



## AUTOREFERAT

**Wykorzystanie modeli transgeniczných opartych o ablację czynnika transkrypcyjnego TIF-IA do badań nad neuroprotekcją w chorobach neurodegeneracyjnych**

**Dr Grzegorz Kreiner**

Zakład Biochemii Mózgu  
Instytut Farmakologii PAN w Krakowie

Kraków 2019

Spis treści:

<b>1. DANE OSOBOWE</b>	<b>5</b>
1.1. IMIĘ I NAZWISKO	5
1.2. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE	5
1.3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH	5
1.4. INNE	5
<b>2. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ. U. 2016 POZ. 882 ZE ZM. W DZ. U. Z 2016 POZ. 1311)</b>	<b>7</b>
2.1. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO	7
2.2. LISTA PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO	7
2.3. OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO WW. PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW WRAZ Z OMÓWIENIEM ICH EWENTUALNEGO WYKORZYSTANIA	8
2.3.1. WPROWADZENIE	8
2.3.2. GENEZA CYKLU PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA HABILITACYJNEGO	10
2.3.3. OMÓWIENIE GŁÓWNYCH WYNIKÓW CYKLU PRAC (OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO)	11
2.3.4. OMÓWIENIE EWENTUALNEGO WYKORZYSTANIA WYNIKÓW PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO	15
2.3.5. DALSZE PLANY BADAWCZE	15
2.3.6. BIBLIOGRAFIA	16
<b>3. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA</b>	<b>18</b>
3.1. STAŻE ZAGRANICZNE	18
3.2. KIEROWANIE I UCZESTNICTWO W GRANTACH BADAWCZYCH	19
3.3. WSPÓŁPRACE NAUKOWE (KRAJOWE I ZAGRANICZNE)	22
3.4. UDZIAŁ W INNYCH PROJEKTACH BADAWCZYCH REALIZOWANYCH W ZAKŁADZIE BIOCHEMII MÓZGU INSTYTUTU FARMAKOLOGII PAN	26
3.5. DZIAŁALNOŚĆ DYDAKTYCZNA	26
3.6. DZIAŁALNOŚĆ POPULARYZATORSKA I ZABIERANIE GŁOSU W SPRAWACH NAUKI	27
3.7. WYKŁADY NA KRAJOWYCH I MIĘDZYNARODOWYCH KONFERENCJACH ORAZ SPOTKANIACH NAUKOWYCH	28
3.8. UCZESTNICTWO W PANELACH EKSPERCKICH	29
3.9. RECENZJE PUBLIKACJI W CZASOPISMACH NAUKOWYCH	29
3.10. DZIAŁALNOŚĆ ORGANIZACYJNA	29
3.11. CZŁONKOSTWA W TOWARZYSTWACH NAUKOWYCH	30
<b>4. PODSUMOWANIE CAŁOŚCI DOROBKU NAUKOWEGO</b>	<b>30</b>
<b>5. ZAŁĄCZNIKI</b>	<b>31</b>
Załącznik 1 – DANE KONTAKTOWE	
Załącznik 2 – UWIERZYTELNIONY ODPIS Z DYPLOMU DOKTORSKIEGO	
Załącznik 3 – ANALIZA BIBLIOMETRYCZNA DOROBKU NAUKOWEGO PRZYGOTOWANA PRZEZ CENTRUM INFORMACJI NAUKOWEJ, BIBLIOTEKI I ARCHIWUM INSTYTUTU FARMAKOLOGII PAN	
Załącznik 4 – PEŁNY WYKAZ WSZYSTKICH PRAC OPUBLIKOWANYCH PRZEZ HABILITANTA	
Załącznik 5 – OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW PUBLIKACJI BĘDĄCYCH PRZEDMIOTEM DZIEŁA HABILITACYJNEGO	
Załącznik 6 – ZAŚWIADCZENIE PROWADZENIA ZAJĘĆ NA WYDZIALE HODOWLI I BIOLOGII ZWIERZĄT UNIwersytetu Rolniczego w Krakowie z podaniem wymiaru godzin	
Załącznik 7 – ZAŚWIADCZENIE PROWADZENIA ZAJĘĆ w Instytucie Nauk Biomedycznych Akademii Wychowania Fizycznego im. B. Czecha w Krakowie z podaniem wymiaru godzin	
Załącznik 8 – PEŁNE WERSJE PRAC STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ HABILITACJI	

## 1. Dane osobowe

### 1.1. Imię i nazwisko

**Grzegorz Kreiner**

### 1.2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

- 1994 **magister biologii** z prawem nauczania chemii, Uniwersytet Pedagogiczny w Krakowie (tytuł pracy magisterskiej: *Udział bakterii *Thiobacillus denitrificans* DSM 807 w procesie denitryfikacji biologicznego oczyszczania ścieków komunalnych*; promotor: prof. dr hab. Ryszard Pado)
- 2003 **doktor nauk medycznych**, Instytut Farmakologii PAN w Krakowie (tytuł rozprawy doktorskiej: *Badania nad ekspresją receptorów  $\alpha_{1A}$ - i  $\alpha_{1B}$ -adrenergicznych w mózgu szczura w modelowych terapiach przeciwdepresyjnych*; promotor: prof. dr hab. Irena Nalepa)

### 1.3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- 1994 – 1996 Instytut Farmakologii PAN, Zakład Biochemii, prac. inż.-tech.
- 1997 – 2005 Instytut Farmakologii PAN, Zakład Biochemii, asystent
- 2005 – 2008 German Cancer Research Center (DKFZ – Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Niemcy), Molecular Biology of the Cell I, post-doc
- 2008 – 2017 Instytut Farmakologii PAN, Zakład Biochemii Mózgu, adiunkt
- 2017 – Instytut Farmakologii PAN, Zakład Biochemii Mózgu, prac. badawczo-tech./specjalista

### 1.4. Inne

- 1994 CAE – Cambridge Certificate of Advanced English
- 1995 – 2005 Inspektor Ochrony Radiologicznej w IF PAN
- 1997 – 2005 przedstawiciel AMRESCO® Biochemicals na terenie Polski
- 2016 – wykładowca prowadzący zajęcia z przedmiotu Biochemia (umowa-zlecenie, Akademia Wychowania Fizycznego im. Bronisława Czecha w Krakowie)
- 2017 – kierownik Zakładu Inżynierii Genetycznej GMO/GMM w Instytucie Farmakologii PAN

2. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 poz. 1311)

2.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Wykorzystanie modeli transgenicznnych opartych o ablację czynnika transkrypcyjnego TIF-1A do badań nad neuroprotekcją w chorobach neurodegeneracyjnych

2.2. Lista publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

**Tabela 1.** Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego będącego przedmiotem habilitacji ze wskaźnikami bibliometrycznymi z roku opublikowania pracy i opisem wkładu habilitanta. Punkty IF/MNiSW liczone wg wskaźników podanych dla roku opublikowania pracy.

L.p.	Publikacja	IF	MNiSW	Wkład habilitanta
1	Parlato R, <b>Kreiner G</b> , Erdmann G, Rieker C, Stotz S, Savenkova E, Berger S, Grummt I, Schütz G: Activation of an endogenous suicide response after perturbation of rRNA synthesis leads to neurodegeneration in mice. <i>J Neurosci</i> <b>2008</b> ; 28:12759-64; doi: 10.1523/JNEUROSCI.2439-08.2008	7,452	24	Dr Parlato – jako pomysłodawca badań – jest pierwszym autorem publikacji, natomiast ja byłem odpowiedzialny za prowadzenie projektu podczas jej urlopu macierzyńskiego. Wykonałem eksperymenty zilustrowane na Fig 1G-L, 2I-P, 4A-C, 4F, uczestniczyłem w wykonaniu pozostałych, analizie i dyskusji wyników, wspólnie z GS i RP napisałem manuskrypt pracy. Swoj wkład w powstanie pracy oceniam na 50%.
2	<b>Kreiner G</b> , Bierhoff H, Armentano M, Rodriguez-Parkitna J, Sowodniok K, Naranjo JR, Bonfanti L, Liss B, Schütz G, Grummt I, Parlato R: A neuroprotective phase precedes striatal degeneration upon nucleolar stress. <i>Cell Death Differ</i> <b>2013</b> ; 20: 1455-1464; doi: 10.1038/cdd.2013.66	8,385	40	Wspólnie z dr Parlato i dr Bierhoffem byłem pomysłodawcą badań. Wykonałem eksperymenty zilustrowane na Fig. 2a-e; 3c; 4a,b, d-f; 5a,c; 6c; Suppl Fig. 2a, 3a-c, 4, 6a-d, uczestniczyłem w wykonaniu większości pozostałych, analizie i dyskusji wyników, redagowaniu manuskryptu. Opracowałem wyniki w ostatecznej formie, przygotowałem w finalnej wersji wszystkie ryciny i ostateczną wersję pracy. Swoj wkład w jej powstanie oceniam na 50%.
3	<b>Kreiner G</b> : Compensatory mechanisms in genetic models of neurodegeneration: are the mice better than humans? <i>Front Cell Neurosci</i> <b>2015</b> 6;9:56; doi: 10.3389/fncel.2015.00056	4,609	35	Praca przeglądowa napisana samodzielnie. Wkład w powstanie pracy – 100%
4	<b>Kreiner G</b> , Rafa-Zabłocka K, Chmielarz P, Bagińska M, Nalepa I: Lack of riluzole efficacy in the progression of the neurodegenerative phenotype in a new conditional mouse model of striatal degeneration. <i>PeerJ</i> <b>2017</b> ; 5:e3240; doi: 10.7717/peerj.3240	2,118	35	Byłem pomysłodawcą badań, zdobyłem środki na ich realizację (grant NCN Opus2), wykonałem eksperymenty zilustrowane na Fig. 2A-D i 3A-D, współuczestniczyłem w wykonaniu pozostałych. Przeanalizowałem wyniki, przygotowałem ryciny i napisałem manuskrypt pracy. Jestem jej autorem korespondencyjnym. Wkład własny w powstanie publikacji oceniam na 75%.

5	<b>Kreiner G:</b> What have we learned recently from transgenic mouse models about neurodegeneration? The most promising discoveries of this millennium. <i>Pharmacol Rep</i> <b>2018</b> , 70(6):1105-1115; doi: 10.1016/j.pharep.2018.09.006	2,787	25	Praca przeglądowa napisana samodzielnie. Wkład w powstanie pracy – 100%
6	<b>Kreiner G, Rafa-Zablocka K, Barut J, Chmielarz P, Kot M, Bagińska M, Parlato R, Daniel WA, Nalepa I:</b> Stimulation of noradrenergic transmission by reboxetine is beneficial for a mouse model of progressive Parkinsonism. <i>Scientific Rep</i> <b>2019</b> , 9:5262; doi: 10.1038/s41598-019-41756-3	4,122	40	Byłem pomysłodawcą badań, zdobyłem środki na ich realizację (grant NCN Opus2), wykonałem eksperymenty zilustrowane na Fig. 3A-D, współuczestniczyłem w wykonaniu pozostałych. Przeanalizowałem wyniki, przygotowałem ryciny i napisałem manuskrypt pracy. Jestem jej autorem korespondencyjnym. Swój wkład w powstanie publikacji oceniam na 60%.
		<b>29,473</b>	<b>199</b>	

Podsumowując, na osiągnięcie naukowe będące przedmiotem habilitacji składają się

- **4 prace oryginalne**
- **2 przeglądowne**

Sumaryczny IF prac wchodzących w skład dzieła habilitacyjnego – **29.473** (199 MNiSW), w tym **22.077** (139 MNiSW) z prac oryginalnych.

### 2.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

#### 2.3.1. Wprowadzenie

##### *Choroby neurodegeneracyjne*

Najpoważniejszym z zadań jakie stoją przed współczesną medycyną jest nie tyle samo przedłużenie życia ludzkiego (wg danych statystycznych GUS w Polsce wskaźnik średniej długości życia to obecnie 74 lata dla mężczyzn i 82 dla kobiet; w Japonii – odpowiednio 81 i 88 lat), ale zapewnienie by trwało ono we względnie dobrym zdrowiu do ostatnich dni. Jednym z największych zagrożeń dla dobrej kondycji umysłowej i fizycznej w podeszłym wieku są choroby neurodegeneracyjne, w znacznej większości przypadków o nieustalonej etiologii. Szacuje się, że np. zapadalność na chorobę Alzheimera obejmuje obecnie ok. 40 mln. ludzi na całym świecie a osiągnie 135 mln. do roku 2050, w przypadku choroby Parkinsona te wskaźniki wynoszą odpowiednio 6 mln. na chwilę obecna z alarmującą prognozą zapadalności co trzeciej osoby powyżej wieku 65 lat w roku 2050 (źródło: dane GUS, [www.alzheimer.org.pl](http://www.alzheimer.org.pl), [www.mayoclinic.org](http://www.mayoclinic.org)).

Zdecydowana większość chorób neurodegeneracyjnych, w tym ok. 90% przypadków choroby Alzheimera (AD) i Parkinsona (PD), należy do schorzeń idopatycznych o nieustalonej etiologii, ale nawet w przypadku chorób wywoływanych przez mutacje genetyczne (dziedziczne formy AD i PD czy choroba Huntingtona, HD) sekwencja procesów wewnątrzkomórkowych prowadzących do utraty neuronów pozostaje słabo poznana<sup>1</sup>. Pomimo ogromnych wysiłków, gigantycznych funduszy i wielu lat badań, postęp w możliwościach leczenia chorób neurodegeneracyjnych nie wydaje się szczególnie

spektakularny. Aktualnie dostępne farmakoterapie wciąż ograniczają się wyłącznie do leczenia objawowego i nie są w stanie zahamować progresji choroby.

Wśród niektórych badaczy istnieje pogląd, iż różne choroby neurodegeneracyjne mogą posiadać wspólne szlaki prowadzące do ostatecznej śmierci komórki. Upośledzenie mitochondriów, procesy zapalne, zaburzenia degradacji białek, funkcji jąderka komórkowego, stres oksydacyjny, apoptoza i autofagia - wszystkie te procesy, postulowane jako zaangażowane w procesach neurodegeneracyjnych, nie stanowią specyficznej cechy konkretnego schorzenia. Postuluje się, że takie holistyczne podejście może przyczynić się do lepszego zrozumienia patofizjologii neurodegeneracji<sup>2</sup>. Dogłębne poznanie tych wewnątrzkomórkowych procesów na poziomie molekularnym wraz z rozwojem wczesnej diagnostyki chorób neurodegeneracyjnych może przyczynić się w przyszłości do projektowania nowych farmakoterapii o charakterze neuroprotektynym, wprowadzanych – co ważne – na wczesnym etapie neurodegeneracji, przed wystąpieniem objawów związanych z nieodwracalną utratą komórek nerwowych.

### Modele badawcze

Aby badać mechanizmy molekularne chorób neurodegeneracyjnych, a także testować potencjalne farmakoterapie, konieczne są dobre modele zwierzęce. Stanowią one wciąż niezastąpiony pomost pomiędzy badaniami *in-vitro* z wykorzystaniem linii komórkowych a próbami klinicznymi. Można przyjąć, że idealny model choroby neurodegeneracyjnej powinien charakteryzować się następującymi pięcioma paradygmatami<sup>3</sup>:

- obraz neuropatologii widoczny dopiero u zwierząt dorosłych;
- upośledzenie kognitywne lub motoryczne typowe dla przebiegu schorzenia;
- występowanie charakterystycznych inkluzji białkowych dla danej choroby (ciała Lewy'ego, splątki, plaki itp.);
- progresja postępująca w czasie, odzwierciedlająca sekwencję zmian neurodegeneracyjnych;
- relatywnie krótki przebieg procesu neurodegeneracyjnego dla efektywnego badania i testowania potencjalnych terapii.

