

AUTOREFERAT

Dr n. przyr. Magdalena M. Brzózka

Pracę dedykuję wszystkim zwierzętom laboratoryjnym.

Spis treści

1. Dane personalne	3
2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	4
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt 2 Ustawy	5
4.1 Tytuły osiągnięć naukowych.....	5
4.1.1 Prace oryginalne.....	5
4.1.2 Prace przeglądowe powiązane tematycznie z osiągnięciem naukowym	7
4.1.3 Publikacje niepowiązane z tematem przewodnim	7
4.2 Omówienie celu naukowego prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania	9
4.2.1 Wstęp.....	9
4.2.2 Cel badań	11
4.2.3 Przegląd osiągnięć naukowych.....	12
4.2.3.1. Osiągnięcia w ramach cyklu habilitacyjnego.....	13
4.2.3.2. Osiągnięcia poza cyklem habilitacyjnym.....	24
4.3 Podsumowanie i znaczenie badań.....	31
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.....	33
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę	36
7. Inne informacje, dotyczące kariery zawodowej wnioskodawcy.....	38
8. Piśmiennictwo	40

1. Dane personalne

Imię i nazwisko: Magdalena Marta Brzózka

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

- **2015 Master of Business Administration (MBA)** – FOM: Fachhochschule für Oekonomie und Management (*University of Applied Sciences*), Monachium, Niemcy

- **2008 Doktor Nauk Przyrodniczych** (tytuł niemiecki: dr. rer. nat., *doctor rerum naturalium*, ekwiwalent PhD), Georg-August-Universität Göttingen, Niemcy

Tytuł rozprawy doktorskiej: *Rola czynnika transkrypcyjnego bHLH ME2 (Tcf4) w procesach uczenia się i zapamiętywania u myszy (Untersuchungen zur Funktion des basischen Helix-Loop-Helix (bHLH)-Transkriptionsfaktors ME2(Tcf4) bei Lern- und Gedächtnisprozessen in der Maus)*

Ocena: *magna cum laude*. Data obrony: 31.10.2008. Recenzenci: Prof. Ralf Heinrich, Prof. Klaus-Armin Nave, Promotor: Prof. Moritz Rossner.

Badania naukowe w ramach pracy doktorskiej prowadziłam w Instytucie Maxa Plancka Medycyny Eksperymentalnej w Getyndze, Niemcy (Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin) w latach 2004 – 2008.

- **2003 Biolog Dyplomowany** (tytuł niemiecki: Diplombiologin), III. Zoologisches Institut, Entwicklungsbiologie (Zakład Biologii Rozwoju), Uniwersytet Georga Augusta w Getyndze (Georg-August-Universität Göttingen), Niemcy

Ocena: bardzo dobry

Tytuł pracy dyplomowej: *Charakterystyka funkcji białka Outer dense fiber 2 (ODF2), jego partnerów i uzyskanie linii komórkowych pozbawionych ODF2*

Opiekunka: Prof. Sigrid Hoyer-Fender

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- **2011-2016 Kierownik Pracowni Zachowania Myszy (*Mouse Behavioral Unit*)** w Klinice Psychiatrii i Psychoterapii Uniwersytetu Ludwika Maksymiliana w Monachium, Niemcy
Ludwigs-Maximilians-Universität München, Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie
- **2011-2012 Pracownik naukowy /Post-Doc (*wissenschaftliche Mitarbeiterin*)**, Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Göttingen, Niemcy
- **2008-2011 Pracownik naukowy /Post-Doc (*wissenschaftliche Mitarbeiterin*)** – równoległe prowadziłam projekty badawcze w dwóch instytucjach:
Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Georg-August-Universität Göttingen, Niemcy
Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Göttingen, Niemcy
- **2004- 2008 Doktorantka**, Instytut Maxa Plancka Medycyny Eksperymentalnej, Zakład Neurogenetyki, Getynga, Niemcy (Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Abteilung Neurogenetik, Göttingen)
- **2004-2007 Stypendystka** Graduiertenkolleg 632 ufundowane przez Niemiecką Wspólnotę Badawczą (DFG, Deutsche Forschungsgemeinschaft) *Neuroplasticity: from molecules to systems*, Koordynator programu: Prof. Walter Paulus
- **01.2004-04.2004 Asystentka naukowa** Instytut Medycyny Eksperymentalnej Maxa Plancka w Getyndze, Zakład Neurogenetyki, Dyrektor: Prof. Klaus-Armin Nave
- **11.2003-06.2004 Asystentka naukowa** Klinika Uniwersytetu Georga Augusta w Getyndze, Oddział Kardiologii i Pulmonologii Dyrektor: Prof. G. Hasenfuß, Göttingen, Niemcy

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

Podstawą do złożenia przeze mnie wniosku o rozpoczęcie postępowania habilitacyjnego zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2b Ustawy jest cykl 7 artykułów naukowych poświęconych tematowi „*Analiza czynników genetycznych i środowiskowych przyczyniających się do rozwoju chorób psychiatrycznych w modelach zwierzęcych*”. Impulsem do prowadzenia badań w tym obszarze była publikacja zwięzająca moją pracę doktorską *Cognitive and sensorimotor impairments in transgenic mice overexpressing the schizophrenia susceptibility gene Tcf4 in the brain*, opublikowana w 2010 w *Biological Psychiatry* Jul 1;68(1):33-40 (IF 8,674).

4.1 Tytuły osiągnięć naukowych

Analiza bibliometryczna na dzień 10.05.2022 wykazała, że łączny *impact factor* (IF) wszystkich moich prac oryginalnych wynosi 71,275, suma punktów MNiSW 722. Łączny IF moich wszystkich prac (łącznie z pracami przeglądowymi) wynosi 90,397, suma punktów MNiSW 807. Moje prace były cytowane wg bazy Web of Science 351, a wg bazy Scopus 378 razy (bez autocytowań odpowiednio: 314 i 341 razy). Mój indeks Hirscha wynosi 8 wg Web of Science i 9 wg Scopus. (ORCID 0000-0001-8633-2855).

4.1.1 Prace oryginalne

#, równy udział współautorów; *, autorka korespondencyjna; liczba cytowań wg bazy Scopus na dzień 10.05.2022; pierwsza wartość: wszystkie cytowania; wartość w nawiasie: bez autocytowań.

Do osiągnięcia zaliczam pozycje 2-8; pozycja 1 to publikacja wyników mojej pracy doktorskiej.

1. **Brzózka MM**, Radyushkin K, Wichert SP, Ehrenreich H, Rossner MJ (2010). *Cognitive and sensorimotor impairments in transgenic mice overexpressing the schizophrenia susceptibility gene Tcf4 in the brain*. *Biological Psychiatry* Jul 1;68(1):33-40.
IF 8,674
MEiN 32
cytowania = 92 (80)
2. **Brzózka MM** and Rossner MJ (2013). *Deficits in trace fear memory in a mouse model of the schizophrenia risk gene TCF4*. *Behavioral Brain Research* Jan 15;237:348-56.

IF 3,391**MEiN 30**

cytowania = 27 (21)

3. **Brzózka MM**, Rossner MJ, De Hoz L. (2015) *Tcf4 transgenic female mice display impaired flexibility learning measured with latent inhibition*. European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience 2015 Sept 24.

IF 3,569**MEiN 35**

cytowania = 5 (3)

4. **Brzózka MM***, Unterbarnscheidt T, Schwab MH, Rossner MJ*. (2016) *OSO paradigm – a rapid behavioral screening method for acute psychosocial stress reactivity in mice*. Neuroscience, Feb 9;314:1-11.

IF= 3,277**MEiN = 25**

cytowania = 5 (4) * autor korespondencyjny

5. Badowska DM[#], **Brzózka MM[#]**, Kannaiyan N, Thomas C, Dibaj P, Chowdhury A, Steffens H, Turck CW, Falkai P, Schmitt A, Papiol S, Scheuss V, Willig KI, Martins-de-Souza D, Rhee JS, Malzahn D, Rossner MJ. (2020) *Modulation of cognition and neuronal plasticity in gain- and loss-of-function mouse models of the schizophrenia risk gene Tcf4*. Transl Psychiatry. 2020 Oct 9;10(1):343.

IF 6,222**MEiN 100**cytowania = 4 (4), [#]równy udział współautorów

6. **Brzózka MM**, Havemann-Reinecke U, Wichert SP, Falkai P, Rossner MJ. (2015) *Molecular signatures of psychosocial stress and cognition are modulated by chronic lithium treatment*. Schizophrenia Bulletin 2015 Dec 28. pii: sbv194

IF 7,757**MEiN -**

cytowania = 9 (8)

7. **Brzózka MM***, Fischer A, Falkai P, Havemann-Reinecke U (2011). *Acute treatment with cannabinoid receptor (CB1) agonist WIN55212-2 improves prepulse inhibition in psychosocially stressed mice*. Behavioral Brain Research Apr 15;218(2): 280-7

IF 3,417**MEiN 30**

cytowania = 22 (19) * autor korespondencyjny

8. Bouter Y, **Brzózka MM**, Rygula R, Pahlisch F, Leweke FM, Havemann-Reinecke U, Rohleder C (2020). *Chronic Psychosocial Stress Causes Increased Anxiety-Like Behavior and Alters Endocannabinoid Levels in the Brain of C57Bl/6J Mice*. Cannabis Cannabinoid Res. 2020 Feb 27;5(1):51-61.

IF 5,800

MEiN 20

cytowania = 3 (3)

Łącznie publikacje oryginalne z cyklu (pozycje 2-8): **IF 33,433 MEiN 240****4.1.2 Prace przeglądowe powiązane tematycznie z osiągnięciem naukowym**

1. **Brzózka MM**, Falkai P, Havemann-Reinecke U (2009). *Für Schizophrenie braucht man Drei. (Do schizofrenii potrzeba trojga)* Suchtmedizin in Forschung und Praxis. 11(3):98-103.

IF 0**MEiN 0**

cytowania = 5 (5) Artykuł w języku niemieckim.

2. Quednow BB, **Brzózka MM**, Rossner MJ (2014) *Transcription factor 4 (Tcf4) and schizophrenia: integrating the animal and the human perspective*. Review, Cellular and Molecular Life Sciences 7 Aug 2014.

IF 5,808**MEiN 40**

cytowania = 42 (38)

3. Falkai P, Rossner MJ, Schulze TG, Hasan A, **Brzózka MM**, Malchow B, Honer WG, Schmitt A. (2015) *Kraepelin revisited: Schizophrenia from degeneration to failed regeneration*. Molecular Psychiatry 2015 Mar 31.

IF 13,314**MEiN 45**

cytowania = 54 (53)

Łącznie publikacje przeglądowe powiązane tematycznie z osiągnięciem naukowym:

IF 19,122 MEiN 85**4.1.3 Publikacje niepowiązane z tematem przewodnim**

1. Badowska DM, **Brzózka MM**, Chowdhury A, Malzahn D, Rossner MJ (2014) *Data calibration and reduction allows to visualize behavioural profiles of psychosocial influences in mice*. European Archives Of Psychiatry And Clinical Neuroscience, 2014 Sept 19.

IF 4,113**MEiN 30**

cytowania = 5 (4)

2. Baier PC[#], **Brzózka MM[#]**, Shahmoradi A, Reinecke L, Kroos C, Wichert SP, Oster H, Wehr MC, Taneja R, Hirrlinger J, Rossner MJ. (2014) *Mice lacking the circadian*

modulators Sharp1 and Sharp2 display altered sleep and mixed state endophenotypes of psychiatric disorders. PLOS one. 2014 Oct 23;9(10).

IF 3,234

MEiN 40

cytowania = 19 (18) #równy udział współautorów

3. Agarwal A, Zhang M, Trembak-Duff I, Unterbarnscheidt T, Radyushkin K, Dibaj P, Martins De Souza D, Boretius S, **Brzózka MM**, Steffens H, Berning S, Teng Z, Gummert M, Tantra M, Guest PC, Willig Ki, Frahm J, Hell SW, Bahn S, Rossner MJ, Nave K-A, Ehrenreich H, Zhang W*, and Schwab MH* (2014). *Dysregulated expression of Neuregulin-1 by cortical pyramidal neurons disrupts synaptic plasticity.* Cell Reports 21 Aug 2014 8(4):1130-45

IF 8,358

MEiN 35

cytowania = 64 (60)

4. Wehr MC#, Hinrichs W#, **Brzózka MM**, Unterbarnscheidt T, Herholt A, Wintgens JP, Papiol S, Soto-Bernardini MC, Kravchenko M, Zhang M, Nave KA, Wichert SP, Falkai P, Zhang W, Schwab MH, Rossner MJ (2017). *Spironolactone is an antagonist of NRG1-ERBB4 signaling and schizophrenia-relevant endophenotypes in mice.* EMBO Mol Med. 2017 Oct;9(10):1448-1462. #równy udział współautorów

IF 10,293

MEiN 45

cytowania = 16 (15)

5. Götze T, Soto-Bernardini MC, Zhang M, Mießner H, Linhoff L, **Brzózka MM**, Velanac V, Dullin C, Ramos-Gomes F, Peng M, Hussein H, Schifferdecker E, Fledrich R, Sereda MW, Willig K, Alves F, Rossner MJ, Nave KA, Zhang W, Schwab MH. (2021). *Hyperactivity is a Core Endophenotype of Elevated Neuregulin-1 Signaling in Embryonic Glutamatergic Networks.* Schizophr Bull. 2021 Aug 21;47(5):1409-1420.

