

**mgr Magdalena Zygmunt**

**Promotor: dr hab. Jan Rodriguez Parkitna**

**Promotor pomocniczy: dr Michał Korostyński**

## **Wpływ leków psychotropowych na ekspresję alternatywnych transkryptów w mózgu**

### **Streszczenie**

Pomimo kilku dekad intensywnych badań wciąż słabo poznaliśmy etiologię zaburzeń psychicznych i nie w pełni rozumiemy mechanizmy decydujące o skuteczności ich farmakoterapii. Szczególnie zaskakiwać może drugi z tych problemów – w większości przypadków biologiczne punkty uchwytu leków są opisane i mamy obszerną wiedzę względem mechanizmów komórkowych, z którymi są one związane. Problem leży jednak w tym, że leki często działają plejotropowo, w znacznej mierze poprzez mechanizmy pośrednie, a do tego mogą mieć przeciwstawne efekty na różne typy komórek nerwowych. Stąd też najczęściej stosowana klasyfikacja leków psychotropowych oparta jest o wskazanie medyczne, np. leki przeciwdepresyjne, przeciwpsychotyczne czy przeciwłękowe, przy czym w ramach poszczególnych klas występują leki o mocno zróżnicowanych profilach receptorowych oraz innych mechanizmach działania na poziomie molekularnym. Stworzenie klasyfikacji leków w oparciu o ich wewnątrzkomórkowe mechanizmy działania pozwoliłoby na zrozumienie etiopatologii chorób psychicznych, skuteczniejsze poszukiwanie wskaźników ich efektywności oraz nowych dróg terapii, ale jak dotąd podejmowane wysiłki nie przyniosły znaczących postępów.

Na poziomie komórkowym leki psychotropowe wpływają m.in. na reorganizację i normalizację połączeń neuronalnych. Procesy inicjujące i kontrolujące powstawanie oraz rozwój zmian neuroplastycznych są zależne od ekspresji odpowiednich genów i syntezy nowych produktów białkowych. Zrozumienie mechanizmów molekularnych aktywowanych przez leki psychotropowe może pomóc wyjaśnić dlaczego wiele z efektów klinicznych ich działania pojawia się dopiero po dłuższym czasie stosowania. Ponadto, wiele genów wykazuje ekspresję alternatywnych izoform, które mogą pełnić w komórce odrębną lub nawet przeciwną funkcję, zaś proces alternatywnej transkrypcji jest zjawiskiem szczególnie częstym w układzie nerwowym. Wiedza na temat poszczególnych jednostek transkrypcyjnych i ich wzorców ekspresji w określonych rodzajach komórek nerwowych jest niezbędnym pierwszym krokiem do poznania roli danego genu w pracy mózgu, a także sposobu jego zaangażowania w działanie leków psychotropowych.

Celem moich badań było wskazanie zmian w ekspresji genów wywołanych działaniem leków psychotropowych, które mogłyby wskazać mechanizmy inicjujące ich długotrwałe efekty oraz umożliwić klasyfikację opartą o podobieństwa na poziomie transkrypcji.

W pierwszym etapie badań przeprowadziłam pogłębioną analizę zmian transkryptomu zachodzącą pod wpływem leków psychotropowych. Wykorzystałam metodę sekwencjonowania następnej generacji (NGS), do zbadania zmian ekspresji transkryptów w dwóch strukturach mózgu myszy (kora przedczołowa i jądro półleżące przegrody) wywołanych podaniem leków reprezentujących różne klasy terapeutyczne. Wykazałam, że transkrypty można podzielić na podgrupy, dla których określony został specyficzny wzór regulacji, zaangażowane czynniki transkrypcyjne i ontologie funkcjonalne. Zmiany w ekspresji zidentyfikowanych przez RNA-seq alternatywnych transkryptów genów potwierdziłam w niezależnych doświadczeniach z wykorzystaniem ilościowej reakcji PCR.

Druga część rozprawy skupia się na wybranym przykładzie genu *Dclk1*. Lepsze zrozumienie działania *Dclk1* jest szczególnie istotne, gdyż zaobserwowano asocjację występowania polimorfizmów tego genu ze skłonnością do schizofrenii i zespołu nadpobudliwości psychoruchowej u ludzi. Oznacza to, że regulacja ludzkiego genu *DCLK1* może pełnić rolę w etiologii zaburzeń neuropsychiatrycznych, jak i mechanizmie działania leków zwalczających objawy chorobowe. Gen *Dclk1* posiada wiele wariantów transkrypcyjnych powstałych poprzez wykorzystanie dwóch alternatywnych promotorów i alternatywne składanie eksonów. Warianty te różnią się profilem ekspresji i aktywnością kinazową. Dotychczasowe badania wskazywały na udział kinazy *Dclk1* w neurogenezie i plastyczności synaptycznej, jednakże proces regulacji transkrypcyjnej i znaczenia biologicznego różnych wariantów genu *Dclk1* pozostawał wciąż słabo poznany. W tej części rozprawy przedstawiłam regulację izoform tego genu po podaniu wybranych leków psychotropowych. Ponadto, w moich badaniach po raz pierwszy wskazałam na specyficzny dla działania mianseryny i rysperydonu proces regulacji ekspresji nowego wariantu transkrypcyjnego nazwanego *Dclk1-m*.

