

Załącznik nr 2



Krakowska Akademia
im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego

Autoreferat

Przedstawiający opis osiągnięć naukowych

Anna Sadakierska-Chudy

Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu
Zakład Fizjologii i Patofizjologii

Kraków, 2017

Spis treści:

1. IMIĘ I NAZWISKO:	2
2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE:	2
3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH:	2
4. OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ. U. NR 65, POZ. 595 ZE ZM.):	3
a) Tytuł osiągnięcia naukowego	3
b) Autorzy i tytuły publikacji	3
c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.	4
5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH:	16
a) Osiągnięcia naukowo-badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora	16
b) Osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora	18
6. PIŚMIENNICTWO:	22

1. IMIĘ I NAZWISKO:

Anna Sadakierska-Chudy

2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE:

- 2007 doktor nauk medycznych, specjalność biologia medyczna, Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Tytuł rozprawy doktorskiej: „*Konstrukcja i wklonowanie do plazmidu elementów genu VEGF*”
- 2000 podyplomowe studia marketingu, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Nauk Ekonomicznych i Zarządzania
- 1988 magister biologii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi

3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH:

- 02.2017–obecnie** *adiunkt*, Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego, Kraków, Zakład Fizjologii i Patofizjologii
- 2012 – obecnie** *adiunkt*, Instytut Farmakologii PAN, Kraków, Zakład Farmakologii, Pracownia Farmakologii Uzależnień
- 2011 – 2012** *adiunkt*, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków, Katedra Biochemii Klinicznej, Zakład Diagnostyki Genetycznej i Nutrigenomiki
- 2009 - 2011** *adiunkt*, Instytut Farmakologii PAN, Kraków, Zakład Farmakokinetyki i Metabolizmu Leków
- 2007 – 2009** *adiunkt*, Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich, Wrocław, Katedra i Zakład Medycyny Sądowej, Zakład Technik Molekularnych
- 2005 - 2007** *wykładowca*, Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich, Wrocław, Katedra i Zakład Medycyny Sądowej, Zakład Technik Molekularnych
- 2004 – 2005** *wolontariusz*, Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich, Wrocław, Katedra i Zakład Medycyny Sądowej, Zakład Technik Molekularnych
- 2000 - 2003** *asystent*, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Pracownia Genetyki

4. OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ. U. NR 65, POZ. 595 ZE ZM.):

a) Tytuł osiągnięcia naukowego

„Zmiany molekularne w różnych strukturach mózgu szczurów na poziomie genomu jądrowego i mitochondrialnego oraz epigenomu po odstawieniu kokainy”

Podstawę habilitacji stanowi cykl pięciu monotematycznych prac opublikowanych w latach 2014-2017 o sumarycznym **IF** (*Impact Factor* wg Journal Citation Reports JCS) wynoszącym **28.99** (**KBN/MNiSW 185** pkt). We wszystkich pracach jestem pierwszym autorem.

b) Autorzy i tytuły publikacji

[P-1] Sadakierska-Chudy A, Frankowska M, Miszkiewicz J, Wydra K, Jastrzębska J, Filip M. (2017) Prolonged induction of miR-212/132 and REST expression in rat striatum following cocaine self-administration. *Mol Neurobiol.*, 54:2241–2254 (IF₂₀₁₆ = **6.19**, KBN/MNiSW=**40** pkt)

[P-2] Sadakierska-Chudy A, Frankowska M, Jastrzębska J, Wydra K, Miszkiewicz J, Sanak M, Filip M. (2017) Cocaine administration and its withdrawal enhance the expression of genes encoding histone-modifying enzymes and histone acetylation in the rat prefrontal cortex. *Neurotox Res.*, 32:141–150 (IF₂₀₁₆ = **2.942**, KBN/MNiSW = **25** pkt)

[P-3] Sadakierska-Chudy A, Frankowska M, Wydra K, Jastrzębska J, Miszkiewicz J, Filip M. (2017) Increased 5-hydroxymethylation levels in the hippocampus of rat extinguished from cocaine self-administration. *Hippocampus*, 27:811–821 (IF₂₀₁₆ = **3.945**, KBN/MNiSW = **35** pkt)

[P-4] Sadakierska-Chudy A, Kotarska A, Frankowska M, Jastrzębska J, Wydra K, Miszkiewicz J, Przegaliński E, Filip M. (2016) The alterations in mitochondrial DNA copy number and nuclear-encoded mitochondrial genes in rat brain structures after cocaine self-administration. *Mol Neurobiol.* DOI 10.1007/s12035-016-0153-3 (IF₂₀₁₆ = **6.19**, KBN/MNiSW = **40** pkt)

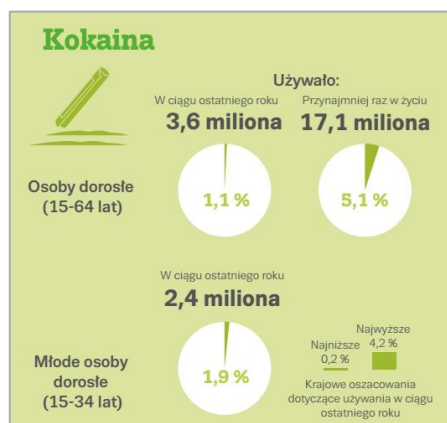
[P-5] **Sadakerska-Chudy A, Frankowska M, Filip M. (2014)** Mitoepigenetics and drug addiction. *Pharmacology & Therapeutics*, 144:226–233 (IF₂₀₁₆ = **9.723**, MNiSW = **45 pkt**)

Badania naukowe, opisane w wymienionych publikacjach finansowane były przez Narodowe Centrum Nauki w ramach grantu MAESTRO nr UMO-2012/06/A/NZ3/00022 oraz Instytut Farmakologii Polskiej Akademii Nauk w Krakowie w ramach środków przeznaczonych na działalność statutową.

c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Wprowadzenie

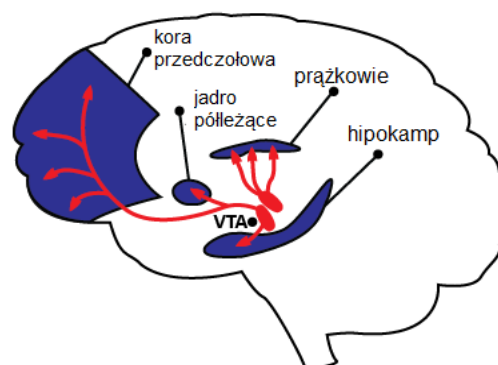
Według raportu Europejskiego Centrum Monitorowania Narkotyków i Narkomanii (ECMDDA) z roku 2016, kokaina jest najczęściej stosowaną nielegalną substancją pobudzającą w Europie (Raport EMCDDA, 2016). Szacuje się, że w ubiegłym roku około 2,4 mln młodych osób (15-34 lat) użyło kokainę (ryc. 1).



Ryc. 1 Szacunkowe dane dotyczące używania kokainy w Unii Europejskiej (Raport EMCDDA, 2016).

Od momentu utworzenia w Stanach Zjednoczonych Narodowego Instytutu Uzależnień Narkotykowych (*National Institute on Drug Abuse, NIDA*), czyli od roku 1974, podejmowane są próby wyjaśnienia mechanizmu powstawania uzależnienia od substancji psychoaktywnych. Zgodnie z definicją przyjętą przez ICD-10 (*International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*) „Uzależnieniem nazywamy

kompleks zjawisk fizjologicznych, behawioralnych i poznawczych, wśród których przyjmowanie substancji lub grupy substancji dominuje nad innymi zachowaniami, które miały poprzednio dla pacjenta większą wartość”. Uzależnienie od substancji psychoaktywnych traktowane jest jako ciężka przewlekła, nawracająca choroba ośrodkowego układu nerwowego, charakteryzująca się kompulsywnym poszukiwaniem (*drug-seeking*) i pobieraniem (*drug-taking*) substancji. Kolejną ważną cechą uzależnień jest ich nawrotowość, czyli pojawienie się silnego pragnienia przyjęcia substancji (głód narkotykowy, *drug craving*), nawet po długich okresach abstynencji, które prowadzi do nawrotu do nałogu (Koob i Le Moal, 2001). Najważniejszym miejscem działa dla wszystkich uzależniających substancji psychoaktywnych w mózgu jest układ nagrody (*reward system*), nazywany mezolimbicznym układem dopaminowym. Układ nagrody tworzą połączone ze sobą struktury mózgu, takie jak jądra dopaminergiczne brzuszego pola nakrywki (*ventral tegmental area*, VTA) i istoty czarnej (*substantia nigra*, SN), jądro połączone przegrody (*nucleus accumbens*, NAc), kora przedczołowa (*prefrontal cortex*, PFC), ciało migdałowe (*amygdala*), prążkowie (*striatum*) i hipokamp (*hippocampus*, HIP) (ryc. 2).



