

**Svitlana Antoniuk**

**“INTERPLAY BETWEEN SEROTONIN 5-HT<sub>1A</sub> AND 5-HT<sub>7</sub> RECEPTORS IN STRESS-RELATED DISORDERS”**

**ABSTRACT**

Stress-related disorders are highly prevalent diseases all over the world. Accumulating data indicate that the serotonergic system is strongly linked with the pathogenesis of depression. Numerous studies based on molecular biology, genetic, histological, and behavioral approaches have shown that serotonin receptors, in particular 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>7</sub>, might mediate the stress response in both rodents and humans. However, mechanisms explaining an involvement of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>7</sub> receptors in stress-related diseases are not completely understood. Previous studies of our research group have shown that 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>7</sub> receptors form heterodimers in the recombinant system, in neuronal cultures and in the mouse brain, which in turn leads to changes in the receptor-mediated signaling. In this regard, the aim of this project was to investigate functional implication of 5-HT<sub>1A</sub>R/5-HT<sub>7</sub>R heterodimerization by modeling depression in animals.

First, a theoretical study based on meta-analysis was performed to verify the applicability of the chronic unpredictable stress protocol for modeling depression in different strains of rodents. Using this approach, we have demonstrated that both rats and mice showed anhedonic behavior after implementation of the chronic unpredictable stress protocol. In this study, C57BL/6J mice were chosen as the best model due to their higher susceptibility to stress protocol upon shorter stress duration in comparison to other rodent strains, availability of transgenic lines bred on C57BL/6J genetic background, and lower cost of depression modeling compared to rats. The depressive phenotype was assessed based on anhedonic and despair parameters as well as body weight fluctuation.

Second, the investigation of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>7</sub> receptors expression profiles in different mouse brain regions during postnatal development was performed. Thus, our data have shown that the 5-HT<sub>1A</sub>R protein level was upregulated in the prefrontal cortex and hippocampus compared to the raphe nuclei, whereas the level of the 5-HT<sub>7</sub>R did not differ. Additionally, applying qRT-PCR it has been demonstrated that the 5-HT<sub>1A</sub>Rs mRNA is the dominant subpopulation in comparison to the 5-HT<sub>7</sub>Rs mRNA in the prefrontal cortex and hippocampus during brain development.

Third, the interaction between 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>7</sub> receptors using depression-like model in C57BL/6J mice was investigated. Noteworthy, the most prominent changes in heterodimerization profile of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>7</sub> receptors were observed in the medial prefrontal cortex and hippocampal dentate gyrus of C57BL/6J mice. We have obtained a decrease in the number of 5-HT<sub>1A</sub>R/5-HT<sub>7</sub>R heterodimeric complexes in the stressed anhedonic mice in comparison to stressed control and stressed resilient animals. In contrast, no significant changes in the 5-HT<sub>1A</sub>R and 5-HT<sub>7</sub>R heterodimerization profile were detected in the dorsal raphe nuclei.

In conclusion, our data revealed that the chronic unpredictable stress paradigm represents a robust and reproducible model for the depression-like behavior in rodents. Moreover, the number of 5-HT<sub>1A</sub>R/5-HT<sub>7</sub>R heterodimers was decreased in the prefrontal cortex of C57BL/6J mice upon chronic unpredictable stress, suggesting functional role of 5-HT<sub>1A</sub>R and 5-HT<sub>7</sub>R interaction in development of depressive-like behavior.

