanisms of antidepressant drugs, emphasizing how important and challenging this aim is.