IF 9,306

MEiN 200

cytowania = 0 (0)

6. Sarzyńska-Długosz I, Szczepańska-Szerej A, Drużdż A, Łukomski T, Ochudło S, Fabian A, Sobolewski P, Mariańska K, Maciejewska J, Mulek E, Niedzielska A, Raymond R, **Brzózka MM***, Jessa-Jabłońska M. *Real-world effectiveness of abobotulinumtoxinA (Dysport®) in adults with upper limb spasticity in routine clinical practice: an observational study.* Neurol Neurochir Pol. 2020;54(1):90-99.

IF 1,621,

MEiN 100

cytowania = 6 (6), *autorka korespondencyjna

Łącznie publikacje oryginalne niepowiązane tematycznie z osiągnięciem naukowym:

IF 36,925 MEiN 450

4.2 Omówienie celu naukowego prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

4.2.1 Wstęp

Schizofrenia (SZ) jest poważną chorobą psychiatryczną, ujawniającą się klinicznie u młodych dorosłych, z ryzykiem wystąpienia ok. 1% w ciągu życia i charakteryzująca się występowaniem trzech grup objawów o różnym czasie i intensywności trwania: (i) objawów wytwórczych (*positive symptoms*), jak urojenia, halucynacje, (ii) objawów deficytowych (*negative symptoms*), jak apatia, otępienie odczuwania i (iii) deficyty poznawcze (*cognitive impairment*) polegające na zaburzeniach uwagi i pamięci. Hipotezy oraz wiedzę naukową, powiązaną z etiologią SZ, opisałam w trzech artykułach przeglądowych: w artykule *Für Schizophrenie braucht man Drei. (Do schizofrenii potrzeba trojga)* (Brzózka *et al.*, 2009), w pracy Quednow *et al.* (2014) *Transcription factor 4 (Tcf4) and schizophrenia: integrating the animal and the human perspective* oraz w artykule Falkai *et al.* (2015) *Kraepelin revisited: Schizophrenia from degeneration to failed regeneration*. Prace te powstały we współpracy z uczonymi związanymi z Kliniką Psychiatrii w Getyndze i Kliniką Psychiatrii w Monachium, gdzie pracowałam odpowiednio w latach 2008-2013 i 2013–2016.

To właśnie w Klinice Psychiatrii w Monachium około stu lat wcześniej swoje badania prowadził Emil Kraepelin, twórca podstaw wiedzy o SZ. Rozpoznana i nazwana przez niego jako *Dementia praecox*, SZ wciąż pozostaje ciężką chorobą psychiczną, dotykającą głównie młodych dorosłych, prowadzącą do niesprawności u co najmniej połowy pacjentów. Odpowiedź chorych na SZ na farmakoterapię jest tylko częściowa bądź prawie żadna, szczególnie objawy deficytowe SZ są wyjątkowo trudne w terapii. SZ jest powiązana z różnym stopniem zaburzeniami funkcji poznawczych, szczególnie w obszarze pamięci werbalnej i operacyjnej; w wyniku których pacjenci mogą stracić zatrudnienie oraz zdolność tworzenia stabilnych relacji i stać się niezdolnymi do samodzielnego życia. Obserwacje zaburzeń poznawczych u pacjentów wywołały u Kraepelina podejrzenia, że SZ jest młodzieńczą formą demencji, spowodowaną procesami degeneracyjnymi zachodzącymi w mózgu. Przypuszczenia Kraepelina potwierdziły prawie 100 lat później badania GWAS (*genome-wide association studies*) identyfikujące ponad sto genów powiązanych ze ścieżkami sygnałowymi kluczowymi dla metabolizmu dopaminy, immunomodulacji, ścieżek sygnałowych wapnia i dla plastyczności neuronalnej. Udowodniono, że do rozwoju SZ (a także nierzadko innych chorób psychicznych), oprócz czynników genetycznych mogą przyczyniać się także czynniki

środowiskowe, a ich synergia jest określana jako *gene × environment interaction* (G×E), czyli interakcja skłonności uwarunkowanych genetycznie ze stresem środowiskowym (takim jak np. traumatyczne przeżycie – czy to jednorazowe jak np. silna jednokrotna trauma, czy to o charakterze przewlekłym, jak mobbing w szkole oraz przyjmowanie jako używki *cannabis* w krytycznym dla rozwoju mózgu okresie życia). Wystąpienie silnego stresora w życiu (określanego jako tzw. *second hit*), który padnie na podatne podłoże genetyczne, może doprowadzić do rozwinięcia się choroby psychiatrycznej i jej manifestacji klinicznej.

W poszukiwaniu odpowiedzi na pytania, które geny są zaangażowane w rozwój SZ i w jaki sposób można zapobiec rozwojowi choroby lub odwrócić bądź spowolnić jej bieg, naukowcy odnoszą się do modeli zwierzęcych. Modele zwierzęce są niezbędnym elementem badań funkcji poszczególnych genów powiązanych z chorobami psychicznymi w zachowaniu czy procesach kognitywnych, a także ich wpływie na poziomie strukturalnym, molekularnym czy transmisji synaptycznej (Ryc. 1), nawet jeśli nie jesteśmy w stanie modelować pełnego spektrum objawów SZ, lecz jej poszczególne symptomy.

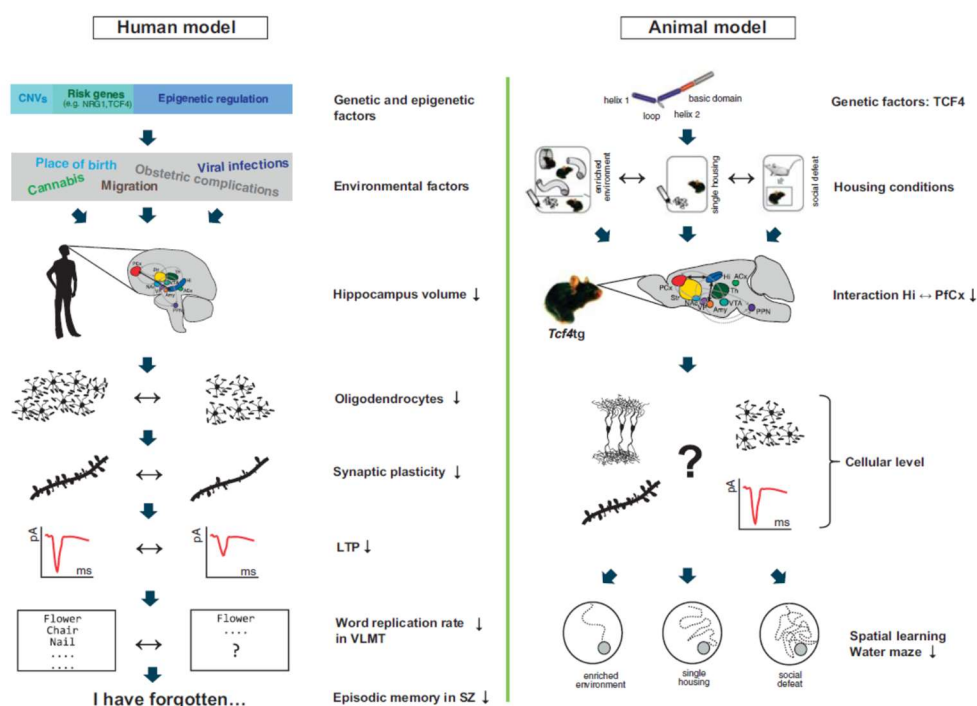


Figure 2. From genetic to environmental risk factors: parallels in humans and animal models. CNV, copy number variation; Hi, hippocampus; LTP, long-term potentiation; PFCx, prefrontal cortex; SZ, schizophrenia; TCF4, transcription factor 4; VLMT, verbal learning and memory test.

Ryc. 1 Od czynników genetycznych przez środowiskowe: podobieństwa u człowieka i w modelu zwierzęcym. Grafika mojego autorstwa opracowana we współpracy z Prof. Peterem Falkaiem, opublikowana w pracy przeglądowej Falkai *et al.* (2015) w *Molecular Psychiatry*.

Podczas pracy naukowej uwagę skupiałam głównie na dwóch modelach myszy nadekspresyjujących geny silnie asocjowane z rozwojem SZ: *Tcf4* i *Nrg1*, których związek z tą

chorobą został wykazany w 2009 roku i opublikowany w *Nature: Common variants conferring risk of schizophrenia* autorów Stefansson *et al.* Jako jeden z najważniejszych genów-kandydatów SZ w GWAS został zidentyfikowany czynnik transkrypcyjny *TCF4* na chromosomie 18q21.2. Kluczowy wydał się intron 4, którego zmiany w ekspresji /polimorfizmy występują u osób ze schizofrenią (SZ). Tcf4 należy do białek zawierających domenę bHLH (*basic helix-loop-helix*) i odgrywa rolę w fazie rozwoju embrionalnego centralnego układu nerwowego. Haploinsuficjenca genu *TCF4* u ludzi powoduje zespół Pitta-Hopkinsa, chorobę neurorozwojową, charakteryzującą się ciężkim niedorozwojem umysłowym i dysmorfia twarzą. Drugim genem opisanym w publikacji Stefansson *et al.* jest *Nrg1* z chromosomu 8, którego produkt, Neuregulina 1, jest zaangażowany w rozwój OUN, plastyczności synaps, i między innymi aktywuje receptory NMDA (N-metylo-D-asparaginowe), stanowiące kanały jonowe w neuronach i ścieżki sygnałowe ERBB4.

4.2.2 Cel badań

Celem moich badań była analiza czynników genetycznych i środowiskowych przyczyniających się do rozwoju chorób psychiatrycznych z zastosowaniem modeli zwierzęcych. Poza czynnikami genetycznymi Tcf4 (którego to analizy tworzą cykl dzieła) i Nrg1 skoncentrowałam się na badaniu wpływu czynników środowiskowych, takich jak:

- (i) stresu psychosocjalnego - jako jednego z kluczowych czynników przyczyniających się do rozwoju chorób psychicznych, także w połączeniu z farmakoterapią (agonistą receptorów CB1) oraz
- (ii) potencjału środowiska wzbogaconego (ang. *enriched environment*), jako swoistej terapii behawioralnej, potencjalnie zapobiegającej *a priori* lub/i niwelującej szkodliwy wpływ niekorzystnego uwarunkowania genetycznego (nadekspresji Tcf4)

na zachowanie i zdolności poznawcze, zmiany anatomiczne i na poziomie komórkowym w OUN oraz na profil ekspresji genów w OUN u myszy.

Nadrzędnym, długofalowym celem moich badań było stworzenie przedklinicznych modeli chorób psychiatrycznych, które znajdą zastosowanie jako cenne narzędzie pod kątem testowania nowych cząsteczek lub istniejących już leków, mogących zmniejszyć objawy

SZ lub im zapobiec i poprawić funkcjonowanie pacjentów psychiatrycznych w życiu codziennym.

4.2.3 Przegląd osiągnięć naukowych

Publikacja 1

Cognitive and sensorimotor impairments in transgenic mice overexpressing the schizophrenia susceptibility gene Tcf4 in the brain

Pierwsza publikacja, będąca zwieńczeniem mojej pracy doktorskiej p.t. „Rola czynnika transkrypcyjnego bHLH ME2 (Tcf4) w procesach uczenia się i zapamiętywania u myszy” (*Untersuchungen zur Funktion des basischen Helix-Loop-Helix (bHLH)-Transkriptionsfaktors ME2(Tcf4) bei Lern- und Gedächtnisprozessen in der Maus*, 2008, monografia: <https://ediss.uni-goettingen.de/handle/11858/00-1735-0000-0006-AD69-F>), to opublikowana na łamach *Biological Psychiatry* praca autorów Brzózka *et al.* (2010) zatytułowana ***Cognitive and sensorimotor impairments in transgenic mice overexpressing the schizophrenia susceptibility gene Tcf4 in the brain***. Stała się ona punktem wyjścia do dalszych badań, tworzących cykl dzieła (publikacje 2-8, zob. 4.2.3.1), którym istotny zwrot w kierunku nadała praca Stefansson *et al.* (2009) *Common variants conferring risk of schizophrenia* pokazująca w badaniach GWAS znamienne powiązanie Tcf4 ze schizofrenią. Wyniki Stefanssona i współautorów stanowiły dla mnie inspirację, aby myszy transgeniczne z nadekspresją Tcf4 (Tcf4tg) w obszarach mózgu odpowiedzialnych za uczenie się i zapamiętywanie (hipokamp, kora, kora przedczołowa) poddać wnikliwej analizie behawioralnej pod kątem fenotypu charakteryzującego SZ, z zastosowaniem testów o wysokiej wartości translacyjnej pomiędzy człowiekiem a modelem zwierzęcym. Podobnie zajęłam się także innym modelem genetycznym SZ Nrg1tg i czynnikami środowiskowymi przyczyniającymi się do rozwoju SZ.