Niestety, taki idealny model nie istnieje. Klasyczne, farmakologiczne modele oparte o podania rozmaitych neurotoksyn (np. 6-OHDA, MPTP stosowane do wywołania neurodegeneracji dopaminowej odzwierciedlającej fenotyp PD, kwas kainowy – degeneracji neuronów prążkowiec w przebiegu HD, podanie  $\beta$ -amyloidu dla wywołania zmian kognitywnych przypominających fenotyp AD) spełniają wprawdzie pierwsze dwa warunki (fenotyp widoczny u zwierząt dorosłych) ale działają na zasadzie systemu „zero-jedynkowego” (podanie toksyny wywołuje natychmiastowy efekt) i tym samym zazwyczaj nie umożliwiają badania powolnego procesu utraty komórek nerwowych, tak charakterystycznego dla chorób neurodegeneracyjnych. Ponadto, modele te z definicji raczej nigdy nie będą miały wiele wspólnego z rzeczywistą etiopatologią schorzenia.

W drugiej połowie XX wieku wielkie nadzieje pokładano w modelach transgenicznych, stworzonych głównie na myszach. Wybór tego gatunku podyktowany był nie tylko względami praktycznymi (relatywnie niskie koszty utrzymania zwierząt, efektywność hodowli, dostępność miejsca dla bytowania zwierząt itp.) ale przede wszystkim technicznymi ograniczeniami związanymi z koniecznością wykorzystania w procesie transgenezy na etapie homologicznej rekombinacji embrionalnych komórek macierzystych. Było to stosunkowo łatwe do przeprowadzenia u myszy, u szczurów stało się możliwe dopiero w roku 2008<sup>4</sup>. Pierwsze modele transgeniczne były oparte o strategię wiernego powielania mutacji odpowiedzialnych za ludzkie formy niektórych chorób neurodegeneracyjnych, zwykle poprzez tworzenie zwierząt z delecją konkretnego genu (tzw. knock-out, KO), jednak zbieżność tych modeli z oczekiwanym fenotypem często nie była zadowalająca<sup>5-7</sup>. Należy tu podkreślić, że tzw. globalny knock-out (KO) niesie ze sobą sporo trudnych do przewidzenia problemów – z jednej strony niejednokrotnie letalność spowodowaną kontrolowaniem przez dany gen

również innych, ważnych funkcji życiowych (zwłaszcza na etapie prenatalnym) z drugiej – wywołanie szeregu zmian kompensacyjnych, powodujących w efekcie brak pożądanej odpowiedzi fenotypowej. Są to często podnoszone argumenty przeciwko traktowaniu modeli genetycznych jako wartościowych dla badania złożonych procesów składających się na całość procesu danej choroby.

Wprowadzenie w połowie lat 90. XX wieku technologii tworzenia modeli opartych o warunkową/indukowaną ekspresję genów z wykorzystaniem tzw. rekombinacji zlokalizowanej (np. system *Cre/loxP*) zrewolucjonizowało metodologię otrzymywania zwierząt transgeniczných, umożliwiając ukierunkowanie mutacji do określonych populacji komórkowych<sup>8</sup>. Dodatkowo, modele indukowane pozwoliły na przezwycięzenie wielu problemów związanych z efektami kompensacyjnymi i niespecyficzną, jakimi obarczone były często modele typu KO. Systemy warunkowej/indukowanej ekspresji genów umożliwiają włączanie mutacji już na etapie dorosłego życia zwierzęcia, co jest szczególnie pożądane w przypadku badań nad neurodegeneracją, a prawidłowy dobór odpowiedniego promotora rekombinazy Cre gwarantuje wycięcie badanego genu wyłącznie w wybranej populacji komórek.

Obecnie jesteśmy świadkami kolejnego przełomu w transgenice. Niedawne odkrycie potężnego i stosunkowo prostego w swoich założeniach narzędzia do edycji genów, systemu CRISPR/Cas9<sup>9,10</sup> – metodologii uznanej w 2015 roku za przełom roku w naukach biologicznych, której odkrywcy stali się poważnymi kandydatami do nagrody Nobla – otworzyło nową erę transgeniki, która z pewnością zaowocuje wprowadzeniem na scenę wielu modeli zwierzęcych w niedalekiej przyszłości<sup>11,12</sup>.

#### Czynnik transkrypcyjny TIF-1A

Czynnik transkrypcyjny TIF-1A, zlokalizowany w jąderkach komórkowych, jest kluczowym regulatorem polimerazy I sterującej procesem biosyntezy białka<sup>13</sup>. Jąderka komórkowe (ang. *nucleolus*), zlokalizowane wewnątrz jądra komórki, są odpowiedzialne za syntezę rybosomalnego RNA. Jednak oprócz tej „tradycyjnej” roli pełnionej przez te organella komórkowe, jąderka pełnią ważną rolę w utrzymaniu homeostazy komórki, pośrednicząc w rozmaitych procesach wewnątrzkomórkowych<sup>14,15</sup>. Niekorzystne zmiany molekularne związane z upośledzoną aktywnością jąderkową pod pojęciem tzw. „**stresu jąderkowego**” (ang. *nucleolar stress*) zaczęły być postrzegane jako istotne czynniki sprawcze w rozmaitych procesach chorobotwórczych powiązanych z uszkodzeniami na poziomie DNA<sup>16</sup>, choć do określenia ich dokładnej roli droga jeszcze daleka. Wykazano m.in., że prawidłowe funkcjonowanie jąderka jest niezbędne m.in. do przeżycia neuronów, odpowiada za aktywność mitochondriów i liczne szlaki wewnątrzkomórkowej sygnalizacji<sup>17</sup>. Upośledzenie funkcji jąderka zostało skorelowane w ostatnich latach również z patofizjologią chorób neurodegeneracyjnych w tym PD, oraz innych, rzadkich chorób genetycznych<sup>18,19</sup>.

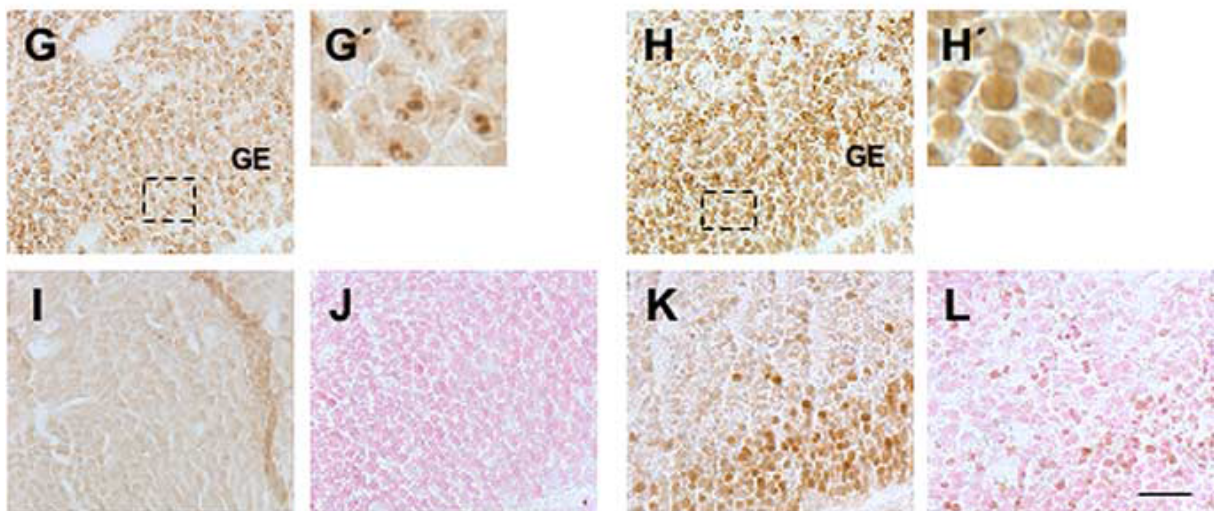
#### 2.3.2. Geneza cyklu prac wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego

W 2005 roku ukazała się praca autorstwa Yuan et al. z grupy badawczej prof. Ingrid Grummt z German Cancer Research Center (Deutsches Krebsforschungszentrum, DKFZ) w Heidelbergu, pokazująca *in-vitro* możliwość wywołania zaprogramowanej śmierci komórek na drodze apoptozy zależnej od białka p53<sup>20</sup>. Opublikowanie tej pracy zbiegło się z moim przyjazdem do Heidelbergu (maj 2005), gdzie w latach 2005-2008 miałem przyjemność odbyć blisko **3.5 roczny staż doktorski w grupie prof. Günthera Schütza** (Laboratory of Molecular Biology of the Cell I). Współpracując z dr Rosanną Parlato, przebywającą również w tym czasie na stażu doktorskim w grupie prof. Schütza, zainteresowaliśmy się możliwością wykorzystania tego narzędzia badawczego *in-vivo*, do wywołania zaprogramowanej śmierci wybranych populacji komórkowych, tworząc odpowiednie modele transgeniczne chorób neurodegeneracyjnych w systemie warunkowych rekombinacji *Cre/loxP*. Ponieważ pierwsze próby były bardzo obiecujące, wspólnie z pozostałymi osobami zaangażowanymi w projekt dokonaliśmy **zgłoszenia patentowego** chroniącego pomysł tworzenia transgeniczných modeli

zwierzęcych, opartych o komórkowo-specyficzną ablację **czynnika transkrypcyjnego TIF-IA** i wywołanie apoptotycznej śmierci komórek w celu studiowania przebiegu chorób neurodegeneracyjnych na przykładzie choroby Parkinsona (**patent WO/2007/110245**). Równolegle, wraz z dr Rosanną Parlato i dr Clausem Riekerem (wówczas doktorantem w grupie prof. Schütza) dokonaliśmy charakterystyki modelu *in-vivo*, początkowo na bazie myszy z delecją czynnika transkrypcyjnego TIF-IA w neuronalnych komórkach progenitorowych<sup>21</sup>, później także w komórkach ekspresjonujących transporter dopaminowy (DAT) jako model progresywnego parkinsonizmu (linia TIF-IA<sup>DAT<sup>Cre</sup>ERT2</sup>), opublikowany ostatecznie w 2011 roku w *J Neurosci*<sup>22</sup>. W pracy tej opisano cały szereg postępujących progresywnie zmian neurodegeneracyjnych, charakterystycznych dla przebiegu PD. Ponieważ było to podsumowanie doktoratu Clausa Riekera, gdzie habilitant pełnił tylko doradczą rolę i wykonał niewielki fragment eksperymentów, publikacja ta (Rieker et al., *J Neurosci*, 2011) nie jest włączona do osiągnięcia habilitacyjnego.

### 2.3.3. Omówienie głównych wyników cyklu prac (osiągnięcia naukowego)

Dla zweryfikowania możliwości wykorzystania do badań nad neurodegeneracją narzędzia jakim była celowana delecja genu kodującego czynnik transkrypcyjny TIF-IA, w pierwszym etapie badań, z pomocą systemu warunkowej rekombinacji *Cre/loxP*, wywołaliśmy ablację TIF-IA w **neuronalnych komórkach progenitorowych** używając jako promotora rekombinazy Cre białka nestyny. W efekcie, czynnik transkrypcyjny TIF-IA został usunięty ze wszystkich komórek ekspresjonujących nestynę, już na etapie prenatalnym (myszy TIF-IA<sup>NesCre</sup>). Jak spodziewaliśmy się, brak TIF-IA w neuronalnych komórkach progenitorowych okazał się letalny, u myszy nie dochodziło do rozwoju układu nerwowego<sup>21</sup>. Ten model, oczywiście bezużyteczny jeśli chodzi o praktyczne zastosowanie, pozwolił nam jednak w szybki sposób pozytywnie zweryfikować, czy opisany system *in-vitro* może być wykorzystany do modelowania chorób polegających na utracie komórek nerwowych. Kwestią było tylko dobranie odpowiedniego promotora rekombinazy Cre. Ponadto – co ważne – w krótkim czasie zdołaliśmy potwierdzić *in-vivo* zakładaną kinetykę zmian molekularnych, wykazując kolejno wzrost akumulacji białka p53, apoptozę i w rezultacie śmierć komórek ekspresjonujących nestynę (**Ryc. 1**)<sup>21</sup>.



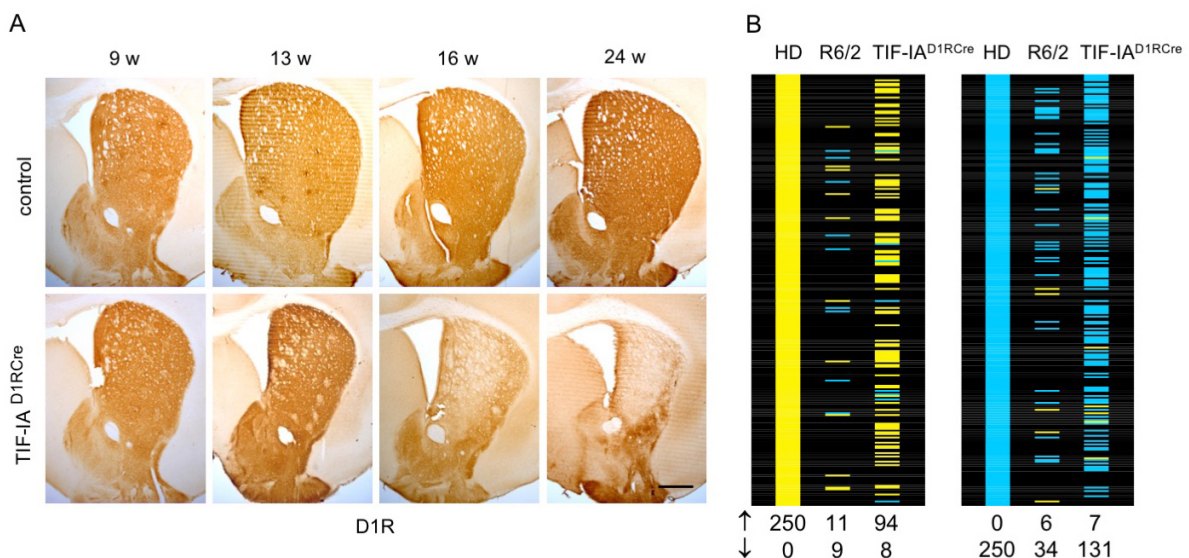
**Ryc. 1.** Efekty mutacji u myszy TIF-IA<sup>NesCre</sup> widoczne na etapie rozwojowym: dezintegracja jąder widoczna w barwieniu z przeciwciałem anti-NPM/B23 (H,H'), wzrost ekspresji białka p53 (K), apoptoza mierzona wzrostem ekspresji kaspazy 3 (L). Po lewej stronie analogiczny układ eksperymentalny u zwierząt kontrolnych (G,I,J). (Parlato et al., *J Neurosci*, 2008).

