

Charakterystyka klozapiny i risperidonu w działaniu na poziomie jądra komórkowego

Celem projektu jest szczegółowy opis molekularnego mechanizmu działania klozapiny i risperidonu poprzez systematyczne badania indukowanych przez leki zmian w poziomie białek jądrowych oraz jądrowych białek wewnątrznie nieustrukturalizowanych pochodzących z wybranych struktur mózgu szczura oraz linii ludzkich komórek nerwowych i astrocytów. Drugim celem jest charakterystyka wpływu wyciszenia genów *SmarcA5* i *Foxp1* na pełny proteom i proteom jądrowy ludzkich linii neuronalnych i astrocytarnych oraz wybranych struktur mózgu szczurów. Ponadto zbadana zostanie zdolność klozapiny i risperidonu do zniesienia wpływu wyciszenia genów. Dodatkowo, zostaną przeprowadzone celowane eksperymenty proteomiczne oparte na roboczej hipotezie o wpływie risperidonu i klozapiny na kanoniczny szlak Wnt i sygnalizację AICD.

Zachorowalność na schizofrenię na świecie wynosi około 0,5-0,7%, co oznacza, że statystycznie 1 osoba na 200 cierpi na schizofrenię. Średnia długość życia chorych na schizofrenię jest krótsza nawet o 20 lat w porównaniu do pozostałej populacji. Wyniki 11-letnich badań nad śmiertelnością w schizofrenii (30 803 mężczyzn i 36 078 kobiet, renomowane czasopismo Lancet [1]) świadczą o tym, że śmiertelność w leczeniu klozapiną jest znacznie niższa w porównaniu do jakiegokolwiek innego leku przeciwpsychotycznego (*antipsychotic drugs*, APDs). Opublikowane ostatnio dane z 17 krajów wykazały, że klozapina jest nadal stosowana zbyt rzadko [2], chociaż nawet opóźnienie w rozpoczęciu leczenia klozapiną może być niekorzystne, szczególnie w przypadku pacjentów z lekooporną schizofrenią [3]. Jednym z powodów zbyt rzadkiego stosowania klozapiny są obawy dotyczące występowania skutków ubocznych, które są częste i poważne. W związku z tym istnieje nagła potrzeba opracowania bardziej skutecznych, i bezpieczniejszych APDs. Szansą na postęp w projektowaniu nowych APDs jest głębsze zrozumienie mechanizmu molekularnego działania leków obecnie używanych, a zwłaszcza klozapiny. Profil farmakologiczny klozapiny jest niezwykle złożony, ponieważ wiąże się do wielu różnych typów receptorów błonowych. Jednak wewnątrzkomórkowy mechanizm klozapiny działania pozostaje niejasny i nie wiadomo, które szlaki biochemiczne są odpowiedzialne za jej wyjątkową skuteczność terapeutyczną, a które związane są ze skutkami ubocznymi. Systematyczne podejście proteomiczne jest szczególnie uzasadnione i rekomendowane w przypadku APDs gdyż umożliwia ono całościowy wgląd w profil białkowy komórek czy tkanek.

W niniejszym projekcie chcemy się skoncentrować na białkach jądrowych, ponieważ komunikacja między synapsą a jądrem realizowana z udziałem synapto-jądrowe przekaźników białkowych wpływa na plastyczność synaptyczną poprzez kontrolę transkrypcji. Nasze wcześniejsze badania na pełnych lizatach tkankowych dostarczały ograniczonych informacji odnośnie jądrowych białek regulatorowych w tym czynników transkrypcyjnych, gdyż białka te występują w komórce w bardzo małej ilości. Jednak uzyskane wyniki pozwalają na postawienie hipotezy o wpływie klozapiny i risperidonu na jądrowe szlaki przekazu sygnału z udziałem AICD oraz kanonicznego szlaku Wnt. Nasze wyniki wstępne badań białek jądrowych wykazały wpływ tych leków m.in. na transport jądrowy, regulację chromatyny i transkrypcji. Interesujące odkrycie dotyczące białek *SmarcA5* i *Foxp1* chcielibyśmy zweryfikować poprzez analizę wpływu wyciszenia tych genów na pełny profil białkowy oraz subproteom jądrowy, a następnie zbadać zdolność klozapiny i risperidonu do zniesienia efektu wyciszenia.

W projekcie zastosujemy bardzo zaawansowaną metodykę opartą na spektrometrii mas: ilościową bezznacznikową technikę *shotgun*, która pozwoli na identyfikację białek regulowanych przez leki lub wyciszenie genu oraz technikę celowanej proteomiki (*parallel reaction monitoring*, PRM), która umożliwi walidację wyników badań *shotgun* ale także pozwoli na weryfikację postawionych hipotez. Do wyciszenia genów zostanie zastosowana zmodyfikowana technologia CRISPR/Cas9, która pozwala na specyficzne dla neuronów wyciszenie genu. Analizy nad komórkami SH-SY5Y zróżnicowanymi do neuronów i komórkami NT2 zróżnicowanymi do neuronów lub astrocytów ułatwią interpretację wyników uzyskanych dla struktur mózgu (kora przedczołowa, hipokamp, prążkowie, wzgórze). Wyniki zostaną również potwierdzone na poziomie mRNA z użyciem techniki qRT-PCR i funkcjonalnie przy użyciu metody obrazowania cytometrycznego. **Według naszej wiedzy, nie ma żadnych publikacji dotyczących wpływu jakiegokolwiek leku przeciwpsychotycznego na proteom jądrowy. Dlatego planowane badania są innowacyjne i pozwolą na poszerzenie wiedzy o molekularnym mechanizmie działania klozapiny i risperidonu.**