Funkcje Tcf4 w dorosłym mózgu (ośrodkowym układzie nerwowym, OUN) nie były przed moją publikacją z 2010 roku poznane. Jako czynnik transkrypcyjny, Tcf4 (ME2) należy do rodziny E-protein, biorących udział w rozwoju układu nerwowego. Wcześniej podejrzewano istotną rolę również w dojrzałym OUN. Myszy *Tcf4 null* umierają w okresie embrionalnym, a u ludzi z haploinsuficencją *TCF4* dochodzi do ciężkiego niedorozwoju umysłowego i innych zaburzeń (Zespół Pitta-Hopkinsa) (zob. Quednow *et al.*, 2014). W celu

zbadania potencjalnej roli w pełni ukształtowanym OUN, stworzyliśmy linię transgeniczną myszy *Tcf4tg* z lekką (o 30% wyższą, niż w dzikim genotypie) postnatalną nadekspresją *Tcf4*. Użycie promotora *Thy1* gwarantowało nadekspresję *Tcf4* dopiero po zakończeniu etapu życia płodowego, aby uniknąć potencjalnych wczesnorozwojowych zaburzeń OUN. Myszy *Tcf4tg* zostały poddane molekularnej, histologicznej i behawioralnej analizie. Mutanty *Tcf4tg* wykazały silne deficyty w pamięci kontekstualnej i *cued fear memory* oraz zaburzenia w bramkowaniu sensomotorycznym (*sensorimotor gating*). Zaburzenia w hamowaniu przed sygnałowym PPI (*prepulse inhibition*) są uznawane jako wysoko zwalidowany parametr, obecny w chorobach psychiatrycznych, w tym w SZ. Ponadto wykazaliśmy w pracy, że *Tcf4* interakuje *in vivo* z innymi neurogennymi czynnikami transkrypcyjnymi, jak NEUROD i NDRF i że wykazują one amplitudę ekspresji w hipokampie, zależną od rytmu dobowego.

Podsumowując – udowodniliśmy, że *Tcf4* współdziała z innymi czynnikami transkrypcyjnymi w kontekście wyższych procesów neuronalnych, oraz że lekka deregulacja *Tcf4* w mózgu interferuje z funkcjami poznawczymi i może mieć wpływ na procesy regulowane okołodobowo *in vivo*. Wyniki tej pracy były pierwszymi opublikowanymi obserwacjami, opisującymi fizjologiczne funkcje TCF4 w ukształtowanym już OUN i jego potencjalnym udziale w zaburzeniach psychiatrycznych.

4.2.3.1. Osiągnięcia w ramach cyklu habilitacyjnego

W badaniach prowadzonych po doktoracie postanowiłam w pierwszej kolejności zbadać głębiej funkcje poznawcze w modelu *Tcf4tg* poddając ten model eksperymentom behawioralnym, badającym bardziej złożone procesy, niż sama klasyczna pamięć kondycjonowana na wzór kondycjonowania Pawłowa, takie jak uwaga (*attention*), pamięć operacyjna (*working memory*) oraz zdolność antycypacji (*anticipation*). Procesy te wymagają prawidłowych funkcji hipokampu i kory przedczołowej. Rezultatem tych badań są dwie prace: opublikowana na łamach *Behavioral Brain Research* badająca tzw. śladowe warunkowanie strachem (Publikacja 2) oraz praca w *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, badająca fenomen utajonego hamowania (*latent inhibition*) (Publikacja 3).

*Publikacja 2****Deficits in trace fear memory in a mouse model of the schizophrenia risk gene TCF4***

W tej pracy poddałam kohortę Tcf4tg tzw. *trace fear conditioning* – śladowemu warunkowaniu strachem, w którym prezentacja bodźca warunkowego jest odseparowana od bodźca bezwarunkowego interwałem czasowym. Prawidłowa ekspresja śladowego warunkowania strachem wymaga wysokiej uwagi i jest zależna – oprócz hipokampa – także od kory przedniego zakrętu obręczy (*anterior cingulate cortex, ACC*). Wykazałam, że myszy Tcf4tg wykazują deficyty w krótkotrwałej i długotrwałej pamięci *trace fear* i mają obniżoną zdolność przewidywania awersyjnych, wcześniej kondycjonowanych bodźców. Aby sprawdzić, czy ta dysfunkcja jest powiązana z potencjalnie zaburzoną ekspresją jednego z kluczowych dla tworzenia pamięci genu *c-Fos*, markera aktywności neuronalnej (tzw. *immediate early gene, EAG*) w ACC, zmierzyłam poziom ekspresji *c-Fos* mRNA w ACC bezpośrednio po kondycjonowaniu i po ekspozycji na bodziec wywołujący kondycjonowane wspomnienie. Udowodniłam, że zaobserwowana przeze mnie dysfunkcja w śladowym warunkowaniu strachem, jest równocześnie powiązana ze zmniejszoną ekspresją *c-Fos* w ACC u Tcf4tg myszy, sugerując niższą aktywność neuronalną w kluczowych dla tego paradygmatu regionach OUN.

Podsumowując, dane wykazały, że deficyty kognitywne obserwowane wcześniej u myszy Tcf4tg (Brzózka *et al.*, 2010) i w tej pracy (Brzózka *et al.*, 2013), mogą opierać się na zaburzeniach uwagi (*attention*), poświadczone obniżoną aktywnością neuronów bezpośrednio po procesie nauki (*data acquisition*). Dodatkowym rezultatem badań w tym modelu zwierzęcym jest wykazanie obniżonej zdolności antycypacji wcześniej wyuczonych zdarzeń i sugestia, że za kognitywne symptomy w SZ może być odpowiedzialne zaburzenia prawidłowej ekspresji TCF4.

*Publikacja 3****Tcf4 transgenic female mice display impaired flexibility learning measured with latent inhibition.***

W dalszych badaniach nasunęło się pytanie, czy model Tcf4tg oddaje także zaburzenia elastyczności poznawczej (*flexibility learning*), które są nierzadko obecne u pacjentów psychiatrycznych.

Aby lepiej zrozumieć istotę tej pracy, należy najpierw wyjaśnić pojęcie utajonego hamowania (*latent inhibition*). Utajone hamowanie polega na odepchnięciu z obszaru aktualnej uwagi bodźców, które zostały uznane za nieistotne, a jego zaburzenia są fenotypem często obserwowanym u osób cierpiących na SZ. Polega on na gorszej adaptacji do zmiany reakcji na stymulus, kiedy staje się on z niekondycjonowanego – kondycjonowanym, odzwierciedlając problemy z elastycznością poznawczą. Eksperymenty przeprowadziłam z użyciem tzw. audioboxu, w którym zwierzęta były pre-eksponowane na dwa początkowo neutralne (niekondycjonowane, *unconditioned*) dźwięki, 3 lub 12 kHz – po ekspozycji na dźwięk myszy mogły napić się wody z podajnika. W dalszej części eksperymentu jeden z sygnałów (12 kHz) stał się kondycjonowany – sparowany z nieprzyjemnym dla myszy bodźcem (*aversive stimulus*), jakim jest lekki wyrzut powietrza (*airpuff*). Myszy kontrolne całkiem szybko nauczyły się reagować i unikać sparowanego z nieprzyjemnym bodźcem sygnału 12 kHz, niezależnie od tego, czy poznały wcześniej sygnał 3 czy 12 kHz jako bezpieczny. W przeciwieństwie do nich, myszy transgeniczne *Tcf4tg*, pre-eksponowane wcześniej do bezpiecznego sygnału 12 kHz, z opóźnieniem nauczyły się reagować na niego, gdy został sparowany z awersyjnym bodźcem.

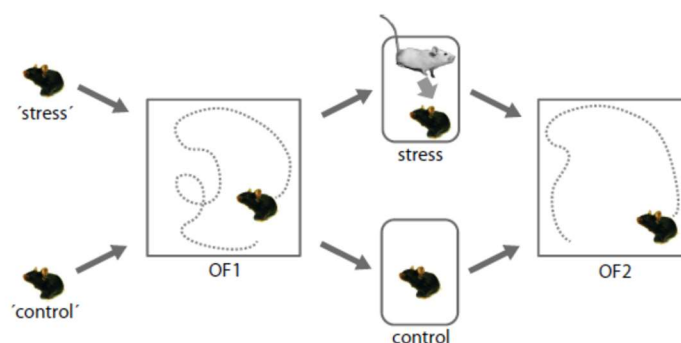
Wyniki tej pracy pokazały, że model *Tcf4tg* wykazuje w porównaniu z kontrolami gorszą elastyczność poznawczą, sugerując braki w filtrowaniu nierелеwantnych bodźców sensorycznych, analogicznie, jak dzieje się to w przypadku pacjentów cierpiących na SZ. Była to trzecia z kolei praca dowodząca powiązania ekspresji *Tcf4* z zaburzeniami poznawczymi i dysfunkcją sieci neuronowych.

Publikacja 4

OSO paradigm – a rapid behavioral screening method for acute psychosocial stress reactivity in mice

Ponieważ choroby psychiatryczne mogą charakteryzować się również zmienioną odpowiedzią na przewlekły bądź nagły (także psychosocjalny) stres osób nimi dotkniętych, w kolejnej pracy zadałam pytanie, czy zwierzęcy model *Tcf4tg* może wykazywać zmienioną reakcję emocjonalną na nagły stres, czy obserwowane zaburzenia w modelu nadekspresji *Tcf4* dotyczą tylko funkcji poznawczych. Znając model stresu psychosocjalnego w formie chronicznej (*resident-intruder paradigm*, zob. Ryguła *et al.*, 2005) i stosując go równolegle w innych

eksperymentach, które opiszę dalej, postanowiłam na potrzeby powyższego zapytania opracować i zastosować własny paradygmat behawioralny i zwalidować go na różnych, niezależnych grupach myszy: na myszach dzikich (wt, *wild type*) C57Bl6/N oraz na grupach genetycznych modeli SZ Tcf4 i Nrg1. Zaprojektowałam paradygmat behawioralny adresujący odpowiedź na nagły stres psychosocjalny - nazwałam go OSO – skrót od *Open field – Social stress – Open field*, gdzie badacz najpierw mierzy aktywność zwierząt w neutralnych warunkach w otwartym polu, kiedy to jest mierzona długość pokonanej odległości, czas spędzony w rogach aparatu (przejaw lęku) oraz tzw. *rearings* (stawanie słupka) jako przejaw ciekawości. Następnie zwierzęta są umieszczone na 5 minut w klatce z dominującym samcem i poddawane krótkiemu stresowi psychosocjalnemu. Po tej konfrontacji, wywołującej nagłe emocje w zwierzęciu, jest ono poddawane ponownie neutralnemu testowi aktywności w otwartym polu (**Ryc. 2**). Myszy kontrolne, zamiast konfrontacji z dominującym samcem, były umieszczane na 5 min w swojej klatce, którą zamieszkują na co dzień.



Ryc. 2 Schemat paradygmatu OSO. Ilustracja własna z publikacji Brzózka *et al.* (2016), *Neuroscience*.

W ramach publikacji zweryfikowałam OSO na czterech niezależnych kohortach myszy:

Eksperyment 1 i *Eksperyment 2*. OSO paradygmat poddałam dwie niezależne kohorty myszy dzikich, C57Bl6, jako *proof of the concept*. Zgodnie z oczekiwaniami, pojedynczy epizod stresu psychosocjalnego w obu eksperymentach doprowadził do zahamowania aktywności lokomotorycznej oraz eksploracyjnej, a także do zwiększenia ekspresji lęku (wyrażonego przez spędzanie więcej czasu w rogach otwartego pola) u myszy poddanych stresowi w porównaniu z myszami, które po pierwszej ocenie aktywności wracały do własnej klatki.

Eksperyment 3. Tutaj użyłam kohorty składającej się z myszy Nrg1tg i ich dzikich (wt) kontroli. Mutanty Nrg1tg wykazały inną niż wt odpowiedź na nagły stres – myszy transgeniczne spędzały taki sam czas w centrum i w rogach aparatu bez różnicy, czy doświadczyły nagłego stresu, czy nie. Sugeruje to nieadekwatną odpowiedź modelu Nrg1tg na raptowne warunki

stresowe, które w naturze mogłyby doprowadzić do ryzykownego zachowania zwierzęcia, przykładowo w obliczu naturalnego wroga.

Eksperyment 4. OSO poddałam kohortę myszy Tcf4. Mutanty wykazały identyczną odpowiedź na nagły stres psychosocjalny, jak dzikie kontrole, zgodnie z moimi wcześniejszymi oczekiwaniami – jak dotąd, fenotyp Tcf4tg wykazywał zmiany jedynie w domenach zachowania powiązanych z zaburzeniami uczenia się i zapamiętywania, dysfunkcji uważności oraz zaburzeń bramkowania sensomotorycznego – lecz nie w obszarze zachowań powiązanych z afektem (*affective behaviour*).

