

Autoreferat

1. Imię nazwisko.

Michał Korostyński

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

2002 – tytuł **magistra**, na kierunku Biologia w zakresie **biotechnologii roślin i mikroorganizmów**, Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, 5 lipca 2002 w Katowicach.

2003 – dyplom studiów podyplomowych w zakresie **biologii molekularnej** Uniwersytet Jagielloński w Krakowie, Wydział Biotechnologii, 24 czerwca 2003 w Krakowie.

2008 – stopień **doktora nauk medycznych** w zakresie **biologii medycznej z wyróżnieniem**. Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja PAN, Kraków, rozprawa doktorska pt. „Genomowe determinanty ośrodkowego działania opioidów”. Promotor: prof. dr hab. Ryszard Przewłocki, 12 lutego 2008 w Krakowie.

2015 – dyplom studiów podyplomowych Polsko-Amerykańska Szkoła Biznesu Program pn. „Executive Master of Business Administration (**MBA**)”, 3 lipca 2015 w Krakowie.

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

2003 – 2007 - Instytut Farmakologii PAN im. Jerzego Maja, Kraków, **doktorant**.

2007 – 2008 - Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, **asystent biolog**.

2008 – Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja PAN, Kraków, **adiunkt**, od 2018 **kierownik** Działu Transferu Technologii.

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy.

A. Tytuł osiągnięcia naukowego

Rozkład wzorów ekspresji genomu na funkcjonalne składowe oraz ich interpretacja w kontekście wybranych schorzeń wielogenowych

B. Spis publikacji wchodzących w skład osiągnięcia (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy).

Osiągnięcie zostało udokumentowane cyklem 7 prac opublikowanych w recenzowanych czasopismach, znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR). Podane zostały współczynniki wpływu czasopisma w roku publikacji oraz punkty KBN/MNiSW.

Cykl prac oryginalnych:

- 1) **KOROSTYNSKI M**, Piechota M, Dzbek J, Mlynarski W, Szklarczyk K, Ziolkowska B, Przewlocki R. Novel drug-regulated transcriptional networks in brain reveal pharmacological properties of psychotropic drugs. BMC Genomics. 2013 Sep 8;14:606 [1] (współczynnik wpływu: 4,04; KBN/MNiSW: 40).
- 2) Piechota M, Golda S, Ficek J, Jantas D, Przewlocki R, **KOROSTYNSKI M**. Regulation of alternative gene transcription in the striatum in response to antidepressant drugs. Neuropharmacology. 2015 Dec;99:328-36 [2] (współczynnik wpływu: 4,94; KBN/MNiSW: 40).
- 3) Ficek J, Zygmunt M, Piechota M, Hoinkis D, Rodriguez Parkitna J, Przewlocki R, **KOROSTYNSKI M**. Molecular profile of dissociative drug ketamine in relation to its rapid antidepressant action. BMC Genomics. 2016 May 17;17:362 [3] (współczynnik wpływu: 3,72; KBN/MNiSW: 35).
- 4) **KOROSTYNSKI M**, Małek N, Piechota M, Starowicz K. Blood Transcriptional Signatures for Disease Progression in a Rat Model of Osteoarthritis. Int J Genomics. 2017;2017:1746426. Epub 2017 Jul 3 [4] (współczynnik wpływu: 1.90; KBN/MNiSW: 20).
- 5) **KOROSTYNSKI M**, Malek N, Piechota M, Starowicz K. Cell-type-specific gene expression patterns in the knee cartilage in an osteoarthritis rat model. Funct Integr Genomics. 2018 Jan;18(1):79-87. Epub 2017 Nov 13 [5] (współczynnik wpływu: 2.74; KBN/MNiSW: 30).
- 6) **KOROSTYNSKI M**, Piechota M, Morga R, Hoinkis D, Golda S, Zygmunt M, Dziedzic T, Moskala M, Slowik A, Pera J. Systemic response to rupture of intracranial aneurysms involves expression of specific gene isoforms. J Transl Med. 2019 May 2;17(1):141. [6] (współczynnik wpływu: 4.10; KBN/MNiSW: 140).

- 7) **KOROSTYNSKI M**, Morga R, Piechota M, Hoinkis D, Golda S, Dziedzic T, Slowik A, Moskala M, Pera J. Inflammatory Responses Induced by the Rupture of Intracranial Aneurysms Are Modulated by miRNAs. *Mol Neurobiol.* 2019 Oct 25. [7] (współczynnik wpływu: 4,59; KBN/MNiSW: 100).

C. Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

a) Cel prac stanowiących osiągnięcie naukowe.

Celem badań składających się na przedmiotowe osiągnięcie naukowe było rozpoznanie, analiza i interpretacja wzorów zmian transkrypcji genów występujących w zaburzonych układach fizjologicznych. Przeprowadzone prace pozwoliły na identyfikację istotnych genów, poznanie sposobów ich transkrypcyjnej regulacji, a w wielu przypadkach zrozumienie fizjologicznej roli obserwowanych zmian. Odczytane profile zmian ekspresji genomu zostały podzielone na funkcjonalnie spójne składowe oraz zinterpretowane w kontekście etiologii wybranych schorzeń cywilizacyjnych.

Definicja genu stanowi, że jest to odcinek sekwencji genomu kodujący informację ulegającą transkrypcji do poziomu cząsteczek RNA [8]. W dany gen wpisują się również sekwencje DNA zawierające elementy odpowiedzialne za regulujące jego ekspresji. W ostatnim dziesięcioleciu nastąpiło istotne poszerzenie wiedzy o mechanizmach kontroli ekspresji genów. Do naukowego wykorzystania przekazane zostały wyniki projektów sekwencjonowania genomów i transkryptomów człowieka oraz organizmów modelowych. Dostępna stała się technologia pozwalająca na pełną analizę transkryptów kodujących produkty białkowe oraz niekodujących RNA o właściwościach regulatorowych. W podejściu do badań kontroli transkrypcji nastąpiło przejście od pomiarów ekspresji genu do identyfikacji i kwantyfikacji zmian poziomów abundancji poszczególnych jednostek transkrypcyjnych.

Początkowo moje badania były prowadzone na poziomie genów i interpretowane w kontekście możliwych zmian w ilości produktów białkowych o określonych funkcjach. Pobudzenie mechanizmów regulacji ekspresji genu w komórkach następuje w sytuacji zapotrzebowania na odpowiedni produkt białkowy. Jednym z uproszczeń zastosowanego podejścia było założenie, że odczyt poziomu abundancji RNA odpowiada intensywności ekspresji danego genu. Podczas interpretacji obserwowanych zmian należy brać pod uwagę, że na poziom abundancji danego RNA poza nasileniem ekspresji genu wpływa także szybkość procesu jego degradacji. W przypadku badań tkanek organizmu odczytywane zmiany poziomów mRNA mogą być wypadkową efektów zachodzących w różnych typach komórek. Kolejnym czynnikiem wymagającym uwzględnienia podczas porównywania poziomów abundancji mRNA pomiędzy stanami są różnice w okresie czasu półtrwania transkryptów. Wszystkie wskazane powyżej czynniki wraz z informacjami o cechach i funkcjach regulowanych transkryptów brałem pod uwagę podczas interpretacji uzyskanych wyników profilowania ekspresji genomu.

Analizy profilowania ekspresji genów były prowadzone w kilku zróżnicowanych układach eksperymentalnych. Wykorzystałem zarówno modele zwierzęce jak i materiał pozyskany w warunkach klinicznych. Badałem transkrypcyjne profile działania leków psychotropowych [1-3], zmiany towarzyszące rozwojowy choroby zwyrodnieniowej stawu kolanowego [4, 5] oraz molekularne skutki pęknięcia tętniaków wewnątrzczaszkowych [6, 7]. W każdym z tych układów wykonana została analiza zmian poziomów abundancji transkryptów w skali całego genomu. Pomiary były przeprowadzane w różnych punktach czasowych co umożliwiło ocenę dynamiki i trwałości zmian zachodzących na poziomie RNA. W szczególności analizowałem zagadnienia badawcze dotyczące:

1. Klas i rodzajów regulowanych transkryptów.
2. Kierunków i profili zmian transkrypcji oraz współregulacji ekspresji genów.
3. Typów komórek w jakich zachodzą obserwowane zmiany transkrypcji.
4. Funkcji zidentyfikowanych genów oraz biologicznej roli zmian ich ekspresji.
5. Powiązania zmian poziomów abundancji RNA ze zjawiskami fizjologicznymi o istotnym znaczeniu w etiopatologii chorób.

Dla każdego z badanych układów podjąłem próby wskazania kluczowych czynników regulatorowych, jak i związków funkcjonalnych pomiędzy genami ulegającymi ekspresji. W zależności od zastosowanej technologii w części badań możliwe było wykonanie pomiarów ilościowych dla izoform genów o alternatywnych miejscach startu i zakończenia transkrypcji, długich niekodujących RNA, jak również różnego typu małych RNA.

Celem nadrzędnym było powiązanie zmian obserwowanych na poziomie molekularnym z etiologią chorób oraz przebiegiem procesu leczenia. Zaproponowana interpretacja uzyskanych wyników pozwoliła na wskazanie szeregu potencjalnych interakcji pomiędzy regulacją genów a aspektami ważnymi dla przebiegu i terapii takich stanów chorobowych jak depresja, ból przewlekły, zwyrodnienie stawów oraz krwotok podpajęczynówkowy. W swojej pracy zidentyfikowałem molekularne wskaźniki zmian fizjologicznych potencjalnie zdolne do przewidywania konsekwencji zdrowotnych oddalonych w czasie.

b) Zastosowane technologie badań transkryptomu.

W swojej pracy wykorzystywałem najnowsze dostępne narzędzia służące do prowadzenia przesiewowego poszukiwania genów, których ekspresja ulega regulacji. Zarówno w przypadku mikromacierzy DNA jak i sekwencjonowania NGS badania prowadzone w Zakładzie Neurofarmakologii Molekularnej IF PAN były jednymi z pierwszych tego typu w kraju. Do pełnego wykorzystania potencjału metod wysokoprzepustowych konieczne było wypracowanie zdolności użycia zaawansowanych metod bioinformatycznych oraz zaprojektowania układów eksperymentalnych odpowiednich do tego rodzaju analiz. W badaniach przyjąłem szeroką hipotezę, która zakładała że w wybranych stanach fizjologicznych następują zmiany ekspresji zestawów genów o zakresie i nasileniu umożliwiającym ich detekcję. Pierwsza technologia, która dała możliwość prowadzenia badań

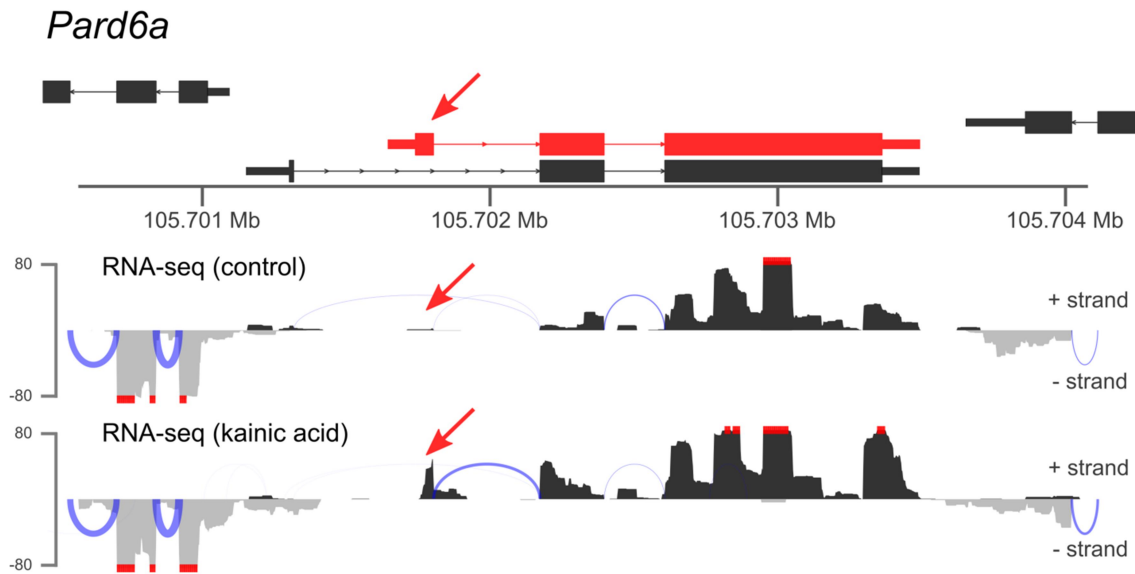
w skali całego genomu to mikromacierze DNA. Metoda ta pozwala na równoczesne przeprowadzenie ilościowego pomiaru abundancji wielu tysięcy RNA. Pełnogenomowe mikromacierze DNA wykorzystałem do profilowania efektów leków psychotropowych w mózgu myszy. W wyniku przeprowadzonych badań powstał duży zbiór danych transkryptomicznych (składający się z ponad 400 odczytów mikromacierzowych). Mikromacierze stosowałem do molekularnego profilowania kilkudziesięciu układów eksperymentalnych m.in. w badaniach chrząstki stawowej oraz krwi obwodowej, w materiale pochodzącym od zwierząt eksperymentalnych jak i w tkankach pochodzenia ludzkiego. Wyzwaniem było przygotowanie biologicznej interpretacji obserwowanych zmian przy wykorzystaniu różnego rodzaju narzędzi bioinformatycznych oraz metod statystycznych. Do analizy uzyskanych wyników profilowania zmian ekspresji utworzony został warsztat narzędziowy oraz dedykowane bazy danych (w tym www.genes2mind.org).

Stosując metody przesiewowe należy pamiętać o wynikających z tego faktu ograniczeniach. Metody umożliwiające pomiary dziesiątek lub setek tysięcy transkryptów wymagają odpowiedniego podejścia w zakresie oceny poziomu wiarygodności uzyskanych wyników. Niezbędne jest przeprowadzenie oceny szansy uzyskania wyników fałszywie pozytywnych oraz fałszywie negatywnych. We wszystkich swoich badaniach stosowałem matematyczne metody określające odsetek wyników fałszywie pozytywnych. Próg akceptacji był ustalany na poziomie szansy uzyskania wyników fałszywie pozytywnych (tzw. FDR od ang. *false discovery rate*) na poziomie 10% lub mniej. Konieczność zastosowania korekty wyników analizy statystycznej powoduje ograniczenia w zdolności detekcji zmian o małym nasileniu. W przypadku małej liczby biologicznych powtórzeń oraz niskiej krotności zachodzących zmian możliwa jest sytuacja, w której wcześniej znane z literatury różnice w poziomie mRNA nie uzyskują potwierdzenia w metodzie przesiewowej.

Kolejne generacje mikromacierzy umożliwiały pomiar coraz większej liczby transkryptów przy wyższej specyficzności odczytywanego sygnału. Największym ograniczeniem techniki mikromacierzy DNA pozostała możliwość pomiaru wyłącznie znanych transkryptów, do których sondy zostały zaprojektowane przez producenta. Problem ten rozwiązało wprowadzenie do użytku technologii NGS, która umożliwia wykonywanie pełnego sekwencjonowania transkryptomu (metoda RNA-seq). W technice RNA-seq pomiary dokonywane są z rozdzielczością na poziomie pojedynczych nukleotydów. Podejście to pozwala na wykrywanie ekspresji alternatywnych wariantów genów oraz niekodujących RNA (Rycina 1). Ograniczeniem badań ekspresji genów stał się etap informatycznej analizy wyników. Proporcjonalnie do ilości uzyskiwanych informacji wzrasta wielkość gromadzonych danych oraz trudność procesu ich przetwarzania.

Zastosowanie techniki RNA-seq pozwoliło na identyfikację nowych wariantów genów, których ekspresja następuje w określonych warunkach fizjologicznych. Technologia NGS została przeze mnie wykorzystana do pomiarów abundancji różnego typu małych RNA. Badania powiązań funkcjonalnych oraz mechanizmów regulatorowych pozwoliły na odkrycie prawidłowości w kontroli transkrypcji grup genów o zbieżnych wzorach ekspresji. Uzyskane wyniki profilowania genów zostały udostępnione publicznie w postaci surowej poprzez

dedykowane do tego bazy danych GEO oraz SRA (numer identyfikacyjne zbiorów danych zostały podane poniżej, w punkcie 7).