Kolejnym etapem było wygenerowanie modeli opartych o usunięcie czynnika transkrypcyjnego TIF-IA w dojrzałych neuronach, co wywołało ich postępującą degenerację. Efekt ten wykorzystaliśmy w dwóch stworzonych przez nas liniach myszy transgenicznnych, wspomnianej już na wstępie TIF-



IA<sup>DATCreERT2</sup> i TIF-IA<sup>D1Cre</sup>, gdzie gen kodujący TIF-IA był usuwany selektywnie odpowiednio z **komórek dopaminowych rejonu substancji czarnej i pola brzusznej nakrywki** (ang. *substantia nigra, ventral tegmental area, SN/VTA*) (linia TIF-IA<sup>DATCreERT2</sup>) oraz **prążkowie** (linia TIF-IA<sup>D1Cre</sup>), co powodowało wierne odtworzenie sekwencji zmian neurodegeneracyjnych obserwowanych odpowiednio w PD<sup>22</sup> i HD<sup>23</sup>. W pierwszym przypadku jako promotora rekombinazy Cre użyto transportera dopaminowego (DAT), w drugim przypadku rekombinaza Cre była pod kontrolą promotora D1R (receptor dopaminowy D1).

Warto podkreślić, że istotną cechą wszystkich modeli opartych o ablację TIF-IA jest wywołanie zmian o charakterze **postępującym**, rozwijających się na przestrzeni kilku tygodni, co pozwala na rzeczywiste odzwierciedlenie kinetyki procesów neurodegeneracyjnych, jak również daje możliwość badania ścieżek molekularnych zaangażowanych w ich rozwój. Ponadto, w świetle ostatnich doniesień literaturowych, zjawisko zahamowania syntezy rRNA będące bezpośrednim efektem wywołanej mutacji (*nucleolar stress*) wydaje się mieć nie tylko znaczenie narzędziowe, ale może istotnie być elementem rzeczywistego procesu neurodegeneracyjnego<sup>18</sup>. Być może właśnie dlatego, obie linie odzwierciedlały wiernie fenotyp zmian neurodegeneracyjnych, charakterystyczny zarówno w przypadku linii modelującej PD jak i HD. W obu przypadkach postępująca utrata neuronów była wyraźnie skorelowana z zaburzeniami motoryki zwierząt mierzonymi na przestrzeni tygodni w testach behawioralnych (rotarod, test kłaśnieć – ang. *claspings behavior*, ruchliwość zwierząt). Zwierzęta TIF-IA<sup>D1Cre</sup> na wczesnym etapie zmian neurodegeneracyjnych poprzedzającym utratę neuronów w rejonie prążkowie, charakteryzowały się ponadto widocznym podniesieniem markerów stresu oksydacyjnego, mikro- i astrogleju, zmianami w aktywności kompleksów mitochondrialnych. Co szczególnie interesujące, w przypadku linii TIF-IA<sup>D1Cre</sup> profilowanie ekspresji genów ujawniło, że 13-tygodniowe myszy TIF-IA<sup>D1Cre</sup> wykazują zadziwiająco podobny **profil transkryptyczny** w stosunku do obserwowanego w przebiegu ludzkiej choroby Huntingtona, daleko bardziej zgodny niż inne modele HD, jak choćby najpowszechniej używany model myszy R6/2 (**Ryc. 2**).

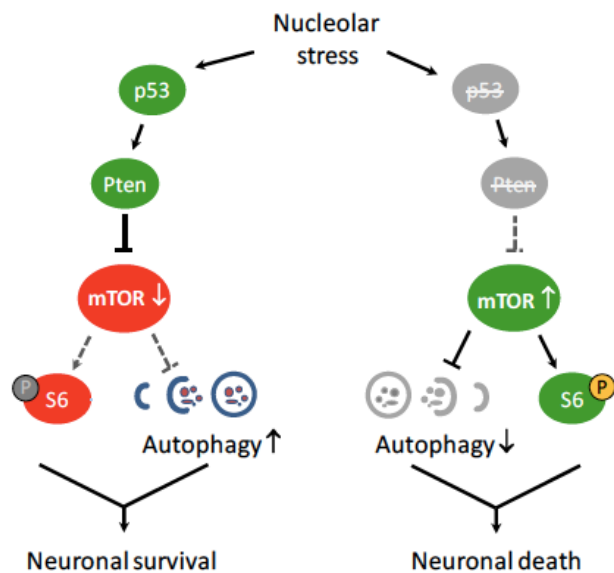


**Ryc. 2.** (A) Postępująca neurodegeneracja u myszy TIF-IA<sup>D1Cre</sup> uwidoczniła na przestrzeni kilku tygodni za pomocą barwienia IHC z przeciwciałem anti-D1R w prążkowie. (B) Porównanie istotnych statystycznie zmian transkryptycznych dla 250 genów o najbardziej podwyższonej i obniżonej ekspresji w HD (dane zebrane na materiale ludzkim) w stosunku do modelu R6/2 i TIF-IA<sup>D1Cre</sup> (Kreiner et al., *Cell Death Diff*, 2013).

Po zakończeniu stażu doktorskiego powyższe linie myszy transgeniczných zostały przeniesione do Instytutu Farmakologii PAN, gdzie wykorzystano je do badań nad neuroprotekcją i farmakologiczną weryfikacją potencjalnych strategii neuroprotektorycznych w powyższych modelach

(grant NCN Opus2 2011/03/B/NZ7/05949, kierownik: dr Grzegorz Kreiner). Założenia tych badań zostały ujęte w opublikowanej przeze mnie równolegle pracy przeglądowej wyrażającej pogląd, że brak fenotypu obserwowany niekiedy w modelach zwierzęcych stworzonych na bazie celowania w mutacje odpowiedzialne za ludzkie formy chorób neurodegeneracyjnych niekoniecznie oznacza, iż model jest nieprzydatny. Przeciwnie, może skłaniać do badań w kierunku identyfikacji możliwych **mechanizmów neuroprotekcyjnych**, zaangażowanych w „odporność” zwierząt na wywołaną mutację<sup>24</sup>.

Jednym z takich mechanizmów może być wzajemna regulacja procesów apoptozy i autofagocytozy, obserwowana w modelu TIF-IA<sup>D1RCre</sup> i opisana w pracy Kreiner et al., *Cell Death Differ*, 2013<sup>23</sup>.



Ryc. 3. Schemat reprezentujący zależną od p53/Pten neuroprotekcijną odpowiedź komórkową na wywołaną mutację u myszy

W publikacji tej wykazano istnienie neuroprotekcijnej fazy obronnej obserwowanej u 9-tygodniowych myszy TIF-IA<sup>D1RCre</sup> w odpowiedzi na wprowadzoną mutację, polegającej na przejściowej aktywacji zależnej od białka p53 fosfatazy PTEN oraz zahamowaniu ścieżki sygnalizacyjnej związanej z kinazą mTOR (ang. *mammalian target of rapamycin*) co powodowało nasilenie procesów **autofagocytozy**<sup>23</sup>. Jednym z głównych osiągnięć tej pracy było udowodnienie, że dodatkowe usunięcie p53/PTEN przyspiesza fenotyp neurodegeneracyjny u myszy TIF-IA<sup>D1RCre</sup> pozbawiając komórki możliwości aktywowania obronnego procesu autofagocytozy poprzez inhibicję szlaku mTOR (Ryc. 3).

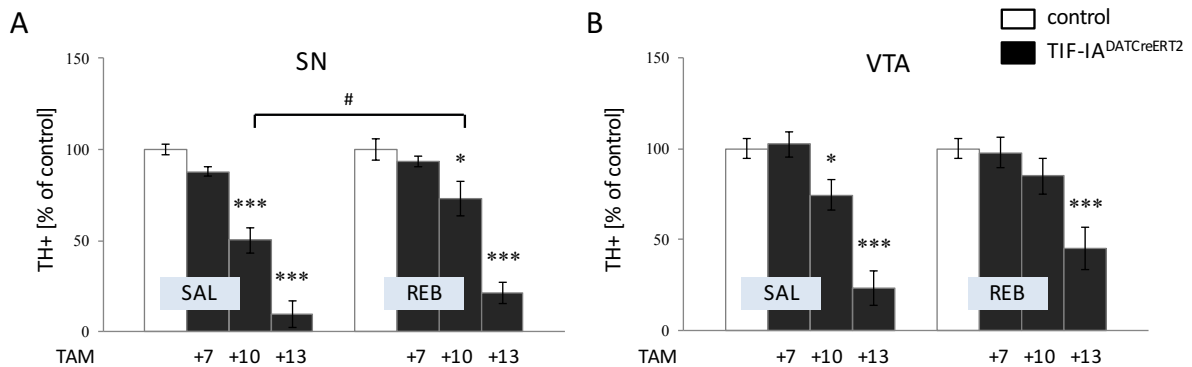
W dalszych badaniach podjęto próbę wykazania, czy dodatkowe nasilenie tego procesu poprzez chroniczne podania **trehalozy** (roztwór 2%, per os, 8 tyg.) może wpływać pozytywnie na modulację fenotypu mutacji. Trehaloza posiada udokumentowane działanie wzmagające autofagocytozę, niezależne od szlaku mTOR<sup>25,26</sup>. Próba ta jednak okazała się nieskuteczna. Zwierzęta przyjmujące trehalozę (roztwór 2%, per os) – w przeciwieństwie do zwierząt otrzymujących zwykłą wodę oraz maltozę (kontrola negatywna) – wykazywały wprawdzie nieco zwiększony poziom ekspresji białka LC3 (marker autofagocytozy), ale nie miało to znaczenia praktycznego (dane nieopublikowane). Z drugiej strony, może to podkreślać, że dla efektów neuroprotekcyjnych istotne jest właśnie zaangażowanie przekąźnictwa poprzez szlak mTOR a nie tylko samo wzmożenie procesów autofagocytarnych.

Kolejną próbą weryfikacji innej strategii neuroprotekcijnej w tym modelu polegała na **stymulacji neurogenezy** w prądkowiu poprzez chroniczne podania **riluzolu** (5 mg/kg, i.p., 14 dni), leku wprowadzonego kilka lat temu do leczenia stwardnienia zanikowego bocznego (ALS) i HD, z postulowanym udziałem w nasileniu procesu neurogenezy<sup>27,28</sup>. Po podaniach riluzolu zaobserwowano istotnie znamienne statystycznie nasilenie neurogenezy w rejonie strefy podkomorowej (SVZ, ang. *subventricular zone*) wykazane w barwieniach immunofluorescencyjnych z użyciem markera Ki67, nie wpłynęło to jednak na kinetykę postępującego procesu neurodegeneracji jak również na zmiany w morfologii neuronów, mierzone analizą ilości kolców dendrytycznych<sup>29</sup>. Mogło to wynikać z konieczności zastosowania mniejszej dawki riluzolu niż zakładanej w projektowanych badaniach i podawanej w piśmiennictwie, ze względu na dużą śmiertelność zwierząt. Ze względu na brak tolerancji u myszy linii TIF-IA<sup>D1RCre</sup> stosowanej standardowo w badaniach dziennej dawki riluzolu (30 mg/kg, i.p.), konieczne było jej zmniejszenie (aż do 5 mg/kg, i.p.) oraz skrócenie planowanego okresu podań

(14 dni zamiast 21), co mogło mieć wpływ na uzyskane wyniki. Niemniej jednak, wykazanie efektu wzmożenia neurodegeneracji pod wpływem riluzolu stanowiło oryginalne odkrycie tej pracy.

W następnym etapie badań dokonano weryfikacji hipotezy **neuroprotektoryjnej roli noradrenaliny** i możliwości wykorzystania tego zjawiska dla strategii przyszłych farmakoterapii choroby PD. Jak powszechnie wiadomo, PD jest powoli postępującą chorobą neurodegeneracyjną ośrodkowego układu nerwowego, prowadzącą do zaniku komórek nerwowych układu dopaminowego w rejonie SN/VTA, co bezpośrednio odpowiada za jej objawy. PD jest związana jednak nie tylko z neurodegeneracją w obrębie układu dopaminowego, odpowiedzialnego bezpośrednio za powstawanie symptomów, ale także z dysfunkcją innych systemów pozapiramidowych, a w szczególności układu noradrenergicznego<sup>30</sup>. Postuluje się nawet, że degeneracja komórek układu noradrenergicznego w miejscu sinawym (LC, *locus ceruleus*) może poprzedzać, a nawet przewyższać utratę komórek dopaminowych<sup>31,32</sup>. Dane eksperymentalne wskazują na istotną zależność pomiędzy poziomem noradrenaliny w mózgu a podatnością na neurotoksyny indukujące parkinsonizm u myszy, podkreślając neuroprotektoryjną rolę tego neurotransmitera<sup>33-35</sup>.

Do badań w tym kierunku wykorzystano model progresywnego parkinsonizmu, oparty o usunięcie czynnika transkrypcyjnego z rejonu SN/VTA (linia TIF-IA<sup>DATCreERT2</sup>). Wykazano, iż stymulacja układu noradrenergicznego poprzez chroniczne podanie leku z grupy selektywnych inhibitorów wychwytu zwrotnego noradrenaliny, **reboksetyny** (20 mg/kg, i.p., 21 dni), powodowała spowolnienie progresji fenotypu mutacji. Podanie reboksetyny łączyło obserwowany u 13-tyg. myszy TIF-IA<sup>DATCreERT2</sup> postęp w zaburzeniach motorycznych mierzonych w teście rotarod jak również przyczyniało się do spowolnienia zarówno spadku liczby komórek TH+ w rejonie SN/VTA jak i obniżenia poziomu dopaminy w prążkowie w stosunku do myszy zmutowanych, nie otrzymujących leku<sup>36</sup>. Różnica ta była widoczna szczególnie u zwierząt w 10 tygodniu od indukcji mutacji wywołanej poprzez podanie tamoksifenu (**Ryc. 4**).



**Ryc. 4.** Neuroprotektoryjne efekty chronicznych podań reboksetyny (REB) widoczne u myszy TIF-IA<sup>DATCreERT2</sup> wyrażone poprzez zliczenia komórek TH+ w rejonie SN (A) i VTA (B). TAM+7,+10,+13 – liczba tygodni od indukcji mutacji (Kreiner et al., *Scientific Rep.* 2019).

Analogiczna próba serii eksperymentów z zastosowaniem chronicznych podań antagonisty receptorów alpha<sub>2</sub>-AR, **atipamezolu** (3 mg/kg, i.p., 21 dni) – inne podejście w kontekście mechanizmu działania, ale prowadzące również do nasilenia transmisji noradrenergicznej – nie wykazała podobnych efektów. W dodatkowych badaniach *in-vitro* potwierdziliśmy jednak na przykładzie **fenylefryny**, że agoniści noradrenergiczni mają pozytywny wpływ na przeżywalność komórek dopaminowych z embrionalnych hodowli pierwotnych<sup>36</sup>.

Podsumowując, uzyskane wyniki wykazały, iż modele chorób neurodegeneracyjnych oparte o selektywną ablację czynnika transkrypcyjnego TIF-IA mogą stanowić interesujące narzędzie nie tylko do badania samego procesu neurodegeneracyjnego, ale także dla testowania strategii farmakoterapii opartych na stymulowaniu endogennych mechanizmów neuroprotektoryjnych. Wydaje się, iż takie

podejście stanowi wciąż niedoceniane pole dla dalszych badań nad możliwą terapią chorób neurodegeneracyjnych. Podsumowaniem osiągnięcia habilitacyjnego w bardziej szerokim ujęciu było opublikowanie na koniec pracy przeglądowej, omawiającej wkład wiedzy w zrozumienie patomechanizmów neurodegeneracji, jaki dostarczyły modele transgeniczne chorób neurodegeneracyjnych badane na przestrzeni ostatnich 20 lat<sup>37</sup>.