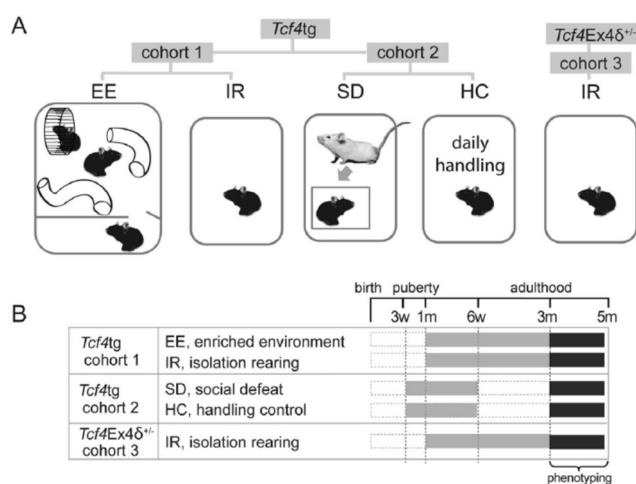
Wnioski, które nasunęły się na podstawie powyższej pracy to: (i) OSO jest szybką i dobrą metodą na ocenę reakcji myszy na nagły stres psychosocjalny, pozwalającą na szybką ocenę ich reaktywności na stres w obecnych i potencjalnych modelach zwierzęcych chorób psychiatrycznych, (ii) model Nrg1tg wykazuje zmienioną w porównaniu z kontrolą odpowiedź na nagły stres, sugerując rolę Nrg1 w reakcji na stres, (iii) myszy Tcf4tg wykazały reakcję na nagły stres psychosocjalny zgodną z zachowaniem niezmutowanych zwierząt, sugerując, że nadekspresja Tcf4 nie interferuje z czynnikami zaangażowanymi w odpowiedź na nagły stres tego typu. Tym samym wykazałam, że efekty nadekspresji genu Tcf4 na poziomie behawioralnym nie ujawniają się w reakcji emocjonalnej.

Publikacja 5

Modulation of cognition and neuronal plasticity in gain- and loss-of-function mouse models of the schizophrenia risk gene Tcf4

Naturalnie nasunęło się nam pytanie o przyczynę deficytów poznawczych w modelu Tcf4 na poziomie strukturalnym bądź komórkowym. Czy dochodzi do deregulacji poziomu ekspresji bądź funkcji innych białek w decydujących dla procesów kognitywnych obszarach OUN, a jeśli tak, to jakich? I wreszcie pytanie kluczowe w kontekście potencjalnych terapii pacjentów cierpiących na SZ: czy deficyty kognitywne modelu Tcf4 da się odwrócić – bądź im zapobiec? Odpowiedzi na te zagadnienia opisałam w kolejnej – i ze względu na złożoność zastosowanych metod – szeroko zakrojonej pracy badawczej, którą zainicjowałam jeszcze w 2009 roku podczas pracy w Instytucie Maxa Plancka w Getyndze, wpadając na pomysł, aby model Tcf4tg, będący modelem wzmocnienia funkcji genu (*gain of function, GOF*), który zaproponowaliśmy wówczas jako zwierzęcy model SZ (i jako taki został on uznany przez środowisko naukowe),

poddać stresowi (jako tzw. *second hit*) w różnej intensywności, oraz aby zwierzętom zapewnić warunki „pozytywnego stresu”, jakim było stworzenie wzbogaconego środowiska (*enriched environment*). Postawiłam hipotezę, że wzbogacone środowisko, spełniając rolę na wzór „terapii behawioralno-kognitywnej”, może zniwelować powstałe już zaburzenia poznawcze w modelu *Tcf4tg* bądź im zapobiec. Z drugiej strony, przez poddanie *Tcf4tg* negatywnemu stresowi o różnej intensywności – od hodowli w izolacji, przez ekspozycję na stres psychosocjalny, chciałam zweryfikować kolejną hipotezę, czy deficyty poznawczo-kognitywne ulegną pogłębieniu w *Tcf4tg* w większym stopniu, niż w dzikich kontrolach. Dodatkowo, aby zbadać kwestię *gene-dosage effect*, została stworzona nowa linia *Tcf4Ex4 $\delta^{+/-}$* jako model utraty funkcji *Tcf4* (*loss-of-function, LOF*) i przebadana pod kątem molekularnym i behawioralnym. Praca ta, której wraz z ówczesną doktorantką Dorotą Badowską jesteście równorzędnymi pierwszymi autorkami, została opublikowana na łamach *Translational Psychiatry* w roku 2020. W toku badań jako drugi czynnik przyczyniający się do rozwoju chorób psychiatrycznych – wpływ środowiska - zastosowałyśmy w niezależnych kohortach zwierząt *Tcf4tg* różne warunki hodowlane (**Ryc. 3**): (i) wychowanie w izolacji socjalnej (IR, *isolation rearing*), (ii) chroniczny stres psychosocjalny (SD, *social defeat*), (iii) wzbogacone środowisko – pozytywny bodziec jako potencjalny model terapii behawioralno-kognitywnej (EE, *enriched environment*), oraz dla porównania jako kontroli użyliśmy kohorty przyzwyczajonej do codziennej manipulacji przez człowieka (HC, *handling control*). Ponadto testom poddaliśmy linię myszy z heterozygotyczną delecją egzonu 4 w genie *Tcf4* (*Tcf4Ex4 $\delta^{+/-}$*), hodowaną od momentu rozdzielenia od matki w 3 tyg. życia w izolacji (IR).



Ryc. 3 Warunki środowiskowo-społeczne, w których hodowano model *gain-of-function* (*Tcf4tg*) i *loss-of-function* (*Tcf4Ex4 $\delta^{+/-}$*) (A) wraz z planem czasowym ekspozycji zwierząt na dane środowisko i ich analizy behawioralnej (B).
Ilustracja mojego autorstwa z publikacji Badowska, Brzózka *et al.* (2020, *Translational Psychiatry*).

Zastosowaliśmy analizę wielowymiarową (*multivariate statistics*, wcześniej zwalidowaną przez nas w kontekście analiz behawioralnych w publikacji Badowska *et al.* [2014] *Data calibration and reduction allows to visualize behavioural profiles of psychosocial influences in mice* (zob. rozdział 4.2.3.2 opisujący publikacje poza cyklem) dla stworzenia profili fenotypów behawioralnych poszczególnych kohort. Wykazaliśmy, że IR oraz SD pogłębiły deficyty poznawcze u myszy Tcf4tg, podczas gdy hodowla w warunkach wzbogaconego środowiska „zamaskowała” deficyty kognitywne, w zgodzie z oczekiwaniami pełniąc funkcję terapii bądź prewencji zaburzeń procesów poznawczych. Oba modele, GOF i LOF zostały przebadane pod kątem plastyczności - model GOF Tcf4tg charakteryzował się wzmożonym długotrwałym osłabieniem synaptycznym (*long-term depression*), a model LOF wzmożonym długotrwałym wzmocnieniem synaptycznym (*long-term potentiation*), wskazując na znaczenie poziomu ekspresji Tcf4 (*gene dosage effect*) w plastyczności neuronalnej. Ponadto analiza gęstości synaps za pomocą mikroskopii STED wykazała większą gęstość niedojrzałych synaps podczas rozwoju OUN modelu Tcf4tg. Równolegle, analiza synaptosomów Tcf4tg potwierdziła zwiększony poziom białek zaangażowanych w funkcjonowanie synaps i ścieżki metaboliczne.

Konkludując – wykazaliśmy, że stres środowiskowy w połączeniu z zaburzeniami ekspresji genu Tcf4 jest odpowiedzialny za pogłębienie deficytów kognitywnych w modelu schizofrenii Tcf4tg. To odkrycie zostało potwierdzone w niezależnej publikacji grona badaczy z mojego byłego zespołu w pracy opublikowanej w *Frontiers in Behavioural Neuroscience* Volkman *et al.* (2021) *PsyCoP - A Platform for Systematic Semi-Automated Behavioral and Cognitive Profiling Reveals Gene and Environment Dependent Impairments of Tcf4 Transgenic Mice Subjected to Social Defeat*. Ponadto – z punktu widzenia wykorzystania wyników w klinice – publikacja 5 wykazuje, jak istotne jest przeciwdziałanie rozwojowi symptomów chorób psychiatrycznych u osób z potencjalnymi skłonnościami genetycznymi (i nie tylko) przez zapewnienie odpowiednich warunków rozwoju (we wspierającej grupie) i przez odpowiednią stymulację kognitywną dzięki wzbogaconemu środowisku – i to zanim pojawią się pierwsze symptomy choroby. Jest to szczególnie istotne w dobie pandemii i wojny, gdzie izolacja i doznanie traumy wyjątkowo silnie zaburzają równowagę psychiczną.

Tu pozwolę sobie na krótką dygresję. Poza genem Tcf4, analizy modeli chorób psychiatrycznych rozszerzyłam o mutacje genu Nrg1, kodującego białko Neuregulinę 1 (*Nrg1*, *Neuregulin 1*), jednego z najważniejszych genów przyczyniających się do rozwoju SZ (Stefansson *et al.*, 2009). Analizy na poziomie behawioralnym i kognitywnym modeli

zwierzęcych z dysregulacją ekspresji Nrg1 były kolejnym celem moich badań, poza głównym cyklem dzieła. Oprócz wcześniej wymienionej w kontekście opracowanego przeze mnie paradygmatu behawioralnego OSO (Brzózka *et al.*, 2013) dokonałam analiz myszy z nadekspresją Nrg1, których to zwieńczeniem są trzy wysoko punktowane publikacje, opisane w rozdziale 4.2.3.2:

- Agarwal *et al.* (2014) ***Dysregulated expression of Neuregulin-1 by cortical pyramidal neurons disrupts synaptic plasticity*** z *Cell Reports* (IF 8,358) (której współautorem jest laureat Nagrody Nobla w dziedzinie chemii w 2014 roku, Prof. Stefan W. Hell z Instytutu Maxa Plancka Chemii Biofizycznej w Getyndze),
- praca Wehr[#], Hinrichs[#] *et al.* (2017) ***Spironolactone is an antagonist of NRG1-ERBB4 signaling and schizophrenia-relevant endophenotypes in mice***, opublikowana na łamach *EMBO Molecular Medicine* (IF 10,239), której wyniki pozwoliły na zaprojektowanie i rozpoczęcie badania klinicznego włączającego spironolakton jako terapię dodatkową (*add-on*) u pacjentów ze SZ (zob. 4.2.3.2) oraz
- Götze *et al.* (2021) ***Hyperactivity is a Core Endophenotype of Elevated Neuregulin-1 Signaling in Embryonic Glutamatergic Networks*** w *Schizophrenia Bulletin* (IF 9,306).

Wracając do cyklu dzieła, obok badań czynników genetycznych przyczyniających się do zaburzeń psychicznych w interakcji lub bez czynnika środowiskowego jak stres psychosocjalny, uwagę poświęciłam także samym czynnikom środowiskowym i idącymi za tym molekularnymi i behawioralnymi efektami stresu psychosocjalnego u myszy niemodyfikowanych genetycznie oraz próbom prewencji i/lub odwrócenia negatywnego wpływu stresu na organizm. Celem badań było określenie, jakie są możliwości modyfikowania efektów stresu psychosocjalnego substancjami chemicznymi znanymi jako modulatory objawów chorób psychicznych:

- (i) litu jako leku stabilizującego nastrój w chorobie afektywnej dwubiegunowej
- (ii) agonisty receptorów CB1 – jako z jednej strony czynnika mogącego wywoływać powstanie epizodów psychotycznych, zwiększających prawdopodobieństwo wystąpienia SZ, a z drugiej strony nierzadko wskazywanego jako substancja przynosząca ulgę u pacjentów ze SZ w wyciszaniu myśli i pomagająca skupić uwagę.

*Publikacja 6****Molecular signatures of psychosocial stress and cognition are modulated by chronic lithium treatment***

W tej pracy zajęłam się zagadnieniem, jakiego typu sygnatury molekularne w definiowanych regionach OUN pozostawia chroniczny stres psychosocjalny i czy można je farmakologicznie odwrócić litem. Myszy C57/Bl6 poddałam chronicznemu stresowi psychosocjalnemu (z grupą kontrolną zwierząt niestresowanych, przyjmujących równolegle lit w wodzie pitnej) i z pomocą lasera, używając techniki LCM (*laser captured microdissection*), wyizolowałam precyzyjnie zdefiniowane mikroregiony dorsalnej części hipokampu odpowiedzialne za kluczowe procesy kognitywne: *gyrus dentatus (DG)* i region CA3 (*cornum ammonium 3*). mRNA wyizolowane z neuronów z tych obszarów zostało poddane analizie indywidualnych transkryptów oraz *gene set enrichment analysis (GSEA)*, pozwalającej na identyfikację „sygnatur molekularnych”, czyli deregulacji ścieżek bądź grup genów zaangażowanych w określone procesy komórkowe. Zidentyfikowaliśmy wzmożoną ekspresję genów pod wpływem stresu w zależności od badanego regionu mózgu (172 in CA3 i 189 w DG, przy 19 genach deregulowanych w obu regionach jednocześnie). Analiza GSEA wykazała deregulację ścieżek metabolicznych zaangażowanych w funkcje proteosomów oraz w procesy dostawy energii komórkowej, a konkretnie genu skorelowanego z białkami HSP (*heat shock proteins, Hspa1a, Hspa5, Hspa9*) oraz grupę skorelowaną z fosforylacją oksydacyjną, zawierającą np. białka ATPazy łańcucha oddechowego (*Atp6v1a, Atp6v1b2, Atp1b1*). Na poziomie behawioralnym analiza zachowania myszy poddanych stresowi wykazała zgodnie z oczekiwaniami zaburzenia funkcji kognitywnych zależnych od hipokampu (zaburzenia pamięci w kondycjonowaniu strachem, *fear conditioning*), których nie obserwowałam w przypadku myszy poddanych stresowi przyjmujących roztwór litu. Sugerowało to, że spożycie litu podczas przewlekłej doświadczanej psychotraumy zapobiegło deficytom kognitywnym, zależnym od hipokampu. Nasunęło się nam pytanie, czy spożycie litu jest w stanie odwrócić bądź zapobiec molekularnym efektom stresu, zaobserwowanym na poziomie indywidualnych transkryptów i w GSEA, działając na te same geny, poddane deregulacji przez stres psychosocjalny? Aby rozwiązać tę kwestię, ponownie zbadaliśmy transkrypty z DG i CA3 myszy nieprzyjmujących litu i porównaliśmy z transkryptami z regionu CA3 myszy poddanych stresowi i przyjmujących lit. Na poziomie ekspresji indywidualnych transkryptów, znaleźliśmy deregulację zaledwie 22 genów (20 o zwiększonej, 2 o zmniejszonej ekspresji). Szersza analiza klastrów genów pozwoliła zidentyfikować trzy grupy deregulowane przez stres i przez lit – geny powiązane ze ścieżkami

metabolicznymi i funkcjami proteasomu, ubiquinonu oraz fosforylacji oksydacyjnej. Co ciekawe, ekspresja tych wszystkich ścieżek była zwiększona pod wpływem stresu w DG i CA3 oraz zredukowana w CA3 po zaaplikowaniu chronicznie zestresowanym zwierzętom terapii litem.