Ryc. 2 Struktury należące do układu nagrody w mózgu człowieka. Szlaki dopaminowe - strzałki czerwone.

Mimo rozwoju nowych technik eksperymentalnych, które wzbogaciły warsztat badawczy farmakologów, neurobiologów, biochemików i genetyków, wciąż nie mamy wystarczającej wiedzy na temat neurobiologicznego podłoża związanego z nabywaniem i utrzymaniem się zmian adaptacyjnych w fenotypie uzależnienia. W ostatnich latach wiele badań skupia się na zmianach molekularnych indukowanych przez substancje psychoaktywne. Badania te wskazują, że długotrwałe podawanie uzależniających substancji psychoaktywnych promuje zmiany w acetylacji, metylacji oraz fosforylacji

histonów i wspólnie ze zmianami w poziomie metylacji DNA kontroluje aktywność transkrypcyjną genomu (Biliński i wsp., 2012). Kokainie przypisuje się modulowanie efektów behawioralnych poprzez jej wpływ na procesy epigenetyczne i transkrypcyjne (Robison i Nestler, 2011).

Badania nad molekularnymi efektami działania kokainy prowadzone są najczęściej w fazie podtrzymania nałogu kokainowego (*maintenance*). Według nas faza wygaszania zachowań poszukiwawczych (*extinction training*) jest również bardzo istotna w procesie odchodzenia od nałogu, dlatego identyfikacja zmian zachodzących w tym okresie jest ważna dla ustalenia w przyszłości skuteczniejszej farmakoterapii zapobiegającej nawrotom. Dlatego też postanowiliśmy przeprowadzić przesiewowe, a następnie szczegółowe analizy molekularne podczas fazy odstawienia kokainy u szczurów.

Celem podjętych badań prowadzonych na poziomie:

- * genomu jądrowego (ekspresja genów kodujących białka oraz cząsteczki regulatorowe),
- * genomu mitochondrialnego (liczba kopii mtDNA oraz ekspresja genów mitochondrialnych),
- * epigenomu (znaczniki epigenetyczne DNA i białek histonowych),

była identyfikacja zmian, które pomogłyby wyjaśnić mechanizmy regulacji i złożoną naturę zachowań poszukiwawczych (głodu narkotykowego). We wszystkich przeprowadzonych doświadczeniach wykorzystaliśmy model dożylnego samopodawania kokainy u szczurów, rozszerzony o procedurę sprzężenia ("yoked") celem uzyskania właściwych grup kontrolnych oraz oddzielenia motywacyjnych od farmakologicznych efektów substancji psychoaktywnej. Zwierzę samopodające kokainę było sprzężone z osobnikiem biernie otrzymującym kokainę (w tej samej ilości i wzorze samopodawania) lub biernie otrzymującym sól fizjologiczną (procedura została szczegółowo opisana w każdej z prac w części „Materiały i metody”). Analizy molekularne przeprowadzaliśmy w grzbietowym prążkowie (*dorsal striatum*, DST), HIP i PFC, strukturach odgrywających kluczową rolę w indukcji fenotypów uzależnienia (Koob i Volkow, 2010). Badania zostały wykonane w okresie samopodawania kokainy jak i jej odstawienia (w dniu 3. i/lub 10.) celem uwidocznienia trwałości zmian.

Uzyskane wyniki

Uzależnienie od kokainy może indukować zmiany neuroplastyczności, a jej długotrwałe przyjmowanie ma wpływ na ekspresję genów kodujących nie tylko białka, ale także małe regulatorowe cząsteczki RNA (miRNA) (Bali i Kenny, 2013). Wcześniejsze badania ujawniły, że cząsteczki miRNA mogą zmieniać morfologię dendrytów (Chandrasekar i Dreyer, 2009), inicjować długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (*long-term potentiation*, LTP) (Ryan i wsp., 2015) i indukować zmiany behawioralne (Dreyer, 2010). Wiele różnych cząsteczek miRNA uczestniczy w post-transkrypcyjnej regulacji ekspresji genów zaangażowanych w plastyczność synaptyczną przez co mogą one wpływać na proces synaptycznej adaptacji i rozwój fenotypu uzależnienia. Ponadto liczne dowody pokazują, że kokaina może indukować przejściowe i utrzymujące się zmiany w ekspresji genów, które są ważne dla procesu uzależnienia (Walker i wsp., 2015; Yuferov i wsp., 2005). Wyniki badań wskazują, że DST, jest kluczowym obszarem mózgu dla eskalacji przyjmowania kokainy, powstawania zachowań nawykowych oraz kompulsywnych zachowań poszukiwawczych (Volkow i wsp., 2006). Dlatego postanowiliśmy ocenić zmiany w ekspresji genów kodujących: małe, regulatorowe cząsteczki RNA (miRNA) oraz białka zaangażowane w ich transkrypcję i biogenezę u szczurów poddanych procedurze samopodawania i wygaszania zachowań poszukiwawczych.

W naszym badaniu analizowaliśmy cztery dojrzałe cząsteczek miRNA (*miR-124*, *miR-132*, *miR-134* i *miR-212*), które są szczególnie ważne dla funkcji neuronów, plastyczności i uzależnienia od substancji psychoaktywnych. Klaster *miR-212/132* wydaje się szczególnie interesujący ponieważ reguluje geny kodujące białka i enzymy wchodzące w skład kompleksów remodelujących strukturę chromatyny (np. *MeCP2*, *p300* czy *Kdm5A*) (Wanet i wsp., 2012). W związku z tym, że w biogenezę i funkcję miRNA zaangażowana jest złożona maszyna enzymatyczna, rozszerzyliśmy nasze badania na geny i białka zaangażowane w te procesy. Naszą uwagę skupiliśmy na białku argonaut-2 (*Ago2*), *Pumilio-2* (*Pum2*) i *REST*. *Ago2* buduje katalityczny kompleks *RISC* (*RNA-induced silencing complex*) uczestniczący w obróbce miRNA i wyciszaniu docelowych mRNA. Wcześniejsze badania wykazały, że knock-out genu *Ago2* w neuronach NAc osłabiał motywacyjny aspekt samopodawania kokainy (Schaefer i wsp., 2010), a chroniczne podawanie kokainy zwiększało zarówno poziom mRNA jak i białka *Ago2* w prążkowie szczurów. Białko *Pum2* reguluje wyciszanie genów zależne od miRNA, a w regionie 3'UTR mRNA *Pum2* znajdują się miejsce docelowe dla *miR-134* (Fiore i wsp., 2009).

Zaobserwowano również, że transkrypcyjny i epigenetyczny czynnik regulatorowy REST (*RE1 silencing transcription factor*) może kontrolować ekspresję, przetwarzanie i funkcję wielu miRNA oraz genów kodujących białka ważne dla funkcji neuronu (np. kanały jonowe, receptory neurotransmiterów i pęcherzyki synaptyczne) (Qureshi i Mehler, 2011). Giusti i wsp. (2014) wykazali, że chroniczne podawanie kokainy zwiększyło poziom mRNA *REST* w prążkowiu i NAc szczurów.