#### 2.3.4. Omówienie ewentualnego wykorzystania wyników prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Postęp inżynierii genetycznej w ciągu ostatnich dwóch dekad zaowocował wygenerowaniem bardzo wielu genetycznych modeli chorób neurodegeneracyjnych (głównie u myszy), stanowiących doskonałą alternatywę dla klasycznych modeli farmakologicznych. Wiele z nich znacząco przyczyniło się do poszerzenia naszej wiedzy o etiologii i rozwoju chorób ludzkich, jak również do identyfikacji szlaków molekularnych regulowanych przez badane w ten sposób geny. Niemniej jednak okazało się, iż wiele z takich modeli nie w pełni odzwierciedla oczekiwane zmiany fenotypowe<sup>37</sup>. Co więcej, nawet wierne skopiowanie mutacji będących bezpośrednią przyczyną rozmaitych chorób u ludzi nie zawsze wywoływało analogiczne zmiany patomorfologiczne u zwierząt<sup>37</sup>. Obserwowany brak korelacji wprowadzonej mutacji z oczekiwanym fenotypem jest często postrzegany przez krytyków transgeniki jako jej zasadnicza wada, skłania też badaczy do zaniechania dalszej charakterystyki i wykorzystania takich modeli. Tymczasem może to stanowić szansę dla wykrycia i opisanie rozmaitych mechanizmów kompensacyjnych, których stymulacja mogłaby mieć potencjalnie znacznie terapeutyczne<sup>24</sup>. Badania realizowane w ramach niniejszego projektu poszerzyły wiedzę na temat dwóch takich strategii neuroprotekcyjnych dotyczących stymulacji układu noradrenergicznego oraz nasilenia procesów autofagocytozy. W obu przypadkach wykazano skuteczność zaprezentowanego podejścia eksperymentalnego w badanych modelach transgenicznych chorób neurodegeneracyjnych.

Osobnym problemem jest wciąż niewielka liczba modeli, w których oprócz oczekiwanego fenotypu obserwuje się skorelowaną z nim, postępującą w czasie kinetykę procesu utraty komórek nerwowych tak charakterystyczną dla ludzkich chorób neurodegeneracyjnych. Analizowane w projekcie, nowe modele oparte o ablację czynnika transkrypcyjnego TIF-1A wydają się doskonale wypełniać tę lukę i – jak wykazały doświadczenia przeprowadzone w ramach niniejszego projektu – ze względu na progresywną kinetykę procesu neurodegeneracyjnego i możliwość jej regulacji poprzez czynniki zewnętrzne, mogą stanowić cenne narzędzie badawcze dla weryfikacji innych terapii neuroprotekcyjnych.

#### 2.3.5. Dalsze plany badawcze

Pomimo solidnych dowodów klinicznych na istnienie korelacji pomiędzy układami noradrenergicznym a dopaminowym w PD<sup>38,39</sup>, jak dotychczas podjęto bardzo niewiele prób badań eksperymentalnych długotrwałego wpływu degeneracji noradrenergicznej na funkcjonowanie układu dopaminowego, przede wszystkim z braku odpowiednich modeli zwierzęcych. Klasyczne podejście farmakologiczne polegające na wywołaniu lezji noradrenergicznej przez neurotoksynę DSP-4 dostarczyło wprawdzie dowodów na kontrolowanie przez układ noradrenergiczny uwalniania dopaminy w prążkowiu, ale na dłuższą metę nie przyniosło rozstrzygnięcia, prawdopodobnie z powodu funkcjonalnej odwracalności lezji po dłuższym czasie od jej wywołania<sup>40</sup>. We wstępnych badaniach z użyciem trzeciej linii transgenicznej z delecją czynnika transkrypcyjnego TIF-1A z wywołaną progresywną neurodegeneracją **układu noradrenergicznego** (linia TIF-1A<sup>DBHCre</sup>), zaobserwowano szereg zmian świadczących o dysfunkcji układu dopaminowego (nie będącego w tym modelu celem mutacji): wzrost stresu oksydacyjnego, aktywację astrogleju, podniesienie ekspresji cytokin prozapalnych czy nawet pojedyncze neurony z pozytywnym sygnałem dla FluoroJadeC (marker

specyficzny dla degenerujących komórek). Niestety, ze względu na to, iż ekspresja promotora hydroksylazy  $\beta$ -dopaminowej (DBH) jest również obecna na obwodzie, mutacja dotyka także pozaośrodkowych struktur układu noradrenergicznego, prowadząc m.in. do zaniku rdzenia nadnerczy i wczesnej letalności zwierząt.

Niemniej jednak, obiecujące wyniki uzyskane w modelu TIF-IA<sup>DBHCre</sup> odnośnie możliwości badania wstępnej, przedklinicznej fazy PD na myszach z selektywną i progresywną neurodegeneracją noradrenergiczną stały się podstawą do kontynuacji projektu w tym kierunku, realizowanego w kolejnym grantie (**NCN Opus 13 2017/25/B/NZ7/02406, kierownik: dr Grzegorz Kreiner**). W projekcie tym, rozpoczętym w ub. roku, na bazie tworzonych aktualnie w oparciu o **technologię CRISPR/Cas9** modelu selektywnej degeneracji neuronów LC (ograniczonej tym razem wyłącznie do ośrodkowego układu nerwowego) zamierzamy zbadać wpływ takiego uszkodzenia na funkcjonowanie układu dopaminowego w celu poszukiwania ew. przedklinicznych markerów PD.

### 2.3.6. Bibliografia

- 1 Labbadia, J. & Morimoto, R. I. Huntington's disease: underlying molecular mechanisms and emerging concepts. *Trends Biochem Sci* 38, 378-385, doi:10.1016/j.tibs.2013.05.003 S0968-0004(13)00078-9 [pii] (2013).
- 2 Ahmed, R. M. *et al.* Neuronal network disintegration: common pathways linking neurodegenerative diseases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 87, 1234-1241, doi:10.1136/jnnp-2014-308350 (2016).
- 3 Beal, M. F. Parkinson's disease: a model dilemma. *Nature* 466, S8-10, doi:10.1038/466S8a 466S8a [pii] (2010).
- 4 Li, P. *et al.* Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell* 135, 1299-1310 (2008).
- 5 Chang, R., Liu, X., Li, S. & Li, X. J. Transgenic animal models for study of the pathogenesis of Huntington's disease and therapy. *Drug Des Devel Ther* 9, 2179-2188, doi:10.2147/DDDT.S58470 (2015).
- 6 Cuadrado-Tejedor, M. & Garcia-Osta, A. Current animal models of Alzheimer's disease: challenges in translational research. *Front Neurol* 5, 182, doi:10.3389/fneur.2014.00182 (2014).
- 7 Dawson, T. M., Ko, H. S. & Dawson, V. L. Genetic animal models of Parkinson's disease. *Neuron* 66, 646-661, doi:10.1016/j.neuron.2010.04.034 (2010).
- 8 Copeland, N. G., Jenkins, N. A. & Court, D. L. Recombineering: a powerful new tool for mouse functional genomics. *Nat Rev Genet* 2, 769-779, doi:10.1038/3509355635093556 [pii] (2001).
- 9 Deltcheva, E. *et al.* CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 471, 602-607, doi:10.1038/nature09886 (2011).
- 10 Jinek, M. *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816-821, doi:10.1126/science.1225829 (2012).
- 11 Doudna, J. Genome-editing revolution: My whirlwind year with CRISPR. *Nature* 528, 469-471 (2015).
- 12 Sander, J. D. & Joung, J. K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol* 32, 347-355, doi:10.1038/nbt.2842 [pii] (2014).
- 13 Yuan, X., Zhao, J., Zentgraf, H., Hoffmann-Rohrer, U. & Grummt, I. Multiple interactions between RNA polymerase I, TIF-IA and TAF(I) subunits regulate preinitiation complex assembly at the ribosomal gene promoter. *EMBO Rep* 3, 1082-1087, doi:10.1093/embo-reports/kvf212 (2002).
- 14 Boisvert, F. M., van Koningsbruggen, S., Navascues, J. & Lamond, A. I. The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 574-585, doi:10.1038/nrm2184 (2007).
- 15 Hetman, M. & Pietrzak, M. Emerging roles of the neuronal nucleolus. *Trends Neurosci* 35, 305-314, doi:10.1016/j.tins.2012.01.002 (2012).
- 16 Pietrzak, M. *et al.* Nucleolar disruption and apoptosis are distinct neuronal responses to etoposide-induced DNA damage. *J Neurochem* 117, 1033-1046, doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07279.x (2011).
- 17 Mayer, C., Bierhoff, H. & Grummt, I. The nucleolus as a stress sensor: JNK2 inactivates the transcription factor TIF-IA and down-regulates rRNA synthesis. *Genes Dev* 19, 933-941, doi:10.1101/gad.333205 (2005).

- 18 Parlato, R. & Kreiner, G. Nucleolar activity in neurodegenerative diseases: a missing piece of the puzzle? *J Mol Med (Berl)* 91, 541-547, doi:10.1007/s00109-012-0981-1 (2013).
- 19 Parlato, R. & Liss, B. How Parkinson's disease meets nucleolar stress. *Biochim Biophys Acta* 1842, 791-797, doi:10.1016/j.bbadis.2013.12.014 S0925-4439(14)00003-9 [pii] (2014).
- 20 Yuan, X. *et al.* Genetic inactivation of the transcription factor TIF-IA leads to nucleolar disruption, cell cycle arrest, and p53-mediated apoptosis. *Mol Cell* 19, 77-87, doi:10.1016/j.molcel.2005.05.023 (2005).
- 21 Parlato, R. *et al.* Activation of an endogenous suicide response after perturbation of rRNA synthesis leads to neurodegeneration in mice. *J Neurosci* 28, 12759-12764, doi:10.1523/JNEUROSCI.2439-08.2008 (2008).
- 22 Rieker, C. *et al.* Nucleolar disruption in dopaminergic neurons leads to oxidative damage and parkinsonism through repression of mammalian target of rapamycin signaling. *J Neurosci* 31, 453-460, doi:10.1523/JNEUROSCI.0590-10.201131/2/453 [pii] (2011).
- 23 Kreiner, G. *et al.* A neuroprotective phase precedes striatal degeneration upon nucleolar stress. *Cell Death Differ* 20, 1455-1464, doi:10.1038/cdd.2013.66 (2013).
- 24 Kreiner, G. Compensatory mechanisms in genetic models of neurodegeneration: are the mice better than humans? *Front Cell Neurosci* 9, 56, doi:10.3389/fncel.2015.00056 (2015).
- 25 Sarkar, S., Davies, J. E., Huang, Z., Tunnacliffe, A. & Rubinsztein, D. C. Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein. *J Biol Chem* 282, 5641-5652, doi:10.1074/jbc.M609532200 (2007).
- 26 Tanaka, M. *et al.* Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease. *Nat Med* 10, 148-154, doi:10.1038/nm985 (2004).
- 27 Katoh-Semba, R. *et al.* Riluzole enhances expression of brain-derived neurotrophic factor with consequent proliferation of granule precursor cells in the rat hippocampus. *FASEB J* 16, 1328-1330, doi:10.1096/fj.02-0143fj (2002).
- 28 Squitieri, F., Ciammola, A., Colonnese, C. & Ciarmiello, A. Neuroprotective effects of riluzole in Huntington's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35, 221-222, doi:10.1007/s00259-007-0615-y (2008).
- 29 Kreiner, G., Rafa-Zablocka, K., Chmielarz, P., Baginska, M. & Nalepa, I. Lack of riluzole efficacy in the progression of the neurodegenerative phenotype in a new conditional mouse model of striatal degeneration. *PeerJ* 5, e3240, doi:10.7717/peerj.3240 (2017).
- 30 Rommelfanger, K. S. & Weinschenker, D. Norepinephrine: The redheaded stepchild of Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol* 74, 177-190, doi:S0006-2952(07)00086-X [pii] 10.1016/j.bcp.2007.01.036 (2007).
- 31 Sotiriou, E., Vassilatis, D. K., Vila, M. & Stefanis, L. Selective noradrenergic vulnerability in alpha-synuclein transgenic mice. *Neurobiol Aging* 31, 2103-2114, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2008.11.010 S0197-4580(08)00403-X [pii] (2010).
- 32 Zarow, C., Lyness, S. A., Mortimer, J. A. & Chui, H. C. Neuronal loss is greater in the locus coeruleus than nucleus basalis and substantia nigra in Alzheimer and Parkinson diseases. *Arch Neurol* 60, 337-341, doi:noc20089 [pii] (2003).
- 33 Kadoguchi, N. *et al.* Mirtazapine has a therapeutic potency in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced mice model of Parkinson's disease. *BMC Neurosci* 15, 79, doi:10.1186/1471-2202-15-79 (2014).
- 34 Rommelfanger, K. S., Weinschenker, D. & Miller, G. W. Reduced MPTP toxicity in noradrenaline transporter knockout mice. *J Neurochem* 91, 1116-1124, doi:JNC2785 [pii] 10.1111/j.1471-4159.2004.02785.x (2004).
- 35 Srinivasan, J. & Schmidt, W. J. Potentiation of parkinsonian symptoms by depletion of locus coeruleus noradrenaline in 6-hydroxydopamine-induced partial degeneration of substantia nigra in rats. *Eur J Neurosci* 17, 2586-2592 (2003).
- 36 Kreiner, G. *et al.* Stimulation of noradrenergic transmission by reboxetine is beneficial for a mouse model of progressive parkinsonism. *Sci Rep* 9, 5262, doi:10.1038/s41598-019-41756-3 (2019).
- 37 Kreiner, G. What have we learned recently from transgenic mouse models about neurodegeneration? The most promising discoveries of this millennium. *Pharmacol Rep* 70, 1105-1115 (2018).
- 38 Braak, H. *et al.* Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24, 197-211, doi:S0197458002000659 [pii] (2003).
- 39 Braak, H., Ghebremedhin, E., Rub, U., Bratzke, H. & Del Tredici, K. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res* 318, 121-134 (2004).
- 40 Srinivasan, J. & Schmidt, W. J. Functional recovery of locus coeruleus noradrenergic neurons after DSP-4 lesion: effects on dopamine levels and neuroleptic induced-parkinsonian symptoms in rats. *J Neural Transm* 111, 13-26 (2004).

