



mgr Magdalena Zygmunt

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

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Neurofarmakologii Molekularnej

Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie

Promotor: dr hab. Jan Rodriguez Parkitna

Promotor pomocniczy: dr Michał Korostyński

Kraków, 2019

Pragnę podziękować

Mojemu Promotorowi, dr hab. Janowi Rodriguezowi Parkitnie, za dzielenie się wiedzą i doświadczeniem, cenne uwagi oraz pomoc w wykonaniu niniejszej pracy.

Mojemu drugiemu Promotorowi dr Michałowi Korostyńskiemu, za nieocenioną pomoc, poświęcony czas i wytrwałość w poprawianiu niniejszej pracy oraz wielu innych wniosków i prezentacji.

Wszystkim Koleżankom i Kolegom z Zakładu Neurofarmakologii Molekularnej za życzliwość i pomoc.

W szczególności Sławkowi, za możliwość uczenia się od najlepszego biologa molekularnego.

Łukaszowi, Adze, Uli i Lidce za rozmowy, wsparcie, możliwość ponarzekania.

Dzięki Wam zawsze będę miło wspominać lata spędzone w IF PAN.

Kamili i Przemkowi, za dzielenie doli i niedoli doktoranta.

Marcinowi, Dżesice, Asi i Jackowi – za ogromną pomoc bioinformatyczną.

Pani Prof. dr hab. Sylwii Kędrackiej-Krok, dr Urszuli Jankowskiej oraz mgr Bożenie Skupień-Rabian dziękuję za pomoc w eksperymentach z analizą spektrometrii mas.

Monice, Oli i Monice z Małopolskiego Centrum Medycznego za wyrozumiałość.

Moim Rodzicom i Dziadkom za nieustanną wiarę we mnie.

I Bronkowi - za wieczny optymizm.

Podczas badań prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej, otrzymywałam specjalne stypendium naukowe ze środków KNOW. Dziękuję również Narodowemu Centrum Nauki za udzielone wsparcie finansowe w postaci grantu PRELUDIUM (2016/23/N/NZ3/00133)

Streszczenie

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

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

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

W pierwszym etapie badań przeprowadziłam pogłębioną analizę zmian transkryptomu zachodzącą pod wpływem leków psychotropowych. Wykorzystałam metodę sekwencjonowania następnej generacji (NGS), do zbadania zmian ekspresji transkryptów w dwóch strukturach mózgu

mysz (kora przedczołowa i jądro półleżące przegrody) wywołanych podaniem leków reprezentujących różne klasy terapeutyczne. Wykazałam, że transkrypty można podzielić na podgrupy, dla których określony został specyficzny wzór regulacji, zaangażowane czynniki transkrypcyjne i ontologie funkcjonalne. Zmiany w ekspresji zidentyfikowanych przez RNA-seq alternatywnych transkryptów genów potwierdziłam w niezależnych doświadczeniach z wykorzystaniem ilościowej reakcji PCR.

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

Podsumowując, w wyniku badań prowadzonych w ramach mojej rozprawy doktorskiej zidentyfikowany został zbiór wariantów transkrypcyjnych oraz niekodujących RNA regulowanych podaniem leków psychotropowych. W dalszych doświadczeniach dokonałam weryfikacji wywołanych działaniem leków zmian ekspresji wybranych alternatywnych transkryptów, poświęcając szczególną uwagę *Dclk1*. Zidentyfikowałam nowy krótki transkrypt i pokazałam, że jego ekspresja prawdopodobnie zależna jest od aktywacji receptorów 5HT_{2A}. Otrzymane wyniki mogą pomóc zrozumieć udział *Dclk1-m* w regulacji procesów neuroplastycznych wywołanych przez leki psychotropowe, których efekty mediowane są poprzez receptory 5HT_{2A}. Moje wyniki znacząco pogłębiają zrozumienie działania leków na ekspresję genów, przenosząc analizę na poziom indywidualnych transkryptów. Mam nadzieję, że przyczyni się to do możliwości klasyfikacji leków psychotropowych w oparciu o ich molekularne mechanizmy działania. W dalszej perspektywie, zgromadzona wiedza może otworzyć nowe perspektywy w badaniach neurobiologicznych podstaw leczenia zaburzeń psychotycznych i afektywnych, w tym wyjaśnić rolę zróżnicowania sekwencji genu *DCLK1* w podatności na choroby psychotyczne i afektywne.

Abstract

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

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

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

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

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

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

Spis treści

Spis treści	7
I. Wstęp	10
1. Metody klasyfikacji leków psychotropowych	10
2. Regulacja transkrypcji genów	12
3. Alternatywna transkrypcja genów	16
4. Zmiany ekspresji genów w mózgu	19
5. Przykłady alternatywnego splicingu genów w mózgu	22
6. Regulacja ekspresji niekodującego RNA w ośrodkowym układzie nerwowym	24
7. Poszukiwanie wspólnych cech łączących grupy podobnie regulowanych genów	26
8. Molekularna klasyfikacja leków psychotropowych	28
II. Cel badań	31
III. Materiały i metody	32
1. Zwierzęta	32
2. Podania leków	32
3. Preparacja tkanki i izolacja RNA	33
4. Sekwencjonowanie transkryptomu	35
4.1 Przygotowanie bibliotek DNA	36
4.2 Namnażanie biblioteki cDNA w emulsji	37
4.3 Proces sekwencjonowania transkryptomu	39
5. Pomiar poziomu mRNA metodą ilościowego PCR	39
6. Detekcja białkowego produktu genu <i>Dclk1</i>	41
6.1 Przygotowanie próbek do analizy białek	41
6.2 Analiza spektrometrii mas	42
7. Analiza danych	42
7.1 Analiza danych mikromacierzowych	42
7.2 Analiza danych z sekwencjonowania następnej generacji	43

7.3 Klasyfikacja transkryptów	43
7.4. Analiza obszarów regulatorowych genów	44
7.5. Grupowanie funkcjonalne genów	44
7.6. Porównanie ekspresji transkryptomu regulowanego podaniem leków z bazą danych transkryptomów pojedynczych komórek kory wzrokowej	44
7.7. Analiza wyników qPCR	45
IV. Wyniki	46
1. Zmiany transkryptomu wywołane podaniem leków psychotropowych	46
2. Komórkowa klasyfikacja zmian transkrypcji genów wywołanych podaniem leków psychotropowych	53
3. Wpływ leków psychotropowych na ekspresję wybranych genów	56
3.1 Weryfikacja wyników sekwencjonowania przy pomocy metody qPCR	56
3.2 Potwierdzenie ekspresji alternatywnych wariantów wybranych genów przy pomocy metody qPCR	58
4. Zmiany ekspresji <i>Dclk1</i> po podaniu leków psychotropowych	60
5. Regulacja ekspresji izoform <i>Dclk1</i>	62
6. Identyfikacja nowej izoformy genu <i>Dclk1</i>	63
7. Potwierdzenie zmian ekspresji izoform <i>Dclk1</i> metodą qPCR	65
8. Zmiany ekspresji izoform <i>Dclk1</i> w czasie po podaniu mianseryny i rysperydonu	67
9. Potencjalne funkcje nowo wykrytego wariantu <i>Dclk1</i>	69
V. Dyskusja	71
1. Zmiany w profilu ekspresji genów wywołane podaniem poszczególnych leków psychotropowych	71
2. Analiza transkryptomu w kontekście alternatywnych wariantów genów	78
3. Charakterystyka wybranych genów regulowanych podaniem leków psychotropowych	81
4. Wybiórcza regulacja ekspresji transkryptów genu <i>Dclk1</i>	83
5. Wykorzystanie wyników pochodzących z sekwencjonowania transkryptomu pojedynczych komórek	87

VI. Podsumowanie i wnioski	89
VII. Wykaz wybranych skrótów	91
VIII. Spis rycin	93
IX. Spis tabel	95
X. Bibliografia	96
XI. Tabele dodatkowe	112

I. Wstęp

Początki badań dotyczących molekularnych podstaw procesów zachodzących w mózgu sięgają lat 60-tych ubiegłego stulecia, kiedy to pojawiły się pierwsze postulaty, że u podłoża uczenia się i pamięci leżą procesy biochemiczne związane z udziałem białek i kwasów nukleinowych [1]. Przełomowe dla rozwoju dziedziny były doświadczenia wykonywane na organizmie modelowym, ślimaku morskim *Aplysia californica*. Kandel i wsp. przeprowadzili szereg doświadczeń pokazując, że podczas gdy pamięć krótkotrwała powstaje dzięki oddziaływaniom pomiędzy białkami, pamięć długotrwała wymaga ekspresji genów [1, 2]. Opisane wyniki wskazały na możliwość przeprowadzenia molekularnej analizy podstaw procesu powstawania i utrzymywania się śladów pamięciowych. Był to początek wielu lat badań nad zjawiskami zachodzącymi w centralnym układzie nerwowym. Za badania nad fizjologicznymi podstawami mechanizmów pamięci Eric Kandel wraz z Arvidem Carlssonem i Paulem Greengardem otrzymali w 2000 roku Nagrodę Nobla w dziedzinie Fizjologii lub Medycyny.

Połączenia pomiędzy komórkami neuronalnymi w mózgu mogą ulegać przebudowie lub modulacji w wyniku procesów biologicznych określanych jako plastyczność neuronalna. Neuroplastyczność ma podstawowe znaczenie zarówno dla procesów fizjologicznych, takich jak uczenie, pamięć jak i patologicznych – jak np. zmiany będące przyczyną depresji czy psychozy. Biologiczne podstawy zaburzeń psychicznych są związane z nieprawidłowym działaniem układów neuronalnych kształtujących emocje, motywacje oraz nastroj. Badania epidemiologiczne pokazują, że każdego roku 38% populacji Unii Europejskiej cierpi z powodu różnego typu zaburzeń psychicznych, m.in. depresji, psychoz, uzależnień i zaburzeń lękowych [3]. Umiarkowana skuteczność stosowanych leków psychotropowych, częste nawroty objawów choroby oraz wysokie koszty terapii wskazują na potrzebę poszukiwania etiologii schorzeń psychicznych oraz na poznanie mechanizmów działania leków w celu opracowywania precyzyjnych terapii. Leki psychotropowe przywracają prawidłowe funkcje poszczególnych systemów neuroprzekaźnikowych poprzez oddziaływanie na specyficzny zestaw receptorów komórkowych. Uważa się, że na poziomach komórkowym i molekularnym działanie leków psychotropowych jest związane z modulacją plastyczności neuronalnej.

1. Metody klasyfikacji leków psychotropowych

Leki psychotropowe to w najszerszym ujęciu wszelkie substancje, które mają wpływ na funkcje psychiczne, czyli zmiany nastroju, percepcji, myślenia i zachowania. Jest to szerokie pojęcie i dotyczy zarówno leków stosowanych do leczenia zaburzeń psychicznych, jak i substancji narkotycznych, odurzających czy w niektórych przypadkach leków stosowanych przeciwbólowo. Inna

definicja podaje, że leki psychotropowe, to preparaty posiadające zdolność przekraczania bariery krew-mózg i wpływania na funkcjonowanie ośrodkowego układu nerwowego. Istnieje co najmniej kilka klasyfikacji leków psychotropowych, jednakże najczęściej stosowany jest podział oparty na ich zastosowaniu klinicznym. Wyróżniane są główne grupy leków przeciwdepresyjnych, przeciwpsychotycznych (neuroleptycznych), normotymicznych (stabilizatorów nastroju), przeciwlękowych (anksjolitycznych), nasennych oraz prokognitywnych (nootropowe).

Większość leków psychotropowych wykazuje szerokie spektrum działania. Wymienione grupy obejmują substancje o różnej budowie chemicznej, różnych właściwościach fizycznych i odmiennych profilach receptorowych. Obecna nomenklatura nie wskazuje na mechanizm działania leków, a także nie opisuje wszystkich potencjalnych zastosowań danej substancji. Leki z jednej grupy wykazują zróżnicowaną skuteczność w klinice, a ich efekty mogą być ograniczone do konkretnych podtypów lub objawów danego zaburzenia. Dobrym przykładem są leki przeciwdepresyjne, podzielone na podgrupy w zależności od ich głównych celów farmakologicznych. Wyróżniane są m.in. inhibitory wychwyty zwrotnego neuroprzekaźników (np. selektywne inhibitory zwrotnego wychwyty serotoniny, jak fluoksetyna lub inhibitory wychwyty zwrotnego serotoniny i noradrenaliny SNRI, do których należy wenlafaksyna), leki o receptorowych mechanizmach działania (np. antagoniści receptorów α_2 i 5HT₂ jak mianseryna), inhibitory monoaminooksydazy (np. tranilcypromina) oraz leki o atypowych mechanizmach działania (takie jak tianeptyna lub agomelatyna). Zazwyczaj pierwszą linię leczenia stanowią leki przeciwdepresyjne z grupy selektywnych inhibitorów zwrotnego wychwyty serotoniny ze względu na relatywnie szeroki zasięg skuteczności oraz mało działań niepożądanych. Jednakże około połowa pacjentów odczuwa korzyść z terapii dopiero po zmianie na alternatywny lek przeciwdepresyjny lub po dodaniu drugiego leku, często należącego do innej grupy klinicznej [4]. Z uwagi na plejotropowe działanie w przypadku depresji psychotycznej bardziej skuteczna może okazać się mianseryna, a przy silnych objawach anhedonii - tranilcypromina [5].

Często leki sklasyfikowane w jednej grupie są w praktyce stosowane do leczenia wielu jednostek chorobowych. Leki przeciwdepresyjne stosowane są również w zaburzeniach odżywiania i zaburzeniach obsesyjno-kompulsyjnych. Leki przeciwpsychotyczne są stosowane w leczeniu psychozy towarzyszącej np. schizofrenii, ale także manii, niektórych typów depresji, zespołu Tourette'a i agresji. Ciekawe jest działanie leków na zjawisko zmiany faz pomiędzy stanami manii i depresji, które jest charakterystyczną cechą choroby afektywnej dwubiegunowej. Leki stosowane w celu zmniejszenia objawów depresyjnych mogą wykazywać zdolność do indukowania manii, natomiast neuroleptyki redukujące objawy manii mogą powodować przejście w fazę depresji. Znaczna część antydepresantów z grupy trójcyklicznych leków przeciwdepresyjnych (np. imipramina) lub selektywnych inhibitorów zwrotnego wychwyty noradrenaliny i serotoniny (np. wenlafaksyna)

powoduje przejście z depresji w manię, z kolei inne jak np. mianseryna nie wywołują tego efektu. Typowe neuroleptyki (np. haloperydol), będące antagonistami receptorów D2, mogą ze znacznym prawdopodobieństwem powodować zmianę fazy z maniakalnej na depresyjną, natomiast atypowe neuroleptyki (np. rysperydon) cechują się relatywnie niskim ryzykiem zmiany fazy [6].

Od lat rozważane jest udoskonalenie klasyfikacji leków psychotropowych. Proponowane były inne formy nazewnictwa i sposoby klasyfikacji leków, np. klasyfikacja oparta o profil działania farmakologicznego, jednakże nowe rozwiązania nie zyskały akceptacji wśród klinicystów [7, 8]. Nie zmienia to faktu, że szerokie spektrum działania poszczególnych leków psychotropowych komplikuje ich stosowanie i wprowadza konieczność personalizacji leczenia. Współczesna neurofarmakologia wciąż stoi przed wyzwaniem udoskonalenia klasyfikacji leków psychotropowych. Poznanie mechanizmów działania leków na poziomie molekularnym pozwala na wykorzystanie do celów klasyfikacji nowych parametrów. Leki psychotropowe mogą działać poprzez rekonstrukcję i normalizację połączeń neuronalnych w konkretnych obszarach mózgu osoby chorej [9]. Jest to potencjalne wytłumaczenie dlaczego efekty terapeutyczne leków psychotropowych zwykle pojawiają się dopiero po dłuższym czasie ich stosowania. Ustanowienie trwałych zmian w strukturze połączeń neuronalnych wymaga regulacji ekspresji genów i syntezy nowych białek [10, 11]. Zmiany te mogłyby służyć jako markery procesów biologicznych aktywowanych przez leki psychotropowe oraz pomóc w zrozumieniu mechanizmów terapeutycznych. Ponadto porównanie profili działania poszczególnych leków psychotropowych na poziomie molekularnym zapewnia dodatkowe kryteria dla racjonalnej klasyfikacji leków psychotropowych.

2. Regulacja transkrypcji genów

Kontrola ekspresji genów odgrywa kluczową rolę w działaniu komórki. Jest podstawą różnicowania się typów komórek oraz zdolności dostosowania funkcji w odpowiedzi na sygnały pochodzące z otoczenia. Badania ostatnich lat pokazują, że wiele mechanizmów regulacji ekspresji genów, które zachodzą podczas rozwoju i różnicowania organizmu jest również zaangażowanych u dorosłych osobników jako proces adaptacji komórek do bodźców zewnętrznych. Mechanizmy zaangażowane w regulację transkrypcji są złożone, angażując przede wszystkim aktywację i hamowanie czynników transkrypcyjnych, modyfikację struktury chromatyny i DNA oraz regulację na poziomie niekodujących RNA [12].

Najlepiej opisany mechanizm regulacji ekspresji genów zachodzi poprzez czynniki transkrypcyjne czyli białka, które w odpowiedzi na wewnątrzkomórkowe ścieżki przekazu sygnału wiążą się do specyficznej sekwencji DNA. Miejsca wiązania zazwyczaj znajdują się w regionach promotorowych i wzmacniających (*ang. enhancer*) genów docelowych. Interakcje czynników

transkrypcyjnych oraz struktury DNA prowadzą do wzrostu lub spadku ekspresji genu. Mechanizmy regulacji polegają na ułatwianiu lub blokowaniu przyłączania kolejnych białek wchodzących w skład kompleksu transkrypcyjnego dla polimerazy RNA II. Czynniki transkrypcyjne działają jako części dużych kompleksów białkowych, które po części wpływają na modelowanie struktury chromatyny, by ułatwić wiązanie polimerazy. Promotory dla polimerazy RNA II można opisać jako serię modułów czyli krótkich sekwencji nukleotydowych będących miejscem wiązania białka mającego wpływ na składanie kompleksu inicjującego transkrypcję. Można wyróżnić moduły, które biorą udział w utrzymaniu podstawowego poziomu transkrypcji oraz takie, które kontrolują inicjację transkrypcji w odpowiedzi na sygnały z zewnątrz komórki. Te drugie mają istotniejsze znaczenie z punktu widzenia poniższej rozprawy i obejmują np. moduł odpowiedzi na cykliczne AMP – CRE (*ang. cAMP response element*) rozpoznawany przez aktywator CREB [13]. Transdukcja sygnału odbywa się poprzez przekaźnik cAMP wytwarzany z ATP w odpowiedzi m.in. na pobudzenie niektórych receptorów błonowych komórek. Większość genów posiada tzw. promotory alternatywne. Dobrym przykładem jest ludzki gen kodujący dystrofinę, w którym mutacje są przyczyną choroby – dystrofii mięśniowej Duchenne’a. Gen ten posiada przynajmniej siedem alternatywnych promotorów, z których trzy leżą po stronie 5’ genu i są aktywne w różnych tkankach (korze mózgowej, mięśniach i mózdzku), zaś pozostałe cztery są położone wewnątrz genu i powstają z nich krótsze transkrypty, również specyficzne tkankowo [14, 15]. Co ciekawe, pomimo nazwy „promotor alternatywny”, mogą być one aktywne równocześnie. Każdy z promotorów ma specyficzną strukturę modułarną i może być regulowany przez ten sam lub inny wzmacniacz (*ang. enhancer*) i wyciszacz (*ang. silencer*). Białka stymulujące inicjację transkrypcji nazywa się aktywatorem lub koaktywatorem, w zależności od tego czy specyficznie wiąże się do konkretnych sekwencji DNA czy też wiąże DNA niespecyficznie lub poprzez inne białka. Niektóre aktywatory rozpoznają miejsca położone w niedalekiej odległości powyżej elementów promotorowych i wpływają na inicjację transkrypcji tylko z promotora, zaś inne-mogące wiązać się z sekwencjami wchodzącymi w skład wzmacniaczy - powodują jednoczesne oddziaływanie na transkrypcję wielu genów.

Słabiej poznany jest mechanizm represji transkrypcji. Początkowo sądzono, że represja nie pełni istotnej roli w procesie kontroli transkrypcji u eukariontów, z uwagi na obserwacje wskazujące na bardzo niski podstawowy poziom transkrypcji genów z udziałem promotora polimerazy RNA II. Kolejne odkrycia opisują jednakże coraz więcej białek wiążących DNA biorących udział w represji inicjacji transkrypcji. Podobnie jak w przypadku aktywatorów, represory również mogą wiązać się z elementami położonymi powyżej promotora podstawowego lub oddalonymi sekwencjami wyciszającymi. Na przykład sekwencja NRSE (*ang. neuron-restrictive silencer element*) zidentyfikowana w okolicy niektórych genów o wysokim poziomie ekspresji w neuronach, np. w genie

kodującym podjednostkę $\beta 2$ receptora nikotynowego, odpowiada za wyciszenie transkrypcji tych genów w innego typu komórkach [16].

Właściwa kontrola nad aktywnością czynników transkrypcyjnych, aktywatorów i represorów ma kluczowe znaczenie dla zachowania homeostazy komórki. Jednym z mechanizmów kontroli ich aktywności jest chemiczna modyfikacja, na przykład fosforylacja lub zmiana konformacji. Proces ten jest szybszy niż synteza białka *de novo* i umożliwia komórce natychmiastową odpowiedź na bodziec zewnętrzny. Przykładem takiego mechanizmu jest czynnik transkrypcyjny NF- κ B, który jest utrzymywany w cytoplazmie przez białko I κ B, które maskuje sygnał lokalizacji jądrowej białka NF κ B. Fosforylacja I κ B, np. przez kinazę PKC prowadzi do oddysocjowania NF κ B i jego translokacji do jądra. Z kolei inne czynniki, jak np. CREB są obecne w jądrze komórkowym i uaktywniają się po fosforylacji przez odpowiednią kinazę, która translokuje do jądra i rekrutuje białko adaptorowe np. CBP. Proces ten prowadzi do interakcji z podstawowym kompleksem transkrypcyjnym, modyfikacji histonów i wzmocnieniem transkrypcji. CREB należy do rodziny białek zawierających motyw suwaka leucynowego, do której zaliczane są również białka CREM (*ang.* cAMP Responsive Element Modulator) i ATF (*ang.* activating transcription factor). Wiele czynników transkrypcyjnych jest zdolnych do formowania kompleksów, które istotnie zwiększają możliwość regulacji ekspresji genów w komórce. Ważną rodziną czynników transkrypcyjnych pełniących istotne funkcje w komórkach nerwowych są kompleksy AP-1 (*ang.* activator protein 1) zbudowane z białek z rodziny Fos (c-Fos, Fra-1, Fra-2, FosB) i Jun (c-Jun, JunB, JunD). Co ciekawe, sekwencja do której białka z tej rodziny wiążą się do DNA jako hetero- lub homodimery różni się tylko jednym nukleotydem od sekwencji CRE. Odrębną grupę czynników transkrypcyjnych stanowią receptory hormonów sterydowych – niezwykle ważne w różnicowaniu komórek nerwowych oraz w odpowiedzi na bodźce związane ze stresem i reakcją na leki. Przykładem jest receptor glikokortykoidowy (GR, *ang.* glucocorticoid receptor), który jest obecny w cytoplazmie komórki w formie nieaktywnej – związany m.in. z białkami szoku cieplnego. Po związaniu liganda (np. kortyzolu u ludzi lub kortykosteronu u gryzoni) następuje oddysocjowanie receptora, homodimeryzacja, translokacja do jądra komórkowego i aktywacja transkrypcji poprzez związanie ze swoistą sekwencją DNA.

Mniej wiadomo na temat mechanizmów kończących transkrypcję. Terminacja syntezy większości mRNA jest połączona z poliadenylacją czyli dodaniem sekwencji złożonej z samych reszt adenozyiny (do 250) na końcu 3' transkryptu [17]. Sygnałem do poliadenylacji (PAS, *ang.* poly(A) site) jest sekwencja obecna w mRNA, z których najczęściej występująca to 5'-AAUAAA-3'. Jeden z postulowanych modeli terminacji transkrypcji zakłada, że polimeraza RNA II w niejasny jak dotąd sposób wykrywa przejście przez funkcjonalne PAS, co powoduje przyłączenie złożonego kompleksu białkowego CPA (*ang.* cleavage and polyadenylation). W rezultacie dochodzi do zmiany konformacji

w miejscu aktywnym PolII, wstrzymania transkrypcji i oddysocjowania enzymu od DNA [18]. Poliadenylacja stanowi część mechanizmu terminacji transkrypcji, niemniej jednak rola ogona poli(A) nie jest w pełni wyjaśniona. Jego występowanie jest łączone ze stabilnością transkryptu oraz inicjacją translacji. mRNA nieulegające poliadenylacji stanowią relatywnie małą grupę, jednakże mogą pełnić podstawowe dla komórki funkcje, czego najlepszym przykładem są mRNA kodujące białka histonowe.

Odrębny rodzaj mechanizmu regulacji ekspresji genów odbywa się przy udziale niekodujących RNA (ncRNA, ang. non-coding RNA). Zarówno małe (<200 nukleotydów), jak i długie (>200 nukleotydów) niekodujące RNA są ważnymi regulatorami ekspresji genów. Funkcje ncRNA obejmują syntezę białek (np. tRNA i rRNA), modyfikacje RNA (np. snoRNA) i post-transkrypcyjne wyciszanie (np. miRNA, siRNA i piRNA) [19, 20]. Jednym z lepiej opisanych mechanizmów jest regulacja transkrypcji poprzez mikroRNA (miRNA). miRNA jest komplementarny do fragmentu komórkowego RNA, dzięki czemu tworzy pary zasad ze swoją sekwencją docelową, co prowadzi do cięcia mRNA. Często miRNA przyłączają się do nie ulegającego translacji regionu 3' docelowego RNA, czasem w wielu kopiach. W efekcie prowadzą do wyciszenia mRNA [21]. Ponadto szacuje się, że istnieje około 20 000 długich ncRNA (lncRNA), które mogą uczestniczyć w regulacji transkrypcji genów poprzez modyfikację dynamiki chromatyny, modulowanie aktywności czynników transkrypcyjnych lub interakcje wynikające z komplementarności do sekwencji genu [22]. Ważne by podkreślić w tym miejscu, że o ile początkowo skupiano się głównie na sposobie regulacji genomu przez białka, to odkrycie że cząsteczki RNA mogą być równie istotne pod tym względem doprowadziło do zmiany postrzegania mechanizmów kontroli funkcji komórek na poziomie molekularnym.

Rozwój badań nad strukturą chromatyny sprawił, że wiele uwagi poświęcono w ostatnich latach badaniu zmian epigenetycznych, które zachodzą równolegle i uzupełniająco do innych form regulacji transkrypcji. Modyfikacje białek histonowych tworzących nukleosomy decydują o stopniu upakowania chromatyny, a tym samym bezpośrednio wpływa na aktywność genomu [23]. Najlepiej poznana została acetylacja histonów, czyli przyłączanie grupy acetylowej do reszt lizynowych w N-końcowym fragmencie histonu rdzeniowego. Taka modyfikacja zmniejsza powinowactwo histonów do DNA destabilizując strukturę włókna chromatynowego i tym samym ułatwiając powstanie kompleksu polimerazy. Jedną z grup enzymów zaangażowanych w ten proces są acetylotransferazy histonów wśród których wyróżnia się przynajmniej pięć różnych rodzin białek (HAT, ang. *histone acetyltransferase*). Aktywacja genów jest procesem odwracalnym, a enzymy, które przywracają wyjściową strukturę chromatyny to deacetylazy histonów (HDAC, ang. *histone deacetylase*). Znane są ponadto przynajmniej trzy inne rodzaje modyfikacji kowalencyjnych białek histonów: metylacja reszt lizynowych i argininowych, fosforylacja reszt serynowych oraz ubikwitynacja reszt lizynowych [24]. Rozwój badań nad różnorodnością różnych typów modyfikacji histonów oraz sposobu ich

wzajemnego oddziaływania doprowadził do sformułowania hipotezy dotyczącej kodu histonowego, zgodnie z którą wzór chemiczny modyfikacji histonów miałby określać, który region genomu ulega ekspresji w danym czasie i kieruje innymi aspektami biologii genomu [25]. Kluczową dla aktywności genomu rolę odgrywają również modyfikacje chemiczne samego DNA. Możliwe jest długotrwałe wyciszenie regionów DNA lub nawet całego chromosomu. Przykładem jest tutaj metylacja DNA czyli przeprowadzana przez enzymy metylotransferazy DNA reakcja przyłączenia grupy metylowej do cytozyny tworzącej łańcuch DNA [26].

Udział opisanych powyżej mechanizmów regulacji ekspresji genów wskazywany jest również w rozwoju chorób psychicznych takich jak depresja, schizofrenia lub uzależnienie. Przykładowo, stwierdzono, że przewlekłe podania kokainy prowadziły do zwiększenia poziomu acetylacji histonów H3 i H4 [27] oraz zaburzeń aktywności enzymu metylotransferazy DNMT3a [28]. Szereg kolejnych prac wskazuje na wzrost acetylacji histonów w regionach hipokampa po wystawieniu myszy lub szczurów na czynniki stresowe (w teście wymuszonego pływania lub teście porażki społecznej) [29, 30]. Badanie zmian regulacji funkcji histonów i struktury chromatyny w mózgu wywołanych działaniem substancji psychoaktywnych jest w tym momencie odrębną dziedziną badań. Dotychczas najwięcej danych pochodzi z eksperymentów z wykorzystaniem substancji uzależniających, jednakże opublikowane zostały także prace dotyczące wpływu leków psychotropowych, np. haloperidolu i kwasu walproinowego [31-33]. Część badaczy przypuszcza, że terapie epigenetyczne, wpływające na deacetylację histonów lub metylację DNA, mogą być drogą do odkrycia nowszych i bardziej skutecznych leków [34].

3. Alternatywna transkrypcja genów

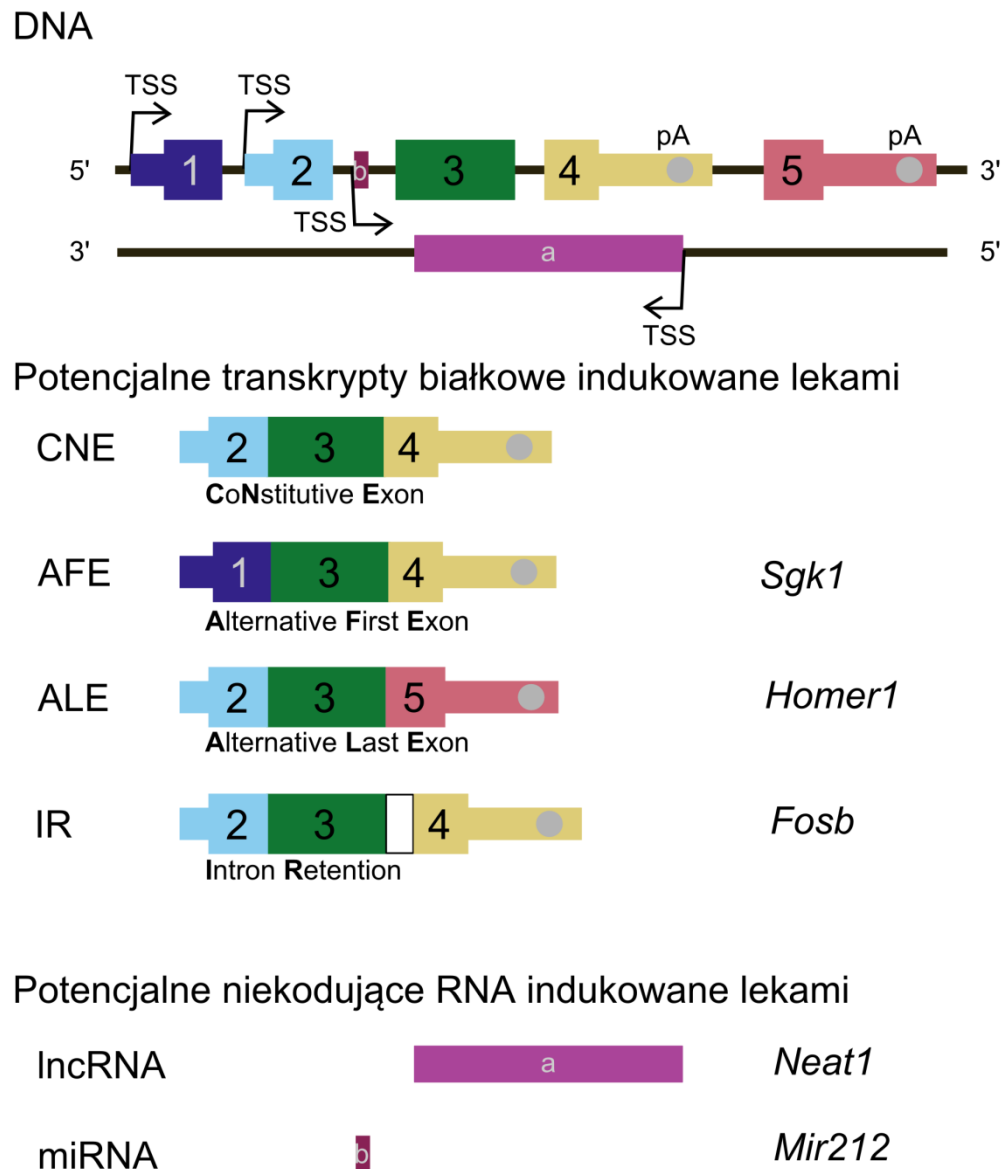
Rozważania na temat ekspresji genów chciałabym rozpocząć od zdefiniowania czym jest gen. Pomimo powszechnego użycia, termin ten jest niejednoznaczny. Wczesne definicje skupiały się na genach kodujących białka i traktowały geny jako oddzielne, precyzyjnie określone fragmenty genomu. Ta definicja ulegała zmianie wraz z postępem metod wysokoprzepustowego odczytu sekwencji genomów i transkryptomów. Okazało się, że dla większości *loci* ekspresji ulega wiele transkryptów, zarówno kodujących jak i niekodujących białka. Te alternatywne transkrypty mają często odmienne miejsce startu transkrypcji, które mogą być od siebie oddalone nawet o ponad 100 000 par zasad. Dlatego, uwzględniając obecny stan wiedzy o regulacji transkrypcji zasadnym jest zdefiniowanie genu jako zestawu fragmentów genomu zaangażowanych w ekspresję określonej jednostki transkrypcyjnej (Rycina 1) [35].

Większość genów ulega procesowi alternatywnego składania (ang. *alternative splicing*), w wyniku którego mogą powstawać mRNA kodujące odmienne białka oraz niekodujące, regulatorowe RNA. Proces ten istotnie zwiększa repertuar możliwości odpowiedzi komórki na bodźce zewnętrzne i

zmiany środowiska. Ekspresja genów podlega kontroli na wielu poziomach, od transkrypcji do procesowania RNA i translacji. Proces alternatywnego składania jest szczególnie rozpowszechniony w przypadku genów wykazujących ekspresję w ośrodkowym układzie nerwowym [36]. Wynika to zarówno z mnogości typów komórek jak i liczby różnych transkryptów występujących w komórkach nerwowych. Wariantowa ekspresja obejmuje wykorzystanie alternatywnych promotorów transkrypcji, alternatywnej terminacji transkrypcji, alternatywnych miejsc „splicingowych” oraz wykorzystania eksonów kasetowych czy retencji intronu.

Cześć regulacji alternatywnego składania eksonów odbywa się na późnych etapach obróbki RNA zachodzących w spliceosomie [37]. Coraz więcej informacji wskazuje jednak, że kluczowy wpływ na budowę transkryptu ma regulacja zachodząca na wczesnych etapach ścieżki kontrolującej ekspresję genu. Procesy kontroli zachodzą poprzez wzajemne oddziaływanie między czynnikami *cis* (czyli sekwencjami regulatorowymi w obrębie promotorów i wzmacniaczy) oraz *trans* (białka wiążące się do sekwencji regulatorowych), które promują lub represjonują rozpoznawanie sygnałów kluczowych dla obróbki transkryptów czyli miejsc 5' splicingowych, miejsc rozgałęzienia i miejsc 3' splicingowych. Z tego powodu w poniższej rozprawie główny nacisk położony jest na analizę wczesnych etapów procesów transkrypcji.

Proces regulacji ekspresji danego genu może obejmować jedno lub wiele zdarzeń alternatywnego splicingu. Mogą one zachodzić niezależnie od siebie lub być połączone w specyficzny układ kombinacji. Przykładowo, dwa sąsiednie eksony mogą być alternatywnie łączone tak, aby jeden lub drugi znalazł się w ostatecznym transkrypcie (wzajemnie wykluczające się eksony, *ang. mutually exclusive exons*). Poprzez działanie dwóch lub więcej różnych promotorów transkrypcji otrzymywane są dodatkowe warianty transkrypcyjne danego genu różniące się 5' końcem. Alternatywny koniec 5' transkryptu może być uzyskany poprzez wydłużenie lub skrócenie pierwszego eksonu lub przez wykorzystanie innego eksonu jako pierwszego. W podobny sposób modyfikowany może być 3' koniec transkryptu poprzez obecność sekwencji zawierających dwa lub więcej miejsca poliadenylacji. Pomijanie eksonu oraz wykorzystanie alternatywnych miejsc 5' i 3' to najczęściej występujące formy alternatywnego splicingu. Alternatywna terminacja została stwierdzona w przypadku 24% genów, rzadszym zjawiskiem jest wykluczanie eksonów podczas transkrypcji [38, 39].



Rycina 1. Budowa genu oraz przykłady możliwych wariantów transkrypcji. Dla każdego z teoretycznych transkryptów wskazane zostały miejsca startu transkrypcji (TSS, oznaczone strzałkami) i związany z nim obszar minimalnego promotora, umiejscowiony powyżej w bezpośrednim sąsiedztwie TSS. Zaznaczona została sekwencja terminacji transkrypcji, zwykle poprzedzona sekwencjami poliadenylacji (oznaczonymi szarymi kołami), które są sygnałem rozpoznawanym przez kompleks Pol II. Wariant zawierający ekson konstytutywny jest oznaczony jako CNE. Przedstawione zostały przykłady alternatywnych transkryptów ulegających ekspresji w mózgu w odpowiedzi na podanie leków psychotropowych, w tym: wariant zawierający alternatywny pierwszy ekson (AFE), np. *Sgk1*, alternatywny ostatni ekson ("ALE"), np. *Homer1*, retencja intronu (IR) np. *Fosb*. W danym regionie genomu mogą dodatkowo występować sekwencje kodujące krótkie i długie niekodujące RNA (oznaczone odpowiednio jako "a" i "b") o potencjalnych funkcjach regulatorowych, np. miR-212 lub *Neat1*.

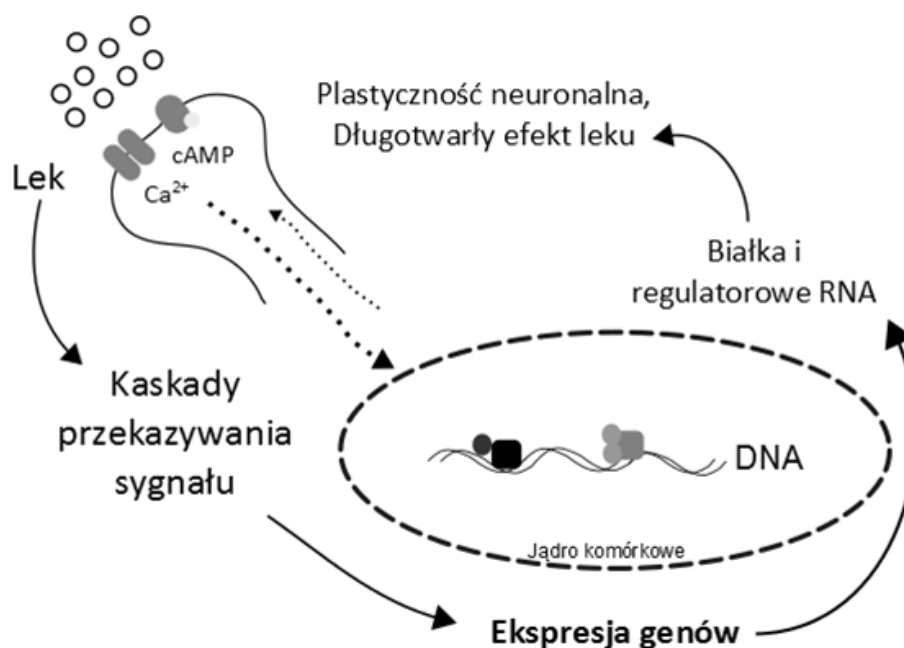
Opisana złożoność transkrypcji wpływa na poziom różnorodności proteomu. Po pierwsze alternatywny splicing może dotyczyć regionów nieulegających translacji (UTR, ang. *untranslated*

region) i w ten sposób może doprowadzić do zmiany stabilności lub lokalizacji dojrzałego mRNA. Proces ten nie ma wpływu na sekwencję białka. Po drugie alternatywne miejsce startu transkrypcji często zmienia sekwencję N-końca białka, podczas gdy alternatywne miejsce terminacji często modyfikuje jego C-końiec. W ten sposób może zostać zmodyfikowana lub dodana funkcja do produkowanego białka. Pominięcie eksonu może doprowadzić do usunięcia danej domeny lub motywu funkcjonalnego białka. Dodatkowo, w niektórych przypadkach alternatywny splicing może spowodować zmianę ramki odczytu i wprowadzenie przedwczesnego kodonu stop prowadzącego do degradacji transkryptu.

