

Bożena Skupień-Rabian

Analiza wpływu wybranych leków przeciwpsychotycznych na proteom jądrowy kory mózgowej szczura

Streszczenie

Leki przeciwpsychotyczne stosowane są w terapii wielu zaburzeń psychicznych, a w szczególności schizofrenii, która stanowi poważny problem społeczny dotykając około 0.5% populacji. Objawy choroby można zaklasyfikować do trzech głównych grup: wytwórczych (np. halucynacje), ubytkowych (np. anhedonia) i zaburzeń funkcji poznawczych (np. problemy z pamięcią i uwagą). Działanie leków przeciwpsychotycznych związane jest przede wszystkim z redukcją symptomów wytwórczych, podczas gdy ich wpływ na poprawę w zakresie objawów ubytkowych i zaburzeń poznawczych wciąż jest przedmiotem dyskusji w środowisku naukowym. Ponadto, około 30% pacjentów jest oporna na leczenie. W takich przypadkach wskazane jest przyjmowanie kłozapiny, leku o wyjątkowej skuteczności, którego stosowanie wiąże się jednak z ryzykiem wystąpienia poważnych skutków ubocznych. Kwestia poprawy skuteczności oraz bezpieczeństwa terapii jest zatem bardzo istotna. Jedną z możliwości osiągnięcia postępu w tym zakresie jest lepsze poznanie i zrozumienie mechanizmów działania leków przeciwpsychotycznych. Wspólną cechą charakterystyczną tych substancji jest blokowanie receptora dopaminowego D2. Znane są również właściwości wiązania leków przeciwpsychotycznych z innymi receptorami neuroprzekazników, jednak wciąż nie jest jasne w jaki sposób przekłada się to na zmiany w procesach wewnątrzkomórkowych i szlakach sygnałowych zwłaszcza podczas długotrwałego leczenia.

Celem niniejszej pracy doktorskiej było zbadanie wpływu kłozapiny oraz jednego z najczęściej stosowanych leków przeciwpsychotycznych, risperidonu, na proteom jądrowy mózgu szczura. Dotychczas badania subproteomu jądrowego w aspekcie biochemii chorób psychicznych oraz molekularnego mechanizmu działania leków przeciwpsychotycznych były podejmowane sporadycznie, podczas gdy białka jądrowe pełnią szereg funkcji regulatorowych, a w analizach całego proteomu są często maskowane przez liczne w komórce enzymy metaboliczne i białka strukturalne. W pracy wykorzystano metody proteomiczne, które pozwalają na analizę ilościową nawet kilku tysięcy białek jednocześnie, dając kompleksowy obraz zmian, jakie zachodzą w procesach komórkowych na skutek działania danego czynnika. Na potrzeby tego eksperymentu opracowano procedurę wzbogacania proteomu jądrowego w białka wewnętrznie nieuporządkowane (IDPs, ang. *intrinsically disordered proteins*). Charakterystyka uzyskanej frakcji wykazała

nadrepzentację IDPs w jądrze komórkowym oraz wzbogacenie jądrowego subproteomu IDPs w białka zaangażowane w proces transkrypcji, a także w same czynniki transkrypcyjne. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że optymalny wgląd w proteom jądrowy można uzyskać badając zarówno wyjściową frakcję jądrową, jak i proteom jądrowy wzbogacony w IDPs. Opracowaną procedurę wykorzystano w dalszych badaniach nad mechanizmem działania klozapiny i risperidonu. Badaniu poddano korę mózgową szczurów traktowanych lekami przeciwpsychotycznymi przez okres trzech tygodni. Do osobnej analizy wyodrębniono region przedczołowy kory (PFC, ang. *prefrontal cortex*). Do identyfikacji zmian w proteomie wykorzystano trzy metody oparte o spektrometrię mas: analizę w trybie zależnym od danych, celowaną analizę proteomiczną typu PRM oraz analizę w trybie niezależnym od danych typu SWATH-MS.

Po podaniach klozapiny zaobserwowano wzrost poziomu białek poru jądrowego, wybranych ogólnych czynników transkrypcyjnych oraz białek rybosomalnych i białek związanych z biogenezą rybosomów w regionie kory mózgowej pozbawionej części przedczołowej. Sugeruje to wzmożoną syntezę białek w komórce na skutek działania leku. Zarówno klozapina, jak i risperidon zaindukowały zmiany w poziomie różnych czynników splicingowych w obu badanych regionach kory mózgowej. Badane leki podwyższyły również poziom wybranych czynników modelujących chromatynę: dla risperidonu takie zmiany zaobserwowano w PFC, natomiast dla klozapiny w pozostałej części kory mózgowej. Chroniczna ekspozycja na badane leki spowodowała obniżenie poziomu czynników transkrypcyjnych c-Fos i jun-B w obszarze kory mózgowej bez PFC. W części przedczołowej zidentyfikowano obniżony poziom c-Fos po traktowaniu risperidonem. W PFC po traktowaniu risperidonem zaobserwowano także zmianę poziomu czynnika regulującego ekspresję białka wchodzącego w skład otoczki mielinowej.