### 3. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych po uzyskaniu stopnia doktora

#### 3.1. Staże zagraniczne

W latach **2005-2008** przebywałem na ponad 3-letnim stażu podoktorskim w **German Cancer Research Center** (Deutsches Krebsforschungszentrum, DKFZ) w Heidelbergu, w grupie **prof. Günthera Schütza** (Lab. Molecular Biology of the Cell I). Pobyt w Niemczech umożliwił mi praktyczne zapoznanie się z zupełnie nowym zagadnieniem, jakim była **technologia tworzenia transgenicznych modeli zwierzęcych, opartych o warunkową/indukowaną ekspresję rekombinazy Cre**, w jednym z wiodących laboratoriów światowych prowadzących od lat badania w tym kierunku. Podczas stażu rozpocząłem badania w całkowicie nowej dla mnie tematyce, jaką były **molekularne mechanizmy chorób neurodegeneracyjnych**. Oprócz tego brałem udział także w innych projektach badawczych, w tym m.in. dot. określenia roli mitochondrialnego białka p53 w procesach nowotworowych. Staż był również świetną okazją do poznania realiów funkcjonowania nauki w wiodącym, modelowo zarządzanym niemieckim ośrodku badawczym, zatrudniającym ponad 3000 osób, finansowanym w dużej części z budżetu federalnego. Styl pracy w grupie prof. Schütza charakteryzował się bardzo dużą swobodą naukową dotyczącą wyboru tematyki badań, technik badawczych i partnerskim traktowaniem wszystkich współpracowników. Efektem stażu – oprócz poszerzenia horyzontów naukowych, przyswojenia nowych technik laboratoryjnych, współautorstwa w publikacjach – było nawiązanie szerokich kontaktów naukowych, które procentują do dzisiaj (w szczególności kontynuowana nadal **współpraca z dr Rosanną Parlato** z Ulm University w Niemczech, **dr Andrii Domanskyi'm** z Institute of Biotechnology, University of Helsinki w Finlandii). Dzięki uprzejmości prof. Schütza mogłem dalej prowadzić badania z wykorzystaniem stworzonych w Heidelbergu modeli transgenicznych po powrocie do kraju. Prof. Schütz zgodził się nie tylko na nieodpłatne przekazanie kilku linii transgenicznych na podstawie umów MTA, ale sfinansował także koszty transportu zwierząt do Polski. Był to rok 2009, kiedy finansowanie nauki w Polsce i możliwości aplikowania o projektu grantowe były jeszcze bardzo ograniczone.

W późniejszym okresie przebywałem jeszcze 3-krotnie w German Cancer Research Center w Heidelbergu, na zaproszenie prof. Schütza na krótkich pobytach, finansowanych przez stronę niemiecką, trwających od 7 do 21 dni (10.2009, 05.2010, 05.2013). Bezpośrednim efektem stażu podoktorskiego był 1 patent i następujące publikacje:

1. Díaz-Ruiz C, Parlato R, Aguado F, Ureña JM, Burgaya F, Martínez A, Carmona MA, **Kreiner G**, Bleckmann S, Del Río JA, Schütz G, Soriano E: Regulation of neural migration by the CREB/CREM transcription factors and altered Dab1 levels in CREB/CREM mutants. *Mol Cell Neurosci* **2008**; 39: 519-28
2. Parlato R, **Kreiner G**, Erdmann G, Rieker C, Stotz S, Savenkova E, Berger S, Grummt I, Schütz G: Activation of an endogenous suicide response after perturbation of rRNA synthesis leads to neurodegeneration in mice. *J Neurosci* **2008**; 28: 12759-64
3. Rieker C, Engblom D, **Kreiner G**, Domanskyi A, Schober A, Stotz S, Neumann M, Yuan X, Grummt I, Schütz G, Parlato R: Nucleolar disruption in dopaminergic neurons leads to oxidative damage and parkinsonism through repression of mTOR signaling. *J Neurosci* **2011**; 31: 453-60
4. **Kreiner G**, Bierhoff H, Armentano M, Rodriguez-Parkitna J, Sowodniok K, Naranjo JR, Bonfanti L, Liss B, Schütz G, Grummt I, Parlato R: A neuroprotective phase precedes striatal degeneration upon nucleolar stress. *Cell Death Differ* **2013**; 20: 1455-1464

Wkład w badania: Publikacje [2] i [4] wchodziły w skład dzieła habilitacyjnego, dokładny wkład habilitanta w ich powstanie został opisany w części 2.2. W publikacji [1] wykonałem badania techniką RTqPCR zamieszczone na Fig. 5. W pracy [3] współuczestniczyłem w wykonaniu eksperymentów zamieszczonych na Fig. 1, 2 i 6, byłem aktywnym uczestnikiem dyskusji wyników w okresie jej tworzenia i współredagowałem manuskrypt publikacji. Swoje wkład w powstanie w/w prac oceniam odpowiednio: [1] – 5%, [2] – 50%, [3] – 20%, [4] – 50%.

### 3.2. Kierowanie i uczestnictwo w grantach badawczych

Przed uzyskaniem stopnia doktora byłem zaangażowany w dwóch grantach badawczych KBN jako główny wykonawca oraz w grantcie promotorskim. Po uzyskaniu stopnia doktora kierowałem i kieruję następującymi projektami badawczymi:

**2010 – 2014 NCBiR DeMeTer** (POIG.01.01.02-12-004/09), zadanie 1.2: *Badanie interakcji układu noradrenergicznego i glukokortykoidowego w nowym modelu genetycznym i ocena jego przydatności jako modelu depresji u myszy*. Budżet projektu: 978 530 PLN (kierownik zadania w projekcie realizowanym przez Instytut Farmakologii PAN)

Celem projektu była weryfikacja czy zwierzęta pozbawione receptorów glukokortykoidowych (GR) w układzie noradrenergicznym (myszy GR<sup>DBHCre</sup>) mogą stać się wartościowym, nowym modelem depresji. W ramach projektu sprowadzono z Niemiec i rozwinięto hodowlę myszy transgeniczných, potwierdzono selektywność mutacji w obrębie ośrodkowego układu nerwowego i dokonano wszechstronnej, behawioralnej, biochemicznej i molekularnej charakterystyki modelu. W badaniach behawioralnych wykazano, iż samice GR<sup>DBHCre</sup> charakteryzują się zachowaniami lękowymi i prodepresyjnymi oraz osłabioną pamięcią roboczą w teście labiryntu Y. Zmian takich nie obserwowano u samców, co więcej wykazywały one oporność na efekty chronicznego stresu. Wykazano, że podanie leków przeciwdepresyjnych (LPD) – dezipraminy jak i fluoksetyny – znosi zachowania prodepresyjne samic GR<sup>DBHCre</sup> tym samym zweryfikowano pozytywnie przydatność modelu pod kątem odpowiedzi na terapię przeciwdepresyjną. Zaobserwowano, iż działanie fluoksetyny u zwierząt zmutowanych jest pogłębione w stosunku do efektów obserwowanych po dezipraminie. Efekt ten został dodatkowo poparty danymi z oznaczeń neurotransmiterów. Nie stwierdzono natomiast różnic w dawkozależnej odpowiedzi na antagonistę GR, mifepriston. Wykonany test supresji deksametazonowej nie wykazał anomalii w działaniu osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (HPA) u myszy GR<sup>DBHCre</sup>, zaobserwowano jednak istotnie wyższy poziom kortykosteronu u samic względem zwierząt kontrolnych w zależności od pory dnia. Wykazano różną, zależną od płci regulację niektórych podtypów receptorów adrenergicznych (AR) i ekspresji czynnika troficznego BDNF. Wykazano także istotny statystycznie wzrost gęstości receptorów  $\alpha_2$ -AR u samic GR<sup>DBHCre</sup> przy braku różnic u samców. Uzyskane wyniki udokumentowały potencjał linii GR<sup>DBHCre</sup> jako nowego, transgenicznego modelu dla badań nad zachowaniami depresyjnymi oraz podkreśliły istotny a często pomijany w dotychczasowych badaniach problem różnic płciowych w odpowiedzi na wprowadzane mutacje i efekty działania LPD. Efektem projektu są następujące publikacje:

1. Chmielarz P, Kuśmierczyk J, Parlato R, Schütz G, Nalepa I, **Kreiner G**: Inactivation of glucocorticoid receptor in noradrenergic system influences anxiety- and depressive-like behavior in mice. *PLoS One* **2013**; 8(8):e72632
2. Kot M, **Kreiner G**, Chmielarz P, Kuśmierczyk J, Nalepa I, Daniel WA: Sex-dependent activity of CYP3A is indirectly modulated by GR in noradrenergic system. *Pharmacol Rep* **2013**; 65: 1431-34
3. **Kreiner G**, Chmielarz P, Roman A, Nalepa I: Gender differences in genetic mouse models evaluated for depressive-like and antidepressant behavior. *Pharmacol Rep* **2013**, 65(6):1580-90
4. Chmielarz P, **Kreiner G**, Nalepa I: Selective ablation of glucocorticoid receptors in the noradrenergic system affects evening corticosterone levels in a gender-dependent manner. *Pharmacol Rep* **2015**, 67(6):1201-3
5. Chmielarz P, **Kreiner G**, Kot M, Zelek-Molik A, Kowalska M, Bagińska M, Daniel WA, Nalepa I: Disruption of glucocorticoid receptors in the noradrenergic system leads to BDNF upregulation and altered serotonergic transmission associated with a depressive-like phenotype in GR<sup>DBHCre</sup> mice. *Pharmacol Biochem Behav* **2015**, 137:69-77

Wkład w badania: Byłem pomysłodawcą projektu. Sprowadziłem składowe badanych linii transgeniczných i nadzorowałem rozwój ich hodowli. Opracowałem doświadczalnie protokoły genotypowania zwierząt i przeszkoliłem w tym pracownika inż.-tech. zajmującego się hodowlą. Przez cały okres projektu zarządzałem hodowlą myszy transgeniczných. Z wyjątkiem pracy [2] współuczestniczyłem w planowaniu i wykonaniu większości eksperymentów (podanie leków, testy behawioralne, pobrania struktur mózgowych, izolacja RNA, oznaczenia RT-qPCR, barwienia immunohistochemiczne), analizie wyników i pisaniu manuskryptów



publikacji. W pracy [1] i [3] jestem autorem korespondencyjnym. Napisałem w znacznej większości manuskrypt pracy przeglądowej [3]. W pracy [5] współdzielię pierwsze autorstwo na zasadzie równorzędności (*equal contribution*). Swoj udział procentowy w w/w publikacjach szacuję odpowiednio: [1] – 40%, [2] – 5%, [3] – 80%, [4] – 20%, [5] – 30%.

**2012 – 2016 NCN Opus 2** (2011/03/B/NZ7/05949): *Farmakologiczna weryfikacja potencjalnych strategii neuroprotektynowych w nowych, genetycznych modelach progresywnej neurodegeneracji u myszy*. Budżet projektu – 471 000 PLN (kierownik grantu)

Projekt będący podstawą osiągnięcia naukowego składającego się na habilitację. Najważniejszym osiągnięciem wynikającym bezpośrednio z prac realizowanych w projekcie było wykazanie, iż stymulacja układu noradrenergicznego poprzez chroniczne podanie reboksetyny w transgenicznym modelu progresywnego parkinsonizmu u myszy (linia TIF-IA<sup>DATCreERT2</sup>) wykazuje właściwości neuroprotektynowe wpływając na spowolnienie progresji w fenotypie wywołanej mutacji. W badaniach potwierdzono również odkryty wcześniej mechanizm aktywacji odpowiedzi neuroprotektynowej poprzez nasilenie procesów autofagocytozy u myszy linii TIF-IA<sup>DTRCre</sup>. Ponadto wykazano, iż progresywna neurodegeneracja u myszy ograniczona selektywnie do układu noradrenergicznego (linia TIF-IA<sup>DBHCre</sup>) może odpowiadać za zmiany stochastyczne w obrębie układu dopaminowego, charakterystyczne dla wczesnych, przedklinicznych etapów choroby Parkinsona. i zwrócono uwagę na możliwości wykorzystania endogennych mechanizmów kompensacyjnych obserwowanych w genetycznych modelach chorób neurodegeneracyjnych jako potencjalnych punktów uchwytu farmakoterapii. Wynikiem projektu są następujące publikacje:

1. Parlato R & Kreiner G: Nucleolar activity in neurodegenerative diseases: a missing piece of the puzzle *J Mol Med* **2013**; 91: 541-7
2. Kreiner G, Bierhoff H, Armentano M, Rodriguez-Parkitna J, Sowodniok K, Naranjo JR, Bonfanti L, Liss B, Schütz G, Grummt I, Parlato R: A neuroprotective phase precedes striatal degeneration upon nucleolar stress. *Cell Death Differ* **2013**; 20: 1455-1464
3. Kreiner G: Compensatory mechanisms in genetic models of neurodegeneration: are the mice better than humans? *Front Cell Neurosci* **2015** 6;9:56
4. Kreiner G, Rafa-Zablocka K, Chmielarz P, Bagińska M, Nalepa I: Lack of riluzole efficacy in the progression of the neurodegenerative phenotype in a new conditional mouse model of striatal degeneration. *PeerJ* **2017**; 5:e3240
5. Kreiner G, Rafa-Zablocka K, Barut J, Chmielarz P, Kot M, Bagińska M, Parlato R, Daniel WA, Nalepa I: Stimulation of noradrenergic transmission by reboxetine is beneficial for a mouse model of progressive Parkinsonism. *Scientific Rep* **2019**, accepted

Wkład w badania: Byłem pomysłodawcą projektu, na który zdobyłem finansowanie. Publikacje [2-5] wchodzi w skład dzieła habilitacyjnego, dokładny udział habilitanta w ich powstaniu został opisany w części 2.2. W pracach [3-5] jestem autorem korespondencyjnym. Publikację [1] napisałem wspólnie z dr Parlato, byłem też autorem zamieszczonych w tej publikacji schematów i rycin. Swoj wkład w powstanie w/w publikacji szacuję odpowiednio: [1] – 50%, [2] – 50%, [3] – 100%, [4] – 75%, [5] – 60%.

**2015 – 2019 NCN Opus 7** (2014/13/B/NZ7/02293): *Ocena roli czynnika transkrypcyjnego CREB w mechanizmach działania leków przeciwdepresyjnych: badania na nowych, genetycznych modelach opartych o system warunkowej rekombinazy Cre/loxP*. Budżet projektu – 673 100 PLN (kierownik grantu).

Celem projektu było zbadanie funkcji czynnika transkrypcyjnego CREB w mechanizmach działania wybranych leków przeciwdepresyjnych (LPD) poprzez wykorzystanie nowych, unikatowych modeli myszy transgenicznnych, charakteryzujących się selektywnym usunięciem genu kodującego CREB, ograniczonym jedynie do neuronów noradrenergicznych lub serotoninowych. Uzasadnieniem tak postawionego pytania badawczego była niespójność danych dotyczących wpływu LPD na ekspresję CREB, istotnego białka regulatorowego. Choć według akceptowanego, przeważającego w piśmiennictwie poglądu, obniżenie ekspresji CREB jest skorelowane z depresją a chronicznie stosowane LPD przyczyniają się do nasilenia zarówno ekspresji jak i aktywności CREB, dane te – pochodzące

również z analiz *post-mortem* przeprowadzonych na materiale ludzkim – nie znalazły potwierdzenia w badaniach na zwierzętach pozbawionych CREB. Co więcej, fenotyp tych zwierząt był nieraz odwrotny do oczekiwanego. Modele te były jednak obarczone istotnymi ograniczeniami, mogącymi wpływać na zachowanie zwierząt, zmiany rozwojowe i w konsekwencji interpretację uzyskanych wyników z dwóch zasadniczych powodów: **(a)** mutacja obejmowała nieselektywne usunięcie genu kodującego CREB z wielu struktur mózgowych, **(b)** w badaniach nie uwzględniano możliwości kompensacji braku CREB przez białko modulujące CREM (ang. *cyclic AMP response element modulator*). Stąd do naszych badań zaproponowaliśmy użycie modeli opartych o selektywną delecję CREB w systemie tzw. rekombinacji zlokalizowanych Cre/loxP, wprowadzoną dodatkowo w tło genetyczne Crem<sup>-/-</sup>.