Kluczowym wnioskiem tej pracy jest udowodnienie korzystnej roli terapii litem jako działania prewencyjnego, zmniejszającego negatywne skutki chronicznego stresu psychosocjalnego na funkcje poznawcze i wspierającego równowagę na poziomie molekularnym w precyzyjnie zdefiniowanych regionach hipokampu, zaburzaną przez chroniczny stres psychosocjalny.

Publikacja 7

Acute treatment with cannabinoid receptor (CB1) agonist WIN55212-2 improves prepulse inhibition in psychosocially stressed mice

Jednym z istotnych czynników środowiskowych, obok stresu psychosocjalnego, przyczyniającym się do rozwoju chorób psychiatrycznych, jest palenie marihuany (konopi indyjskich, *Cannabis sativa*) w wieku, kiedy OUN jest jeszcze w fazie rozwoju. Ekspresja fenotypu SZ pod wpływem *cannabis* ma miejsce szczególnie u osób posiadających skłonność genetyczną, np. mutację w genie COMT (katecholo-O-metylotransferazy). *Cannabis* działa na OUN m.in. przez receptory CB1, odpowiadające również na endokannabinoidy – obecne w organizmie pochodne kannabinoidów, zaangażowane w odpowiedź organizmu na stres i wpływające na oś podwzgórze-przysadka-kora nadnerczy (HPA, *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*). Nasunęło się nam pytanie, czy receptor kannabinoidowy 1 (CB1) jest zaangażowany w odpowiedź na stres psychosocjalny i czy jego stymulacja bądź inhibicja może mieć wpływ na ekspresję zachowań typowych dla efektów stresu psychosocjalnego? W publikacji 7 badałam synergiczny wpływ agonisty receptorów kannabinoidowych WIN55212.2 i stresu psychosocjalnego na aktywność i bramkowanie sensomotoryczne u myszy dzikich C57B/Bl6. Wyniki badań potwierdziły wcześniejsze doniesienia, że myszy poddane chronicznemu stresowi psychosocjalnemu inaczej odpowiadały w teście hamowania przed sygnałowego (PPI), niż myszy niezestresowane. W pracy pokazaliśmy, że deficyty PPI wywołane przewlekłym stresem psychosocjalnym były odwracalne dzięki zastosowaniu WIN55212.2, oraz że odpowiedź powodowana stresem była zależna od receptorów CB1, ponieważ podanie myszom antagonisty CB1 – Rimonabantu, odwracało efekty WIN55212.2

na PPI. Dane zasugerowały, że receptory CB1 mogą mieć kluczową rolę w synergistycznych efektach stresu psychosocjalnego i kannabinoidów na OUN.

Publikacja 8

Chronic Psychosocial Stress Causes Increased Anxiety-Like Behavior and Alters Endocannabinoid Levels in the Brain of C57Bl/6J Mice

Biorąc pod uwagę wnioski z publikacji 7, zadaliśmy kolejne pytanie, czy zatem wewnętrzny system endokannabinoidów może podlegać deregulacji przez stres psychosocjalny? Odpowiedzi na to zagadnienie udzieliliśmy w publikacji 8, w ramach której poddaliśmy chronicznemu stresowi psychosocjalnemu myszy i przeanalizowaliśmy ich zachowanie wraz z analizą zmian ekspresji endocannabinoidów w definiowanych regionach OUN. Zgodnie z oczekiwaniami, zwierzęta wykazały się podwyższoną bojaźliwością. Analiza ekspresji endokannabinoidów w definiowanych regionach mózgu zwierząt poddanych stresowi wykazała, że poziom 2-AG (2-arachidonoyl glicerolu) były podwyższony w korze i w mózdzku, podczas gdy poziomy AEA (anandamidu, N-arachidonoyletanoloaminy) oraz OEA (oleoyletanolamidu) uległy redukcji w hipokampie.

Podsumowując wykazaliśmy, że endocannabinoidy są zaangażowane w reakcję na chroniczny stres psychosocjalny i poziom ich modulacji przez stres jest zależny od regionu OUN.

4.2.3.2. Osiągnięcia poza cyklem habilitacyjnym

Publikacja 1

Badowska DM, **Brzózka MM**, Malzahn D, Rossner MJ (2014) *Data calibration and reduction allows to visualize behavioural profiles of psychosocial influences in mice*. European Archives Of Psychiatry And Clinical Neuroscience, 2014 Sept 19.

IF 4,113

MEiN 30

cytowania = 5 (4)

Powracając do wątku opisu domen behawioralnych kilka słów warto poświęcić sposobowi przedstawienia danych dla różnych kohort poddanych takim samym paradygmatom behawioralnym, adresującym zachowania o konkretnym znaczeniu w kontekście chorób psychiatrycznych. Badania modeli chorób psychiatrycznych opierają się na badaniach wielu niezależnych kohort myszy, muszą adresować różne domeny behawioralne i aspekty funkcji kognitywnych. Porównywalność takich eksperymentów jest utrudniona właśnie ze względu na swój złożony charakter oraz na fakt wykorzystania różnych kohort w badaniach. Aby umożliwić porównanie tak wielowymiarowych danych, w pracy Badowska *et al.* (2014) ***Data calibration and reduction allows to visualize behavioural profiles of psychosocial influences in mice*** opublikowanej na łamach *European Archives Of Psychiatry And Clinical Neuroscience*, przeanalizowaliśmy zachowanie dwóch niezależnych kohort myszy C57BBl/6, hodowanych w warunkach socjalnej izolacji (IR, *isolation rearing*) i chronicznego stresu psychosocjalnego (SD, *social defeat*), porównując ich zachowanie z zachowaniem myszy w warunkach wzbogaconego środowiska (EE, *enriched environment*), najbardziej odpowiadającemu warunkom naturalnym. Zastosowaliśmy wielowymiarowe metody statystyczne, aby scalić dane z indywidualnych pomiarów w szersze, pokrewne kategorie, kalibrując dane w obrębie danej kategorii. Kolejno dane zostały zwizualizowane na wykresach radarowych, aby umożliwić prostą i szybką wizualną ocenę zmian w badanych kohortach w obrębie domen behawioralnych. Stworzenie takiej metody, zwalidowanej na myszach wt, wykorzystaliśmy w analizie zachowania mutantów genu *Tcf4* we wcześniej opisanej w ramach cyklu dzieła Badowska, Brzózka *et al.* (2020) *Modulation of cognition and neuronal plasticity in gain- and loss-of-function mouse models of the schizophrenia risk gene Tcf4*.

Publikacja 2

Baier PC[#], Brzózka MM[#], Shahmoradi A, Reinecke L, Kroos C, Wichert SP, Oster H, Wehr MC, Taneja R, Hirrlinger J, Rossner MJ. (2014) *Mice lacking the circadian modulators Sharp1 and Sharp2 display altered sleep and mixed state endophenotypes of psychiatric disorders*. PLOS one. 2014 Oct 23;9(10).

IF 3,234

MEiN 40

cytowania = 19 (18) [#]równy udział współautorów

W kolejnym projekcie będącym już poza cyklem dzieła habilitacyjnego, lecz o pokrewnej tematyce, zajęłam się analizą czynników genetycznych powiązanych z cyklem dobowym. Zaburzenia snu i rytmu dobowego są częstym prodromalnym objawem niektórych chorób psychiatrycznych, jak np. zaburzenia nastroju, czy SZ. Coraz więcej badań wskazywało na to, że tzw. *clock genes*, geny odpowiedzialne za regulację procesów okołodobowych, mogą przyczyniać się do rozwoju i manifestacji chorób psychiatrycznych. W naszym laboratorium, jeszcze w Instytucie Maxa Plancka Medycyny Eksperymentalnej w Getyndze, badaliśmy czynniki transkrypcyjne Sharp1 /Dec2/bHLHe41 oraz Sharp2/Dec1/bhlhe40, znane już wtedy modulatory procesów okołodobowych, z których ten pierwszy – Sharp1 – został zidentyfikowany jako regulator homeostazy snu u ludzi. W pracy Baier, Brzózka *et al.* (2014) *Mice lacking the circadian modulators Sharp1 and Sharp2 display altered sleep and mixed state endophenotypes of psychiatric disorders* opublikowanej na łamach *PLOS One* poddaliśmy analizie behawioralnej i molekularnej model zwierzęcy z delecją obu czynników transkrypcyjnych, Sharp1 i Sharp2 (Sharp1/2^{-/-}). Mutanty poddaliśmy analizie cyklu snu/stanu obudzonego encefalogramem (EEG) oraz profilowaniu na poziomie behawioralnym oraz ekspresji genów. Analiza EEG wykazała, że model Sharp1/2^{-/-} wykazuje stłumioną amplitudę snu/czuwania oraz zmiany w falach theta. WzmóŜona ilość snu u mutantów towarzyszyła zredukowanej aktywności lokomotorycznej mierzonej w kołowrotkach oraz zmianom w ekspresji grup/klasterów genów powiązanych z zaburzeniami psychiatrycznymi, jak zaburzenia nastroju, schizofrenia, choroba dwubiegunowa, oraz na poziomie indywidualnych transkryptów – deregulacji genów *Per1*, *Per2* i *Cry1*, związanych z molekularnym zegarem. Na płaszczyźnie behawioralnej, model ten wykazał nadaktywność lokomotoryczną w otwartym polu, indukowaną nowym środowiskiem (*novelty induced hiperactivity*), redukcję lęku oraz

zaburzenia w PPI, zatem objawy przypominające choroby psychiatryczne. Przyjrzelśmy się także modelowaniu sieci molekularnych (*unbiased network modeling*) i znaleźliśmy korelacje między genami plastyczności neuronów i genami *clock*, szczególnie genów kodujących białka SHARP1 i PER1. Wyniki naszej pracy popierają hipotezę, że anormalny wzór cyklu snu/czuwania i pewne fenotypy chorób psychiatrycznych mogą być spowodowane pokrewnymi lub nawet wspólnymi mechanizmami, angażującymi składniki molekularnego zegara, włączając w to SHARP1 i SHARP2. Zaproponowaliśmy, że model zwierzęcy delecji obu czynników transkrypcyjnych Sharp1/Sharp2 może być cennym modelem przedklinicznym do testowania farmakologicznych substancji jako potencjalnych leków w kontekście chorób psychiatrycznych, jak zaburzenia nastroju i snu/rytmu okołodobowego.

Publikacja 3

Agarwal A, Zhang M, Trembak-Duff I, Unterbarnscheidt T, Radyushkin K, Dibaj P, Martins De Souza D, Boretius S, **Brzózka MM**, Steffens H, Berning S, Teng Z, Gummert M, Tantra M, Guest PC, Willig Ki, Frahm J, Hell SW, Bahn S, Rossner MJ, Nave K-A, Ehrenreich H, Zhang W*, and Schwab MH* (2014). *Dysregulated expression of Neuregulin-1 by cortical pyramidal neurons disrupts synaptic plasticity*. Cell Reports 21 Aug 2014 8(4):1130-45

IF 8,358

MEiN 35

cytowania = 64 (60)

Różne warianty genowe *NRG1* są powiązane z występowaniem SZ u pacjentów, nie było jednak do końca zbadane, jaki wpływ ma deregulacja ekspresji izoform NRG1 na zmiany w OUN. Nrg1 aktywuje receptor ERBB4, a zaburzenia ścieżki sygnałowej Nrg1-ERBB4 przyczyniają się do negatywnych, pozytywnych i kognitywnych symptomów SZ. Ponadto analizy *post mortem* OUN pacjentów ze SZ wykazały nadekspresję Nrg1 i hiperfosforylację ERBB4. Aby zbadać, jaki wpływ na funkcje OUN ma deregulacja ekspresji Nrg1 w modelu zwierzęcym, w ramach tej pracy stworzyliśmy modele mysie ze zredukowaną (LOF) lub zwiększoną (GOF) ekspresją Nrg1 w regionach kluczowych dla funkcji poznawczych: kory mózgowej i hipokampu i poddaliśmy je analizie pod kątem behawioralnym, struktury neuronów i zmian molekularnych. Pod kątem zachowania, model LOF wykazał brak zmian w

hamowaniu przed sygnałowym (PPI), przy jednoczesnej redukcji aktywności lokomotorycznej i normalnym poziomie lęklivosti. Budowanie pamięci krótko- i długoterminowej opartej na kondycjonowaniu Pawłowa było również zaburzone w mutantach z obniżoną ekspresją Nrg1. Z drugiej strony, model GOF Nrg1 w neuronach projekcyjnych kory, cechujący się nadekspresją najczęściej występującej izoformy Nrg1 z domeną bogatą w reszty cysteinowe (CRD, *cystein rich domain*)-NRG1, wykazał intensywniejszą transmisję hamującą, zredukowaną plastyczność oraz hipoaktywność na poziomie behawioralnym. Nadekspresja (CRD)-NRG1 spowodowała zaburzenia równowagi neurotransmisji pobudzającej i hamującej, redukcję plastyczności mierzoną jako LTP (*long-term potentiation*) w hipokampie, anormalny wzrost i rodzaj kolców neuronów piramidalnych, jak i zmiany na poziomie ekspresji białek powiązanych z plastycznością, a także powiększenie komórek OUN. Na płaszczyźnie behawioralnej model GOF Nrg1 wykazał zwiększoną bojaźliwość i zredukowaną ciekawość (*exploratory behaviour*). Ponadto stwierdziliśmy deficyty w bramkowaniu sensorymotorycznym, będącym istotnym symptomem SZ o wysokiej wartości translacyjnej.