Wysokoprzepustowe metody analizy transkryptomu znacznie przyczyniły się do poszerzenia wiedzy na temat zjawiska alternatywnego splicingu. Opracowane zostały metody mapowania (np. CLIP-Seq, Chip-Seq lub TRAP) miejsc wiązania się białek do chromatyny, oceny ich interakcji oraz poziomu dostępności [40].

4. Zmiany ekspresji genów w mózgu

Związek między aktywnością komórek nerwowych i zmianami w ekspresji genów został po raz pierwszy zaobserwowany w latach 80-tych XX wieku. W pierwszych badaniach pobudzenie neuronów było wywoływane silnymi bodźcami takimi jak stymulacja elektryczna, podanie czynników wzrostu czy środków depolaryzujących błonę komórkową [41, 42]. Z czasem liczne obserwacje potwierdziły, iż ekspresja genów zachodzi również w odpowiedzi komórek nerwowych na bodźce zbliżone do fizjologicznych, w tym podanie substancji psychoaktywnych [43, 44]. Wraz z rozwojem technik molekularnych identyfikowano coraz więcej genów ulegających regulacji i określano ich funkcje m.in. w procesach sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, różnicowania komórek i przekazywania synaptycznego. Na podstawie dostępnej wiedzy można stwierdzić bez wątpliwości, iż leki psychotropowe działają poprzez reorganizację i normalizację połączeń neuronalnych. Na poziomie molekularnym zaangażowane są w to procesy inicjujące i kontrolujące rozwój zmian neuroplastycznych, wymagające ekspresji odpowiednich genów i syntezy nowych produktów białkowych. To tłumaczy dlaczego część efektów terapeutycznych leków psychotropowych pojawia się dopiero po dłuższym czasie ich stosowania (Rycina 2).



Rycina 2. Schemat działania leków psychotropowych poprzez modulację procesów neuroplastycznych w mózgu. Leki psychotropowe poprzez swoje działanie receptorowe aktywują wewnątrzkomórkowe ścieżki przekazu sygnału. Centralnym punktem kontroli zmian na poziomie molekularnych są mechanizmy regulacji ekspresji genów. Produkty zmian ekspresji genów w postaci białek i regulatorowych RNA modulują plastyczność neuronalną i mogą brać udział w formowaniu długotrwałych efektów leków.

Wywołana lekami regulacja przekazywania neuronalnego prowadzi do szybkich zmian w transkrypcji, co jest szczególnie widoczne w ekspresji tzw. genów wczesnej odpowiedzi komórkowej (*ang. immediate-early gene, IEG*) [11]. Efekt zmiany poziomu abundancji mRNA jest przejściowy i w większości przypadków jest zauważalny maksymalnie do kilku godzin [5]. Można ten proces postrzegać jako część pętli sprzężenia zwrotnego: aktywność synaptyczna wywołuje ekspresję genu, który z kolei dostarcza składniki niezbędne do zmian strukturalnych w synapsach. Stopień, w jakim indukowana przez aktywność ekspresja genów definiuje zmiany w plastyczności i w konsekwencji wpływa na zachowanie jest obiektem intensywnych badań. Przykłady bezpośrednich powiązań zmian molekularnych i adaptacji zachowania obejmują rolę CREB-zależnej ekspresji genów w konsolidacji pamięci strachu [45], udział genu *Npas4* w polu CA3 hipokampa w nabywaniu pamięci przestrzennej [46], czy znaczenie genu *Arc* w regulacji plastyczności synaptycznej [47]. Postulowany jest model, w którym regulowana aktywnością neuronalną ekspresja genów wpływa na prawdopodobieństwo wystąpienia trwałych zmian w procesie przekazywania sygnałów na poziomie synapsy [48].

Wiele początkowych badań nad wpływem leków na ekspresję genów w mózgu skupiało się na substancjach wywołujących uzależnienie [49, 50]. Zaobserwowano, że opioidy i psychostymulanty silnie zwiększają ekspresję IEG (np. *Fos*, *Fosb* lub *Egr1*) w obszarach otrzymujących unerwienie

dopaminergiczne, w szczególności prążkowie i jądrze półleżącym przegrody (NAc) [51, 52]. Obserwacje te stały się punktem odniesienia i odegrały ogromną rolę w dalszych badaniach nad wpływem leków psychotropowych na transkrypcję genów.

Przeszkody dotyczące badania ekspresji genów w mózgu wynikają m.in. ze specyficzności strukturalnej i różnorodności komórek w układzie nerwowym. W wielu przypadkach można zaobserwować, iż zmiana ekspresji transkryptu jest specyficzna dla określonej struktury mózgu. Przykładem są różnice w efektach molekularnych typowych i atypowych neuroleptyków na ekspresję genu *Fos* [53]. Jednorazowe podanie haloperydolu, typowego neuroleptyka, silnie indukuje ekspresję *Fos* w prążkowie, jądrze półleżącym przegrody i korze przedczołowej, podczas gdy klozapina, atypowy neuroleptyk, wywołuje znacznie słabszy efekt w prążkowie w porównaniu z korą. Inny gen wczesnej odpowiedzi – *Egr1 (Zif268)* wykazuje odmienny wzorzec regulacji i jego ekspresja jest indukowana w prążkowie zarówno przez typowe jak i atypowe neuroleptyki [50]. Obserwacje te wskazują na możliwą korelację różnic na poziomie molekularnym z wpływem leków przeciwpsychotycznych na zachowanie, szczególnie dla efektów pozapiramidowych związanych z prążkowiem [54].

Badanie ekspresji genów w mózgu jest również utrudnione ze względu na jednoczesność procesów zachodzących w różnych typach i rodzajach komórek nerwowych. Dla przykładu haloperydol i psychostymulanty wywołują w prążkowie podobne zmiany ekspresji grupy genów wczesnej odpowiedzi, jednakże ich wpływ na zachowanie jest skrajnie odmienny. Powodem jest pobudzenie rozdzielnych populacji neuronów prążkowie, co maskuje rzeczywiste efekty leków na ekspresję genów [44, 55]. Przyczyna tej pozornej sprzeczności leży w funkcji i strukturze prążkowie. Większość neuronów w tym obszarze to średnie neurony kolczyste, które można podzielić na dwie podgrupy na podstawie połączeń aksonalnych, które tworzą. Około połowa średnich neuronów kolczystych wysyła swoje zakończenia bezpośrednio do części siateczkowatej istoty czarnej oraz wewnętrznej części gałki bladej (droga bezpośrednia), podczas gdy druga połowa ma zakończenia w zewnętrznej części gałki bladej (droga pośrednia). Te dwie grupy neuronów prążkowie w przeciwstawnym sposobie kontrolują ruch ciała oraz wykazują ekspresję odmiennych typów receptora dopaminowego [56]. Wykazano, że psychostymulanty aktywują ekspresję IEG szczególnie w neuronach dróg bezpośrednich, podczas gdy leki przeciwpsychotyczne wybiórczo działają na drogę pośrednią [57]. Stąd wiele uwagi poświęcono opracowaniu metod, które pozwalałyby na rozdzielenie różnych typów komórek prążkowie, w szczególności średnich kolczystych neuronów wykazujących ekspresję dynorfiny i receptora dopaminowego D1 od neuronów wykazujących ekspresję enkefaliny i receptora dopaminowego D2. Do tego celu wykorzystuje się myszy transgeniczne wyrażające białko fluorescencyjne pod kontrolą określonego promotora, np. linia *Drd1a-EGFP* [58]. W ten sposób

możliwa jest identyfikacja zmian molekularnych zachodzących w zdefiniowanych typach komórek. Ponadto najnowsze badania wskazują na bezpośredni udział innych typów komórek mózgu w odpowiedzi na działanie leków, m.in. astrocytów i mikrogleju [59-62]. Coraz więcej analiz dotyczących pełnego transkryptomu wykonywanych jest na izolowanych typach komórek [60, 63], a także na poziomie pojedynczych komórek [64-66].

5. Przykłady alternatywnego splicingu genów w mózgu

Rozpowszechnienie alternatywnych izoform genów w układzie nerwowym wskazuje na udział tego mechanizmu w regulacji fizjologii i rozwoju patologii mózgu. Co więcej, wiele badań pokazuje odmienną funkcję alternatywnych izoform genów w porównaniu do form kanonicznych i znaczenie wyborów splicingowych i regulatorów splicingu dla determinacji plastyczności mógu (Tabela 1).

Dobrze poznanym przykładem jest gen *Fosb*, którego forma Δ Fosb była początkowo intensywnie badana głównie w kontekście etiopatomechanizmu uzależnienia od różnych substancji, w tym psychostymulantów, opioidów, etanolu i Δ^9 -THC [67]. Zmiany ekspresji Δ Fosb w mózgu zaobserwowano również po podaniach leków przeciwdepresyjnych i dysocjantów takich jak fluoksetyna, imipramina i ketamina [68, 69]. Białko Δ Fosb ma masę 35-37kDa i jest wyjątkowo stabilne z uwagi m.in. na brak dwóch domen ułatwiających degradację obecnych na C-końcu pełnego FosB [70]. Tym samym jego postulowana rola polega na byciu długotrwałym „przełącznikiem molekularnym”, który pomaga zarówno w inicjacji jak i utrzymaniu stanu wywołanego bodźcem [71]. Kolejnym przykładem indukowanych aktywnością neuronalną alternatywnych transkryptów są geny z rodziny *Homer*, których produkty białkowe odgrywają kluczową rolę w przekazie sygnału w mózgu poprzez fizyczne łączenie receptorów mGluR5 i NMDA w błonie komórkowej i modulację neurotransmisji [72]. Długie izoformy transkrypcyjne *Homer 1b* i *1c* wykazują konstytutywną ekspresję, podczas gdy ekspresja alternatywnych, skróconych wariantów genu *Homer1* – *Homer1a* i *Ania3* jest indukowana. Krótsza forma białka *Homer* konkuruje z dłuższą formą o możliwość związania do białek sygnałowych, tym samym modyfikując zdolność do zmian funkcji i struktury synaps [73, 74]. Jest to postrzegane jako część mechanizmu homeostatycznego, który poprzez wyhamowanie aktywności synaptycznej utrzymuje ogólny poziom aktywności neuronów w fizjologicznym zakresie [75]. Ekspresja wariantu *Homer1a* indukowana jest m.in. podaniem selektywnego agonisty receptora dopaminy D1 SKF38393 [76], wybranych neuroleptyków [77], leków przeciwdepresyjnych [78] i psychostymulantów [79].

Zbliżonym do *Homer* sposobem regulacji charakteryzuje się indukowana aktywnością neuronalną ekspresja alternatywnego transkryptu genu *Crem*. Białko CREM to analog CREB, z którym może tworzyć hetero dimery. Przypisuje mu się podobne funkcje, co potwierdza zdolność kompensacji przez CREM braku białka CREB. Białko kodowane przez krótki wariant genu *Crem* – ICER

(ang. *Inducible cAMP Early Repressor*), jest negatywnym regulatorem CREB/CREM-zależnej transkrypcji w mózgu [80]. W ten sposób ICER może wpływać hamująco na długotrwałą neuroplastyczność poprzez hamowanie ekspresji genów związanych z aktywnością neuronów [81]. Innym przykładem, pokazującym złożoność transkrypcji pojedynczego genu jest *Bdnf*. Jest to gen o złożonej strukturze kodujący czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego BDNF (ang. *brain-derived neurotrophic factor*). Czynniki ten odgrywa istotną rolę we wzroście komórek nerwowych, w rozwoju, fizjologii oraz patologii układu nerwowego [82, 83]. Badania pokazały, że ludzki gen BDNF składa się z 11 eksonów i 9 funkcjonalnych promotorów, których ekspresja jest silnie zależna od regionu mózgu [84]. Dokładne znaczenie i regulacja poszczególnych izoform są wciąż mało poznane. Przypisuje im się kluczowe znaczenie w rozwoju zaburzeń afektywnych. W modelach zwierzęcych leki przeciwdepresyjne stymulują ekspresję BDNF, co niektórzy badacze wiążą z nasileniem neurogenety i odwróceniem objawów choroby [85]. Hipoteza wskazująca na rolę neurogenety w działaniu leków przeciwdepresyjnych mogłaby tłumaczyć opóźnione pojawianie się ich efektów klinicznych. Niemniej, rola jaką mógłby odgrywać BDNF w tym procesie pozostaje przedmiotem sporu.

Warto podkreślić, że opisywanych jest coraz więcej przypadków, gdzie indukowana lekami ekspresja wariantów transkrypcyjnych dotyczy konkretnych typów komórek mózgu. Przykładem jest gen *Sgk1*, który należy do podrodziny serynowo-treoninowych kinaz białkowych. Izofomy *Sgk1* są odmiennie regulowane w zależności od bodźca stymulującego [86]. Wykazano, że warianty *Sgk1* wyrażane w neuronach są funkcjonalnie powiązane z dendrytogenezą [87] i regulacją aktywności jonotropowych receptorów glutaminianu [88]. Ponadto ekspresja *Sgk1* związana jest z wywołanymi stresem zmianami morfologii oligodendrocytów [89] i regulację funkcji specyficznych dla astrocytów transporterów glutaminianu [90]. Została również zidentyfikowana izoforma *Sgk1* zależna od receptora glikokortykoidowego GR. Ekspresja tej formy występuje specyficznie w astrocytach [59]. Zmiany w ekspresji transkryptu lub białka SGK1 są obserwowane w ośrodkowym układzie nerwowym w zwierzęcych modelach stresu pourazowego [91], formowania pamięci [92] oraz po podaniu leków przeciwdepresyjnych [93] i substancji uzależniających [94]. Rola innych GR-zależnych transkryptów ulegających regulacji w astrocytach, takich jak np. *GILZ* (*Tsc22d3*) i *Fkbp5* nie została dotychczas dobrze poznana [95, 96]. Oba geny wykazują w mózgu ekspresję alternatywnych izoform ulegających regulacji po podaniu leków psychotropowych [60].

Powyższe przykłady pokazują, że ekspresja alternatywnych izoform genów może być powiązana z różnymi lub przeciwstawnymi efektami na poziomie aktywności białek i jest swoista dla różnych bodźców i typów komórek. Dlatego analiza na poziomie transkryptu jest niezbędna do wnioskowania o mechanizmach działania leków w oparciu o ekspresję genów.

6. Regulacja ekspresji niekodującego RNA w ośrodkowym układzie nerwowym

Liczba różnego typu ncRNA wyrażanych w mózgu jest większa niż liczba unikalnych mRNA [97]. Dzięki ciągłym postępom w transkryptomice wciąż odkrywane są nowe klasy RNA, takie jak np. kołowe RNA (*ang. circular RNA*), dla których postulowana jest funkcja w regulacji działania synaps [98] lub „extra coding” RNA, które mogą wpływać na metylację DNA [99]. Rola ncRNA w plastyczności neuronalnej jest obiektem intensywnych badań [100, 101]. Najnowsze wyniki wskazują na udział ncRNA w długotrwałym działaniu leków psychoaktywnych, np. poprzez mechanizmy regulacji ekspresji genów powiązanych z reorganizacją sieci neuronowych. Specyficzne miRNA odgrywają kluczową rolę w neuroplastyczności poprzez regulację białek w synapsie, np. mir-125a wraz z białkami FMRP (*ang. fragile X mental retardation protein*) oraz białkami Ago-2 wpływa na zahamowanie translacji postsynaptycznego białka PSD-95 (*ang. postsynaptic density protein 95*). Białko PSD-95 jest kluczowym składnikiem synaps glutamatergicznych [102, 103]. Szereg doniesień wskazuje na zmiany w poziomie abundancji miRNA spowodowane działaniem substancji uzależniających i leków psychotropowych. Regulowany podaniem kokainy mir-212 jest wskazywany jako jeden z czynników warunkujących podatność na uzależnienie [104]. Badania pokazują, iż podanie psychostymulantów powoduje wzrost ekspresji wielu miRNA, które mogą brać udział w regulacji morfologii kolców dendrytycznych poprzez transport mRNA do zakończeń dendrytycznych. Mechanizm działania jest związany z pobudzeniem translacji i modulacją fosforylacji białek zlokalizowanych w synapsie. Potwierdzona doświadczalnie została rola w tym procesie miRNA z rodziny miR-8 oraz miR-182 i miR-183 [105, 106]. Ponadto zmiany w ekspresji miRNA w mózgu człowieka oraz szczura odnotowano również w odpowiedzi na działanie alkoholu, m.in. miR-369-3p, miR-34c-5p, miR-203, miR-146a, miR-194 oraz członków rodziny let-7 [107, 108]. Podanie opioidów obniżało poziom ekspresji miR-133b, który jest specyficznie wyrażany w neuronach dopaminergicznych śródmózgowia, gdzie reguluje różnicowanie tych komórek [109]. Wielokrotne podania fluoksetyny zwiększały poziom ekspresji miR-16 w neuronach serotonergicznych jąder szwu mózgu. Powodowało to spadek produkcji transportera serotoniny i uwalnianie czynnika neurotroficznego S100B, który oddziaływał na neurony noradrenergicznych miejsca sinawego [110]. Zarówno ostre jak i chroniczne podanie imipraminy i fluoksetyny powodowało wzrost poziomu miR135a w jądrach szwu. miR135 jest zaangażowany w kontrolę poziomu serotoniny w normalnych warunkach i istotny w odpowiedzi na leki przeciwdepresyjne [111]. Wśród innych typów małych niekodujących RNA warto wymienić małe jądrowe RNA snoRNA HBII-52. HBII-52 reguluje alternatywny splicing receptora serotoninowego 5-HT_{2C} poprzez oddziaływanie z sekwencją regulatorową obecną w jednym z eksonów tego genu. W efekcie translacji ulega zmodyfikowane białko warunkujące zmianę funkcjonalności receptora [112]. Wywołane lekami zmiany w ekspresji

lncRNA w mózgu są dotychczas mało poznane. Zaobserwowano, że podania metamfetaminy powodują obniżenie ekspresji zestawu lncRNA w jądrze półleżącym [113]. Kilka z tych lncRNA (w tym *Neat1* i *Miat*) pełni funkcje regulacyjne w procesie transkrypcji, które poprzez interakcje cis lub trans z docelowymi genami. Co ciekawe, poziom *Neat1* był podwyższony w prążkowie mózgu myszy po podaniu mianseryny lub tranylcyprominy [60]. Dwukierunkowa regulacja *Neat1* może odzwierciedlać odmienne efekty kliniczne substancji psychostymulujących i przeciwdepresyjnych. Podsumowując, szereg obserwacji wskazuje na istotną rolę ncRNA w działaniu leków psychoaktywnych na poziomie ekspresji genów.

Tabela 1. Przykłady alternatywnych wariantów genów i niekodujących transkryptów ulegających ekspresji w mózgu.

Przykład genu	Typ wariantu ^a	Regulacja ^b	Funkcja w mózgu	Powiązane choroby OUN	Inne przykłady ^c
<i>Homer1</i>	ALE	Alternatywne miejsce zakończenia transkrypcji w odpowiedzi na aktywność neuronalną	Kontrola neurotransmisji i plastyczności mózgu	Depresja [114]	<i>Smyd3</i> [60] <i>Gabrg3</i> [115]
<i>Sgk1</i>	AFE	Alternatywne miejsca startu transkrypcji, regulacja zależna od GR w komórkach glejowych[59]	Kontrola metabolizmu glejowego i plastyczności neuronalnej	Zaburzenia związane ze stresem [91]	<i>Crem</i> [81] <i>Bdnf</i> [84] <i>Fkbp5</i> [116]
<i>Fosb</i>	IR	Ekspresja zależna od CREB, złożony splicing izoformy delta	Czynnik transkrypcyjny zaangażowany w ekspresję genów krytycznych dla plastyczności neuronalnej	Uzależnienia lekowe i depresja[69]	<i>Clk1</i> [60]
<i>miR-128</i>	miRNA	Odmienne wzorce ekspresji podczas rozwoju mózgu	Zaangażowany w różnicowanie neuronów i wzrost dendrytów	Niepokój [117] i niepełnosprawność intelektualna [118]	<i>miR-132</i> [119] <i>miR-212</i> [120]
<i>Snord115</i> (<i>HBII-52</i>)	snoRNA	Wzrost ekspresji w hipokampie myszy po kontekstowym warunkowaniu strachu	Regulacja alternatywnego splicingu genów, w tym receptorów serotoninowych	Zespół Pradera-Williego [112], Autyzm [121]	

<i>Gomafu</i> (<i>Miat</i>)	lncRNA	Ekspresja regulowana przez aktywność neuronalną; zaburzona ekspresja w korze osób chorych na schizofrenię	Kontrola alternatywnego splicingu zaangażowanego w rozwój mózgu i postmitotyczną funkcję neuronów	Schizofrenia [122]	<i>Neat1</i> [60]
----------------------------------	--------	---	---	--------------------	-------------------

^a**Wariant transkrypcyjny (nomenklatura zgodnie z Ryciną 1):** *ALE* alternative last exon, *AFE* alternative first exon, *IR* intron retention, *miRNA* microRNA, *snoRNA* small nucleolar RNA, *lncRNA* long non-coding RNA;

^b**Regulacja ekspresji alternatywnego wariantu** ^c**Przykłady innych genów o podobnym profilu transkrypcyjnym**

7. Poszukiwanie wspólnych cech łączących grupy podobnie regulowanych genów

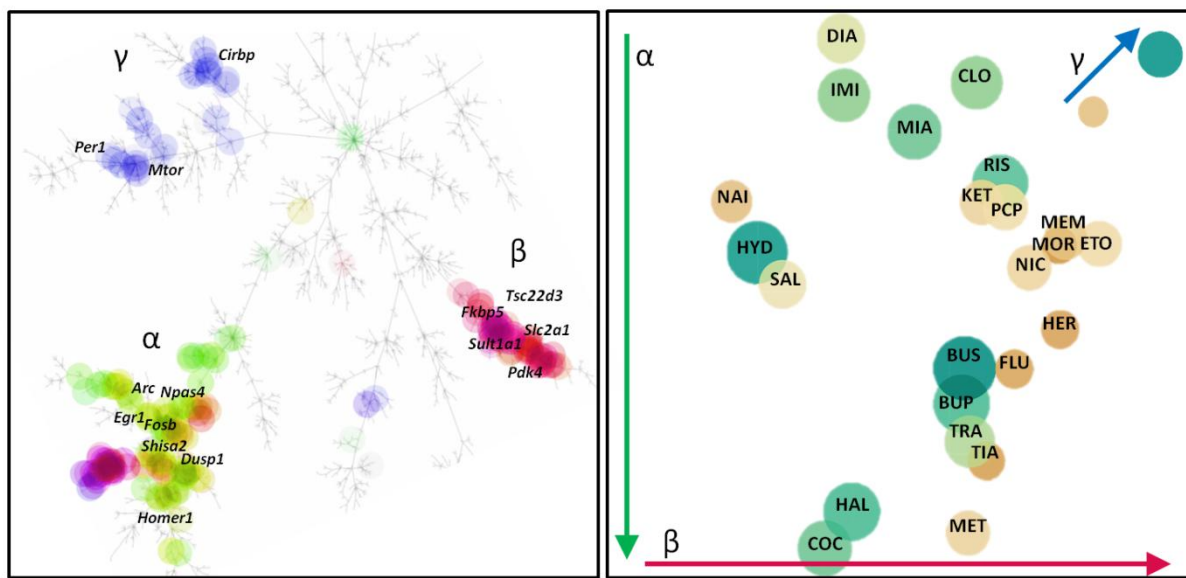
Badania ekspresji genów, które koncentrują się na pojedynczym genie lub zestawie wcześniej wybranych genów wiążą się z problemem potencjalnego pominięcia innych istotnych zmian oraz skupieniu analizy na genach znanych o relatywnie dużych zmianach ekspresji [123]. Rozwiązaniem tego problemu było wprowadzenie wysokoprzepustowych metod analizy ekspresji oraz odpowiednich metod bioinformatycznych. Główną zmianą w podejściu do badania indukowanej lekami ekspresji genów jest przejście od analizy specyficznych transkryptów do tworzenia i analizowania sieci współ-regulowanych genów [124, 125]. Odkryte zostały nowe relacje pomiędzy genami, ścieżkami molekularnymi i procesami biologicznymi a regulacją transkrypcji, tworząc bardziej kompletny obraz zmian wywołanych podaniem leków psychotropowych [5]. Dotychczas większość badań wykonana została z wykorzystaniem mikromacierzy DNA, których głównym ograniczeniem jest konieczność korzystania z wcześniej zdefiniowanych sond DNA. Powstał zbiór prac, w których badano skutki ostrego i chronicznego podania leków w różnych obszarach mózgu [5, 60, 94, 126-128]. Metody stosowane do identyfikacji grup powiązanych genów są wciąż udoskonalane. Jak dotąd, większość badań skupiała się na lekach z jednej grupy klinicznej i łączyła regulowane geny w kategorie funkcjonalne. Na przykład, wielokrotne podania fluoksetyny powodowały regulację ekspresji genów zaangażowanych w metabolizm oraz transdukcję sygnału i transkrypcję w hipokampie mózgu szczura [129, 130]. Pojedyncze podanie klozapiny wywołało zmiany w ekspresji genów związanych z neuroprzebieżnością, rozwojem i funkcją komórek nerwowych oraz regulacją enzymatyczną, podczas gdy chroniczne podania regulowały sieci uczestniczące w przeżyciu neuronów, transmisji synaptycznej i kontroli metabolizmu węglowodanów i tłuszczów [131]. Natomiast, indukowana przez haloperydol ekspresja genów była powiązana ze szlakami zapalnymi i immunologicznymi [132], przy czym regulacja transkrypcji kanałów jonowych była wspólnym efektem chronicznego leczenia klozapiną i haloperydolem [133]. Analiza sieci genów kodujących cytokiny prozapalne wykazała nowe oddziaływania pomiędzy alkoholem a układem odpornościowym. Ponadto, znaczący wpływ na zmiany profilu ekspresji wywołane działaniem leków psychotropowych

zaobserwowano dla grupy genów powiązanych z rytmem okołodobowym (np. *Per1*, *Per2* i *Bmal1*) [134-136].

Od lat prowadzone są w Zakładzie Neurofarmakologii Molekularnej IF PAN badania wpływu leków psychotropowych na regulację ekspresji genów w układzie nagrody. W obszernym badaniu zmian ekspresji genów wywołanych podaniem 18 leków psychotropowych zaobserwowaliśmy, że leki należące do różnych klas klinicznych i farmakologicznych wpływają na transkrypcję odrębnych sieci genów (Rycina 3a). Sieci współregulowanych genów można scharakteryzować poprzez identyfikację głównych typów komórek, w których zachodzi ich ekspresja oraz nadreprezentację w obszarach promotorowych miejsc wiążących czynniki transkrypcyjne. Pierwszą grupą były transkrypty, które odzwierciedlały poziom zmiany pobudliwości komórek nerwowych, w tym *Fosb*, *Npas4* i *Arc*. Obserwowane zmiany ekspresji są zgodne z wcześniejszymi badaniami modułów transkrypcyjnych aktywowanych podaniem różnych substancji uzależniających, m.in. kokainy, metamfetaminy czy heroiny [94]. Druga sieć obejmowała geny zaangażowane w procesach metabolicznych, takich jak transport glukozy i metabolizm, np. *Pdk4* i *Slc2a1* [59]. Trzecia grupa transkryptów zawierała geny zaangażowane w organizację projekcji komórkowych i szlaku mTOR, takich jak *Lst1* i *Mtor*. Co ciekawe, analiza transkryptów wykorzystująca dane dotyczące poziomu abundancji poszczególnych transkryptów w różnych typach komórek wykazała, że pierwsza grupa składała się głównie z transkryptów ekspresjonowanych w neuronach, podczas gdy druga grupa głównie zawierała geny o wyższych względnych poziomach ekspresji w gleju [137, 138]. Ponadto, regiony promotorowe genów należących do pierwszej i drugiej grupy zostały znacząco wzbogacone w miejsca wiązania specyficznych zestawów czynników transkrypcyjnych. Geny zależne od aktywności neuronalnej wykazują nadreprezentację motywów wiążących białka SRF - CArG i CREB - CRE, podczas gdy geny regulowane w astrocytach częściej zawierają miejsca wiązania dla GR oraz izolatora transkrypcji CTCF [60, 139, 140]. Warto podkreślić, że wyniki opisujące regulację odpowiedzi transkrypcyjnej astrocytów przez leki psychotropowe sugerują potencjalną rolę tych komórek jako wsparcia dla neuronów w okresach wzmożonej aktywności [141].

Dzięki wprowadzeniu metod sekwencjonowania następnej generacji możliwy jest odczyt transkryptomu z rozdzielczością pojedynczego nukleotydu. Dostępnych jest coraz więcej baz danych gromadzących odczyty sekwencjonowania RNA pojedynczych komórek mózgu oraz pierwsze analizy transkryptomu po podaniach leków psychotropowych [60, 142]. Ostatecznym celem jest zgromadzenie kompleksowych danych i wykorzystanie wzorców transkrypcyjnych do lepszej klasyfikacji i przewidywania efektów leków psychotropowych [93, 94].

a) **Sieci genów regulowanych podaniem leków** b) **Klasyfikacja leków w oparciu o sieci genów**



Rycina 3. Wykorzystanie wyników profilowania zmian ekspresji genów w mózgu do klasyfikacji leków psychotropowych. (a) Hierarchiczne grupowanie zmian ekspresji genów indukowanych przez główne typy leków psychoaktywnych (wycinek). Każdy węzeł sieci reprezentuje jeden transkrypt. Długość gałęzi odpowiada korelacji ekspresji Spearmana, stąd im bliższa jest pozycja transkryptów, tym bardziej podobne są zmiany w ekspresji wywołane podaniem leków psychotropowych. Kolory zostały przyporządkowane na podstawie wyników analizy głównych składowych (PCA, ang. *principal component analysis*), ze wskazaniem na prawym panelu trzech pierwszych elementów przy pomocy strzałek. (b) Wykres przedstawiający analizę głównych składowych PCA (zmodyfikowano za zgodą [143]) został wygenerowany w oparciu o profil zmian ekspresji 50 genów (o najbardziej istotnych wynikach testu statystycznego) regulowanych podaniem leków. W analizie uwzględniono 21 leków psychotropowych: ketaminę (KET) memantynę (MEM), fencyklidynę (PHE), mianserynę (MIA), imipraminę (IMI), fluoksetynę (FLU), bupropion (BUP), tianeptynę (TIA), tranylcyprominę (TRA), metamfetaminę (MET), kokainę (COC) nikotynę (NIC), heroinę (HER), morfinę (MOR), etanol (ETO), diazepam (DIA), buspiron (BUS), hydroksyzynę (HYD), klozapinę (CLO), rysperydon (RIS) i haloperydol (HAL). Jako grupy kontrolne zastosowano zwierzęta otrzymujące podania fizjologicznego roztworu soli (SAL) oraz zwierzęta nie poddane żadnemu traktowaniu (NAI). Wyniki dla pierwszej i drugiej składowej przedstawiono odpowiednio na osi x i y, podczas gdy wartości trzeciej składowej zakodowano przy pomocy koloru i rozmiaru okręgów, przy czym czerwony i zielony stanowią przeciwległe końce skali, a rozmiar oznacza większą wartość bezwzględnego efektu.

8. Molekularna klasyfikacja leków psychotropowych

Zmiany profilu ekspresji genów w mózgu odzwierciedlają poziomy aktywacji poszczególnych mechanizmów neurobiologicznych. Klasyfikacja oparta na porównaniu sygnatur transkrypcyjnych może poprawić skuteczność procesu przesiewu i charakteryzacji nowych związków psychoaktywnych. Sygnatury wielogenowe mogą pozwolić na bardziej zdecydowane podejście do identyfikacji

mechanizmów molekularnych zaangażowanych w działanie leków i przewidywania ich skuteczności. Dobrym przykładem są opisane powyżej wzory ekspresji genów indukowane przez leki. Przeprowadzone badania wykazały, że ekspresja grupy genów regulowanych przez aktywność neuronalną różni się w zależności od klasy leków psychoaktywnych. Analizy transkrypcyjnych sygnatur zostały wykorzystane w szczególności do rozróżnienia efektów molekularnych grup leków przeciwpsychotycznych [144, 145] i psychostymulujących [146, 147]. W oparciu o wyniki profilowania ekspresji genów, nasz Zespół zidentyfikował specyficzne wzorce transkrypcji dla różnych klas leków psychoaktywnych, w tym anksjolityków, leków przeciwpsychotycznych, opioidów, leków przeciwdepresyjnych i psychostymulujących [5]. Rycina 3b przedstawia jak w oparciu o podzbiór transkryptów wykazujących zmiany poziomu abundancji w prążkowie myszy, możliwe jest opracowanie nowego systemu ich klasyfikacji. Określone zostały przypadki, w których leki o podobnych efektach behawioralnych są zgrupowane razem. Na przykład, atypowe leki przeciwpsychotyczne (klozapina i rysperydon) lub antagoniści receptora NMDA (memantyna, ketamina i fencyklidyna) zostały odpowiednio zgrupowane [143]. Szczególnie interesujące obserwacje dotyczą grupy leków przeciwdepresyjnych. Profile transkrypcyjne wybranych leków przeciwdepresyjnych są bardzo zróżnicowane, a sygnatury transkrypcyjne mocno rozproszone. Obraz ten jest zbieżny z różnicami w profilach farmakologicznych, przykładowo leki o silnej komponente dopaminowej (np. tranilcypromina i bupropion) są zgrupowane razem z psychostymulantami, podczas gdy mianseryna, która ma stosunkowo wysokie powinowactwo do receptorów serotoninowych 5-HT_{2A}, wykazuje podobieństwo do atypowych leków przeciwpsychotycznych. Lek anksjolityczny, hydroksyzyna, nie wywołał silnych zmian ekspresji genów co sugeruje, że prawdopodobnie lek ten nie wpływa istotnie na aktywność neuronów w prążkowie. Do uzyskania pełnej klasyfikacji substancji psychoaktywnych na podstawie profili molekularnych konieczne jest rozszerzenie stosowanej metodologii. Po pierwsze, konieczna jest poprawa możliwości oceny swoistości komórkowej obserwowanych zmian ekspresji. Rozdział komórkowy wzorów ekspresji pozwoliłby na poprawę możliwości odróżnienia poszczególnych klas leków, takich jak antagoniści receptora D₂ dopaminy (np. haloperydol) oraz środki psychostymulujące. Po drugie, należy uwzględnić zmiany transkrypcji genów zachodzące w różnych obszarach mózgu. W przypadku leków przeciwdepresyjnych, wpływ na sygnalizację serotonergiczną, jak i noradrenergiczną, może objawiać się poprzez efekty molekularne charakterystyczne dla poszczególnych regionów przedmózgowia, takich jak kora przedczołowa lub hipokamp. Niewątpliwie, dane dotyczące ekspresji genów należy uzupełniać innymi metodami, takimi jak profile wiązania badanych związków do receptorów komórkowych oraz parametry wpływu na zachowanie w modelach zwierzęcych [148-150]. Sygnatury transkrypcyjne reakcji na leki są w coraz większym stopniu wykorzystywane w modelowaniu komputerowym działania leków, dla przykładu powstało narzędzie analityczne DrugSig,

które ma na celu poszerzenie stanu wiedzy o mechanizmach działania leków oraz wypracowanie narzędzi optymalizujących proces stosowania istniejących leków [151].

Podsumowując, należy zauważyć, że transkryptomika obejmuje tylko część odpowiedzi komórkowych i konieczne jest wykorzystanie danych z innych technologii "omicznych", w tym genotypowania [152, 153], proteomiki [154] lub metabolomiki [155]. Uzyskane wyniki sugerują, że żadna z wysokowydajnych metod nie jest samodzielnie wystarczająca, aby w pełni scharakteryzować złożone biologiczne zmiany wywołane lekami w mózgu. Powzięte zostały próby przeprowadzenia analiz równoległe uzyskanych danych transkryptomicznych, proteomicznych i metabolicznych pochodzących od osób poddanych farmakoterapii [156, 157]. Pomimo tego, iż integracja dużych, heterogenicznych zbiorów danych jest wyzwaniem metodycznym, jest to bardzo obiecująca ścieżka uzyskanie postępu w tej dziedzinie.

II. Cel badań

Celem przeprowadzonych przeze mnie badań było określenie alternatywnych wariantów genów, niekodujących RNA oraz mechanizmów regulatorowych, których aktywacja jest powiązana z farmakologicznymi właściwościami leków psychotropowych. Jakkolwiek włożony został już ogromny wysiłek w rozwój badań w tym zakresie, dopiero wykorzystanie sekwencjonowania następnej generacji (NGS) pozwala na poznanie molekularnych efektów leków na poziomie pojedynczych zdarzeń transkrypcyjnych. W ramach niniejszej rozprawy podjęłam próbę połączenia badań, w ramach których oprócz najnowszych narzędzi biologii molekularnej (sekwencjonowania NGS) wykorzystywane zostały metody bioinformatyczne (poszukiwanie miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych oraz analiza ekspresji w różnych populacjach komórkowych) oraz elementy neurofarmakologii (wykorzystanie zwierzęcych modeli odpowiedzi na podanie leku). Podejście zintegrowane pozwoliło na uzyskanie szerokiego wglądu w procesy kontroli indukowanej lekiem ekspresji alternatywnych form genów.

Szczegółowe cele badawcze obejmowały następujące zadania:

1. Porównanie zmian transkryptomów dwóch regionów mózgu myszy wywołanych podaniem sześciu leków psychotropowych działających na układ dopaminowy i serotoninowy.
2. Identyfikacja transkryptów ulegających specyficznej lekowo regulacji.
3. Potwierdzenie istnienia wcześniej nieznanymi wariantów transkrypcyjnych i ewentualnych produktów białkowych.

III. Materiały i metody

1. Zwierzęta

W eksperymentach wykorzystywano dorosłe (8-10 tygodni) myszy C57BL/6N pochodzące z hodowli firmy Charles River lub hodowli prowadzonej przez IF PAN. Zwierzęta przebywały w grupach od 4 do 6 myszy w jednej klatce domowej zbudowanej z pleksiglasu, w pomieszczeniu o stałej temperaturze $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ oraz cyklu dobowym światło-ciemność po 12 godzin. Zwierzęta miały wolny dostęp do pokarmu oraz wody (pasza RM1 A (P) Special Diets Services). Wszystkie eksperymenty były wykonywane zgodnie z wytycznymi Parlamentu Europejskiego i Rady dotyczącymi opieki i wykorzystania zwierząt laboratoryjnych (dyrektywa 2010/63/EU). Protokoły eksperymentalne zostały sprawdzone i zatwierdzone przez II Lokalną Komisję Etyczną do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach (numery pozwoleń 1156/2015 i 217/2017).

2. Podania leków

Do badania zmian w poziomie ekspresji wariantów genu wykorzystano model jednorazowego podania następujących substancji: haloperydol (1 mg/kg, Haloperidol hydrochloride, Tocris Nr kat. 0931), rysperydon (0,5 mg/kg, Tocris Nr kat. 2865), metamfetaminę (2 mg/kg, syntetyzowana w IF PAN), wenlafaksynę (16 mg/kg, Venlafaxine hydrochloride, Tocris Nr kat. 2917), mianserynę (20 mg/kg, Mianserin hydrochloride, Tocris Nr kat. 0997) lub ketaminę (20 mg/kg, Ketamine hydrochloride, Tocris Nr kat. 3131) rozpuszczone w soli fizjologicznej lub soli fizjologicznej z dodatkiem kropli 0,1 M HCl dla haloperydolu i rysperydonu. Zwierzęta były uśmiercane przez przerwanie szyjnego odcinka rdzenia kręgowego. W eksperymentach wykorzystujących sekwencjonowanie (rozdziały 1-2 oraz 4-6 Wyników) i qPCR (rozdziały 3 i 7 Wyników) badano efekt leków 2 godziny od ich podania. W doświadczeniach zmian ekspresji *Dclk1* w czasie (rozdział 8 Wyników) zwierzęta zabijano 1, 2, 4 i 8 godzin od podania mianseryny i 1, 2 i 8 godzin od podania rysperydonu. W doświadczeniu, w którym badano zmiany na poziomie białek (rozdział 9 Wyników) oraz w dodatkowym eksperymencie qPCR (rozdział 8 Wyników) myszy otrzymywały mianserynę raz dziennie przez kolejne 5 dni i zostały uśmiercone 2 godziny po ostatnim podaniu. Wszystkie podania leków były wykonywane w fazie jasnej cyklu dobowego. Dawki leków a także czas po jakim badany będzie ich wpływ na ekspresję genów wybrane zostały na podstawie naszych poprzednich badań [5, 142, 143] i dostępnych danych literaturowych [158-162]. W Tabeli 2 przedstawiono spis wykorzystanych substancji wraz z ich profilem farmakologicznym oraz opisem wpływu na zachowanie myszy po jednorazowym podaniu. We wszystkich przeprowadzonych eksperymentach wykorzystano 8 zwierząt w każdej grupie podań substancji.