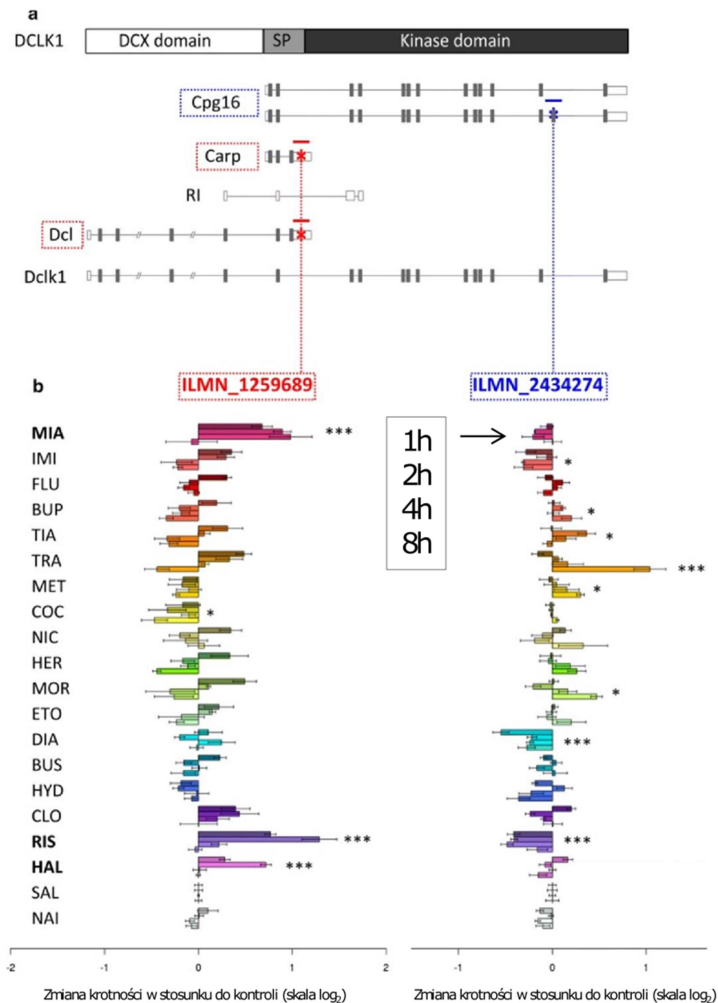


Rycina 1. Przykład odczytu zmian poziomu transkryptów w *locus* genu *Pard6a* metodą NGS.

Pomiar abundancji RNA został przeprowadzony w pierwotnej hodowli neuronów poddanej stymulacji farmakologicznej (kwas kainowy). Na rycinie przedstawione są dwie ścieżki odczytów sekwencjonowania transkryptomu. Górna ścieżka reprezentuje poziom sygnału w komórkach kontrolnych, ścieżka dolna sygnał w neuronach w czasie 1 godziny od podania. Kolorem czerwonym zaznaczona została izoforma podlegająca regulacji (transkrypt ENSMUST00000212430). Rycina zmodyfikowana za zgodą współautorów [2].

c) Różnorodność produktów ekspresji genów.

Pionierskimi narzędziami umożliwiającymi pomiary abundancji mRNA w skali całego transkryptomu były mikromacierze DNA. Przy użyciu tej technologii zidentyfikowałem przypadki występowania różnic w profilach ekspresji kilku różnych transkryptów przyporządkowanych do tego samego genu (Rycina 2). Taki profil zmian sugeruje, że regulacja może dotyczyć tylko części transkryptów genu wyrażanych w badanej tkance. Przykłady tego typu wyników obserwowałem w różnych układach eksperymentalnych, zarówno w badaniach zmian ekspresji genów w mózgu myszy wywołanych podaniem leków jak i w szczurzym modelu rozwoju choroby zwyrodnieniowej stawu kolanowego. Co ciekawe, w przypadku niektórych z analizowanych genów stwierdziłem występowanie przeciwnych profili regulacji poszczególnych izoform. Wzrostowi poziomu jednej formy towarzyszył spadek poziomu drugiej [9]. Uzyskane wyniki ukierunkowały dalsze moje badania w stronę poszukiwania zmian ekspresji alternatywnych wariantów genów.



Rycina 2. Identyfikacja alternatywnego wariantu genu ulegającego ekspresji w odpowiedzi na podanie leków psychotropowych na przykładzie *Dclk1*.

(a) Górny panel przedstawia schemat *locus Dclk1* wraz ze wskazaniem pięciu wariantów ekspresji genu (*Cpg16*, *Carp*, *Dcl*, *RI* oraz *Dclk1*). Umieszczone na schemacie symbole asterysk wskazują lokalizacje, w których wykonany został pomiar poziomu abundancji przy pomocy mikromacierzy DNA. Symbole ILMN_1259689 oraz ILMN_2434274 odpowiadają dwóm sondom mikromacierzowym (lokalizacja do sprawdzenia np. poprzez bazę www.genes2mind.org). (b) Dolny panel prezentuje różnice w odczycie zmian poziomu ekspresji *Dclk1* zachodzących w odpowiedzi na podanie leków: mianseryna (MIA), imipramina (IMI), fluoksetyna (FLU), bupropion (BUP), tianeptyna (TIA), tranilcypromina (TRA), metamfetamina (MET), kokaina (COC), nikotyna (NIC), heroina (HER), morfina (MOR), etanol (ETO), diazepam (DIA), buspiron (BUS), hydroksyzyna (HYD), kłozapina (CLO), rysperydon (RIS), haloperidol (HAL), grupy kontrolne otrzymały sól fizjologiczną (SAL) lub nie otrzymały iniekcji (zwane dalej grupą zwierząt naiwnych, NAI). Oznaczenia istotności to * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$, wyniki jednoczynnikowej analizy wariancji dla czynnika lek. Pomiary zmian poziomu zostały przeprowadzone w czterech wskazanych punktach czasowych (od góry 1, 2, 4 i 8 h od podania). Rycina pochodzi z pracy Zygmunt i wsp. BMC Neuroscience. 2018 i została zmodyfikowana za zgodą współautorów [9].

Przykładem genu o zróżnicowanych profilach transkrypcji w prążkowie myszy wywołanych podaniem leków psychotropowych jest *Homer1*. Gen ten jest dobrze scharakteryzowany pod

względem ekspresji alternatywnych wariantów [10]. Jednorazowe podanie leków o właściwościach psychostymulujących wywołuje ekspresję izoformy *Homer1a* (wyniki dostępne poprzez portal www.genes2mind.org). Transkrypt ten jest określany jako forma indukowalna. Sygnał z mikromacierzowych sond skierowanych do innych wariantów tego genu, czyli *Homer1b* oraz *Homer1c*, nie wykazał efektów podania leków. Biologiczne znaczenie produktu białkowego *Homer1a* jest związane z blokowaniem możliwości przyłączenia innych form białka HOMER1 do metabotropowych receptorów glutaminianu w komórkach nerwowych. W przypadku *Homer1*, regulacja z wykorzystaniem miejsc alternatywnego startu i terminacji transkrypcji odpowiada na nasilenie transmisji glutaminergicznej zachodzące w wyniku działania związków psychoaktywnych. Badania innych autorów wskazują, że wzrost ekspresji krótszej formy tego genu ma w konsekwencji efekt neuroprotekcyny [11]. Przykład HOMER1 dobrze obrazuje możliwość funkcjonalnego wykorzystania produktów alternatywnej ekspresji genu.

Kolejnym przykładem regulacji specyficznej izoformy genu jest kinaza SGK1. Stwierdziłem, że ekspresja tego genu ulega silnej aktywacji w kilku układach eksperymentalnych wykorzystywanych do badań molekularnych mechanizmów działania leków psychotropowych [1, 12]. Szczegółowa analiza profilu zmian dowiodła, że zmiany wywołane lekami dotyczą specyficznej formy genu wykorzystującej alternatywne miejsce terminacji procesu transkrypcji. Co więcej, obserwowane zmiany zostały przyporządkowane do określonego kompartmentu komórkowego [13]. Forma transkryptu o względnie wysokim poziomie bazowej ekspresji RNA w neuronach nie wykazywała zmian w prążkowiu pod wpływem leków. Natomiast, wariant krótszy był silnie indukowany w odpowiedzi na podanie m.in. opioidów, etanolu oraz niektórych leków przeciwdepresyjnych. Wariant ulegający regulacji okazał się być charakterystyczny dla komórek glejowych. Badania funkcji SGK1 w astrocytach oraz znaczenie zmian ekspresji krótkiego wariantu były kontynuowane w odrębnych pracach [14].

Obserwowane zjawisko zróżnicowanej regulacji alternatywnych wariantów wielokrotnie dotyczyło genów wcześniej nie opisywanych pod tym względem w literaturze. Stwierdziłem wywołaną podaniem leków psychotropowych regulację ekspresji nowych form genów *Dclkl* i *Pard6a* (Rycina 1 i 2) [2, 3]. Zidentyfikowane zmiany wariantów ekspresji genów stanowiły impuls do dalszych badań. Temat ekspresji wariantów genu *Dclkl* był kontynuowany m. in. w ramach pracy doktorskiej Magdy Zygmont, w której pełniłem rolę promotora pomocniczego [8, 9]. Uzyskane wyniki wskazały nowy obszar badań, dotyczący ekspresji alternatywnych form genów w mózgu. Rozróżnienie wariantów ulegających regulacji stanowiło wyzwanie zarówno technologiczne jak i analityczne. Wprowadzenie do użytku technologii sekwencjonowania NGS znacząco polepszyło zdolność do kwantyfikacji poziomu abundancji różnego typu transkryptów. Kierowane przeze mnie badania polegały na porównaniu transkrypcyjnych efektów leków psychotropowych o różnych mechanizmach farmakologicznego działania [1-3]. Analizy zostały wykonane na poziomie izoform genów, przy uwzględnieniu możliwości wykorzystania alternatywnych miejsc startu i terminacji transkrypcji. Jednym z wyników przeprowadzonych badań było stwierdzenie, że zmiana programu transkrypcyjnego w prążkowiu z bazowego na indukowany podaniem leku polega

na uruchomieniu ekspresji zestawu alternatywnych wariantów genów. Ulegające ekspresji warianty genów mogą potencjalnie dostarczać komórkom zestaw dodatkowych białek, o funkcjach odmiennych od form konstytutywnych. Uzyskane wyniki zasugerowały, że geny regulowane w odpowiedzi na podanie leków psychotropowych w neuronach są względnie częściej kontrolowane poprzez aktywację proksymalnych promotorów genów oraz mają wyższą specyficzność co do określonej izoformy genu. Wydaje się zatem, że geny aktywowane w komórkach glejowych są mniej specyficzne co do miejsca startu, wyrażają więcej form oraz wymagają zaangażowania białek regulatorowych oddziałujących poprzez sekwencje wzmacniające. Prognozowanie biologicznego znaczenia transkryptów nie opisywanych wcześniej w literaturze jest możliwe na podstawie porównania jakiego typu domeny białkowe kodują poszczególne formy. Zastosowanie tego podejścia zidentyfikowało przykłady różnic w układzie domen pomiędzy kanonicznymi formami mRNA oraz transkryptami ulegającymi regulacji [2]. Uzyskane wyniki potwierdziły hipotezę, że zmiana programu ekspresji genów ze stanu bazowego na stan wywołany bodźcem farmakologicznym uwzględnia ekspresję nowych białek o potencjalnie innych funkcjach biologicznych.

Pytania badawcze dotyczące zmienności profilu wyrażanych transkryptów zadałem również w przypadku analiz krwi obwodowej pacjentów dotkniętych pęknięciem tętniaka wewnątrzczaszkowego. Pomiedzy badanymi stanami wykonałem porównanie liczby transkryptów należących do poszczególnych klas i typów. Wyniki zasugerowały względnie wyższą częstość RNA kodujących produkty białkowe w puli transkryptów o zmienionym poziomie abundancji [6]. Obserwacja ta potwierdza, że zmiany w transkrypcji genów zachodzące w reakcji na silny bodziec mogą mieć przełożenie na komórkową dostępność białek o specyficznych funkcjach. W opublikowanych pracach przedstawiłem przykłady nieopisanych dotychczas form genów. Wskazałem izoformy, których ekspresja wydaje się być charakterystyczna dla stanu wywołanego krwotokiem podpajęczynówkowym będącym konsekwencją pęknięcia tętniaka wewnątrzczaszkowego. W stanie poudarowym w krwi obwodowej stwierdziłem występowanie wcześniej nie opisywanych w literaturze wariantów genów m.in. *ELF2*, *ACBD6* oraz *HEATR1*.

Wyniki pozyskane przy pomocy metody RNA-seq pozwoliły na analizę zarówno izoform genów jak również transkryptów klasyfikowanych jako niekodujące produkty białkowe (lncRNA, od ang. *long-non coding RNA*). Możliwości biologicznej interpretacji zmian ekspresji niekodujących RNA są ograniczone z uwagi na małą liczbę opublikowanych badań funkcjonalnych tej klasy transkryptów. Naturalną kontynuacją badań była chęć poznania zmian w ekspresji małych niekodujących RNA (sRNA, od ang. *small RNA*). Zastosowana metodyka sekwencjonowania RNA pozwoliła na analizę zarówno regulatorowych miRNA, jak i pozostałych klas małych RNA. Badania zmian poziomu abundancji sRNA były prowadzone w kontekście realnej potrzeby diagnostycznej, związanej z możliwością wczesnego przewidywania skutków pęknięcia tętniaka. Transkrypty ulegające ekspresji w badanych układach zostały opisane przy pomocy informacji dostępnych w katalogach genów i bazach wiedzy. Obniżenie poziomu ekspresji małych RNA dotyczyło w sposób szczególny klas piRNA, rRNA oraz tRNA. W następnym kroku poszukiwałem transkryptów docelowych dla zidentyfikowanych miRNA, których regulacja może mieć pośrednie znaczenie

fizjologiczne [7]. Różnice poziomów abundancji RNA były interpretowane w kontekście zmian fizjologicznych zachodzącymi w krwi obwodowej w konsekwencji pęknięcia tętniaka. Poczynione obserwacje wskazały na potencjalny udział zidentyfikowanych małych RNA w mechanizmach kontroli odpowiedzi zapalnej.

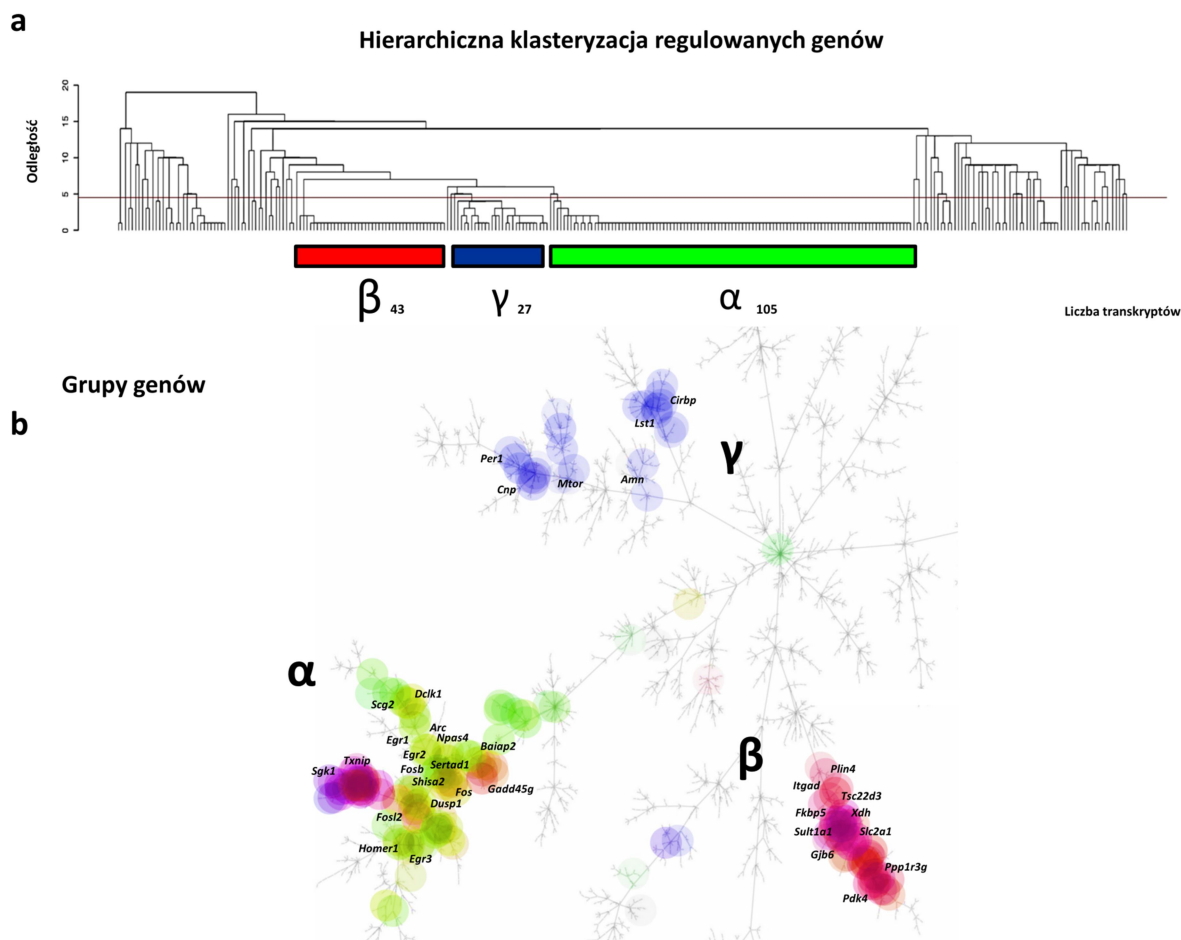
d) Regulacja ekspresji zbiorów genów.