Podsumowując, nasze badania wykazały, że optymalny poziom ekspresji Nrg1 jest czynnikiem wpływającym na poprawną równowagę między transmisją neuronalną hamującą i pobudzającą w korze, a zarówno zbyt niska, jak i zbyt wysoka ekspresja Nrg1 prowadzi do niepożądanych zaburzeń funkcji sieci neuronalnych. Analizy fenotypów modeli LOF i GOF Nrg1 pokazały potencjalny patomechanizm prowadzący do deficytów w plastyczności synaps i wyraźnie zasugerowały, że w przypadku pacjentów cierpiących na SZ najprawdopodobniej mamy do czynienia z nadmiarową (GOF), a nie niedostateczną (LOF) ekspresją Nrg1, co pokrywało się z wcześniejszymi doniesieniami (Hashimoto *et al.*, 2004).

Publikacja 4

Wehr MC#, Hinrichs W#, **Brzózka MM**, Unterbarnscheidt T, Herholt A, Wintgens JP, Papiol S, Soto-Bernardini MC, Kravchenko M, Zhang M, Nave KA, Wichert SP, Falkai P, Zhang W, Schwab MH, Rossner MJ (2017). *Spironolactone is an antagonist of NRG1-ERBB4 signaling and schizophrenia-relevant endophenotypes in mice*. EMBO Mol Med. 2017 Oct;9(10):1448-1462. #równy udział współautorów

IF 10,293

MEiN 45

cytowania = 16 (15)

Nasunęło się zatem pytanie, czy jesteśmy w stanie farmakologicznie sprowadzić – jak udowodniliśmy w powyżej omówionej publikacji Agarwal *et al.* - zbyt intensywnie pobudzoną ekspresję *Nrg1*, aktywującą ścieżkę sygnałową Nrg1-ERBB4 - z powrotem do stanu równowagi i w ten sposób pomóc pacjentom cierpiącym na SZ uwolnić się choćby częściowo od symptomów choroby? W tym celu należało (i) zidentyfikować cząsteczkę pełniącą rolę inhibitora nadpobudzonej ścieżki Nrg1-ERBB4 oraz (ii) zwalidować jej potencjał w odwróceniu zmian wywołanych nadekspresją Nrg1 na poziomie behawioralnym i molekularnym, początkowo w modelu zwierzęcym. Powyższe aspekty zbadaliśmy w kolejnej pracy badawczej, używając uprzednio opracowanego w naszym laboratorium systemu split-TEV pozwalającego na badanie interakcji międzycząsteczkowych i kaskad sygnałowych w żywych komórkach *in vitro* (Wehr *et al.*, 2006). Przeprowadziliśmy screening biblioteki różnych związków chemicznych, dopuszczonych już do zastosowania klinicznego, posiadających potencjał modulowania ścieżki sygnałowej Nrg1-ERBB4. Wśród kandydatów zidentyfikowaliśmy spironolakton jako antagonistę ścieżki sygnałowej Nrg1-ERBB4, dotychczas znany jako antagonist mineralokortykoidów i stosowany w np. nadciśnieniu tętniczym czy aldosteronizmie pierwotnym. Myszy transgeniczne Nrg1 typ III wykazały hiperfosforylację receptora ERBB4, podobnie, jak zostało to wykazane w pośmiertnie zbadanych mózgach pacjentów ze SZ. Zbadaliśmy zatem wpływ spironolaktonu na fenotyp powiązany ze SZ na modelu myszy z nadekspresją Nrg1 w OUN. Terapia spironolaktonem odwróciła hiperfosforylację aktywowanego ERBB4 *in vivo*. Na poziomie behawioralnym, spironolakton złagodził ekspresję fenotypu podobnego do obserwowanego w SZ – złagodził deficyty bramkowania sensomotorycznego, nadaktywność ruchową oraz zredukował upośledzenie pamięci operacyjnej. Ponadto, na poziomie komórkowym, spironolakton zintensyfikował spontaniczne hamujące sygnały postsynaptyczne w skrawkach kory mózgowej, wspierając wcześniejsze obserwacje, że spironolakton działa przez ścieżki sygnałowe modulowane przez ERBB4.

Podsumowując, wyniki naszej pracy wykazały, że spironolakton może stanowić obiecującą opcję terapeutyczną dla pacjentów cierpiących na SZ, co jest dla nich kluczowe, ponieważ spironolakton jest obecny od wielu lat w codziennej praktyce lekarskiej i w razie udowodnienia jego pozytywnego wpływu na odwrócenie bądź redukcję objawów SZ pozwoliłoby to znamienne skrócić ścieżkę dopuszczenia leku w nowym wskazaniu (*drug repurposing*).

Wyniki powyższej publikacji pozwoliły na zaprojektowanie i rozpoczęcie badania klinicznego włączającego spironolakton jako terapię dodatkową (*add-on*) u pacjentów ze SZ, czego dowodem jest opublikowana w roku 2020 w *Contemporary Clinical Trials Communications* praca moich byłych koleżanek i kolegów z Kliniki Psychiatrii w Monachium Hasan *et al.*, ***Add-on spironolactone as antagonist of the NRG1-ERBB4 signaling pathway for the treatment of schizophrenia: study design and methodology of a multicenter randomized, placebo-controlled trial.*** Artykuł przedstawia protokół wieloośrodkowego badania klinicznego na 90 pacjentach z SZ, którym zaczęto podawać spironolakton, aby zweryfikować hipotezę poprawy parametrów klinicznych oraz funkcji poznawczych, adresowanych w baterii testów kognitywnych i psychologicznych. Jest to fascynujący przykład na tranzycję z badania przedklinicznego do klinicznego i mam nadzieję na jego pozytywne wyniki.

Publikacja 5

Götze T, Soto-Bernardini MC, Zhang M, Mießner H, Linhoff L, **Brzózka MM**, Velanac V, Dullin C, Ramos-Gomes F, Peng M, Hussein H, Schifferdecker E, Fledrich R, Sereda MW, Willig K, Alves F, Rossner MJ, Nave KA, Zhang W, Schwab MH. (2021). *Hyperactivity is a Core Endophenotype of Elevated Neuregulin-1 Signaling in Embryonic Glutamatergic Networks*. Schizophr Bull. 2021 Aug 21;47(5):1409-1420.

IF 9,306

MEiN 200

cytowania = 0 (0)

Nie tylko region mózgu dotknięty zaburzeniem równowagi ekspresji danego czynnika ma znaczenie dla ekspresji fenotypu, lecz także etap rozwoju OUN, w jakim doszło do niekorzystnej zmiany. Owocem badań pod takim kątem jest kolejna praca, w ramach której badaliśmy modele z miejscowo i czasowo sterowaną nadekspresją CRD-Nrg1 kierowaną CRE. Wyniki wcześniejszych analiz pacjentów ze SZ wykazały, że szlak NRG1/ErbB4 jest decydującą ścieżką sygnałową w SZ, lecz pozostawało niejasne, który etap w rozwoju OUN, który region OUN lub typ neuronów są szczególnie wrażliwe na zaburzenia sygnałowe tej ścieżki. Zbadaliśmy trzy modele nadekspresji CRD-Nrg1 w różnych regionach OUN (cały OUN w modelu T-Nrg1 vs. nadekspresja w korowych neuronach projekcyjnych modelu NC-

Nrg1) i nadekspresji CRD-Nrg1 indukowanej na różnych etapach rozwoju OUN. Badania wykazały, że zaburzone sygnały ścieżki NRG1-ERBB4 przyczyniają się do powiększenia komórek OUN i indukcji procesów zapalnych w OUN poza neuronami glutaminianergicznymi, a ponadto są powiązane z ogólnym metabolizmem, wpływając na wagę ciała. Nadekspresja CRD-NRG1 na wczesnym etapie embrionalnym w glutaminianergicznym neuronach kory doprowadziła do zmniejszonej neurotransmisji hamującej oraz do nadaktywności lokomotorycznej na poziomie behawioralnym.

Podsumowując – w pracy zidentyfikowaliśmy specyficzne konsekwencje nadpobudzenia ścieżek sygnałowych aktywowanych przez CRD-NRG1: (i) powiększenie komórek, jako jeden z głównych neuroanatomicznych biomarkerów SZ oraz (ii) nadaktywność lokomotoryczną jako uznany w środowisku naukowym model zwierzęcy objawów pozytywnych SZ. Tym samym wykazaliśmy, że zaprojektowane i opisane przez nas modele mutacji Nrg1, skutkujące ekspresją endofenotypów SZ, mogą stanowić cenne narzędzie w badaniach farmakologicznych, celowanych w definiowane symptomy SZ.

Publikacja 6

Sarzyńska-Długosz I, Szczepańska-Szerej A, Drużdż A, Łukomski T, Ochudło S, Fabian A, Sobolewski P, Mariańska K, Maciejewska J, Mulek E, Niedzielska A, Raymond R, **Brzózka MM***, Jessa-Jabłońska M. *Real-world effectiveness of abobotulinumtoxinA (Dysport®) in adults with upper limb spasticity in routine clinical practice: an observational study.* *Neurol Neurochir Pol.* 2020;54(1):90-99.

IF 1,621,

MEiN 100

cytowania = 6 (6), *autorka korespondencyjna

Trzecia praca poza cyklem habilitacyjnym i znacznie oddalona od niego tematycznie to artykuł opublikowany w *Neurologii i Neurochirurgii Polskiej*, który powstał już podczas mojej aktywności zawodowej w Polsce i stanowi wielośrodkowe, otwarte niekontrolowane badanie obserwacyjne pacjentów ze spastycznością kończyny górnej, leczonych iniekcjami toksyny abobotulinowej (aboBONT-A) w codziennej praktyce lekarskiej w Polsce. Rezultaty leczenia, oceniane przez badaczy i przez pacjentów za pomocą skali *Clinical Global Impression-*

Improvement Scale, jak i pomiary napięcia mięśniowego z użyciem zmodyfikowanej skali Ashwortha (*Modified Ashworth Scale*) i siły mięśni z pomocą *Medical Research Council Scale* wykazały pozytywny wpływ iniekcji AboBONT-A na kondycję dotkniętej spastycznością kończyny.

4.3 Podsumowanie i znaczenie badań.

Za najważniejsze osiągnięcia wynikające z badań przedstawionych w moim cyklu prac uważam:

1. Stworzony w naszym laboratorium model myszy transgenicznych Tcf4tg jest zwalidowanym modelem zwierzęcym SZ, obrazującym zaburzenia w PPI i funkcji poznawczych (Brzózka *et al.*, 2010; Brzózka i Rossner, 2013; Brzózka *et al.*, 2013; Brzózka *et al.*, 2016a; Brzózka *et al.*, 2016b; Badowska, Brzózka *et al.*, 2020) i może stanowić przydatne narzędzie w poszukiwaniu terapii farmakologicznych zaburzeń funkcji poznawczych w SZ.
2. Czynniki transkrypcyjne Tcf4 jest odpowiedzialny za deficyty poznawcze i wyższe procesy kognitywne, takie jak: uczenie się i zapamiętywanie (Brzózka *et al.*, 2010), a także uwagę, hamowanie przed sygnałowe i utajone (Brzózka i Rossner, 2013; Brzózka *et al.*, 2013; Brzózka *et al.*, 2016a; Brzózka *et al.*, 2016b)
3. Do deficytów poznawczych w modelu Tcf4tg przyczynia się obniżona aktywność neuronów mierzona ekspresją c-fos (Brzózka and Rossner, 2013) i deregulacja białek zaangażowanych w funkcjonowanie synaps i metabolizm (Badowska, Brzózka *et al.*, 2020).
4. Nadekspresja Tcf4 nie powoduje zmian w reakcji na nagły stres psychosocjalny, w przeciwieństwie do nadekspresji Nrg1 w paradygmacie OSO (Brzózka *et al.*, 2016a).
5. Poziom ekspresji Tcf4 (*gene dosage effect*) ma istotne znaczenie dla gęstości synaps podczas rozwoju OUN oraz w plastyczności neuronalnej w dorosłości: GOF Tcf4tg charakteryzował się wzmożonym długotrwałym osłabieniem, a LOF długotrwałym wzmocnieniem synaptycznym (Badowska, Brzózka *et al.*, 2020).
6. Funkcje poznawcze w modelu myszy Tcf4tg mogą być modyfikowane (upośledzane lub pozytywnie wzmocniane) przez różne warunki środowiskowe silniej, niż w dzikich kontrolach (Badowska, Brzózka *et al.*, 2020).