Schemat przyjętego przez nas eksperymentu behawioralnego wraz z grupami badanych zwierząt został szczegółowo opisany w części merytorycznej pracy i zilustrowany na rycinach 1 i 2 (**P-1**). Przeprowadzone badania wykazały statystycznie znamienne wzrost ekspresji *miR-132* i *-212* oraz mRNA i białka REST jedynie u szczurów aktywnie pobierających kokainę zarówno w fazie podtrzymania nałogu jak i w 10. dniu wygaszania zachowań poszukiwawczych (**P-1**, ryc. 3, 4, 5; tab. 2 i 3). Wyniki sugerują że, aktywne przyjmowanie kokainy indukuje długotrwały wzrost ekspresji *miR-132* i *-212* oraz transkryptu i białka REST. Powyższe zmiany wiążemy z motywacyjnymi właściwościami kokainy, ponieważ nie występują one u zwierząt biernie otrzymujących substancję. Wydaje się, że białko REST mogłoby być molekularnym markerem zachowań motywacyjnych w uzależnieniu od kokainy. Przeprowadzona analiza Western Blot ujawniła, że poziom białka Ago2 i Pum2 wzrósł w fazie wygaszania zachowań poszukiwawczych w grupie zwierząt aktywnie przyjmujących kokainę (**P-1**, ryc. 5). Zmiany w poziomie tych białek prawdopodobnie są wynikiem nowej formy uczenia jaką jest wygaszanie zachowań poszukiwawczych prowadzone w klatkach eksperymentalnych, ale aby potwierdzić to przypuszczenie konieczna jest dalsza analiza. Opierając się na uzyskanych wynikach i dostępnej literaturze sugerujemy przypuszczalne ścieżki sygnałowe zaangażowane w długotrwałą, zaobserwowaną w naszym badaniu, upregulację *miR-132* i *-212* (**P-1**, ryc. 6) oraz prawdopodobny mechanizm interakcji między miRNA a badanymi przez nas białkami (**P-1**, ryc. 7).

Długotrwałe zmiany w ekspresji genów mogą być spowodowane zmianami epigenetycznymi, które są indukowane chronicznym przyjmowaniem kokainy (Robison i Nestler, 2011). Zaobserwowane przez nas zmiany w poziomie ekspresji genu i białka REST oraz miRNA (cząsteczek uczestniczących w regulacji epigenetycznej) wydają się potwierdzać udział kokainy w regulacji procesu transkrypcji poprzez jej wpływ na białka i elementy regulatorowe zaangażowane w kształtowanie struktury chromatyny. Trwałość głodu narkotykowego i ryzyko nawrotu przypisywane jest mechanizmom epigenetycznym, które wydają się być dobrym kandydatem wyjaśniającym długotrwałe zmiany molekularne.

Aktualnie większość badań nad mechanizmami epigenetycznymi zaangażowanymi w przyjmowanie i poszukiwanie kokainy skupia się na strukturach dopaminergicznych związanych z układem nagrody. Badania głównie koncentrują się na ocenie zmian metylacji DNA i post-translacyjnych modyfikacji histonów (*posttranslational modifications* - PTMs) w NAc, regionie integrującym układ nagrody.

Biorąc pod uwagę fakt, iż w fazie wygaszania ma miejsce nowe, aktywne uczenie i powstanie nowej hamującej „pamięci wygaszania” (*extinction memory*) z udziałem PFC, postanowiliśmy przeprowadzić w tej strukturze analizy molekularne w fazie podtrzymania nałogu oraz wczesnej i późnej (3. i 10. dzień) fazie wygaszania. Przeanalizowaliśmy profil ekspresji genów oraz poziomu metylacji i acetylacji białek histonowych (histon H3 i H4) w PFC w grupie zwierząt aktywnie przyjmujących kokainę oraz biernie otrzymujących kokainę lub sól fizjologiczną (kontrola). Diagram ilustrujący poszczególne etapy eksperymentu behawioralnego oraz grupy badanych zwierząt prezentuje rycina 1 (**P-2**). Analiza profilu ekspresji genów metodą mikromacierzy ujawniła zmiany w poziomie 416 transkryptów w PFC u zwierząt aktywnie przyjmujących kokainę w porównaniu z kontrolą (sól fizjologiczna) (**P-2**, Materiał uzupełniający - tabela S1). Dodatkowo, przeprowadzona analiza Gene Ontology (GO) pozwoliła na pogrupowanie genów pod kątem ich funkcji (GO.MF) i lokalizacji w komórce (GO.CC) (**P-2**, Materiał uzupełniający - tabela S2). Wśród genów o zmienionej ekspresji zidentyfikowaliśmy te które kodują enzymy odpowiedzialne za post-translacyjne modyfikacje histonów, a następnie przeprowadziliśmy ich analizę w obrębie trzech grup zwierząt. Spośród 7 z 9 wyselekcjonowanych genów istotnie zwiększoną ekspresję obserwowano jedynie w grupie aktywnie przyjmującej kokainę co zobrazowano w postaci map ciepłych (*heat maps*) (**P-2**, ryc. 2). Przeprowadzona przez nas analiza ekspresji wyselekcjonowanych genów (metodą RT-qPCR) w trzech punktach czasowych wykazała, że zwierzęta aktywnie przyjmujące kokainę mają podwyższony poziom mRNA *Kdm6a* i *Smarcc2* jedynie w fazie podtrzymania nałogu, a poziom *Brd1* zarówno w fazie podtrzymania jak i wczesnej fazie (3. dzień) wygaszania zachowań poszukiwawczych (**P-2**, ryc. 3, tabela 3). Ponadto, zaobserwowaliśmy wzrost pięciu transkryptów (*Dot1l*, *Kdm5a*, *Kdm6a*, *Kdm6b* i *Kdm7a/Jhdm1d*) wyłącznie we wczesnej fazie wygaszenia zarówno w grupie samopodającej jak i biernie otrzymującej kokainę (**P-2**, ryc. 3, tabela 3). Uzyskane wyniki wskazują na to, że zarówno w fazie podtrzymania nałogu i wygaszania zachowań poszukiwawczych dochodzi do upregulacji genów kodujących ważne dla remodelingu chromatyny białka. Analiza zmian całkowitego poziomu acetylacji i metylacji białek

histonowych, uwzględniająca 15 różnych modyfikacji korespondujących ze zmianą w ekspresji genów kodujących enzymy modyfikujące, ujawniła wzrost acetylacji lizyny 9 histonu H3 (H3K9ac) i lizyny 8 histonu H4 (H4K8ac) w dwu grupach zwierząt tj. aktywnie i biernie otrzymujących kokainę (**P-2**, ryc. 4). Wykazaliśmy, że większość analizowanych genów kodujących enzymy promujące aktywny stan chromatyny zwiększało swoją ekspresję we wczesnej (3. dzień) ale nie późnej (10. dzień) fazie wygaszania zachowań poszukiwawczych. Wykryty wzrost ekspresji genu *Brd1*, który koduje białko wchodzące w skład kompleksu acetylotransferaz MOZ/MORF stymulującego acetylację histonów H3 i H4, może sugerować udział kodowanego przez niego białka w zaobserwowanym przez nas wzroście poziomu acetylacji histonu H3K9 i H4K8.

Wskazuje się, że oprócz zmian w PFC również w HIP dochodzi do zmian plastyczności podczas fazy wygaszania zachowań poszukiwawczych (Gass i Chandler i wsp., 2013). Stąd wzrost zainteresowania HIP jako strukturą powiązaną z układem nagrody, zaangażowaną w poszukiwanie (*drug-seeking*) i zdobycie narkotyku (*drug craving*) wywołane kontekstem (Volkow i Fowler, 2000; García-Fuster i wsp., 2012). Według Taubenfeld i wsp. (2010) mechanizmy hipokampalne mają decydujące znaczenie nie tylko dla ustalenia preferencji miejsca indukowanej substancją psychoaktywną, ale również powiązania pamięci preferencji miejsca z wycofaniem substancji uwarunkowanej kontekstem. Dlatego postanowiliśmy przeanalizować, podobnie jak w PFC, profil ekspresji genów w HIP we wczesnej (3. dzień) i późnej (10. dzień) fazie wygaszania zachowań poszukiwawczych wykorzystując macierze ekspresyjne.

Analiza wyników macierzy ekspresyjnych wskazała 26 genów o istotnie zwiększonej ekspresji utrzymującej się między 3. a 10. dniem wygaszania reakcji instrumentalnej u zwierząt aktywnie przyjmujących kokainę w odniesieniu do kontroli (biernie otrzymującej sól fizjologiczną) (**P-3**, tabela 1). Spośród tych genów do dalszych analiz wybraliśmy gen kodujący białko Tet3, które ze względu na udział w procesie demetylacji DNA, może wpływać na aktywność transkrypcyjną genomu. Białko Tet3 to enzym należący do rodziny TET (*ten-eleven translocation*), enzymy te biorą udział w procesie oksydacji 5-metylocytozyny (5-mC) do 5-hydroksymetylocytozyny (5-hmC). Najnowsze badania wskazują na korelację między poziomem 5-hmC w obrębie genu (*gene body*) a poziomem jego transkryptu w mózgu człowieka (Wen i wsp., 2014). Analiza ekspresji genów regulowanych z udziałem białka Tet3 wskazała, odpowiednio, 9 i 16 genów upregulowanych w 3. i 10. dniu wygaszania (**P-3**, tabela 2 i ryc. 2). Aby ustalić czy zmiany w ekspresji genu *Tet3* są charakterystyczne tylko dla abstynencji kokainowej połączonej z

wygaszaniem, przeprowadziliśmy również analizy u zwierząt przechodzących fazę abstynencji w klatkach domowych (*home cage*). Dokładny przebieg eksperymentów behawioralnych z uwzględnieniem grup badanych zwierząt, punktów czasowych i sposobów abstynencji/wygaszania prezentuje rycina 1 (P-3).