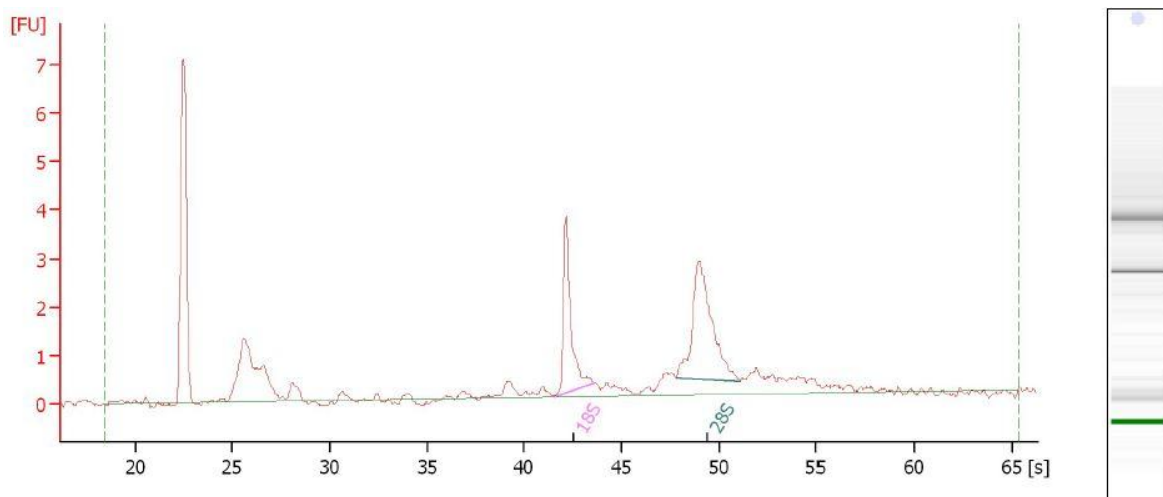
Tabela 2. Spis substancji psychotropowych stosowanych w eksperymentach. W Tabeli zebrano dawki substancji, grupy kliniczne, cele receptorowe oraz efekt behawioralny jednorazowego podania myszom. Zastosowane skróty: *DAT* Dopamine transporter, *FST* forced swim test, *TST* tail suspension test, *PPI* prepulse inhibition, *NaSSa* noradrenergic and specific serotonergic antidepressant, *NET* norepinephrine transporter, *SNRI* serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor

Substancja psychoaktywna	Grupa	Główne punkty uchwytu	Efekty jednorazowego podania u myszy
<u>Haloperydol</u> (1 mg/kg)	Neuroleptyk (typowy)	DRD2, 3, 4 / 5HT2 / α 2	Silna katepsja [163], Wzmoczone PPI [164], Zwiększony okres bezruchu w FST [165]
<u>Risperidon</u> (0.5 mg/kg)	Neuroleptyk (atypowy)	5HT2A, C/ DRD1, 2, 3, 4 / α 1, 2 / H1	Umiarkowana katepsja, Zwiększone PPI [166]
<u>Metamfetamina</u> (2 mg/kg)	Psychostymulant	NET / DAT	Hiperlokomocja i fenotyp podobny do manii [167]
<u>Wenlafaksyna</u> (16 mg/kg)	Antydepresant (SNRI)	SERT / NET	Zmniejszenie bezruchu w FST i TST [162], hiperlokomocja [168]
<u>Mianseryna</u> (20 mg/kg)	Antydepresant (NaSSa)	H1 / 5HT2C, 2A, 3A / α 2C, 2A, 1A / NET / mACh	Brak wpływu na bezruch w FST i TST [162], Obniżona aktywność lokomotoryczna [169]
<u>Ketamina</u> (20 mg/kg)	Psychodysleptyk	NMDAR	Zmniejszenie bezruchu w FST [170], hiperlokomocja [171]

3. Preparacja tkanki i izolacja RNA

Mózgi utrwalane były przez noc w odczynniku stabilizującym RNA i unieczynnającym RNAzy - RNAlater (Ambion). Następnie mózgi cięto w płaszczyźnie czołowej przy użyciu wibratomu Leica VT1200 na plastry o grubości 125 μ m. Badane struktury: jądro półleżące przegrody (nucleus accumbens septi, NAc) oraz korę przedczołową (prefrontal cortex, PFCx) wyjmowano pod binokulem StemiDV4 (Zeiss) przy pomocy igieł, bezpośrednio z utrwalonych skrawków. Jako PFCx wyodrębniano korę zakrętu obręczy, część prelimbiczną, infralimbiczną i część konaru mózgu po stronie grzbietowej z obszaru około +1,90 do +1,15 mm od bregmy, wykorzystując atlas Paxinosa jako odniesienie [172]. NAc wyodrębniano ze skrawków od około +1,94 do +0,6 mm od bregmy. Kształt ciała modelowego i spoidła mózgowego przedniego zostały użyte jako punkty odniesienia do oceny odległości od linii bregmy. Tkanki zamrażano i przechowywano w RNAlater w temperaturze -25°C.

Po rozmrożeniu, dokładnie usunięto RNAlater, a do próbek dodano po 1 kulce ze stali nierdzewnej i 1ml Trizolu (Invitrogen). W trakcie izolacji całkowitego RNA, próbki pochodzące od pojedynczych zwierząt nie były łączone. Tkanki homogenizowano w dwumililitrowych próbkach okrągłodennych przy użyciu homogenizatora TissueLyser II (Qiagen), dwa razy po 3 minuty, przy częstotliwości 25 Hz. Następnie, do uzyskanego homogenatu dodawano po 200 μ l chloroformu i wytrząsano energicznie na wytrząsarce przez 30 – 60 sekund, po czym inkubowano przez 10 minut na lodzie. W następnym etapie, próbki wirowano przez 20 minut w temperaturze 4°C, przy 12000g. Po rozdzieleniu faz, górną (wodną) fazę przenoszono do nowych próbek, dodano równą objętość alkoholu izopropylowego i inkubowano przez 30 minut w -70°C. Po tym czasie próbki ponownie wirowano przez 20 minut, odrzucono nadsącz a do pozostałych osadów dodano 1ml 70% (obj./obj.) etanolu i wirowano przez 10 minut z prędkością 12 000g. Nadsącz dokładnie zebrano, a osady suszono na powietrzu przez 5-10 minut, po czym rozpuszczano w 30 μ l sterylnej, dejonizowanej, wolnej od rybonukleaz wodzie. Po rozpuszczeniu, próbki RNA denaturowano 3 minuty w temperaturze 65°C. RNA przeznaczone do sekwencjonowania było dodatkowo oczyszczane z użyciem kolumnienek z krzemionką (RNeasy Mini Kit). Stężenie całkowitego RNA określano spektrofotometrycznie przy długości fali 260 nm (spektrofotometr ND-1000 NanoDrop) lub fluorymetrycznie wykorzystując selektywne barwniki fluorescencyjne (Qubit 2.0). Integralność wyizolowanego RNA była oznaczona metodą elektroforezy kapilarnej wykorzystującej bioanalyzer Agilent 2100 oraz zestaw mikroczipów Agilent Nano 6000 RNA Reagents (Rycina 4).

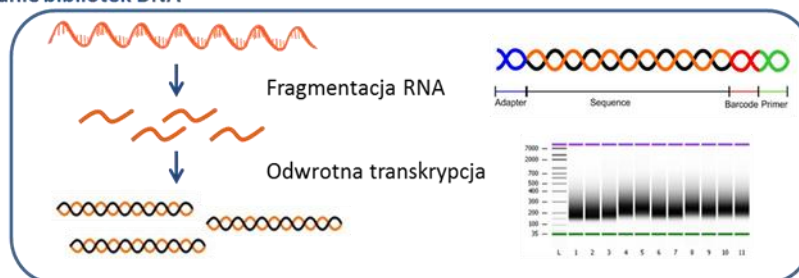


Rycina 4. Analiza integralności całkowitego RNA wyizolowanego z jądra półleżącego przegrody mózgu myszy, wykonana przy użyciu bioanalyzera. Wykres po lewej stronie przedstawia rozkład wielkości fragmentów RNA dla jednej z analizowanych próbek jako sygnał intensywności fluorescencji (oś Y – FU, *ang. fluorescence unit*) w czasie (oś X – czas, sekundy) i obraz elektroforezy w żelu (prawa strona). Na podstawie profilu bioanalyzer dostarcza informacji o stężeniu RNA oraz umożliwia kontrolę integralności RNA. Dla powyższego przykładu próbki RNA parametr integralności RIN został określony na poziomie 9.2 (w skali od 1-10). Piki 18S i 28S odpowiadają pikom rybosomalnego RNA.

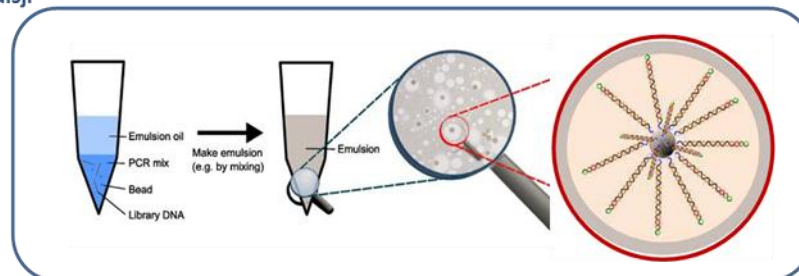
4. Sekwencjonowanie transkryptomu

Sekwencjonowanie transkryptomu obejmowało następujące etapy: usuwanie rybosomalnego RNA, fragmentację RNA, przygotowanie bibliotek cDNA, przygotowanie matrycy do sekwencjonowania oraz wysokoprzepustowe sekwencjonowanie z wykorzystaniem platformy Ion Proton (Rycina 5).

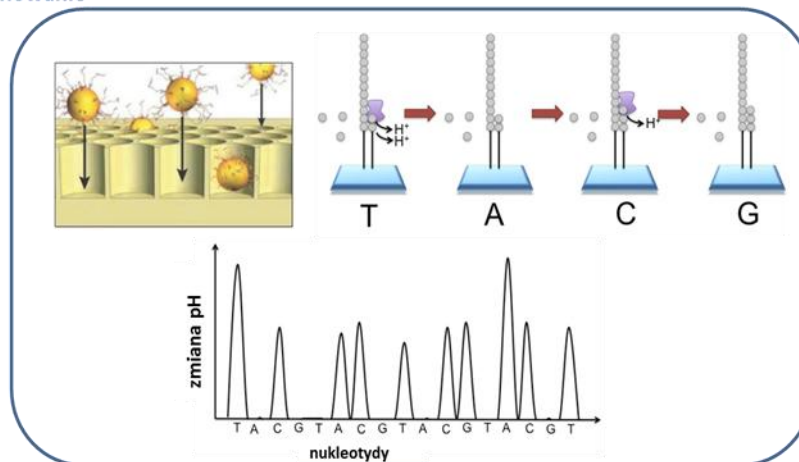
Przygotowanie bibliotek DNA



PCR w emulsji



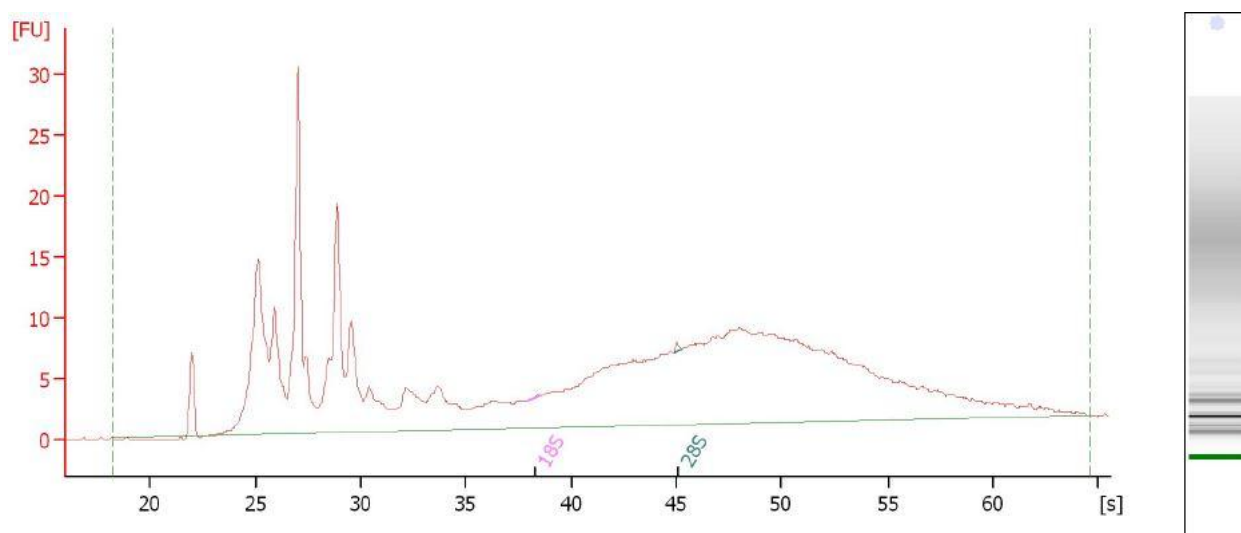
Sekwencjonowanie



Rycina 5. Graficzne podsumowanie procesu sekwencjonowania pełnego transkryptomu. Przedstawiono trzy główne etapy opisane w tekście: Przygotowanie bibliotek DNA, wykonanie reakcji PCR w emulsji oraz przeprowadzenie sekwencjonowania transkryptomu przy użyciu metody półprzewodnikowej. Każdy z etapów został szczegółowo omówiony w tekście (4.1 – 4.3). Przedstawiona rycina jest modyfikacją kilku rycin znalezionych w zasobach internetowych oraz materiałów producenta technologii.

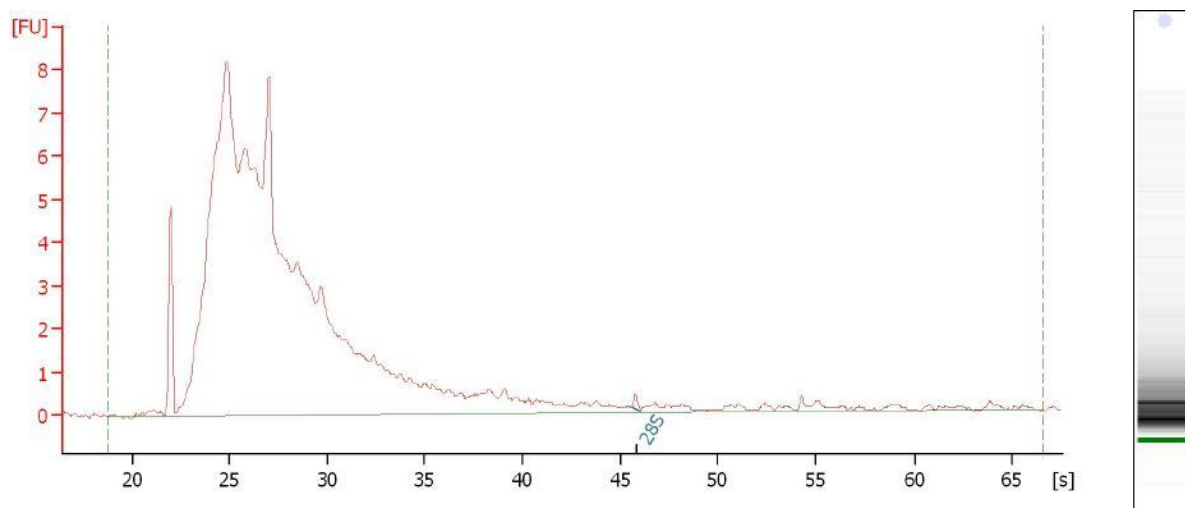
4.1 Przygotowanie bibliotek DNA (Rycina 5, górny panel)

Próbki RNA przeznaczone do sekwencjonowania przygotowano z dwóch myszy, dla minimalizacji wpływu indywidualnych różnic występujących pomiędzy zwierzętami i różnic wynikających z pobierania tkanki i ekstrakcji RNA. W pierwszym kroku, z całkowitego RNA (1 µg) usuwano rybosomalne RNA (zarówno cytoplazmatyczne 5S, 5.8S, 18S, 28S jak i mitochondrialne 12S i 16S) wykorzystując biotynylowane sondy skierowane do wysoce konserwowanych regionów rRNA oraz separację opartą o kulki magnetyczne z przyłączoną streptawidyną, dostępne w zestawie odczynników RiboMinus Eukaryote Kit v2 (Ambion). Selektywne usunięcie rRNA (stanowiącego największą frakcję całkowitego RNA) wykonywane jest celem wzbogacenia sekwencjonowanego materiału w mRNA.



Rycina 6. Analiza wielkości fragmentów RNA po usunięciu rybosomalnego RNA, przy użyciu bioanalyzera. Wykres po lewej stronie przedstawia rozkład wielkości fragmentów RNA dla jednej z analizowanych próbek jako sygnał intensywności fluorescencji (oś Y – FU, ang. fluorescence unit) w czasie (oś X – czas, sekundy) i obraz elektroforezy w żelu (prawa strona). Na podstawie profilu bioanalyzera można wizualnie ocenić rozkład wielkości fragmentów RNA. Piki rybosomalnego RNA (18S i 28S) widoczne na Rycinie 4. przestały występować.

Tak przygotowane RNA zostało następnie zagęszczone za pomocą kolumniek z krzemionką zgodnie z instrukcją w zestawie odczynników RiboMinus Concentration Module (Ambion), a rozkład wielkości RNA oceniono przy pomocy Bioanalyzera (Rycina 6). Próbkę została następnie poddana fragmentacji enzymatycznej wykorzystującej RNAzę III. Po tym etapie oceniono wydajność i rozkład wielkości fragmentowanego RNA (Rycina 7) ponownie wykorzystując Bioanalyzer.

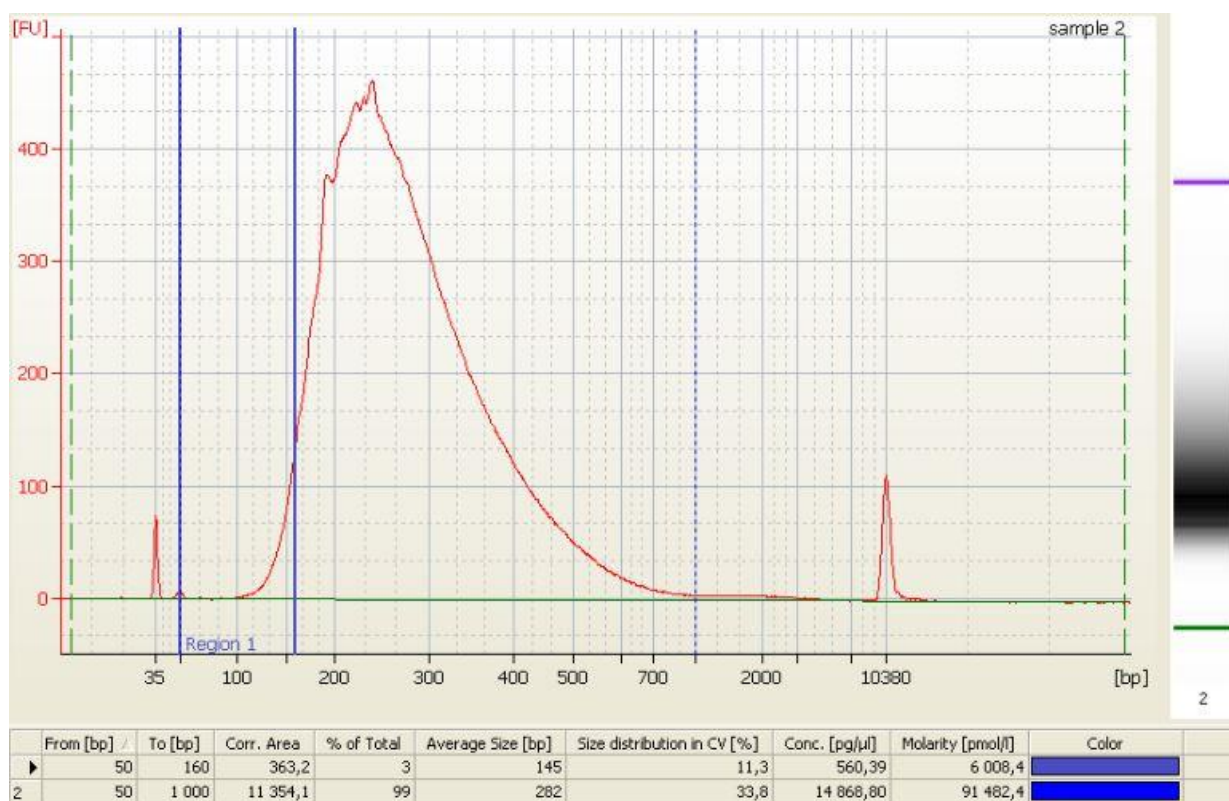


Rycina 7. Analiza rozkładu wielkości fragmentów RNA uzyskanych po enzymatycznym trawieniu RNAzą III, przy użyciu bioanalizatora. Wykres po lewej stronie przedstawia rozkład wielkości fragmentów RNA dla jednej z analizowanych próbek jako sygnał intensywności fluorescencji (oś Y – FU, ang. fluorescence unit) w czasie (oś X – czas, sekundy) i przybliżony obraz elektroforezy w żelu (prawa strona). Na podstawie profilu bioanalizatora dokonana została wizualna ocena rozkładu wielkości fragmentów RNA. Po zastosowaniu procedury enzymatycznego trawienia całość widma znajduje się po lewej stronie wykresu, co oznacza, że fragmenty są krótsze.

Przygotowanie bibliotek cDNA wymagało hybrydyzacji i ligacji sekwencji adaptorowych RNA, przeprowadzenia reakcji odwrotnej transkrypcji, oczyszczenia i amplifikacji cDNA z dodaniem specjalnych sekwencji „barcode” (wykorzystano zestaw odczynników Ion Total RNA-seq Kit v2). Po tych etapach oceniono rozkład wielkości biblioteki cDNA przy pomocy bioanalizatora (zakres wielkości 50-160 par zasad (pz) oraz 50 – 1000, Rycina 8) .

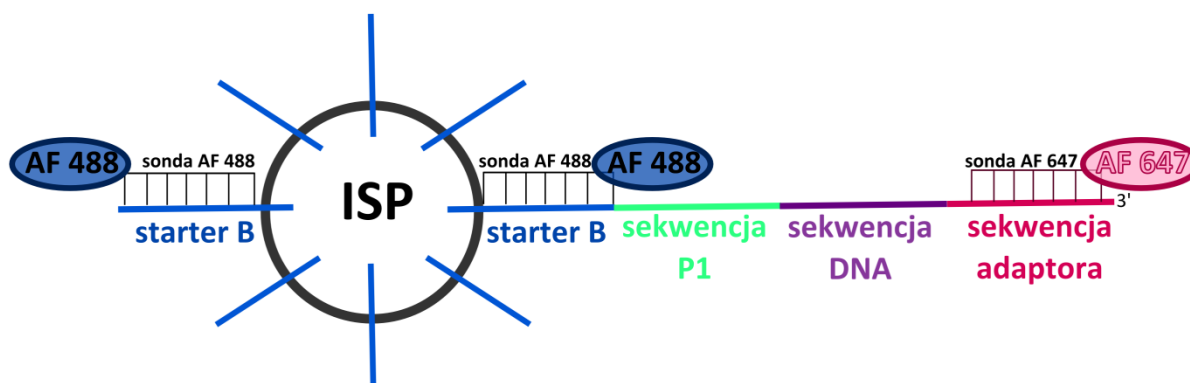
4.2 Namnażanie biblioteki cDNA w emulsji (Rycina 5, środkowy panel)

Na podstawie rozkładu wielkości fragmentów cDNA, określono ilość biblioteki koniecznej do przeprowadzenia reakcji PCR (ang. *polymerase chain reaction*) w emulsji. Emulsja tworzona jest dzięki zastosowaniu wody i oleju o odpowiednich właściwościach. W ten sposób tworzą się krople, które zawierają jedną cząsteczkę DNA związaną na kulce, a w płynie dookoła zawarte są odczynniki do reakcji PCR. W efekcie teoretycznym produktem pożądanym w reakcji jest wiele kopii cząsteczki DNA na jednej kulce.



Rycina 8. Rozkład wielkości fragmentów biblioteki cDNA. Wykres po lewej stronie przedstawia rozkład wielkości fragmentów DNA (oś X – pary zasad) dla jednej z analizowanych próbek. Wynik przedstawia sygnał intensywności fluorescencji (oś Y – FU, ang. fluorescence unit) oraz obraz elektroforezy w żelu (prawa strona). Tabela poniżej wykresu przedstawia parametry dla dwóch zakresów długości: 50 – 160 pz i 50 – 1000 pz. Na podstawie zmierzonego przez bioanalyzer stężenia DNA wyliczana jest końcowa ilość biblioteki potrzebna do sekwencjonowania.

Celem kolejnego etapu było przygotowanie wzbogaconych cząsteczek sfer (ISPs, *ang. Ion Sphere Particles*) zawierających namnożoną matrycę do sekwencjonowania. Amplifikacja na sferach wykonana była poprzez reakcję PCR w emulsji z użyciem instrumentu Ion OneTouch™ 2 Instrument i odczynników Ion PI™ Template OT2 200 Kit v3, a następnie produkt reakcji PCR został wzbogacony w sfery zawierające matrycę przy użyciu instrumentu Ion OneTouch ES. Równocześnie wykonany został test kontroli jakości sfer (Ion Sphere™ Quality Control assay) z wykorzystaniem pomiaru fluorymetrycznego dwóch różnych fluoroforów: Alexa Fluor488 i Alexa Fluor647 przy użyciu Qubit 2.0. Sonda AF 488 ulega hybrydyzacji do startera B czyli do wszystkich ISP, zaś sonda AF 647 hybrydyzuje do sekwencji adaptorowej czyli do ISPs z wydłużoną matrycą (Rycina 9). Stosunek fluorescencji mierzonej dla AF 647 do tej dla AF 488 pozwala na wyznaczenie procentowej ilości sfer z odpowiednią matrycą. Optymalna ilość biblioteki cDNA zawiera się w zakresie 10-25%.



Rycina 9. Schemat konstruktu pozwalającego na kontrolę jakości sfer. Rycina przedstawia sondy fluorescencyjne (AF 488 i AF 647) przyłączone do sfery (ISP) zawierającej namnożoną matrycę do sekwencjonowania. Struktura została przedstawiona bez zachowania skali długości sekwencji.

4.3. Proces sekwencjonowania transkryptomu (Rycina 5, dolny panel)

Matryca do sekwencjonowania została przygotowana przy użyciu instrumentu Ion OneTouch™ 2 Instrument i odczynników Ion PI™ Template OT2 200 Kit v3. Do sekwencjonowania wykorzystano zestaw odczynników Ion PI™ Sequencing 200 Kit v3, Ion PI™ Chip v2 oraz wysokoprzepustowy sekwenator NGS Ion Proton. Wykorzystana została metoda sekwencjonowania półprzewodnikowego, które opiera się na wykrywaniu zmian pH wywoływanych przez uwalnianie jonu wodorowego w momencie włączenia nukleotydu w rosnącą nić DNA. Uwolniony jon powoduje zmianę napięcia w dołku na mikroczipie. Z każdego sekwencjonowania otrzymano około 10^9 odczytanych par zasad czyli około 80 milionów odczytów o średniej długości 120 par zasad.

5. Pomiar poziomu mRNA metodą ilościowego PCR

Pomiar ekspresji genów techniką qPCR (ang. *quantitative polymerase chain reaction*) wykonano w próbkach pochodzących od pojedynczych zwierząt. Reakcję odwrotnej transkrypcji prowadzono z użyciem odwrotnej transkryptazy Omniscript (4 jednostki, Qiagen Inc.), przez 60 minut, w temperaturze 37°C z użyciem 1 µg całkowitego RNA jako matrycy. Reakcję prowadzono w obecności inhibitora rybonukleaz (10 jednostek, RNasin Inhibitor, Promega) i starterów oligo(dT)₁₂₋₁₈ (mieszanka oligomerów deoksytymidyny o długości od 12 do 18 zasad, Invitrogen). Mieszankę reakcyjną dopełniano wodą tak, aby końcowa objętość dla pojedynczej reakcji wynosiła 20 µl. Otrzymane po 1 h inkubacji w temperaturze 37°C próbki cDNA rozcieńczano w wodzie, w stosunku objętościowym 1:20, gdyż pochodzące z buforu sole mogą zaburzać reakcję PCR. Do każdej reakcji PCR wykorzystano ~25 ng produktów reakcji. Pomiar przyrostu ilości produktu reakcji PCR prowadzono w czasie rzeczywistym z użyciem zestawów starterów i sond TaqMan oraz odczynników

TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, ThermoFisher), zgodnie z protokołem zalecanym przez producenta. TaqMan Universal PCR Master Mix zawiera termostabilną polimerazę DNA AmpliTaq Gold oraz mieszaninę dNTP. W oparciu o analizę wyników sekwencjonowania wybrane zostały alternatywne transkrypty regulowane podaniem leków a poziom ich ekspresji zostanie określony przy użyciu specjalnie zaprojektowanych sond TaqMan. Listę transkryptów wraz z odpowiadającymi im numerami sond zamieszczono w Tabeli 3.

Tabela 3. Spis sond TaqMan wykorzystanych w doświadczeniach przeprowadzonych z użyciem metody ilościowego PCR.

Identyfikator sondy TaqMan	Symbol genu	Oznaczenie transkryptu ^{a)}	Fragment docelowy
Mm01545304_m1	<i>Hprt</i>	ENSMUST00000026723	Eksony 2/3
Mm00457274_g1	<i>Dusp1</i>	ENSMUST00000025025	Eksony 2/3
Mm01204954_g1	<i>Arc</i>	ENSMUST00000023268	Eksony 2/3
Mm00456650_m1	<i>Egr2</i>	ENSMUST00000048289	Eksony 1/2
Mm00477798_m1	<i>Nfkbia</i>	ENSMUST00000021413	Eksony 2/3
Custom TaqMan	<i>Sgk1</i>	ENSMUST00000020145	Eksony 1/2
Mm00487425_m1	<i>Fos</i>	ENSMUST00000021674	Eksony 1/2
Mm00478593_m1	<i>Bhlhe40</i>	ENSMUST00000032194	Eksony 4/5
Mm01183076_g1	<i>Bhlhe40</i>	ENSMUST00000032194 ENSMUST00000163617	Eksony 2/3
Custom TaqMan	<i>Map6</i>	ENSMUST00000127492	Ekson 3
Mm00447899_m1	<i>Map6</i>	ENSMUST00000068973	Eksony 3/4
Custom TaqMan	<i>Clk1</i>	ENSMUST00000129577	Ekson 4
Custom TaqMan	<i>Clk1</i>	ENSMUST00000123580	Eksony 1/2
Mm00444950_m1	<i>Dcl1</i>	ENSMUST00000054237 ENSMUST00000167204	Eksony 4/5
Mm01545304_m1	<i>Dcl1</i>	ENSMUST00000167204 ENSMUST00000199585	Eksony 6/7 Eksony 2/3
Mm01512375_m1	<i>Dcl1</i>	ENSMUST00000070418	Eksony 13/14
Custom TaqMan	<i>Dcl1</i>	ENSMUST00000054237	Intron 6 5'
Custom TaqMan	<i>Dcl1</i>	ENSMUST00000054237	Intron 6 3'

^{a)} z bazy Ensembl: <http://www.ensembl.org/index.html>;

Detekcja oparta na sondach TaqMan wykorzystuje krótkie, fluorescencyjnie znakowane oligonukleotydy, które wiążą się z komplementarną sekwencją DNA. Na etapie wydłużania sonda jest degradowana przez polimerazę *Taq*, dzięki czemu znajdujący się na jej 5' końcu fluorochrom oddziela się od znajdującego się na końcu 3' wygaszacza i jakościowo zwiększa wydajność fluorescencji, której sygnał gromadzi się wraz z postępowaniem reakcji PCR. Zastosowana metoda jest ilościowa oraz charakteryzuje się wysoką czułością pomiaru poprzez ograniczenie możliwości powstawania niespecyficznego sygnału amplifikacji. Część starterów została zaprojektowana przy użyciu narzędzia bioinformatycznego Custom TaqMan Assay Design Tool dostępnego na stronie producenta (<https://www.thermofisher.com/order/custom-genomic-products/tools/cadt/>). Wszystkie sondy wraz z opisem eksonu/intronu, w który celują zebrano w Tabeli 3. Wydajność amplifikacji dla każdego zestawu określano z użyciem wzorcowej krzywej rozcieńczeń cDNA. Przygotowane próbki umieszczano w termocyklerze CFX96 Real-Time (Bio-Rad). Zastosowano program reakcji PCR zgodny z instrukcją producenta czyli 50°C/2 minuty, 95°C/10 minut, 40 cykli denaturacji 95°C/15 sekund i wydłużania 60°C/1 minutę.

6. Detekcja białkowego produktu genu *Dclk1*

6.1. Przygotowanie próbek do analizy białek

W celu zbadania czy regulowany wariant genu *Dclk1* ulega translacji postanowiono wyizolować białko z NAC myszy po subchronicznych podaniach mianseryny. Bezpośrednio po wyodrębnieniu, tkankę poddano homogenizacji w gorącym 1% roztworze SDS z wykorzystaniem homogenizatora Rotor Stator 161 Homogenizer (IKA®-Werke, Staufen, Germany). Próbki odwirowano w temperaturze 4°C przez 20 minut z prędkością 16 000g, a nadsącz przeniesiono do nowych probówek. Stężenie białka oznaczono stosując metodę z kwasem bis-cynchoninowym (BCA) i zestaw odczynników BCA Protein Assay Kit (Sigma-Aldrich).

Próbki zawierające 50 µg białka poddano denaturacji w buforze obciążającym Laemmli'ego przez 5 minut w 95°C. Rozdział białek przeprowadzono metodą elektroforezy w układzie denaturującym (SDS-PAGE) w 18% żelu poliakrylamidowym (18% Criterion™ TGX™ Precast Gels, Bio-Rad). Po elektroforezie żele przenoszono do roztworu zawierającego 40% metanolu i 20% kwasu octowego, a następnie barwiono przez noc barwnikiem Coomassie brilliant blue R250. Z żelu wycinano prążki zawierające peptydy o masie < 10 kDa. Jako standard wielkości wykorzystano marker Polypeptide 1.4–26.6 kD SDS-PAGE Standard (Bio-Rad, nr kat. 1610326).

6.2 Analiza spektrometrii mas

Analiza spektrometrii mas została wykonana w Laboratorium proteomiki i spektrometrii mas Małopolskiego Centrum Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie dzięki współpracy z dr hab. Sylwią Kędracką-Krok, dr Urszulą Jankowska i mgr Bożeną Skupień-Rabian. Wycięte fragmenty żelu zostały najpierw przemyte roztworem zawierającym 25% acetonitrylu/25 mM NH_4HCO_3 , potem roztworem 50% acetonitrylu/25 mM NH_4HCO_3 , odwodnione w 100% acetonitrylu i osuszone. Następnie, fragment żelu został umieszczony w roztworze 25 mM NH_4HCO_3 zawierającym endoproteinazę LysC (Promega). Trawienie zostało przeprowadzone przez noc w temperaturze 37°C. Następnego dnia reakcja została zatrzymana przez dodanie CF_3COOH , po czym mieszanina strawionych peptydów została osuszona w wyparce próżniowej i zawieszona w roztworze zawierającym znakowany izotopowo standard. Tak przygotowaną próbkę analizowano przy użyciu spektrometru masowego Q-Exactive (Thermo Scientific) sprzężonego z nano-HPLC (wysokosprawną chromatografią cieczową, UltiMate 3000 RSLCnano System, Thermo Scientific). Rozszerzony opis warunków chromatografii, ustawień jonizacji i metod analizy danych opisany został w opublikowanej pracy [142].

7. Analizy danych

7.1. Analiza danych mikromacierzowych

W analizach wykorzystano dane z doświadczeń wykonanych przy użyciu mikromacierzy DNA firmy Illumina [5]. Dane te pochodzą z wcześniej opublikowanych eksperymentów profilowania ekspresji genów w prążkowi myszy po jednokrotnym podaniu 18 substancji psychoaktywnych: mianseryny, imipraminy, fluoksetyny, bupropionu, tianeptyny, tranilcyprominy, metamfetaminy, kokainy, nikotyny, heroiny, morfiny, etanolu, diazepam, buspironu, hydroksyzyny, klozapiny, rysperydonu i haloperydolu, po 1, 2, 4 i 8 godzinach od podania leku. Użyto mikromacierzy MouseWG-6 BeadChip array (łącznie 108 mikromacierzy Illumina MouseWG-6 v1.1 i 216 Illumina MouseWG-6 v2). Próbkę RNA pochodzące od dwóch zwierząt były łączone, wykorzystano 3 powtórzenia biologiczne dla każdego punktu czasowego oraz 12 mikromacierzy dla każdego leku. Analiza i kontrola jakości 324 mikromacierzy została przeprowadzona z wykorzystaniem pakietu BeadArray R package v1.10.0. Surowe wyniki odczytu poddano korekcji tła, normalizacji danych oraz transformacji \log_2 . Wyniki poddano standaryzacji w celu zmniejszenia efektu partii stosując transformację Z. Do wizualizacji wyników wykorzystano narzędzie Genes2mind (<http://genes2mind.org>) [173].

7.2. Analiza danych z sekwencjonowania następnej generacji

Jakość danych NGS została zweryfikowana przy użyciu algorytmu FastQC. W następnej kolejności odczyty zostały uliniowane do genomu referencyjnego przy użyciu algorytmów TopHat 2.0.1 oraz Tmap 3.0.2 [174, 175]. Wykorzystanie tych dwóch algorytmów pozwala na uliniowanie zarówno odczytów, które obejmują sekwencję eksonów jak i takich, które są rozdzielone intronem. Określenie poziomu abundancji transkryptów składa się z dwóch etapów: (1) wyliczenie RPKM (Reads Per Kilobase of transcript per Million fragments mapped):

$$RPKM = \frac{\frac{\text{długość genu}}{1000}}{\frac{\text{ilość wszystkich uliniowanych odczytów}}{1000000}}$$

(2) rozdzielenie odczytów do poszczególnych transkryptów z wykorzystaniem algorytmu Cufflinks v2.2.1 czyli określenie FPKM (Fragments Per Kilobase of transcript per Million fragments mapped). Na wszystkich etapach korzystano z sekwencji i struktur genów dostępnych w bazie Ensembl (www.ensembl.org). Istotność statystyczna była wyliczana z wykorzystaniem analizy wariancji na wartościach $\log_2(1 + x)$ dla rozkładów ciągłych normalnych [60]. Wartość spodziewanego odsetku wyników fałszywie pozytywnych (FDR, ang. *false discovery rate*) oszacowano za pomocą metody Benjaminiego-Hochberga [176]. Do wszystkich analiz statystycznych wykorzystano oprogramowanie R w wersji v3.3.1. Pełne dane uzyskane metodą sekwencjonowania NGS zdeponowano w bazie GEO (GEO: GSE117174) i udostępniono publicznie ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/geo](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo)).

7.3 Klasyfikacja transkryptów

Do adnotacji i klasyfikacji transkryptów wykorzystano interfejs Biomart do bazy danych Ensembl. Adnotacja Ensembl polega na zebraniu i automatycznym przypisaniu identyfikatorów genów, transkryptów i biotypów z innych baz danych. Ponadto dla niektórych gatunków (m.in. dla *Mus musculus*) przeprowadzana jest też ręczne sprawdzanie przypisanych oznaczeń. Wszystkie transkrypty są oparte o wyniki eksperymentalne. Geny Ensembl (z unikalnym numerem „gene ID ENSG...”) obejmują wszystkie znane transkrypty (z unikalnym numerem „transcript ID ENST...”). Dostępne typy transkryptów wykorzystane w przedstawionej w pracy analizie, to transkrypty kodujące białko (ang. *protein coding*), retencja intronu (ang. *retained intron*), pseudogeny (ang. *pseudogene*), przetworzone transkrypty (ang. *processed transcript*), snoRNA, miRNA oraz lincRNA. Przetworzone transkrypty w tej klasyfikacji to takie, które nie kodują białka i nie posiadają otwartej ramki odczytu.

7.4. Analiza obszarów regulatorowych genów

Analiza potencjalnych miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych w regionach regulatorowych genów wykonywana była przy użyciu narzędzia seqinspector (seqinspector.cremag.org) [139]. Seqinspector pozwala utworzenie listy białek regulatorowych wiążących się do sekwencji DNA genów o wspólnej ekspresji. Dane zgromadzone w seqinspectorze zawierają m.in. ścieżki ENCODE ChIP-seq oraz dane znajdujące się w bazie Gene Expression Omnibus (GEO). Przy każdym czynniku transkrypcyjnym znajduje się opis ścieżki wraz z informacją z jakiego eksperymentu pochodzą dane, wykres stosu, który pokazuje mapę cieplną przedstawiającą rozkład pokryć dla wszystkich zadanych genów oraz histogram z wizualizacją średniego pokrycia dla badanych grup genów (2000 bp wokół centrum przedziału genomowego). Metoda ChIP-seq polega na immunoprecypitacji chromatyny połączonej z wysokoprzepustowym sekwencjonowaniem DNA. Wykorzystanie danych z eksperymentów ChIP-seq pozwala na otrzymanie informacji na temat bezpośredniej interakcji białka z DNA. Szczegółowe informacje na temat eksperymentów są dostępne w bazie GEO. Każda ścieżka ma unikalny numer, który pozwala na identyfikację typu organizmu i warunków w jakich przeprowadzone było doświadczenie.