7. Hodowla w środowisku wzbogaconym i w grupach modelu Tcf4tg zapobiegła deficytom kognitywnym i upośledzeniu bramkowania sensorycznego (Badowska, Brzózka *et al.*, 2020). Z klinicznego punktu widzenia podkreśla to, jak istotne jest zapewnienie odpowiednio wzbogaconego środowiska i odpowiednich interakcji społecznych osobom potencjalnie podatnym na choroby psychiatryczne, jeszcze przed wystąpieniem pierwszych symptomów choroby. Ma to szczególne znaczenie w okresie dorastania.
8. Paradygmat behawioralny OSO okazał się skuteczny w testowaniu reakcji na nagły stres psychosocjalny w modelach zwierzęcych Tcf4tg, Nrg1 i w dzikich kontrolach (Brzózka *et al.*, 2016a) i może posłużyć w testach farmakoterapii.

Najważniejsze wnioski płynące z publikacji poza cyklem prac:

9. Modele mysie różnych mutacji Nrg1 stanowią zwalidowane modele SZ (Agarwal *et al.*, 2014; Wehr, Hinrichs *et al.*, 2017; Götze *et al.*, 2021), które mogą być przydatne w testowaniu nowych terapii farmakologicznych.
10. Zmiany poziomu ekspresji Nrg1 prowadzą do zaburzeń neurotransmisji pobudzającej i hamującej, redukcję plastyczności neuronów oraz zaburzenia behawioralne (deficyty PPI, nadaktywność, wzmożona odpowiedź na nagły stres psychosocjalny) i zmiany anatomiczne w OUN jak powiększenie komór (Agarwal *et al.*, 2014; Brzózka *et al.*, 2016a; Wehr, Hinrichs *et al.*, 2017; Götze *et al.*, 2021).
11. W modelu SZ Nrg1tg zastosowanie spironolaktonu jako farmakoterapii na poziomie molekularnym odwróciło hiperfosforylację ERBB4, a także złagodziło deficyty w PPI i pamięci operacyjnej oraz nadaktywność ruchową, co stanowi punkt wyjściowy do dalszych badań klinicznych i nadzieję dla pacjentów cierpiących na SZ (Wehr, Hinrichs *et al.*, 2017).
12. W sytuacji przewlekłego stresu psychosocjalnego terapia litem działa prewencyjnie w kontekście poprawy deficytów funkcji poznawczych indukowanych stresem oraz może pomóc przywrócić równowagę na poziomie molekularnym w definiowanych regionach OUN (Brzózka *et al.*, 2015). Zatem terapia litem mogłaby potencjalnie w uzasadnionych przypadkach poprawić jakość życia pacjentów poddanych silnemu stresowi psychosocjalnemu.

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

Całą aktywność naukową przeprowadziłam za granicami polski – po stypendium Erasmusa w Getyndze w latach 2000-2001 zdecydowałam się skończyć Uniwersytet Georga Augusta w Getyndze w Niemczech, gdzie w 2003 roku uzyskałam tytuł Biologa Dyplomowanego. W 2004 roku rozpoczęłam pracę doktorską w Instytucie Maxa Plancka Medycyny Eksperymentalnej (MPIEM) w Getyndze w Pracowni Neurogenetyki, jako stypendystka Graduiertenkolleg 632 ufundowanego przez Niemiecką Wspólnotę Badawczą (DFG, Deutsche Forschungsgemeinschaft) *Neuroplasticity: from molecules to systems*. To właśnie tutaj zafascynowałam się neurobiologią, a szczególnie badaniem zachowania zwierząt i możliwością modelowania chorób psychiatrycznych w modelach zwierzęcych. Podczas pracy badawczej współpracowałam z licznymi instytucjami naukowymi, czego dowodem są różnorodne afiliacje współauterek i współautorów publikacji, np. Instytut Maxa Plancka Chemii Biofizycznej, Centralny Instytut Zdrowia Psychicznego w Mannheim, Uniwersytet w Zurichu, Uniwersytet w Kilonii, Uniwersytet w Sao Paolo. Niezbędne uprawnienia do przeprowadzania eksperymentów na zwierzętach zdobyłam w MPIEM oraz w University College of London (kurs FELASA B), a upoważnienia do zarządzania jako kierowniczką jednostki badania zachowania zwierząt i zwierzętarni w Monachium (kurs FELASA C).



Podczas mojej aktywności naukowej w Klinice Psychiatrii w Getyndze i w Klinice Psychiatrii w Monachium, bez wątpienia wzbogaceniem pod kątem naukowym był dla mnie czynny udział w Grupie Badawczej KFO241 (www.kfo241.de/staff_en.php), skupionej wokół tematyki powiązań między genotypem a fenotypem i neurobiologią długofalowego przebiegu chorób psychiatrycznych. W tym czasie recenzowałam prace naukowe dla pism takich jak *Recent Patents on Central Nervous System Drug Discovery*, *Neuroscience*, *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *Cognitive, Affective, and Behavioral Neuroscience* i *Cell Reports*.

Niewątpliwie przynoszącym mi największą satysfakcję i najważniejszym moim osiągnięciem podczas kariery naukowej, oprócz cyklu wysokopunktowanych publikacji poświęconych analizie czynników genetycznych i środowiskowych przyczyniających się do rozwoju chorób psychiatrycznych z zastosowaniem modeli zwierzęcych, było zaplanowanie i zbudowanie od podstaw nowoczesnego laboratorium badania mysich modeli chorób psychiatrycznych.

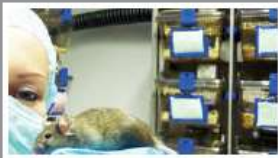
Zaczątkiem tego procesu była koncepcja Dyrektora Kliniki Psychiatrii w Getyndze, a potem w Monachium - Prof. Petera Falkaia, aby w jednym miejscu zintegrować badania klinicystów i naukowców – biologów molekularnych i aby taka interdyscyplinarna synergia mogła zaowocować jak największym postępowaniem w badaniach naukowych, z korzyścią dla pacjentów psychiatrycznych. W historycznych murach Kliniki Psychiatrii w Monachium, gdzie wiek wcześniej swoje badania prowadzili Alois Alzheimer i Emil Kraepelin, miałam ogromną przyjemność wspólnie z Prof. Peterem Falkaiem i Kierownikiem Departamentu Neurobiologii Molekularnej, Prof. Moritzem Rossnerem zaprojektować w ścisłej współpracy z zespołem inżynierów - od wstępnych szkiców ołówkiem do finalnej wersji - Laboratorium Badania Mysich Zachowań (*Mouse Behavioural Unit, Mausverhaltenslabor*), zapewniające najwyższe standardy życia myszom, umożliwiające przeprowadzanie testów behawioralnych, od najprostszych, jak test aktywności w otwartym polu, do najbardziej złożonych, jak analiza zachowania i funkcji poznawczych w zautomatyzowanych klatkach *Intellcages* (**Ryc. 4**). Laboratorium funkcjonuje do dziś, umożliwiając naukowczyniom i naukowcom prowadzenie złożonych analiz behawioralnych modeli zwierzęcych pod kątem symptomów chorób psychicznych i opracowania potencjalnych farmakoterapii. Obserwowanie, gdy w bazach publikacji pojawiają się nowe doniesienia naukowe z wykorzystaniem możliwości, które oferuje stworzone przeze mnie Laboratorium Badania Mysich Zachowań, dostarcza mi ogromnej satysfakcji.

The Structure of the Mouse Behavioral Unit

Magdalena M. Brzózka
Ludwig-Maximilian University, Department of Psychiatry, Munich, Germany;





Our Focus




In the focus of our Mouse Unit are mouse models of psychiatric diseases, e.g. schizophrenia (SZ) and bipolar disease (BD): mice with manipulated *Tcf4*, *Nrg1* and *Sharp1/2* genes. Mouse mutants of SZ can be generated on different ways: by genetical or/and by environmental manipulation.

Mouse Strains

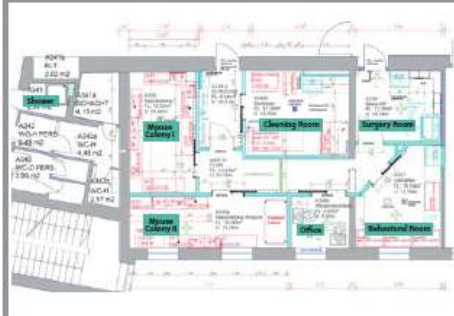


Different Housing Conditions




High stress: negative change, respiratory 40% less active

Plan of the Mouse Unit



Preparation of Cages



Individually ventilated cages (IVC) Sealsafe NEXT Blue Line with microbiological filters provide protection for mice and operators.


Washing machine for cages (left) with throughput of 18 cages per 2-5 min/wash. After cleaning, dry cages filled with bedding are sterilized in autoclave (right) with capacity of 50 cages or 50 filter-tops or 120 grids/cycle.

Mouse Colony Rooms




Our two colony rooms have the capacity of 666 IVCs. Mice are isolated from the outside world in order to provide maximum on pathogen-free and clean environment. Moreover, for change of cages and mouse handling/weaning etc. cages are opened only under the hood - mobile cages changing station.


Rooms in the Mouse Unit



Mouse Behavioral Room

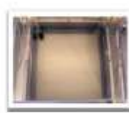


Mouse Surgery Room

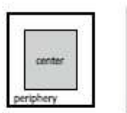


Office


Behavioral Tests Available in the Mouse Unit



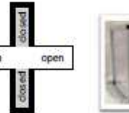
Open Field




Elevated Plus Maze




Light-Dark Preference



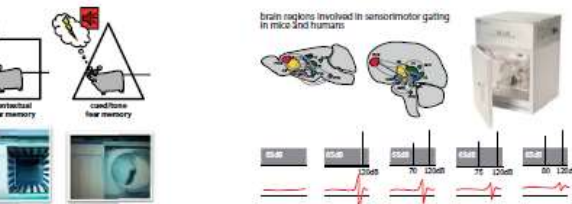
Tail Suspension Test




Y-maze



Fear Conditioning



Prepulse Inhibition Test



Intelligences

Ryc. 4 Laboratorium Badania Mysich Zachowań (*Mouse Behavioural Unit*), które stworzyłam w Klinice Psychiatrii w Monachium

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

Działalność dydaktyczna:

Podczas mojej pracy w Instytucie Maxa Plancka Medycyny Eksperymentalnej w Getyndze byłam odpowiedzialna za stworzenie laboratorium behawioralnego i za wprowadzenie i kalibrację metod pozwalających na analizę zachowań myszy – pełnej baterii testów badających zachowania relewantne dla modelowania chorób psychiatrycznych, w tym funkcji poznawczych. W tym kontekście szkoliłam naukowców z Wydziału Neurogenetyki z zakresu analizy behawioralnej modeli genetycznych i wspierałam w przeprowadzaniu eksperymentów behawioralnych i ich analizy, także w ramach prac licencjackich (*Bachelor*), dyplomowych czy doktorskich. Kwalifikacje wykładowczynie akademickiej zdobyłam podczas kursu dla kandydatów do habilitacji na Wydziale Medycznym Uniwersytetu Ludwika-Maksymiliana (LMU) w Monachium – Kurs był organizowany przez Instytut Dydaktyki i Badań nad Nauczaniem *MeCum Intensiv Seminar Lehre*. Podczas pracy w Klinice Psychiatrii w Monachium, poza działalnością ściśle naukową, prowadziłam wykłady poświęcone modelowaniu chorób psychiatrycznych w modelach zwierzęcych dla grup amerykańskich studentów przebywających gościnnie w Niemczech w ramach programu *DIS - Danish Institute for Study Abroad*; do dzisiaj okazjonalnie wygłaszam wykłady dla studentów tego Instytutu.