Ekspresja genu jest kontrolowana poprzez wielopoziomowy system regulacji transkrypcji. W proces regulacji bezpośrednio zaangażowane są zestawy czynników transkrypcyjnych, wzmacniaczy i izolatorów. Czynniki te to białka oddziałujące ze specyficznymi sekwencjami regulatorowymi. Schemat mechanizmu kontroli ekspresji genu zapisany jest w sekwencji DNA zlokalizowanej w bliższej (bezpośrednie oddziaływanie *cis*) lub dalszej (oddziaływanie pośrednie *trans*) odległości od startu transkrypcji. Miejscem bezpośredniej kontroli startu transkrypcji jest sekwencja promotorowa. W tym obszarze genu do DNA przyłącza się zestaw białek regulatorowych uruchamiających ekspresję genu. W odległości od pozycji startu TSS (od ang. *transcription start site*) występują sekwencje odpowiedzialne za oddziaływanie czynników zdolnych do modulacji ekspresji oraz białek stanowiących elementy strukturalne [8].

W każdym z badanych przeze mnie układów stwierdziłem występowanie specyficznych wzorów zmian ekspresji genów. Do identyfikacji wzorów ekspresji wykorzystywałem metody grupowania profili genowych o zbliżonym przebiegu. Zidentyfikowane grupy liczyły od kilkudziesięciu do kilkuset genów. Kluczowym zadaniem było przeprowadzenie funkcjonalnej interpretacji zjawiska skoordynowanej regulacji określonych genów. Dla każdego układu eksperymentalnego wskazałem procesy komórkowe i mechanizmy molekularne w jakie mogą być zaangażowane zidentyfikowane geny. Wykonałem analizy porównawcze sekwencji regulatorowych występujących w grupach genów o podobnych profilach. Sprawdzałem jakie cechy sekwencji towarzyszą występowaniu skoordynowanych zmian ekspresji grup genów w wybranych układach badawczych. Badania prowadziłem *in silico* przy pomocy narzędzi zliczających częstość występowania w zdefiniowanym odcinku sekwencji DNA motywów charakterystycznych dla określonych czynników transkrypcyjnych. Dostęp do wyników uzyskanych przy pomocy metody ChIP-seq (od ang. *chromatin immunoprecipitation-sequencing*) pozwolił na identyfikację eksperymentalnie potwierdzonych miejsc wiązania różnego typu białek w obszarach regulatorowych genów. Analizy prowadziłem przy pomocy narzędzi bioinformatycznych, w których zaprojektowaniu i utworzeniu brałem czynny udział (<http://seqinspector.cremag.org>) [15, 16].

Podanie leków psychotropowych wywołuje w komórkach mózgu aktywację ścieżek wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnałów. Efektem ich aktywacji jest ekspresja zestawu genów i produkcja białek o specyficznych funkcjach biologicznych. Zmiany zachodzą w sposób skoordynowany i zsynchronizowany. Grupy genów o zbliżonych przebiegach zmian w poziomie abundancji RNA określałem jako wzór ekspresji. Wiodący wpływ na obraz zmian wywołanych bodźcem farmakologicznym w prążkowiu mają trzy układy genów o odmiennych wzorach regulacji (Rycina 3). Każdy z układów wykazuje charakterystyczny przebieg zmian ekspresji w czasie. Zidentyfikowane grupy genów

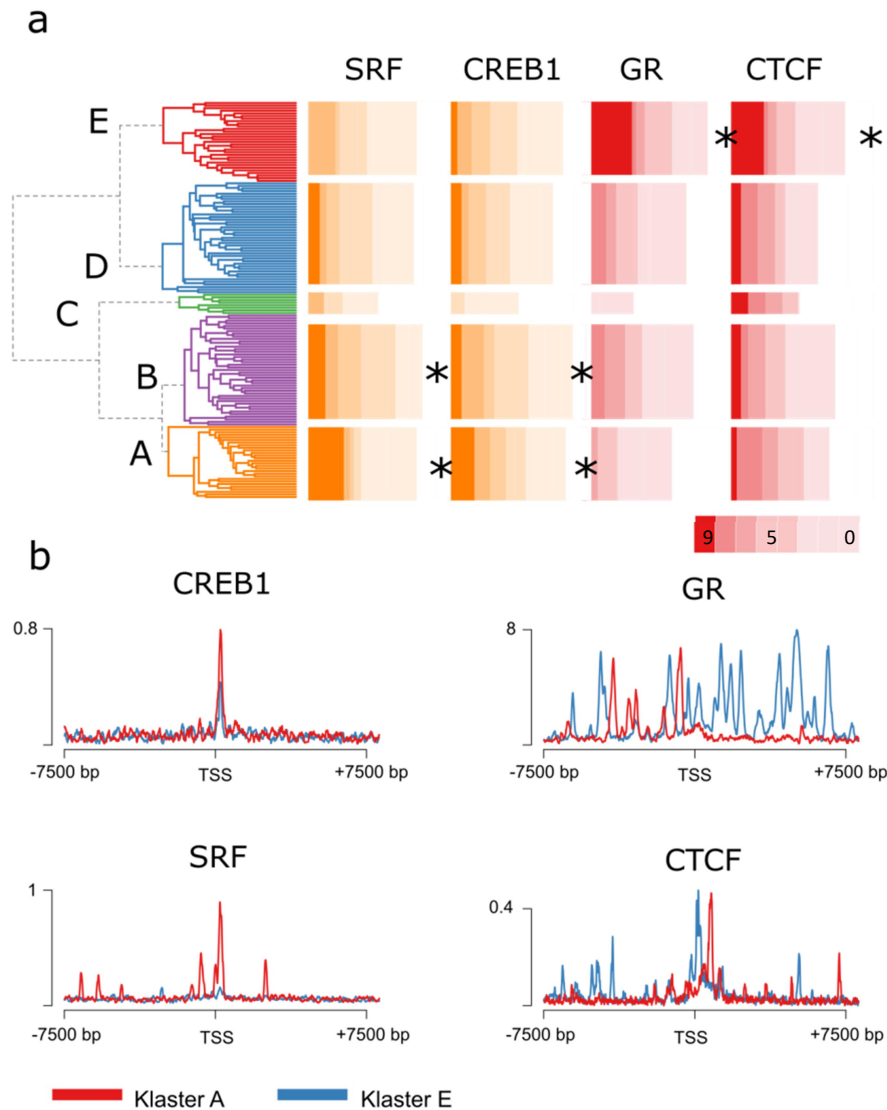
opisałem pod względem sposobów regulacji, funkcji biologicznych oraz typów komórek w jakich zachodzą określone zmiany [1, 2, 12].



Rycina 3. Trzy grupy genów regulowanych w prążkowie myszy w odpowiedzi na podanie leków psychotropowych.

(a) Identyfikacja grup genów oznaczonych literami α , β , γ została wykonana przy pomocy metody hierarchicznej klasteryzacji. (b) Mapa transkryptomu prążkowiec została opracowana na podstawie poziomu korelacji pomiędzy transkrypcjami ulegającymi regulacji. Kolor dla danego transkryptu przedstawia podobieństwo profilu ekspresji do jednego z trzech wzorów. Więcej informacji o metodach i wynikach klasyfikacji genów podlegających regulacji znajduje się w publikacji Korostyński i wsp. BMC Genomics 2015. Rycina zmodyfikowana za zgodą współautorów [1].

Zmiany transkrypcji genów z grupy α wykazały zależność od stopnia aktywacji czynników CREB1/SRF. Natomiast, ekspresja genów o wzorze regulacji β jest powiązana z transkrypcyjnym działaniem receptora glukokortykoidowego (GR). W obrębie poszczególnych grup genów stwierdziłem występowanie związków funkcjonalnych wskazujących, że regulacja dotyczy zestawu produktów ekspresji o potencjalnie uzupełniających się rolach biologicznych. Trzecia z opisanych przeze mnie sieci genów (wzór γ) została powiązana z działaniem leków na układ serotoninowy poprzez receptor 5-HT_{2A}, jednak nie udało się zidentyfikować molekularnego mechanizmu ich regulacji [1].



Rycina 4. Porównanie cech dwóch systemów regulacji genów (CREB1/SRF i GR/CTCF) wykazujących aktywność w prądkowiu myszy w odpowiedzi na działanie leków psychotropowych.

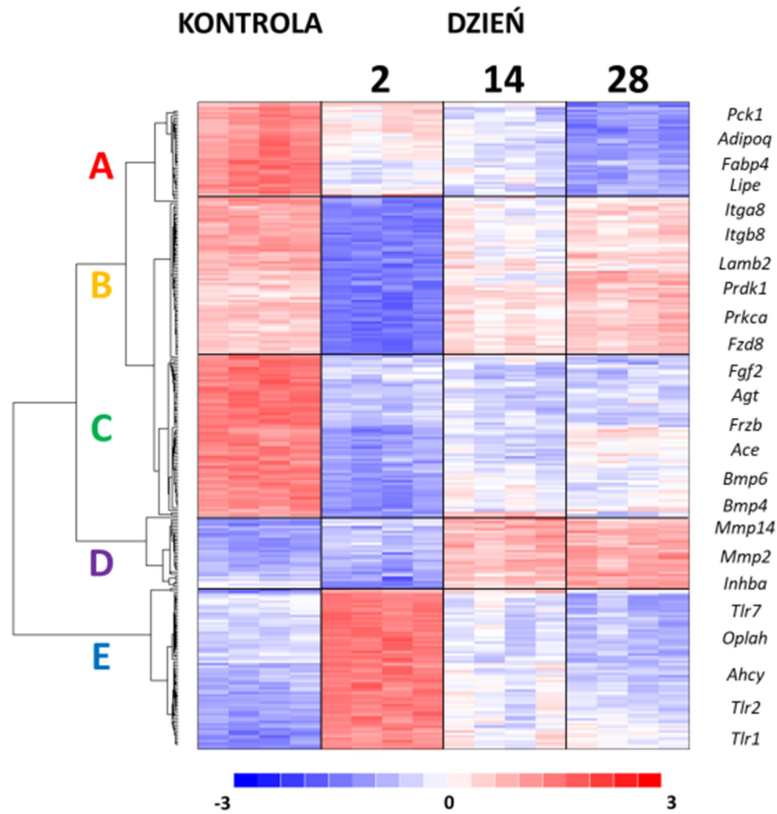
(a) Nadreprezentacja miejsc wiązania dla wskazanych powyżej czynników regulujących transkrypcję genów o wzorach ekspresji A-E (dokładny opis wyników znajduje się w publikacji Piechota i wsp. *Neuropharmacology* 2015). Odczyt poziomu wiązania został wykonany przy pomocy narzędzia seqinspector (www.seqinspector.org), i jest on wyrażony na wykresie poprzez intensywność koloru wykresów kolumnowych (poniżej przedstawiona jest skala). Statystyczna nadreprezentacja miejsc wiązania dla danego czynnika została oznaczona poprzez umieszczenie symbolu asterisk * $P < 0.05$ (z poprawką Bonferroniego). (b) Na histogramach zaznaczony został rozkład sygnału uzyskanego przy pomocy technologii ChIP-seq dla białek CREB1, SRF, GR and CTCF w obszarach regulatorowych (pomiędzy -7500 i +7500 p.z. w stosunku do TSS) genów o profilach zmian typu A i E. Rycina zmodyfikowana za zgodą współautorów [2].

Przeprowadzone badania umożliwiły identyfikację molekularnych mechanizmów potencjalnie biorących udział w kontroli zmian ekspresji genów. Opisałem zestawy czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za regulację powiązanych grup genów (Ryciny 3 i 4).

Opracowałem modele procesów regulacji ujawniających się w danym układzie eksperymentalnym wzorów ekspresji np. regulacja genów w prążkowie z udziałem zestawu czynników CREB1/SRF oraz GR/CTCF [2]. Uzyskane wyniki dostarczyły nowych informacji o mechanizmach kontrolujących specyficzność regulacji alternatywnych wariantów genów w mózgu. Zdefiniowane zestawy genów zostały przyporządkowane do następujących po sobie fal zmian transkrypcji.

Każdy z zastosowanych leków psychotropowych wywołał zmiany transkrypcyjne stanowiące molekularną sygnaturę jego działania. Na podstawie uzyskanych wyników przygotowałem scenariusze udziału poszczególnych komponentów profilu ekspresji w kontroli procesów plastycznych inicjowanych u mózgu podaniem leków psychotropowych. Współregulowane sieci zawierają geny kodujące białka, których funkcje biologiczne są związane z punktami kontroli ważnych procesów komórkowych. Powiązania funkcjonalne odnajdywałem na różnych poziomach kontroli wewnątrzkomórkowych ścieżek przekazywania sygnału. Dla analizowanych grup genów zaproponowałem lokalizację zmian ekspresji w zakresie przedziałów komórkowych obecnych w danej tkance. W przypadku badań efektów leków psychotropowych w prążkowie podstawowy rozdział dotyczył zmian ekspresji genów zachodzących w komórkach neuronalnych i glejowych. Uzyskane wyniki sugerują, że łączny efekt regulacji transkrypcji grupy genów skutkuje zmianą potencjału adaptacyjnego mózgu na poziomie plastyczności neuronów oraz metabolizmu komórek glejowych. W przypadku niektórych wzorów ekspresji, zadanie określenia potencjalnego znaczenia regulacji zespołu transkryptów o podobnych profilach zmian jest utrudnione ponieważ w literaturze brak jest informacji o funkcjach poszczególnych genów.

W drugim z wykorzystanych układów badawczych monitorowałem przebieg zmian molekularnych powiązanych z degeneracją stawu kolanowego zachodzącą w zwierzęcym modelu przebiegu osteoartrozy (Rycina 5). Zaobserwowałem pięć zróżnicowanych (oznaczonych literami A-E) profili zmian ekspresji przebiegających w czasie kilkunastu dni od uszkodzenia [5]. Dla wzorów zmian ekspresji określiłem zestawy czynników transkrypcyjnych potencjalnie zaangażowanych w ich regulację oraz opisałem kaskadę mechanizmów molekularnych towarzyszących procesowi degradacji chrząstki. W obszarach regulatorowych genów z grupy A stwierdziłem występowanie silnej nadreprezentacji miejsc wiązania czynnika PPAR- γ . Z kolei, grupa E zawiera geny potencjalnie regulowane przy udziale czynników transkrypcyjnych powiązanych z odpowiedzią zapalną, w tym STAT3, RELA i RELB. Co ciekawe, wynik analizy grupy transkryptów o wzorze B wskazał na występowanie miejsc wiązania dla specyficznego mięśniowo czynnika MYOG. Pomimo wyraźnie odmiennych profili zmian ekspresji genów w grupach C i D nie udało się wskazać czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za ich regulację. Zaobserwowałem natomiast, że poszczególne składowe obrazy ekspresji odwzorowują występowanie i aktywność różnych typów komórek (Rycina 9). Szczególnie wyraźne były profile zmian genów najprawdopodobniej powiązanych z adipocytami, fibroblastami oraz komórkami układu odpornościowego. Wychwycone mechanizmy regulacji ekspresji genów mogą być powiązane zarówno ze zmianami aktywności poszczególnych typów komórek jak i zmianami w porcjach ich występowania.



Rycina 5. Wyniki profilowania zmian ekspresji genów zachodzących w stawie kolanowym szczura w modelu osteoartrozy.

Pomiary zostały wykonane przy pomocy mikromacierzy w czterech punktach czasowych określonych względem czasu podania MIA (dzień 0, 2, 14 i 28). Rycina przedstawia wyniki zmian poziomu 272 transkryptów posegregowane na podstawie podobieństwa profili metodą hierarchicznej klasteryzacji. Na mapie cieplnej wyrażone zostały zmiany poziomu abundancji RNA zachodzące w trakcie rozwoju osteoartrozy. Intensywność kolorów jest proporcjonalna do wystandaryzowanych wartości dla każdego rzędu danych (w skali -3 do 3). Profile zmian zostały oznaczone literami A-E. Po prawej stronie wskazane zostały przykładowe geny. Rycina zmodyfikowana za zgodą współautorów [5].