Walidacja ekspresji *Tet3* metodą RT-qPCR potwierdziła statystycznie istotny wzrost poziomu transkryptu w obu wczesnej i późnej fazie wygaszania (P-3, ryc. 3). Ponadto, obserwowaliśmy spadek ekspresji genu *Tet3* zarówno w 3. jak i 10. dniu abstynencji w klatkach domowych, jednak poziom transkryptu nie przekroczył przyjętego w analizie punktu odcięcia ($FC_{\text{cutoff}} = 0,5$) (P-3, ryc. 3). Dodatkowo, przeprowadzona przez nas analiza statusu metylacji DNA regionów promotorowych z wykorzystaniem metody MeDIP-chip w obu fazach wygaszania zachowań poszukiwawczych ujawniła wiele promotorów o zróżnicowanej metylacji w grupie zwierząt aktywnie przyjmujących kokainę lub w grupie kontrolnej (P-3, Materiały uzupełniające - tabela S1 i S2, ryc. S4). Wśród wyselekcjonowanych promotorów o zwiększonej metylacji w grupie zwierząt samopodających kokainę, znajdowały się te, które regulują ekspresję miRNA (P-3, Materiały uzupełniające - tabela S3, ryc. S5). Dalsza analiza miejsc wiązania zidentyfikowanych miRNA, przeprowadzona w oparciu o dostępne bazy danych, wskazała na *miR-30d* i *miR-let-7i* (odpowiednio w 3. i 10. dniu), oba miRNA regulują ekspresję genu *Tet3*, (P-3, Materiały uzupełniające - ryc. S6). Co ważne, analiza poziomu docelowych transkryptów dla *miR-30d* i *miR-let-7i* ujawniła ich upregulację w obu fazach wygaszania (P-3, ryc. 4). W związku z obserwowanym wzrostem ekspresji genu *Tet3*, przeprowadziliśmy ocenę całkowitego poziomu 5-hmC w hipokampalnym DNA zarówno w 3. jak i 10. dniu abstynencji od kokainy u zwierząt przebywających w klatkach domowych oraz klatkach eksperymentalnych (wygaszanie). Wykazaliśmy statystycznie istotny wzrost całkowitego poziomu 5-hmC jedynie podczas fazy wygaszania w grupie samopodającej kokainę, natomiast u zwierząt przebywających w klatkach domowych poziom 5-hmC był zbliżony do kontroli (P-3, ryc. 5). Uzyskane wyniki wskazują, że abstynencja kokainy połączona z wygaszaniem zachowań poszukiwawczych (ale nie z przebywaniem zwierząt w klatkach domowych) tworzy odmienny wzór ekspresji *Tet3* i 5-hmC w HIP i prowadzi do długotrwałych zmian w poziomie transkryptu *Tet3* z równoczesnym wzrostem całkowitego poziomu 5-hmC jedynie u zwierząt aktywnie pobierających kokainę. Zaobserwowany przez nas utrzymujący się podwyższony poziom mRNA *Tet3* wiążemy ze zwiększoną metylacją promotorów genów *miR-30d* i *miR-let-7i*, których miejsca docelowe znajdują się w regionie 3'UTR genu *Tet3*. W oparciu o uzyskane

wyniki i dostępną literaturę, opracowaliśmy schemat możliwych interakcji zachodzących na różnych poziomach oddziaływań molekularnych w HIP szczura w fazie abstynencji kokainowej (**P-3**, ryc. 6).

Wykazano, że 5-hmC może być nowym znacznikiem epigenetycznym działania kokainy, a indukowany przez substancję wzrost 5-hmC w NAc myszy pozytywnie wpływał na ekspresję genów (Feng i wsp., 2015). Postulujemy, że wykazane w naszym badaniu zmiany mogą mieć bezpośredni wpływ na transkrypcję genów, które wpływają na procesy uczestniczące w hamowaniu zachowań poszukiwawczych. Co wydaje się znajdować potwierdzenie w zakończonych w ostatnim czasie badaniach przeprowadzonych przez nasz zespół (Frankowska et al., manuskrypt przedłożony do recenzji).

W aspekcie procesów regulujących funkcjonowanie epigenomu i genomu nie można zapominać o neurotoksycznym wpływie kokainy na procesy komórkowe. Neurotoksyczny efekt działania kokainy może być spowodowany wzrostem poziomu dopaminy (toksyczność wynikająca z metabolizmu dopaminy) i/lub reaktywnymi formami tlenu (ROS) oraz dysfunkcją mitochondriów (Lepsch i wsp., 2015). Wiadomo, że mitochondria są ważne dla projekcji neuronalnej i plastyczności synaptycznej, zapewniają optymalny poziom neurotransmisji generując ATP i buforując poziom Ca^{2+} (Billups i Forsythe, 2002; Sheng i Cai, 2012). Pojawiły się dowody na to, iż istnieje związek między mitochondrialnym DNA (mtDNA) a strukturą neuronu, jak również między mtDNA a aksonalną i synaptyczną aktywnością (Roubertoux i wsp., 2003).

Sugeruje się, że kokaina może wpływać na ekspresję genów jądrowych i mitochondrialnych, jak również dynamikę mitochondriów poprzez stres oksydacyjny (*oxidative stress*, OS). Ponadto, OS wpływa na ilość mitochondriów, integralność i liczbę kopii mtDNA (Lee i Wei, 2005). Wcześniejsze badania przeprowadzone przez zespół Prof. Małgorzaty Filip wykazały, że samopodawanie kokainy nasila aktywność dysmutazy nadtlenkowej w HIP i PFC, która utrzymuje się nawet po wycofaniu kokainy (Pomierny-Chamioło i wsp., 2013). Aby ocenić funkcjonowanie genomu jądrowego i mitochondrialnego w okresie wygaszania nałogu przeprowadzaliśmy analizy molekularne w obu wyżej wspomnianych strukturach mózgu (ważnych dla neuroadaptacji związanej z procesem uzależnienia) u szczurów aktywnie przyjmujących kokainę lub biernie opisany w części „Materiały i metody” (**P-4**). W przeprowadzonych przez nas badaniach, we wczesnej (3. dzień) fazie wygaszania zachowań poszukiwawczych, ocenialiśmy liczbę kopii mtDNA oraz poziom ekspresji genów mitochondrialnych i genów jądrowych zaangażowanych w metabolizm i dynamikę mitochondriów.

