

JOANNA SOLICH

CHARAKTERYSTYKA WYBRANYCH ASPEKTÓW FENOTYPU I GENOTYPU MYSZY POZBAWIONYCH TRANSPORTERA NORADRENERGICZNEGO

Praca wykonana w Pracowni Farmakologii Biochemicznej, Zakładu
Farmakologii, pod kierunkiem prof. dr hab. Marty Dziedzickiej-Wasylewskiej

Recenzenci:

Prof. dr hab. Jolanta Jura

Prof. dr hab. Jan Braszko

STRESZCZENIE

Leki przeciwdepresyjne stosowane są od wielu lat, a mimo to mechanizm ich działania nie został do końca poznany. Dlatego stworzenie myszy pozbawionych funkcjonalnego transportera noradrenergicznego wydaje się być szansą na dogłębne zbadanie tego zagadnienia, bez konieczności przewlekłego podawania leków. Transporter noradrenergiczny jest jednym z ważnych miejsc działania leków przeciwdepresyjnych. Szczegółowa budowa genu kodującego ten transporter, a także struktura białka i rozmieszczenie w mózgu oraz opis chorób wynikających z upośledzenia budowy i funkcji tego transportera zostały umieszczone we wprowadzeniu do niniejszej rozprawy doktorskiej. Znalazł się tam też sposób powstania myszy NET^{-/-} oraz ogólna charakterystyka badań przeprowadzona dotychczas na tym modelu zwierzęcym.

Badania przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej objęły wybrane aspekty charakterystyki zarówno fenotypu jak i genotypu myszy pozbawionych funkcjonalnego transportera noradrenergicznego.

Potwierdzono reakcję tych zwierząt w testach behawioralnych, takich jak test wymuszonego pływania (FST) oraz test zawieszenia za ogon (TST), podczas których myszy $NET^{-/-}$ wykazywały skrócony czas bezruchu. Następnie sprawdzono reakcję zwierząt dzikich i transgeniczných na stres wywołany przez te testy. W tym celu mierzono stężenie kortykosteronu w różnych punktach czasowych po wykonaniu FST i TST. Poziom kortykosteronu nie zmieniał się po TST, natomiast po FST wzrastał zarówno u myszy $NET^{-/-}$ jak i $NET^{+/+}$, chociaż jego stężenie było znamienne wyższe u myszy typu dzikiego. Takie wyniki mogą świadczyć o większej odporności myszy $NET^{-/-}$ na stres i mogą być spowodowane zmianami gęstości receptorów adrenergicznych (α_1 , α_2 i β) u myszy typu *knock-out*. Mogą też być spowodowane odkrytymi w trakcie niniejszych badań zmianami ekspresji genu kodującego białko CRH-BP.

W ramach charakterystyki fenotypowej przeprowadzono także badania biochemiczne uwzględniające zmiany w dwóch innych transporterach, które są istotne dla działania leków przeciwdepresyjnych. Metodą autoradiografii udowodniono brak wiązania [3H]nizoksetyny do transportera noradrenergicznego we wszystkich badanych strukturach mózgowych myszy $NET^{-/-}$ oraz wyższe wiązanie [3H]GBR12935 do transportera dopaminowego i [3H]paroksetyny do transportera serotoninowego u myszy $NET^{-/-}$ w porównaniu do myszy $NET^{+/+}$ w większości badanych obszarów mózgu. Opisane w literaturze zmiany gęstości tych transporterów po działaniu leków przeciwdepresyjnych dotyczą zwykle zmian gęstości konkretnego transportera, na który działa dany lek, natomiast nie było równoległych badań ewentualnych zmian w pozostałych transporterach. Jednak ostatnio coraz częściej pojawiają się prace przedstawiające szersze spojrzenie. Z prac tych wynika, że po działaniu inhibitorów wychwytu zwrotnego noradrenaliny dochodzi do kompensacji funkcjonalnej, czy też zmian gęstości innych transporterów, takich jak DAT czy SERT.

Charakterystyka genotypu objęła badania wykonane metodami hybrydyzacji *in situ*, RT-PCR a także z zastosowaniem mikromacierzy Affymetrix, pozwalających na zbadanie całego genomu mysiego oraz macierzy niskiej gęstości typu TaqMan. Przeprowadzone badania pozwoliły

na wyłonienie grupy genów, które są opisane w kontekście działania leków przeciwdepresyjnych (geny wczesnej odpowiedzi komórkowej, geny kodujące receptory adrenergiczne, geny związane ze stresem, geny kodujące podjednostki dla receptorów glutaminianu), ale także takie, które związane są z transportem mRNA oraz jego translacją, a również uwalnianiem neurotransmitera. Zaskakującym odkryciem była zwiększona ekspresja mRNA kodującego transporter noradrenergiczny (Slc6a2) u myszy NET^{-/-} w stosunku do NET^{+/+} stwierdzona podczas wszystkich badań genetycznych, z wyjątkiem hybrydyzacji *in situ*. Ta podwyższona ekspresja genu Slc6a2 była widoczna w tych rejonach mózgu myszy, gdzie znajdują się zakończenia neuronów noradrenergicznych. Natomiast w miejscu sinawym, gdzie umiejscowione są ciała komórek noradrenergicznych ekspresja ta była znamienne niższa. W wyniku tych badań powstała hipoteza o transporcie uszkodzonego mRNA kodującego NET w kompleksach RNP oraz magazynowania go w ciałkach GW/P w zakończeniach noradrenergicznych myszy typu *knock-out*, którą wstępnie próbowano potwierdzić. Równocześnie nie obserwowano różnic w ekspresji mRNA kodującego SERT i DAT w różnych rejonach mózgu myszy NET^{-/-} i NET^{+/+}, co może być wynikiem braku manipulacji genetycznej w obrębie tych genów.

Wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej nie tylko stanowią dalszy krok w kierunku charakterystyki myszy NET^{-/-}; pozwoliły one też wyłonić nowe geny, które mogą okazać się ważne dla działania inhibitorów wychwytu zwrotnego noradrenaliny, a być może także innych leków przeciwdepresyjnych, ale również pozwoliły na zrozumienie konsekwencji spowodowanych przez trwający całe życie *knock-out*. Badania niniejsze są również pomocne w zrozumieniu różnic pomiędzy metodami wykorzystywanymi do pomiaru poziomu mRNA.