Wyniki badań zmian ekspresji w krwi pacjentów, u których wystąpiło pęknięcie tętniaka wewnątrzczaszkowego również ukazały zmiany ekspresji grup genów o wysokim stopniu podobieństwa profili [6, 17]. Zidentyfikowałem dwie główne grupy współregulowanych genów, których poziom RNA uległ istotnym zmianom w stosunku do poziomu kontrolnego. Co ciekawe, zaobserwowane w komórkach krwi obwodowej wzrosty i spadki abundancji RNA mają charakter odwrotnej korelacji. Kontrola obserwowanych zmian transkryptów najprawdopodobniej zachodzi na poziomie systemowej regulacji homeostazy organizmu. Badania ekspresji genów w krwi obwodowej doprowadziły do identyfikacji czynników transkrypcyjnych istotnych dla występowania różnic w profilach pomiędzy badanymi grupami osób. Analiza mechanizmów regulacji genów pomogła zrozumieć cykl zdarzeń zachodzących na poziomie molekularnym będących konsekwencją pęknięcia tętniaka wewnątrzczaszkowego. Regiony promotorowe genów kodujących transkrypty o obniżonym poziomie abundancji wykazują nadreprezentację miejsc wiązania dla czynników STAT6 i

RUNX. Podczas gdy regiony promotorowe genów o podwyższonym w stosunku do grupy kontrolnej poziomie zawierają miejsca wiązania dla ELF2 oraz SMRT. Zidentyfikowany zestaw czynników transkrypcyjnych współgra z wynikami wskazującymi na obniżenie funkcji limfocytów T oraz aktywacji czynników prozapalnych w monocytach zachodzącymi po pęknięciu tętniaka [6].

Kolejny badany mechanizm regulacji ekspresji genów opiera się o wykorzystanie miRNA. Funkcję miRNA są związane z degradacją transkryptów i hamowaniem translacji genów kodujących określone białka. Specyficzność działania miRNA wynika z możliwości ich wiązania do zdefiniowanych sekwencji docelowych cząsteczek mRNA. Sekwencjonowanie małych RNA pozwoliło na identyfikację miRNA wykazujących statystycznie istotne zmiany poziomu abundancji. Pomiar mRNA zostały wykonane u tych samych pacjentów, takie podejście ułatwiło poszukiwania transkryptów docelowych dla zidentyfikowanych miRNA [7]. Wynikiem analiz było wskazanie potencjalnych celów dla regulowanych miRNA w grupie białek funkcjonalnie powiązanych z aktywnością cytokin. Dla kilku czynników, w tym dla HMGB1 oraz sFasL, potencjalne konsekwencje regulacji z udziałem miRNA były sprawdzane na poziomach transkryptów oraz białek. W krwi obwodowej pacjentów po urazie pęknięcia tętniaka wewnątrzczaszkowego analizowałem również profile zmian ekspresji innych typów RNA. Stwierdziłem występowanie zależności pomiędzy zmianami poziomów abundancji piRNA i rRNA oraz obecnością w ich genomowych lokacjach miejsc wiązania określonych czynników transkrypcyjnych. Mechanizmy kontroli ekspresji małych RNA o funkcjach regulatorowych są słabo poznane. W literaturze brak jest odniesień opisujących biologiczne znaczenie obserwacji zmian ich ekspresji. Badania mające na celu poznanie roli poszczególnych typów małych RNA w badanym układzie są kontynuowane.

e) Układy badawcze i czynniki wywołujące zmiany poziomu abundancji transkryptów.

Przedstawione osiągnięcie naukowe dotyczy badań prowadzonych w trzech układach eksperymentalnych. W każdym z nich analizowałem zmiany transkrypcji genów w kilku punktach czasowych. Celem badań była identyfikacja genów powiązanych z badanym stanem fizjologicznym. W eksperymentach stosowałem wysokoprzepustowe metody analizy transkryptomu, których możliwości pomiarowe ulegały zwiększeniu wraz z postępem technologicznym. W badanych układach rozpoznałem i analizowałem wzory zmian transkrypcji genów wywołanych bodźcami o stosunkowo silnym wpływie na organizm. Układy różniły się przebiegiem, zakresem oraz nasileniem zmian ekspresji genów co umożliwiło poszukiwania prawidłowości w mechanizmach regulacji ekspresji genów. Wyniki uzyskane w poszczególnych układach interpretowałem w kontekście etiologii powiązanych chorób oraz potencjalnych możliwości terapeutycznych. Dodatkowym celem badań było wskazanie molekularnych wskaźników umożliwiających przewidywanie powiązanych efektów fizjologicznych, ale występujących w oddalonym punkcie czasowym.

W mojej pracy przeprowadziłem łącznie kilkadziesiąt eksperymentów profilowania zmian ekspresji genów. Zróznicowanie układów badawczych pozwoliło na porównanie zmian transkrypcji o odmiennym nasileniu i przebiegu czasowym. Dotychczas opisałem

wykorzystywane technologie i obserwane kierunki analizy wraz z przykładami. Poniżej omówię główne czynniki, które wpływają na ekspresję genów. Każdy z badanych układów cechował inny zestaw czynników kształtujących profil zmian transkrypcji. Część czynników została uwzględniona na etapie tworzenia planów eksperymentów, wpływ kolejnych został rozpoznany i określony na podstawie wyników wykonanej analizy danych. Końcowa interpretacja wyników wymagała przeprowadzenia oceny wpływu każdego z czynników.

Układy badawcze:

I. Określenie genomowych sygnatur leków psychotropowych o zróżnicowanych mechanizmach działania.

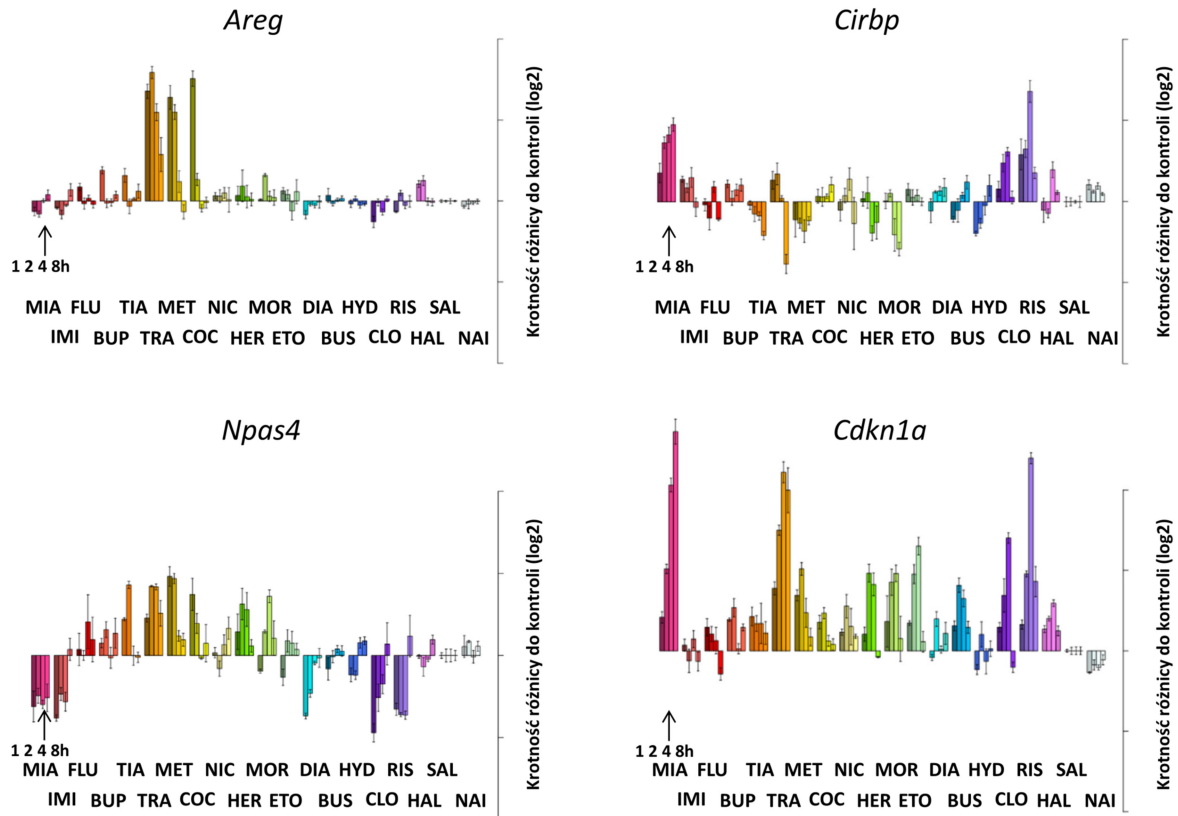
Personalizacja doboru leków psychotropowych to potencjalny kierunek do poprawy skuteczności terapii chorób neuropsychiatrycznych. Do jej praktycznego zastosowania konieczne jest zdefiniowanie cech i właściwości leków na podstawie których możliwa będzie optymalizacja skuteczności terapii. Profilowanie leków w warunkach eksperymentalnych ułatwia określenie różnic i podobieństw w ich działaniu na poziomie molekularnym. Celem moich badań było porównanie profili zmian transkrypcyjnych wywołanych podaniem leków psychotropowych o farmakologicznie zróżnicowanych mechanizmach działania. Do porównania wybrałem 21 leków i substancji psychoaktywnych należących do różnych grup. W badaniach uwzględnione zostały leki o działaniu przeciwdepresyjnym, przeciwłękowym, przeciwpsychotycznym, opioidy, psychodyspleptyki oraz psychostymulanty. Badania zostały w całości przeprowadzone w Zakładzie Neurofarmakologii Molekularnej IF PAN, przy wsparciu współautorów zaangażowanych w eksperymenty na zwierzętach, pomiary biochemiczne oraz analizę danych. Zmiany poziomów abundancji transkryptów były analizowane w tkance mózgowej myszy. Pomiary ekspresji genów zostały wykonane w prążkowie, a dodatkowe analizy w mniejszej skali przeprowadzono w hipokampie. Dynamika zmian była monitorowana w czterech punktach przebiegu czasowego (1, 2, 4 i 8 godzin od podania). Całość analiz wymagała użycia kilkuset mikromacierzy DNA oraz opracowania i uruchomienia zestawu dedykowanych narzędzi bioinformatycznych. Badania mechanizmów regulacji genów kontynuowane były również w modelach komórkowych, tj. neuronalnych i astrocytarnych hodowlach pierwotnych.

Czynnikiem definiującym obraz ekspresji genów jest rodzaj badanej tkanki. Wynikowy profil ekspresji jest złożeniem informacji pochodzących z różnych typów komórek występujących w analizowanym materiale. Większość badań profilowania genów przeprowadziłem w prążkowie myszy. Jest to region mózgu złożony z podobszarów o funkcjach istotnych dla kontroli kilku typów zachowań. Interpretacja obserwowanych zmian molekularnych dotyczyła działania badanych substancji na napęd, motywację oraz motorykę. Dla porównania efektów podania wybranych leków psychotropowych dodatkowe pomiary zmian ekspresji zostały wykonane w formacji hipokampa [3]. Uzyskane w ten sposób wyniki pozwoliły na wskazanie podobieństw i różnic w regulacji genów w dwóch obszarach mózgu otrzymujących unerwienie dopaminergiczne. Kolejnym zagadnieniem była specyficzność komórkowa oraz przestrzenna lokalizacja obserwowanych zmian. Przeprowadzone badania efektów leków psychotropowych pozwoliły na rozróżnienie zmian ekspresji zachodzących w komórkach

neuralnych i glejowych [1, 2, 18]. Dopasowanie właściwości farmakologicznych każdego z leków do wywoływanych zmian umożliwiło przewidywanie udziału poszczególnych układów neurotransmisyjnych w regulacji danego genów. Przykładowo, profil zmian poziomu abundancji transkryptu *Areg* sugeruje, że zmiany ekspresji tego genu są wywoływane poprzez aktywację transmisji dopaminergicznej (Rycina 6).

Czynnikiem istotnym dla pomiarów abundancji transkryptów jest punkt czasowy, w którym są one dokonywane. Zagadnienie to dotyczy zarówno analizy przebiegu wywołanych zmian genów jak i kontroli molekularnego tła, które podlega regulacji w cyklach biologicznych. Możliwość detekcji zmian w poziomie ekspresji jest zależna od decyzji w jakim punkcie dokonywany jest odczyt sygnału. Zmiany poziomu transkryptów w prążkowi wywołane bodźcem farmakologicznym były obserwowane w okresie kilku godzin od podania. W przypadku większości regulowanych genów maksymalne efekty były widoczne w 2 lub 4 godzinie (Rycina 6). Poszczególne grupy genów regulowanych w odpowiedzi na podanie leków wykazują różnice w średnim czasie półtrwania mRNA. Parametr ten dobrze koreluje z punktem, w którym zaobserwowany jest maksymalny poziom abundancji mRNA. Transkrypty wykazujące maksymalny poziom indukcji we wczesnych punktach czasowych mają relatywnie krótki okres półtrwania np. *Egr2*, *Junb* i *Dusp1*.

W efekcie wykonanych prac powstał katalog zmian w transkrypcji genów wywołanych w prążkowi w odpowiedzi na jednorazowe podanie leków psychotropowych. Dla każdego z badanych leków zdefiniowałem sygnaturę zmian ekspresji genów w prążkowi. Interesujących wyników dostarczyły analizy podobieństw i różnic sygnatur w obrębie klas leków oraz pomiędzy nimi. Leki przeciwpsychotyczne, przeciwłękowe oraz opioidy charakteryzowały się stosunkowo wysokim stopniem podobieństwa w obrębie klas. Tym niemniej poszczególne leki wykazywały cechy molekularne wychodzące poza ramy danej klasy. Dla przykładu, profil działania haloperidolu na transkryptom prążkowie wskazał na cechy wspólne z psychostymulantami (kokainą i metamfetaminą). To z pozoru paradoksalne podobieństwo wynika ze zdolności regulacji ekspresji podobnego zestawu genów, zależnych od aktywności neuralnej wywołanej w prążkowi. Zaobserwowane zmiany transkrypcji genów zachodzą jednak w odmiennych populacjach neuralnych oraz wynikają z aktywacji różnych mechanizmów neurofarmakologicznych [19].



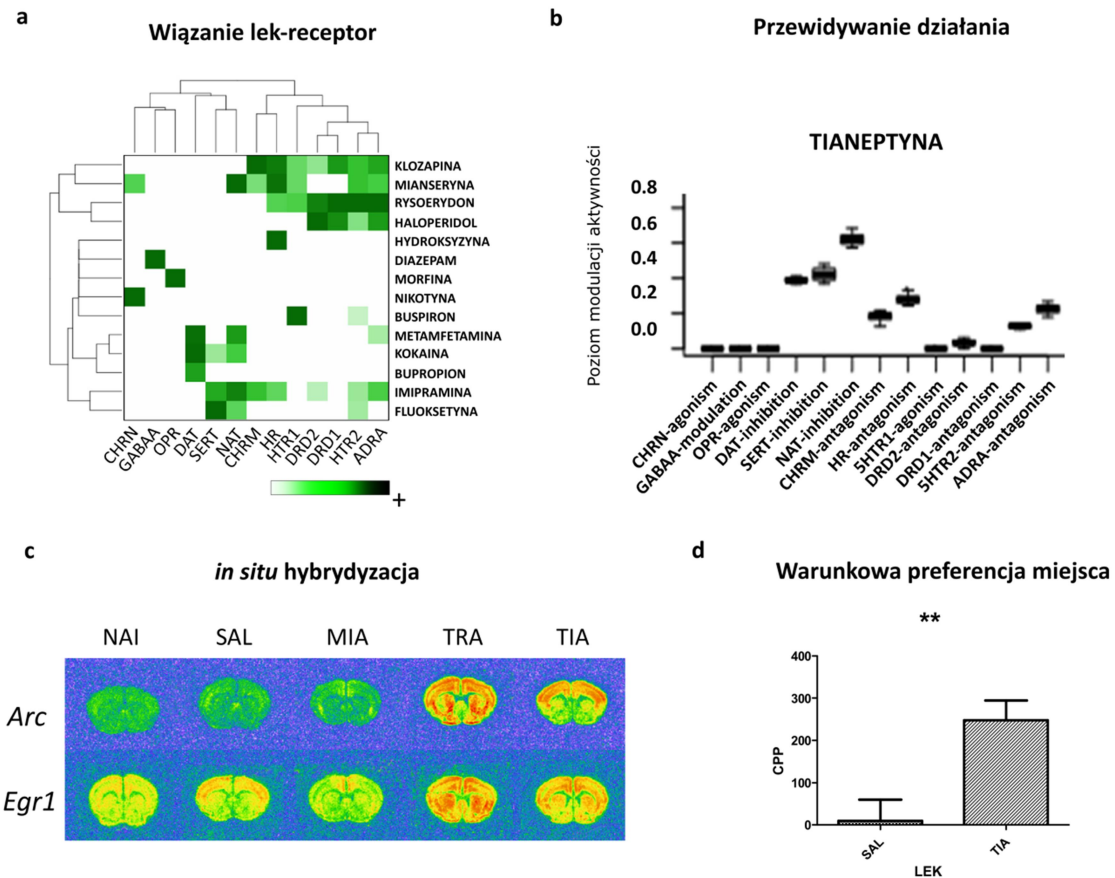
Rycina 6. Przebieg czasowy zmian ekspresji wybranych genów w prążkowie myszy wywołanych podaniem wybranych leków psychotropowych.