7.5. Grupowanie funkcjonalne genów

Związki funkcjonalne występujące pomiędzy genami były identyfikowane na podstawie podobieństw w ich klasyfikacji, wykonanej przy pomocy terminów ontologicznych (ang. *gene ontology*). Analiza została wykonana przy pomocy serwisu DAVID w wersji 6.8 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) [177]. Lista wszystkich znanych genów, których ekspresję stwierdzono w mózgu *Mus musculus* przy pomocy mikromacierzy DNA została użyta jako odniesienie. Znamienne nadreprezentacja grupy genów w obrębie analizowanych list transkryptów została zdefiniowana jako zawierająca co najmniej 3 geny i wykazująca wartość $p < 0,01$ w teście Fishera. Nadreprezentacja funkcjonalna rozumiana jest jako występowanie większej liczby genów przyporządkowanych do danego terminu ontologicznego, niż mogłoby to wystąpić przez przypadek.

7.6. Porównanie ekspresji transkryptomu regulowanego podaniem leków z bazą danych transkryptomów pojedynczych komórek kory wzrokowej

Wyniki własne uzyskane z sekwencjonowania transkryptomu porównano z wynikami sekwencjonowania transkryptomu pojedynczych komórek udostępnionymi przez Tasic i wsp [178]. Nałożono na siebie listy transkryptów tak, by te zidentyfikowane jako istotne w wynikach własnych przypisać do określonego typu komórek z bazy. Odczyty uliniowane do genomu referencyjnego myszy mm10 zostały pobrane z bazy Sequence Read Archive (BioSample: SAMN03946596).

Następnie, przy pomocy narzędzia Cufflinks i pliku GTF z bazy Ensembl (został on również użyty do analizy własnych danych) obliczono poziom ekspresji transkryptów wyrażony w FPKM. W ten sposób otrzymano listę transkryptów zgodną z analizą własnych danych. Pozwoliło to na analizę poziomu ekspresji 113 transkryptów regulowanych w odpowiedzi na podanie leków psychotropowych na podstawie zestawu danych udostępnionych przez Tasic i wsp. Nadreprezentacja transkryptów wyliczona została testem Fishera.

7.7. Analiza wyników qPCR

Względną liczbę kopii danego transkryptu obliczano na podstawie wzoru: $2^{-\Delta Ct}$, gdzie ΔCt to różnica wartości cyklu progowego (ang. *threshold cycle*) pomiędzy badaną sondą a wartości dla genu referencyjnego *Hprt*. Analizę statystyczną wyników qPCR przeprowadzano poprzez analizę wariancji ANOVA, a różnice pomiędzy poszczególnymi grupami wykazano przy pomocy post testu HSD Tukey'a.

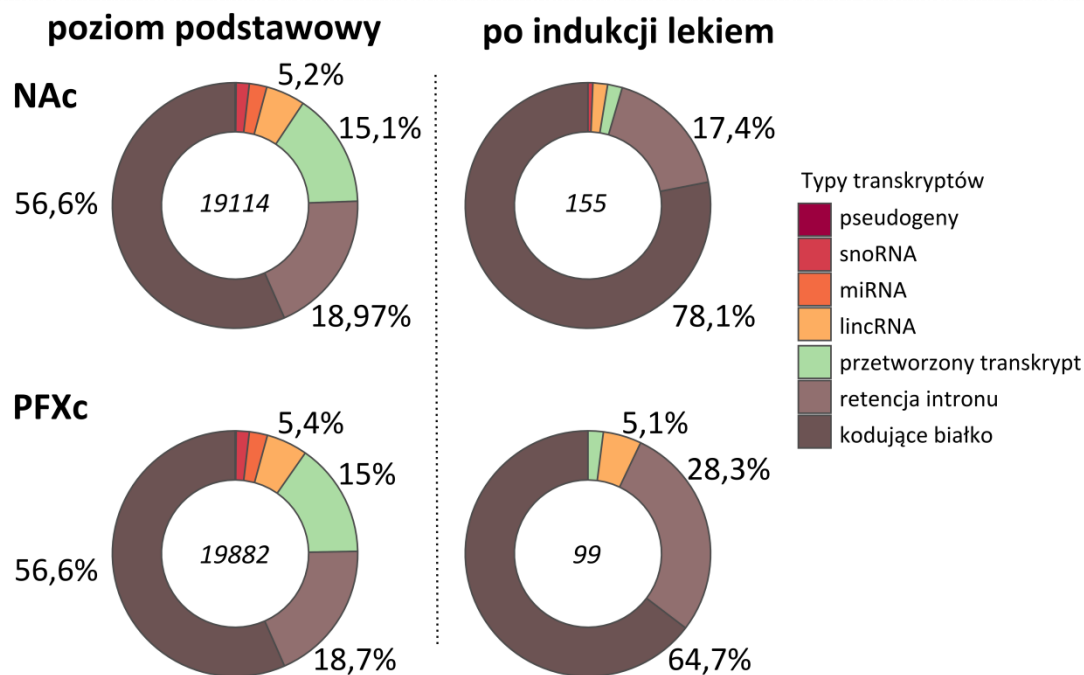
IV. Wyniki

Opis uzyskanych wyników podzielono na dwie części. W pierwszej części przedstawione zostały wyniki analizy pełnego transkryptomu mające na celu zbadanie procesu alternatywnej ekspresji genów w mózgu wywołanych podaniem leków psychotropowych. Druga część skupiona jest na przedstawieniu wyników szczegółowej analizy zmian transkrypcji zachodzących w obrębie locus *Dclk1*.

1. Zmiany transkryptomu wywołane podaniem leków psychotropowych

Przeprowadzono analizę różnic w ekspresji transkryptów w korze przedczołowej i jądrze półleżącym przegrody mózgu myszy po podaniu sześciu leków psychotropowych: haloperydolu, rysperydonu, mianseryny, wenlafaksyny, metamfetaminy i ketaminy. Zastosowano metodę sekwencjonowania następnej generacji (NGS) z wykorzystaniem platformy Ion Proton.

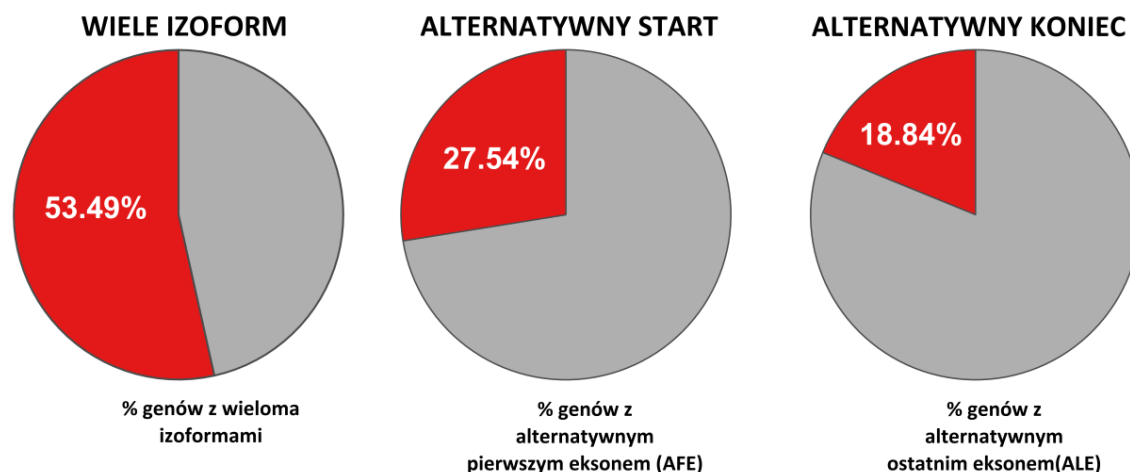
Odczytano znormalizowane poziomy abundancji (FPKM) dla wszystkich transkryptów, dla których dostępne są adnotacje w edycji genomu GRCm38.p5 przy użyciu pakietu Cufflinks. Zidentyfikowano 110 327 różnych transkryptów odpowiadających 45 935 genom ulegającym ekspresji w PFCx i NAc przy założeniu progu detekcji jako średni FPKM ≥ 0.1 . Zmiany wywołane podaniem leków klasyfikowano na podstawie biotypów i rodzajów alternatywnego składowania eksonów. Po pierwsze zauważono, że większość regulowanych lekami transkryptów należała do transkryptów kodujących białka: 78% w NAc i 65% w PFCx w porównaniu do 56% transkryptów kodujących białko w warunkach podstawowych (bez stymulacji lekiem, Rycina 10). Pozostałą grupę regulowanych lekami transkryptów stanowiły transkrypty niekodujące białek, wśród których najliczniejszą podgrupę stanowiły te sklasyfikowane jako zawierające retencję intronu. W obydwu strukturach zaobserwowano spadek ilości regulowanych transkryptów klasyfikowanych jako przetworzony transkrypt, czyli taki który nie koduje białka i nie posiada otwartej ramki odczytu (ok. 15% wszystkich transkryptów w warunkach podstawowych vs ok. 2% po podaniu leków). Nie stwierdzono regulacji ekspresji transkryptów klasyfikowanych jako pseudogeny, czyli tych będących efektem duplikacji genu lub jego retrotranspozycji. Niewielką grupę (ok. 5% wszystkich transkryptów w warunkach podstawowych) stanowiły długie niekodujące RNA, których proporcja nie uległa zmianie po podaniu leków w PFCx, a w NAc zaobserwowano spadek poniżej 2% regulowanych transkryptów. Nie wykryto indukcji krótkich niekodujących RNA (miRNA, snoRNA) po podaniu leków w żadnej z badanych struktur.



Rycina 10. Klasyfikacja zidentyfikowanych transkryptów. Wykresy kołowe przedstawiają dystrybucję biotypów transkryptów indukowanych podaniem leków (prawa strona) w porównaniu do całego transkryptomu (lewa strona) jądra półleżącego przegrody (górna część) i kory przedczołowej (dolna część) mózgu myszy. Kolorami zaznaczono typy transkryptów zgodnie z legendą. W środku wykresów kołowych oznaczono liczbę transkryptów.

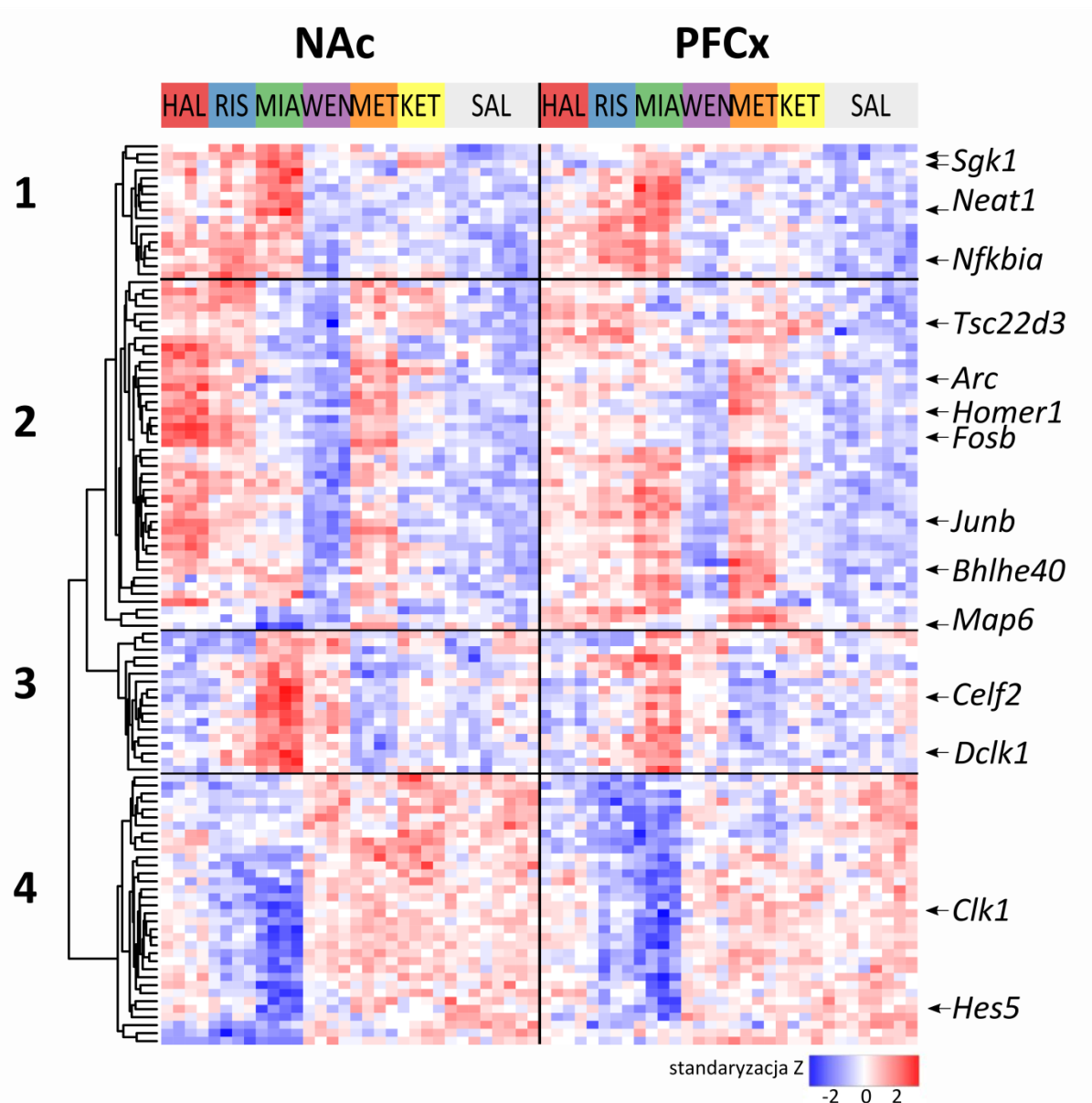
Kolejnym krokiem było sprawdzenie czy wykryte transkrypty należą do genów, które mogą ulegać zjawisku alternatywnej transkrypcji. Ponad połowa zidentyfikowanych transkryptów (53,49%) przynależała do genów, dla których dotychczas określono co najmniej dwie izoformy (Ensembl wersja GRCh38.p5/mm10). Z tej grupy 27% transkryptów charakteryzowało się wykorzystaniem alternatywnego miejsca startu transkrypcji, a 18% alternatywnego miejsca końca transkrypcji (Rycina 11).

Następnym elementem analizy było określenie różnic w profilu indukowanej lekami ekspresji genów pomiędzy NAc i PFCx. Oceny dokonano przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji dla czynnika leku wykonywanego osobno w każdej tkance. Przeprowadzone porównanie stwierdziło 90 transkryptów regulowanych przez co najmniej jeden z badanych leków tylko w NAc (np. *Map6*, *Cdkn1a*) oraz 246 transkryptów zmienianych tylko w PFCx (np. *Bhlhe40*, *Fkbp5*), przy FDR < 0,0001. Przy zdefiniowanym progu istotności zidentyfikowano 26 transkryptów regulowanych w obu tkankach (np. *Homer1*, *Sgk1* i *Fosb*). Pełna lista transkryptów została zamieszczona w Dodatkowej Tabeli S1.



Rycina 11. Charakterystyka genów regulowanych w mózgu podaniem leków ze względu na liczbę możliwych izoform transkrypcyjnych. Wykresy kołowe przedstawiają (od lewej): procent genów z więcej niż jednym transkrypcyjnym, procent genów z alternatywnym pierwszym eksonem oraz procent genów z alternatywnym ostatnim eksonem. Transkrypty charakteryzowano w grupie wszystkich transkryptów regulowanych podaniem leków.

Kolejnym zadaniem było określenie zmian w transkryptomie wywołanych podaniem badanych leków. Przeprowadzono dwuczynnikową analizę wariancji dla czynników tkanka oraz lek. Zastosowano próg istotności statystycznej dla czynnika lek na poziomie $FDR < 0,001$. Na Rycinie 12 przedstawiono grupowanie hierarchiczne profili zmian ekspresji 113 najbardziej istotnych statystycznie transkryptów w ANOVA. Metoda ta pozwoliła na wydzielenie czterech głównych grup transkryptów o podobnych profilach regulacji po podaniu leków psychotropowych (numery 1-4). Następnie, zdefiniowane grupy transkryptów zostały przeanalizowane pod kątem nadreprezentacji miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych w ich regionach promotorowych oraz powiązań funkcjonalnych zgodnie z bazą przypisanych terminów ontologicznych.



Rycina 12. Profilowanie zmian transkrypcji genów wywołanych podaniem leków psychotropowych. Mapa cieplna przedstawia hierarchiczną analizę skupień 113 transkryptów ulegających regulacji w jądrze półęcznym przegrody (NAc) i/lub korze przedczołowej (PFCx). Po prawej stronie wykresu przedstawione zostały przykładowe geny. Intensywność kolorów na mapie cieplnej jest proporcjonalna to poziomów abundancji transkryptów zmierzonych metodą NGS. Przedstawione pomiary są pochodną znormalizowanych wartości po dokonaniu standaryzacji Z (zawierają się w zakresie pomiędzy -2 a 2, zgodnie ze skalą przedstawioną poniżej). Analizę statystyczną wykonano przy użyciu testu dwuczynnikowej ANOVA dla czynnika lek, na podstawie wyników analizy zdefiniowano listę 113 transkryptów. Grupowanie profili przeprowadzono przy użyciu miary odległości euklidesowych. Główne gałęzie drzewa skupień wydzielono i oznaczono jako 1-4.

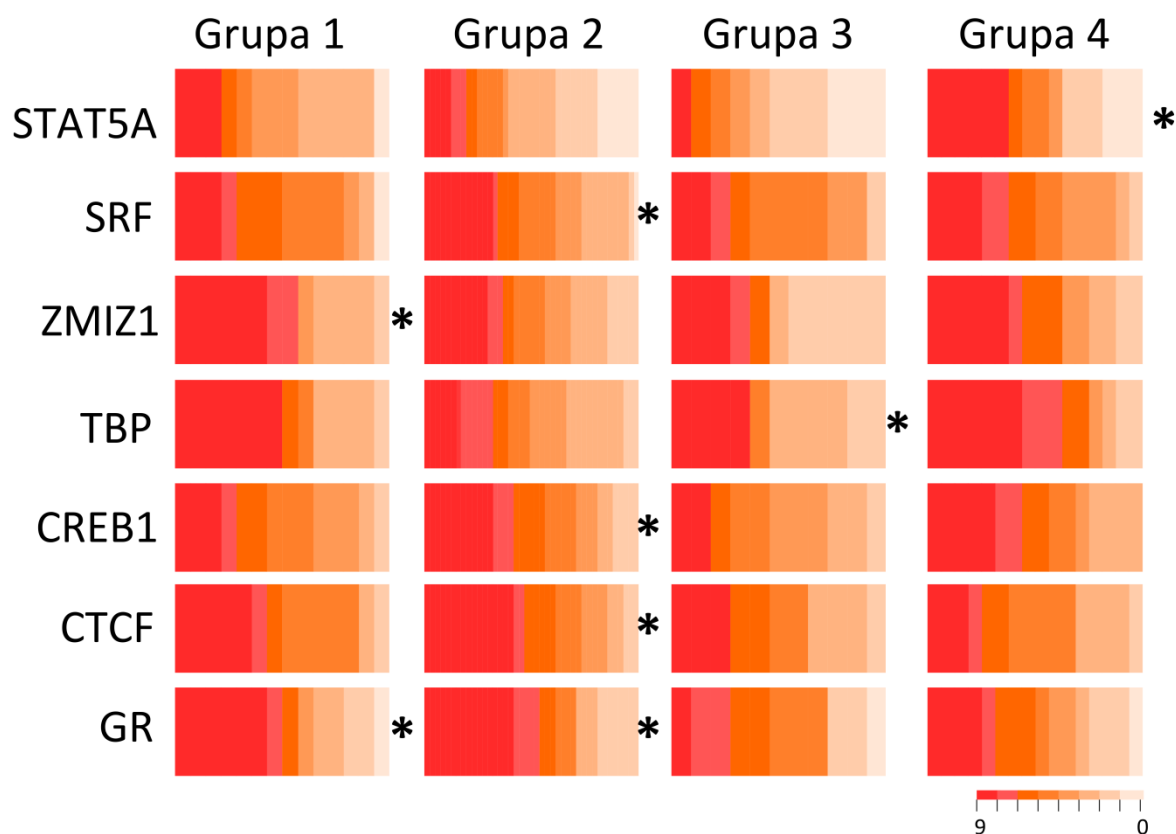
W Dodatkowej Tabeli S2 przedstawiono pełną listę transkryptów ulegających regulacji w badanym układzie eksperymentalnym. Zaobserwowano, iż poziom ekspresji transkryptów należących do grupy nr 1 był podniesiony po podaniu mianseryny w obu badanych rejonach mózgu oraz w NAc po

podaniu rysperydonu i haloperydolu. Ponad połowa (65%) transkryptów w tej grupie została przypisana jako kodująca produkty białkowe. Przykładowym genem w obrębie tej grupy jest *Sgk1*. W przypadku tego genu regulacji ulegają dwa transkrypty: ENSMUST0000020145 oraz ENSMUST00000141218. Ekspresja pierwszego ulega ponad 5-krotnemu wzrostowi po podaniu haloperydolu ($\log_2FC=2,43$, $P = 5,3 \times 10^{-6}$), rysperydonu ($\log_2FC=2,75$, $P = 1,1 \times 10^{-6}$), mianseryny ($\log_2FC=3,4$, $P = 1,17 \times 10^{-7}$), ketaminy ($\log_2FC=2,5$, $P = 1,39 \times 10^{-6}$) w NAc. Drugi z wymienionych transkryptów *Sgk1* jest regulowany poprzez podanie mianseryny – ponad 4-krotny wzrost w NAc ($\log_2FC=2,22$, $P = 2,01 \times 10^{-6}$) i prawie 3-krotny w PFCx ($\log_2FC=1,49$, $P = 1,9 \times 10^{-5}$) oraz ketaminy – 3-krotny wzrost w NAc ($\log_2FC=1,68$, $P = 8,69 \times 10^{-6}$). Inne przykłady obejmują *Nfkbia* (ponad 2-krotny wzrost ekspresji po RIS ($\log_2FC=1,2$, $P = 3,75 \times 10^{-6}$ w NAc, $\log_2FC=1,26$, $P = 5,14 \times 10^{-5}$ w PFCx) oraz MIA ($\log_2FC=1,07$, $P = 9,51 \times 10^{-6}$ w NAc, $\log_2FC=1,17$, $P = 4,27 \times 10^{-5}$ w PFCx), a także długie niekodujące RNA *Neat1* (ponad 1,5-krotna indukcja ekspresji po MIA w NAc ($\log_2FC=0,78$, $P = 1,85 \times 10^{-7}$) i PFCx ($\log_2FC=0,61$, $P = 7,61 \times 10^{-7}$)).

Wykorzystanie narzędzia seqinspector (<http://seqinspector.cremag.org>), w którym zgromadzone są dane z eksperymentów ChIP-Seq, pozwoliło na identyfikację regulatorów (czynników transkrypcyjnych, modyfikacji histonów, polimeraz RNA, wzmacniaczy i izolatorów) ekspresji zgrupowanych transkryptów regulowanych podaniem leków (Rycina 13). Analiza regionów promotorowych genów należących do grupy 1 wykazała istotną statystycznie nadreprezentację sekwencji wiążących czynniki transkrypcyjne, m.in. GR (Nr3c1, $P = 9,7 \times 10^{-6}$, t-test z poprawką Bonferroniego, numer ścieżki GEO: GSM686976) oraz ZMIZ1 ($P = 1,4 \times 10^{-5}$, GSM1003793). Analiza funkcjonalna wykonana przy pomocy analizy terminów ontologicznych wykazała nadreprezentację transkryptów związanych z regulacją procesów apoptotycznych, ubikwitynacją oraz przedziałami komórkowymi: jądrem, cytoplazmą i błoną plazmatyczną (Rycina 14).

Największa grupa transkryptów o zmienionej ekspresji (grupa nr 2) była regulowana w NAc podaniem haloperydolu i metamfetaminy oraz w mniejszym stopniu rysperydonu. W PFCx najsilniejszy efekt wywołało podanie metamfetaminy. Znakomita większość (89%) transkryptów z tej grupy koduje produkty białkowe. W grupie drugiej znalazły się transkrypty genów związanych z plastycznością neuronalną, np. *Fosb*, *Arc*, *Junb* lub *Homer1*. *Fosb* ulegał ponad 5-krotnej indukcji po podaniu haloperydolu w NAc ($\log_2FC=2,57$, $P = 1,79 \times 10^{-10}$), rysperydonu w NAc ($\log_2FC=1,69$, $P = 2,61 \times 10^{-6}$) oraz PFCx ($\log_2FC=0,82$, $P = 1,96 \times 10^{-5}$) i metamfetaminy w NAc ($\log_2FC=1,42$, $P = 6,01 \times 10^{-7}$) i PFCx ($\log_2FC=0,98$, $P = 6,3 \times 10^{-6}$). Dla transkryptu *Arc* i *Junb2* zaobserwowano ponad 3-krotny wzrost w NAc po podaniu haloperydolu ($\log_2FC=1,77$, $P = 2,83 \times 10^{-5}$; $\log_2FC=1,98$, $P = 2,5 \times 10^{-6}$). Z kolei *Homer1* był regulowany w NAc podaniem haloperydolu ($\log_2FC=1,18$, $P = 1,73 \times 10^{-8}$), rysperydonu ($\log_2FC=0,57$, $P = 3,66 \times 10^{-5}$) i metamfetaminy ($\log_2FC=0,92$, $P = 1,01 \times 10^{-7}$). W regionach

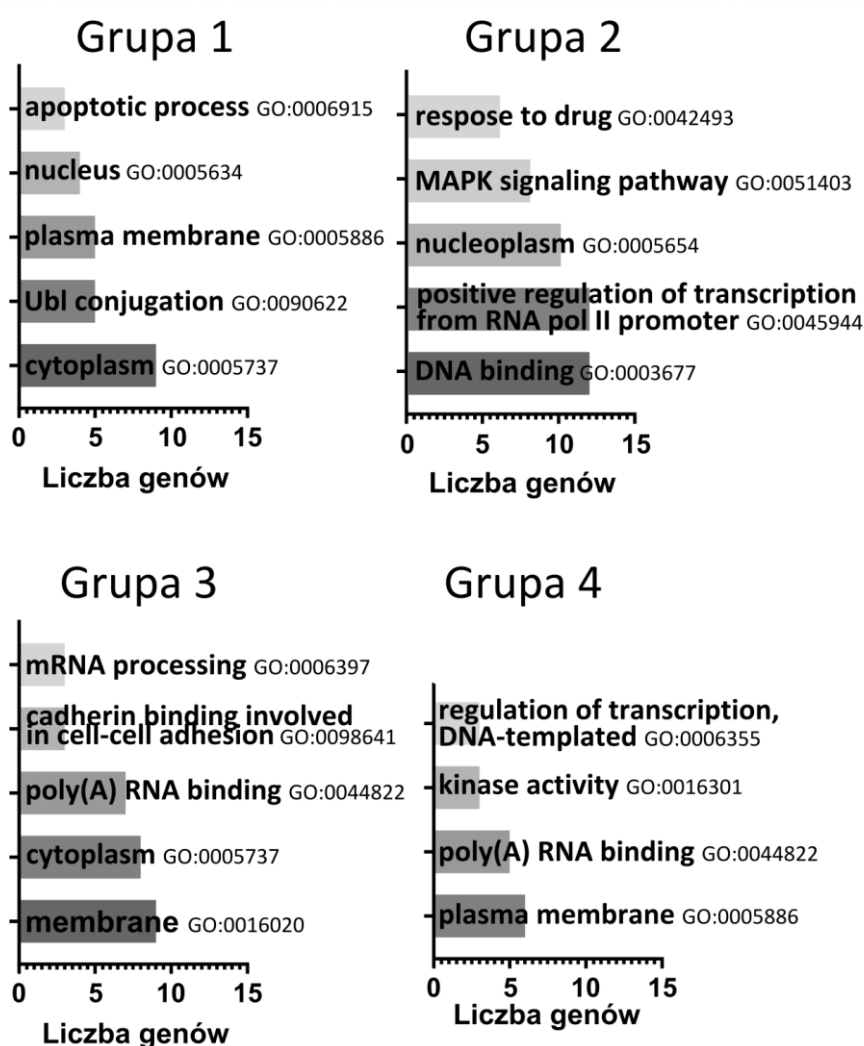
promotorowych genów z tej grupy zidentyfikowano sekwencje wiążące inne czynniki transkrypcyjne, m.in. SRF ($P = 2.1 \times 10^{-31}$, GSM915168) i CTCF ($P = 2.1 \times 10^{-12}$, GSM915188). Analiza funkcjonalna wskazała na nadreprezentację genów związanych z regulacją transkrypcji, odpowiedzią na lek oraz ścieżką przekazu sygnału MAPK.



Rycina 13. Czynniki transkrypcyjne potencjalnie zaangażowane w regulację ekspresji genów w odpowiedzi na podanie leków. Wykres stosu przedstawia poziom nadreprezentacji miejsc wiązania danego czynnika transkrypcyjnego w regionach promotora transkryptów wykazujących regulację po podaniu leku (grupy transkryptów 1-4 przedstawiono na Ryc.12.). Nazwy wybranych czynników transkrypcyjnych przedstawiono po lewej stronie wykresów. Istotność statystyczna zaznaczona jest * $P < 0,05$ (z poprawką Bonferroniego). Dla każdego genu przypisany jest poziom wiązania danego czynnika transkrypcyjnego do promotora. Poziom wiązania został przedstawiony intensywnością koloru przy pomocy rangi decylowej obliczonej w skali całego genomu. Im ciemniejszy kolor tym częstotliwość występowania miejsc jest większa w stosunku do promotorów pozostałych genów w genomie. Pełna lista czynników transkrypcyjnych zebrana została w Dodatkowej Tabeli S3.

Grupa nr 3 zawierała transkrypty takie jak, np. *Celf2* i *Dclk1*, których transkrypcja nasilała się w wyniku podania mianseryny. Efekt ten był wyraźnie silniejszy dla NAc niż w PFCx. Dla przykładu, ekspresja genów *Celf2* i *Dclk1* była indukowana podaniem mianseryny w NAc ($\log_2FC=0,57$, $P = 2,91 \times 10^{-5}$; $\log_2FC=0,91$, $P = 2,8 \times 10^{-6}$). W przeciwieństwie do dwóch pierwszych grup, tylko 21%

transkryptów z tej grupy stanowią transkrypty kodujące białka. Najliczniejszą podgrupę stanowiły transkrypty zaklasyfikowane jako „retencja intronu”. Tylko jeden czynnik transkrypcyjny został zidentyfikowany jako potencjalny regulator ekspresji genów z tej grupy, tj. TBP ($P = 2.3 \times 10^{-11}$, GSM912900). Analiza funkcjonalna wskazała na potencjalną rolę tych genów w procesowaniu RNA i wiązaniu do poli(A).



Rycina 14. Klasyfikacja funkcjonalna grup genów regulowanych podaniem leków. Analiza terminów ontologicznych (GO, *ang. gene ontologies*) wskazująca na powiązania funkcjonalne transkryptów regulowanych w mózgu po podaniu leków psychotropowych. Na wykresach umieszczono oryginalne nazwy angielskie terminów oraz numery GO. Analiza przeprowadzona przy pomocy serwisu DAVID w wersji 6.8 [177]. Narzędzie DAVID stosuje algorytmy grupujące nakładające się GO i koryguje wynik z uwzględnieniem poziomu równomierności w rozkładzie. Na osi x przedstawiono liczbę genów przypisanych do danej grupy funkcjonalnej.

Ostatnia grupa transkryptów (nr 4) wykazywała odmienny profil regulacji. Podanie mianseryny powodowało obniżenie poziomu abundancji transkryptów z tej grupy, m.in. *Clk1* i *Hes5*. Podobnie jak

w przypadku profilu transkryptów grupy 3, większość transkryptów z grupy 4 nie koduje znanych produktów białkowych (75%). Z tej podgrupy 54% zostało zaklasyfikowane jako warianty zawierające retencję intronu. Analiza regionów promotorowych genów z grupy 4 wskazała na nadreprezentację sekwencji potencjalnie wiążących czynnik transkrypcyjny STAT5A. Analiza funkcjonalna zasugerowała ich zaangażowanie w wiązanie do poli(A) oraz występowanie w bliskości błon plazmatycznych.

2. Komórkowa klasyfikacja zmian transkrypcji genów wywołanych podaniem leków psychotropowych

Kolejnym krokiem analizy danych NGS była próba określenia w jakich typach komórek nerwowych zachodzą zidentyfikowane zmiany ekspresji genów. Najnowsze technologie pozwalają na możliwość analizy dużej liczby pojedynczych komórek. Techniki te bazujące na połączeniu metod sortowania komórek (np. wykorzystując sortowanie fluorescencyjne FACS, ang. *fluorescence-activated cell sorting*) i wysokoprzepustowego sekwencjonowania są wykorzystywane m.in. w onkologii i immunologii. Rozdzielenie w ten sposób tkanki mózgowej, aby uzyskać zdolność sekwencjonowania RNA pochodzącego z pojedynczych komórek jest w dalszym ciągu dużym wyzwaniem technologicznym. Nie są dostępne narzędzia, które pozwoliłyby na pełną analizę tkanki mózgowej w kontekście regulacji w poszczególnych przedziałach komórkowych z uwzględnieniem podtypów neuronów.

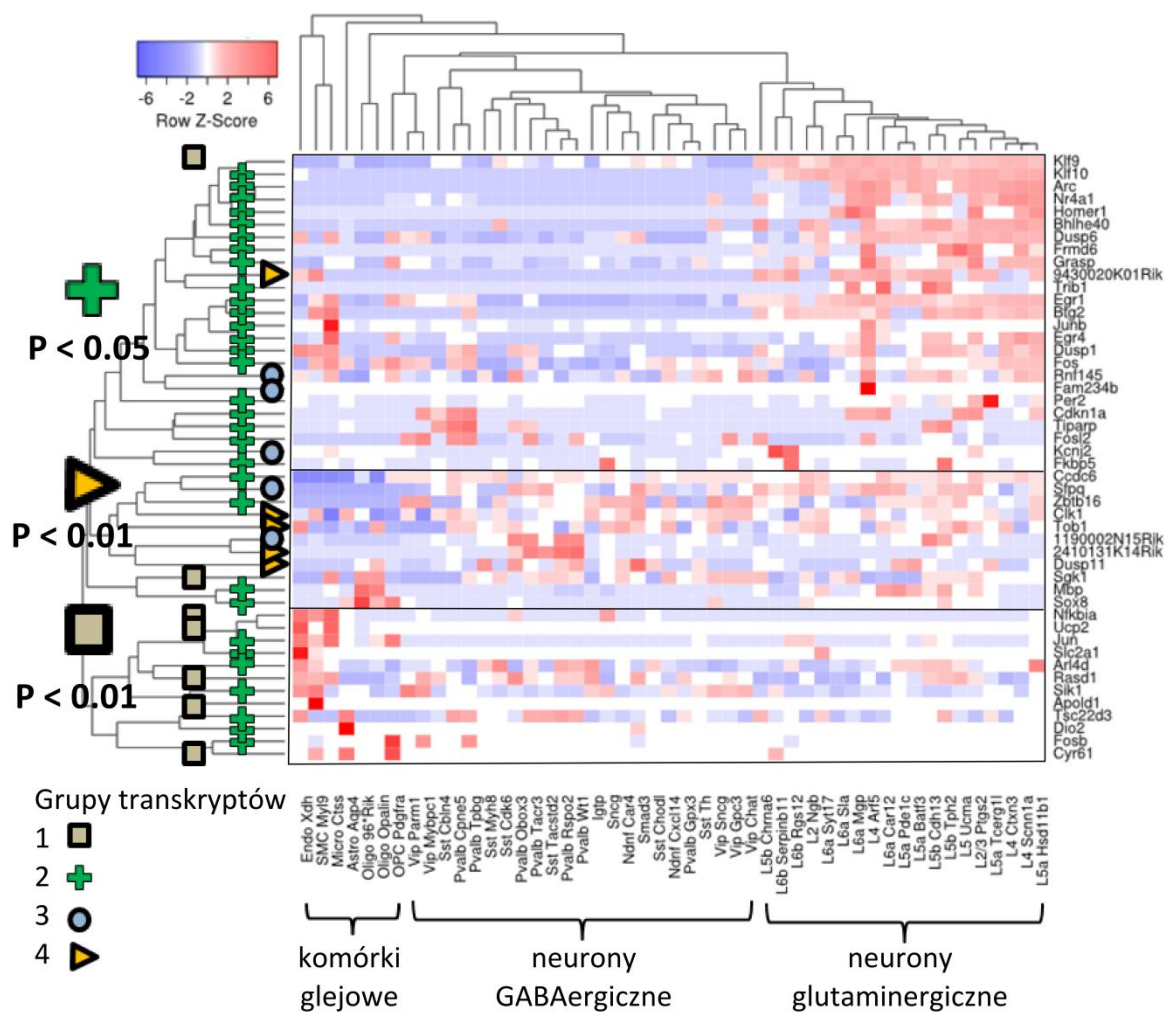
Dlatego, w następnym etapie analizy wykorzystałam zestaw danych opublikowanych przez Tasic i wsp. w 2016 roku w czasopiśmie *Nature Neuroscience* [178]. W przytoczonej pracy wykorzystano sekwencjonowanie pojedynczych komórek pierwotnej kory wzorkowej myszy. Zidentyfikowano 1 679 pojedynczych komórek, co odpowiada w sumie ponad 5 milionom odczytów. Na podstawie profili ekspresji genów autorzy zgrupowali te pojedyncze komórki, a tym samym opisali i scharakteryzowali molekularnie 49 typów komórek: 23 GABAergiczne, 19 glutaminergicznych i 7 nieneuronalnych. Postanowiłam porównać własne wyniki z sekwencjonowania transkryptomu po podaniu leków z dostępnymi danymi z sekwencjonowania pojedynczych komórek. Celem tej analizy było przypisanie regulowanego podaniem leku transkryptu do konkretnego typu komórki mózgu. Ogólny schemat porównania przedstawiony jest na Rycinie 15.



Rycina 15. Schemat przeprowadzenia procesu analizy ekspresji genów w różnych typach komórek nerwowych. Analiza poziomu abundancji została przeprowadzona dla 113 transkryptów regulowanych w odpowiedzi na podanie leków psychotropowych na podstawie zestawu danych udostępnionych przez Tasic i wsp. [178]. Odczyty uliniowane do genomu referencyjnego myszy mm10 zostały pobrane z bazy Sequence Read Archive (BioSample: SAMN03946596). Następnie, przy pomocy narzędzia Cufflinks i pliku GTF z bazy Ensembl (został on również użyty do analizy własnych danych) obliczono poziom ekspresji transkryptów wyrażony w FPKM. W ten sposób otrzymano listę transkryptów zgodną z analizą własnych danych. Pozwoliło to na analizę poziomu ekspresji 113 transkryptów regulowanych w odpowiedzi na podanie leków psychotropowych na podstawie zestawu danych udostępnionych przez Tasic i wsp. Nadreprezentację transkryptów obliczono testem Fishera.

W pozyskanym zbiorze danych z pojedynczych komórek stwierdzono ekspresję 48 transkryptów zidentyfikowanych wcześniej jako regulowane przez leki. Opracowano mapę cieplną, na której przedstawiono poziom ekspresji transkryptów w szeregu różnego typu komórek nerwowych (Rycina 16). Po prawej stronie mapy cieplnej widoczne są nazwy genów, do których należą transkrypty regulowane lekami. Pod mapą cieplną znajdują się nazwy podtypów komórek zidentyfikowanych przez Tasic i wsp. Po lewej stronie mapy cieplnej dla każdego transkryptu zaznaczono symbolem (plus, trójkąt, kwadrat, koło), do której z wcześniej opisanych grup transkryptów (1-4) regulowanej podaniem leków należą zidentyfikowane geny. Przeprowadzona analiza wykazała, że transkrypty z grupy 2 są nadreprezentowane w neuronach

glutaminianergicznych ($P = 0,03$), transkrypty grupy 1 były nadreprezentowane w komórkach glejowych ($P = 0,007$), zaś transkrypty zgrupowane w grupę 4 wykazują ekspresję zarówno w neuronach glutaminianergicznych jak i GABAergicznych ($P = 0,007$). Transkrypty należące do grupy 3 nie wykazały nadreprezentacji w żadnym z analizowanych typów komórek, żaden z tych transkryptów nie został też przypisany do komórek glejowych. Warto zaznaczyć, że nie wszystkie transkrypty regulowane podaniem leków udało się zidentyfikować w zbiorze danych transkryptów pojedynczych komórek.