Wystąpienia wygłoszone na zaproszenie / wykłady na konferencjach naukowych:

BRZÓZKA MM. “*The schizophrenia risk gene Tcf4 modulates cognition and neuronal plasticity in a gene dosage- and environment-dependent manner*”. Science Festival, 24.07.2015, Klinik für Psychiatrie, München

BRZÓZKA MM. “*Tcf4 transgenic mice modelling cognitive dysfunction on schizophrenia*”. 4th Munich Kraepelin Symposium, 27.09.2014, Klinik für Psychiatrie, München

BRZÓZKA MM. “*Lessons from two different animal models of psychiatric diseases: Tcf4 transgenic and Sharp1/2 double knockout mice*”. Science Festival, 25.07.2014, Klinik für Psychiatrie, München

BRZÓZKA MM. “*Mice lacking the circadian modulators Sharp1 and Sharp2 display altered sleep and mixed state endophenotypes of psychiatric disorders*” EPA European Congress of Psychiatry, Munich, 1-4.03.2014

BRZÓZKA MM. “*Housing conditions modulate the cognitive performance in transgenic mice overexpressing the schizophrenia susceptibility gene Tcf4*” EPA European Congress of Psychiatry Munich, 1-4.03.2014

BRZÓZKA MM. “*Schizophrenia mouse model: Tcf4 transgenic mouse*”. Science Festival, 11.07.2013, Clinic of Psychiatry, Munich, Germany

BRZÓZKA MM. “*Tcf4 transgenic mouse: schizophrenia model*”. Zaproszenie Prof. Anton Bernalov, Firma Abbott, 17.12.2012, Ludwigshafen, Germany

BRZÓZKA MM. “*Genes, environment and schizophrenia*”. Zaproszenie Prof. Leszek Kaczmarek, Nencki Institute, 25.06.2012, Warsaw, Poland

BRZÓZKA MM. “*Gene×environment interactions in mouse models of schizophrenia*”. Zaproszenie Prof. Andreas Meyer-Lindenberg, Zentralinstitut für Seelische Gesundheit, 17.01.2012, Mannheim, Germany

BRZÓZKA MM. “*Psychosocial stress, cannabis and schizophrenia: about the development of schizophrenia mouse models*”. Max-Planck-Institute of experimental Medicine, 11.11.2009, Göttingen, Germany

BRZÓZKA MM. „*Psychosocial Stress, Cannabinoids and psychiatric diseases*”. 14. Conference on Addiction 2009, 23-25.09.2009, Tübingen, Germany

BRZÓZKA MM. „*Jet lag*“ Workshop: „*Circadian Activity Analysis*“, Max-Planck of Biophysical Chemistry 14.04.2008, Göttingen, Germany

Recenzentka prac naukowych w czasopismach międzynarodowych:

Recent Patents on Central Nervous System Drug Discovery

Neuroscience

Frontiers in Behavioral Neuroscience

International Journal of Neuropsychopharmacology

Cognitive, Affective, and Behavioral Neuroscience

Cell Reports

7. Inne informacje, dotyczące kariery zawodowej wnioskodawcy.

Stypendystka następujących programów:

- 2000-2001 Stypendium Naukowe Erasmus za osiągnięcia w nauce Getynga/Niemcy Uniwersytet Georga Augusta w Getyndze, Wydział Biologii
- 2004-2008 Stypendium naukowe Graduiertenkolleg 632 ufundowane przez Niemiecką Wspólnotę Badawczą (DFG, Deutsche Forschungsgemeinschaft) *Neuroplasticity: from molecules to systems*
Koordynator programu: prof. dr Walter Paulus
- Członkini Grupy Badawczej Clinical Research Group 241 ‘*Genotype–phenotype relationships and neurobiology of the longitudinal course of psychosis*’ wspieranej przez grant Niemieckiej Wspólnoty Badawczej (DFG, Deutsche Forschungsgemeinschaft)
(http://www.kfo241.de/staff_en.php; http://www.kfo241.de/staff_wp6_en.php)

Uprawnienia do przeprowadzania eksperymentów na zwierzętach:

- 10.2013 - Certyfikat FELASA kategoria C (dla osób zarządzających zwierzętarniami i odpowiedzialnych za prowadzenie eksperymentów na zwierzętach), wydany przez GWT – Gesellschaft fuer wissenschaftlichen Tierschutz mbH, tiz-bifo Akademie, Monachium, Niemcy
- 07.2007 - Kurs “Eksperymenty na zwierzętach laboratoryjnych”, Animals (Scientific Procedures) Act 1986 (ASPA) Certyfikat Nr 22436 (na szczury, myszy, króliki, świnki morskie) uprawnienia zdobyte podczas kursu w King’s College of London, ekwiwalent FELASA (*Federation of European Laboratory Animal Science Associations*) kategoria B. Londyn, Wielka Brytania.

Inne kursy doskonalenia zawodowego i praktyki:

- 2013 – 2015 studia podyplomowe Business Administration (MBA) – FOM: Fachhochschule für Oekonomie und Management, Monachium, Niemcy
- 07.2014 – *MeCum Intensiv Seminar Lehre*, Instytut Dydaktyki LMU, Monachium, Niemcy
- 11.2013 – Kurs Zarządzania *The art of leadership – fewer conflicts, more results*. European Molecular Biology Organization (EMBO), Heidelberg, Niemcy
- 09.2013 – Seminarium: Kariera, Kompetencje i Networking, Matuschek Consulting, Getynga, Niemcy
- 06-07.2013 Kurs Kompetencje w Zarządzaniu „*Führungskompetenz – praxisnah und intensiv*”, A47-Consulting i Klinika LMU w Monachium
- 06.2013 – Seminarium: *Get funded! English for grant writing*, TuTech Innovation, Hamburg, Niemcy
- 06.2004 – Praktyka w ramach organizacji IASTE (*The International Association for the Exchange of Students for Technical Experience*), Instytut Biologii Morskiej, Uniwersytet w Czarnogórze, Projekt: „Biologia i środowisko życia alg” Kotor, Czarnogóra
- 01-04.2000 – Praktyka w zakresie medycyny reprodukcyjnej, Klinika Ginekologiczna, Uniwersytet Georga Augusta w Getyndze, Dyrektor: prof. dr H.W. Michelmann. Temat: *Andrology and assisted human reproduction techniques (in vitro fertilisation [IVF], embryo transfer [ET], intracytoplasmatic sperm injection [ICSI]*

8. Piśmiennictwo

Agarwal A, Zhang M, Trembak-Duff I, Unterbarnscheidt T, Radyushkin K, Dibaj P, Martins De Souza D, Boretius S, **Brzózka MM**, Steffens H, Berning S, Teng Z, Gummert M, Tantra M, Guest PC, Willig Ki, Frahm J, Hell Sw, Bahn S, Rossner MJ, Nave K-A, Ehrenreich H, Zhang W*, and Schwab MH* (2014). *Dysregulated expression of Neuregulin-1 by cortical pyramidal neurons disrupts synaptic plasticity*. Cell Reports 21 Aug 2014 8(4):1130-45

Badowska DM, **Brzózka MM**, Chowdhury A, Malzahn D, Rossner MJ (2014) *Data calibration and reduction allows to visualize behavioural profiles of psychosocial influences in mice*. European Archives Of Psychiatry And Clinical Neuroscience, 2014 Sept 19.

Badowska DM[#], **Brzózka MM**[#], Kannaiyan N, Thomas C, Dibaj P, Chowdhury A, Steffens H, Turck CW, Falkai P, Schmitt A, Papiol S, Scheuss V, Willig KI, Martins-de-Souza D, Rhee JS, Malzahn D, Rossner MJ. (2020) *Modulation of cognition and neuronal plasticity in gain- and loss-of-function mouse models of the schizophrenia risk gene Tcf4*. Transl Psychiatry. 2020 Oct 9;10(1):343.

Baier PC[#], **Brzózka MM**[#], Shahmoradi A, Reinecke L, Kroos C, Wichert SP, Oster H, Wehr MC, Taneja R, Hirrlinger J, Rossner MJ. (2014) *Mice lacking the circadian modulators Sharp1 and Sharp2 display altered sleep and mixed state endophenotypes of psychiatric disorders*. PLOS one. 2014 Oct 23;9(10).

Bouter Y, **Brzózka MM**, Rygula R, Pahlisch F, Leweke FM, Havemann-Reinecke U, Rohleder C. (2020) *Chronic psychosocial stress causes increased anxiety-like behavior and alters endocannabinoid levels in the brain of C57Bl/6J Mice*. Cannabis Cannabinoid Res. 2020 Feb 27;5(1):51-61.

Brzózka MM, Falkai P, Havemann-Reinecke U (2009). *Für Schizophrenie braucht man Drei*. Suchtmedizin in Forschung und Praxis. 11(3):98-103.

Brzózka MM, Radyushkin K, Wichert SP, Ehrenreich H, Rossner MJ (2010). *Cognitive and sensorimotor impairments in transgenic mice overexpressing the schizophrenia susceptibility gene Tcf4 in the brain*. Biological Psychiatry Jul 1;68(1):33-40.

Brzózka MM, Fischer A, Falkai P, Havemann-Reinecke U (2011). *Acute treatment with cannabinoid receptor (CB1) agonist WIN55212-2 improves prepulse inhibition in psychosocially stressed mice*. Behavioral Brain Research Apr 15;218(2): 280-7

Brzózka MM and Rossner MJ (2013). *Deficits in trace fear memory in a mouse model of the schizophrenia risk gene TCF4*. Behavioral Brain Research Jan 15;237:348-56.

Brzózka MM, Havemann-Reinecke U, Wichert SP, Falkai P, Rossner MJ. (2015) *Molecular signatures of psychosocial stress and cognition are modulated by chronic lithium treatment*. Schizophrenia Bulletin 2015 Dec 28.

Brzózka MM, Unterbarnscheidt T, Schwab MH, Rossner MJ. (2016a) *OSO paradigm – a rapid behavioral screening method for acute psychosocial stress reactivity in mice*. Neuroscience, Feb 9;314:1-11.

Brzózka MM, Rossner MJ, De Hoz L. (2016b) *Tcf4 transgenic female mice display impaired flexibility learning measured with latent inhibition*. European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience 2015 Sept 24.

Falkai P, Rossner MJ, Schulze TG, Hasan A, **Brzózka MM**, Malchow B, Honer WG, Schmitt A. (2015) *Kraepelin revisited: Schizophrenia from degeneration to failed regeneration*. Molecular Psychiatry 2015 Mar 31.

Götze T, Soto-Bernardini MC, Zhang M, Mießner H, Linhoff L, **Brzózka MM**, Velanac V, Dullin C, Ramos-Gomes F, Peng M, Husseini H, Schifferdecker E, Fledrich R, Sereda MW, Willig K, Alves F, Rossner MJ, Nave KA, Zhang W, Schwab MH. (2021). *Hyperactivity is a Core Endophenotype of Elevated Neuregulin-1 Signaling in Embryonic Glutamatergic Networks*. Schizophr Bull. 2021 Aug 21;47(5):1409-1420.

Hasan, A., Roeh, A., Leucht, S., Langguth, B., Hansbauer, M., Oviedo-Salcedo, T., Kirchner, S. K., Papazova, I., Löhrs, L., Wagner, E., Maurus, I., Strube, W., Rossner, M. J., Wehr, M. C., Bauer, I., Heres, S., Leucht, C., Kreuzer, P. M., Zimmermann, S., Schneider-Axmann, T., Falkai, P. (2020). *Add-on spironolactone as antagonist of the NRG1-ERBB4 signaling pathway for the treatment of schizophrenia: Study design and methodology of a multicenter randomized, placebo-controlled trial*. Contemporary clinical trials communications, 17, 100537. <https://doi.org/10.1016/j.conctc.2020.100537>

Hashimoto R, Straub RE, Weickert CS, Hyde TM, Kleinman JE, Weinberger DR (2004) *Expression analysis of neuregulin-1 in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia*. Mol Psychiatry 9: 299 – 307

Quednow BB, **Brzózka MM**, Rossner MJ. (2014) *Transcription factor 4 (Tcf4) and schizophrenia: integrating the animal and the human perspective*. Review, Cellular and Molecular Life Sciences 7 Aug 2014.

Rygula R, Abumaria N, Flügge G, Fuchs E, Rütther E, Havemann-Reinecke U. (2005) *Anhedonia and motivational deficits in rats: impact of chronic social stress*. Behav Brain Res. 2005 Jul 1;162(1):127-34. doi: 10.1016/j.bbr.2005.03.009. Epub 2005 Apr 14. PMID: 15922073.

Stefansson H, Ophoff RA, Steinberg S, Andreassen OA, Cichon S, Rujescu D, et al. (2009): *Common variants conferring risk of schizophrenia*. Nature 460:744 –747.

van Os J, Kapur S (2009) Schizophrenia. Lancet 374:635– 645.

Volkman P, Stephan M, Krackow S, Jensen N, Rossner MJ. *PsyCoP - A Platform for Systematic Semi-Automated Behavioral and Cognitive Profiling Reveals Gene and Environment Dependent Impairments of Tcf4 Transgenic Mice Subjected to Social Defeat*. Front Behav Neurosci. 2021 Jan 14;14:618180. doi: 10.3389/fnbeh.2020.618180.

Wehr MC[#], Hinrichs W[#], **Brzózka MM**, Unterbarnscheidt T, Herholt A, Wintgens JP, Papiol S, Soto-Bernardini MC, Kravchenko M, Zhang M, Nave KA, Wichert SP, Falkai P, Zhang W, Schwab MH, Rossner MJ. (2017) *Spironolactone is an antagonist of NRG1-ERBB4 signaling and schizophrenia-relevant endophenotypes in mice*. EMBO Mol Med. 2017 Oct;9(10):1448-1462.

Wehr MC, Laage R, Bolz U, Fischer TM, Grünewald S, Scheek S, Bach A, Nave KA, Rossner MJ. (2006) *Monitoring regulated protein-protein interactions using split TEV*. Nat Methods. 2006 Dec;3(12):985-93. doi: 10.1038/nmeth967. Epub 2006 Oct 29. PMID: 17072307.

.....
(podpis wnioskodawcy)