Przykłady regulacji ekspresji genów o profilach przyporządkowanych do wzorów α (*Areg*, *Npas4*), β (*Cdkn1a*) oraz γ (*Cirbp*) (patrz Rycina 3). Zastosowane leki psychotropowe to: mianseryna (MIA), imipramina (IMI), fluoksetyna (FLU), bupropion (BUP), tianeptyna (TIA), tranilcypromina (TRA), metamfetamina (MET), kokaina (COC), nikotyna (NIC), heroina (HER), morfina (MOR), etanol (ETO), diazepam (DIA), buspiron (BUS), hydroksyzyna (HYD), klozapina (CLO), rysperydon (RIS), haloperidol (HAL), grupy kontrolne otrzymały sól fizjologiczną (SAL) lub nie otrzymywały iniekcji (NAI). Wyniki zostały przedstawione w stosunku do grupy kontrolnej otrzymującej sól fizjologiczną. Pomiarów zmian poziomu zostały przeprowadzone przy pomocy mikromacierzy DNA w czterech punktach czasowych (od lewej 1, 2, 4 i 8 godzin od jednorazowego podania) [1].

Szczególnie heterogenną grupą związków pod względem profili zmian ekspresji genów okazały się leki przeciwdepresyjne. W porównaniu uwzględnione zostały leki o zróżnicowanych mechanizmach działania, w tym między innymi trójcykliczny lek przeciwdepresyjny (imipramina), selektywny inhibitor zwrotnego wychwytu serotoniny (fluoksetyna) oraz inhibitor monoaminooksydazy (tranilcypromina). Na podstawie uzyskanych wyników stwierdziłem, że różnice w efektach molekularnych pomiędzy lekami przeciwdepresyjnymi współgrają z różnicami na poziomie ich farmakologicznego mechanizmu działania. Dla przykładu, imipramina wykazała zestaw cech molekularnych wspólnych z lekami przeciwłękowymi. Działanie imipraminy zachodzi poprzez hamowanie wychwytu zwrotnego noradrenaliny i serotoniny oraz umiarkowane efekty hamujące na układy cholinergiczny i histaminowy. Lek ten jest opisywany przez psychiatrów jako

posiadający pozytywne efekty w terapii depresji współwystępującej z nasilonym lękiem. Z kolei profil zmian wywołanych przez mianserynę sugeruje podobieństwo jej efektów do działania atypowych leków przeciwpsychotycznych (klozapiny i rysperydonu). Za zbieżność na poziomie molekularnym może odpowiadać zdolność mianseryny do wiązania się z receptorami serotoniny 5-HT_{2A}. Przykłady te dobrze obrazują poziom złożoności zmian ekspresji genów zachodzących w układzie nerwowym oraz konieczność zachowania ostrożności przy ich neurobiologicznej interpretacji. Na podstawie uzyskanych profili molekularnych opracowałem system grupowania i klasyfikacji leków psychotropowych oraz substancji psychoaktywnych. W ramach przeprowadzonych analiz zbudowana została baza referencyjnych profili lekowych, umożliwiającą badania kolejnych związków o neurofarmakologicznym potencjale.

W publikacjach mojego autorstwa zaproponowałem sposób wykorzystania katalogu wzorów regulacji genów do oceny molekularnych efektów. Postawiłem hipotezę, iż profil molekularny uzyskany po jednorazowym podaniu leku pozwala na potwierdzenie mechanizmu farmakologicznego. Podjąłem także próby przewidywania mechanizmów działania leków o klinicznie sprawdzonych efektach, ale niepewności co do punktów uchwytu. Dla dwóch leków na podstawie sygnatury genów zaproponowałem potencjalne punkty neurobiologicznego uchwytu. Uzyskany profil transkrypcyjny tianeptyny zasugerował możliwość jej działania poprzez układy monoaminergiczne (Rycina 7). Według twórców leku, jego właściwości przeciwdepresyjne mają wynikać ze zdolności do nasilenia transportu zwrotnego serotoniny. Informacja ta była często wykorzystywana jako argument kwestionujący monoaminergiczną teorię powstawania i leczenia depresji. Wyniki analizy zmian ekspresji genów nie potwierdziły wspomnianego mechanizmu działania tianeptyny [20]. Moje badania sugerują inne tłumaczenie efektów przeciwdepresyjnych. Obraz zmian genów wywołanych przez podanie tego leku wskazuje na możliwość aktywacji trzech głównych systemów monoaminergicznych. W tym miejscu warto przypomnieć historię rynkowego poprzednika tianeptyny czyli amineptyny [21]. Lek ten wykazywał potencjał blokowania transportu zwrotnego dopaminy i noradrenaliny. Pomimo pozytywnych opinii w zakresie działania przeciwdepresyjnego, amineptyna została wycofana z rynku z uwagi na informacje o hepatotoksyczności oraz podejrzenie uzależniającego potencjału. Tianeptyna wykazuje podobieństwo struktury chemicznej do amineptyny, jednak na rynek została wprowadzona jako substancja mająca odmienny mechanizm działania. W przypadku tianeptyny ujawnione zostały raporty o jej nadużywaniu przez pacjentów [22]. Właściwości nagradzające tianeptyny zostały wykazane w modelu zwierzęcym (Rycina 7). Interesujące informacje o działaniu tianeptyny zostały ujawnione już po publikacji moich wyników. Przedstawione zostały dowody, że tianeptyna może posiadać zdolność aktywacji receptorów opioidowych [23]. Idea potencjalnego wykorzystania w terapii zaburzeń nastroju związków o umiarkowanym działaniu na układ endogennych opioidów ma racjonalne podstawy. Efekt terapeutyczny tianeptyny może wynikać z połączonego działania aktywującego na układy monoaminergiczne oraz na układ endogennych opioidów. Działanie przeciwdepresyjne jest postulowane w przypadku leków o podobnych właściwościach np. tramadolu [24].



Rycina 7. Badania mechanizmu działania tianeptyny na podstawie jej transkrypcyjnych efektów w prążkowie.

(a) Macierz korelacji przedstawia poziom wiązania substancji do wybranych punktów neurobiologicznego uchwytu. Nasylenie koloru odpowiada wartościom uzyskanym z bazy PDSP Ki. Dane te posłużyły jako punkty referencyjne dla analizy przewidywania efektów tianeptyny. (b) Na wykresie przedstawiono teoretyczny wpływ tianeptyny na poziom aktywacji poszczególnych mechanizmów neurofarmakologicznych określony na podstawie efektów transkrypcyjnych. (c) Porównanie rozmieszczenia transkryptów *Arc* i *Egr1* w mózgu myszy w odpowiedzi na jednorazowe podanie tianeptyny (TIA), tranlycyprominy (TRA) i mianseryny (MIA). Pomiary metodą hybrydyzacji *in situ* zostały wykonane dwie godziny od podania. Grupy kontrolne to myszy otrzymujące sól fizjologiczną (SAL) lub nie otrzymujące iniekcji (NAI). (d) Nagradzające właściwości tianeptyny zostały zbadane w teście warunkowej preferencji miejsca (CPP, od ang. *conditioned place-preference*). Na osi Y przedstawiony został wskaźnik preferencji. Różnice pomiędzy grupami zwierząt analizowano przy pomocy testu t (** $P < 0.01$). Więcej informacji o metodach oraz wynikach przewidywania mechanizmów działania tianeptyny znajduje się w publikacji Korostyński i wsp. BMC Genomics 2015. Rycina zmodyfikowana za zgodą współautorów [1].

Drugim przykładem jest ketamina, opisywana w ostatnich latach jako lek wywołujący wyjątkowo szybki, utrzymujący się w czasie efekt poprawy nastroju u chorych na depresję [25]. Również w tym przypadku analiza zmian na poziomie molekularnym wprowadziła nowe argumenty do dyskusji biologicznych podstaw skuteczności ketaminy w specyficznych zastosowaniach [3]. Trudność w zrozumieniu efektów ketaminy wynika z jej działania poprzez kilka systemów neuroprzebieżnikowych. W moich badaniach porównałem efekty transkrypcyjne ketaminy z innymi związkami o antagonistycznym działaniu wobec receptorów NMDA. Wyniki na poziomie molekularnym potwierdziły duże podobieństwo ketaminy do fencyklidyny i memantyny (Rycina 8). Profil ketaminy w pewnych aspektach odpowiedzi transkrypcyjnej wykazuje wspólne cechy z opioidami, etanolem i nikotyną. W przypadku leków przeciwdepresyjnych najbliższe ketaminie były sygnatury molekularne fluoksetyny i bupropionu. Złożony profil transkrypcyjny ketaminy odpowiada jej unikalnym właściwościom klinicznym łączącym efekty psychodysleptyczne, dysocjacyjne i przeciwdepresyjne.

Uzyskane wyniki pokazują, że przy użyciu wysokoprzepustowych metod analizy transkryptów można odkrywać nowe aspekty działania leków, co do których faktycznego mechanizmu farmakologicznego nie ma pewności. Szerokie analizy wzorów ekspresji grup genów regulowanych podaniem leków dodatkowo ukazały złożoność efektów badanych substancji na poziomie molekularnym. Uzyskiwane wskazówki co do efektów leków psychotropowych mogą być dodatkowo wykorzystywane w procesie personalizacji farmakoterapii.

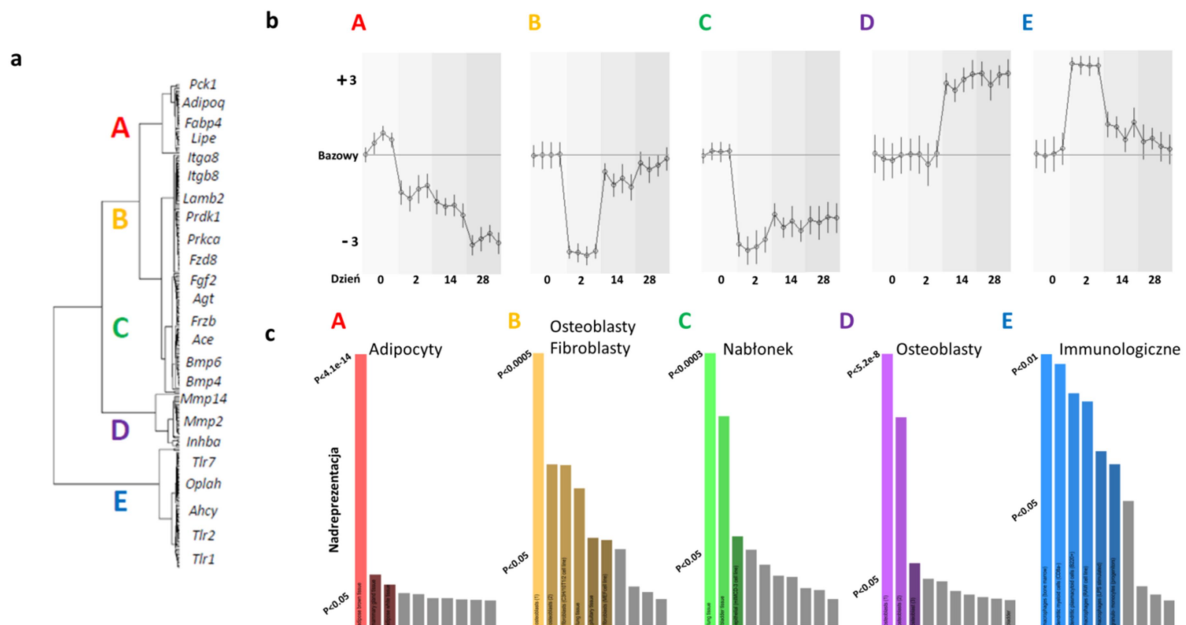
II. Profilowanie zmian ekspresji genów towarzyszących rozwojowi choroby zwyrodnieniowej stawu kolanowego w modelu zwierzęcym.

Choroba zwyrodnieniowa (osteoartroza) to postępujące schorzenie degeneracyjne chrząstki stawu kolanowej, któremu towarzyszy przewlekły ból oraz trudność z poruszaniem się. Poznanie etiologii tej choroby na poziomie molekularnym może wskazać potencjalne punkty uchwytu nowych terapii jak również wczesne markery prognostyczne. Moje badania miały na celu identyfikację genów, których ekspresja zmienia się w kolejnych fazach rozwoju choroby. Badania ekspresji genów zostały wykonane w Zakładzie Neurofarmakologii Molekularnej IF PAN, koncepcja badań oraz model zwierzęcy zostały opracowane we współpracy z prof. Katarzyną Starowicz, kierownikiem Zakładu Neurochemii IF PAN.

Zastosowany model zwierzęcy polegał na wywołaniu uszkodzenia stawu kolanowego w wyniku dostawowej iniekcji jodooctanu sodu (MIA) [5]. Substancja ta blokuje procesy glikolizy zachodzące w chondrocytach. Profilowanie zmian ekspresji zostało przeprowadzone w 2, 14 oraz 28 dniu rozwoju choroby. W eksperymencie jako punkt odniesienia przyjąłem profil ekspresji genów zmierzony w próbce chrząstki stawu kolanowego pochodzącej od zdrowych szczurów. Analiza przebiegu czasowego zmian pozwoliła na prześledzenie następujących po sobie procesów anabolicznych i katabolicznych. Każdy z pięciu głównych wzorów transkrypcji (A-E) został przeze mnie zinterpretowany w kontekście jego potencjalnego znaczenia dla rozwoju choroby (Rycina 9). Zaobserwowane wzrosty i spadki poziomów abundancji transkryptów sugerują możliwość zmian aktywności określonych procesów biologicznych. Przykładowo, sieć genów wykazująca progresywny spadek poziomu ekspresji (*Adipoq* i *Lipe*) została powiązana z procesami adipogenezy oraz szlakiem przekazywania sygnału z udziałem receptora PPAR-gamma. Grupa transkryptów o profilu zmian wykazującym silną, przejściową aktywację ekspresji w drugim dniu rozwoju choroby zawiera czynniki (w tym *Trl1* i *Trl2*) biorące udział w odpowiedzi zapalnej. Z kolei, w skład grupy wykazującej wzrost poziomu mRNA w późnej fazie rozwoju choroby tj. w dniach 14 i 28 (w tym *Mmp2* i *Mmp14*) wchodziły geny kodujące metaloproteiny biorące udział w procesie modelowania macierzy zewnątrzkomórkowej.

Następnie podjąłem próbę przyporządkowania współregulowanych grup genów do poszczególnych przedziałów komórkowych występujących w badanej tkance (Rycina 9). Postępujący spadek poziomu abundancji grupy transkryptów został powiązany z genami ekspresjonowanymi w adipocytach. Natomiast lista transkryptów wykazujących wczesny, przejściowy wzrost poziomu abundancji zawierała nadreprezentację genów ekspresjonowanych w komórkach immunologicznych. Stwierdzone zmiany ekspresji dobrze obrazują rozwój reakcji zapalnej, której towarzyszy narastające odczuwanie bólu. Co istotne, tkanka tłuszczowa posiada zdolność produkcji czynników przeciwzapalnych, obniżenie aktywności adipocytów może być jednym z czynników nasilających postęp choroby [26]. Przeprowadzone badania pozwoliły na rozpoznanie obrazu zmian występujących na poziomie molekularnym we wczesnej i pośredniej fazie rozwoju choroby zwyrodnieniowej stawu kolanowego. Szczególnie interesujące były poszukiwania molekularnych śladów procesów związanych z regeneracją tkanki. Część genów wykazała relatywny wzrost poziomu ekspresji w przedziale czasu od 2 do 28 dnia eksperymentu. Stwierdziłem, że funkcje genów o takim

profilu regulacji są powiązane z procesami osteo- i chondrogenyzy oraz mają udział w procesach przebudowy macierzy zewnątrzkomórkowej. W grupie tej zidentyfikowałem czynniki stanowiące potencjalne punkty uchwytu dla nowych farmakoterapii.