Podsumowując, w pierwszym etapie badań przeprowadzono wielkoskalową analizę proteomiczną jądrowych IDPs, która wykazała ich nadrepzentację w jądrze komórkowym oraz wzbogacenie w białka związane z procesem transkrypcji. Opracowana na tym etapie metoda wzbogacania próbki jądrowej w IDPs została wykorzystana w badaniach nad mechanizmem działania leków przeciwpsychotycznych. Zidentyfikowane zmiany w proteomie jądrowym kory mózgowej szczura wskazują, że zarówno klozapina, jak i risperidon wpływają na proces ekspresji genów na różnych jego etapach. Dodatkowo, uzyskane wyniki sugerują, że synteza białek w komórce wzrasta na skutek działania klozapiny.

Analysis of influence of selected antipsychotic drugs on the nuclear proteome of a rat brain cortex

Abstract

Antipsychotic drugs are used in the treatment of many psychiatric disorders, in particular schizophrenia, which is a serious social problem, affecting approximately 0.5% of the population. The symptoms of the disease can be classified into three main groups: positive (e.g. hallucinations), negative (e.g. anhedonia) and cognitive (e.g. problems with memory and attention). The effect of antipsychotic drugs is primarily related to the reduction of positive symptoms, while their impact on negative symptoms and cognitive dysfunctions is still a subject of discussion in the scientific community. Moreover, about 30% of patients are resistant to treatment. In such cases, clozapine is recommended as the most effective antipsychotic drug. However, its use is associated with the risk of serious side effects. Therefore, the issue of improving the effectiveness and safety of therapy is essential. One way to make progress in this area is better characterization and understanding of the mechanisms of action of antipsychotic drugs. A common feature of these substances is the blockage of the dopamine D2 receptor. The binding properties of antipsychotics to other neurotransmitter receptors are also known, but it is still unclear how this translates into changes in intracellular processes and signalling pathways, especially in long-term treatment.

The aim of the thesis was to investigate the effect of clozapine and one of the most widely used antipsychotic drugs, risperidone, on the nuclear proteome of a rat brain. So far, studies of the nuclear subproteome in the aspect of the biochemistry of psychiatric diseases and the molecular mechanism of action of antipsychotic drugs have been undertaken only occasionally, while nuclear proteins perform a number of regulatory functions, and in the analysis of the entire proteome they are often masked by highly abundant metabolic enzymes and structural proteins. Proteomic methods employed in this work allow for the identification and quantification of thousands of proteins simultaneously, providing an insight into the cellular processes affected by a given treatment. For the study of antipsychotic drugs, a procedure for enrichment of nuclear proteome in intrinsically disordered proteins (IDPs) was established. Characterization of the obtained fraction showed overrepresentation of IDPs in the cell nucleus and enrichment of the nuclear subproteome of IDPs in proteins involved in the transcription process, as well as in the transcription factors. The results showed that optimal insight into the nuclear proteome can be obtained by examining both the starting nuclear fraction and the nuclear proteome enriched in IDPs. The established

procedure was used in further research on the mechanism of action of clozapine and risperidone. The subject of the study was the cerebral cortex of rats treated with antipsychotics for three weeks. The prefrontal part of the cortex (PFC) was isolated for separate analysis. Three mass spectrometry-based methods were used to reveal changes in the proteome: data-dependent analysis, PRM-type targeted proteomic analysis, and SWATH-MS-type data-independent analysis.

Clozapine administration induced an increase in the level of nuclear pore complex proteins, selected general transcription factors as well as ribosomal proteins and proteins related to ribosome biogenesis in the area of the cerebral cortex without the prefrontal part. This suggests enhanced protein synthesis in the cell as a result of the drug treatment. For both clozapine and risperidone changes in the level of various splicing factors were detected in both studied regions of the cortex. The drugs also increased the level of selected chromatin re-modelling factors: for risperidone, such changes were observed in the PFC, and for clozapine in the rest of the cerebral cortex. Chronic exposure to the studied drugs decreased the level of c-Fos and jun-B transcription factors in the area of the cerebral cortex without PFC. In the prefrontal part, a decreased level of c-Fos was identified after risperidone treatment. The altered level of the factor regulating the expression of the myelin sheath protein was also observed in the PFC in response to risperidone.

Summarizing, in the first stage of the study, a large-scale proteomic analysis of nuclear IDPs was carried out, which showed their overrepresentation in the cell nucleus and enrichment in proteins related to the transcription process. The method of enriching the nuclear sample in IDPs established at this stage was used in research on the mechanism of action of antipsychotic drugs. The identified changes in the nuclear proteome of the rat cerebral cortex indicate that both clozapine and risperidone affect the process of gene expression at its various stages. Additionally, the obtained results suggest that protein synthesis in the cell is enhanced in response to clozapine.

Akceptuję Sylwia Kucharska-Korda

Bożena Skupień-Rabik