



Instytut Farmakologii
im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk

mgr Katarzyna Chorążka

**Analiza funkcjonalnego zróżnicowania podtypów receptorów
alfa1-adrenergicznych w efektach leków przeciwdepresyjnych:
badania w genetycznych modelach *in vitro* i *in vivo***

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Biochemii Mózgu
Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

Promotorzy:

prof. dr hab. n. med. Irena Nalepa (Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja PAN)

prof. dr hab. n. med. Wojciech Piekoszewski (Wydział Chemii UJ)

Streszczenie

Noradrenalina mediuje odpowiedź organizmu na sytuacje stresowe poprzez oddziaływanie z receptorami adrenergicznymi w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym. Spośród nich wyróżnia się rodzinę receptorów α_1 -adrenergicznych (α_1 -AR), która składa się z trzech podtypów: α_{1A} , α_{1B} i α_{1D} . Ich zróżnicowana dystrybucja i funkcje zostały stosunkowo dobrze scharakteryzowane w obwodowym układzie nerwowym, jednak w mózgu badanie podtypów α_1 -AR jest utrudnione lub często niemożliwe ze względu na brak wysoce selektywnych ligandów zdolnych do przekraczania bariery krew-mózg oraz wysoce specyficznych przeciwciał. Mimo tych ograniczeń, istnieją doniesienia wskazujące na zróżnicowane zaangażowanie podtypów α_1 -AR w etiologię, patofizjologię i farmakoterapię zaburzeń psychicznych - w tym depresję. Historia farmakoterapii tej choroby jest stosunkowo krótka, jednak od samego jej początku leki przeciwdepresyjne (LPD) wpływały w sposób bezpośredni lub pośredni na układ noradrenergiczny. Niestety w kontekście specyficznych funkcji regulowanych przez podtypy α_1 -AR efekty te

nadal pozostają w dużej mierze niewyjaśnione, dlatego zdefiniowanie funkcjonalnego zróżnicowania podtypów α_1 -AR w efektach działania LPD wydaje się być kluczowe do zwiększenia skuteczności, szybkości i bezpieczeństwa farmakoterapii depresji.

Głównym celem niniejszej rozprawy było zbadanie, czy udział i funkcjonalność α_1 -AR w efektach LPD są zróżnicowane w zależności od podtypu α_1 -AR, na podstawie badań przeprowadzonych w genetycznych modelach *in vitro* i *in vivo*. Badania *in vitro* wykonano z wykorzystaniem trzech linii komórkowych ze stabilną ekspresją pojedynczego podtypu α_1 -AR w celu określenia czy i jak LPD z różnych grup działają na aktywację poszczególnych podtypów α_1 -AR wywołaną obecnością agonisty, z uwzględnieniem ich krótkotrwałego i długotrwałego oddziaływania na α_1 -AR. Z kolei badania *in vivo* wykonano z wykorzystaniem trzech mysich linii transgenicznych typu knockout z selektywnym unieczynnieniem genu kodującego pojedynczy podtyp α_1 -AR w celu określenia czy i jak dana mutacja wpływa na efekty długotrwałego stosowania LPD z różnych grup, na różnych poziomach molekularnych w mózgu samców i samic.

Na podstawie uzyskanych wyników potwierdzono, że LPD działające antagonistycznie względem α_1 -AR wykazują najsłabszy efekt na podtyp α_{1B} i uzupełniono tę wiedzę o kolejne związki - dezipraminę i citalopram. Przeprowadzone badania *in vitro* dostarczyły również nowych danych w kontekście długotrwałego oddziaływania LPD na α_1 -AR wskazując, że prowadzi ono do wyraźnego nasilenia przekazu sygnału noradrenergicznego za pośrednictwem podtypu α_{1B} w wyniku działania imipraminy lub dezipraminy oraz za pośrednictwem α_{1A} i α_{1B} w wyniku działania citalopramu, na skutek zwiększenia ich reaktywności na noradrenalinę. Co ciekawe, w bezpośrednim działaniu na α_1 -AR leki te wykazywały najsilniejszy efekt antagonistyczny względem podtypu α_{1D} , co koreluje z wynikami uzyskanymi w modelach *in vivo*. W badaniach tych wykazano bowiem na różnych poziomach molekularnych, że unieczynnienie podtypu α_{1D} u myszy moduluje efekty długotrwałego stosowania dezipraminy lub milnacipranu, w sposób zależny od płci. Ponadto, może to być związane z kompensacją funkcji podtypu α_{1D} przez podtyp α_{1A} . Różnice międzypłciowe odnotowano również w poziomie pierwiastków w mózgu, jednak w tym przypadku efekty działania badanych LPD nie były zależne od podtypów α_1 -AR.