Rycina 9. Analiza wzorów zmian poziomu transkryptów w stawie kolanowym towarzyszących rozwojowi osteoartrozy pod względem ich przebiegu oraz lokalizacji komórkowej.

(a) Identyfikacja wzorów zmian ekspresji (grupy genów A-E) w szczurzym modelu choroby została wykonana metodą hierarchicznej klasteryzacji (patrz Rycina 5). (b) Na wykresach przedstawione są przebiegi czasowe w postaci wartości średnich dla danej grupy genów. Poziom bazowy został zdefiniowany poprzez wykonanie pomiarów w tkance zdrowej. Pomiary zmian przeprowadzono w 0, 2, 14 oraz 18 dniu eksperymentu. (c) Na wykresach przedstawione zostały wyniki analizy dotyczącej typów komórek w jakich mogą być wyrażane geny zidentyfikowane w grupach A-E. Poziom nadreprezentacji regulowanych genów w typach komórek oraz tkankach (na podstawie danych uzyskanych z bazy BioGPS). Rycina zmodyfikowana za zgodą współautorów [5].

W tych samych czterech punktach czasowych pobrana została krew obwodowa do badań profilowania genów. Celem tego eksperymentu było znalezienie biologicznych wskaźników degeneracji chrząstki kolanowej w kontrolowanym układzie modelowym. Interpretacja zmian ekspresji genów w krwi była trudniejsza w stosunku do zmian zaobserwowanych w stawie kolanowym [4]. Badania doprowadziły do identyfikacji transkryptów powiązanych ze ścieżką przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego G13. Geny z tej grupy *Ppp1cb*, *Gna13* i *Tnk2* wykazały obniżenie poziomu abundancji w przebiegu eksperymentu. Potwierdzenia uzyskanych wyników zmian genów szukałem w innych układach badawczych analizujących etiologię osteoartrozy na poziomie molekularnym. Mimo wysokiej chorobowości osteoartrozy w populacjach krajów rozwiniętych, stosunkowo mało jest doniesień literaturowych opisujących zmiany transkrypcji genów zachodzące podczas jej rozwoju. Do porównania wykorzystałem wyniki z badań na grupie kilkudziesięciu osób chorych udostępnione przez

autorów w postaci surowych danych poprzez bazę Gene Expression Omnibus (GEO) [27]. W efekcie przeprowadzonej analizy zdefiniowałem trójgenową sygnaturę o profilu zmian ekspresji zbieżnym w obu badaniach. Przydatność prognostyczna zestawu trzech potencjalnych markerów wymaga potwierdzenia w badaniach na większej grupie pacjentów.

III. Badanie zmian molekularnych w krwi obwodowej zachodzących w reakcji na pęknięcie tętniaka wewnątrzczaszkowego.

Pęknięcie tętniaka wewnątrzczaszkowego zazwyczaj prowadzi do powikłań neurologicznych, w tym deficytów ruchowych i utrzymującego się stanu obniżonego nastroju. Komplikacje te mają negatywny wpływ na zdolność chorego do powrotu do pełnego zdrowia. Metody przewidujące poziom ryzyka wystąpienia powikłań dają szansę na przeprowadzenie działań profilaktycznych lub obrania optymalnej ścieżki terapeutycznej. Celem moich badań było poszukiwanie transkrypcyjnych wskaźników, których różnice poziomów towarzyszą określonym objawom chorobowym. Badania zmian ekspresji genów zostały wykonane w Zakładzie Neurofarmakologii Molekularnej IF PAN. Koncepcja badań, pobranie materiału, ocena stanu pacjentów oraz dodatkowe analizy krwi zostały wykonane we współpracy z prof. Joanną Perą z Katedry i Kliniki Neurologii UJ CM oraz jej współpracownikami.

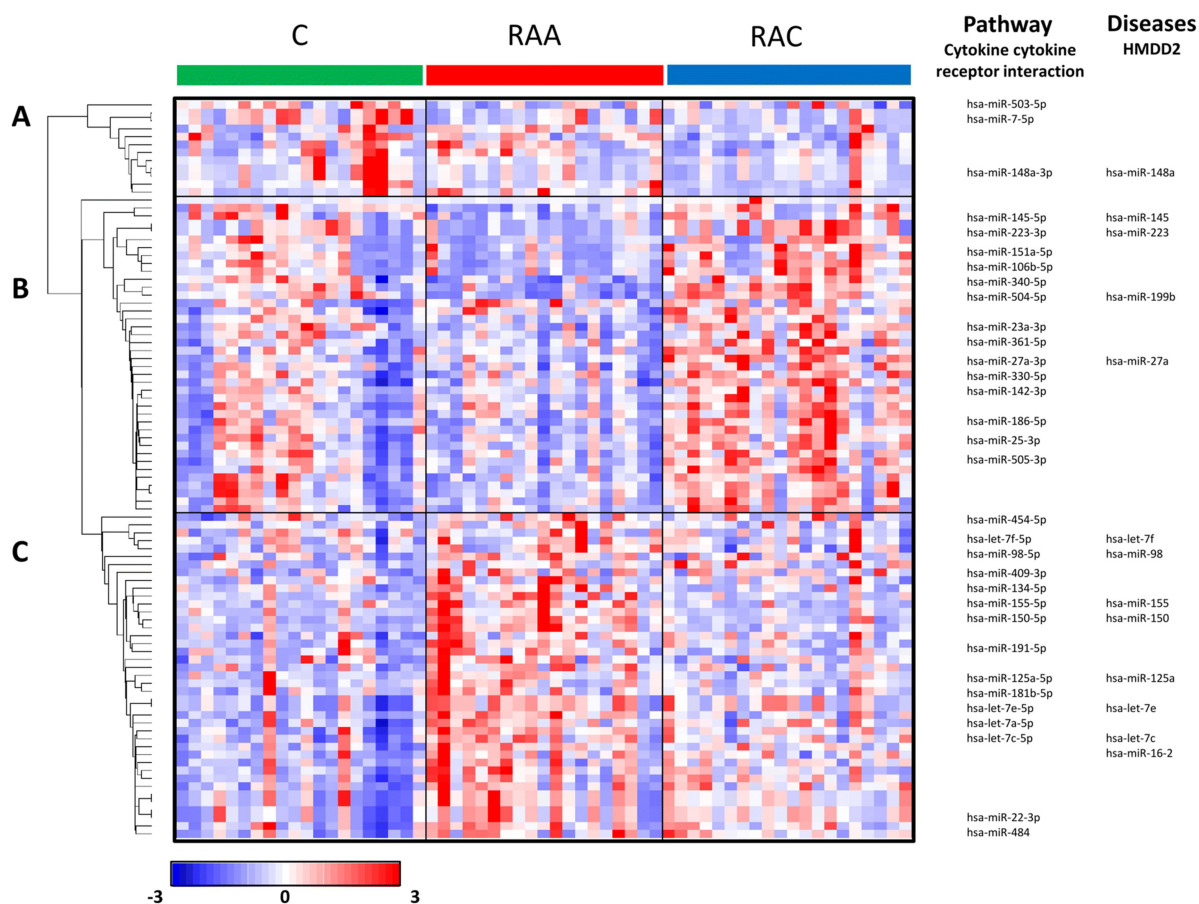
Profilowanie ekspresji genów zostało przeprowadzone w krwi obwodowej pobranej od pacjentów w dwóch przedziałach czasowych [6]. Faza ostra została zdefiniowana jako okres pierwszych 72 godzin od momentu pęknięcia tętniaka. Drugim punktem pomiaru genów był czas pomiędzy 3 a 15 miesięcy od pęknięcia naczynia. Grupę kontrolną stanowiły próbki pobrane od osób o ogólnie dobrym stanie zdrowia, u których potwierdzone zostało występowanie bólów głowy. Łącznie wykonano 60 odczytów pełnego transkryptomu krwi obwodowej, w każdej z grup eksperymentalnych znalazło się po 20 próbek pobranych od osób badanych. Dla uczestników pozyskane zostały parametry kliniczne, w tym wyniki rozszerzonego badania morfologii krwi oraz oceny neuropsychologicznej. Jedna próbka została wykluczona z badania z uwagi na brak dostępu do informacji klinicznych.

W uzyskanych próbkach dokonane zostały pomiary poziomu abundancji różnego typu transkryptów metodą NGS. Kompleksowa analiza objęła zarówno mRNA, długie niekodujące (ncRNA) jak i krótkie transkrypty sRNA. Przeprowadzone zostało porównanie ekspresji alternatywnych wariantów genów pomiędzy badanymi stanami. W fazie ostrej choroby widoczne było duże zróżnicowanie skali odpowiedzi transkrypcyjnej pomiędzy badanymi osobami. Dla dwóch głównych wzorów zmian genów zaproponowałem mechanizmy kontroli ekspresji oraz typy komórek w których mogą one zachodzić. Na podstawie zmiany na poziomie molekularnym postulowany był spadek liczby limfocytów w ostrej fazie choroby oraz aktywacja makrofagów i neutrofilii. Z wykorzystaniem cytometrii przepływowej wykonana została analiza liczby poszczególnych podtypów jednojądrzastych leukocytów występujących w krwi osób badanych. Stwierdzone różnice pomiędzy grupami w największym stopniu dotyczyły liczby limfocytów CD4⁺ oraz monocytów pośrednich. Uzyskane wyniki sugerują, że na obraz zmian transkrypcyjnych wywołanych pęknięciem tętniaka składa się zarówno regulacja ekspresji genów jak i zmiany w proporcjach poszczególnych populacji komórkowych.

Nasilenie różnic obserwowanych na poziomie abundancji mRNA wykazało asocjacje z występowaniem objawów klinicznych. Na bazie profilu ekspresji zestawu transkryptów opracowana została autorska miara (tzw. indeks L/MN), której wynik wykazał powiązanie ze stanem zdrowia osób badanych określonym przy pomocy skali GCS (od ang. *Glasgow Coma Scale*). Opracowany algorytm posiada zdolność przewidywania nasilenia negatywnych konsekwencji pęknięcia tętniaka na podstawie profilu zmian ekspresji genów. Interpretacja różnic w transkrypcji zaobserwowanych w fazie przewlekłej była znacznie trudniejsza z uwagi na liczbę czynników wpływających na stan chorego. Tym niemniej, w przeprowadzonych badaniach zidentyfikowane zostały transkrypcyjne wskaźniki, których zmiana poziomu może utrzymywać się w czasie i towarzyszyć pogorszeniu stanu pacjenta [6, 7, 28].

Kolejne badania dotyczyły zmian poziomu sRNA o funkcjach regulatorowych. U tych samych pacjentów i w tych samych punktach czasowych, jak opisano powyżej, przeprowadzone zostało profilowanie małych RNA. Grupa regulowanych miRNA wykazała statystycznie istotną nadreprezentację czynników zaangażowanych w regulację odpowiedzi zapalnej oraz powiązanie z chorobami układu immunologicznego (Rycina 10). Kolejne zadanie polegało na przyporządkowaniu zmian w poziomie abundancji miRNA do ich potencjalnych celów molekularnych na poziomie mRNA. Wyniki wskazały, które transkrypty kodujące czynniki zaangażowane w kontrolę procesów zapalnych mogą ulegać regulacji poprzez mechanizm zależny od aktywności miRNA. Zmiany wytypowanych czynników sFasL i HMGB1 zostały przebadane na poziomie białka w próbkach pochodzących od osób u których wystąpiło pęknięcie tętniaka. Poziomy abundancji miRNA potencjalnie kontrolujących ekspresje genów *FASLG* oraz *HMGB1* ulegały wzrostowi, podczas gdy mRNAs dla tych dwóch cytokin był obniżony. Z tego powodu oczekiwanym wynikiem było obniżenie poziomu tych czynników również na poziomie białek. Wynik taki został uzyskany dla sFasL, natomiast w przypadku HMGB1 w krwi osób badanych stwierdzony został wzrost białka w stosunku do grupy kontrolnej. Jednym z możliwych wyjaśnień braku zgodności może być różne pochodzenie cząsteczek podlegających pomiarowi. RNA izolowano z obwodowych komórek krwi, podczas gdy białko mierzono w osoczu. Krążący HMGB1 może być uwalniany z różnych typów komórek, w tym z aktywowanych płytek krwi [29]. Co ważne, aktywacja płytek krwi jest znanym zjawiskiem w krwotoku podpajęczynówkowym i jest ona powiązana ze stopniem uszkodzenia mózgu zachodzącym we wczesnej fazie choroby [30]. Zatem można spekulować, że w fazie ostrej po pęknięciu naczynia może zachodzić tendencja do zahamowania procesu wytwarzania HMGB1 w leukocytach obwodowych. Niemniej jednak ze względu na uwalnianie z innych źródeł, w tym z aktywowanych płytek krwi, jego poziom w osoczu może rosnąć.

Podsumowując możliwość identyfikacji grup transkryptów o zmienionych poziomach ekspresji została potwierdzona w warunkach klinicznych. Zmiany na poziomie molekularnym zostały powiązane ze spadkiem liczby limfocytów oraz aktywacją monocytów. Jednocześnie, wstępnie określony został zestaw molekularnych wskaźników prognostycznych skutków pęknięcia tętniaka wewnątrzczaszkowego



Rycina 10. Identyfikacja miRNA wykazujących zmiany poziomu abundancji w krwi obwodowej osób dotkniętych pęknięciem tętniaka wewnątrzczaszkowego.

Poziomy abundancji miRNA zostały zmierzone metodą NGS w próbkach pochodzących od osób w fazie ostrej choroby (RAA), fazie przewlekłej (RAC) oraz z grupy kontrolnej (C). Rycina przedstawia profile 93 miRNA posegregowanych na podstawie podobieństwa zmian przy użyciu hierarchicznej klasteryzacji. Na mapie cieplnej wyrażone są wyniki analizy różnic pomiędzy grupami eksperymentami (przy progu istotności 10% FDR). Intensywność kolorów jest proporcjonalna do wartości (w skali -3 do 3) wystandaryzowanych dla każdego rzędu danych (czyli jednego miRNA). Profile zmian zostały oznaczone literami A-C. Po prawej stronie wskazane zostały przykładowe miRNA wraz ze wskazaniem ich powiązania z działaniem cytokin oraz etiologią wybranych chorób. Więcej informacji wynikach analizy miRNA znajduje się w publikacji Korostyński i wsp. *Molecular Neurobiology* 2019. Rycina zmodyfikowana za zgodą współautorów [7].

f) Interpretacja wyników w kontekście etiopatologii wybranych chorób.

Nadrzędnym celem mojej pracy było powiązanie zmian ekspresji z przebiegiem chorób. Praktycznie wszystkie choroby cywilizacyjne wymagają pogłębienia wiedzy o ich etiopatologii oraz opracowania bardziej skutecznych terapii przyczynowych. Z uwagi na niedobór skutecznych farmakoterapii, problem ten jest szczególnie aktualny zarówno dla chorób neuropsychiatrycznych, neurologicznych jak i reumatologicznych. Identyfikacja zmian towarzyszących rozwojowi choroby może wskazać potencjalne punkty uchwytu terapii oraz wskaźniki prognostyczne. Z kolei badania efektów na poziomie molekularnym leków

stosowanych w praktyce klinicznej pozwalają określić jakie mechanizmy biologiczne mogą być powiązane z odwracaniem procesów chorobowych.

Jednym z zadawanych pytań badawczych jest ocena zdolności wywoływania przez leki psychotropowe trwałych zmian w poziomie ekspresji genów w tkance mózgowej. Uzyskane przeze mnie wyniki wskazują, że większość zmian w programie regulacji ekspresji zachodzących w odpowiedzi na podanie leków psychotropowych ma charakter przejściowy. Analizy przeprowadzone w układach eksperymentalnych dotyczących punktów czasowych oddalonych czasowo od podania nie pozwoliły na identyfikację transkryptów wykazujących trwałe zmiany poziomu abundancji mRNA [31]. Rola zmian ekspresji genów wywołanych podaniem leków psychotropowych może być związana z inicjacją i wzmacnianiem zachodzących procesów neuroplastycznych. Zagadnienie mechanizmów biologicznych odpowiadających za odroczone w czasie efekty leków, dotyczy zarówno efektów terapeutycznych takich jak działanie przeciwdepresyjne, jak i niepożądanych jak rozwój uzależnienia. Kolejne podania leku poprzez określony zestaw celów receptorowych powtarza efekt zarówno na poziomie neuronalnej transmisji jak i zjawisk molekularnych. Zmiany plastyczne w określonych obszarach mózgu mogą w konsekwencji uruchomić procesy biologiczne prowadzące do odwracania efektów chorobowych. Moja interpretacja uzyskanych wyników prowadzi do wniosku, że konsekwencje zmian w transkrypcji zachodzące w wyniku wielokrotnego działania leku ulegają kumulacji. Tak więc, stabilizacja zmian neuroplastycznych może wymagać wielokrotnej ekspozycji na bodziec farmakologiczny. Hipoteza ta pozwala lepiej zrozumieć dlaczego konsekwencje terapeutyczne terapii z wykorzystaniem leków przeciwdepresyjnych są obserwowane z opóźnieniem.