Podsumowując, w wyniku badań prowadzonych w ramach mojej rozprawy doktorskiej zidentyfikowany został zbiór wariantów transkrypcyjnych oraz niekodujących RNA regulowanych podaniem leków psychotropowych. W dalszych doświadczeniach dokonałam weryfikacji wywołanych działaniem leków zmian ekspresji wybranych alternatywnych transkryptów, poświęcając szczególną uwagę *Dclk1*. Zidentyfikowałam nowy krótki transkrypt i pokazałam, że jego ekspresja prawdopodobnie zależy od aktywacji receptorów 5HT2A. Otrzymane wyniki mogą pomóc zrozumieć udział *Dclk1-m* w regulacji procesów neuroplastycznych wywołanych przez leki psychotropowe, których efekty mediowane są poprzez receptory 5HT2A. Moje wyniki znacząco

pogłębiają zrozumienie działania leków na ekspresję genów, przenosząc analizę na poziom indywidualnych transkryptów. Mam nadzieję, że przyczyni się to do możliwości klasyfikacji leków psychotropowych w oparciu o ich molekularne mechanizmy działania. W dalszej perspektywie, zgromadzona wiedza może otworzyć nowe perspektywy w badaniach neurobiologicznych podstaw leczenia zaburzeń psychiatrycznych i afektywnych, w tym wyjaśnić rolę zróżnicowania sekwencji genu *DCLK1* w podatności na choroby psychiatryczne i afektywne.

**mgr Magdalena Zygmunt**

**Promotor: dr hab. Jan Rodriguez Parkitna**

**Promotor pomocniczy: dr Michał Korostyński**

## **Wpływ leków psychotropowych na ekspresję alternatywnych transkryptów w mózgu**

### **Abstract**

Despite several decades of intensive research, our understanding of the etiology of mental disorders and the mechanisms that determine the effectiveness of their treatment remain limited. The second of these problems is arguably more surprising - in most cases the biological drug targets are known and we have considerable knowledge of the cellular mechanisms with which they are associated. The problem, however, is that drugs often act pleiotropically, through indirect mechanisms, and they can have opposite effects on different types of nerve cells. Therefore, the most commonly used classification of psychotropic drugs is based on a medical indication, e.g. antidepressants, antipsychotics or anxiolytics, with classes with very diverse receptor profiles and other mechanisms of action at the molecular level. The development of drug classification based on their intracellular mechanisms of action would provide insight into the etiopathology of mental disorders, indicate better biomarkers of drug effectiveness and novel targets for pharmacotherapy.

At the cellular level, psychotropic drugs affect, among others, the reorganization and normalization of neuronal connections. The processes initiating and controlling the formation and development of neuroplastic changes requires gene expression and *de novo* protein synthesis. Understanding the molecular mechanisms activated by psychotropic drugs may help explain why many of their clinical effects appear only after prolonged use. In addition, many genes express alternative isoforms that can play a distinct or even opposite roles, and the alternative transcription process is a particularly frequent phenomenon in the central nervous system. Knowledge about individual transcription units and their expression patterns in specific types of neuronal cells is an indispensable first step for understanding the role of a given gene in brain function, as well as how it is involved in the action of psychotropic drugs.

The aim of my research was to verify the hypothesis that the transcriptional effects of psychotropic drugs with different clinical profiles reflect the activation of specific molecular pathways and the directions of plastic processes.

In the first part of the research, I carried out an in-depth analysis of brain transcriptome changes under the influence of psychotropic drugs. I used the next-generation sequencing (NGS) to study changes in transcript expression levels in the two mouse brain structures (prefrontal cortex and nucleus accumbens) after the administration of drugs representing different therapeutic classes. I found that transcripts can be divided into subgroups, for which a specific patterns of regulation, sets of transcription factors and functional gene ontologies were specified. Expression of selected transcripts that exhibited an atypical profile was confirmed using an independent method.

The second part of the dissertation focuses on the chosen example of the *Dclk1* gene. Investigation of DCLK1 action is particularly important as an association of the occurrence of this gene sequence polymorphisms with schizophrenia and attention-deficit hyperactivity disorder in humans has been observed. This means that the regulation of DCLK1 may play a role in the etiology of neuropsychiatric disorders as well as the mechanism of action of drugs that combat disease symptoms. The *Dclk1* gene has many transcriptional variants resulting from the usage of two alternative promoters and the alternative assembly of exons. These variants differ in the expression profile and kinase activity. Previous studies have indicated the participation of *Dclk1* kinase in neurogenesis and synaptic plasticity, however, the process of transcriptional regulation and biological significance of various variants of the *Dclk1* gene remains still poorly understood. In this part of the dissertation, I presented the regulation of isoforms of this gene after administration of selected psychotropic drugs. These results show for the first time that the mianserin and risperidone treatment affects regulation of specific transcriptional variant Dclk1-m.

In conclusion, as a result of research carried out as part of my doctoral dissertation, a database of transcriptional isoforms and non-coding RNAs regulated by the administration of psychotropic drugs was created. Based on profiling results, I selected a few candidate genes with multiple transcripts, including *Dclk1*, for further analysis. In this way I have identified a novel transcript of the murine *Dclk1* gene, which appears to be specifically regulated by psychotropic drugs acting through 5HT2 receptors, and may be involved in the mechanisms that underlie the observed association between DCLK1 polymorphisms and susceptibility to psychotic and affective disorders in humans.