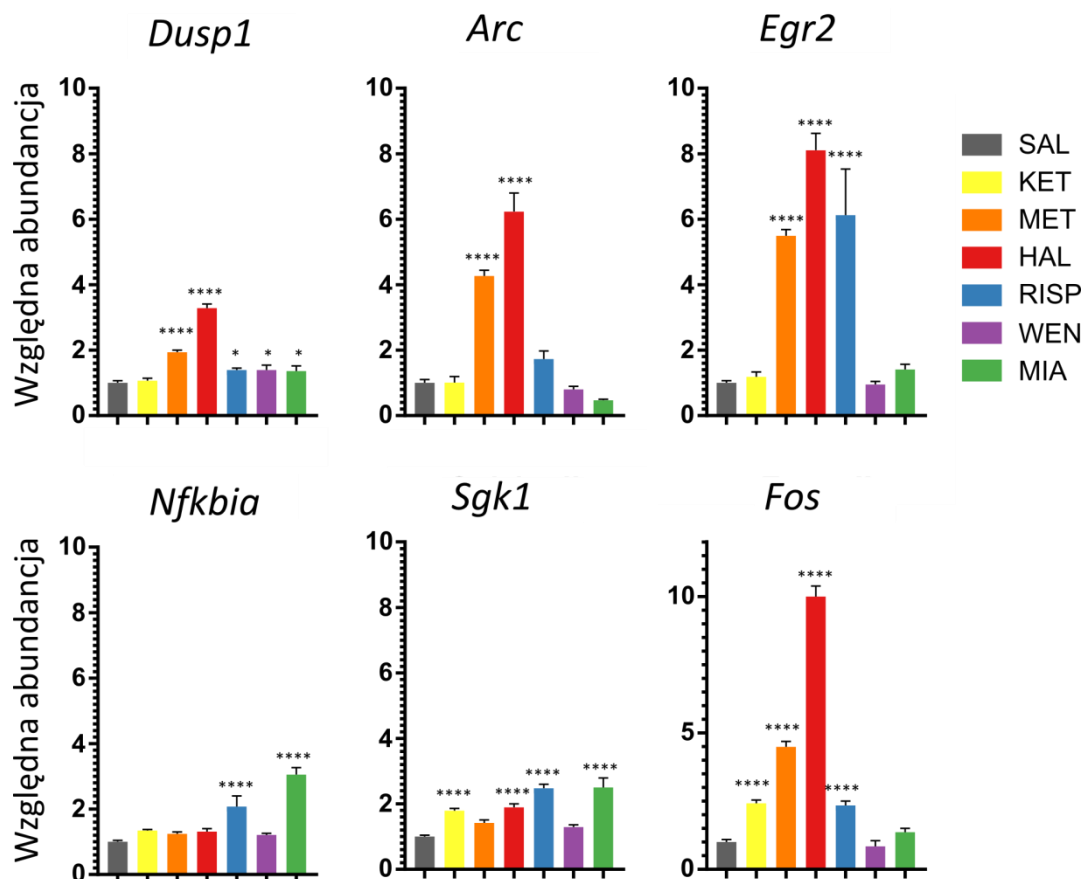


Rycina 16. Poziom ekspresji transkryptów regulowanych podaniem leków psychotropowych w różnych typach komórek nerwowych. Mapa cieplna przedstawia nałożenie dwóch zbiorów danych: wyników własnych z bazą danych transkryptów komórek kory wzrokowej. Grupy transkryptów 1-4 (z Ryciny 12) oznaczone są kolejno symbolami kwadrat, plus, kółko i trójkąt. Nadreprezentacja transkryptów wyliczona została testem Fishera.

3. Wpływ leków psychotropowych na ekspresję wybranych genów

3.1 Weryfikacja wyników sekwencjonowania przy pomocy metody qPCR

Do weryfikacji wyników sekwencjonowania wykorzystano metodę ilościowego PCR z zastosowaniem fluorescencyjnie znakowanych sond TaqMan. Analizę przeprowadzono na próbkach RNA pochodzących od pojedynczych zwierząt ($n = 8$) na niezależnie przygotowanym materiale biologicznym. Pierwszy etap weryfikacji polegał na pomiarze poziomu mRNA genów o opisanym w literaturze profilu zmian ekspresji wywołanych podaniem leków. Wyniki analizy qPCR wskazały największe zmiany dla genu *Fos* – ponad 10-krotny wzrost ekspresji po podaniu haloperydolu i prawie 5-krotny po podaniu metamfetaminy w jądrze półleżącym przegrody. Warto zwrócić uwagę, iż haloperydol i metamfetamina powodują również największe zmiany w ekspresji genów w przedstawionych wcześniej wynikach sekwencjonowania. Stwierdzono, że ekspresja genów *Dusp1*, *Arc* i *Egr2* również jest pobudzona po podaniu haloperydolu i metamfetaminy, jednakże *Egr2* jest także indukowany podaniem rysperydonu, a *Dusp1* ulega niewielkiej ale istotnej statystycznie indukcji po wszystkich badanych substancjach za wyjątkiem ketaminy. Ketamina wpływa natomiast na ekspresję transkryptu *Sgk1*. Zastosowana sonda molekularna rozpoznaje specyficzną izoformę genu *Sgk1* (ENSMUST00000020145) o alternatywnym miejscu startu transkrypcji. W opisywanych doświadczeniach ta izoforma transkrypcyjna jest ponadto indukowana podaniem haloperydolu, rysperydonu i mianseryny. Podanie mianseryny i rysperydonu powoduje wzrost abundancji transkryptu *Nfkb1a*. Efekt ten nie jest również obserwowany dla pozostałych leków. Przedstawione na Rycinie 17 geny (z wyjątkiem *Sgk1*) charakteryzują się ekspresją jednej, głównej formy transkrypcyjnej.



Rycina 17. Ekspresja wybranych genów po podaniu leków psychotropowych. Potwierdzenie zmian w poziomie mRNA w NAC zmierzonych metodą sekwencjonowania transkryptomu zostało wykonane techniką qPCR. Zwierzęta uśmiercano 2h po podaniu leków. Do eksperymentu wykorzystano ketaminę (20 mg/kg), metamfetaminę (2 mg/kg), haloperydol (1 mg/kg), rysperydon (0,5 mg/kg), wenlafaksynę (16 mg/kg) i mianserynę (20 mg/kg). Wyniki przedstawione są jako miara krotności różnicy w stosunku do grupy kontrolnej (podanie soli fizjologicznej) wraz z błędem standardowym (n = 8). Kolorami oznaczono leki, zgodnie z legendą. Nazwy genów umieszczono nad wykresami. Analizę statystyczną wykonano przy użyciu testu jednoczynnikowej ANOVA wraz z post testem Tukey'a, wynik oznaczono na wykresach **** p<0,0001, ***p<0,001, *p<0,01.

Analiza qPCR zmian w ekspresji wybranych genów w pełni potwierdziła możliwość przeprowadzenia ilościowego pomiaru metodą wysokoprzepustowego sekwencjonowania transkryptomu. Kierunek zmian obserwowany przy pomocy RNA-seq i qPCR jest podobny, chociaż występują drobne różnice w wynikach. Dla przykładu, w wynikach uzyskanych metodą sekwencjonowania nie uzyskano istotności statystycznej dla indukcji *Dusp1* i *Arc* po podaniu metamfetaminy, co wynika prawdopodobnie z zastosowanych kryteriów statystycznych. Jednakże dla genów *Egr2*, *Nfkbia*, *Sgk1* oraz *Fos* wyniki sekwencjonowania znajdują pełne potwierdzenie w wynikach qPCR.

3.2 Potwierdzenie ekspresji alternatywnych wariantów wybranych genów przy pomocy metody qPCR

Kolejny etap weryfikacji wyników sekwencjonowania obejmował wybór genów, które wykazują ekspresję liczby transkryptów większej niż jeden oraz potwierdzenie, iż podanie leków psychotropowych wywołuje specyficzną regulację określonej izoformy transkrypcyjnej. Na podstawie wyników sekwencjonowania wybrano 4 geny: *Bhlhe40*, *Map6*, *Clk1* i *Dclk1*. Sondy qPCR zaprojektowano w sposób pozwalający na detekcję wybranej izoformy transkrypcyjnej genu (Rycina 18, Tabela 3).

Analiza qPCR pozwoliła na potwierdzenie, iż izoforma kinazy *Map6* (ENSMUST00000127492) o alternatywnym miejscu zakończenia transkrypcji ulega w NAc indukcji po podaniu metamfetaminy. Natomiast po podaniu mianseryny następuje obniżenie poziomu transkryptu *Map6* w NAc (sonda 1 w NAc, Rycina 18 górny panel). W PFCx stwierdzono spadek ekspresji tego transkryptu *Map6* po podaniu ketaminy. Nie stwierdzono, aby badane leki regulowały ekspresję innej izoformy *Map6* w żadnej z badanych struktur (sonda 2).

Dla kinazy *Clk1* badano regulację ekspresji izoformy o alternatywnym ostatnim eksonie. Zaobserwowano najsilniejszy spadek ekspresji tego niekodującego transkryptu *Clk1* (ENSMUST00000129577) po podaniu mianseryny, zarówno w NAc jak i PFCx. Ekspresja tego samego transkryptu była podwyższona po podaniu metamfetaminy w obu badanych strukturach (sonda 1, Rycina 18 środkowy panel).

W przypadku czynnika transkrypcyjnego *Bhlhe40* było możliwe zaprojektowanie sondy specyficznej do najdłuższej znanej izoformy genu (ENSMUST00000032194). Zmierzone wzrost ekspresji transkryptu *Bhlhe40* o alternatywnym końcu transkrypcji w NAc po podaniu metamfetaminy i haloperydolu, zaś w PFC zaobserwowano wzrost ekspresji tej izoformy po działaniu rysperydonu (sonda 1, Rycina 18 dolny panel).

Rycina 18. Regulacja ekspresji wybranych izoform transkrypcyjnych po podaniu leków. Potwierdzenie zmian w poziomie transkryptów uzyskane techniką qPCR. Wyniki przedstawione są jako krotność różnicy w stosunku do grupy kontrolnej (podanie soli fizjologicznej) wraz z poziomem błędu standardowego ($n = 8$). Analizę statystyczną wykonano przy użyciu testu jednoczynnikowej ANOVA, a wyniki przedstawiono wykresach *** $p < 0,0001$, ** $p < 0,001$, * $p < 0,01$. Środkowa część przedstawia schematyczną reprezentację wybranych transkryptów przygotowaną na podstawie bazy Ensembl. Na czerwono oznaczono warianty regulowane w efekcie podania leków: genów *Map6*, *Clk1* i *Bhlhe40*. Przy pomocy pionowych kresek oznaczono eksony, poziomych introny. Strzałki wskazują kierunek transkrypcji. Kolory poszczególnych słupków określają leki: SAL-szary, KET-żółty, MET-pomarańczowy, HAL-czerwony, RISP-niebieski, WEN-fioletowy, MIA-zielony, zgodnie z legendą.

Zaprezentowano trzy przykłady genów, w których regulacja po podaniu leków dotyczyła wybranej izoformy transkrypcyjnej. Są to nowe, nieopisane dotychczas obserwacje indukcji bądź spadku ekspresji danego transkryptu. Wymieniony na początku podrozdziału gen kinazy *Dclk1* został opisany szczegółowo w kolejnych rozdziałach rozprawy, z powodu szczególnie interesującego profilu regulacji ekspresji po podaniu leków psychotropowych.

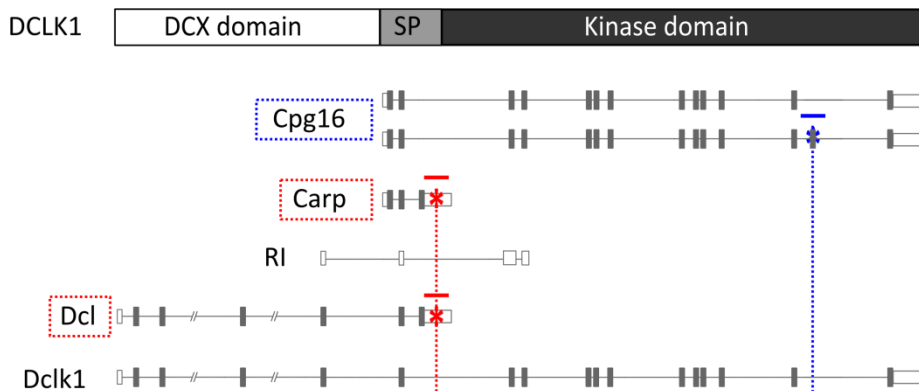
4. Zmiany ekspresji *Dclk1* po podaniu leków psychotropowych

Na podstawie uzyskanych wyników sekwencjonowania wytypowano do dalszych badań gen *Dclk1*. Najpierw sprawdzono regulację tego genu w oparciu o wcześniejsze dane z mikromacierzy. Dane te pochodzą z wcześniej opublikowanych przez nasz Zespół wyników profilowania ekspresji genów w prądkowiu myszy po jednokrotnym podaniu 18 substancji psychoaktywnych: mianseryny, imipraminy, fluoksetyny, bupropionu, tianeptyny, tranilcyprominy, metamfetaminy, kokainy, nikotyny, heroiny, morfiny, etanolu, diazepamu, buspironu, hydroksyzyny, klozapiny, rysperydonu i haloperydolu, po 1, 2, 4 i 8 godzinach od podania leku [5]. W celu wizualizacji wyników wykorzystano narzędzie internetowe genes2mind (<http://genes2mind.org>). Wyniki analizy dla genu *Dclk1* przedstawiono na Rycinie 19. Panel A pokazuje schematyczne przedstawienie sześciu głównych transkryptów mysiego genu *Dclk1* na podstawie genomu myszy edycja MGSCv37. Fragmenty genu odpowiadające sondom z mikromacierzy MouseWG-6 v2 BeadChip są oznaczone niebieskimi lub czerwonymi symbolami. Dwie wykorzystane sondy odpowiadają niepokrywającym się transkryptom i żadna z nich nie wykrywa długiego, kanonicznego transkryptu *Dclk1*. Panel B przedstawia zmiany poziomu ekspresji genów po podaniu leków w porównaniu do myszy traktowanych solą. Można zauważyć, że poziom ekspresji transkryptów wykrywanych przez różne sondy jest w inny sposób regulowany podaniem leków psychotropowych.

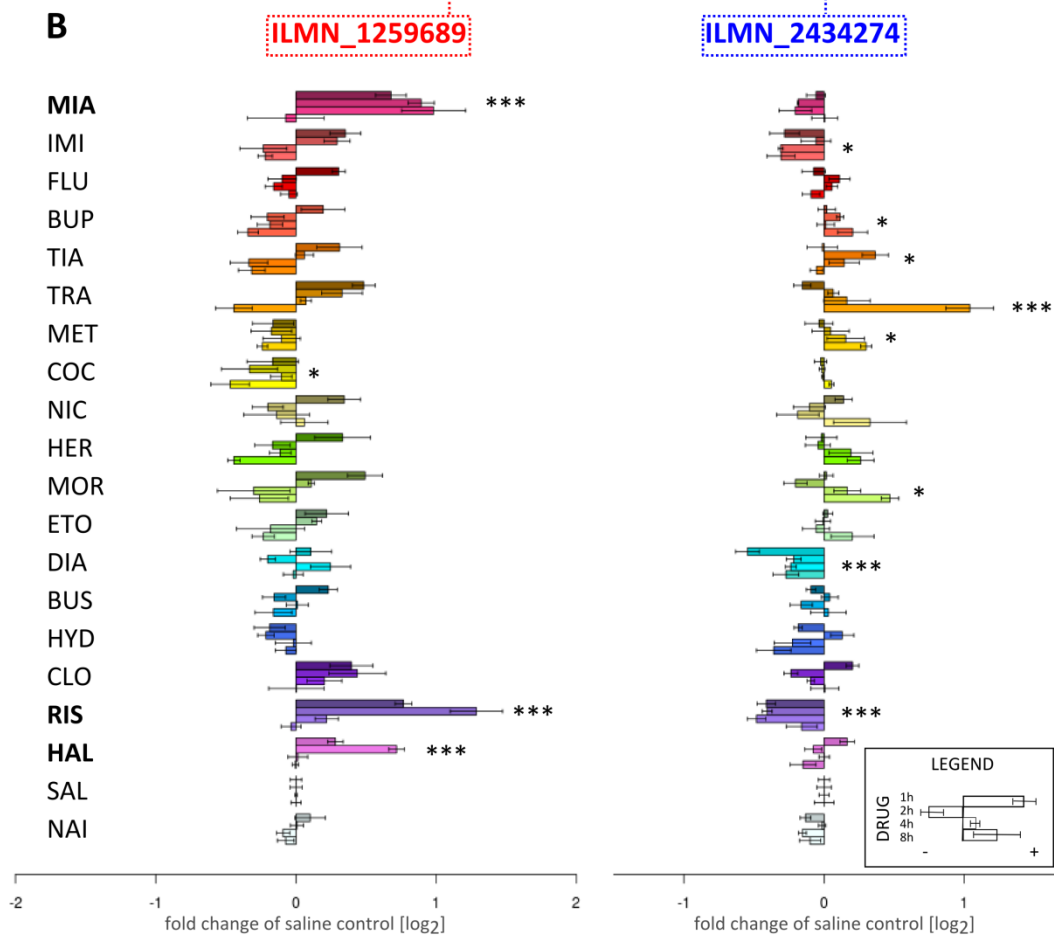
Poziom mRNA zmierzony pierwszą sondą mikromacierzową (ILMN_1259689, zaznaczona czerwoną gwiazdką na Rycinie 19, wartość P dla leku = $4,14 \times 10^{-16}$, wartość P dla czasu = $9,9 \times 10^{-15}$,

wartość P dla interakcja = $4,2 \times 10^{-5}$) wskazuje na zwiększoną ekspresję po podaniu mianseryny (1, 2 i 4 godziny po wstrzyknięciu), rysperydonu (1 i 2 godz.) oraz, w mniejszym stopniu, podanie haloperydolu (2 godz.) (Rycina 19B). Druga sonda (ILMN_2434274, niebieska gwiazda, wartość P dla leku = $4,68 \times 10^{-16}$, wartość P dla czasu = $1,2 \times 10^{-4}$, wartość P dla interakcji = $2,5 \times 10^{-7}$) wykazała wzrost poziomu abundancji mRNA 8 godzin od podania tranylcyprominy.

A



B

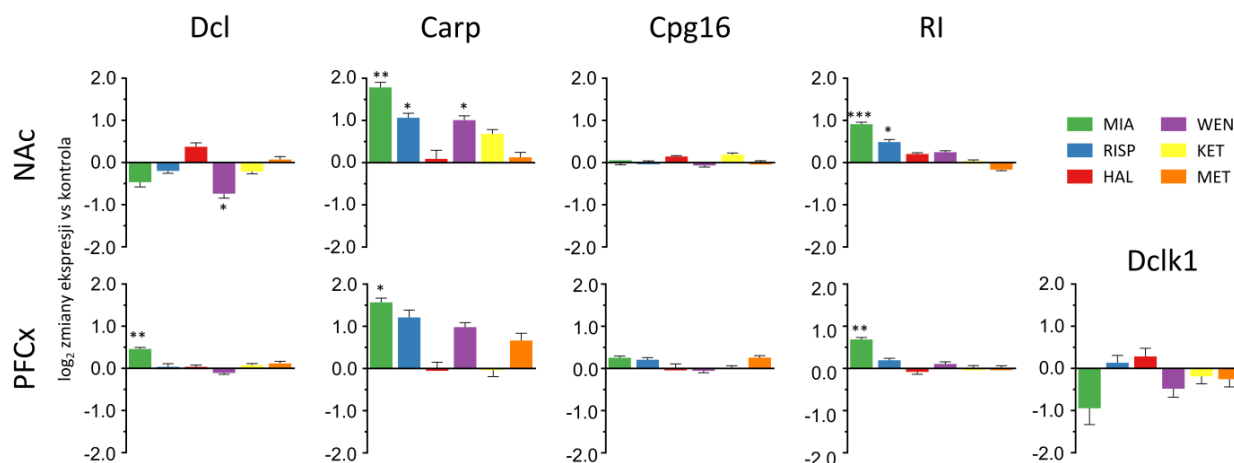


Rycina 19. Schematyczne przedstawienie budowy genu *Dclk1* oraz jego regulacji po podaniu leków psychotropowych. (A) Główne transkrypty genu *Dclk1*: dwa warianty Cpg16 (ENSMUST00000198437, ENSMUST0000070418), Carp (ENSMUST00000199585), izoforma z retencją intronu (RI, ENSMUST00000198757), Dcl (ENSMUST00000167204) i Dclk1 (ENSMUST0000054237). Umieszczenie sond mikromacierzowych zaznaczono gwiazdkami. Schemat został stworzony w oparciu o informacje zawarte w bazie Ensembl i dostępną literaturę [179, 180]. Nad schematem zaznaczono funkcjonalne domeny białkowe. SP – ang. *serine/proline-rich domain* – domena bogata w serynę i prolinę. (B) Wyniki analizy ekspresji genów z mikromacierzy przedstawione jako przebieg zmian w porównaniu do soli, w czasie (1, 2, 4 i 8 godzin, zgodnie z legendą w prawym dolnym rogu). Przedstawiono wyniki dla dwóch sond. Lewa strona ryciny przedstawia poziom ekspresji *Dclk1* mierzony sondą ILMN_1259689, prawa dla ILMN_2434274. Lista analizowanych leków obejmuje mianserynę (MIA), imipraminę (IMI), fluoksetynę (FLU), bupropion (BUP), tianeptynę (TIA), tranilcyprominę (TRA), metamfetaminę (MET), kokainę (COC), nikotynę (NIC), heroinę (HER), morfinę (MOR), etanol (ETO), diazepam (DIA), buspiron (BUS), hydroksyzynę (HYD), klozapinę (CLO), rysperydon (RIS), haloperydol (HAL), sól fizjologiczną (SAL) i kontrolą (NAI). * $P < 0,01$, ** $P < 0,001$, *** $P < 0,0001$, jednoczynnikowa ANOVA dla czynnika lek.

Analiza wyników profilowania z mikromacierzy wykazała specyficzną dla izoform regulację ekspresji *Dclk1* przez leki psychotropowe. Jednakże z uwagi na to, że sonda ILMN_1259689 wykrywa przynajmniej dwa transkrypty *Dclk1* – Carp i Dcl, niemożliwa była niejednoznaczna interpretacja uzyskanych wyników. By ominąć ten problem wykorzystano opisane wcześniej w rozprawie wyniki sekwencjonowania transkryptomu.

5. Regulacja ekspresji izoform *Dclk1*

W celu uzyskania pełnego obrazu regulacji wszystkich dostępnych w bazie izoform genu *Dclk1* przeprowadzono szczegółową analizę odczytów sekwencjonowania zmapowanych do obszaru genu *Dclk1*. Na podstawie wyników uzyskanych algorytmem Cufflinks i sekwencji GRCm38.p5 mysiego genomu zidentyfikowano 12 transkryptów genu (FPKM > 1), w tym 8 izoform występujących w dużej liczbie kopii (FPKM > 5). Trzy izoformy nie zostały wykryte w żadnej z badanych struktur (ENSMUST00000198821, ENSMUST00000197870, and ENSMUST00000196745). Większość odczytów sekwencji odpowiadała izoformom Carp (ENSMUST00000199585), Dcl (ENSMUST00000167204) i Cpg16 (ENSMUST00000198437). Dwa transkrypty należały do izoform z retencją intronu, które nie były wcześniej opisane w literaturze (RI - ENSMUST00000198757, ENSMUST00000198154). Względny poziom ekspresji wybranych izoform *Dclk1*, względem kontroli solnej, po podaniu leków psychotropowych został przedstawiony na Rycinie 20.



Rycina 20. Zmiany ilości transkryptów *Dcl1* w oparciu o RNA-seq. Wykresy słupkowe przedstawiają zmiany ekspresji (\log_2 - krotność zmiany) głównych izoform *Dcl1* w porównaniu do kontroli solnej. Górny panel przedstawia wyniki z NAc, dolny z PFCx. Ekspresja izoformy *Dcl1* była niewykrywalna w NAc. Słupki przedstawiają SEM, * $P < 0,01$, ** $P < 0,001$, *** $P < 0,0001$, jednoczynnikowa ANOVA, czynnik lek.

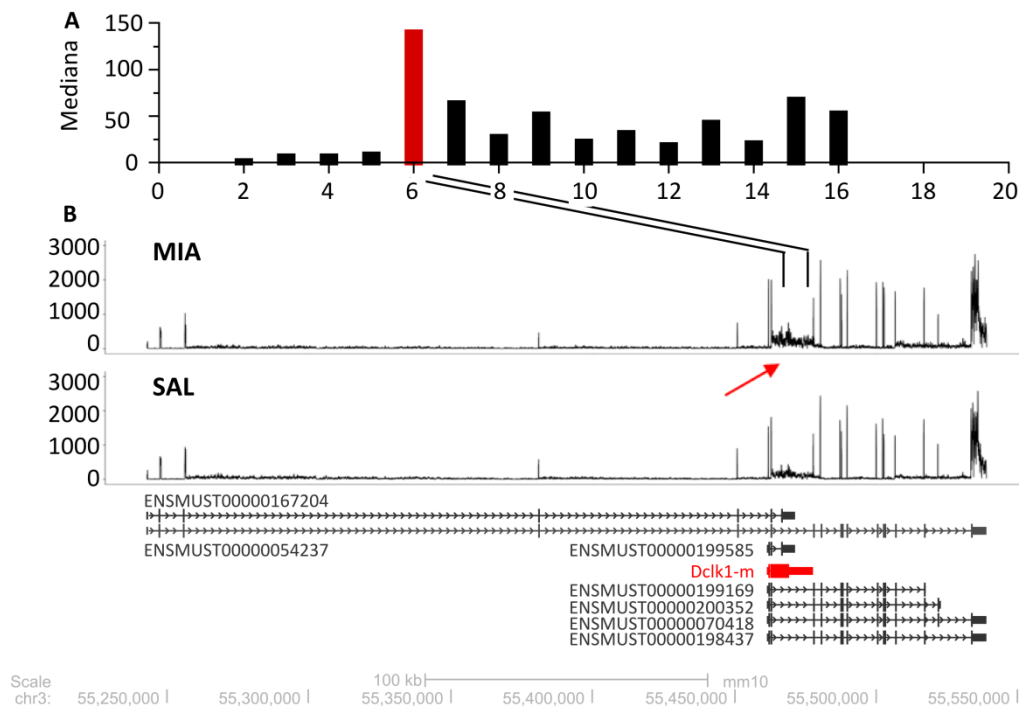
Ekspresja transkryptu *Carp* była podwyższona w NAc po podaniu mianseryny ($\log_2FC=1,78$, $P = 0,0002$), rysperydonu ($\log_2FC = 1,07$, $P = 0,007$) i wenlafaksyny ($\log_2FC = 1,01$, $P = 0,009$). W PFCx ekspresja *Carp* była regulowana tylko przez mianserynę ($\log_2FC = 1,57$, $P = 0,0027$). Ekspresja transkryptu *Cpg16* nie była zmieniona przez podanie leków w żadnej z analizowanych struktur mózgu. Wenlafaksyna obniżała ekspresję izoformy *Dcl* w NAc ($\log_2FC = -0,74$, $P = 0,078$). Z kolei, ekspresja *Dcl* była zwiększona w PFCx po podaniu mianseryny ($\log_2FC = 0,46$, $P = 0,0009$). Ekspresja pełnego transkryptu *Dcl1* (ENSMUST00000054237) była poniżej założonego progu wykrywalności w NAc, zaś w PFC nie zaobserwowano istotnych zmian wywołanych podaniem leków. Ekspresja izoformy z retencją intronu (RI) była znacząco podwyższona po podaniu mianseryny ($\log_2FC = 0,9$, $P = 2,8 \times 10^{-6}$) i rysperydonu ($\log_2FC = 0,49$, $P = 0,002$) w NAc oraz przez mianserynę w PFCx ($\log_2FC = 0,69$, $P = 0,0003$).

Podsumowując, szczegółowa analiza wyników sekwencjonowania izoform transkrypcyjnych genu *Dcl1* potwierdziła, że leki w sposób wybiórczy indukują ekspresję transkryptów zawierających fragmenty zlokalizowane w centralnej części genu.

6. Identyfikacja nowej izoformy genu *Dcl1*

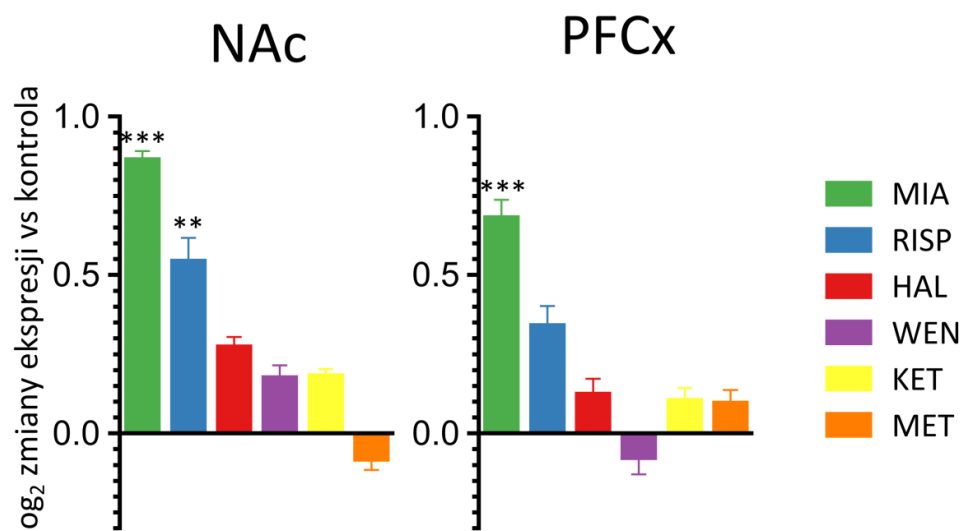
Znaczna część odczytów uzyskanych metodą RNA-seq nie została przez algorytmy przypisana do znanych, występujących w referencyjnych bazach transkryptów. Zidentyfikowane odczyty odpowiadają sekwencji fragmentów intronowych. Dlatego kolejnym krokiem była powtórne uliniowanie odczytów transkryptomu do fragmentu locus *Dcl1* jednakże tym razem bez wcześniejszego założenia sekwencji transkryptów. Wyniki tak przeprowadzonej analizy pojedynczych eksonów/intronów wskazała na obecność nowego transkryptu, który nazwałam *Dcl1*-m,

charakteryzującego się alternatywnym miejscem startu transkrypcji, alternatywnym ostatnim eksonem oraz zachowaniem sekwencji odpowiadającej szóstemu intronowi pełnej wersji transkryptu *Dclk1* (ENSMUST0000054237). Analiza pokrycia intronów wykazała statystycznie wyższy wynik ($P = 0,002$) dla tego intronu w porównaniu do innych. Na tej podstawie stwierdzam, że sygnał *Dclk1*-m nie pochodzi od niewyplicowanego pre-mRNA. Opisane wyniki przedstawiono na Rycinie 21.



Rycina 21. Identyfikacja nowej, regulowanej podaniem leku, izoformy genu *Dclk1*. (A) Słupki przedstawiają medianę pokrycia odczytów sekwencjonowania ze wszystkich pozycji dla każdego intronu w transkrypcie *Dclk1*. Numery intronów przedstawiono na osi x. Na czerwono zaznaczono intron 6. (B) Przykładowe odczyty RNA-seq pokazujące profil transkrypcyjny locus *Dclk1* po mianserynie i w próbce kontrolnej. Transkrypty opisane są na podstawie bazy danych Ensembl, a na czerwono dodano nową izoformę - *Dclk1*-m. Strzałka wskazuje na indukowaną przez lek regulację ekspresji intronu 6.

Kolejnym krokiem było przeprowadzenie ponownej analizy statystycznej danych z sekwencjonowania z uwzględnieniem transkryptu *Dclk1*-m. Stwierdzono, że ekspresja *Dclk1*-m była indukowana w PFCx po podaniu mianseryny ($\log_2FC = 0.679$, $P = 0.000253$) oraz w NAc po mianserynie i rysperydonie ($\log_2FC = 0.862$, $P = 3.8 \times 10^{-8}$; $\log_2FC = 0.542$, $P = 0.00079$, Rycina 22 oraz Dodatkowa Tabela S4). Pozostałe leki nie wpływały w istotny sposób na ekspresję *Dclk1*-m. Warto podkreślić, że opisana wcześniej sonda mikromacierzowa ILMN_1259689 również wykrywa *Dclk1*-m.

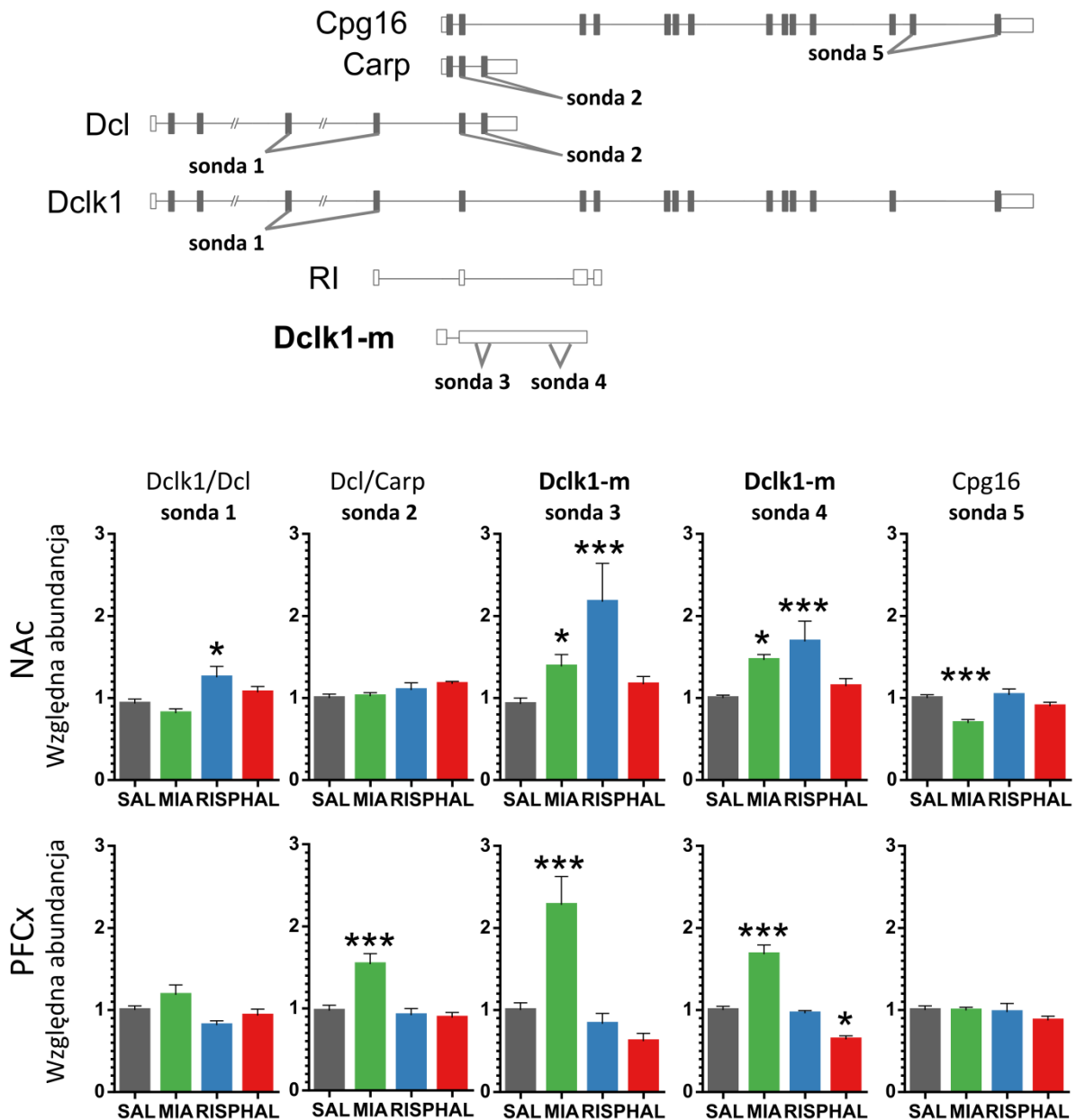


Rycina 22. Wywołane lekiem zmiany w ekspresji nowej izoformy *Dclk1* (*Dclk1-m*). Zmiany poziomu *Dclk1-m* mierzone metodą RNA-seq. Wyniki przedstawiono jako zmiany (\log_2 -fold) w porównaniu z wynikami kontroli solnej. Słupki wskazują S.E.M., ** P < 0,001, *** P < 0,0001, jednoczynnikowa ANOVA dla czynnika leku.

Podsumowując, analiza wyników sekwencjonowania potwierdziła swoistą dla leku indukcję transkrypcji z locus *Dclk1* i wykazała, że pewne leki psychotropowe wpływają na transkrypcję nowej izoformy *Dclk1-m* - krótkiego regionu w pobliżu sekwencji kodującej domenę bogatą w serynę i prolinę. Warto podkreślić, że odczyty RNA-seq pierwotnie przypisane jako pochodzące od izoform Carp i RI mogą w rzeczywistości odpowiadać *Dclk1-m*.

7. Potwierdzenie zmian ekspresji izoform *Dclk1* metodą qPCR

W celu weryfikacji wyników sekwencjonowania wykorzystano specyficzne sondy dla reakcji qPCR. Eksperyment miał na celu wskazanie transkryptu genu *Dclk1*, który ulega indukcji po podaniu leku. Analiza została przeprowadzona na serii nowych, niezależnych powtórzeń tkanek (NAc i PFCx), uzyskanych po 2 godzinach od podania mianseryny (20 mg/kg), rysperydonu (0,5 mg/kg), haloperydolu (1 mg/kg) lub soli (n=8). Wykorzystano pięć fluorescencyjnych sond (Rycina 23, górny panel), dwie z nich zostały specjalnie zaprojektowane by wykrywały izoformę *Dclk1-m* zawierającą retencję intronu 6 (sonda 3 i sonda 4 wykrywają kolejno fragment 5' intronu 6 oraz fragment 3' intronu 6). Sondy 1, 2 i 5 były zaprojektowane już wcześniej i dostępne komercyjnie. Sonda 1 pozwala na detekcję połączenia eksonów 4 i 5 pełnej formy *Dclk1* oraz formy *Dcl*. Sonda 2 umożliwia pomiar ilości izoformy *Dcl* oraz *Carp*, gdyż jest skierowana do połączenia eksonów 2 i 3 izoformy *Carp*. Sonda 5 pozwala na wykrycie jednej z izoform kinazowych *Cpg16*.

Locus *Dclk1*

Rycina 23. Walidacja zmian w ekspresji izoform *Dclk1* po podaniu wybranych leków psychotropowych. W reakcji qPCR wykorzystano 5 sond TaqMan pozwalających rozróżnić wybrane transkrypty *Dclk1*: "sonda 1" wykrywa połączenie eksonów 4 i 5 transkryptu *Dclk1* (ENSMUST0000054237), "sonda 2" wykrywa w połączenie eksonów 6 i 7 w *Dcl* (ENSMUST00000167204), "sonda 3" wykrywa fragment 5' intronu 6 transkryptu *Dclk1* (ENSMUST0000054237), a "sonda 4" wykrywa fragment 3' intronu 6 w *Dclk1* (ENSMUST0000054237), "sonda 5" wykrywa połączenie eksonów 13 i 14 transkryptu *Cpg16* (ENSMUST00000198437). Umieszczenie sond TaqMan na tle głównych izoform genu *Dclk1* przedstawiono na górnym panelu Ryciny (sondy 1-5). Dolny panel przedstawia zmiany w poziomie mRNA po 2 godzinach od podania leków: mianseryny, rysperydonu i haloperydolu oraz kontroli solnej dla NAc i PFCx. Analizę wykonano przy użyciu próbek z niezależnego

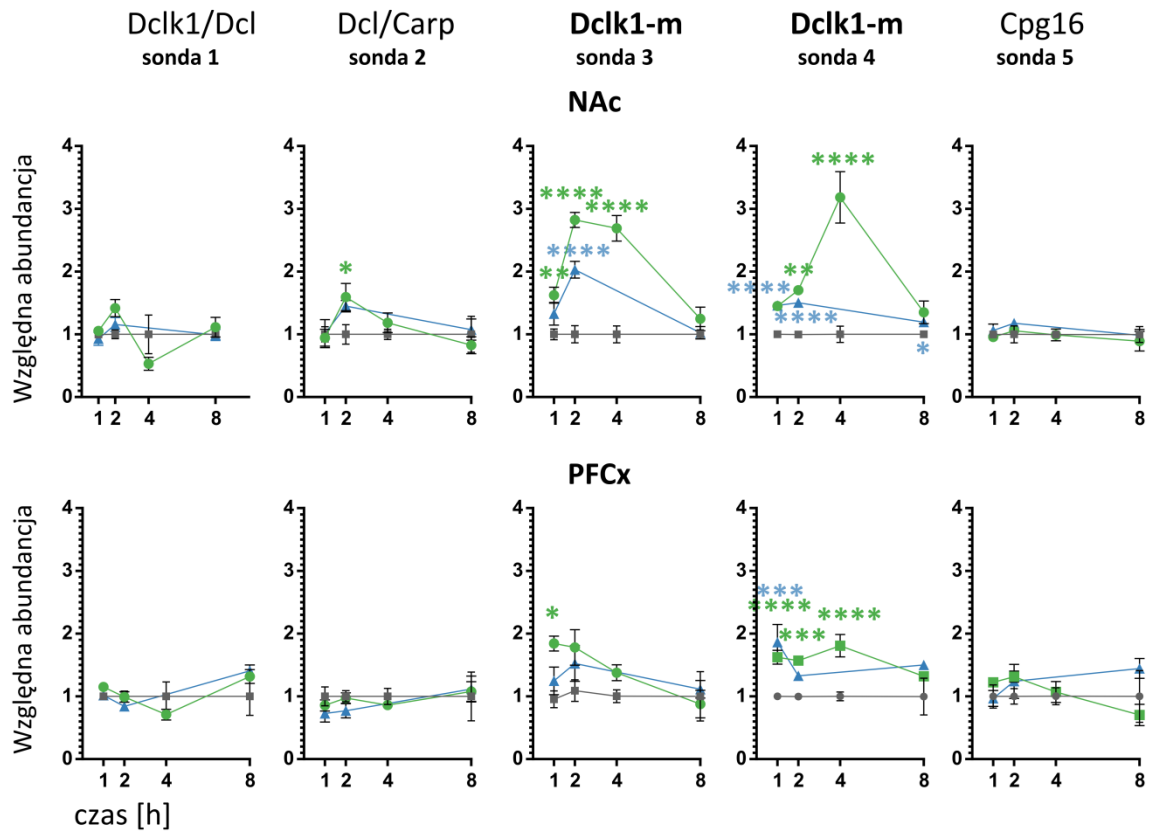
eksperymentu biologicznego (n = 8). Słupki błędu wskazują SEM, *** P < 0,001, jednoczynnikowa ANOVA, czynnik lek.