W ramach projektu wykazano, iż myszy z selektywnie usuniętym czynnikiem transkrypcyjnym CREB oraz CREM – w przeciwieństwie do myszy z pojedynczą delecją CREB – reagują odmiennie na jednorazowe podania leków przeciwdepresyjnych w TST. Różnicowanie to było najwyraźniej uwidocznione w liniach Creb1<sup>DBHCre</sup> i Creb1<sup>DBHCre</sup>Crem<sup>-/-</sup> (delecja CREB w układzie noradrenergicznym) po podaniach dezypiramy, natomiast w liniach Creb1<sup>TPHCreERT2</sup> i Creb1<sup>TPH2CreERT2</sup>Crem<sup>-/-</sup> (delecja CREB w układzie serotoninowym) po podaniach fluoksetyny zależało dodatkowo od płci zwierząt. Tym samym wykazano istotny udział białka CREM w kompensacji efektów zależnych od CREB. Zmiany molekularne widoczne po wielokrotnych podaniach LPD były przede wszystkim związane z regulacją poziomu neurotrofin. M.in. wykazano, że czynnik transkrypcyjny CREB w układzie serotoninowym jest kluczowy do regulacji odpowiedzi na fluoksetynę wyrażoną zmianami w ekspresji BDNF. Myszy pozbawione CREB w układzie serotoninowym – w przeciwieństwie do myszy kontrolnych – nie wykazywały podniesionego poziomu BDNF wywoływanego przez chroniczne podania fluoksetyny. Co więcej, efekt ten był skorelowany ze zmianami na poziomie kinaz białkowych (CamKII, ERK1/2), zaangażowanych w szlaki przekazywania wewnątrzkomórkowego regulujące ekspresję BDNF. Podsumowując, wykazano istotną rolę czynnika transkrypcyjnego CREB zlokalizowanego w neuronach noradrenergicznych i serotoninowych w mechanizmach działania badanych LPD. Na obecną chwilę efektem projektu jest 1 praca magisterska oraz następujące publikacje:

1. Rafa-Zablocka K, **Kreiner G**, Bagińska M, Kuśmierczyk J, Parlato R, Nalepa I: Transgenic mice lacking CREB and CREM in noradrenergic and serotonergic neurons respond differently to common antidepressants on tail suspension test. *Scientific Rep* **2017**; 7(1):13515. doi: 10.1038/s41598-017-14069-6
2. Rafa-Zablocka K, **Kreiner G**, Bagińska M, Nalepa I: Selective depletion of CREB in serotonergic neurons affects the upregulation of brain-derived neurotrophic factor evoked by chronic fluoxetine treatment. *Front Neurosci* **2018**; 12:637
3. Rafa-Zablocka K, **Kreiner G**, Bagińska M, Nalepa I: The influence of CaMKII and ERK phosphorylation on BDNF changes observed in mice selectively devoid of CREB in serotonergic or noradrenergic neurons. *Pharmacol Rep* **2019**, accepted

Wkład w badania: Jestem pomysłodawcą projektu, na który zdobyłem finansowanie. Sprawdziłem składowe badanych linii transgenicznnych, opracowałem strategię i nadzorowałem rozwój hodowli. Opracowałem doświadczalnie protokoły genotypowania zwierząt i przeszkoliłem w tym pracownika inż.-tech zajmującego się hodowlą. Zaplanowałem i współuczestniczyłem w wykonaniu części eksperymentów (podania leków, test TST, pobrania struktur mózgowych, izolacja RNA, profilowanie ekspresji genów, RT-qPCR, barwienia immunohistochemiczne). Wspólnie z doktorantką (mgr Katarzyna Rafa-Zablocka) przedyskutowałem uzyskane wyniki i napisałem manuskrypty publikacji. Jestem autorem korespondencyjnym wszystkich publikacji. W pracach [1] i [2] współdziałę pierwsze autorstwo na zasadzie równorzędności (*equal contribution*). Swoją wkład w powstanie w/w publikacji szacuję odpowiednio: [1] – 40%, [2] – 40%, [3] – 30%.

**2018 – 2021 NCN Opus 13 (2017/25/B/NZ7/02406):** *Badanie wpływu postępującej neurodegeneracji układu noradrenergicznego na funkcjonowanie układu dopaminowego w kontekście pre-symptomatycznej fazy choroby Parkinsona.* Budżet projektu – 1 620 000 PLN (kierownik grantu)

Obecnie realizowany projekt badawczy, rozpoczęty w ub. roku, będący bezpośrednią kontynuacją grantu Opus 2. Celem projektu jest **(a)** stworzenie modelu myszy charakteryzującego się selektywną,

mózgowo-specyficzną, progresywną degeneracją układu noradrenergicznego, co w konsekwencji będzie prowadzić do spontanicznych zmian w układzie dopaminowym; **(b)** wykorzystanie modelu dla badania wzajemnych zależności pomiędzy w/w układami neuroprzekąźnictwa w kontekście wczesnej, przedklinicznej fazy PD i poszukiwania ew. markerów i punktów uchwytu farmakoterapii. Aktualnie jesteśmy w końcowej fazie opracowania przez doktorantkę (mgr Justyna Barut) wektora lentiwirusowego w systemie CRISPR/Cas9, pozytywnie zweryfikowanego w testach *in-vitro*. W ciągu najbliższych miesięcy spodziewamy się otrzymać pierwsze zwierzęta z mózgowo-specyficzną delecją genu kodującego TIF-1A, odpowiadającego za wywołanie neurodegeneracji ograniczonej do miejsca sinawego (LC). Na obecną chwilę efektem projektu jest wyróżnienie w postaci zaproszenia doktorantki na wygłoszenie ustnej prezentacji podczas konferencji (15-th Transgenic Technology Meeting, Kobe, Japonia) oraz 1 publikacja przeglądowa:

**Kreiner G:** What have we learned recently from transgenic mouse models about neurodegeneration? The most promising discoveries of this millennium. *Pharmacol Rep* **2018**, 70(6):1105-1115

Wkład w powstanie publikacji – 100%.

Ponadto jestem zatrudniony również jako wykonawca w 3 innych projektach badawczych, finansowanych z grantów NCN:

- **2016 – 2021 NCN Symfonia – Air Pollution versus Autoimmunity: Role of multiphase aqueous Inorganic Chemistry** – APARIC; projekt realizowanym przez konsorcjum, w skład którego wchodzi Wydział Chemii UJ, Collegium Medicum UJ i Instytut Farmakologii PAN (kierownik projektu – prof. Rudi van Eldik, kierownik zadania realizowanego w IF PAN – prof. dr hab. Irena Nalepa).
- **2016 – 2019 NCN Opus 9 – Różnicowanie udziału trzech podtypów receptora alfa(1)-adrenergicznego w efektach leków przeciwdepresyjnych: badania w oparciu o genetyczne modele in vitro oraz in vivo**; projekt realizowany w Zakładzie Biochemii Mózgu, IF PAN (kierownik projektu – prof. dr hab. Irena Nalepa).
- **2019 – 2022 NCN Opus 16 – Sekrecja asprozyny i innych adipocytokin na tle wysiłkowych zmian w równowadze prooksydacyjno-antyoksydacyjnej krwi u mężczyzn w zależności od wieku, wydolności fizycznej i składu ciała**; projekt realizowany w Zakładzie Fizjologii i Biochemii Instytutu Nauk Biomedycznych na Akademii Wychowania Fizycznego im. Bronisława Czecha w Krakowie (kierownik projektu – dr hab. Magdalena Więcek).

### 3.3. Współprace naukowe (krajowe i zagraniczne)

Jestem gorącym zwolennikiem wszelkiego rodzaju współprac naukowych, w tym również nawiązywanych bez zbędnych formalności. Mam pełne przekonanie, że jest to najlepszy środek dla poszerzenia naukowych horyzontów, wymiany myśli, realizacji innowacyjnych badań, dający doskonałą możliwość do skonfrontowania i krytycznej weryfikacji własnych pomysłów w dyskusjach z partnerami, niezależnie od stopnia i etapu rozwoju kariery naukowej. Współpraca niejednokrotnie może stanowić istotną wartość dodaną do projektu, umożliwiając osiągnięcie bardziej wartościowych wyników, a co za tym idzie – opublikowanie ich w lepszym czasopiśmie. Staram się dzielić swoją wiedzą i umiejętnościami, sam chętnie korzystam również z pomocy innych przy realizacji własnych projektów. Współpracowałem i współpracuję z naukowcami reprezentującymi inne Zakłady/Pracownie Instytutu Farmakologii PAN, jak również różne ośrodki w Polsce i za granicą:

- **prof. dr hab. Joanna Mika, Zakład Farmakologii Bólu, IF PAN**

W ramach współpracy prowadzonej od 2013 roku z grupą badawczą kierowaną przez prof. Joannę Mika, w modelach neuropatii wykazaliśmy po raz pierwszy zmiany poziomu ekspresji wielu chemokin i ich receptorów. Ponadto, dowiedliśmy, że antagoniści wybranych receptorów chemokinowych

przynoszą ulgę w bólu, a także mogą nasilać efektywność leków opioidowych stosowanych w klinice. Dane literaturowe dotyczące interakcji neuroimmunologicznych w neuropatii są jeszcze ciągle niekompletne, jednakże wskazują, że cytokiny modulują odpowiedź bólową, a wśród nich chemokiny wydają się być niezwykle interesujące. W ramach badań prowadzonym pod kierunkiem prof. Joanny Mika wykonałem analizy immunohistochemiczne mające na celu określenie kolokalizacji receptorów chemokinowych z mikroglejem, astroglejem i neuronami u myszy/szczura w modelach bólu neuropatycznego o rozmaitej etiologii, w tym neuropatii cukrzycowej. Uzyskane wyniki wskazują, że zarówno komórki neuronalne jak i mikroglejowe na poziomie rdzenia kręgowego są zaangażowane w procesy nocycyptywne. Jednakże, co było nieoczekiwane, receptory dla chemokin znajdują się często głównie na neuronach, a ponadto w przypadku kilku chemokin to również neurony są ich głównym źródłem komórkowym biosyntezy. Efektem współpracy są następujące publikacje:

1. Żychowska M, Rojewska E, **Kreiner G**, Nalepa I, Przewłocka B, Mika J: Minocycline influences the anti-inflammatory interleukins and enhances the effectiveness of morphine under mice diabetic neuropathy. *J Neuroimmunol* **2013**; 262: 35-45
2. Żychowska M, Rojewska E, Piotrowska A, **Kreiner G**, Mika J: Microglial inhibition influences XCL1/XCR1 expression and causes analgesic effects in a mouse model of diabetic neuropathy. *Anesthesiology*. **2016**; 125(3):573-89
3. Żychowska M, Rojewska E, Piotrowska A, **Kreiner G**, Nalepa I, Mika J: Spinal CCL1/CCR8 signaling interplay as a potential therapeutic target - Evidence from a mouse diabetic neuropathy model. *Int Immunopharmacol* **2017**; 52:261-271
4. Rojewska E, Żychowska M, Piotrowska A, **Kreiner G**, Nalepa I, Mika J: Involvement of macrophage inflammatory protein-1 family members in the development of diabetic neuropathy and their contribution to effectiveness morphine. *Front Immunol* **2018**; 9:494
5. Piotrowska A, Rojewska E, Pawlik K, **Kreiner G**, Ciechanowska A, Makuch W, Żychowska M, Mika J: Pharmacological blockade of CXCR3 by (±)-NBI-74330 reduces neuropathic pain and enhances opioid effectiveness - Evidence from in vivo and in vitro studies. *BBA Mol Basis Dis* **2018**; 1864(10):3418-3437
6. Piotrowska A, Rojewska E, Pawlik K, **Kreiner G**, Ciechanowska A, Makuch W, Nalepa I, Mika J: Spinal CXCL3/CXCR2 signaling as a potential therapeutic target in neuropathic pain - evidence from in vivo and in vitro studies. *Pain* **2019**; *under revision*

Wkład w badania: W powyższych pracach wykonałem eksperymenty z wykorzystaniem techniki immunohistochemii fluorescencyjnej, przeanalizowałem dane i przygotowałem następujące ryciny obrazujące uzyskane wyniki: praca [1] – Fig. 2E-F; praca [2] – Fig. 4; praca [3] – Fig. 2,3; praca [4] – Fig. 3, 4C; praca [5] – Fig. 3; praca [6] – Fig. 2. Ponadto uczestniczyłem w dyskusji wyników, redagowaniu manuskryptów i odpowiedzi na uwagi recenzentów. Swoją wkład w powstanie w/w publikacji szacuję odpowiednio: [1] – 15%, [2] – 15%, [3] – 20%, [4] – 20%, [5] – 15%, [6] – 10%.

- **prof. dr hab. Marta Kubera, Zakład Neuroendokrynologii Doświadczalnej, IF PAN**

Projekt realizowany z grupą badawczą prof. Marty Kubery dotyczył zróżnicowanej efektywności leków przeciwdepresyjnych z grupy selektywnych inhibitorów wychwytu zwrotnego serotoniny w zależności od wieku i płci. W badaniach wykazaliśmy m.in. przeciwwzapalne działanie fluoksetyny mierzone zmianami w ekspresji wybranych cytokin. W ramach prowadzonych badań wykonałem ilościowe oznaczenia cytokin pro- i przeciwzapalnych na poziomie mRNA. Efektem tej współpracy jest publikacja:

1. Duda W, Kubera M, **Kreiner G**, Curzytek K, Detka J, Głombik K, Ślusarczyk J, Basta-Kaim A, Budziszewska B, Lasoń W, Regulska M, Leśkiewicz M, Roman A, Zelek-Molik A, Nalepa I: Suppression of pro-inflammatory cytokine expression and lack of anti-depressant-like effect of fluoxetine in lipopolysaccharide-treated old female mice. *Int Immunopharmacol* **2017**; 48:35-42

Wkład w badania: W powyższej pracy przeprowadziłem izolację i oznaczenia RNA, wykonałem eksperymenty techniką RT-qPCR, przeanalizowałem dane i przygotowałem następujące ryciny obrazujące uzyskane przeze mnie wyniki: Fig. 3, Fig. 4. Uczestniczyłem w redagowaniu manuskryptu, napisałem fragment dyskusji dot. wpływu podań fluoksetyny na efekty badanych cytokin w modelu LPS. Swoją wkład w powstanie publikacji szacuję na 25%.

- **prof. dr hab. Krystyna Gołębiowska i dr Katarzyna Kamińska, Zespół II, Zakład Farmakologii, IF PAN**

W ramach badań prowadzonym pod kierunkiem prof. Gołębiowskiej pomagałem dr Katarzynie Kamińskiej w ustawieniu i optymalizacji testu kometkowego (*Comet Assay*, SCGE) do oznaczeń

stopnia defragmentacji DNA po tzw. dopalaczach. Z kolei dr Kamińska wykonała dla potrzeb prowadzonych przeze mnie projektów oznaczenia poziomu neurotransmiterów metodą HPLC. Efektem tej współpracy jak dotychczas są następujące publikacje:

1. Noworyta-Sokołowska K, Kamińska K, **Kreiner G**, Rogóż Z, Golembiowska K: Neurotoxic effects of 5-MeO-DIPT: a psychoactive tryptamine derivative in rats. *Neurotox Res* **2016**; 30(4):606-619
2. Górka AM, Kamińska K, Wawrzczak-Bargieła A, Costa G, Morelli M, Przewlocki R, **Kreiner G**, Golembiowska K: Neurochemical and neurotoxic effects of MDMA (Ecstasy) and caffeine after chronic combined administration in mice. *Neurotox Res* **2018**; 33(3):532-548
3. Kamińska K, Noworyta-Sokołowska K, Górka A, Rzemieniec J, Wnuk A, Wojtas A, **Kreiner G**, Kajta M, Golembiowska K: The effects of exposure to mephedrone during adolescence on brain neurotransmission and neurotoxicity in adult rats. *Neurotox Res.* **2018**; 34(3):525-537
4. Noworyta-Sokołowska K, Kamińska K, Rzemieniec J, Wnuk A, Wojcieszak J, Górka AM, **Kreiner G**, Kajta M, Golembiowska K: Effects of exposure to 5-MeO-DIPT during adolescence on brain neurotransmission and neurotoxicity in adult rats. *Forensic Toxicology* **2019**, 37(1):45-58

Wkład w badania: W pracach [1-4] pomagałem w ustawieniach metody i mikroskopowej dokumentacji eksperymentów przeprowadzonych za pomocą testu kometkowego. Swoją wkład w powstanie każdej z nich szacuję na 10%.