Wykazaliśmy, że liczba kopii mtDNA w HIP i PFC była ponad 4-krotnie wyższa w 3. dniu wygaszania u zwierząt samopodających kokainę w porównaniu do zwierząt kontrolnych (P-4, ryc. 3). Ponadto, zaobserwowaliśmy statystycznie znamienne wzrost ekspresji genów mitochondrialnych *ND1* i *ND6* w obu badanych strukturach mózgu (P-4, ryc. 4). Analiza danych pochodzących z mikromacierzy ekspresyjnych wykazała zmiany w ekspresji 486 genów w PFC i 135 genów w HIP (P-4, ryc. 1, Materiał uzupełniający - tabela S1 i S2) oraz 79 genów wspólnych dla obu struktur (P-4, ryc. 1, Materiał uzupełniający - tabela S3). W oparciu o analizę Gene Ontology (GO) obejmującą 3 kategorie funkcjonalne ustaliliśmy, pule genów należące do grup ontologicznych, takich jak „mitochondrialna błona wewnętrzna”, „macierz mitochondrialna”, „mitochondrialny nukleoid” czy „mitochondrialna fuzja i fizja” szczegółowe informacje zawarte są w tabeli 1 (P-4). Dalsza analiza przeprowadzona w HIP i PFC wykazała upregulację genów zaangażowanych w: (i) fosforylację oksydacyjną (*Ndufaf2*, *Uqcrcq*, *Oxnad1* i *Cox7c*); (ii) formowanie nukleoidu oraz transkrypcję i replikację mtDNA (*Tfam*, *Dna2*, *Pbh*, *Hadha* i *Cps1*); (iii) dynamikę mitochondriów - proces fuzji/fizji (*Mfn1*, *Opa1*, *Mtfr1* i *Opa3*) (P-4, ryc. 2a-c). Dodatkowo, zarówno w HIP jak i PFC zaobserwowaliśmy wzrost ekspresji genów indukowanych stresem siateczki endoplazmatycznej (ER stres) jedynie u zwierząt samopodających kokainę co sugeruje, że indukuje ona ER stres (P-4, ryc. 2d). Zaobserwowane przez nas zmiany, takie jak upregulacja genów jądrowych kodujących białka wchodzące w skład I i III kompleksu łańcucha oddechowego oraz wzrost liczby kopii mtDNA z równoczesnym wzrostem ekspresji genów mitochondrialnych kodujących podjednostki I kompleksu łańcucha oddechowego, mogą wskazywać na wzrost zapotrzebowania energetycznego związanego z procesami neuroadaptacji podczas wygaszania zachowań poszukiwawczych u zwierząt samopodających kokainę. Ponadto, wysoce prawdopodobne jest, że wzrost liczby kopii mtDNA spowodowany był OS, co wydają się potwierdzać badania *in vitro* i obserwowane zmiany w PFC pacjentów z autyzmem (Gu i wsp., 2013, Lee i wsp., 2000). Z kolei, wykazane przez nas zmiany w ekspresji genów kodujących białka zaangażowane w dynamikę mitochondriów, mogą być istotne z punktu widzenia gęstości i plastyczności synaptycznej, czyli kluczowych zjawisk dla rozwoju uzależnienia.

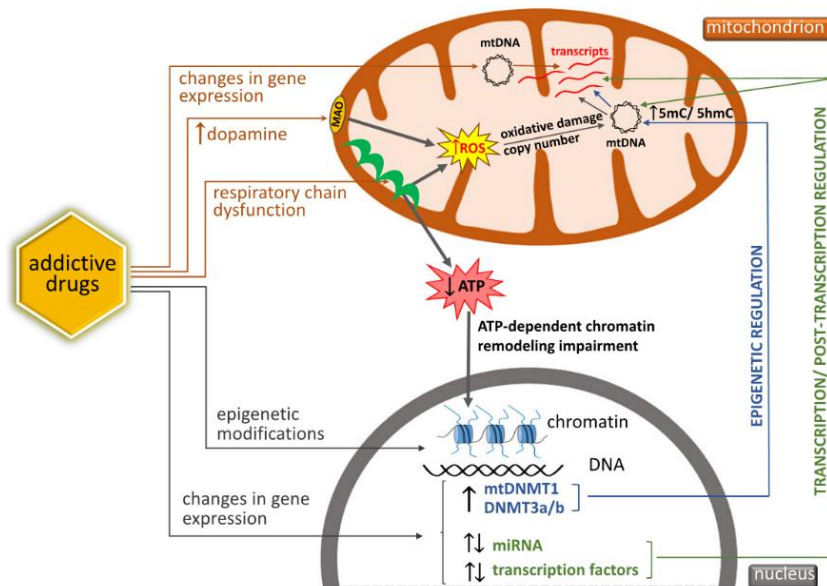
Wyniki badań dotyczące zależności między funkcją mitochondriów, liczbą kopii mtDNA, regulacją epigenetyczną genomu jądrowego i mitochondrialnego a uzależnieniem od substancji psychoaktywnych zawarte zostały w pracy poglądowej (P-5). Mitochondria są szczególnie ważne dla tkanek wykazujących duże zapotrzebowanie energetyczne (np. mózg, mięśnie szkieletowe czy mięsień sercowy), właściwa regulacja biogenezy i funkcji

mitochondriów jest kluczowa dla utrzymania homeostazy energetycznej. Mitochondria jako jednostki półautonomiczne posiadają własny genom, jego struktura w której uwzględniono obecność ostatnio zidentyfikowanych genów kodujących małe i duże cząsteczki niekodującego RNA (ncRNA) przedstawiona została na rycinie 1 (**P-5**). Cechy jądrowego i mitochondrialnego DNA zestawiono w tabeli 1 (**P-5**). Istnieje wzajemna komunikacja (*cross-talk*) między jądrem a mitochondriami, większość białek mitochondrialnych kodowana jest przez genom jądrowym (~1500 genów). Zatem jądro komórkowe wpływa na replikację i strukturę mitochondriów oraz ich ilość w komórce kontrolując proces fuzji, fizji i mitofagii (Wallace, 2010). Ostatnie badania wskazują na obecności jądrowych miRNA we frakcji mitochondrialnej, jak również białek uczestniczących w ich biogenezie (m.in. argonaut-2) (Li i wsp., 2012).

Wiadomo, że procesy, takie jak replikacja i ekspresja genomu jądrowego oraz modyfikacja struktury chromatyny wymagają energii dostarczanej przez mitochondria. Wykazano, że liczba kopii mtDNA i aktywność mitochondriów wpływają na poziom metylacji jądrowego DNA (Bellizzi i wsp., 2012). Najnowsze badania wskazują, że mtDNA może ulegać metylacji, u kilku gatunków ssaków zidentyfikowano mitochondrialną izoformę DNMT1 (szczegółowe informacje zawiera tabela 2, **P-5**). Ponadto, wykazano obecność innych metylotransferaz DNA (DNMT3A i 3B) w mitochondriach mózgu człowieka i myszy.

Transmisja synaptyczna wymaga mitochondrialnego ATP, którego poziom w znacznym stopniu zależy od funkcji mitochondriów i zaopatrzenia w tlen. Sugeruje się, że zmiany w mtDNA i zaburzenie funkcji mitochondriów mają wpływ na neurotransmisję i są zaangażowane w proces uzależnienia od substancji psychoaktywnych (Feng i wsp., 2013). W tabeli 3 zestawiono wpływ substancji psychoaktywnych i alkoholu na genom mitochondrialny i jądrowy w eksperymentalnych modelach *in vitro* i *in vivo* (**P-5**). W pracy graficznie przedstawiony został wpływ substancji psychoaktywnych na funkcjonowanie genomu mitochondrialnego i jądrowego oraz kierunki regulacji transkrypcyjnej i epigenetycznej obu genomów (**P-5**, ryc. 2).

Substancje uzależniające, w tym kokaina, nasilają neurotoksyczność podnosząc poziom OS, który w efekcie skutkuje zaburzeniem funkcji mitochondriów i mtDNA. Zatem wysoce prawdopodobne jest, że substancje psychoaktywne zaburzając funkcję mitochondriów mogą zakłócać ich komunikację i oddziaływanie z jądrem komórkowym poprzez wpływ na procesy regulacji epigenetycznej.



Ryc. 3 Wpływ substancji psychoaktywnych na regulację epigenetyczną i transkrypcyjną genomu mitochondrialnego i jądrowego (rycina 2 z P-5).

Podsumowanie

W przeprowadzonych badaniach wykorzystano model dożylnego samopodawania kokainy u szczurów. Analizy molekularne wykonano w okresie samopodawania kokainy oraz we wczesnej (3. dzień) i późnej (10. dzień) fazie jej odstawienia przeprowadzanej w klatkach eksperymentalnych (wygaszenie) lub klatkach domowych.

Na podstawie uzyskanych wyników można wyciągnąć następujące wnioski:

1. Aktywne przyjmowanie kokainy indukuje utrzymujący się w okresie odstawienia (3. lub 10. dzień wygaszenia) wzrost ekspresji genów kodujących białka i cząsteczki regulatorowe zaangażowane w regulację epigenetyczną (*miR-132* i *-212*, *REST*, *Brd1* i *Tet3*). Ze względu na to, że zmiany w ekspresji miRNA, *REST* i *Brd1* nie występują u zwierząt biernie przyjmujących kokainę, należy je przypisać motywacyjnemu efektowi działania substancji.
2. Zaobserwowany wzrost ekspresji genu *Brd1*, kodującego białko kompleksu acetylotyferaz MOZ/MORF oraz wzrost acetylacji lizyny 9 w histonie H3 i lizyny 8 w histonie H4 w PFC w fazie wygaszania zachowań poszukiwawczych może świadczyć o wzajemnym oddziaływaniu genomu jądrowego i epigenomu. Obserwowane zmiany przypisać jednak należy farmakologicznemu efektowi działania kokainy ponieważ występują one zarówno u zwierząt aktywnie jak i biernie otrzymujących kokainę.