Podanie mianseryny powodowało w NAc około 1,5-krotny wzrost ekspresji transkryptu *Dclk1-m* wykrywanego przez dwie sondy celujące w intron 6. Poziom *Cpg16* był obniżony po podaniu mianseryny, podczas gdy poziomy *Dcl / Carp* nie różniły się od poziomów dla grupy kontrolnej traktowanej solą fizjologiczną. Rysperydon indukował ekspresję transkryptu *Dclk1-m* o około 1,6 do 2,1-krotnie oraz izoformy *Dclk1 / Dcl* (około 1,2-krotnie). Nie wpływał natomiast na poziom ekspresji izoform *Dcl / Carp* oraz *Cpg16*. Podanie haloperydolu nie miało wpływu na ekspresję izoform *Dclk1* w NAc. W PFCx podanie mianseryny również regulowało ekspresję *Dclk1-m* (ponad 2-krotnie). W tej tkance również zaobserwowano 1,5-krotny wzrost izoform *Dcl / Carp*. Rysperydon nie regulował ekspresji izoform *Dclk1* w PFCx. Podanie haloperydolu nieznacznie obniżało ekspresję wariantu zawierającego część 3' intronu 6 w PFCx (Rycina 23, dolna część).

8. Zmiany ekspresji izoform *Dclk1* w czasie po podaniu mianseryny i rysperydonu

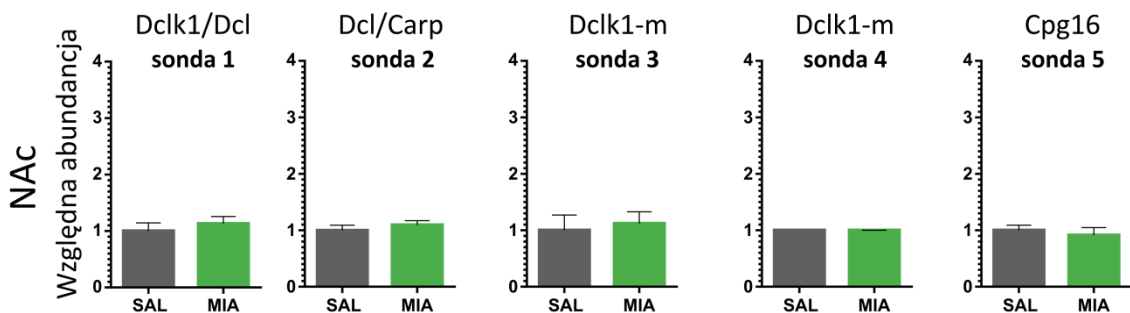
Następnie przeprowadzono eksperyment, którego celem było zbadanie jak długo po podaniu leków utrzymują się zmiany w poziomie ekspresji transkryptów *Dclk1*. Doświadczenie przeprowadzono na odrębnej grupie zwierząt (n = 8), którym podano mianserynę, rysperydon lub roztwór soli fizjologicznej. Zwierzęta uśmiercano w czterech punktach czasowych od podania leku: po upływie 1, 2, 4 i 8 godzin dla mianseryny oraz w trzech punktach czasowych po podaniu leku: 1, 2 i 8 godzin dla rysperydonu (Rycina 24).

Dla obu leków zmiany były większe w NAc niż w PFCx. Po podaniu mianseryny maksimum ekspresji *Dclk1-m* w NAc przypadało na 2-4 godzinę (około 3-krotny wzrost ekspresji), zaś po 8 godzinach zmiany zanikały. Ekspresja *Dclk1-m* w NAc po podaniu rysperydonu była niższa (ok. 2-krotna). W PFCx większe zmiany zaobserwowano dla sondy 4 po 1, 2 i 4 godzinach od podania mianseryny i po godzinie dla rysperydonu. W obu strukturach nie obserwowano zmian w wybranych punktach czasowych w ekspresji izoformy *Dclk1/Dcl* lub *Cpg16*.



Rycina 24. Zmiany ekspresji izoform *Dclk1* w czasie. W reakcji qPCR wykorzystano 5 wcześniej opisanych sond TaqMan. Badano efekt mianseryny po 1, 2, 4 i 8 godzinach oraz rysperydonu po 1,2 i 8 godzinach. Wyniki przedstawiono jako przebieg zmian ekspresji w czasie, wraz z błędem standardowym. Kolor zielony to mianseryna, niebieski to rysperydon a szary to kontrola solna. Analizę statystyczną wykonano przy użyciu dwuczynnikowej ANOVA i oznaczono na wykresach, **** $P < 0,0001$.

Ponadto wykonano dodatkowy eksperyment, w którym mianseryna podawana była myszom przez 5 kolejnych dni. Zwierzęta uśmiercano 2 godziny po ostatnim podaniu leku i izolowano NAc. W tym modelu nie stwierdzono znamienych zmian w ekspresji izoform genu *Dclk1* (Rycina 25).



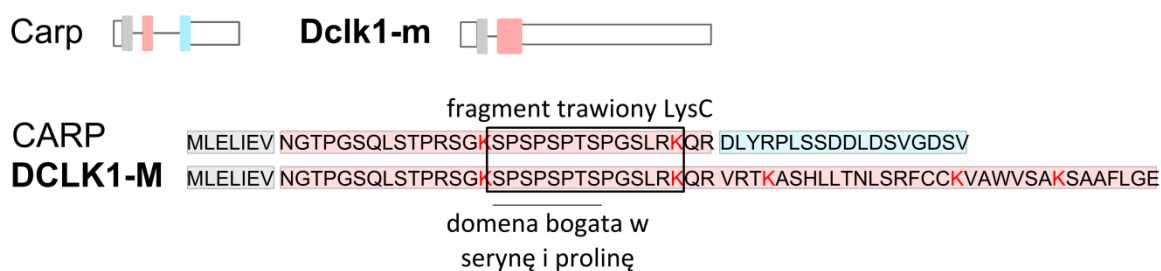
Rycina 25. Ekspresja izoform genu *Dclk1* po 5 dniach podawania mianseryny. W reakcji qPCR wykorzystano 5 wcześniej opisanych sond TaqMan. Badano efekt mianseryny (MIA, 20 mg/kg) w NAc po 5 dniach codziennych podań leku, 2 godziny od ostatniej dawki leku. Analizę wykonano przy użyciu próbek z niezależnego

eksperymentu biologicznego (n = 8). Analiza statystyczna wykonana przy użyciu jednoczynnikowej ANOVA nie wykazała istotnych statystycznie różnic pomiędzy kontrolą solną (SAL).

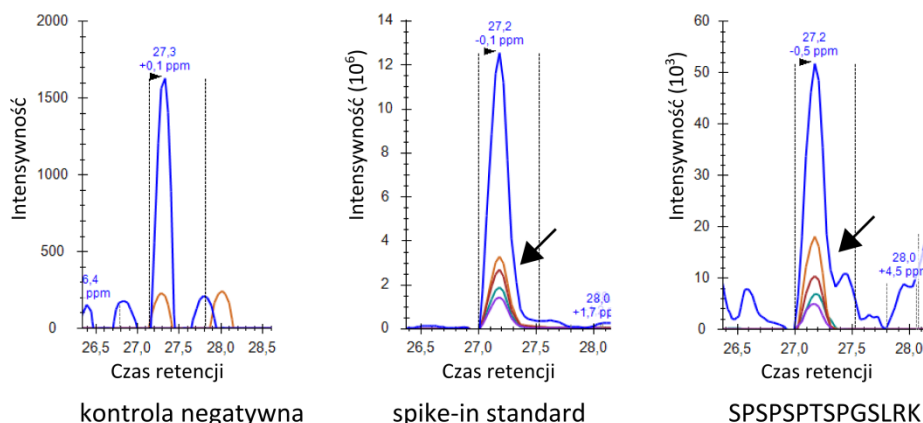
9. Potencjalne funkcje nowo wykrytego wariantu *Dclk1*

Ostatni eksperyment miał na celu sprawdzenie czy jest możliwe wykrycie produktu białkowego transkryptu *Dclk1-m*. Mysiom podawano mianserynę (20 mg/kg) przez 5 kolejnych dni, a 2 godziny po ostatnim podaniu zwierzęta uśmiercano i izolowano białko z prądkowia. Z uwagi na to, że zależało nam na wykryciu krótszych izoform genu *Dclk1*, przeprowadzono rozdział białek metodą elektroforetyczną i oddzielono w żelu te białka, których masa cząsteczkowa była poniżej 10 kDa. Ta frakcja została wykorzystana w analizie spektrometrii mas. Wykorzystanie tej techniki było możliwe dzięki współpracy z Laboratorium proteomiki i spektrometrii-mas Małopolskiego Centrum Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

A



B



Rycina 26. Identyfikacja peptydu pochodzącego od CARP / DCLK1-M przy użyciu spektrometrii mas. (A) Schematyczne przedstawienie transkryptów Carp i Dclk1-m oraz ich przypuszczalnych produktów peptydowych. Kolorowe fragmenty oznaczają eksony. Peptydy trawiono endoproteinazą LysC, która rozszczepia wiązania peptydowe po stronie grupy karboksylowej reszt lizyny (zaznaczone na czerwono). Fragment odpowiadający peptydowi SPSPSPTSPGSLRK jest zaznaczony ramką. (B) Sposób wykrywania peptydu SPSPSPTSPGSLRK. Panele pokazują (od lewej): sygnał potencjalnego zanieczyszczenia peptydem lekkim sprawdzonym w ciężkiej próbce peptydowej, sygnał dla ciężkiego znakowanego peptydu dodanego do próbki eksperymentalnej, sygnał dla endogennego (lekkiego) peptydu w próbce pochodzącej z prądkowia mysiego. Zaznaczone kolorami piki odpowiadają jonom fragmentów peptydowych.

Sekwencje transkryptów Dclk1-m i Carp są identyczne w obrębie końca 5' i przypuszczalnie sekwencji kodujących białko. Różnica w sekwencji białkowej dotyczy C-końcowej części kodowanych peptydów. Obie sekwencje obejmują fragment bogaty w prolinę i serynę (SP), który jest odpowiedzialny za oddziaływanie z innymi białkami. Analiza spektrometrii masowej oczyszczonej SDS-PAGE frakcji białkowej o masie cząsteczkowej mniejszej niż 10 kDa potwierdziła obecność fragmentu bogatego w reszty seryny i proliny (Rycina 26). Dodatkowa analiza LC-MS / MS-shotgun, przeprowadzona oprócz PRM, nie potwierdziła obecności innych fragmentów pochodzących z CARP lub DCLK1-M. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że dochodzi do translacji jednego lub obu białek DCLK1-M i CARP.

V. Dyskusja

1. Zmiany w profilu ekspresji genów wywołane podaniem poszczególnych leków psychotropowych

Głównym celem badań indukowanej podaniem leków zmiany profilu ekspresji genów jest uzyskanie zdolności do przewidywania możliwych efektów klinicznych. W moich badaniach wykorzystuję model oparty o podania leków myszom szczepu C57BL/6J. Od razu nasuwa się pytanie na ile efekty leków stwierdzone w organizmie myszy mogą być użyteczne w przewidywaniu działania leków psychotropowych u ludzi. Należy w pierwszej kolejności zwrócić uwagę, że myszy szczepu C57BL/6J to model szeroko wykorzystywany w badaniach wpływu leków psychotropowych na ekspresję genów, ze względu na dobrze zdefiniowany profil reakcji behawioralnych. Ponadto, wykorzystanie modeli zwierzęcych oferuje znacznie lepsze odwzorowanie fizjologii niż badania *in vitro*, poprzez możliwość kontroli procesu podawania leków oraz przygotowania tkanek do badań molekularnych.

W wyniku przeprowadzenia przedstawionych w rozprawie doświadczeń uzyskane zostały względnie podobne listy transkryptów ulegających zmianom ekspresji po podaniu wybranych leków w dwóch analizowanych regionach mózgu. Zaobserwowane różnice pomiędzy NAc i PFC są przede wszystkim ilościowe. Wcześniejsze badania wywołanej działaniem leków regulacji ekspresji genów w mózgu wskazują na duże zróżnicowanie profilu zmian w zależności od badanego regionu. W kilku opublikowanych eksperymentach profilowania zmian transkrypcji wskazywano na obszar pochodzenia tkanki mózgowej jako istotne źródło wariacji [181]. W przypadku przeprowadzonych przeze mnie badań, źródło podobieństw w profilu zmian pomiędzy tkankami upatruje w dopaminergicznym unerwieniu obu regionów projektującym z z pola brzusznej nakrywki. W dalszych rozważaniach koncentruję się przede wszystkim na oólnych efektach wybranych leków, międzytkankowe różnicę w ich działaniu są opisywane dodatkowo.

W opisanych eksperymentach wykorzystałam sześć leków psychotropowych o farmakologicznie zróżnicowanych mechanizmach działania. Stwierdziłam że każdy z tych leków wywołuje charakterystyczne wzory ekspresji genów w mózgu, które następnie zostały zgrupowane na podstawie podobieństw w profilu zmian. Na podstawie przeprowadzonych analiz zdefiniowane zostały cztery grupy współregulowanych genów (oznaczone przy pomocy numerów 1-4).

Podania haloperydolu i metamfetaminy wywołały silny wzrost ekspresji genów z grupa nr 2. Jest to najliczniejsza z wyodrębnionych grup transkryptów, w skład której wchodzi geny (np. *Fos*, *Fosb*, *Arc*, *Homer*) opisywane jako ulegające regulacji w w neuronach pobudzonych przy pomocy

elektrody [182], w odpowiedzi na podanie silnego agonisty receptorów glutaminianu [183] oraz w wyniku działania psychostymulantów, np. kokainy [184]. Pomimo przeciwnego profilu behawioralnych efektów metamfetaminy i haloperydolu, a także obserwacji odmiennego działania w warunkach klinicznych (metamfetamina wywołuje silne efekty psychozomimetyczne, natomiast haloperydol to typowy lek przeciwpsychotyczny), obie te substancje wykazały pewne podobieństwa na poziomie molekularnym. Należy zwrócić uwagę, iż w moich wynikach transkrypcyjne efekty metamfetaminy i haloperydolu zostały zbadane na poziomie homogenatu uzyskanego z badanej tkanki mózgowej. Na podstawie danych literaturowych przypuszczam, że aktywacja tych samych genów może dotyczyć innych populacji komórek nerwowych prążkowie. Wykazano, że haloperydol silnie aktywuje neurony szlaku pośredniego poprzez oddziaływanie na receptory dopaminy D2 w jądrze półleżącym przegrody. Natomiast metamfetamina, jak również i inne psychostymulanty wpływa aktywująco na szlak bezpośredni [55]. Tym samym uzyskane przeze mnie wyniki potwierdzają, że zarówno haloperydol jak i metamfetamina wywołują wzrost ekspresji transkryptów zależnych od aktywacji neuronalnej. Wzrost poziomu abudancji mRNA kodujących IEGs w NAc nie jest wskaźnikiem umożliwiającym poprawną klasyfikacji leków psychotropowych. Rozróżnienie pomiędzy efektami metamfetaminy i haloperydolu w NAc jest natomiast widoczne w poziomie ekspresji transkryptów należących do grupy nr 1. Transkrypty z tej grupy, np. *Sgk1* ulegają regulacji w NAc w efekcie podania haloperydolu, natomiast zmian ta nie występuje po podaniu metamfetaminy. Różniaca w profilu zmian została potwierdzona przeze mnie z wykorzystaniem techniki qPCR. W literaturze naukowej można odnaleźć tylko kilka porównań efektów działania neuroleptyków i psychostymulantów w obszarze kory przedczołowej. Autorzy pracy stwierdzili, że metamfetamina, podobnie jak w NAc, również w PFCx powoduje wzrost poziomu mRNA IEGs łączonych z procesem synaptogenezy jak np. *Arc* [185]. Silniejsze działanie haloperydolu w obszarze prążkowie potwierdza większa ilość zidentyfikowanych zmian transkrypcyjnych w NAc w stosunku do PFCx. Jednakże haloperydol równocześnie wykazuje działanie na szlak mezokortyczny, co jest związane z wywoływaniem niepożądanych efektów przyjmowania przez chorych haloperydolu w postaci nasilenia negatywnych objawów w schizofrenii. Wyniki badań elektrofizjologicznych wskazują, że efekty haloperydolu na aktywność neuronów w PFCx są wzbudzone pośrednio [186]. Ponadto badania z wykorzystaniem metody mikrodializy wskazują na wzrost poziomu dopaminy w obszarze PFCx po jednorazowym podaniu haloperydolu [187]. Moje wyniki potwierdzają obserwacje innych autorów, dotyczące wpływu jednorazowego podania haloperydolu na wzrost poziomu mRNA genów, m.in. genu *Arc* w PFCx [188]. Regulacja ekspresji transkryptów zaklasyfikowanych w mojej analizie do grup nr 1 i 2 w obu badanych tkankach charakteryzuje złożoność molekularnych efektów haloperydolu i metamfetaminy. Sposobem na jednoznaczne określenie efektów obu leków byłyby

badania na poziomie transkryptomów pojedynczych komórek neuronalnych, z precyzyjnym zdefiniowaniem ich lokalizacji i uwzględnieniem zmian efektów działania leku w czasie.

Przy analizie zaobserwowanych efektów rysperydonu na ekspresję genów należy zauważyć, że jest on atypowym neuroleptykiem i wykazuje, oprócz działania antagonistycznego do receptorów dopaminowych D2 oraz adrenergicznych α_1 , również silne powinowactwo do receptorów serotoninowych (przede wszystkim 5-HT₂). Bardziej zróżnicowany profil farmakologiczny, w porównaniu do haloperydolu, częściowo tłumaczy słabszą indukcję w prążkowie genów z grupy nr 2. W literaturze opisano niższy poziom aktywacji genów IEG np. *Homer1* w wyniku działania rysperydonu w stosunku do haloperydolu [189]. Zostało to również potwierdzone w moich wynikach uzyskanych metodą qPCR, w których rysperydon powodował słabszy wzrost ekspresji genów *Dusp1*, *Arc*, *Fos* i *Egr2* w porównaniu do haloperydolu. Różnice pomiędzy działaniem haloperydolu i rysperydonu wynikają z różnic ilościowych związanych z ilością zajętych receptorów dopaminowych D2. Przyjmuje się, że haloperydol wysyca ok. 80% receptorów D2, podczas gdy rysperydon mniej niż 60% i jest to wystarczające do uzyskania efektów klinicznych. Tym samym mogę przypuszczać, że różnice we wpływie rysperydonu i haloperydolu na ekspresję transkryptów z grupy nr 2 mogą być związane z oddziaływaniem dopaminy poprzez nieobsadzone receptory. Co ciekawe, rysperydon wywołuje silniejszy niż haloperydol efekt na poziom ekspresji genów z grupy nr 1 np. *Sgk1* lub *Nfkbia*. Przeprowadzona analiza wskazała także na podobieństwa w molekularnych efektach działania rysperydonu i mianseryny na regulację ekspresji transkryptów z grupy nr 1. Fakt ten może wynikać z występowania wspólnej dla obu leków serotoninowej komponenty działania. Z drugiej strony, przynajmniej część efektów wspólnych wywieranych na transkrypty z grupy nr 1 przez rysperydon, mianserynę i słabiej przez haloperydol może być powiązana z działaniem antagonistycznym wobec receptora adrenergicznego α_1 . Mianseryna jest atypowym lekiem przeciwdepresyjnym, który jest u ludzi także stosowany w terapii schizofrenii w połączeniu z typowymi neuroleptykami w celu częściowego zmniejszenia ich efektów niepożądanych [190]. Podobieństwo molekularne rysperydonu i mianseryny wiąże się z ich działaniem antagonistycznym zarówno do receptorów 5-HT₂ jak i α_1 . Ponadto wykazano, że mianseryna wpływa na wzrost poziomu dopaminy w obszarze kory przedczołowej mózgu szczura [191]. Ekspresja genów z grupy nr 1 jest regulowana w podobny sposób przez rysperydon i mianserynę w obu badanych regionach mózgu. Podobieństwo pomiędzy tymi lekami jest również widoczne w regulacji dużej części genów z grupy nr 2, w szczególności w PFCx. Natomiast w przypadku aktywacji genów z grupy nr 3 zaobserwowany został silniejszy efekt mianseryny w stosunku do rysperydonu. Mianseryna wywołała także silniejszy efekt obniżenia poziomu abundancji transkryptów z grupy nr 4. Efekt mianseryny może być związany z nakierowaniem działania serotoniny na postsynaptyczne receptory 5HT_{1A}. Wydaje się, że kluczowy

dla efektu klinicznego leku jest właściwy balans pomiędzy blokadą pre- i postsynaptycznych receptorów 5HT1A. Postsynaptyczne receptory 5HT1A są jednym z celów terapii zaburzeń nastroju oraz nowych terapii przeciwpsychotycznych [192, 193]. Regulacja transkryptów z grupy 3 i 4 może, więc odzwierciedlać sygnalizację poprzez postsynaptyczne receptory 5HT1A na poziomie transkrypcyjnym. Należy ponadto zwrócić uwagę, że mianseryna regulowała ekspresję większości zidentyfikowanych w eksperymencie sekwencjonowania transkryptomu genów. Stąd też w dalszych opisywanych w rozprawie eksperymentach duży nacisk został położony właśnie na efekty podania mianseryny.

W przedstawionych doświadczeniach zbadano również molekularne działanie ketaminy. Substancja ta stosowana jest w klinice jako lek znieczulający oraz przeciwbólowy. Ketaminę można też z uwagi na jej działanie zaklasyfikować jako psychodysleptyk o potencjale uzależniającym. W ostatnim czasie ketamina wzbudziła duże zainteresowanie jako substancja wykazująca szybkie działanie przeciwdepresyjne [194]. Profil farmakologiczny ketaminy obejmuje niekompetytywny antagonizm do receptorów glutaminianu NMDA oraz powinowactwo do szeregu receptorów i transporterów, m.in. receptorów dopaminy D2, opioidowych μ , δ i κ , jak również transporterów monoamin [195-197]. W literaturze przedstawiona została hipoteza, że przeciwdepresyjne działanie ketaminy wynika z jej pozytywnego wpływu na powstawanie zmian plastycznych w obszarach mózgu zaangażowanych w kontrolę motywacji, takich jak hipokamp, kora przedczołowa i prążkowie. Wykazano, że ketamina wzmacnia aktywność szlaku mTOR oraz zwiększa ekspresję BDNF powodując modyfikację liczby i funkcji połączeń synaptycznych [170, 198]. Proces powstawania opisanych zmian strukturalnych najprawdopodobniej wymaga aktywacji odpowiednich genów oraz syntezy nowych białek. W publikacji Ficek i wsp. 2016 [143] wskazaliśmy na podobieństwa w profilu zmian transkrypcji wywołanych przez ketaminę oraz wybranych leków przeciwdepresyjnych takich jak fluoksetyna i tianeptyna jak również substancji uzależniających takich jak morfina lub heroina. Analiza hierarchiczna wykazała mniejsze podobieństwo do haloperydolu i metamfetaminy. W przedstawionych w mojej pracy wynikach profil zmian ekspresji genów wywołanych działaniem ketaminy odbiega od pozostałych leków. Podanie tego leku miało umiarkowany wpływ na wzrost ekspresji kilku genów z grupy 1 i 2 głównie w jądrze półkuli i nie miało wpływu na ekspresję genów z grupy 3 i 4. Można to częściowo tłumaczyć oddziaływaniem ketaminy na modulację aktywności serotoninowej i dopaminowej w mózgu. Wyniki zaprezentowane w powyższej rozprawie potwierdziły postulowany przez nas wcześniej wpływ ketaminy na alternatywną transkrypcję niektórych genów, m.in. *Fkbp5*, *Tsc22d3* i *Sgk1* w NAc. Należy podkreślić, że w analizie transkryptomu PFCx żadna ze zmian w ekspresji genów nie przekroczyła zadanego progu znamienności statystycznej. Dostępna literatura wskazuje na wpływ ketaminy na ekspresję genów w

obszarach korowych rozwijającego się mózgu, jednakże efekt ten ujawnia się dopiero po wielokrotnych podaniach leku [199, 200].

Wenlafaksyna to lek przeciwdepresyjny o dużym znaczeniu klinicznym [201], jednakże jej działanie na poziomie zmian ekspresji genów w mózgu jest słabo poznane. Profil farmakologiczny wenlafaksyny związany jest z hamowaniem wychwytu zwrotnego serotoniny i noradrenaliny, aczkolwiek dane literaturowe wskazują również na pośrednie zaangażowanie receptorów opioidowych oraz adrenergicznych $\alpha 2$ [202, 203]. Zastosowanie czułej metody pomiaru mRNA (RNAseq) pozwoliło na identyfikację wywołanych przez wenlafaksynę zmian ekspresji genów, które zostały zaklasyfikowane przede wszystkim do 3 grupy genów regulowanych przez leki psychotropowe. Dotychczas przeprowadzono badania wpływu przewlekłego stosowania wenlafaksyny na ekspresję genów w limfocytach pacjentów z depresją [204]. Wykazano, że wielokrotne podania wenlafaksyny wywołują wzrost ekspresji genu *Arc* w korze i hipokampie [205] oraz spadek ekspresji mRNA receptorów gliko- i mineralokortykosteroidowego w różnych obszarach hipokampu mózgu szczura [206]. Przedstawione w rozprawie wyniki to pierwszy w literaturze opis zmian ekspresji genów w mózgu wywołanych jednorazowym podaniem wenlafaksyny. Wyraźna różnica w efektach wenlafaksyny na ekspresję genów w porównaniu do psychostymulantów i neuroleptyków jest zbieżna z behawioralnymi efektami podań leków. O ile podanie metamfetaminy powoduje szybki wzrost aktywności ruchowej, a haloperydol czy rysperydon natychmiastowo hamują wszelką aktywność, o tyle działanie wenlafaksyny nie miało żadnego zauważalnego wpływu na zachowanie myszy. W przeprowadzonych doświadczeniach wykazałam, że podanie wenlafaksyny nie aktywuje tych samych genów, co podanie haloperydolu, rysperydonu czy metamfetaminy. Z drugiej strony, bardziej zastanawiający jest brak jednoznacznych podobieństw w profilu ekspresji genów związanych z działaniem wenlafaksyny w porównaniu do innych wykorzystanych leków o działaniu przeciwdepresyjnym, czyli ketaminy i mianseryny. W szczególności w obszarze kory przedczołowej oczekiwałam przynajmniej częściowo zbieżnych wyników, ze względu na rolę jaką przypisuje się tej części mózgu w działaniu leków przeciwdepresyjnych u ludzi. Najwyraźniej silniejszy wpływ na profil transkrypcyjny ma mechanizm działania leku. Każdy z wykorzystanych leków przeciwdepresyjnych ma odmienne punkty uchwytu: ketamina związane z receptorem NMDA, wenlafaksyna z transporterami serotoniny i noradrenaliny a mianseryna z receptorami serotoninowymi i noradrenergicznymi. W dalszych badaniach zasadnym byłoby rozszerzenie analizy porównawczej na inne obszary przodomózgowia w celu potencjalnej identyfikacji struktur, gdzie efekty wszystkich trzech leków mogłyby być zbieżne.

Każdy z przebadanych leków pozostawia charakterystyczny odcisk palca w postaci grupy regulowanych transkryptów. Ekspresja transkryptów została porównana do mechanizmu działania

wybranych leków z uwzględnieniem ich działania receptorowego. Jednakże nie da się jednoznacznie przypisać ekspresji każdego z transkryptów do konkretnych receptorów. Na podstawie uzyskanych wyników sugeruję, że ekspresja transkryptów z grupy nr 2 jest związana z szeroko pojętym efektem dopaminy, regulacja ekspresji transkryptów z grupy nr 1 odzwierciedla efekty związane z blokadą receptorów $\alpha 1$ i/lub 5HT2 zaś grupy 3 i 4 mogą być szerzej związane z regulacją serotoninową, m.in. przez sygnalizację mediowaną przez receptory 5HT1. Najprawdopodobniej ekspresja transkryptów w każdej z tych grup jest wypadkową efektów pochodzących z wielu receptorów.

Dla każdej z wyróżnionych grup genów można określić specyficzny zestaw czynników transkrypcyjnych, który wpływa na regulację transkrypcji. Czynniki transkrypcyjne poprzez wiązanie się do specyficznych sekwencji DNA są potencjalnymi regulatorami indukowanej lekami plastyczności komórkowej [10]. W opisanych eksperymentach czynniki te zostały zidentyfikowane poprzez wykorzystanie bazy danych wyników uzyskanych metodą ChIP-seq [207].

Najliczniejsza grupa genów regulowanych podaniem leków (grupa nr 2) zawiera czynniki zaangażowane w kontrolę ekspresji genów zależnej od aktywności neuronów. W grupie nr 2 znajduje się wiele genów powiązanych ze szlakiem przekazu sygnału wewnątrzkomórkowego MAPK, np. *Dusp1*, *Dusp4*, *Dusp6*. W literaturze dobrze opisano udział czynników SRF1 i CREB w regulacji transkrypcji genów z tej grupy oraz ich rolę w kontroli plastyczności komórek nerwowych. Czynniki transkrypcyjne SRF i CREB1 oddziałują poprzez promotory zlokalizowane w pobliżu miejsca startu transkrypcji tym samym bezpośrednio i selektywnie kontrolują ekspresję danego wariantu genu. Precyzyjna kontrola transkrypcji w komórkach nerwowych przez regulatory CREB/SRF jest uważana za element inicjujący plastyczność zaangażowaną w mechanizmy uczenia się i pamięci [208]. Haloperydol i metamfetamina powodują najsilniejszą rekrutację tych czynników transkrypcyjnych, podczas gdy wenlafaksyna prawdopodobnie nie wywiera wpływu na aktywację czynnika CREB lub SRF.

Jako czynnik transkrypcyjny powiązany z regulacją niektórych genów grupy 2 oraz grupy 1 wskazany został receptor glikokortykoidowy (GR). Przykładem genu regulowanego przez GR, i indukowanego przez podanie rysperydonu, haloperydolu i ketaminy, jest *Fkbp5* kodujący białko należące do rodziny immunofilin. Zróżnicowanie sekwencji genu FKBP5 u ludzi wykazuje asocjacje z poziomem wrażliwości na działanie leków przeciwdepresyjnych, w tym na szybkość występowania efektów terapeutycznych [116]. Co ciekawe, receptor GR jest zaangażowany w ekspresję wybranych wariantów transkrypcyjnych *Fkbp5*, natomiast aktywność białka FKBP5 jest regulatorem aktywności GR [209]. Taki mechanizm ujemnego sprzężenia zwrotnego jest częstym mechanizmem samoregulacji w ośrodkowym układzie nerwowym. Jest to m.in. jeden ze sposobów regulacji aktywności osi

podwzgórze – przysadka – kora nadnerczy. Glikokortykosteroidy uwalniane m.in. w sytuacji stresowej powodują pobudzenie osi HPA, a z drugiej strony działają na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego na hamowanie uwalniania hormonów w podwzgórze i przysadki. Mechanizm ten ma doprowadzić do przywrócenia homeostazy organizmu. W przedstawionych wynikach wskazuję, że leki psychotropowe mogą regulować sprzężenie zwrotne ekspresji *Fkbp5* i aktywności GR. Innym przykładem udziału GR w regulacji wywołanej podaniem leków psychotropowych jest ekspresja genu *Tsc22d3*. Ekspresja wariantu *TSC22D3* została powiązana z podwyższonym poziomem interleukiny 6 stwierdzonym u pacjentów cierpiących na depresję [210]. W przedstawionych w rozprawie wynikach układ złożony z GR i koaktywatora transkrypcji *ZMIZ1* został wskazany jako regulator kontrolujący ekspresję genów z grupy nr 1. W grupie tej warto wskazać gen *Sgk1*, który pod wpływem leków psychotropowych ulega ekspresji w postaci dwóch form transkrypcyjnych. Ich produkty białkowe nie posiadają domen PX odpowiedzialnych za wewnątrzkomórkową lokalizację kinazy. Badania nad receptorem GR przeprowadzane w naszym zespole wskazują, że najprawdopodobniej duża część aktywności GR następuje w astrocytach i mikrogleju. Aktywność GR może być również modelowana układzie *in vitro*, poprzez stymulację hodowli astrocytów selektywnym agonistą GR – deksametazonem [60]. GR oddziałuje na sekwencje DNA zlokalizowane stosunkowo daleko od proksymalnego promotora, koaktywując inne czynniki np. *ZMIZ1* i/lub kontrolując moc izolatora np. *CTCF* [211]. Tym samym, moje wyniki wskazują, że część genów z grupy nr 1 i nr 2 ulega aktywacji pod wpływem leków psychotropowych w odmiennych komórkach niż neurony.

W grupie genów aktywowanych w odpowiedzi na podanie mianseryny, zidentyfikowano transkrypty wcześniej nie opisywane w literaturze w kontekście ich funkcji w układzie nerwowym. Z uwagi na sekwencję promotorów potencjalnym regulatorem ekspresji tych genów może być czynnik transkrypcyjny TBP. TBP wiąże się do sekwencji TATA w DNA i jest opisywany jako jedno z białek wchodzące w skład dużego kompleksu inicjującego transkrypcję [10]. Obecnie uważa się, że sekwencja TATA jest obecna tylko w ok. 20% promotorów eukariotycznych [212]. TBP nie został wskazany jako potencjalny regulator pozostałych trzech grup genów. Białko to jest więc specyficznie obecne na promotorach szeregu genów grupy nr 3, m.in. *Tia1*, *Sfpq* lub *Rps3*. Funkcja tych genów w ośrodkowym układzie nerwowym nie jest dokładnie poznana, aczkolwiek *Tia1* został wskazany jako czynnik biorący udział w zachowaniu homeostazy lipidów w mózgu [213].

Transkrypty z grupy nr 4, o obniżonej ekspresji po podaniu mianseryny posiadają w obszarach promotorowych miejsca wiązania dla czynnika transkrypcyjnego *STAT5a*. W omawianych wynikach po raz pierwszy pokazano potencjalne zaangażowanie *STAT5a* w regulację odpowiedzi na leki psychotropowe. W literaturze opisano czynniki transkrypcyjne z rodziny *STAT* (ang. *Signal Transducers and Activators of Transcription*) jako silne regulatory odpowiedzi komórkowej na

cytokiny i czynniki wzrostu. Przyłączenie liganda powoduje zmianę konformacji odpowiedniego receptora, następnie aktywację białka JAK, które fosforyluje reszty tyrozyny obecne w białkach STAT. Białka te następnie jako homo- lub heterodimery translokują do jądra komórkowego, gdzie działają jako czynniki regulujące ekspresję genów docelowych [214]. STAT5 był dotychczas głównie komentowany w kontekście regulacji genów związanych z odpowiedzią zapalną, uwalnianiem cytokin i właściwościami antyapoptycznymi. Wykazano, że podanie cytokiny interferon α powoduje aktywację ścieżki JAK-STAT, co skutkuje osłabieniem aktywności GR w mysich komórkach hipokampa. Farmakologiczne zahamowanie ścieżki JAK-STAT odwraca ten efekt. Najprawdopodobniej białko STAT5 oddziałuje w jądrze komórkowym z GR by uniemożliwić interakcję GR z GRE [215]. Na tej podstawie pozwalam sobie wysunąć przypuszczenie, że mianseryna wpływa na regulację genów z grupy nr 4 poprzez aktywację ścieżek przekazu wewnątrzkomórkowego wpływających na osłabienie wiązania STAT5 do promotorów tych genów lub przekierowanie STAT5 na alternatywne szlaki sygnałowe, np. związane GR jako część reakcji ujemnego sprzężenia zwrotnego.

Podsumowując, w mojej analizie miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych obserwuję różnice w ilości zidentyfikowanych czynników transkrypcyjnych pomiędzy grupami genów nr 1 i 2 a grupami nr 3 i 4. Około połowa (61/113) regulowanych transkryptów jest indukowana w największym stopniu podaniem haloperydolu, rysperydonu i metamfetaminy (grupy nr 1 i 2). Można wśród nich wyróżnić transkrypty należące do genów regulowanych aktywnością neuronalną powiązaną z czynnikami transkrypcyjnymi SRF lub CREB1 lub do genów regulowanych glikokortykoidami i receptorem GR. W literaturze te dwa układy czynników transkrypcyjnych są stosunkowo dobrze opisane w kontekście neuroplastyczności. Natomiast ekspresja genów z grupy nr 3 i 4 jest najsilniej regulowana przez podanie mianseryny. Analiza promotorów tych genów wskazała mniejszą ilość zaangażowanych czynników transkrypcyjnych niż w przypadku grup nr 1 i 2. Niewykluczone, że wiązanie czynników transkrypcyjnych TBP i STAT5 stanowi nowy, słabo jeszcze poznany mechanizm regulacji ekspresji genów, który mógłby być swoisty dla leków działających poprzez receptory serotoninowe 5-HT₂ oraz adrenergiczne α 1.

2. Analiza transkryptomu w kontekście alternatywnych wariantów genów

Na podstawie wyników wysokoprzepustowych badań ekspresji genomu ssaków można stwierdzić, że większość znanych genów jest transkrybowana w postaci kilku izoform RNA [35]. Taki system zapewnia wydajne źródło białek i regulatorowych RNA ulegających ekspresji w zależności od stanu komórki oraz bodźców pochodzących ze środowiska [216]. Badania stopnia alternatywnej ekspresji genów w skali całego transkryptomu wymagają zastosowania odpowiedniego zestawu narzędziowego. Prace prowadzone w Zakładzie Neurofarmakologii Molekularnej z wykorzystywaniem

mikromacierzy DNA wielokrotnie wskazywały na różnice w pomiarze poziomu mRNA dokonywanym przy pomocy sond zaprojektowanych do jednego genu. W kilku przypadkach zaobserwowane zostały wyniki wzajemnie sprzeczne, opisujące jednocześnie wzrost i spadek ekspresji danego genu. Sytuacje te były interpretowane jako potencjalna detekcja transkrypcji wielu alternatywnych wariantów genu [94, 127]. Odkrycia te sugerowały, że leki psychotropowe mogą indukować w ośrodkowym układzie nerwowym ekspresję specyficznych izoform transkrypcyjnych.

Przedstawiona w rozdziale pt. „Wyniki” analiza transkryptomu potwierdza, że duża część genów regulowanych przez leki psychotropowe ulega ekspresji w postaci więcej niż jednej izoformy. Znaczna część ze zidentyfikowanych izoform to warianty o alternatywnych miejscach startu i terminacji transkrypcji. Ta obserwacja jest zbliżona do wcześniej opisanego profilu ekspresji genów w rozwoju mózdzku. Autorzy tej publikacji zasugerowali, że nasilenie procesów neuroplastycznych zachodzące podczas kształtowania się mózgu jest częściej powiązane z ekspresją oddzielnych jednostek transkrypcyjnych niż podmianą eksonów [217]. Moje wyniki sugerują, że część efektu molekularnego działania leków psychotropowych odbywa się na poziomie regulacji pojedynczych transkryptów.