Dla każdej z badanych substancji psychotropowych opracowałem sygnaturę transkrypcyjną, która poprzez ocenę poszczególnych składowych profili ekspresji opisuje efekty molekularnego działania w prądkowiu myszy [1]. W badaniach przeprowadziłem dogłębną analizę i interpretację zmian obserwowanych na poziomie molekularnym. Na podstawie uzyskanych wyników zaproponowałem neurobiologiczne konsekwencje aktywacji procesów molekularnych powiązanych z grupami regulowanych genów. Dostarczyłem nowych informacji zarówno co do sposobów regulacji genów w wyniku bezpośredniego działania leków psychotropowych poprzez receptory neuronalne, jak i pośrednio w reakcji systemowej po pobudzeniu mechanizmów obwodowych. W przypadku leków o oddziaływaniu wieloukładowym analiza profilu regulacji genów zależnych od aktywności neuronalnej pozwoliła na oszacowanie wartości wpływu poszczególnych komponentów. Na podstawie literatury odszukałem potencjalne powiązania zidentyfikowanych zestawów genów z procesami neuroplastyczności mózgu. Interesującym odkryciem okazało się stwierdzenie aktywacji genów zależnych od receptora GR w odpowiedzi na podanie leków psychoaktywnych [12, 13]. W swojej pracy zidentyfikowałem nową grupę GR-zależnych genów ulegających regulacji w mózgu. Funkcje komórkowe genów z tej grupy wskazują na ich potencjalny udział w kontroli metabolizmu. Są to dla przykładu transporter glukozy 1 (*Slc2a1*) oraz peripilina, zaangażowana procesy magazynowania tłuszczów (*Plin4*). Co istotne, szereg genów z tej grupy wykazuje względnie wysoki poziom ekspresji w komórkach glejowych. Obserwacja ta dała początek teorii o możliwości regulacji potencjału plastycznego

neuronów poprzez aktywację mechanizmów wspierających neurony od strony metabolicznej. Mimo, że udział receptora GR w rozwoju depresji oraz uzależnień lekowych był wielokrotnie postulowany to biologiczny mechanizm tej zależności nie jest w pełni zrozumiały [32]. Opracowane przeze mnie wyniki dały nowe spojrzenie na potencjalną rolę astrocytów w efektach leków psychotropowych [33]. Badania mechanizmów neurobiologicznych biorących udział w tym zjawisku są kontynuowane przez moich współpracowników [13, 14].

Zastosowanie eksperymentalnego modelu choroby pozwoliło na analizę progresywnych zmian w poziomach ekspresji genów. W badanym układzie monitorowany był rozwój osteoartrozy pod kątem zmian molekularnych w stawie kolanowym w okresie czterech tygodni. W tym przypadku moim zadaniem było stwierdzenie różnic na poziomie transkryptów pomiędzy stanem chorobowym a tkanką zdrową, oraz analiza przebiegu zmian w poszczególnych punktach czasowych. W wyniku przeprowadzonych prac pozyskałem nowe informacje o procesach biologicznych towarzyszących degeneracji stawu we wczesnej i pośredniej fazie rozwoju choroby [5]. Dla każdej z współregulowanych grup genów zdefiniowałem profil zmian oraz opracowałem opis mechanizmów regulujących. Co więcej, przyporządkowałem grupy genów do różnych przedziałów komórkowych występujących w stawie kolanowym. Na tej podstawie możliwe było przewidywanie w jaki sposób aktywność poszczególnych populacji komórkowych mogą być powiązane z daną fazą rozwoju choroby.

Pośród zidentyfikowanych zmian stwierdziłem różnice poziomu abundancji mRNA znanych wskaźników procesów patofizjologicznych, w tym genów wiązanych z różnymi aspektami odpowiedzi zapalnej. Równocześnie rozpoznałem mechanizmy, których modulacja farmakologiczna może potencjalnie wpłynąć na sposób rozwoju choroby np. zaobserwowana została aktywacja genów kodujących kilka podtypów metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowych [34]. U tych samych zwierząt wykonane zostały badania efektów systemowych rozwijającej się choroby poprzez analizę występowania wskaźników w krwi obwodowej [4]. W układzie modelowym przeprowadzone zostały badania zmian towarzyszących degeneracji chrząstki kolanowej, a zachodzących w krwi obwodowej. Krew jest szczególnie interesującym materiałem do poszukiwań biologicznych wskaźników stanów chorobowych, z uwagi na możliwość szybkiej translacji uzyskanych wyników do zastosowań klinicznych. Grupa transkryptów wykazujących zmiany poziomu w eksperymentalnym modelu choroby została porównana z wynikami uzyskanymi u ludzi. Poziom kilku ze zidentyfikowanych genów zmieniony był także w krwi pacjentów cierpiących na osteoartrozę.

Doświadczenie zdobyte w badaniach modeli zwierzęcych zostało przeniesione do układu klinicznego. Badania prowadziłem na materiale pobranym od pacjentów, u których nastąpiło pęknięcie tętniaka wewnątrzczaszkowego. Krew obwodowa jest źródłem wskaźników molekularnych bezpośrednio odzwierciedlających stan chorego. Przeprowadziłem analizy asocjacyjne współwystępowania cech klinicznych oraz zmian ekspresji genów. W tym układzie poszukiwałem molekularnych korelat i wyznaczników zdrowotnych konsekwencji pęknięcia tętniaka. W kolejnych godzinach od zdarzenia w profilu transkrypcyjnym zachodzą zmiany, na które składa się wielowątkowa, fizjologiczna reakcja organizmu. Wskaźniki wyrażane w komórkach krwi mogą wykazywać własności predykcyjne w zakresie szansy wystąpienia i nasilenia komplikacji. Występowanie zmian abundancji transkryptów było

porównywane ze stanem badanych osób opisanym przy pomocy wyników badań diagnostycznych.

Indywidualne zróżnicowanie nasilenia zmian molekularnych zostało wykorzystane do konstrukcji sygnatury transkrypcyjnej czyli zestawu zmian poziomu abundancji RNA wywołanych pęknięciem tętniaka. Porównanie sygnatury pomiędzy pacjentami pozwala na podjęcie próby przewidywania ryzyka wystąpienia komplikacji. Określone profile genowe przyporządkowałem do fizjologicznych zmian zachodzących w organizmie. Największa grupa transkryptów o obniżonym poziomie została powiązana z efektem spadku liczby limfocytów T. Zmiana ta tłumaczona jest jako wypadkowa zwiększonego zaangażowania komórek tego typu w miejscu uszkodzenia oraz nasilenia procesów apoptotycznych komórek układu immunologicznego zachodzących w śledzionie i grasicy [35]. Z kolei druga grupa genów, o podniesionym poziomie abundancji mRNA została scharakteryzowana jako zawierająca transkrypty wyrażane w monocytach. Obserwacja ta może sugerować wzmożoną aktywność krążących monocytów [6, 28].

Przeprowadzone badania transkryptomyczne były prowadzone na poziomie umożliwiającym rozróżnienie izoform genów oraz detekcję RNA niekodujących (zarówno ncRNA jak i sRNA). Stwierdziłem występowanie w krwi pacjentów alternatywnych wariantów genów o specyficznych funkcjach, których produkty białkowe mogą mieć znaczenie w odpowiedzi organizmu na traumę. Zidentyfikowałem także zestaw miRNA o zmienionych poziomach abundancji [7]. Analiza regulowanych miRNA pozwoliła na wskazanie ich potencjalnych celów na poziomie mRNA. Zmiany na poziomie molekularnym sugerują zmiany aktywności zestawu mechanizmów biorących udział w modulacji odpowiedzi zapalnej. Wyniki uzyskane w oddalonym od pęknięcia naczynia punkcie czasowym pozwoliły na odniesienie zmian molekularnych do utrzymujących się skutków zdrowotnych. Przeprowadziłem identyfikację potencjalnych wskaźników stanu zdrowia w zakresie przewidywanie konsekwencji pęknięcia tętniaka wewnątrzczaszkowego. Zaproponowałem model w którym utrzymywanie się specyficznego wzorca zmian poziomów transkryptów jest związane z podwyższonym ryzykiem wystąpienia i utrzymywania się komplikacji.

Wyniki uzyskane w moich badaniach przyczyniają się do lepszego zrozumienia patoetiologii chorób oraz mechanizmów działania leków, nie tylko na poziomie pojedynczych procesów biologicznych, ale także w szerszym kontekście zmian zachodzących w organizmie. Pełna analiza transkryptomu pozwala uzyskać molekularne sygnatury danego stanu zawierające informacje o aktywności wielu procesów fizjologicznych o zróżnicowanym znaczeniu. Docelowo metody przesiewowe są wykorzystywane do identyfikacji klinicznie przydatnych genomowych wskaźników użytecznych w prognozowaniu rokowań i przewidywaniu skuteczności terapii.

g) Element nowatorski prac stanowiących osiągnięcie naukowe.

Prowadzone przeze mnie badania zmian ekspresji genów w skali całego genomu w wielu aspektach były pionierskie. W każdym z badanych obszarów dokonałem odkryć nowych genów i ich wariantów o specyficznych profilach regulacji. Następnie odnajdywałem prawidłowości w procesach regulacji poszczególnych składowych obserwowanych zmian

ekspresji genomu. W szczególności interesująca była identyfikacja i charakteryzacja współregulowanych grup genów, wskazywanie i potwierdzanie mechanizmów kontrolujących oraz potencjalnych wskaźników molekularnych.

Szereg obserwacji zawartych w osiągnięciu habilitacyjnym ma nowatorski charakter, w tym przede wszystkim:

- 1) Zestawienie wzorów ekspresji genów w prążkowiu dla ponad 20 leków psychotropowych i substancji psychoaktywnych, wraz z opracowaniem nowej metody klasyfikacji leków oraz uruchomieniem publicznie dostępnej bazy wraz z zestawem narzędzi analitycznych (www.genes2mind.org) [1, 3].
- 2) Opracowanie na podstawie profili molekularnych teoretycznych modeli farmakologicznego działania leków o zastosowaniu w terapii depresji, tianeptyny i ketaminy [1, 3].
- 3) Opis procesów regulacji głównych układów transkrypcyjnych aktywowanych w mózgu po podaniu leków psychotropowych, określenie sposobów regulacji genów powiązanych z neuroplastycznością oraz kontrolą metabolizmu mózgu [1, 2].
- 4) Określenie zakresu i poziomu ekspresji alternatywnych form transkrypcyjnych w neuronach i astrocytach po podaniu wybranych leków przeciwdepresyjnych [2, 3].
- 5) Poznanie przebiegu zmian w ekspresji genów zachodzących w chrząstce kolana w modelu choroby zwyrodnieniowej stawu kolanowego, przyporządkowanie zmian transkrypcyjnych do poszczególnych układów komórkowych [5].
- 6) Identyfikacja wskaźników w krwi obwodowej na poziomie transkrypcji genów powiązanych z rozwojem choroby zwyrodnieniowej stawu kolanowego zarówno w modelu zwierzęcym jak i w materiale klinicznym [4].
- 7) Zdefiniowanie zestawu zmian ekspresji genów w krwi obwodowej zachodzących po pęknięciu tętniaka wewnątrzczaszkowego wraz z identyfikacją wskaźników molekularnych powiązanych ze stanem klinicznym osób badanych [6, 7].
- 8) Przyporządkowanie zidentyfikowanych wzorów transkrypcyjnych do zmian zachodzących w populacjach komórkowych krwi limfocytów i makrofagów, stworzenie miary (wskaźnik indeksu L/MN) na bazie ekspresji wybranych genów zdolnej do przewidywania podwyższonym ryzyka wystąpienia komplikacji [6].
- 9) Wskazanie potencjalnego znaczenia zmian ekspresji małych RNA, wywołanych w konsekwencji pęknięcia tętniaka wewnątrzczaszkowego, w regulacji odpowiedzi zapalnej organizmu [7].

h) Piśmiennictwo.

1. Korostynski, M., et al., *Novel drug-regulated transcriptional networks in brain reveal pharmacological properties of psychotropic drugs*. BMC Genomics, 2013. **14**: p. 606.
2. Piechota, M., et al., *Regulation of alternative gene transcription in the striatum in response to antidepressant drugs*. Neuropharmacology, 2015. **99**: p. 328-36.
3. Ficek, J., et al., *Molecular profile of dissociative drug ketamine in relation to its rapid antidepressant action*. BMC Genomics, 2016. **17**: p. 362.
4. Korostynski, M., et al., *Blood Transcriptional Signatures for Disease Progression in a Rat Model of Osteoarthritis*. Int J Genomics, 2017. **2017**: p. 1746426.
5. Korostynski, M., et al., *Cell-type-specific gene expression patterns in the knee cartilage in an osteoarthritis rat model*. Funct Integr Genomics, 2018. **18**(1): p. 79-87.
6. Korostynski, M., et al., *Systemic response to rupture of intracranial aneurysms involves expression of specific gene isoforms*. J Transl Med, 2019. **17**(1): p. 141.
7. Korostynski, M., et al., *Inflammatory Responses Induced by the Rupture of Intracranial Aneurysms Are Modulated by miRNAs*. Mol Neurobiol, 2020. **57**(2): p. 988-996.
8. Zygmunt, M., et al., *Decoding the transcriptional programs activated by psychotropic drugs in the brain*. Genes Brain Behav, 2019. **18**(4): p. e12511.
9. Zygmunt, M., et al., *Expression of alternatively spliced variants of the Dcl1 gene is regulated by psychotropic drugs*. BMC Neurosci, 2018. **19**(1): p. 55.
10. Clifton, N.E., et al., *Regulation and Function of Activity-Dependent Homer in Synaptic Plasticity*. Mol Neuropsychiatry, 2019. **5**(3): p. 147-161.
11. Wang, Y., et al., *Scaffolding protein Homer1a protects against NMDA-induced neuronal injury*. Cell Death Dis, 2015. **6**: p. e1843.
12. Piechota, M., et al., *The dissection of transcriptional modules regulated by various drugs of abuse in the mouse striatum*. Genome Biol, 2010. **11**(5): p. R48.
13. Slezak, M., et al., *Astrocytes are a neural target of morphine action via glucocorticoid receptor-dependent signaling*. Glia, 2013. **61**(4): p. 623-35.
14. Tertilt, M., et al., *Glucocorticoid receptor signaling in astrocytes is required for aversive memory formation*. Transl Psychiatry, 2018. **8**(1): p. 255.
15. Piechota, M., M. Korostynski, and R. Przewlocki, *Identification of cis-regulatory elements in the mammalian genome: the cREMaG database*. PLoS One, 2010. **5**(8): p. e12465.
16. Piechota, M., et al., *Seqinspector: position-based navigation through the ChIP-seq data landscape to identify gene expression regulators*. BMC Bioinformatics, 2016. **17**: p. 85.
17. Pera, J., et al., *Gene expression profiles in human ruptured and unruptured intracranial aneurysms: what is the role of inflammation?* Stroke, 2010. **41**(2): p. 224-31.
18. Piechota, M., et al., *Transcriptional signatures of steroid hormones in the striatal neurons and astrocytes*. BMC Neurosci, 2017. **18**(1): p. 37.
19. Berretta, S., Z. Sachs, and A.M. Graybiel, *Cortically driven Fos induction in the striatum is amplified by local dopamine D2-class receptor blockade*. Eur J Neurosci, 1999. **11**(12): p. 4309-19.
20. McEwen, B.S., et al., *The neurobiological properties of tianeptine (Stablon): from monoamine hypothesis to glutamatergic modulation*. Mol Psychiatry, 2010. **15**(3): p. 237-49.
21. Bonnet, J.J., et al., *Interactions of amineptine with the neuronal dopamine uptake system: neurochemical in vitro and in vivo studies*. J Neural Transm, 1987. **69**(3-4): p. 211-20.
22. Springer, J. and W.J. Cubala, *Tianeptine Abuse and Dependence in Psychiatric Patients: A Review of 18 Case Reports in the Literature*. J Psychoactive Drugs, 2018. **50**(3): p. 275-280.
23. Gassaway, M.M., et al., *The atypical antidepressant and neurorestorative agent tianeptine is a mu-opioid receptor agonist*. Transl Psychiatry, 2014. **4**: p. e411.
24. Rojas-Corrales, M.O., J. Gibert-Rahola, and J.A. Mico, *Tramadol induces antidepressant-type effects in mice*. Life Sci, 1998. **63**(12): p. PL175-80.
25. Duman, R.S., *Ketamine and rapid-acting antidepressants: a new era in the battle against depression and suicide*. F1000Res, 2018. **7**.