3. Wzrost ekspresji genu *Tet3* oraz wzrost całkowitego poziomu 5-hmC obserwowany w HIP zwierząt przechodzących okres odstawienia od kokainy w klatkach eksperymentalnych (a nie domowych) wskazuje na to, że rodzaj abstynencji może mieć istotny wpływ na ekspresję czynników zaangażowanych w epigenetyczną regulację hipokampalnego genomu, którego ekspresja jest ważna podczas tworzenia „nowej” pamięci.
4. Ujawniony w fazie wygaszania zachowań poszukiwawczych w PFC i HIP wzrost liczby kopii mtDNA oraz poziomu transkryptów genów mitochondrialnych i jądrowych kodujących białka łańcucha oddechowego oraz białka odpowiedzialne za dynamikę mitochondriów może świadczyć o zwiększonym zapotrzebowaniu energetycznym w związku z procesami neuroadaptacji jakie towarzyszą aktywnemu uczeniu i tworzeniu nowej hamującej pamięci wygaszania.

Uzyskane przez nas wyniki dostarczają nowych informacji na temat zmian molekularnych obserwowanych na poziomie genomu (jądrowego i mitochondrialnego) oraz epigenomu u zwierząt w okresie wygaszania nałogu narkotykowego. Wiedza na temat zmian zachodzących w fazie wygaszania jest szczególnie ważna w aspekcie nawrotu do nałogu i opracowania skutecznego leczenia uzależnienia od kokainy. Nasze wyniki stanowią podstawę do dalszych pogłębionych, ukierunkowanych badań i analiz, których celem będzie opracowanie nowych skuteczniejszych substancji wykorzystanych w terapii uzależnień.

5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH:

a) osiągnięcia naukowo-badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora

W czasie studiów na wydziale biologii interesowałam się genetyką, szczególnie genetyką człowieka. Po skończeniu studiów i odbyciu stażu u prof. Janusza Limona (Akademia Medyczna, Gdańsk) i prof. Bogdana Kałużewskiego (Akademia Medyczna, Łódź) zorganizowałam pracownię cytogenetyczną w Wojewódzkim Szpitalu Dziecięcym w Toruniu w której zajmowałam się diagnostyką aberracji chromosomowych zarówno u dzieci jak i dorosłych. W ówczesnym czasie takie pracownie istniały tylko przy ośrodkach akademickich, dlatego jej powstanie w naszym szpitalu uznaję za swój sukces. W latach 2000-2003 rozpoczęłam swoją karierę naukową w Instytucie Biologii Ogólnej i

Molekularnej UMK w Toruniu pod kierunkiem prof. Anny Goc w Pracowni Genetyki. Tu przystąpiłam do badań nad poziomem ekspresji genu *CD39* w kontekście jego związku ze zmianami miażdżycowymi w naczyniach krwionośnych. Gen *CD39* koduje ekto-apyrasę, enzym ENTPD1 który jak wykazały badania *in vitro* zapobiega agregacji płytek. Enzym posiada dużą specyficzność substratową do ATP i ADP, dzięki temu, że obniża poziom ADP hamuje proces agregacji płytek krwi, zmniejszając ryzyko zawału serca. Ekspresja tego genu jest tkankowo-specyficzna, a wysoki poziom mRNA obserwuje się w śródbłonku naczyń, płucach i nerkach. Stąd też przedmiotem moich badań był śródbłonek naczyń krwionośnych pochodzący od osób posiadających zmiany miażdżycowe w naczyniach (potwierdzone badaniami) oraz śródbłonek bez zmian pochodzący od zdrowych dawców. Jednak ze względu na konieczność zmiany miejsca zamieszkania nie mogłam kontynuować rozpoczętych przeze mnie badań.

W latach 2003-2009 pracowałam na Akademii Medycznej we Wrocławiu (obecnie Uniwersytet Medyczny) pod kierunkiem prof. dr hab. Tadeusza Dobosza w Zakładzie Technik Molekularnych gdzie rozpoczęłam pracę nad konstrukcją wektora ekspresyjnego, który miał być w przyszłości wykorzystany do terapii genowej pacjentów z niedokrwieniem kończyn dolnych (*critical limb ischemia*, CLI). Moim celem było stworzenie funkcjonalnego wektora ekspresyjnego zawierającego sekwencję genu *VEGF*. Gen ten koduje śródbłonkowo-naczyniowy czynnik wzrostu, który jest kluczowym czynnikiem inicjującym i stymulującym proces angiogeny. Leczenie pacjentów z niedokrwieniem serca i kończyn białkiem VEGF ze względu na jego krótki okres półtrwania nie przynosiło zadowalających efektów. Bardziej obiecująca w tych przypadkach wydawała się terapia genowa, dlatego rozpoczęłam pracę nad opracowaniem sekwencji cDNA, izoformy 165, genu *VEGF-A*, a następnie wklonowaniem jej do plazmidu ekspresyjnego pod kontrolą promotora, zapewniającego wydajną ekspresję. Analizy *in vitro* na linii komórkowej CHOPro5 z wykorzystaniem wektorów zawierających sekwencję GFP i różne promotory potwierdziły zdolność ekspresyjną transgenu oraz umożliwiły mi wybór promotora CMV, który zapewniał wysoki poziom jego ekspresji. Przeprowadzone badania wstępne pozwoliły na skonstruowanie wektora ekspresyjnego pcDNA3-VEGF165, którego funkcjonalność została potwierdzona w transfekowanych komórkach linii HUVEC. Wyniki badań zostały opisane w rozprawie doktorskiej, a następnie opublikowane (**załącznik 4**, poz. **I**b**/III-6**). We współpracy z Katedrą i Kliniką Chirurgii Naczyniowej i Transplantologii AM we Wrocławiu ocenialiśmy kliniczne i histologiczne skutki terapii genowej z wykorzystaniem przygotowanego wektora u pacjentów z CLI (**załącznik 4**, poz.

Ib/III-2). Jeszcze w trakcie prowadzenia prac, w roku 2006, nasz zespół wystąpił z wnioskiem o udzielenie patentu wynalazczego do Urzędu Patentowego RP. W dniu 31 lipca 2012 otrzymaliśmy **patent nr PL 211 996 B1** na wynalazek pt. „**Eukariotyczny wektor ekspresyjny kodujący cytokinę VEGF165, sposób jego wytwarzania i zastosowanie**”.

b) osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora kontynuowałam pracę w obszarze angiogennej terapii genowej. Brałam udział w pracach interdyscyplinarnego zespołu, który rozpoczął badania nad terapią genową (tylko wektor) i komórkowo-genową (komórki macierzyste i wektor) u pacjentów z CLI. Pacjenci, którzy przystąpili do badania byli zakwalifikowani do amputacji kończyny ze względu na martwicę stopy oraz bóle spoczynkowe i nocne. Po domięśniowej iniekcji plazmidu pcDNA3-VEGF zaobserwowaliśmy wzrost stężenia VEGF w surowicy pacjentów z CLI w porównaniu do zdrowej kontroli, pomiędzy 14 a 90 dniem, po zastosowaniu terapii. Blisko 40% pacjentów po terapii nie wymagało amputacji, badania histologiczne i immunohistochemiczne mięśni z amputowanych kończyn wykazały ślady tworzenia nowych naczyń krwionośnych. Nasze badania jednoznacznie wskazały, że terapia była bezpieczna dla pacjenta i u części pacjentów pozwoliła zapobiec amputacji kończyn. Ponadto, stwierdziliśmy, że terapia hybrydowa, czyli iniekcja komórek progenitorowych, pochodzących ze szpiku kostnego pacjenta, w połączeniu z wektorem dawała zdecydowanie lepszy efekt terapeutyczny (**załącznik 4**, poz. **Ia-6**).