Większość wykrytych w moich badaniach zmian ekspresji dotyczyła transkryptów kodujących znane produkty białkowe. Pomimo zastosowania metody umożliwiającej odczyt całego transkryptomu zidentyfikowano relatywnie niewiele opisanych w literaturze niekodujących RNA, ulegających regulacji pod wpływem leków psychotropowych. Ta dysproporcja może być intuicyjnie nieoczekiwana w kontekście wcześniejszych doniesień wskazujących na istotną rolę niekodujących RNA w epigenetycznej kontroli efektów związanych z działaniem leków m.in. przeciwdepresyjnych [218]. Przykładem niekodującego RNA, którego poziom zmienia się w wyniku działania leków jest *Neat1*. Jest to długie niekodujące RNA, którego profil ekspresji jest zbieżny z transkryptami zaklasyfikowanymi do grupy genów nr 1. Zgodnie z uzyskanymi danymi, lekiem który wywołał największe zmiany w ekspresji *Neat1* była mianseryna. Należy zaznaczyć, że moje obserwacje dotyczą jednorazowego podania leków, podczas gdy znaczna część opisanych w literaturze zmian dotyczy podań wielokrotnych [126].

Szczególnie ciekawym rezultatem przedstawionych badań zmian ekspresji jest identyfikacja grupy dotychczas nieznanych RNA zaklasyfikowanych jako transkrypty z retencją intronu. Większość z tych transkryptów została na podstawie profilu regulacji zaklasyfikowana do grup nr 3 i nr 4. Jedną z cech charakterystycznych dla genów zawartych w tych grupach jest zmiana ekspresji w badanych tkankach mózgu zachodząca pod wpływem mianseryny. Zjawisko zachowania intronu występuje gdy intron ulega transkrypcji do pre-mRNA, ale nie ulega wycięciu w dojrzałym transkrypcie. Introny czyli

sekwencje, które nie kodują białek a jedynie oddzielają eksony, przez wiele lat postrzegane były jako tzw. śmieciowe DNA (ang. *junk DNA*) [219]. Wiadomym jest, że introny zawierają sekwencje wspomagające proces alternatywnego splicingu. W sekwencjach intronów mogą być zlokalizowane geny dla niekodujących RNA, np. miRNA, pełniące funkcje regulatorowe w komórce. Nieoczekiwanym odkryciem było stwierdzenie, że niektóre introny mogą być aktywnie zatrzymywane w dojrzałym mRNA i efekt ten nie wynika z błędów podczas obróbki transkryptu [220]. Wykorzystanie metod głębokiego, wysokoprzepustowego sekwencjonowania RNA wraz z odpowiednią analizą bioinformatyczną pozwoliło na identyfikację szeregu transkryptów zawierających introny, których funkcje molekularne to regulacja ekspresji genów [221] lub regulacja eksportu mRNA z jądra komórkowego do cytoplazmy [222]. Retencja intronu może również prowadzić do powstawania alternatywnych izoform o określonych funkcjach np. podjednostki neuronalnego kanału BK_{Ca}, która wpływa na pobudliwość neuronów hipokampa i lokalizację kanałów białkowych w dendrytach [223]. Retencja intronu jest słabo dotychczas opisanym typem alternatywnego splicingu u ludzi i zwierząt [220]. Zjawisko to występuje powszechnie u kręgowców, co zostało potwierdzone poprzez analizę transkryptomów siedmiu 7 tkanek pochodzących od 11 ewolucyjnie odległych gatunków. We wszystkich badanych tkankach stwierdzono obecność transkryptów zawierających retencję intronu. Co ciekawe większość przypadków IR była charakterystyczna dla jednego gatunku, wyjątek stanowiła tkanka mózgowa, w której stwierdzono międzygatunkowe podobieństwa ekspresjonowanych transkryptów IR. Według autorów obserwacja ta wskazuje na szczególnie istotną rolę zjawiska IR w działaniu układu nerwowego [224]. Znaczenie zachowania intronu dotychczas było najczęściej badane w kontekście rozwoju stanów chorobowych. Pomimo dowodów potwierdzających dużą częstość występowania IR w tkankach nowotworowych, np. w guzach piersi [225], ich związek z ekspresją niefunkcjonalnych białek został wykazany tylko na kilku przykładach. Przykładowo, cyklina D1b to białko, którego ekspresja jest nasiloną w raku prostaty i przełyku. Transkrypt wyrażany w komórkach nowotworowych ma zachowany intron, który zawiera przedwczesny kodon terminacji, którego działanie prowadzi do produkcji skróconej formy cykliny 1D [226, 227]. Jednakże zachowanie intronu w transkrypcie nie musi mieć negatywnego wpływu na funkcjonowanie komórek. Na przykład, zachowanie intronów 12-13 w genie kalcyneuryny prowadzi do ekspresji nowej izoformy białka – Cnβ1. Ekspresja alternatywnej formy białka poprawia czynność serca i zmniejsza powstawanie blizn po zawale mięśnia sercowego [228]. Tym samym zasadnym jest poszukiwanie transkryptów IR jako potencjalnych wskaźników cech istotnych klinicznie. Dobrym przykładem jest transkrypt kodujący swoisty antygen sterczowy, PSA (ang. *prostate-specific antigen*). Poziom PSA jest wskaźnikiem używanym do wykrywania i monitorowania przebiegu raka prostaty. Badania wykazują, że w ponad połowie przypadków nowotworów prostaty dochodzi do zachowania intronu 4 w transkryptach kodujących PSA. Tym samym wykonanie testu na obecność intronu mogłoby poprawić

wykrywalność raka prostaty [229, 230]. Dotychczas opisanych jest tylko kilka przykładów retencji intronu w ośrodkowym układzie nerwowym. Warto przytoczyć przykład genu PRX kodującego białko periaksynę, któremu przypisuje się udział w stabilizacji struktury osłonki mielinowej. Retencja intronu w transkrypcie powoduje produkcję skróconego białka o odmiennej, cytoplazmatycznej, lokalizacji komórkowej [231]. W moich wynikach odnajduję szereg regulowanych transkryptów z retencją intronu, m.in. *Ucp2*, *Trim2*, *Tia1*, *Nrxn1*, *Ptbp2*, *Clk1* czy *Dclk1*. Geny te mogą pełnić ważne funkcje w ośrodkowym układzie nerwowym. Na przykład wykazano, że gen *Trim2* pełni kluczową rolę we wzroście neurytów oraz jest zaangażowany w proces neurodegeneracji [232, 233]. Kolejnym przykładem jest gen *NRXN1*, którego polimorfizmy łączone są z patogenezą schizofrenii, z uwagi na zmienność liczby kopii tego genu u osób chorych [234]. Dodatkowo delecje i mutacje punktowe w genie *NRXN1* są związane z szerokim spektrum zaburzeń neuropsychiatrycznych i neurorozwojowych, w tym autyzmu, niepełnosprawności intelektualnej lub epilepsji. Wykazano asocjację pomiędzy polimorfizmami genu *NRXN1* a skutecznością leczenia atypowymi neuroleptykami u osób cierpiących na schizofrenię [235]. Dane literaturowe wskazują, że u osób chorych na schizofrenię mutacje punktowe mogą występować również w obszarze promotora genu *NRXN1* modyfikując wiązanie czynników transkrypcyjnych. W moich badaniach zwróciłam uwagę na alternatywne transkrypty z retencją intronu dwóch genów *Clk1* i *Dclk1*. Oba geny zaangażowane są w procesowanie RNA oraz modulację splicingu pre-mRNA. W szczególności *Clk1* jest przedmiotem intensywnych badań jako cel potencjalnej terapii chorób ośrodkowego układu nerwowego [236].

3. Charakterystyka wybranych genów regulowanych podaniem leków psychotropowych

Spśród listy genów różniących się profilem ekspresji po podaniu leków psychotropowych wytypowano cztery do dalszej weryfikacji metodą qPCR: *Map6*, *Clk1*, *Bhlhe40* oraz *Dclk1*. Wybrane geny charakteryzowały się zróżnicowanym profilem regulacji w badanych tkankach z wyraźną regulacją jednego spośród kilku transkryptu genów. Ekspresja tych transkryptów po podaniu wybranych leków psychotropowych nie została dotychczas opisana w literaturze.

Pierwszym badanym genem był *Map6* (Microtubule Associated Protein 6) - gen kodujący białko związane z mikrotubulami (ang. *microtubule-associated protein*). W niektórych typach komórek, takich jak neurony, fibroblasty i komórki glejowe, występuje subpopulacja mikrotubul, która pozostaje stabilna w warunkach takich jak ekspozycja na niskie temperatury lub związki działające depolaryzująco na mikrotubule, np. nokodazol [237]. Odkryto, że białko MAP6 (nazywane inaczej białkiem STOP) jest zaangażowane w proces stabilizacji tych odpornych mikrotubul. Wiele informacji dotyczących tych białek pochodzi z eksperymentów na myszach, u których zablokowano funkcjonowanie genu *Map6* (tzw. myszy „MAP6 null”). Myszy te wykazują szereg defektów

plastyczności synaptycznej i przekaźnictwa neuronalnego prowadzących do poważnych zaburzeń zachowania. Co ciekawe, zaburzenia te mogą być złagodzone podaniem neuroleptyków (haloperydolu z chloropromazyną, rysperydonu lub klozapiny). Efekty neuroleptyków sugerują możliwość wykorzystania myszy MAP6 null jako modelu zaburzeń psychiatrycznych [238, 239]. Wyniki badań genetycznych u ludzi potwierdzają powiązanie genu MAP6 oraz predyspozycji do schizofrenii. Stąd też *Map6* mógłby być potencjalnym biomarkerem wczesnej diagnostyki schizofrenii [240]. Gen *Map6* ulega alternatywnej transkrypcji i translacji do różnych wariantów białek MAP6, które są specyficzne tkankowo i rozwojowo. W neuronach dochodzi do ekspresji dwóch wariantów N-STOP i E-STOP (o masie cząsteczkowej odpowiednio: 120 kDa i 79 kDa), fibroblasty ekspresjonują białko F-STOP (42 kDa), oligodendrocyty O-STOP (89 kDa) zaś astrocyty A-STOP (60 kDa) [241]. W przedstawionych wynikach wykazano regulację ekspresji wariantu o alternatywnym ostatnim eksonie po podaniu wybranych leków psychotropowych. Ten wariant nazywany jest w literaturze izoformą 2 i wykazano, że jego ekspresja jest podwyższona w korze przedczołowej (w polu Brodmanna 46) pacjentów ze schizofrenią w stosunku do osób zdrowych [240]. Analiza ekspresji uzyskana metodą qPCR częściowo potwierdza dostępne dane literaturowe. W moich wynikach mianseryna powoduje obniżenie ekspresji tego wariantu *Map6*, zaś metamfetamina powoduje wzrost jego ekspresji w NAc. Z literatury wiadomo, że wiele objawów indukowanej metamfetaminą psychozy jest podobnych do objawów pozytywnych obserwowanych u pacjentów ze schizofrenią [242]. Z kolei mianseryna jest stosowana u pacjentów ze schizofrenią w połączeniu z neuroleptykami i wykazano, że łagodzi objawy negatywne [243]. Co ciekawe, żaden z testowanych neuroleptyków nie wpływał na ekspresję krótszego wariantu *Map6*. Warto również zwrócić uwagę, że profil ekspresji wskazanego wariantu *Map6* inaczej prezentował się w korze przedczołowej, gdzie jego ekspresja ulegała obniżeniu po podaniu ketaminy. Ketamina jest znana ze swoich właściwości psychozomimetycznych zarówno u zdrowych osób jak i u cierpiących na schizofrenię [244]. Na tym etapie ciężko jednoznacznie zinterpretować regulację *Map6* w kontekście schizofrenii, jednakże uzyskane wyniki dopełniają obecny stan wiedzy. Na podstawie dostępnej literatury zidentyfikowany wariant jest prawdopodobnie wariantem neuronalnym, jednakże w przedstawionej w rozprawie analizie komórkowej nie udało się zidentyfikować tego transkryptu w bazie danych sekwencjonowania transkryptomu pojedynczych komórek.

Drugi gen regulowany, który regulowany jest w przeciwny sposób w efekcie działania mianseryny i metamfetaminy to *Clk1* (*CDC Like Kinase 1*). Gen ten koduje białko należące do rodziny CDC2-podobnych kinaz białkowych, które mogą fosforyzować zarówno reszty tyrozyny, jak i seryny i treoniny. Białka te odgrywają ważną rolę w regulacji procesu splicingu poprzez fosforylację białek zaangażowanych w wycinanie intronów. Z tego powodu białka te są interesującym celem dla rozwoju

nowych leków, m. in. w terapii dystrofii mięśniowej Duchenne'a [236]. Regulowany w przedstawionych badaniach wariant zawiera retencję intronu i jest opisany jako transkrypt niekodujący. Analiza hierarchiczna wykazała, że profil jego ekspresji pasuje do grupy nr 4 czyli transkryptów o obniżonej ekspresji po mianserynie w dwóch badanych strukturach mózgu. Porównanie z bazą profili pojedynczych komórek wskazało, że jest to wariant neuronalny i ulega ekspresji zarówno w neuronach GABAergicznym jak i glutaminergicznym.

Ostatni z przykładowych transkryptów ulegających regulacji to wariant genu *Bhlhe40* (*Basic Helix-Loop-Helix Enhancer 40*). BHLHE40 jest czynnikiem transkrypcyjnym, który może działać zarówno jako bezpośredni represor transkrypcji poprzez wiązanie do sekwencji E-Box (CACGTG) [245], jako czynnik aktywujący poprzez wiązanie do miejsc Sp1 [246] jak i również pośrednio poprzez interakcję z innymi czynnikami transkrypcyjnymi. Gen *Bhlhe40* zaangażowany jest m.in. w odpowiedź komórki na hipoksję, uszkodzenia DNA oraz niektóre funkcje związane z metabolizmem komórki [245]. Jego poziom ekspresji w mózgu myszy jest relatywnie wysoki, szczególnie w obszarach hipokampa i kory, natomiast rola tego genu w działaniu układu nerwowego jest wciąż przedmiotem badań. Wykazano, że uszkodzenie ośrodkowego układu nerwowego wywołane podaniem kwasu kainowego wpływało na wzrost ekspresji *Bhlhe40* w hipokampie i korze mózgu myszy [247]. Ponadto, dane z badań na myszach transgenicznym z ablacją genu *Bhlhe40* wskazały w hipokampie na zwiększoną ekspresję izoformy *Bdnf*, będącej pod kontrolą regulowaną aktywnością komórkową promotora 4. Wyniki te sugerują, że *Bhlhe40* wpływa na pobudliwość neuronów poprzez regulację zależnej od aktywności ekspresji *Bdnf* [248]. W moich wynikach zaobserwowałam w NAc zwiększoną ekspresję głównej izoformy genu *Bhlhe40* wywołaną podaniem haloperydolu lub metamfetaminy. Jak już wcześniej wskazywałam podanie haloperydolu i metamfetaminy powoduje wzrost ekspresji genów związanych z aktywnością neuronalną, np. *c-Fos* lub *Egr1* w dwóch typach neuronów szlaku pośredniego i bezpośredniego. Jednakże nie odnalazłam w danych literaturowych przesłanki do wniosku, że regulacja *Bhlhe40* odbywa się w odmiennych populacjach neuronów prążkowania [64]. Ponadto, nową obserwacją jest fakt, że znamienny wzrost ekspresji *Bhlhe40* w korze przedczołowej wywołany został jedynie podaniem rysperydonu. Co ciekawe, zgodnie z danymi z profilowania pojedynczych komórek kory mózgu, *Bhlhe40* wyrażany jest jedynie w neuronach glutaminianergicznym, stąd przypuszczam, że może to wskazywać na częściowo specyficzne działania rysperydonu właśnie na ten typ komórek.

4. Wybiórcza regulacja ekspresji transkryptów genu *Dclk1*

Uzyskane wyniki wskazują na istnienie nowej izoformy *Dclk1* (*Dclk1-m*), której ekspresja jest indukowana w jądrze półleżącym i korze przedczołowej myszy po podaniu leków psychotropowych.

Regulacja ta jest szczególnie widoczna w przypadku stosowania substancji, które wpływają na sygnalizację od receptora serotoniny 5HT_{2A} / C (tj. mianseryna i rysperydon). Należy zauważyć, że wymienione leki nie są specyficzne w swoim działaniu farmakologicznym czyli działają jednocześnie na wiele receptorów, m.in. także na receptory dopaminy D₂ i adrenergiczne α ₁. W związku z czym transkrypcja może być wywołana przez aktywność więcej niż jednego typu receptorów obecnych na neuronach. Zaobserwowałam, że Dcl₁-m jest głównym, być może wyłącznym transkrypcyjnym *Dcl1*, którego ekspresja jest regulowana przez leki.

Gen *Dcl1* ma złożoną strukturę i posiada co najmniej 15 znanych wariantów transkrypcyjnych. Proces regulacji transkrypcji oraz funkcjonalne znaczenie poszczególnych wariantów *Dcl1* nie są opisane. *Dcl1* został po raz pierwszy opisany jako gen swoisty dla mózgu, jednak w ostatnich latach prowadzone były intensywne badania jego funkcji poza ośrodkowym układem nerwowym. Stwierdzono, że *Dcl1* ulega ekspresji w różnych komórkach nowotworowych [22], pełniąc znaczącą rolę we wzroście guzów. Jednak mechanizm karcynogenezy oraz kliniczne znaczenie jako potencjalnego markera diagnostycznego nie są w pełni jasne [23]. Opisana w niniejszej pracy analiza ujawnia specyficzną dla regionu mózgowego regulację ekspresji izoform *Dcl1* w odpowiedzi na podanie kilku leków psychotropowych. Zgodnie z moją wiedzą jest to pierwsze w literaturze doniesienie, pokazujące regulację *Dcl1* na poziomie pojedynczych eksonów. Moje wyniki są zgodne z wcześniejszymi ustaleniami wskazującymi na regulację w obrębie środkowego obszaru genu *Dcl1* oraz ekspresję krótkiego wariantu tego genu. Dodatkowo uzupełniają wcześniejszą wiedzę poprzez identyfikację wariantu zawierającego retencję intronu Dcl₁-m.

Dotychczas opisany krótki transkrypt *Dcl1* określony jako Carp (znany też jako Ania-4) został zaklasyfikowany jako IEG. Aktywacja ekspresji tego wariantu zachodzi w neuronach prążkowania w ciągu kilku minut od stymulacji receptora dopaminy D₁ [123]. Natomiast w hipokampie zaobserwowano wzrost ekspresji Carp po podaniu agonisty receptora kainowego (kwasu kainowego) [249], po adrenalectomii [180], po długotrwałym wzmocnieniu synaptycznym wywołanym neurotroficznym czynnikiem pochodzenia mózgowego [250] oraz powtarzanej ekspozycji na glutaminian w hodowlach skrawków hipokampu [251]. Dotychczas przeprowadzono tylko jedno badanie pokazujące regulację ekspresji *Dcl1* przez leki psychotropowe. Duncan i wsp. wykazali, że chroniczne podania haloperidolu, ale nie klopazyny lub olanzapiny, wpływają na transkrypcję *Dcl1* [133]. Uzyskane przez nich wyniki nie dają możliwości odróżnienia czy zaobserwowany wzrost dotyczy izoform Dcl, Carp czy Dcl₁-m. Identyfikacja wariantu Dcl₁-m wpływa również na interpretację poprzednich doniesień opublikowanych przez nasz Zespół, w których wykryto wzrost ekspresji *Dcl1* po podaniu mianseryny i rysperydonu [2, 3, 13]. Ze względu na ograniczenia dotyczące metodologii stosowanej w poprzednich badaniach, nie miały one możliwości określenia,

które transkrypty były regulowane przez działanie leków. Sondy stosowane w mikromacierzach zostały zaprojektowane w sposób pozwalający na równoczesny pomiar zmian abundancji różnych transkryptów genu *Dclk1*, zarówno *Dclk1-m*, *Carp* jak i *Dcl*. Tym samym wyniki opublikowane przez innych autorów również mogły wykrywać zmiany w ekspresji *Dclk1-m* jeżeli dokonywano detekcji sekwencji obecnych we wszystkich transkryptach. Po pierwszej analizie wyników RNAseq zakładałam, że podanie leku reguluje ekspresję specyficznych dla mózgu izoform *Dclk1* z alternatywnym ostatnim eksonem - *Dcl* lub *Carp*. Przeprowadzona przeze mnie dogłębną analiza wyników sekwencjonowania transkryptomu wykazała, że podanie leków psychotropowych indukowało ekspresję wcześniej nieznanego transkryptu genu *Dclk1*. Ekspresja tego transkryptu ulegała zmianie w NAc w odpowiedzi na mianserynę i rysperydon, a w PFCx tylko na mianserynę. Izofорма *Dclk1-m* zawiera retencję intronu pokrywającą środkową część locus *Dclk1*. Wynik ten może sugerować, że produkt transkrypcji zawierający zdefiniowany intron może być istotny dla działania tych leków. Zarówno mianseryna, jak i rysperydon wykazują wysokie powinowactwo do receptorów 5-HT_{2A}. Obserwacja ta sugeruje, że receptory serotoninowe mogą pośredniczyć w aktywacji transkrypcji *Dclk1-m*. Warto dodać, że badania genetyczne wykazały asocjację występowania specyficznych polimorfizmów *DCLK1* oraz skłonności do rozwoju schizofrenii. Zatem gen *Dclk1* może być zaangażowany zarówno w etiologię, jak i leczenie przyczynowe tej psychopatologii.

Na podstawie opisanych w przedstawionej rozprawie wyników można stwierdzić, że wywołana zmiana poziomu abundancji transkryptu *Dclk1-m* w mózgu ma charakter przejściowy i utrzymuje się przez kilka godzin od podania leku. Najprawdopodobniej *Dclk1-m* nie ulega kumulacji ponieważ zmiany nie zostały wykryte po wielokrotnych podaniach mianseryny. Co ciekawe, *Dclk1-m* potencjalnie koduje krótki peptyd, który obejmuje sekwencję bogatą w serynę i prolinę. Stosując spektrometrię masową, potwierdziłam obecność małych białek zawierających domenę bogatą w SP, które mogłyby odpowiadać *CARP* lub *DCLK1-M*. Uzyskane wyniki sugerują, że zidentyfikowany wariant może ulegać translacji. Postulowana funkcja domeny bogatej w SP, obecnej zarówno w peptydzie *CARP* jak i *DCLK1-M*, jest związana z interakcją z innymi białkami. Zgodnie z dostępną wiedzą, endogenne peptyd *CARP* nigdy nie został zidentyfikowany *in vivo*. W literaturze wskazuje się, że domena SP będzie oddziaływać z białkami zawierającymi domenę homologii Src 3 (SH3) [252]. W doświadczeniach *in vitro*, stwierdzono iż *CARP* oddziałuje z białkiem adaptorowym związanym z receptorem czynnika wzrostu 2 (*Grb2*), które zawiera domeny SH3 [180]. Czynniki *Grb2* bierze udział w tworzeniu kolców dendrytycznych, co ma kluczowe znaczenie dla rozwoju synaps [253] i jest zaangażowany w regulację dynamiki cytoszkieletu [254] oraz w aktywację kinazy Ras-ERK [255]. Zatem zaobserwowany wpływ leków psychotropowych na ekspresję *Dclk1-m* może ujawniać się w procesach kontroli plastyczności neuronalnej. Na podstawie przedstawionych wyników nie jest

jednak możliwe jednoznaczne ustalenie, czy Dclk1-m ulega translacji, chociaż potwierdziliśmy obecność w badanych próbkach peptydów pochodzących z Dclk1-m lub Carp.

Niedawno opublikowana praca wskazuje na udział DCLK1 w rozwoju dendrytów [256]. Obniżenie poziomu endogennego DCLK1 wpływa na poziom złożoności rozgałęzień dendrytycznych i całkowitą długość dendrytów *in vitro* w neuronach. DCLK1 odgrywa kluczową rolę w transporcie cargo do dendrytów; w szczególności domeny DCX są konieczne dla zachowania prawidłowego transportu pęcherzyków o gęstym rdzeniu (DCV, *ang. dense-core vesicle*), co powoduje wzrost dendrytów oraz uwalnianie peptydów neuromodulatorowych [257, 258]. Warto zauważyć, że aktywność kinazowa DCLK1 nie jest wymagana dla jego zdolności do wiązania mikrotubul. Sugeruje się, że jeden z wariantów zawierających C-końcówką część DCLK1 (CPG16) może być czynnikiem biorącym udział w przebudowie synaps. W badaniach *in vitro*, CPG16 autofosforyluje i fosforyluje białko zasadowe mieliny MBP (*ang. myelin basic protein*), ale *in vivo* substrat CPG16 nie został potwierdzony. CPG16 może być aktywowany przez ścieżkę sygnałowania wewnątrzkomórkowego zależną od aktywności kinazy PKA. W literaturze są doniesienia sugerujące, że rola CARP może polegać zarówno na modulowaniu aktywności kinazy [249], jak i na wzmacnianiu indukowanej przez DCL polimeryzacji tubuliny [259] *in vitro*. Proponowane funkcje w plastyczności synaptycznej opierają się w dużej mierze na analizie strukturalnej *in silico*. Można przypuszczać, że część aktywności przypisywanych wariantowi CARP może być w znacznej części wiązana z działaniem DCLK1-M.

Wyniki otrzymane metodą sekwencjonowania transkryptomu pozwoliły na dodatkową interesującą obserwację. Zauważyłam, że poziomy i różnice w proporcjach izoform *Dclk1* ograniczają możliwość jego badania w układach *in vitro*. Izoformy genów zależne od promotora zlokalizowanego „wcześniej” ulegają ekspresji u myszy we wczesnych etapach życia (P0-P5), podczas gdy transkrypty pochodzące z kolejnych promotorów są częściej ekspresjonowane u zwierząt dorosłych [217]. Zgodnie z literaturą, w przedstawionych w rozprawie wynikach najliczniej występującą izoformą genu *Dclk1* zarówno w NAc, jak i PFCx jest Cpg16 [179]. Wariant Carp był opisywany w niektórych pracach jako specyficzny dla dorosłych osobników. Inne doniesienia pokazują, że jego ekspresja w mózgu myszy nie jest wykrywalna w warunkach podstawowych, ale gwałtownie wzrasta po stymulacji dopaminergicznej [123]. Z kolei ekspresję Dcl opisano w specyficznych populacjach komórek nerwowych i postulowano jej zaangażowanie w neurogenezę u osobników dorosłych [260, 261]. Stąd też byłam zaskoczona wykryciem pełnej długości izoformy *Dclk1* w PFCx, podczas gdy wcześniejsze doniesienia wskazywały na to, że ulega ona ekspresji tylko we wczesnym okresie rozwoju mózgu [179, 259]. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzam, że poziomy ekspresji różnych izoform *Dclk1* mogą wykazywać wzorce specyficzne dla regionu mózgu. Ponadto, porównałam własne wyniki z poziomem ekspresji izoform *Dclk1* w pierwotnych hodowlach neuronów i astrocytów.

Zaobserwowałam znaczące różnice w poziomach ekspresji izoform *Dclk1* pomiędzy różnego typu hodowlami pierwotnymi oraz tkankami mózgu [60]. Szczególnie było to wyraźne dla izoformy Cpg16, która była ekspresjonowana na wysokim poziomie *in vivo*, natomiast była praktycznie niewykrywalna w hodowlach komórkowych. Z kolei pełnej długości transkrypt *Dclk1* był obecny na relatywnie wysokim poziomie ekspresji w hodowanych neuronach w stosunku do tkanek mózgowych. To odkrycie nie jest zaskakujące, ponieważ pierwotne hodowle neuronów pochodzą z zarodków myszy czyli z rozwijającego się mózgu. Ponadto pobudzenie neuronów kwasem kainowym (indukcja ekspresji genów regulowana przez aktywność) lub astrocytów deksametazonem (ekspresja genowa zależna od GR) nie wpłynęło znamienne na ekspresję żadnej z izoform *Dclk1*. Dlatego uważam, że z uwagi na ograniczenia wynikające ze zmiany proporcji ekspresji izoform genu *Dclk1* w warunkach *in vitro*, badania mechanizmów regulujących ekspresję izoform *Dclk1* w mózgu powinny być prowadzone z wykorzystaniem metod *in vivo* u dorosłych zwierząt.

5. Wykorzystanie wyników pochodzących z sekwencjonowania transkryptomu pojedynczych komórek

Wyzwaniem stojącym obecnie przed neuronauką jest integracja dużych zbiorów danych uzyskanych przy pomocy różnych, wysokoprzepustowych metod. Celem połączenia wyników pochodzących z różnych źródeł jest możliwość wyciągnięcia dodatkowych wniosków na temat procesów biologicznych zachodzących w ośrodkowym układzie nerwowym pod wpływem leków psychotropowych. W przedstawionej rozprawie podjęłam próbę integracji własnych wyników badań z danymi uzyskanymi wcześniej w naszym Zakładzie z wykorzystaniem mikromacierzy DNA oraz z dostępnymi danymi literaturowymi dotyczącymi sekwencjonowania mRNA pojedynczych komórek.

Dane z odczytu transkryptomu pojedynczych komórek kory wzrokowej wykorzystane do porównania ze zmianami wywołanymi podaniem leków w badanych tkankach. Wykonane analizy pozwoliły na przeprowadzenie próby przypisania zidentyfikowanych transkryptów do konkretnych typów komórek nerwowych. Wskazałam na prawdopodobną ekspresję transkryptów *Bhlhe40*, *Arc*, *Fos* oraz *Homer1* w neuronach glutaminergicznych. Neurony glutaminergiczne to neurony pobudzające zaangażowane w proces długotrwałego wzmocnienia synaptycznego, więc ekspresję tych transkryptów można bezpośrednio połączyć z modulacją procesów neuroplastycznych lub stabilizacją zmian wywołanych podaniem leków psychotropowych. Dotychczas wykazywano specyficzność neuronalną genu *Arc* poprzez wykorzystanie metody immunohistochemicznej kolokalizacji z markerem neuronalnym NeuN [262]. W przytoczonej pracy ekspresja genu *Arc* była regulowana w zależności od użytego bodźca zarówno w neuronach glutaminergicznych jak i GABAergicznych. Część IEGs jest ekspresjonowana także w pozostałych typach komórek nerwowych

[263]. Moje badania sugerują, że regulacja grupy transkryptów po podaniu wybranych leków psychotropowych jest ograniczona do neuronów glutaminergicznych.

Ponadto, wśród zadnotowanych transkryptów udało się potwierdzić, że geny o ekspresji zależnej od GR np. transporter glukozy *Slc2a1* oraz regulator transkrypcji *Tsc22d3* wykazują relatywnie wysoki poziom mRNA w komórkach glijowych. Należy stwierdzić, że profile ekspresji genów z grup nr 3 i 4 regulowanych podaniem leków są mniej specyficzne komórkowo. Potwierdza to moją hipotezę, w której wskazałam, że transkrypty grup 3 i 4 mogą być związane z ogólnym nakierowaniem serotoniny na działanie postsynaptyczne. Tym samym aktywacji ulegają w podobnym stopniu różne typy komórek nerwowych, które wykazują ekspresję receptorów serotoninowych 5HT1 czyli zarówno neurony jak i komórki glijowe. Niestety, nie wszystkie z regulowanych transkryptów kory przedczołowej i jądra półleżącego przegrody znalazły odwzorowanie w zbiorze danych pojedynczych komórek kory wzrokowej. Analiza danych transkryptomu pojedynczych komórek kory wzrokowej istotnie wzbogaciła uzyskane wyniki sekwencjonowania jednakże nie scharakteryzowała każdego zidentyfikowanego transkryptu. Z pewnością zastosowanie analizy pojedynczych komórek pochodzących z NAc i PFCx dostarczyłoby bardziej adekwatnych danych do porównania. W literaturze są co prawda opisane dane pochodzące z sekwencjonowania pojedynczych komórek innych obszarów mózgu np. prążkowiec [64, 264], jednakże ich dostępność jest ograniczona z uwagi na brak surowych wyników w odpowiednim formacie. W przypadku wykorzystanego w przedstawionej rozprawie transkryptomu pojedynczych komórek kory wzrokowej autorzy pracy umieścili w bazie SRA (*ang. Sequence Read Archive*) odczyty uliniowane do genomu mm10, a więc zgodnego z tym, na podstawie którego wykonana była analiza moich danych. Dzięki temu, w obu analizach jeśli wskazywany jest transkrypt, to mam pewność, że jest to dokładnie taki sam fragment genomu. Dlatego możliwe było bezpośrednie porównanie poziomu ekspresji transkryptu z analizy wariantów regulowanych podaniem leków z jego poziomem ekspresji w komórkach. Trudności z wykorzystaniem zewnętrznych danych sekwencjonowania transkryptomu mogą także wynikać ze sposobu projektowania eksperymentu i analizy danych z pojedynczych komórek. Komórki mózgu, które są wrażliwsze na procedury izolacji komórek, np. neurony, mogą zostać zniszczone w toku eksperymentów. Ponadto w przypadku, gdy sekwencjonowana jest ogromna liczba pojedynczych komórek, często odbywa się to kosztem głębokości sekwencjonowania i część informacji o mniej abundantnych transkryptach może zostać utracona. Z pewnością w kolejnych latach powstaną narzędzia bioinformatyczne poprawiające zdolność porównania danych z sekwencjonowania transkryptomu różnych tkanek i pojedynczych komórek, uwzględniające przy tym opisane powyżej ograniczenia metodologiczne.

VI. Podsumowanie i wnioski

Złożoność efektów molekularnych leków psychotropowych w mózgu powinna być interpretowana w kontekście ich wielopoziomowego wpływu na zachowanie oraz fizjologię organizmu. Sygnatury biologiczne działania poszczególnych leków są odwzorowaniem zaangażowania zestawu systemów transmiterów pracujących w układzie nerwowym. Na poziomie genomu modulacja wewnątrzkomórkowych ścieżek przekazu sygnału skutkuje zmianą transkrypcji docelowych genów. Uzyskane w ramach niniejszej rozprawy wyniki potwierdzają, że sekwencjonowanie RNA daje możliwość pozyskania zupełnie nowej warstwy informacji, dotyczącej ekspresji alternatywnych transkryptów genów. Stwierdziłam, że obserwacja ekspresji genów na poziomie pojedynczych transkryptów ma kluczowe znaczenie dla poprawności interpretacji wyników zmian wywołanych podaniem leków.

W powyższej rozprawie przedstawiłam wpływ sześciu leków psychotropowych na transkryptomy dwóch struktur mózgu myszy. Szczególnie ciekawym rezultatem przedstawionych badań jest identyfikacja stosunkowo dużej grupy transkryptów niekodujących produktów białkowych zawierających retencję intronu. Szereg informacji wskazuje, że transkrypty zawierające introny mogą pełnić w komórce funkcje regulatorowe. Jednak rola tego rodzaju alternatywnego splicingu jak dotychczas jest słabo poznana. Przedstawione rezultaty badań stanowią przesłankę do przeprowadzenia kolejnych eksperymentów, analizujących znaczenie zmian ekspresji transkryptów zawierających retencję intronu dla mechanizmu działania leków psychotropowych.

Ponadto, scharakteryzowałam ekspresję czterech nowych, ciekawych funkcjonalnie genów: *Map6*, *Bhlhe40*, *Clk1* i *Dclk1*. Wybrane do badań leki psychotropowe regulują ekspresję jednej z kilku izoform każdego z tych genów. Dodatkowo, zmiany ekspresji genu *Dclk1* zostały szczegółowo przebadana w różnych punktach czasowych. Wykazałam specyficzną regulację krótkiego wariantu *Dclk1* zawierającego retencję intronu. Nowo zidentyfikowany wariant *Dclk1-m* jest regulowany w mózgu myszy w odpowiedzi na podania mianseryny i rysperydonu. Indukcja ekspresji *Dclk1-m* zanika po 8 godzinach lecz możliwa jest detekcja produktu białkowego fragmentu genu *Dclk1*. Dokładna rola *Dclk1-m* pozostaje nieznana, aczkolwiek interpretacja zaobserwowanych zmian nasuwa kilka możliwych funkcji *Dclk1-m*. Konieczne jest wykonanie dalszych badań w celu potwierdzenia ekspresji białka *DCLK1-M* i jego roli w ośrodkowym układzie nerwowym.

Przewidywanie skutków działania leków psychotropowych w klinice w oparciu o wzorce transkrypcji wciąż pozostaje nieosiągalne. Przygotowanie dokładnego opisu mechanizmów działania poszczególnych leków psychotropowych na poziomie molekularnym jest konieczne dla uzyskania

pełnego obrazu zmian zachodzących w mózgu. Zbiór informacji o zmianach transkrypcji wywoływanych przez leki może w przyszłości stanowić jeden z filarów personalizacji stosowanego leczenia. W najbliższych latach neurogenomika stanie przed koniecznością rozbudowywania i integracji wielu baz danych w celu tworzenia użytecznych narzędzi ułatwiających analizę ekspresji genów na poziomie zdarzeń transkrypcyjnych zachodzących w pojedynczych komórkach nerwowych.