## STRESZCZENIE

Choroby związane ze stresem są bardzo rozpowszechnione na całym świecie. Dotychczas zgromadzone dane wskazują na istnienie związku pomiędzy układem serotonergicznym a patogenezą depresji. Liczne badania z zastosowaniem technik biologii molekularnej, genetyki, histologii oraz badania behawioralne wykazały, że receptory serotoninowe, w szczególności 5-HT<sub>1A</sub> i 5-HT<sub>7</sub> (5-HT<sub>1A</sub>R i 5-HT<sub>7</sub>R), mogą pośredniczyć w odpowiedzi na stres zarówno u gryzoni, jak i u ludzi. Jednak mechanizmy wyjaśniające udział tych receptorów w chorobach związanych ze stresem nie są do końca poznane. Nasze wcześniejsze badania, przeprowadzone na mózgu myszy oraz w pierwotnych hodowlach komórek nerwowych pokazały, że 5-HT<sub>1A</sub>R i 5-HT<sub>7</sub>R mogą tworzyć heterodimery, co prowadzi do zmian w sygnalizacji serotonergicznnej. W związku z tym, celem niniejszego projektu było zbadanie funkcjonalnej implikacji heterodimeryzacji 5-HT<sub>1A</sub>R/5-HT<sub>7</sub>R poprzez modelowanie depresji u zwierząt.

Na wstępie przeprowadzono teoretyczne badania oparte na metaanalizie. Pozwoliło to na zweryfikowanie przydatności protokołu przewlekłego nieprzewidywalnego stresu do modelowania depresji u różnych szczepów gryzoni. Po wdrożeniu tego protokołu zaobserwowaliśmy, że zarówno szczury, jak i myszy wykazywały zachowanie anhedoniczne. Do badań zostały wybrane myszy C57BL/6J, ze względu na ich wyższą podatność na stres w porównaniu z innymi szczepami gryzoni, dostępność linii transgenicznych wyhodowanych na tym samym tle genetycznym oraz niższy koszt modelowania depresji w porównaniu do szczurów. Fenotyp depresyjny oceniano na podstawie trzech parametrów: anhedonii, motywacji oraz spadku masy ciała.

Następnie przeprowadzono badanie profilu ekspresji 5-HT<sub>1A</sub>R i 5-HT<sub>7</sub>R w różnych obszarach mózgu myszy w trakcie rozwoju pourodzeniowego. Wykazano, że poziom białka 5-HT<sub>1A</sub>R był podwyższony w korze przedczołowej i hipokampie w porównaniu z jądrami szwu, natomiast poziom 5-HT<sub>7</sub>R był podobny we wszystkich badanych strukturach. Dodatkowo stosując qRT-PCR pokazano znacznie podwyższony poziom mRNA 5-HT<sub>1A</sub>R w korze przedczołowej i hipokampie, w porównaniu z mRNA kodującym 5-HT<sub>7</sub>R.

Z kolei zbadano interakcję pomiędzy 5-HT<sub>1A</sub>R i 5-HT<sub>7</sub>R w mózgu myszy C57BL/6J poddanych przewlekłemu nieprzewidywalnemu stresowi. Największe zmiany w profilu heterodimeryzacji wspomnianych receptorów zaobserwowano w przyśrodkowej korze przedczołowej i w zakręcie zębatym hipokampa. W tych obszarach mózgu wykazano zmniejszoną liczbę heterodimerycznych kompleksów 5-HT<sub>1A</sub>R/5-HT<sub>7</sub>R u myszy anhedonicznych poddanych stresowi w porównaniu do stresowanych zwierząt kontrolnych

i zwierząt opornych na stres (*ang. resilient*). Co ciekawe, nie wykryto znaczących zmian w profilu heterodimeryzacji 5-HT<sub>1A</sub>R i 5-HT<sub>7</sub>R w grzbietowych jądrach szwu.

Podsumowując, nasze badania potwierdziły, że paradygmat przewlekłego nieprzewidywalnego stresu stanowi solidny i powtarzalny model depresji u gryzoni. Pokazaliśmy również spadek liczby heterodimerów 5-HT<sub>1A</sub>R/5-HT<sub>7</sub>R w korze przedczołowej myszy C57BL/6J poddanych stresowi, co sugeruje funkcjonalną rolę interakcji tych receptorów serotoniny w rozwoju zachowań podobnych do objawów depresji.