Interesowałam się również regulacją procesu angiogenezy na poziomie molekularnym, dlatego we współpracy z naszym zespołem przygotowałam projekt badawczy, którego celem była analiza metylacji genomowego DNA u pacjentów z CLI oraz identyfikacja cząsteczek istotnych dla procesu angiogenezy. Projekt uzyskał finansowanie Narodowego Centrum Nauki. Wyniki przeprowadzonych badań *in vitro* wskazały na istotny udział regulacji epigenetycznej w proliferacji komórek progenitorowych i ich właściwościach proangiogennych (np. metylacja genu *VEGF*). Jednakże, nie wykazaliśmy zależności między CLI a metylacją promotora *VEGF* oraz obecności specyficznych dla tej choroby polimorfizmów. Zaobserwowaliśmy, natomiast znaczący wzrost ekspresji genów indukowanych stresem ścinającym (*shear stress*) (*MMP9*, *CDH5* i *ITGA4*) oraz genu *HIF-1α* (czynnik transkrypcyjny) z współlistniejącą upregulacją genów docelowych, takich jak *VEGF-A* i *FLT1* kodujących istotne dla procesu angiogenezy białka (**załącznik 4**, poz. **Ia-27**).

Zachęcona, ale równocześnie nie w pełni usatysfakcjonowana, wynikami wcześniej prowadzonych prób klinicznych, rozpoczęłam pracę nad przygotowaniem nowego projektu badawczego w ramach programu Innowacyjna Gospodarka 2009-2013. Projekt stanowił część grantu „WROVASC - Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo-Naczyniowej”, o który aplikował Wojewódzki Szpital Specjalistyczny we Wrocławiu Ośrodek Badawczo-Rozwojowy. Projekt obejmował konstrukcję wektorów plazmidowych mono- i bicistronowych zawierających geny *VEGF*, *Ang-1*, *bFGF*, *HGF* i *PGIS* oraz ocenę ich zdolność do transfekcji komórek. Miał również na celu określenie zdolności transgenów do indukcji różnicowania komórek progenitorowych CD133+ i CD34+ w obecności różnych czynników (np. białka P-39 lub HIF-1 α). Ponadto, zakładał przeprowadzenie prób indukcji terapeutycznej angiogenezy u zwierząt z wykorzystaniem opracowanych wektorów ekspresyjnych. Grant WROVASC z opracowanym przeze mnie zadaniem badawczym uzyskał finansowanie na przełomie roku 2008/2009. Ze względu jednak na konieczność zmiany miejsca zamieszkania nie mogłam podjąć się realizacji tego zadania, było ono prowadzone przez zespół kierowany przez prof. dr hab. Tadeusza Dobosza a podjęte prace zaowocowały publikacjami w czasopiśmie z impact factorem.

W ramach szeroko zakrojonej współpracy naszego zakładu z jednostkami Akademii Medycznej we Wrocławiu współpracowałam z:

1. Katedrą i Kliniką Angiologii, Nadciśnienia i Diabetologii wykonując analizy ekspresji genów w monocytach pacjentów z cukrzycą przed i po terapii rosiglitazonem. Uzyskane wyniki wskazywały na to, że terapia obniżyła ekspresję prozapalnych genów *IL-8* i *TNF α* ale nie wpływała na ekspresję *PPAR γ* , *RAGE* i *ADAM17* (załącznik 4, poz. IIa-1,-4 i IIb/III-9).
2. Katedrą i Kliniką Gastroenterologii i Hepatologii badając polimorfizmy i ekspresję genu *CARD15* u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna (*Crohn disease*, CD) oraz polimorfizmy genu *CYP2C19* u pacjentów z chorobą refluksową przełyku (*gastroesophageal reflux disease*, GERD). Wykazaliśmy, że ekspresja genu *CARD15* (jest to jeden z genów podatności na chorobę Leśniowskiego-Crohna) była znacząco wyższa u pacjentów CD niż u zdrowej kontroli. Poziom mRNA zależał od wieku pacjenta oraz czasu trwania choroby i korelował z markerami stanu zapalnego (ESP i CRP). Ponadto, rodzaj terapii miał wpływ na poziom ekspresji, której wzrost obserwowano po leczeniu sterydami i azotiopryną, zaś spadek po podaniu przeciwciał anty-TNF α . Zaobserwowaliśmy, po raz pierwszy, że badane przez nas polimorfizmy w

genie *CARD15* (R702W, G908R i 1007fs) nie wpływały na jego ekspresję (załącznik 4, poz. IIa-26; IIb/III-4,-5 i III/I-3,-4,-6).

Kolejnym zadaniem badawczym była analiza polimorfizmu 681G→A w genie *CYP2C19* u pacjentów z powikłaną i niepowikłaną postacią GERD. Podstawą terapii są inhibitory pompy protonowej, leki z tej grupy metabolizowane są przez enzymy cytochromu P450, a polimorfizmy izoenzymów wchodzących w skład tego systemu warunkują szybkość przemiany leków. Wykazaliśmy, że większość pacjentów z niepowikłaną postacią GERD to szybcy metabolizerzy, jednak polimorfizm *CYP2C19* wydaje się nie mieć związku z rozwojem ciężkich powikłań choroby (załącznik 4, poz. IIa-9).

3. Katedrą i Kliniką Dermatologii, Wenerologii i Alergologii w ramach badań nad ziarniakiem grzybiastym (*mycosis fungoides*, MF). Wykonywałam analizę ekspresji onkogenów (*Bcl-2*, *c-Myc*, *H-Ras*, *K-Ras* i *N-Ras*) oraz miRNA (*miR-15a*, *miR-16*, *miR-155*, *let-7a*, *let-7d* i *let-7f*) w biopsjach skóry pacjentów z różnym stadium MF. Badanie to pokazało istotnie zmniejszoną ekspresję onkogenów *Bcl-2*, *H-Ras* i *N-Ras* u pacjentów z MF w stosunku do zdrowej kontroli, ale nie miało to związku ze stadium zaawansowania choroby, przerzutowością i przeżywalnością. Dodatkowo, analiza ekspresji miRNA ujawniła, że ekspresja wszystkich badanych miRNA była wyższa u pacjentów z wczesnym stadium MF. Ponadto, u pacjentów z przerzutami wykazaliśmy niższy poziom transkryptów dla *let-7a*, *let-7d* i *let-7f*. Wykorzystując jednoczynnikową analizę przeżycia i wieloczynnikowy model regresji Coxa ustaliliśmy, że poziom ekspresji *let-7a* był niezależnym czynnikiem prognostycznym (załącznik 4, poz. IIa-12,-13).

Poza współpracą z klinikami brałam udział w pracach wielośrodkowego zespołu kierowanego przez prof. Mikołaja Urbanowskiego z Katedry Archeologii Uniwersytetu Szczecińskiego. Badania dotyczyły znaleziska w jaskini Stajnia na Jurze Krakowsko-Częstochowskiej gdzie odkryto ślady osadnictwa neandertalskiego. Wśród licznych szczątków wielu gatunków zwierząt odkryto również pierwsze w tej części Europy szczątki neandertalczyków (zęb). W naszym zakładzie wyizolowaliśmy z zęba materiał genetyczny (DNA) przy użyciu nieniszczącej techniki, tak aby ząb pozostał nietknięty i mógł być wykorzystany w badaniach antropologicznych. Aby udowodnić neandertalskie pochodzenie zęba, podjęłam próbę wklonowania do plazmidu pCR®2.1-TOPO mitochondrialnego DNA, a następnie namnożenia go w bakteriach *E. coli* i

zsekwencjonowania. Dzięki współpracy z prof. Paabo z Lipska, który kierował pracami nad sekwencjonowaniem genomu neandertalczyka, uzyskaliśmy startery do reakcji PCR. Wśród wklonowanych fragmentów nie otrzymałam jednak oczekiwanej sekwencji nukleotydowej, prawdopodobnie ze względu na wiek próbki stan mtDNA nie był odpowiedni aby przeprowadzić identyfikację. Dodatkowe analizy genetyczne genomowego DNA pozwoliły ustalić płeć osobnika (męska), ale uzyskany produkt PCR dla genu amylogeniny nie miał typowej wielkości charakterystycznej dla człowieka czy małp, miał on długość pośrednią. (załącznik 4, poz. IIa-5).