- **dr hab. Jan Rodriguez-Parkitna, Zakład Neurofarmakologii Molekularnej, IF PAN**

Współpraca z dr hab. Janem Rodriguezem Parkitną rozpoczęła się podczas stażu w DKFZ, który odbywaliśmy razem w grupie prof. Schütza. Po powrocie do kraju wspólnie organizowaliśmy w IF PAN zaplecze dla hodowli zwierząt transgenicznym w systemie indukowanym, miejscowo-specyficznym mutacji *Cre/loxP* i do tej pory wspólnie użytkujemy pomieszczenia hodowlane. Dr hab. Parkitna jest też współautorem jednej z prac włączonych do cyklu habilitacyjnego. Aktualnie współpracujemy w ramach projektu kierowanego przez dr hab. Parkitną, mającego na celu wyjaśnienie zaburzeń kognitywnych po długotrwałym stosowaniu L-DOPA, realizowanego z wykorzystaniem posiadanego przeze mnie modelu progresywnej degeneracji neuronów dopaminowych (linia TIF-IA<sup>DAT<sup>CreERT2</sup></sup>).

- **dr hab. Magdalena Więcek, Zakład Fizjologii i Biochemii, Instytut Nauk Biomedycznych, Akademia Wychowania Fizycznego w Krakowie**

Współpraca nawiązana przy okazji prowadzenia przeze mnie zajęć z biochemii na krakowskiej AWF. Jestem wykonawcą grantu, którego realizacja rozpoczęła się w tym roku, kierowanego przez dr hab. Magdalenę Więcek. W ramach projektu jestem zaangażowany w wykonanie niektórych oznaczeń biochemicznych, dyskusję wyników i przeprowadzenie analiz statystycznych.

- **prof. Ute Moll, Department of Pathology, Stony Brook University, USA**

Współpraca realizowana w okresie 2007-2008 podczas stażu podoktorskiego w Heidelbergu, gdzie prof. Moll była tzw. *visiting scientist*. Byłem zaangażowany w projekt badający znaczenie mitochondrialnego białka p53 w procesach nowotworowych. W ramach projektu uczestniczyłem w stworzeniu modelu myszy Mitop53<sup>-/-</sup> (z delecją białka p53 w mitochondriach), opracowałem metodykę i protokół genotypowania zwierząt.

- **dr Rosanna Parlato, Institute of Applied Physiology, University of Ulm, Niemcy**

Współpraca kontynuowana od czasu stażu podoktorskiego w Heidelbergu. W roku 2011 aplikowaliśmy o wspólny grant badawczy dla młodych naukowców z sieci ERA-Net – wniosek przeszedł do drugiej tury oceny, niestety ostatecznie nie uzyskał finansowania. Pracowaliśmy i pracujemy wspólnie nad kilkoma projektami związanymi z tematyką neurodegeneracyjną m.in. wyjaśnieniem roli stresu komórkowego przejawiającego się spadkiem syntezy rRNA w przeżywalności

neuronów na przykładzie linii z delecją genu kodującego czynnik transkrypcyjny TIF-1A w rejonie hipokampa (współpraca trójstronna z zaangażowaniem także **dr Witolda Konopki** i kierowanej przez niego Pracowni Modeli Zwierzęcych Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego w Warszawie), roli rzęsek neuronalnych w rozwoju choroby Parkinsona, czy roli sirtuin w chorobach neurodegeneracyjnych. W tym ostatnim projekcie dostarczyliśmy dowodów, że białka SIRT1 i TIF-1A mogą być ściśle powiązane ze sobą i regulowane przez wspólne ścieżki molekularne w odpowiedzi na czynniki stresu komórkowego. Zachwianie tej homeostazy może być krytyczne w rozwoju chorób neurodegeneracyjnych a modulacja szlaków zaangażowanych w regulację SIRT1 może mieć znaczenie terapeutyczne. Owocem tej współpracy są następujące publikacje (nie wliczając innych, będących efektem współpracy w okresie stażu podoktorskiego, wymienionych wcześniej w punkcie 3.1):

1. Parlato R & **Kreiner G**: Nucleolar activity in neurodegenerative diseases: a missing piece of the puzzle *J Mol Med* **2013**; 91: 541-7
2. Kiryk A, Sowodniok K, **Kreiner G**, Rodriguez-Parkitna J, Soenmez A, Górkiewicz T, Janusz A, Liss B, Konopka W, Schütz G, Kaczmarek L, Parlato R: Impaired rRNA synthesis triggers homeostatic responses in hippocampal neurons. *Front Cell Neurosci* **2013**; 11;7:207
3. Mustafa R, Spittau B, **Kreiner G**, Kamińska K, Kirsch J, Tucker KL, Parlato R: Loss of primary cilia function in mature dopaminergic neurons triggers homeostatic responses in the basal ganglia and alters responsiveness to MPTP neurotoxicity. **2019**, *submitted*
4. **Kreiner G**, Soenmez A, Liss B, Parlato R: Integration of the deacetylase SIRT1 in the response to nucleolar stress. *Front Cell Neurosci* **2019**, *minor revision*

Wkład w badania: Publikację [1] napisałem wspólnie z dr Parlato, byłem też autorem zamieszczonych w publikacji schematów i rycin. W publikacji [2] uczestniczyłem w badaniach i z udziałem dr hab. J. Rodriguez Parkitny wykonałem analizę profilowania ekspresji genów zamieszczoną na Fig. 8. W pracy [3] wspólnie z dr K. Kamińską wykonaliśmy oznaczenia neurotransmiterów (KK - oznaczenia HPLC, GK – przygotowanie materiału eksperymentalnego, opracowanie, analiza wyników i przygotowanie rycin), wykonałem zliczenia komórek po barwieniach immunohistochemicznych i analizę statystyczną dla wszystkich wyników zamieszczonych w publikacji. W pracy [4] wykonałem analizę profilowania ekspresji genów, oznaczenia wybranych transkryptów metodą RTqPCR, przygotowałem ryciny, współredagowałem manuskrypt i aktualnie odpowiem na uwagi recenzentów. Swoje wkład w powstanie w/w publikacji szacuję odpowiednio: [1] – 50%, [2] – 15%, [3] – 20%, [4] – 50%.

- **dr Andrii Domanskyi, Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Finlandia**

Niedawno rozpoczęta współpraca przy realizacji grantu NCN Opus 13, którego jestem kierownikiem. Przedmiot współpracy stanowi pomoc dr Domanskyi’ego w opracowaniu konstruktów do podań z użyciem wektora lentiwirusowego, przygotowywanego przez nas w technologii CRISPR/Cas9. W ramach współpracy, w maju 2018 do laboratorium w Helsinkach wyjechała na 2-tygodniowy staż badawczy doktorantka zatrudniona w projekcie grantowym NCN Opus13 (mgr Justyna Barut), gdzie została opracowana strategia stworzenia konstruktów i wykonane pierwsze klonowania. Aktualnie zostałem zaproszony do Helsinek celem wygłoszenia wykładu na seminarium, podsumowującego uzyskane przez nas wstępne wyniki (16.05.2019).

Oprócz powyższych współprac, dysponując zaawansowaną hodowlą kilku unikatowych modeli transgenicznych, którą udało mi się rozwinąć po powrocie ze stażu zagranicznego do Polski, wspierałem i wspieram naukowców z innych ośrodków odpowiadając na ich prośby o udostępnienie modeli transgenicznych będących przedmiotem badań własnych.

Odbiorcami zwierząt na podstawie umów MTA są: **prof. Jan Tuckermann**, Institute for Comparative Molecular Endocrinology, University of Ulm, Niemcy; **prof. Siegfried Hekimi**, Dept. of Biology, McGill University, Montreal, Kanada; **prof. Angel Barco**, Instituto de Neurociencias, Alicante, Hiszpania. Nawiązane w ten sposób kontakty mogą być przyczynkiem do dalszej współpracy z tymi ośrodkami przy realizacji innych projektów badawczych.

### 3.4. Udział w innych projektach badawczych realizowanych w Zakładzie Biochemii Mózgu Instytutu Farmakologii PAN

Po powrocie ze stażu podoktorskiego włączałem się również w inne projekty badawcze realizowane w Zakładzie Biochemii Mózgu IF PAN. Dotyczyły one badań nad udziałem podtypów receptora adrenergicznego  $\alpha 1$ -AR w mechanizmach działania leków przeciwdepresyjnych (prace zapoczątkowane jeszcze w okresie realizacji doktoratu; [1], [3]), uzależnień opioidowych [2], metodycznych aspektów testu TST [4], czy obwodowych efektów mutacji u myszy  $GR^{DBHCre}$  [5]. Efektem tej pracy są następujące publikacje:

1. **Kreiner G**, Zelek-Molik A, Kowalska M, Bielawski A, Antkiewicz-Michaluk L, Nalepa I: Effects of noradrenergic neurotoxin DSP-4 on expression of  $\alpha 1$ -adrenoceptor subtypes after antidepressant treatment. *Pharmacol Rep* **2011**; 63: 1349-58
2. Zelek-Molik A, Bielawski A, **Kreiner G**, Popik P, Vetulani J, Nalepa I: Morphine-induced place preference changes mRNA expression of G protein  $\alpha$  subunits in rat brain. *Pharmacol Rep* **2012**; 64: 546-57
3. **Kreiner G**, Roman A, Zelek-Molik A, Kowalska M, Nalepa I: A lack of  $\alpha 1A$ -adrenergic receptor-mediated antidepressant-like effects of S(+)-niguldipine and B8805-033 in the forced swim test. *Behav Pharmacol* **2016**; 27(4):397-401
4. Chmielarz P, **Kreiner G**, Kuśmierczyk J, Kowalska M, Roman A, Tota K, Nalepa I: Differences in total immobility time and activity pattern in tail suspension test of selected mice strains in basal conditions and after chronic restraint stress. *Stress* **2016**; 19(2):206-13
5. Roman A, Kuśmierczyk J, **Kreiner G**, Nalepa I: Assessment of leukocyte activity in mice devoid of the glucocorticoid receptor in the noradrenergic system (GRDBHCre). *Immunobiology* **2018**; 223(2):227-238

Wkład w badania: Publikacja [1] podsumowuje część wyników uzyskanych jeszcze podczas przygotowywania pracy doktorskiej, wykonałem w niej większość eksperymentów i wspólnie z promotorem zredagowałem manuskrypt publikacji. W publikacji [2] byłem zaangażowany w podsumowanie i analizę statystyczną wyników. W publikacji [3] wspólnie z dr A. Romanem przeprowadziłem eksperymenty FST zamieszczone na Fig.1 i 2, wykonałem analizę wyników, przygotowałem ryciny i napisałem manuskrypt pracy, której jestem autorem korespondencyjnym. Dla potrzeb publikacji [3] zorganizowałem nieodpłatne przekazanie do badań związku B8805-033 z firmy Altana Pharma AG. W pracy [4] pomagałem w barwieniach IHC niezbędnych do analizy zamieszczonej na Fig. 4, współuczestniczyłem w redagowaniu manuskryptu i odpowiedzi na późniejsze recenzje pracy. W publikacji [5] zapewniłem materiał w postaci zwierząt transgenicznych i współuczestniczyłem w redagowaniu manuskryptu pracy. Swoje wkład w powstanie w/w publikacji szacuję odpowiednio: [1] – 60%, [2] – 10%, [3] – 75%, [4] – 15%, [5] – 10%.

### 3.5. Działalność dydaktyczna

W roku akademickim 2013/2014 **prowadziłem zajęcia ze studentami** w ramach kursu „Zwierzęta laboratoryjne w badaniach psycho-neuro-farmakologicznych” na Wydziale Hodowli i Biologii Zwierząt krakowskiego Uniwersytetu Rolniczego dla studentów na kierunku „Biologia stosowana” w łącznym wymiarze 4 godzin.

Od 2016 jestem również zatrudniony na umowę-zlecenie jako **wykładowca** w Zakładzie Fizjologii i Biochemii Instytutu Nauk Biomedycznych Akademii Wychowania Fizycznego in. B. Czecha w Krakowie. Prowadziłem i prowadzę zajęcia z przedmiotu „Biochemia” w następującym wymiarze godzin:

1. Wychowanie Fizyczne, studia stacjonarne I stopnia:
  - semestr zimowy 2016/2017 - 90 godzin (ćwiczenia)
2. Sport, studia stacjonarne I stopnia:
  - semestr letni 2016/2017 - 52 godziny (15 wykład + 37 ćwiczenia)
  - semestr zimowy 2017/2018 - 40 godzin (15 wykład + 25 ćwiczenia)
  - semestr zimowy 2018/2019 - 40 godzin (15 wykład + 25 ćwiczenia)
3. Kultura Fizyczna Osób Starszych, studia stacjonarne I stopnia:
  - semestr letni 2017/2018 - 67 godzin (15 wykład + 52 ćwiczenia)
  - semestr letni 2018/2019 - 67 godzin (15 wykład + 52 ćwiczenia)

W roku 2013 byłem **opiekunem 3-miesięcznego stażu** mgr Katarzyny Tota w ramach projektu „Aktywność kluczem do kariery”, realizowanego w Instytucie Farmakologii PAN a finansowanego z Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki 2007- 2013, Poddziałanie 6.1.3. (1.05-31.07.2013, umowa UmSTAZ/13/0095).

W latach 2010 – 2018 byłem wielokrotnie **opiekunem 3-tygodniowych praktyk** studenckich realizowanych w Zakładzie Biochemii IF PAN przez studentów kierunków Neurobiologia i Biotechnologia UJ (łącznie 9 praktykantów i praktykantek).