26. Clockaerts, S., et al., *The infrapatellar fat pad should be considered as an active osteoarthritic joint tissue: a narrative review*. Osteoarthritis Cartilage, 2010. **18**(7): p. 876-82.
27. Ramos, Y.F., et al., *Genes expressed in blood link osteoarthritis with apoptotic pathways*. Ann Rheum Dis, 2014. **73**(10): p. 1844-53.
28. Pera, J., et al., *Gene expression profiling of blood in ruptured intracranial aneurysms: in search of biomarkers*. J Cereb Blood Flow Metab, 2013. **33**(7): p. 1025-31.
29. Ye, Y., et al., *The Role of High Mobility Group Box 1 in Ischemic Stroke*. Front Cell Neurosci, 2019. **13**: p. 127.
30. de Oliveira Manoel, A.L. and R.L. Macdonald, *Neuroinflammation as a Target for Intervention in Subarachnoid Hemorrhage*. Front Neurol, 2018. **9**: p. 292.
31. Piechota, M., et al., *Common transcriptional effects in the mouse striatum following chronic treatment with heroin and methamphetamine*. Genes Brain Behav, 2012. **11**(4): p. 404-14.
32. Lamontagne, S.J., S.I. Melendez, and M.C. Olmstead, *Investigating dopamine and glucocorticoid systems as underlying mechanisms of anhedonia*. Psychopharmacology (Berl), 2018. **235**(11): p. 3103-3113.
33. Skupio, U., et al., *Astrocytes determine conditioned response to morphine via glucocorticoid receptor-dependent regulation of lactate release*. Neuropsychopharmacology, 2020. **45**(2): p. 404-415.
34. Pajak, A., et al., *Expression of matrix metalloproteinases and components of the endocannabinoid system in the knee joint are associated with biphasic pain progression in a rat model of osteoarthritis*. J Pain Res, 2017. **10**: p. 1973-1989.
35. Liesz, A., et al., *Functional role of regulatory lymphocytes in stroke: facts and controversies*. Stroke, 2015. **46**(5): p. 1422-30.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

Opisane powyżej osiągnięcie naukowe powstało w szerszym kontekście prowadzonych przeze mnie badań zmian ekspresji genów. Większość badań przeprowadziłem podczas pracy w Zakładzie Neurofarmakologii Molekularnej IF PAN, którym kierowali kolejno prof. Ryszard Przewłocki oraz dr hab. Jan Rodriguez Parkitna. Z mojej inicjatywy, w ramach Zakładu powstała Pracownia Genomiki, co umożliwiło przeprowadzenie pierwszych badań sekwencjonowania transkryptomów. Zainteresowanie tematem regulacji transkrypcji pozwoliło na nawiązanie kilku długotrwałych współprac naukowych oraz poszerzenia obszarów badań o kolejne układy eksperymentalne i problemy kliniczne.

W swojej pracy uczestniczyłem w profilowaniu zmian ekspresji genów obserwowanych w kilkunastu zwierzęcych modelach chorób neuropsychiatrycznych. Badania dotyczyły molekularnych korelatów rozwoju bólu chronicznego, uzależnień lekowych, zaburzeń nastroju oraz zespołu stresu pourazowego. Badania biologicznych podstaw bólu prowadziłem we współpracy z Zakładem Farmakologii Bólu IF PAN kierowanym przez prof. Barbarę Przewłocką oraz prof. Joannę Mikę. Efektem współpracy jest kilka wysoko cytowanych publikacji opisujących mechanizmy działania opioidów w zwierzęcych modelach bólu neuropatycznego. Profilowanie zmian ekspresji genów wywołanych stresem pozwoliło na odkrycie nowego mechanizmu biorącego udział w kontroli zachowań lękowych. Wspólnie z prof. Robertem Pawlakiem z Zakładu Fizjologii Komórki i Farmakologii Uniwersytetu w Leicester prowadziłem badania roli neuropsyny w kontroli odpowiedzi na stres, których wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie Nature. Brałem także udział w poszukiwaniu

genów o zmienionej aktywności w układach *in vitro*. Poszukiwałem nowych genów powiązanych z odpowiedzią na różnego rodzaju interleukiny (we współpracy z prof. Jolantą Jurą i prof. Aleksandrem Kojem z Zakładu Biochemii Komórki UJ), z neuroprotekcijnymi efektami agonistów metabotropowych receptorów glutaminianergicznymi (we współpracy z dr hab. Danutą Jantas z Zakładu Neuroendokrynologii IF PAN) oraz nad znaczeniem aktywacji szlaku mTOR w procesach plastyczności neuronalnej (we współpracy z zespołem pracującym pod kierownictwem prof. Jacka Jaworskiego w Laboratorium Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej). W każdym z eksperymentów identyfikowałem i charakteryzowałem grupy genów o zmienionych poziomach abundancji mRNA. Jestem także zaangażowany w badania molekularnych zmian zachodzących w tkankach mięśniowych poddanych różnego rodzaju wysiłkom fizycznym zarówno gryzoni jak i człowieka. Badaniami ekspresji genów w mięśniach kierują prof. Joanna Majerczak oraz prof. Jerzy Żołądź z Katedry Fizjologii i Biochemii Akademii Wychowania Fizycznego w Krakowie.

Kolejne nurty badawcze to poszukiwania genetycznego podłoża zróżnicowania odpowiedzi na podanie substancji psychoaktywnych. Przy wykorzystaniu wyselekcjonowanych szczepów gryzoni poszukiwałem zależności pomiędzy różnicami genetycznymi a m.in. preferencją do przyjmowania opioidów i alkoholu. Uzyskane wyniki pozwoliły na wskazanie listy genów, których poziom ekspresji w mózgu korelował z cechami zachowania oraz odpowiedzi lekowej. We współpracy z dr. hab. Mariuszem Sacharczukiem pracującym w Instytucie Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN badałem wpływ na fenotyp polimorfizmów występujących w genach układów endogennych opioidów u szczepów myszy wyselekcjonowanych w kierunku zróżnicowanej reakcji stresowej.

Doświadczenie zdobyte podczas profilowania ekspresji genomu w zwierzęcych modelach chorób przenieśliem do badań genetycznych podstaw cech człowieka. We współpracy z zespołem prof. Samochowca z Katedry i Kliniki Psychiatrii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego, uczestniczyłem w analizie danych uzyskanych w ramach asocjacyjnych badań predyspozycji do alkoholizmu u ludzi typu GWAS (od ang. *genome-wide association studies*). Wykorzystywałem metodę sekwencjonowania eksomu (od ang. *whole-exome sequencing*) do identyfikacji mutacji przyczynowych u chorych na dystrofię mięśniową obręczowo-kończynowej oraz rzadkich przypadkach nowotworów u dzieci. Badania zróżnicowania sekwencji genomu człowieka prowadzone są we współpracy z zespołem prof. Cezarego Żekanowskiego z Pracowni Neurogenetyki Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN. Natomiast, badania molekularnego podłoża nowotworów odbywają się we współpracy z dr. hab. Szymonem Skoczniem i zespołami klinicznymi Instytutu Pediatrii UJ CM oraz Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego w Krakowie. Równolegle, z grupą naukowców kierowaną przez prof. Ciężczyka pracującego w Akademii Wychowania Fizycznego w Gdańsku prowadzimy poszukiwania wariantów genetycznych wyróżniających wybitnych sportowców.

Moja aktywność międzynarodowa dotyczyła zarówno realizacji wielośrodkowych projektów badawczych jak i bezpośredniej współpracy naukowej. Jako główny wykonawca brałem udział w realizacji dużych, wewnątrzspółnotowych projektów badawczych, w ramach

których poszukiwałem genów powiązanych z rozwojem uzależnień lekowych oraz bólu neuropatycznego. W latach 2009-2013 byłem zaangażowany w organizację europejskiej sieci współpracy pn. SYSGENET: European systems genetics network for the study of complex genetic human diseases using mouse genetic reference population (COST Action BM0901). W ramach działania tej sieci omawiane i organizowane były możliwości wykorzystania zwierzęcych modeli wielogenowych chorób człowieka. Duże doświadczenie w prowadzeniu badań transkrypcyjnych efektów leków psychotropowych dało możliwość nawiązania współpracy z zagranicznymi zespołami naukowców. Wykorzystując własnego pomysłu metody i narzędzia we współpracy międzynarodowej badałem efekty transkrypcyjne psychostymulantów (wraz z naukowcami z *Department of Molecular Biology of the Cell I, German Cancer Research Center Heidelberg*, Niemcy), leków przeciwdepresyjnych (wraz z naukowcami z *Life and Health Sciences Research Institute, University of Minho, Braga*, Portugalia) oraz kanabinoidów (wraz z naukowcami z *Endocannabinoid Research Group, Istituto di Chimica Biomolecolare, CNR, Pozzuoli*, Włochy).

Opisana powyżej działalność naukowa doprowadziła do publikacji wyników w postaci kilkudziesięciu prac afiliowanych przy kilkunastu jednostkach naukowych zarówno krajowych jak i zagranicznych. Dodatkowo, moja aktywność naukowa jest realizowana w więcej niż jednej jednostce, w ramach działalności badawczo-rozwojowej firmy Intelliseq pracuje nad opracowaniem nowych algorytmów i narzędzi umożliwiających analizę i interpretację różnic w sekwencji genomu człowieka, potwierdzeniem czego są publikacje uzyskanych wyników.

Doświadczenie międzynarodowe zdobywałem również poprzez staże badawcze w jednostkach naukowych o światowej renomie. W ramach współpracy naukowej przez kilka miesięcy przebywałem w ośrodku badawczym firmy deCODE znajdującym się w Reykjavíku. Jest to wiodący ośrodek zajmujący się badaniami genetyki człowieka w skali całego genomu. Podczas pobytu zapoznałem się z najnowszymi podejściami i technikami analizy dużych zbiorów danych genetycznych. Wyjazd ten był powiązany z realizacją wspólnego projektu badawczego finansowanego ze środków Komisji Europejskiej. Miałem też okazję odbyć dwumiesięczny staż naukowo-badawczy w Instytucie Psychiatrii Max Planck w Monachium. W tym okresie poszerzyłem swoją wiedzę z zakresu molekularnego podłoża chorób psychiatrycznych, genetycznych badań genetyczne depresji oraz farmakogenetyki leków przeciwdepresyjnych.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

a) Opracowania autorskie wykładów i realizacja ćwiczeń z zakresu:

- Statystyka w medycynie - zajęcia dla studentów III roku biomatematyki, Instytut Matematyki na Wydziale Matematyki i Informatyki UJ, w latach 2013 i 2014;
- Genomika obliczeniowa i analiza danych biomedycznych - zajęcia dla studentów matematyki (studia II stopnia, 6 pkt. ECTS), Instytut Matematyki na Wydziale Matematyki i Informatyki UJ, w latach 2017/18: wykłady - 30 godzin, ćwiczenia - 30 godzin.

b) Promotor pomocniczy prac doktorskich:

- dr Klaudia Szklarczyk-Smolana, tytuł „Neurobiological basis of coping strategies in mice underlying diverse susceptibility to stress” (praca w języku angielskim), instytucja nadająca stopień - Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja PAN, Zakład Neurofarmakologii Molekularnej, stopień doktora został nadany w dniu 06/12/2016 roku.
- dr Magdalena Zygmunt, tytuł „Wpływ leków psychotropowych na ekspresję alternatywnych transkryptów w mózgu”, instytucja nadająca stopień - Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja PAN, Zakład Neurofarmakologii Molekularnej, stopień doktora został nadany w dniu 18/06/2019 roku.
- mgr Kinga Mudlaff, tytuł „Wpływ zmodyfikowanej diety matki na fenotyp potomstwa: korelacje behawioralne i molekularne”, instytucja prowadząca - Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja PAN, Zakład Farmakologii Uzależnień, otwarty przewód doktorski.

c) Prowadzenie praktyk i staży dla studentów:

- opieka nad studentami kierunku matematyka odbywającymi praktyki oraz staże w Zakładzie Neurofarmakologii Molekularnej, Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN, praca z zakresu analizy danych genetycznych: Joanna Ficek (2014), Kamil Antończak (2015), Dżesika Hoinkis (2016), Kacper Łasocha (2018), Jacek Hajto (2018).

d) Nagrody i wyróżnienia.

- Drugie wyróżnienie przyznane przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne w konkursie na nagrodę im. Parnasa w roku 2008 za pracę Korostynski M, Piechota M, Kaminska D, Solecki W, Przewlocki R. Morphine effects on striatal transcriptome in mice. *Genome Biol.* 2007;8(6):R128
- Nagroda Dyrektora IF PAN w roku 2008 za wyróżniającą się pracę oryginalną opublikowaną w roku 2007: Korostynski M, Piechota M, Kaminska D, Solecki W, Przewlocki R. Morphine effects on striatal transcriptome in mice. *Genome Biol.* 2007;8(6):R128
- Wyróżnienie pn. Scientific Highlight of the Year 2008 pracy: Mika J, Korostynski M, Kaminska D, Wawrzczak-Bargiela A, Osikowicz M, Makuch W, Przewlocki R, Przewlocka B. pt. „Interleukin-1 alpha has antiallodynic and antihyperalgesic activities in a rat neuropathic pain model” *Pain* 138, (2008) 587-597.
- Nagroda im. Konorskiego w roku 2009 za pracę Obara I, Parkitna JR, Korostynski M, Makuch W, Kaminska D, Przewlocka B, Przewlocki R. Local peripheral opioid effects and expression of opioid genes in the spinal cord and dorsal root ganglia in neuropathic and inflammatory pain. *Pain.* 2009 Feb;141(3):283-91.
- Nagroda za najlepszą prezentację pn. „Poster Award” na konferencji European Opioid Conference, Krakow, 2011.

- Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla wybitnych młodych naukowców w roku 2011.
- Zespołowa nagroda naukowa przyznana w 2018 roku przez Jego Magnificencje Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego za pracę dotyczącą wyjaśnienia niespecyficznego efektu naltreksonu prowadzącego do wzrostu spożycia i preferencji alkoholu w stanie nadaktywności układu opioidowego (wraz z dr Anną Leśniak, dr hab. Magdaleną Bujalską-Zadrozny, dr. hab. Mariuszem Sacharczukiem oraz mgr. Piotrem Poznańskim).
- Nagroda IV Międzynarodowego Forum Medycyny Personalizowanej (5 marca 2019), pierwsze miejsce w konkursie na pracę naukową za publikację pt. "Ethanol consumption following mild traumatic brain injury is related to the blood-brain barrier permeability". Autorstwa P. Poznański, A. Leśniak, M. Korostyński, M. Sacharczuk w *Addiction Biology*, 2018.

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

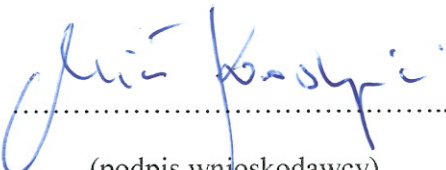
Wszystkie zbiory danych wykorzystane w przedstawionym osiągnięciu naukowym zostały upublicznione.

Zestawy surowych danych mikromacierzowych są zdeponowane w bazie GEO (ang. *Gene Expression Omnibus*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>):

- Transcriptional networks regulated by drugs of abuse in mouse striatum (GSE15774),
- Psychotropic drug-induced gene expression alterations in mouse striatum (GSE48955);
- Molecular profile of ketamine in comparison to memantine and phencyclidine and other psychotropic drugs (GSE73800);
- Gene expression profiling in knee cartilage in a rat model of osteoarthritis (GSE103416);
- Blood transcriptional signatures for disease progression in a rat model of osteoarthritis (GSE99021);
- Gene expression profiling of blood in ruptured intracranial aneurysms (GSE36791).

Zestawy surowych danych NGS są zdeponowane w bazie SRA (ang. *Sequence Read Archive*):

- *Homo sapiens* Transcriptome or Gene expression: RNA-seq of *Homo sapiens* - aneurysm rupture (SRP150595).


.....
(podpis wnioskodawcy)