W roku 2009 po zmianie miejsca zamieszkania podjęłam pracę w Zakładzie Farmakokinetyki i Metabolizmu Leków Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Władysławy Anny Daniel. Prowadziłam badania nad stopniem i specyficznością lezji w różnych strukturach mózgu szczurów po dokomorowym podaniu niskich dawek 6-OHDA oraz rolą układu noradrenergicznego i serotonergicznego w regulacji ekspresji cytochromu P450 w wątrobie. Wykazaliśmy, że niskie dawki 6-OHDA (25 lub 50 µg/komorę) selektywnie niszczą układ noradrenergiczny (NA) nie wpływając na poziom dopaminy. Metoda dokomorowego podania 6-OHDA może być wykorzystana do selektywnej lezji uszkodzającej neurony NA. Ponadto, nasze badania pokazały, że układ noradrenergiczny reguluje wątrobowy cytochrom P450, obserwowane zmiany dotyczyły izoenzymów CYP1A1, CYP2C6/C11 i CYP3A1/2, które zaangażowane są w metabolizm sterydów i leków. Uzyskane wyniki wydają się szczególnie ważne w przypadku pacjentów przyjmujących leki działające na układ katecholaminergiczny. Pacjenci poddani politerapii powinni być monitorowani pod kątem możliwych interakcji leków, a nowe neuroaktywne leki powinny być testowane w kierunku interakcji z cytochromem P450 (załącznik 4, poz. IIa-8,-15,-16,-22,-24 i III/I-8,-9).

Obecnie kontynuuję badania nad identyfikacją i trwałością zmian epigenetycznych w mózgu szczurów w okresie nawrotu do nałogu. Badania, które prowadzę w Zakładzie Farmakologii Uzależnień Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie, koordynowane są przez prof. Małgorzatę Filip.

6. PIŚMIENNICTWO:

- Bali P, Kenny PJ. (2013) MicroRNAs and drug addiction. *Front Genet.*, 4:43.
- Bellizzi D, D'Aquila P, Giordano M, Montesanto A, Passarino G. (2012) Global DNA methylation levels are modulated by mitochondrial DNA variants. *Epigenomics*, 4:17–27.
- Biliński P, Wojtyła A, Kapka-Skrzypczak L, Chwedorowicz R, Cyranka M, Studziński T. (2012) Epigenetic regulation in drug addiction. *Ann Agri Environ Med.*, 19(3):491–496.
- Billups B, Forsythe ID. (2002) Presynaptic mitochondrial calcium sequestration influences transmission at mammalian central synapses. *J Neurosci.*, 22:5840–5847.
- Chandrasekar V, Dreyer JL. (2009) microRNAs miR-124, let-7d and miR-181a regulate cocaine-induced plasticity. *Mol Cell Neurosci.*, 42:350–62.
- Dreyer JL. (2010) New insights into the roles of microRNAs in drug addiction and neuroplasticity. *Genome Med.*, 2(12):92.
- Feng YM, Jia YF, Su LY, Wang D, Lv L, Xu L, Yao YG. (2013) Decreased mitochondrial DNA copy number in the hippocampus and peripheral blood during opiate addiction is mediated by autophagy and can be salvaged by melatonin. *Autophagy*, 9:1395–1406.
- Feng J, Shao N, Szulwach KE. (2015) Role of Tet1 and 5-hydroxymethylcytosine in cocaine action. *Nature Neuroscience*, 18(4):536–544.
- Fiore R, Khudayberdiev S, Christensen M, Siegel G, Flavell SW, Kim TK, et al. (2009) Mef2-mediated transcription of the miR379-410 cluster regulates activity-dependent dendritogenesis by fine tuning Pumilio2 protein levels. *EMBO J.*, 28(6):697–710.
- Gass JT, Chandler LJ. (2013) The plasticity of extinction: contribution of the prefrontal cortex in treating addiction through inhibitory learning. *Front Psychiatry*, 30:4–46.
- García-Fuster MJ, Flagel SB, Mahmood ST, Watson SJ, Akil H. (2012) Cocaine withdrawal causes delayed dysregulation of stress genes in the hippocampus. *PLoS ONE*, 7(7):e42092. doi:10.1371/journal.pone.0042092.
- Giusti SA, Vogl AM, Brockmann MM, Vercelli CA, Rein ML, Trümbach D, et al. (2014) MicroRNA-9 controls dendritic development by targeting REST. *eLife*, 3:e02755. doi:10.7554/eLife.02755.
- Gu F, Chauhan V, Kaur K, Brown WT, LaFauci G, Wegiel J, Chauhan A. (2013) Alterations in mitochondrial DNA copy number and the activities of electron transport chain complexes and pyruvate dehydrogenase in the frontal cortex from subjects with autism. *Transl Psychiatry*, 3:e299. doi:10.1038/tp.2013.68
- Koob GF, Le Moal M. (2001) Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacol.*, 24:97–129.
- Koob GF, Volkow ND. (2010) Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacol.*, 35:217–238.
- Lee HC, Yin PH, Lu CY, Chi CW, Wei YH. (2000) Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. *Biochem J.*, 348:425–432.

- Lee HC, Wei YH. (2005) Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress. *Int J Biochem Cell Biol.*, 37:822–834.
- Lepsch LB, Planeta CS, Scavone C. (2015) Cocaine causes apoptotic death in rat mesencephalon and striatum primary cultures. *Biomed Res Int.*, 750752.
- Li P, Jiao J, Gao G, Prabhakar BS. (2012) Control of mitochondrial activity by miRNAs. *J Cell Biochem.*, 113:1104–1110.
- Pomierny-Chamióło L, Moniczewski A, Wydra K, Suder A, Filip M. (2013) Oxidative stress biomarkers in some rat brain structures and peripheral organs underwent cocaine. *Neurotox Res.*, 23:92–102.
- Qureshi IA, Mehler MF. (2011) Non-coding RNA networks underlying cognitive disorders across the lifespan. *Trends Mol Med.*, 7(6):337–46.
- Raport EMCDDA. Europejskie Centrum Monitorowania Narkotyków i Narkomanii (2016), Europejski raport narkotykowy 2016: Tendencje i osiągnięcia, Urząd Publikacji Unii Europejskiej, Luksemburg.
- Robison AJ, Nestler EJ. (2011) Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nature Review Neuroscience*, 12(11), 623–637.
- Roubertoux PL, Sluyter F, Carlier M, Marcet B, Maarouf-Veray F, Chérif C, Marican C, Arrechi P, et al. (2003) Mitochondrial DNA modifies cognition in interaction with the nuclear genome and age in mice. *Nat Genet.*, 35:65–69.
- Ryan B, Joilin G, Williams JM. (2015) Plasticity-related microRNA and their potential contribution to the maintenance of long-term potentiation. *Front Mol Neurosci.*, 8:4.
- Schaefer A, Im HI, Venø MT, Fowler CD, Min A, Intrator A, et al. (2010) Argonaute 2 in dopamine 2 receptor-expressing neurons regulates cocaine addiction. *J Exp Med.*, 207:1843–51.
- Sheng ZH, Cai Q. (2012) Mitochondrial transport in neurons: impact on synaptic homeostasis and neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci.*, 13:77–93.
- Taubenfeld SM, Muravieva EV, Garcia-Osta A, Alberini CM. (2010) Disrupting the memory of places induced by drugs of abuse weakens motivational withdrawal in a context dependent manner. *PNAS*, 107(27):12345–12350.
- Volkow ND, Fowler JS. (2000) Addiction, a disease of compulsion and drive: Involvement of the orbitofrontal cortex. *Cerebral Cortex*, 10:318–325.
- Volkow ND, Wang GJ, Telang F, Fowler JS, Logan J, Childress AR, et al. (2006) Cocaine cues and dopamine in dorsal striatum: mechanism of craving in cocaine addiction. *J Neurosci.*, 26:6583–88.
- Walker DM, Cates HM, Heller EA, Nestler EJ. (2015) Regulation of chromatin states by drugs of abuse. *Curr Opin Neurobiol.*, 30:112–121.
- Wallace DC. (2010) The epigenome and the mitochondrion: Bioenergetics and the environment. *Genes Dev.* 24:1571–1573.

Wanet A, Tacheny A, Arnould T, Renard P. (2012) miR-212/132 expression and functions: within and beyond the neuronal compartment. *Nucleic Acids Res.*, 40(11):4742–4753.

Wen L, Li X, Yan L. (2014) Whole-genome analysis of 5-hydroxymethylcytosine and 5-methylcytosine at base resolution in the human brain. *Genome Biology*, 15(3):R49.

Yuferov V, Nielsen D, Butelman E, Kreek M. (2005) Microarray studies of psychostimulant-induced changes in gene expression. *Addict Biol.*, 10(1):101–118.

Kraków, 10.11.2017

Anna Sadakierska-Chudy