W latach 2012 – 2016 byłem **opiekunem prac magisterskich** studentek kierunku Neurobiologia na Uniwersytecie Jagiellońskim realizowanych w Zakładzie Biochemii IF PAN. Wszystkie prace magisterskie były realizowane w ramach badań prowadzonych w kierowanych przeze mnie grantach badawczych NCN (Opus2 i Opus7), w dwóch przypadkach studentki były wyłonione na podstawie konkursu i zatrudnione jako stypendystki NCN (zgodnie z decyzją Rady Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego osoba ze stopniem doktora wywodząca się spoza uczelni nie może pełnić funkcji promotora w pracach magisterskich):

- 2012/13 **Agnieszka Jurga**, Neurobiologia UJ. Temat pracy: *Badanie wpływu progresywnej neurodegeneracji układu noradrenergicznego u myszy linii TIF-IADBHC<sup>Cre</sup> na funkcjonowanie układu dopaminowego.*
- 2014/15 **Aneta Latacz**, Neurobiologia UJ. Temat pracy: *Immunohistochemiczna charakterystyka myszy selektywnie pozbawionych czynnika transkrypcyjnego CREB w układzie noradrenergicznym (linia Creb/Cre<sup>DBHC</sup>).*
- 2015/16 **Weronika Buczek**, Neurobiologia UJ. Temat pracy: *Transkrypcyjna ocena myszy transgenicznym pozbawionych czynnika transkrypcyjnego CREB w układzie serotoninowym i noradrenergicznym.*

Aktualnie, decyzją Rady Naukowej Wydziału Farmacji Uniwersytetu w Helsinkach (*Faculty of Pharmacy at the University of Helsinki, Finland*) z dnia 12.02.2019, zostałem zatwierdzony jako **recenzent pracy doktorskiej**:

- 2019 **Katrina Albert, MSc**, Division of Pharmacology and Pharmacotherapy, Faculty of Pharmacy, University of Helsinki, Finlandia. Temat pracy: *Modelling alpha-synuclein-based Parkinson's disease and studies with CDNF* (supervisors: doc. Mikko Airavaara, PhD, prof. Mart Saarma, PhD). Planowana obrona – 17.05.2019.

Jestem również **promotorem pomocniczym** dwóch **prac doktorskich**, w tym jednej już z zakończonym przewodem:

- 2018 mgr inż. **Ewa Trojan**, Zakład Neuroendokrynologii Doświadczalnej IF PAN. Temat pracy: *Neuroimmunologiczne mechanizmy działania leków przeciwdepresyjnych. Badania w modelach in vivo i in vitro* (promotor: prof. dr hab. Agnieszka Basta-Kaim). Doktorat obroniony 16.10.2018.
- 2019 mgr **Katarzyna Rafa-Zabłocka**, Zakład Biochemii IF PAN. Temat pracy: *Evaluation of the putative role of transcription factor CREB in the mechanisms of selected antidepressants – investigation on transgenic mice models with selective deletion of CREB in noradrenergic or serotonergic systems* (promotor: prof. dr hab. Irena Nalepa). Praca doktorska wykonana w ramach kierowanego przeze mnie grantu NCN Opus7. Planowana obrona – czerwiec 2019.

### 3.6. Działalność popularyzatorska i zabieranie głosu w sprawach nauki

Uważam, że popularyzacja nauki stanowi ważną aktywność w pracy naukowej, w której wydajemy publiczne pieniądze podatników. W ramach szerokiego upowszechniania wiedzy wygłosiłem kilka wykładów popularno-naukowych dla studentów, licealistów lub innego, szerokiego grona odbiorców o tematyce w różny sposób powiązanej z wykonywanym zawodem i realizowanymi projektami badawczymi:

- 2011 „Egzotyka blisko i daleko oraz zdrowie w podróży”. IV Konferencja Szkoleniowa "Podróżuj bezpiecznie" organizowana przez Centrum Szczepień w Szpitalu Jana Pawła II. Kraków, 08.10.2011.
- 2015 „Czy myszy mogą mieć depresję?” – wykład w ramach Krakowskiego Sympozjum Samorządów Szkolnych: "Twój mózg – twoja przyszłość". Kraków, 13.02.2015.



- 2016 „Zastosowanie systemów warunkowej/indukowanej ekspresji genów – czyli jak trafić mutacją tam, gdzie chcemy” – wykład dla koła naukowego MYGEN studentów UJ podczas wyjazdu integracyjnego, Mszana Dolna, 22.10.2016.
- 2017 „Czy myszy mogą mieć depresję?” oraz „Farmakologia z klocków Lego” – wykłady i prezentacje podczas Festiwalu Nauki w Instytucie Farmakologii PAN, 25-27.05.2017.

W 2013 wziąłem udział w II edycji międzynarodowego konkursu dla popularyzatorów nauki **FameLab**, organizowanego przez **Centrum Nauki Kopernik** i **British Council**, w którym dotarłem do krajowego finału. W ramach nagrody dla uczestników etapu finałowego wziąłem udział w bezpłatnych warsztatach i szkoleniu **MasterClass** z zakresu komunikacji naukowej, autoprezentacji i występów publicznych, prowadzonym przez specjalistów, zawodowych prezenterów i reżyserów BBC (maj 2013, Liblice k/Pragi, Czechy).

Staram się również uczestniczyć w dyskusji na tematy organizacji życia naukowego czy wprowadzanymi reformami nauki. Wyrazem tego była m.in. poniższa publikacja, w której polemizowałem z bezkrytycznym podejściem do parametryzacji nauki i stosowania wskaźników bibliometrycznych, takich jak tzw. współczynnik Hirscha (h-index), dowodząc, że ten parametr często ma niewiele wspólnego z jakością prowadzonych badań:

**Kreiner G:** The slavery of the h-index - measuring the unmeasurable. *Front Hum Neurosci* **2016**; 10:556

W powyżej pracy dokonałem analizy indeksu Hirscha dla laureatów nagrody Nobla z lat 2005-2015 dla 3 różnych etapów ich kariery, sporządziłem ryciny i napisałem manuskrypt pracy. Wkład w powstanie publikacji – 100%.

### 3.7. Wykłady na krajowych i międzynarodowych konferencjach oraz spotkaniach naukowych

W latach 2009 – 2019 byłem zapraszany przez organizatorów wymienionych niżej konferencji i spotkań naukowych. Wygłosiłem następujące **wykłady**:

- 2009 „Genetyczne modelowanie chorób neurodegeneracyjnych u myszy – zasadnicze strategie”. XVIII Dni Neuropsychofarmakologiczne, 25-27.05.2009, Ustroń-Jaszowiec.
- 2010 “Induction of ribosomal stress as a novel mouse model of neurodegeneration”. XVII Międzynarodowy Kongres Polskiego Towarzystwa Farmakologicznego, 16-18.09.2010, Krynica.
- 2011 „Genetic modeling of neurodegenerative diseases in mice”. 10th International Congress of Polish Neuroscience Society, 21-24.09.2011, Łódź.
- 2013 “Nucleolar activity in neurodegenerative diseases”. XVIII Międzynarodowy Kongres Polskiego Towarzystwa Farmakologicznego, 22-25.05.2013, Kazimierz Dolny.
- 2013 “Nucleolar stress: new insights into the molecular mechanisms of Parkinson’s Disease”. Neurochemical Conference – Emerging topics in neurological diseases: molecular mechanisms, diagnosis and therapy, 24-25.10.2013, Warszawa.
- 2014 „Rola układu noradrenergicznego w chorobie Parkinsona”. XXIII International Symposium, Molecular & Physiological Aspects of Regulatory Processes of the Organism, 26-27.09.2014, Kraków.
- 2015 “Noradrenergic signaling in Parkinson’s disease”. Neurochemical Conference – Neuropsychimmunological mechanisms in the pathology of neurodegenerative diseases - from biomarkers to therapeutics, 22-23.10.2015, Warszawa.
- 2016 „Systemy warunkowej/indukowanej ekspresji genów i ich praktyczne zastosowanie”. XXXIII Szkoła Zimowa Instytutu Farmakologii PAN, 12-15.01.2016, Kraków
- 2016 “Compensatory mechanisms as possible targets of pharmacotherapy in neurodegenerative diseases”. 2<sup>nd</sup> Central European Biomedical Congress, 15-18.06.2016, Kraków
- 2016 “Targeting nucleolus – a new approach in generating transgenic mouse models of neurodegenerative diseases and their exploitation to study possible neuroprotective therapies”. 13<sup>th</sup> Transgenic Technology Meeting, 20-23.03.2016, Praga, Czechy
- 2018 „Czego nauczyliśmy się o chorobach neurodegeneracyjnych ze zwierzęcych modeli transgenicznych w obecnym tysiącleciu?”. XXXV Szkoła Zimowa Instytutu Farmakologii PAN, 06-09.02.2018, Kraków
- 2019 “Noradrenergic system in Parkinson’s disease as a potential target for neuroprotective treatment”. Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Finlandia – wykład na zaproszenie, potwierdzony do wygłoszenia na seminarium naukowym w dniu 16.05.2019.

### 3.8. Uczestnictwo w panelach eksperckich

W latach 2013-2014 byłem członkiem Korpusu Ekspertów **Narodowego Centrum Nauki (NCN)**, brałem udział w panelach eksperckich przy ocenie wniosków grantowych w konkursach Preludium, Sonata, Opus, Fuga i Etiuda (ok. 50 zrecenzowanych wniosków na różnych panelach eksperckich). Oceniałem również wnioski grantowe jako ekspert zewnętrzny (2 wnioski).

Od roku 2015 jestem ekspertem **Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (NCBiR)**. Oceniałem wnioski grantowe i brałem udział w posiedzeniach paneli eksperckich NCBiR, pełniąc również rolę Eksperta Wiodącego i Przewodniczącego (łącznie ok. 20 ewaluowanych wniosków w różnych konkursach).

Jestem także ekspertem oceniającym wnioski grantowe dla **Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej (NAWA)** – 9 wykonanych recenzji. Jako ekspert zewnętrzny wykonywałem również ekspertyzy dla **Departamentu Innowacji i Rozwoju MNiSW** (2 ekspertyzy).

### 3.9. Recenzje publikacji w czasopismach naukowych

Recenzowałem publikacje dla *J Neurochem*, *Pharmacol Rep*, *PLoS One*, *Front Cell Neurosci*, *Front Pharmacol*, *Phytomed*, *Schizophrenia Biul*, *Molecules*, *Mol. Neurobiol* (łącznie ok. 25 recenzji).

Jestem członkiem szerokiej Rady Redakcyjnej (*Editorial Board*) w czasopismach *Front Cell Neurosci* i *Front Pharmacol* pełniąc funkcję *Review Editor*.

### 3.10. Działalność organizacyjna

W trakcie mojej pracy w Instytucie Farmakologii starałem się aktywnie włączać w działalność organizacyjną. Jeszcze przed uzyskaniem stopnia doktora aż do wyjazdu na staż podoktorski w roku 2005 pełniłem funkcję **Inspektora Ochrony Radiologicznej (IOR)** w Instytucie Farmakologii PAN nadzorując pracę z materiałami radioaktywnymi i prowadząc ewidencję źródeł i odpadów radioaktywnych. Pomagałem w organizacji kilku Szkół Zimowych IF PAN, wykonując m.in. **dokumentację fotograficzną** do publikowanych przez Instytut skryptów z wykładami. Bezpośrednio po powrocie ze stażu podoktorskiego, wspólnie z dr hab. Janem Rodriguezem Parkitną, byłem zaangażowany w zorganizowanie i stworzenie na terenie Zwierzętarń Instytutu Farmakologii PAN pomieszczeń przystosowanych dla **hodowli zwierząt transgenicznych** w systemie *Cre/loxP*. W trakcie wakacyjnych urlopów **administratora sieci internetowej** w IF PAN pełniłem w zastępstwie jego funkcję.

W latach 2010 – 2014 byłem wybrany na **członka Rady Naukowej IF PAN** jako przedstawiciel adiunktów i asystentów. W latach 2013 – 2017 byłem regularnie wybierany do komisji nadzorującej przyznawanie **nagród Qualitas/Quantitas** z funduszu KNOW, powoływanych przez dyrektora IF PAN celem weryfikacji i przeliczania kwot nagród wypłacanych za najlepsze prace opublikowane z afiliacją IF PAN.

Od kwietnia 2017 pełnię funkcję **kierownika Zakładu Inżynierii Genetycznej GMO/GMM (ZIG GMO/GMM)** i sprawuję nadzór nad procesem wydawania zgód GMO/GMM dla indywidualnych użytkowników jak również nad bezpieczeństwem pracy z materiałem GMO/GMM.

Byłem/jestem współorganizatorem dwóch sesji tematycznych na konferencjach naukowych:

- |      |   |
|------|---|
| 2011 | „Molecular mechanisms of neurodegenerative diseases”. 10th International Congress of Polish Neuroscience Society, 21-24.09.2011, Łódź.                                    |
| 2019 | “New insights into neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson’s disease”. 20th International Congress of the Polish Pharmacological Society, 5-7.06.2019, Lublin. |

### 3.11. Członkostwa w towarzystwach naukowych

Jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Badań Układu Nerwowego (PT BUN) i Polskiego Towarzystwa Farmakologicznego (PTF).

## 4. Podsumowanie całości dorobku naukowego

Podsumowanie całości dorobku naukowego z podziałem na osiągnięcia przed i po uzyskaniu stopnia doktora zostało przedstawione w tabeli poniżej.

**Tabela 2.** Zbiorczy wykaz najważniejszych osiągnięć naukowych habilitanta (stan na 19.03.2019).

	Przed doktoratem			Po doktoracie		
	Liczba	IF	MNiSW	Liczba	IF	MNiSW
Publikacje oryginalne	6	5.75	62	29	108.02	855
Publikacje przeglądowe	0	0	0	7	21.84	210
<b>RAZEM</b>	<b>6</b>	<b>5.75</b>	<b>62</b>	<b>36</b>	<b>129.86</b>	<b>1065</b>
Patenty	0	-	-	1	-	-
Streszczenia w materiałach pokonferencyjnych	15	-	-	64	-	-
Wykłady naukowe wygłoszone poza IF PAN	0	-	-	12	-	-
Udział w projektach grantowych	3	-	-	3	-	-
Kierowanie projektami grantowymi	0	-	-	4	-	-
Sumaryczny IF wszystkich opublikowanych prac						<b>135.61</b>
Sumaryczna punktacja KBN/MNiSW wszystkich opublikowanych prac						<b>1127</b>
Całkowita liczba cytowań wg bazy JCR Web of Science						<b>454</b>
Całkowita liczba cytowań z wył. autocytowań wg bazy JCR Web of Science						<b>377</b>
h-index						<b>12</b>

W tym sumaryczny IF prac wchodzących w skład dzieła habilitacyjnego – **29.473** / 199 MNiSW (**22.077** / 139 MNiSW z prac oryginalnych i **7.396** / 60 MNiSW z prac przeglądowych). Punkty IF/MNiSW liczone wg danych dla roku opublikowania pracy na podstawie bazy JCR (Journal Citation Reports) Web of Science i punktacji czasopism publikowanych w odpowiednich latach przez KBN/MNiSW.

*Grzegorz Kreiner*

## 5. Załączniki

Załącznik 1 – Dane kontaktowe

Załącznik 2 – Uwierzytelniony odpis z dyplomu doktorskiego

Załącznik 3 – Analiza bibliometryczna dorobku naukowego przygotowana przez Centrum Informacji Naukowej, Biblioteki i Archiwum Instytutu Farmakologii PAN

Załącznik 4 – Pełny wykaz wszystkich prac opublikowanych przez habilitanta

Załącznik 5 – Oświadczenia współautorów publikacji będących przedmiotem dzieła habilitacyjnego

Załącznik 6 – Zaświadczenie prowadzenia zajęć na Wydziale Hodowli i Biologii Zwierząt Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie z podaniem wymiaru godzin

Załącznik 7 – Zaświadczenie prowadzenia zajęć w Instytucie Nauk Biomedycznych Akademii Wychowania Fizycznego im. B. Czecha w Krakowie z podaniem wymiaru godzin

Załącznik 8 – Pełne wersje prac stanowiących podstawę habilitacji