Podsumowując, funkcjonalne zróżnicowanie podtypów α_1 -AR w efektach LPD wykazano zarówno w genetycznych modelach *in vitro*, jak i w modelach *in vivo*. Wyniki niniejszej rozprawy pozwoliły na bardziej precyzyjne zdefiniowanie funkcji wszystkich trzech podtypów α_1 -AR w efektach krótkotrwałego i długotrwałego stosowania klinicznie istotnych LPD oraz wyznaczyły liczne ścieżki, których zbadanie może przyczynić się do rozwoju nowych strategii farmakologicznych leczenia depresji.



Instytut Farmakologii
im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk

mgr Katarzyna Chorążka

**Analysis of the functional differentiation of α_1 -adrenergic
receptor subtypes in the effects of antidepressant drugs:
in vitro and *in vivo* genetic model studies**

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Biochemii Mózgu
Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

Promotorzy:

prof. dr hab. n. med. Irena Nalepa (Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja PAN)

prof. dr hab. n. med. Wojciech Piekoszewski (Wydział Chemii UJ)

Abstract

Norepinephrine mediates the body's response to stressful situations by interacting with adrenergic receptors in the central and peripheral nervous systems. Among them, there is a family of α_1 -adrenergic receptors (α_1 -AR), which consists of three subtypes: α_{1A} , α_{1B} and α_{1D} . Their diverse distribution and functions have been relatively well characterized in the peripheral nervous system, however, in the brain, the study of the α_1 -AR subtypes is difficult or often impossible due to the lack of highly selective ligands capable of crossing the blood-brain barrier and the lack of highly specific antibodies. Despite these limitations, there are reports indicating the diversified involvement of the α_1 -AR subtypes in the etiology, pathophysiology and pharmacotherapy of mental disorders - including depression. The history of pharmacotherapy of depression is relatively short, but from the very beginning, antidepressant drugs (AD) had a direct or indirect effect on the noradrenergic system. Unfortunately, in the context of the specific functions regulated by the α_1 -AR subtypes, these effects still remain largely unexplained.

Therefore, defining the functional differentiation of the α_1 -AR subtypes in the effects of AD seems to be crucial to increasing the effectiveness, speed and safety of pharmacotherapy of depression.

The main aim of this dissertation was to investigate whether the contribution and functionality of α_1 -AR in the effects of AD varies depending on the α_1 -AR subtype, based on research carried out in the *in vitro* and *in vivo* genetic models. The *in vitro* studies were performed with the use of three cell lines stably expressing a single α_1 -AR subtype to determine if and how AD from different groups act on agonist-induced activation of each α_1 -AR subtype, with taking into account their short-term and long-term effects. On the other hand, the *in vivo* studies were performed with the use of three mouse transgenic knockouts with selective inactivation of the gene encoding a single α_1 -AR subtype in order to determine whether and how a given mutation affects the effects of long-term use of AD from various groups, at different molecular levels in the male and female brain.

The obtained results confirmed that AD that act antagonistically towards α_1 -AR show the weakest effect on the α_{1B} subtype and supplemented this knowledge with other compounds - desipramine and citalopram. Also, the *in vitro* studies provided new data in the context of the long-term effect of AD on α_1 -AR, indicating that it leads to a marked increase in noradrenergic signal transmission via the α_{1B} subtype as a result of the action of imipramine or desipramine and via α_{1A} and α_{1B} as a result of the action of citalopram, by increasing their reactivity to norepinephrine. Interestingly, in direct action on α_1 -AR, these drugs showed the strongest antagonistic effect against the α_{1D} subtype, which correlates with the results obtained in *in vivo* models. In turn, these studies have shown at various molecular levels that inactivation of the α_{1D} subtype in mice modulates the effects of long-term use of desipramine or milnacipran in a gender-dependent manner. Also, it may be related to the α_{1D} subtype function compensation by the α_{1A} subtype. Gender differences were also noted in the level of elements in the brain, but in this case the effects of the tested AD were not dependent on the α_1 -AR subtypes.

In summary, functional differentiation of the α_1 -AR subtypes in AD effects was demonstrated in both *in vitro* and *in vivo* genetic models. The results of this dissertation provided more precise definition of the function of all three α_1 -AR

subtypes in the effects of short-term and long-term use of clinically significant AD, and indicated numerous pathways, the study of which may contribute to the development of new pharmacological strategies for the treatment of depression.