VII. Wykaz wybranych skrótów

AFE, *alternative first exon* – alternatywny pierwszy ekson

ALE, *alternative last exon* – alternatywny ostatni ekson

cAMP, *cyclic AMP* – cykliczne AMP

CARP, *CaMK-related peptide* – peptyd pozwiązany z CaMK

ChIP-seq, *chromatin immunoprecipitation-sequencing* – immunoprecypitacja chromatyny oraz sekwencjonowanie wysokoprzepustowe

CNE, *constitutive next exon* – ekson konstytutywny

CREB, *cAMP response element binding* – białko wiążące sekwencję CRE

DAT, *dopamine transporter* – transporter dopaminy

Dclk1, *doublecortin like kinase 1* – kinaza Dclk1

DRD1, *Dopamine receptor D1* – receptor dopaminowy D1

DRD2, *Dopamine receptor D2* – receptor dopaminowy D2

FDR, *false discovery rate* – spodziewany odsetek wyników fałszywie dodatnich

FPKM, *fragments Per Kilobase of transcript per Million fragments mapped* – liczba odczytów na tysiąc nukleotydów na 1 mln na ogólną liczbę zmapowanych odczytów

GO, *gene ontology* – ontologia genu

GR, *glucocorticoid receptor* – receptor glikokortykoidowy

GWAS, *genome-wide association study* – badania asocjacyjne w skali całego genomu

HAL, *haloperidol* – haloperydol

IEG(s), *immediate-early gene(s)* – gen(y) wczesnej odpowiedzi komórkowej

IR, *intron retention* – retencja intronu

KET, *ketamine* – ketamina

mAChR, *muscarinic acetylcholine receptor* – receptor muskarynowy

MET, *methamphetamine* – metamfetamina

MIA, *mianserin* – mianseryna

miRNA, *micro RNA* – mikro RNA

NAc, *nucleus accumbens* – jądro półleżące przegrody

ncRNA, *non-coding RNA* – niekodujące RNA

NET, *norepinephrine transporter* – transporter noradrenaliny

NGS, *next generation sequencing* – sekwencjonowanie następnej generacji

NMDA, *N-methyl-D-aspartate* – N-metylo-D-asparaginan

PFCx, *prefrontal cortex* – kora przedczołowa

PKA, *protein kinase A* – kinaza białkowa A

qPCR, *quantitative polymerase chain reaction* – reakcja łańcuchowa polimerazy

RISP, *risperidone* – rysperydon

SAL, *sal* – sól

Sgk1, *serum and glucocorticoid-regulated kinase 1* – kinaza regulowana surowicą i glikokortykoidami

snoRNA, *small nucleolar RNA* – małe jąderkowe RNA

UTR, *untranslated region* – region nie ulegający translacji

WEN, *venlafaxine* - wenlafaksyna

VIII. Spis rycin

Rycina 1. Budowa genu oraz przykłady możliwych wariantów transkrypcji.	18
Rycina 2. Schemat działania leków psychotropowych poprzez modulację procesów neuroplastycznych w mózgu.	20
Rycina 3. Wykorzystanie wyników profilowania zmian ekspresji genów w mózgu do klasyfikacji leków psychotropowych.	28
Rycina 4. Analiza integralności całkowitego RNA wyizolowanego z jądra półleżącego przegrody mózgu myszy, wykonana przy użyciu bioanalyzera.	34
Rycina 5. Graficzne podsumowanie procesu sekwencjonowania pełnego transkryptomu.	35
Rycina 6. Analiza wielkości fragmentów RNA po usunięciu rybosomalnego RNA, przy użyciu bioanalyzera.	36
Rycina 7. Analiza rozkładu wielkości fragmentów RNA uzyskanych po enzymatycznym trawieniu RNAzą III, przy użyciu bioanalyzera.	37
Rycina 8. Rozkład wielkości fragmentów biblioteki cDNA.	38
Rycina 9. Schemat konstruktów pozwalających na kontrolę jakości sfer.	39
Rycina 10. Klasyfikacja zidentyfikowanych transkryptów.	47
Rycina 11. Charakterystyka genów regulowanych w mózgu podaniem leków ze względu na liczbę możliwych izoform transkrypcyjnych.	48
Rycina 12. Profilowanie zmian transkrypcji genów wywołanych podaniem leków psychotropowych.	49
Rycina 13. Czynniki transkrypcyjne potencjalnie zaangażowane w regulację ekspresji genów w odpowiedzi na podanie leków.	51
Rycina 14. Klasyfikacja funkcjonalna grup genów regulowanych podaniem leków.	52
Rycina 15. Schemat przeprowadzenia procesu analizy ekspresji genów w różnych typach komórek nerwowych.	54
Rycina 16. Poziom ekspresji transkryptów regulowanych podaniem leków psychotropowych w różnych typach komórek nerwowych.	55
Rycina 17. Ekspresja wybranych genów po podaniu leków psychotropowych.	57
Rycina 18. Regulacja ekspresji wybranych izoform transkrypcyjnych po podaniu leków.	59
Rycina 19. Schematyczne przedstawienie budowy genu Dclk1 oraz jego regulacji po podaniu leków psychotropowych.	61

VIII. Spis rycin	94
Rycina 20. Zmiany ilości transkryptów <i>Dclk1</i> w oparciu o RNA-seq.	63
Rycina 21. Identyfikacja nowej, regulowanej podaniem leku, izoformy genu <i>Dclk1</i> .	64
Rycina 22. Wywołane lekiem zmiany w ekspresji nowej izoformy <i>Dclk1</i> (<i>Dclk1-m</i>).	65
Rycina 23. Walidacja zmian w ekspresji izoform <i>Dclk1</i> po podaniu wybranych leków psychotropowych.	66
Rycina 24. Zmiany ekspresji izoform <i>Dclk1</i> w czasie.	68
Rycina 25. Ekspresja izoform genu <i>Dclk1</i> po 5 dniach podawania mianseryny.	68
Rycina 26. Identyfikacja peptydu pochodzącego od CARP / DCLK1-M przy użyciu spektrometrii mas.	69

IX. Spis tabel

Tabela 1. Przykłady alternatywnych wariantów genów i niekodujących transkryptów ulegających ekspresji w mózgu.	25
Tabela 2. Spis substancji psychotropowych stosowanych w eksperymentach.	33
Tabela 3. Spis sond TaqMan wykorzystanych w doświadczeniach przeprowadzonych z użyciem metody ilościowego PCR.	40
Dodatkowa Tabela S1. Listy transkryptów (Transkrypt ID), odpowiadających im identyfikatorów genów (Gene ID) i nazw genów, które ulegały regulacji po podaniu leku w tkance.	112
Dodatkowa Tabela S2. Lista 113 transkryptów regulowanych podaniem leków psychotropowych w NAc lub PFCx.	120
Dodatkowa Tabela S3. Lista białek regulatorowych wiążący się do sekwencji DNA genów o wspólnej ekspresji.	124
Dodatkowa Tabela S4. Tabela podsumowująca ponowną analizę wyników RNA-seq dla locus Dclk1 z dodanym wariantem Dclk1-m.	127

X. Bibliografia

1. Flexner JB, Flexner LB, Stellar E, De La Haba G, Roberts RB: **Inhibition of protein synthesis in brain and learning and memory following puromycin.** *Journal of neurochemistry* 1962, **9**:595-605.
2. Goelet P, Castellucci VF, Schacher S, Kandel ER: **The long and the short of long-term memory--a molecular framework.** *Nature* 1986, **322**(6078):419-422.
3. Wittchen HU, Jacobi F, Rehm J, Gustavsson A, Svensson M, Jonsson B, Olesen J, Allgulander C, Alonso J, Faravelli C *et al*: **The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010.** *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 2011, **21**(9):655-679.
4. Simon GE, Perlis RH: **Personalized medicine for depression: can we match patients with treatments?** *The American journal of psychiatry* 2010, **167**(12):1445-1455.
5. 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, **14**:606.
6. Salvatore G, Quiroz JA, Machado-Vieira R, Henter ID, Manji HK, Zarate CA, Jr.: **The neurobiology of the switch process in bipolar disorder: a review.** *The Journal of clinical psychiatry* 2010, **71**(11):1488-1501.
7. Caraci F, Enna SJ, Zohar J, Racagni G, Zalsman G, van den Brink W, Kasper S, Koob GF, Pariante CM, Piazza PV *et al*: **A new nomenclature for classifying psychotropic drugs.** *British journal of clinical pharmacology* 2017, **83**(8):1614-1616.
8. Zohar J, Stahl S, Moller HJ, Blier P, Kupfer D, Yamawaki S, Uchida H, Spedding M, Goodwin GM, Nutt D: **A review of the current nomenclature for psychotropic agents and an introduction to the Neuroscience-based Nomenclature.** *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 2015, **25**(12):2318-2325.
9. Vidal R, Pilar-Cuellar F, dos Anjos S, Linge R, Treceno B, Vargas VI, Rodriguez-Gaztelumendi A, Mostany R, Castro E, Diaz A *et al*: **New strategies in the development of antidepressants: towards the modulation of neuroplasticity pathways.** *Current pharmaceutical design* 2011, **17**(5):521-533.
10. McClung CA, Nestler EJ: **Neuroplasticity mediated by altered gene expression.** *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 2008, **33**(1):3-17.
11. Krishnan V, Nestler EJ: **Linking molecules to mood: new insight into the biology of depression.** *The American journal of psychiatry* 2010, **167**(11):1305-1320.
12. Levine M, Tjian R: **Transcription regulation and animal diversity.** *Nature* 2003, **424**(6945):147-151.
13. Kadonaga JT: **Regulation of RNA polymerase II transcription by sequence-specific DNA binding factors.** *Cell* 2004, **116**(2):247-257.
14. Tennyson CN, Klamut HJ, Worton RG: **The human dystrophin gene requires 16 hours to be transcribed and is cotranscriptionally spliced.** *Nature genetics* 1995, **9**(2):184-190.
15. Chelly J, Kaplan JC, Maire P, Gautron S, Kahn A: **Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissue.** *Nature* 1988, **333**(6176):858-860.
16. Bessis A, Champtiaux N, Chatelin L, Changeux JP: **The neuron-restrictive silencer element: a dual enhancer/silencer crucial for patterned expression of a nicotinic receptor gene in the brain.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, **94**(11):5906-5911.
17. Yonaha M, Proudfoot NJ: **Transcriptional termination and coupled polyadenylation in vitro.** *The EMBO journal* 2000, **19**(14):3770-3777.

18. Proudfoot NJ: **Transcriptional termination in mammals: Stopping the RNA polymerase II juggernaut.** *Science* 2016, **352**(6291):aad9926.
19. Eddy SR: **Non-coding RNA genes and the modern RNA world.** *Nat Rev Genet* 2001, **2**(12):919-929.
20. Qureshi IA, Mehler MF: **Emerging roles of non-coding RNAs in brain evolution, development, plasticity and disease.** *Nat Rev Neurosci* 2012, **13**(8):528-541.
21. Mello CC, Conte D, Jr.: **Revealing the world of RNA interference.** *Nature* 2004, **431**(7006):338-342.
22. Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS: **Long non-coding RNAs: insights into functions.** *Nat Rev Genet* 2009, **10**(3):155-159.
23. Khorasanizadeh S: **The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation.** *Cell* 2004, **116**(2):259-272.
24. Strahl BD, Allis CD: **The language of covalent histone modifications.** *Nature* 2000, **403**(6765):41-45.
25. Jenuwein T, Allis CD: **Translating the histone code.** *Science* 2001, **293**(5532):1074-1080.
26. Bird A: **DNA methylation de novo.** *Science* 1999, **286**(5448):2287-2288.
27. Kumar A, Choi KH, Renthal W, Tsankova NM, Theobald DE, Truong HT, Russo SJ, Laplant Q, Sasaki TS, Whistler KN *et al*: **Chromatin remodeling is a key mechanism underlying cocaine-induced plasticity in striatum.** *Neuron* 2005, **48**(2):303-314.
28. LaPlant Q, Vialou V, Covington HE, 3rd, Dumitriu D, Feng J, Warren BL, Maze I, Dietz DM, Watts EL, Iniguez SD *et al*: **Dnmt3a regulates emotional behavior and spine plasticity in the nucleus accumbens.** *Nature neuroscience* 2010, **13**(9):1137-1143.
29. Bilang-Bleuel A, Ulbricht S, Chandramohan Y, De Carli S, Droste SK, Reul JM: **Psychological stress increases histone H3 phosphorylation in adult dentate gyrus granule neurons: involvement in a glucocorticoid receptor-dependent behavioural response.** *The European journal of neuroscience* 2005, **22**(7):1691-1700.
30. Chandramohan Y, Droste SK, Arthur JS, Reul JM: **The forced swimming-induced behavioural immobility response involves histone H3 phospho-acetylation and c-Fos induction in dentate gyrus granule neurons via activation of the N-methyl-D-aspartate/extracellular signal-regulated kinase/mitogen- and stress-activated kinase signalling pathway.** *The European journal of neuroscience* 2008, **27**(10):2701-2713.
31. Walker DM, Cates HM, Heller EA, Nestler EJ: **Regulation of chromatin states by drugs of abuse.** *Current opinion in neurobiology* 2015, **30**:112-121.
32. Swathy B, Banerjee M: **Haloperidol induces pharmacoeigenetic response by modulating miRNA expression, global DNA methylation and expression profiles of methylation maintenance genes and genes involved in neurotransmission in neuronal cells.** *PloS one* 2017, **12**(9):e0184209.
33. Tremolizzo L, Doueiri MS, Dong E, Grayson DR, Davis J, Pinna G, Tueting P, Rodriguez-Menendez V, Costa E, Guidotti A: **Valproate corrects the schizophrenia-like epigenetic behavioral modifications induced by methionine in mice.** *Biological psychiatry* 2005, **57**(5):500-509.
34. Peedicayil J: **Epigenetic management of major psychosis.** *Clinical epigenetics* 2011, **2**(2):249-256.
35. Gingeras TR: **Origin of phenotypes: genes and transcripts.** *Genome research* 2007, **17**(6):682-690.
36. Lee CJ, Irizarry K: **Alternative splicing in the nervous system: an emerging source of diversity and regulation.** *Biological psychiatry* 2003, **54**(8):771-776.
37. House AE, Lynch KW: **Regulation of alternative splicing: more than just the ABCs.** *The Journal of biological chemistry* 2008, **283**(3):1217-1221.
38. Modrek B, Lee C: **A genomic view of alternative splicing.** *Nature genetics* 2002, **30**(1):13-19.

39. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W *et al*: **Initial sequencing and analysis of the human genome**. *Nature* 2001, **409**(6822):860-921.
40. Licatalosi DD, Mele A, Fak JJ, Ule J, Kayikci M, Chi SW, Clark TA, Schweitzer AC, Blume JE, Wang X *et al*: **HITS-CLIP yields genome-wide insights into brain alternative RNA processing**. *Nature* 2008, **456**(7221):464-469.
41. Greenberg ME, Ziff EB, Greene LA: **Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription**. *Science* 1986, **234**(4772):80-83.
42. Greenberg ME, Hermanowski AL, Ziff EB: **Effect of protein synthesis inhibitors on growth factor activation of c-fos, c-myc, and actin gene transcription**. *Molecular and cellular biology* 1986, **6**(4):1050-1057.
43. Cole AJ, Saffen DW, Baraban JM, Worley PF: **Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neurons by synaptic NMDA receptor activation**. *Nature* 1989, **340**(6233):474-476.
44. Berretta S, Sachs Z, Graybiel AM: **Cortically driven Fos induction in the striatum is amplified by local dopamine D2-class receptor blockade**. *Eur J Neurosci* 1999, **11**(12):4309-4319.
45. Kida S, Josselyn SA, Pena de Ortiz S, Kogan JH, Chevere I, Masushige S, Silva AJ: **CREB required for the stability of new and reactivated fear memories**. *Nature neuroscience* 2002, **5**(4):348-355.
46. Ramamoorthi K, Fropf R, Belfort GM, Fitzmaurice HL, McKinney RM, Neve RL, Otto T, Lin Y: **Npas4 regulates a transcriptional program in CA3 required for contextual memory formation**. *Science* 2011, **334**(6063):1669-1675.
47. Bramham CR, Worley PF, Moore MJ, Guzowski JF: **The immediate early gene arc/arg3.1: regulation, mechanisms, and function**. *J Neurosci* 2008, **28**(46):11760-11767.
48. Han J-H, Kushner SA, Yiu AP, Cole CJ, Matynia A, Brown RA, Neve RL, Guzowski JF, Silva AJ, Josselyn SA: **Neuronal competition and selection during memory formation**. *Science* 2007, **316**(5823):457-460.
49. Morgan JI, Curran T: **Immediate-early genes: ten years on**. *Trends in neurosciences* 1995, **18**(2):66-67.
50. Nguyen TV, Kosofsky BE, Birnbaum R, Cohen BM, Hyman SE: **Differential expression of c-fos and zif268 in rat striatum after haloperidol, clozapine, and amphetamine**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992, **89**(10):4270-4274.
51. Hope B, Kosofsky B, Hyman SE, Nestler EJ: **Regulation of immediate early gene expression and AP-1 binding in the rat nucleus accumbens by chronic cocaine**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992, **89**(13):5764-5768.
52. Young ST, Porrino LJ, Iadarola MJ: **Cocaine induces striatal c-fos-immunoreactive proteins via dopaminergic D1 receptors**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991, **88**(4):1291-1295.
53. Werme M, Ringholm A, Olson L, Brené S: **Differential patterns of induction of NGFI-B, Nor1 and c-fos mRNAs in striatal subregions by haloperidol and clozapine**. *Brain Res* 2000, **863**(1-2):112-119.
54. Sumner BEH, Cruise LA, Slattery DA, Hill DR, Shahid M, Henry B: **Testing the validity of c-fos expression profiling to aid the therapeutic classification of psychoactive drugs**. *Psychopharmacology* 2004, **171**(3):306-321.
55. Bertran-Gonzalez J, Bosch C, Maroteaux M, Matamalas M, Herve D, Valjent E, Girault JA: **Opposing patterns of signaling activation in dopamine D1 and D2 receptor-expressing striatal neurons in response to cocaine and haloperidol**. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2008, **28**(22):5671-5685.
56. Yager LM, Garcia AF, Wunsch AM, Ferguson SM: **The ins and outs of the striatum: role in drug addiction**. *Neuroscience* 2015, **301**:529-541.
57. Wiltschko AB, Pettibone JR, Berke JD: **Opposite effects of stimulant and antipsychotic drugs on striatal fast-spiking interneurons**. *Neuropsychopharmacology* 2010, **35**(6):1261-1270.

58. Gerfen CR, Surmeier DJ: **Modulation of striatal projection systems by dopamine.** *Annual review of neuroscience* 2011, **34**:441-466.
59. Slezak M, Korostynski M, Gieryk A, Golda S, Dzbek J, Piechota M, Wlazlo E, Bilecki W, Przewlocki R: **Astrocytes are a neural target of morphine action via glucocorticoid receptor-dependent signaling.** *Glia* 2013, **61**(4):623-635.
60. 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, **99**:328-336.
61. Sanacora G, Banasr M: **From pathophysiology to novel antidepressant drugs: glial contributions to the pathology and treatment of mood disorders.** *Biological psychiatry* 2013, **73**(12):1172-1179.
62. Jenkins SI, Pickard MR, Khong M, Smith HL, Mann CL, Emes RD, Chari DM: **Identifying the cellular targets of drug action in the central nervous system following corticosteroid therapy.** *ACS chemical neuroscience* 2014, **5**(1):51-63.
63. Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O'Keeffe S, Phatnani HP, Guarnieri P, Caneda C, Ruderisch N *et al*: **An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex.** *J Neurosci* 2014, **34**(36):11929-11947.
64. Gokce O, Stanley GM, Treutlein B, Neff NF, Camp JG, Malenka RC, Rothwell PE, Fuccillo MV, Sudhof TC, Quake SR: **Cellular Taxonomy of the Mouse Striatum as Revealed by Single-Cell RNA-Seq.** *Cell reports* 2016, **16**(4):1126-1137.
65. Poulin JF, Tasic B, Hjerling-Leffler J, Trimarchi JM, Awatramani R: **Disentangling neural cell diversity using single-cell transcriptomics.** *Nature neuroscience* 2016, **19**(9):1131-1141.
66. Tasic B, Menon V, Nguyen TN, Kim TK, Jarsky T, Yao Z, Levi B, Gray LT, Sorensen SA, Dolbeare T *et al*: **Adult mouse cortical cell taxonomy revealed by single cell transcriptomics.** *Nat Neurosci* 2016, **19**(2):335-346.
67. Perrotti LI, Weaver RR, Robison B, Renthal W, Maze I, Yazdani S, Elmore RG, Knapp DJ, Selley DE, Martin BR *et al*: **Distinct patterns of DeltaFosB induction in brain by drugs of abuse.** *Synapse* 2008, **62**(5):358-369.
68. Vialou V, Thibault M, Kaska S, Cooper S, Gajewski P, Eagle A, Mazei-Robison M, Nestler EJ, Robison AJ: **Differential induction of FosB isoforms throughout the brain by fluoxetine and chronic stress.** *Neuropharmacology* 2015, **99**:28-37.
69. Vialou V, Robison AJ, Laplant QC, Covington HE, 3rd, Dietz DM, Ohnishi YN, Mouzon E, Rush AJ, 3rd, Watts EL, Wallace DL *et al*: **DeltaFosB in brain reward circuits mediates resilience to stress and antidepressant responses.** *Nature neuroscience* 2010, **13**(6):745-752.
70. Nestler EJ: **Review. Transcriptional mechanisms of addiction: role of DeltaFosB.** *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 2008, **363**(1507):3245-3255.
71. McClung CA, Ulerly PG, Perrotti LI, Zachariou V, Berton O, Nestler EJ: **DeltaFosB: a molecular switch for long-term adaptation in the brain.** *Brain research Molecular brain research* 2004, **132**(2):146-154.
72. Tu JC, Xiao B, Yuan JP, Lanahan AA, Leoffert K, Li M, Linden DJ, Worley PF: **Homer binds a novel proline-rich motif and links group 1 metabotropic glutamate receptors with IP3 receptors.** *Neuron* 1998, **21**(4):717-726.
73. Bottai D, Guzowski JF, Schwarz MK, Kang SH, Xiao B, Lanahan A, Worley PF, Seeburg PH: **Synaptic activity-induced conversion of intronic to exonic sequence in Homer 1 immediate early gene expression.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2002, **22**(1):167-175.
74. Kammermeier PJ: **Endogenous homer proteins regulate metabotropic glutamate receptor signaling in neurons.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2008, **28**(34):8560-8567.

75. Sala C, Futai K, Yamamoto K, Worley PF, Hayashi Y, Sheng M: **Inhibition of dendritic spine morphogenesis and synaptic transmission by activity-inducible protein Homer1a.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2003, **23**(15):6327-6337.
76. Berke JD, Paletzki RF, Aronson GJ, Hyman SE, Gerfen CR: **A complex program of striatal gene expression induced by dopaminergic stimulation.** *J Neurosci* 1998, **18**(14):5301-5310.
77. Polese D, de Serpis AA, Ambesi-Impiombato A, Muscettola G, de Bartolomeis A: **Homer 1a gene expression modulation by antipsychotic drugs: involvement of the glutamate metabotropic system and effects of D-cycloserine.** *Neuropsychopharmacology* 2002, **27**(6):906-913.
78. Serchov T, Clement H-W, Schwarz MK, Iasevoli F, Tosh DK, Idzko M, Jacobson KA, de Bartolomeis A, Normann C, Biber K *et al*: **Increased Signaling via Adenosine A1 Receptors, Sleep Deprivation, Imipramine, and Ketamine Inhibit Depressive-like Behavior via Induction of Homer1a.** *Neuron* 2015, **87**(3):549-562.
79. Ghasemzadeh MB, Windham LK, Lake RW, Acker CJ, Kalivas PW: **Cocaine activates Homer1 immediate early gene transcription in the mesocorticolimbic circuit: differential regulation by dopamine and glutamate signaling.** *Synapse* 2009, **63**(1):42-53.
80. Molina CA, Foulkes NS, Lalli E, Sassone-Corsi P: **Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor.** *Cell* 1993, **75**(5):875-886.
81. Borlikova G, Endo S: **Inducible cAMP early repressor (ICER) and brain functions.** *Mol Neurobiol* 2009, **40**(1):73-86.
82. Binder DK, Scharfman HE: **Brain-derived neurotrophic factor.** *Growth factors* 2004, **22**(3):123-131.
83. Zuccato C, Cattaneo E: **Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease.** *Progress in neurobiology* 2007, **81**(5-6):294-330.
84. Pruunsild P, Kazantseva A, Aid T, Palm K, Timmusk T: **Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters.** *Genomics* 2007, **90**(3):397-406.
85. Schmidt HD, Duman RS: **The role of neurotrophic factors in adult hippocampal neurogenesis, antidepressant treatments and animal models of depressive-like behavior.** *Behavioural pharmacology* 2007, **18**(5-6):391-418.
86. Arteaga MF, Alvarez de la Rosa D, Alvarez JA, Canessa CM: **Multiple translational isoforms give functional specificity to serum- and glucocorticoid-induced kinase 1.** *Mol Biol Cell* 2007, **18**(6):2072-2080.
87. David S: **Expression of Serum- and Glucocorticoid-Inducible Kinase Is Regulated in an Experience-Dependent Manner and Can Cause Dendrite Growth.** *Journal of Neuroscience* 2005, **25**(30):7048-7053.
88. Yuen EY, Liu W, Karatsoreos IN, Ren Y, Feng J, McEwen BS, Yan Z: **Mechanisms for acute stress-induced enhancement of glutamatergic transmission and working memory.** *Mol Psychiatry* 2011, **16**(2):156-170.
89. Miyata S, Koyama Y, Takemoto K, Yoshikawa K, Ishikawa T, Taniguchi M, Inoue K, Aoki M, Hori O, Katayama T *et al*: **Plasma corticosterone activates SGK1 and induces morphological changes in oligodendrocytes in corpus callosum.** *PloS one* 2011, **6**(5):e19859.
90. Boehmer C, Palmada M, Rajamanickam J, Schniepp R, Amara S, Lang F: **Post-translational regulation of EAAT2 function by co-expressed ubiquitin ligase Nedd4-2 is impacted by SGK kinases.** *J Neurochem* 2006, **97**(4):911-921.
91. Anacker C, Cattaneo A, Musaelyan K, Zunszain PA, Horowitz M, Molteni R, Luoni A, Calabrese F, Tansey K, Gennarelli M *et al*: **Role for the kinase SGK1 in stress, depression, and glucocorticoid effects on hippocampal neurogenesis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, **110**(21):8708-8713.

92. von Herten LSJ, Giese KP: **Memory reconsolidation engages only a subset of immediate-early genes induced during consolidation.** *J Neurosci* 2005, **25**(8):1935-1942.
93. Conti B, Maier R, Barr AM, Morale MC, Lu X, Sanna PP, Bilbe G, Hoyer D, Bartfai T: **Region-specific transcriptional changes following the three antidepressant treatments electroconvulsive therapy, sleep deprivation and fluoxetine.** *Mol Psychiatry* 2007, **12**(2):167-189.
94. Piechota M, Korostynski M, Solecki W, Gieryk A, Slezak M, Bilecki W, Ziolkowska B, Kostrzewa E, Cymerman I, Swiech L *et al*: **The dissection of transcriptional modules regulated by various drugs of abuse in the mouse striatum.** *Genome Biol* 2010, **11**(5):R48.
95. Tatro ET, Everall IP, Kaul M, Achim CL: **Modulation of glucocorticoid receptor nuclear translocation in neurons by immunophilins FKBP51 and FKBP52: implications for major depressive disorder.** *Brain research* 2009, **1286**:1-12.
96. Yachi K, Inoue K, Tanaka H, Yoshikawa H, Tohyama M: **Localization of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) expressing neurons in the central nervous system and its relationship to the stress response.** *Brain research* 2007, **1159**:141-147.
97. Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith MC, Maeda N, Oyama R, Ravasi T, Lenhard B, Wells C *et al*: **The transcriptional landscape of the mammalian genome.** *Science* 2005, **309**(5740):1559-1563.
98. You X, Vlatkovic I, Babic A, Will T, Epstein I, Tushev G, Akbalik G, Wang M, Glock C, Quedenau C *et al*: **Neural circular RNAs are derived from synaptic genes and regulated by development and plasticity.** *Nature neuroscience* 2015, **18**(4):603-610.
99. Savell KE, Gallus NV, Simon RC, Brown JA, Revanna JS, Osborn MK, Song EY, O'Malley JJ, Stackhouse CT, Norvil A *et al*: **Extra-coding RNAs regulate neuronal DNA methylation dynamics.** *Nature communications* 2016, **7**:12091.
100. Antoniou D, Stergiopoulos A, Politis PK: **Recent advances in the involvement of long non-coding RNAs in neural stem cell biology and brain pathophysiology.** *Front Physiol* 2014, **5**:155.
101. Bian S, Sun T: **Functions of noncoding RNAs in neural development and neurological diseases.** *Molecular neurobiology* 2011, **44**(3):359-373.
102. Im H-I, Kenny PJ: **MicroRNAs in neuronal function and dysfunction.** *Trends Neurosci* 2012, **35**(5):325-334.
103. Rodrigues AC, Li X, Radecki L, Pan YZ, Winter JC, Huang M, Yu AM: **MicroRNA expression is differentially altered by xenobiotic drugs in different human cell lines.** *Biopharmaceutics & drug disposition* 2011, **32**(6):355-367.
104. Hollander JA, Im HI, Amelio AL, Kocerha J, Bali P, Lu Q, Willoughby D, Wahlestedt C, Conkright MD, Kenny PJ: **Striatal microRNA controls cocaine intake through CREB signalling.** *Nature* 2010, **466**(7303):197-202.
105. Eipper-Mains JE, Kiraly DD, Palakodeti D, Mains RE, Eipper BA, Graveley BR: **microRNA-Seq reveals cocaine-regulated expression of striatal microRNAs.** *RNA* 2011, **17**(8):1529-1543.
106. Sim MS, Soga T, Pandey V, Wu YS, Parhar IS, Mohamed Z: **MicroRNA expression signature of methamphetamine use and addiction in the rat nucleus accumbens.** *Metab Brain Dis* 2017.
107. Sinirlioglu ZA, Coskunpinar E, Akbas F: **miRNA and mRNA expression profiling in rat brain following alcohol dependence and withdrawal.** *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2017, **63**(2):49-56.
108. Nunez YO, Mayfield RD: **Understanding Alcoholism Through microRNA Signatures in Brains of Human Alcoholics.** *Frontiers in genetics* 2012, **3**:43.
109. Sanchez-Simon FM, Zhang XX, Loh HH, Law PY, Rodriguez RE: **Morphine regulates dopaminergic neuron differentiation via miR-133b.** *Mol Pharmacol* 2010, **78**(5):935-942.
110. Baudry A, Mouillet-Richard S, Schneider B, Launay JM, Kellermann O: **miR-16 targets the serotonin transporter: a new facet for adaptive responses to antidepressants.** *Science* 2010, **329**(5998):1537-1541.

111. Issler O, Haramati S, Paul ED, Maeno H, Navon I, Zwang R, Gil S, Mayberg HS, Dunlop BW, Menke A *et al*: **MicroRNA 135 is essential for chronic stress resiliency, antidepressant efficacy, and intact serotonergic activity.** *Neuron* 2014, **83**(2):344-360.
112. Kishore S, Stamm S: **The snoRNA HBII-52 regulates alternative splicing of the serotonin receptor 2C.** *Science* 2006, **311**(5758):230-232.
113. Zhu L, Zhu J, Liu Y, Chen Y, Li Y, Huang L, Chen S, Li T, Dang Y, Chen T: **Methamphetamine induces alterations in the long non-coding RNAs expression profile in the nucleus accumbens of the mouse.** *BMC Neurosci* 2015, **16**:18.
114. Rietschel M, Mattheisen M, Frank J, Treutlein J, Degenhardt F, Breuer R, Steffens M, Mier D, Esslinger C, Walter H *et al*: **Genome-wide association-, replication-, and neuroimaging study implicates HOMER1 in the etiology of major depression.** *Biological psychiatry* 2010, **68**(6):578-585.
115. Dick DM, Edenberg HJ, Xuei X, Goate A, Kuperman S, Schuckit M, Crowe R, Smith TL, Porjesz B, Begleiter H *et al*: **Association of GABRG3 with alcohol dependence.** *Alcoholism, clinical and experimental research* 2004, **28**(1):4-9.
116. Binder EB, Salyakina D, Lichtner P, Wochnik GM, Ising M, Putz B, Papiol S, Seaman S, Lucae S, Kohli MA *et al*: **Polymorphisms in FKBP5 are associated with increased recurrence of depressive episodes and rapid response to antidepressant treatment.** *Nature genetics* 2004, **36**(12):1319-1325.
117. Davis MM, Olausson P, Greengard P, Taylor JR, Nairn AC: **Regulator of calmodulin signaling knockout mice display anxiety-like behavior and motivational deficits.** *The European journal of neuroscience* 2012, **35**(2):300-308.
118. Marangi G, Orteschi D, Milano V, Mancano G, Zollino M: **Interstitial deletion of 3p22.3p22.2 encompassing ARPP21 and CLASP2 is a potential pathogenic factor for a syndromic form of intellectual disability: a co-morbidity model with additional copy number variations in a large family.** *American journal of medical genetics Part A* 2013, **161A**(11):2890-2893.
119. Hansen KF, Sakamoto K, Aten S, Snider KH, Loeser J, Hesse AM, Page CE, Pelz C, Arthur JS, Impey S *et al*: **Targeted deletion of miR-132/-212 impairs memory and alters the hippocampal transcriptome.** *Learning & memory* 2016, **23**(2):61-71.
120. Remenyi J, Hunter CJ, Cole C, Ando H, Impey S, Monk CE, Martin KJ, Barton GJ, Hutvagner G, Arthur JS: **Regulation of the miR-212/132 locus by MSK1 and CREB in response to neurotrophins.** *The Biochemical journal* 2010, **428**(2):281-291.
121. Nakatani J, Tamada K, Hatanaka F, Ise S, Ohta H, Inoue K, Tomonaga S, Watanabe Y, Chung YJ, Banerjee R *et al*: **Abnormal behavior in a chromosome-engineered mouse model for human 15q11-13 duplication seen in autism.** *Cell* 2009, **137**(7):1235-1246.
122. Barry G, Briggs JA, Vanichkina DP, Poth EM, Beveridge NJ, Ratnu VS, Nayler SP, Nones K, Hu J, Bredy TW *et al*: **The long non-coding RNA Gomafu is acutely regulated in response to neuronal activation and involved in schizophrenia-associated alternative splicing.** *Molecular psychiatry* 2014, **19**(4):486-494.
123. Berke JD, Paletzki RF, Aronson GJ, Hyman SE, Gerfen CR: **A complex program of striatal gene expression induced by dopaminergic stimulation.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1998, **18**(14):5301-5310.
124. Parikhshak NN, Gandal MJ, Geschwind DH: **Systems biology and gene networks in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders.** *Nat Rev Genet* 2015, **16**(8):441-458.
125. Gaiteri C, Ding Y, French B, Tseng GC, Sibille E: **Beyond modules and hubs: the potential of gene coexpression networks for investigating molecular mechanisms of complex brain disorders.** *Genes Brain Behav* 2014, **13**(1):13-24.
126. Feng J, Wilkinson M, Liu X, Purushothaman I, Ferguson D, Vialou V, Maze I, Shao N, Kennedy P, Koo J *et al*: **Chronic cocaine-regulated epigenomic changes in mouse nucleus accumbens.** *Genome Biol* 2014, **15**(4):R65.
127. Korostynski M, Piechota M, Kaminska D, Solecki W, Przewlocki R: **Morphine effects on striatal transcriptome in mice.** *Genome Biol* 2007, **8**(6):R128.

128. Krasnova IN, Li SM, Wood WH, McCoy MT, Prabhu VV, Becker KG, Katz JL, Cadet JL: **Transcriptional responses to reinforcing effects of cocaine in the rat hippocampus and cortex.** *Genes Brain Behav* 2008, **7**(2):193-202.
129. Lee J-H, Ko E, Kim Y-E, Min J-Y, Liu J, Kim Y, Shin M, Hong M, Bae H: **Gene expression profile analysis of genes in rat hippocampus from antidepressant treated rats using DNA microarray.** *BMC Neurosci* 2010, **11**:152.
130. Patrício P, Mateus-Pinheiro A, Irmeler M, Alves ND, Machado-Santos AR, Morais M, Correia JS, Korostynski M, Piechota M, Stoffel R *et al*: **Differential and converging molecular mechanisms of antidepressants' action in the hippocampal dentate gyrus.** *Neuropsychopharmacology* 2015, **40**(2):338-349.
131. Le-Niculescu H, Balaraman Y, Patel S, Tan J, Sidhu K, Jerome RE, Edenberg HJ, Kuczenski R, Geyer MA, Nurnberger JI, Jr. *et al*: **Towards understanding the schizophrenia code: an expanded convergent functional genomics approach.** *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 2007, **144B**(2):129-158.
132. Rizig MA, McQuillin A, Ng A, Robinson M, Harrison A, Zvelebil M, Hunt SP, Gurling HM: **A gene expression and systems pathway analysis of the effects of clozapine compared to haloperidol in the mouse brain implicates susceptibility genes for schizophrenia.** *Journal of psychopharmacology* 2012, **26**(9):1218-1230.
133. Duncan CE, Chetcuti AF, Schofield PR: **Coregulation of genes in the mouse brain following treatment with clozapine, haloperidol, or olanzapine implicates altered potassium channel subunit expression in the mechanism of antipsychotic drug action.** *Psychiatric genetics* 2008, **18**(5):226-239.
134. Dela Pena IJ, Dela Pena I, de la Pena JB, Kim HJ, Sohn A, Shin CY, Han DH, Kim BN, Ryu JH, Cheong JH: **Transcriptional profiling of SHR/NCr1 prefrontal cortex shows hyperactivity-associated genes responsive to amphetamine challenge.** *Genes Brain Behav* 2017, **16**(7):664-674.
135. Piechota M, Korostynski M, Sikora M, Golda S, Dzbek J, Przewlocki R: **Common transcriptional effects in the mouse striatum following chronic treatment with heroin and methamphetamine.** *Genes Brain Behav* 2012, **11**(4):404-414.
136. Moriya S, Tahara Y, Sasaki H, Hamaguchi Y, Kuriki D, Ishikawa R, Ishigooka J, Shibata S: **Effect of quetiapine on Per1, Per2, and Bmal1 clock gene expression in the mouse amygdala and hippocampus.** *J Pharmacol Sci* 2014, **125**(3):329-332.
137. Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, Foo LC, Zamanian JL, Christopherson KS, Xing Y, Lubischer JL, Krieg PA, Krupenko SA *et al*: **A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2008, **28**(1):264-278.
138. Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O'Keefe S, Phatnani HP, Guarnieri P, Caneda C, Ruderisch N *et al*: **An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2014, **34**(36):11929-11947.
139. Piechota M, Korostynski M, Ficek J, Tomski A, Przewlocki R: **Seqinspector: position-based navigation through the ChIP-seq data landscape to identify gene expression regulators.** *BMC bioinformatics* 2016, **17**:85.
140. Piechota M, Korostynski M, Przewlocki R: **Identification of cis-regulatory elements in the mammalian genome: the cREMaG database.** *PloS one* 2010, **5**(8):e12465.
141. Cadet JL, Bisagno V: **Glial-neuronal ensembles: partners in drug addiction-associated synaptic plasticity.** *Front Pharmacol* 2014, **5**:204.
142. Zygmunt M, Hoinkis D, Hajto J, Piechota M, Skupien-Rabian B, Jankowska U, Kedracka-Krok S, Rodriguez Parkitna J, Korostynski M: **Expression of alternatively spliced variants of the Dclk1 gene is regulated by psychotropic drugs.** *BMC neuroscience* 2018, **19**(1):55.

143. 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, **17**:362.
144. Robbins MJ, Critchlow HM, Lloyd A, Cilia J, Clarke JD, Bond B, Jones D, Maycox PR: **Differential expression of IEG mRNA in rat brain following acute treatment with clozapine or haloperidol: a semi-quantitative RT—PCR study.** *J Psychopharmacol* 2008, **22**(5):536-542.
145. Sakuma K, Komatsu H, Maruyama M, Imaichi S, Habata Y, Mori M: **Temporal and spatial transcriptional fingerprints by antipsychotic or propsychotic drugs in mouse brain.** *PLoS one* 2015, **10**(2):e0118510.
146. González-Maeso J, Weisstaub NV, Zhou M, Chan P, Ivic L, Ang R, Lira A, Bradley-Moore M, Ge Y, Zhou Q *et al*: **Hallucinogens recruit specific cortical 5-HT(2A) receptor-mediated signaling pathways to affect behavior.** *Neuron* 2007, **53**(3):439-452.
147. González-Maeso J, Yuen T, Ebersole BJ, Wurmbach E, Lira A, Zhou M, Weisstaub N, Hen R, Gingrich JA, Sealfon SC: **Transcriptome fingerprints distinguish hallucinogenic and nonhallucinogenic 5-hydroxytryptamine 2A receptor agonist effects in mouse somatosensory cortex.** *J Neurosci* 2003, **23**(26):8836-8843.
148. Chen B, Butte AJ: **Leveraging big data to transform target selection and drug discovery.** *Clin Pharmacol Ther* 2016, **99**(3):285-297.
149. Kafkafi N, Yekutieli D, Elmer GI: **A data mining approach to in vivo classification of psychopharmacological drugs.** *Neuropsychopharmacology* 2009, **34**(3):607-623.
150. Ikeda M, Tomita Y, Mouri A, Koga M, Okochi T, Yoshimura R, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Hashimoto R, Williams HJ *et al*: **Identification of novel candidate genes for treatment response to risperidone and susceptibility for schizophrenia: integrated analysis among pharmacogenomics, mouse expression, and genetic case-control association approaches.** *Biol Psychiatry* 2010, **67**(3):263-269.
151. Wu H, Huang J, Zhong Y, Huang Q: **DrugSig: A resource for computational drug repositioning utilizing gene expression signatures.** *PLoS one* 2017, **12**(5):e0177743.
152. Hitzemann R, Edmunds S, Wu W, Malmanger B, Walter N, Belknap J, Darakjian P, McWeeney S: **Detection of reciprocal quantitative trait loci for acute ethanol withdrawal and ethanol consumption in heterogeneous stock mice.** *Psychopharmacology* 2009, **203**(4):713-722.
153. Parker CC, Gopalakrishnan S, Carbonetto P, Gonzales NM, Leung E, Park YJ, Aryee E, Davis J, Blizard DA, Ackert-Bicknell CL *et al*: **Genome-wide association study of behavioral, physiological and gene expression traits in outbred CFW mice.** *Nat Genet* 2016, **48**(8):919-926.
154. Carboni L, Domenici E: **Proteome effects of antipsychotic drugs: Learning from preclinical models.** *Proteomics Clinical applications* 2016, **10**(4):430-441.
155. Sethi S, Brietzke E: **Omics-Based Biomarkers: Application of Metabolomics in Neuropsychiatric Disorders.** *The international journal of neuropsychopharmacology* 2015, **19**(3):pyv096.
156. Lee KJ, Yin W, Arafat D, Tang Y, Uppal K, Tran V, Cabrera-Mora M, Lapp S, Moreno A, Meyer E *et al*: **Comparative transcriptomics and metabolomics in a rhesus macaque drug administration study.** *Frontiers in cell and developmental biology* 2014, **2**:54.
157. Webhofer C, Gormanns P, Reckow S, Lebar M, Maccarrone G, Ludwig T, Putz B, Asara JM, Holsboer F, Sillaber I *et al*: **Proteomic and metabolomic profiling reveals time-dependent changes in hippocampal metabolism upon paroxetine treatment and biomarker candidates.** *Journal of psychiatric research* 2013, **47**(3):289-298.
158. Altamura AC, De Novellis F, Mauri MC, Gomeni R: **Plasma and brain pharmacokinetics of mianserin after single and multiple dosing in mice.** *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 1987, **11**(1):23-33.
159. Zetler G, Baumann GH: **Pharmacokinetics and effects of haloperidol in the isolated mouse.** *Pharmacology* 1985, **31**(6):318-327.

160. Higashino K, Ago Y, Umehara M, Kita Y, Fujita K, Takuma K, Matsuda T: **Effects of acute and chronic administration of venlafaxine and desipramine on extracellular monoamine levels in the mouse prefrontal cortex and striatum.** *European journal of pharmacology* 2014, **729**:86-93.
161. Riviere GJ, Gentry WB, Owens SM: **Disposition of methamphetamine and its metabolite amphetamine in brain and other tissues in rats after intravenous administration.** *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2000, **292**(3):1042-1047.
162. Kulkarni SK, Dhir A: **Effect of various classes of antidepressants in behavioral paradigms of despair.** *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 2007, **31**(6):1248-1254.
163. Wang G, Fowler SC: **Effects of haloperidol and clozapine on tongue dynamics during licking in CD-1, BALB/c and C57BL/6 mice.** *Psychopharmacology* 1999, **147**(1):38-45.
164. Ouagazzal AM, Jenck F, Moreau JL: **Drug-induced potentiation of prepulse inhibition of acoustic startle reflex in mice: a model for detecting antipsychotic activity?** *Psychopharmacology* 2001, **156**(2-3):273-283.
165. Weiner I, Schiller D, Gaisler-Salomon I, Green A, Joel D: **A comparison of drug effects in latent inhibition and the forced swim test differentiates between the typical antipsychotic haloperidol, the atypical antipsychotics clozapine and olanzapine, and the antidepressants imipramine and paroxetine.** *Behavioural pharmacology* 2003, **14**(3):215-222.
166. Olivier B, Leahy C, Mullen T, Paylor R, Groppi VE, Sarnyai Z, Brunner D: **The DBA/2J strain and prepulse inhibition of startle: a model system to test antipsychotics?** *Psychopharmacology* 2001, **156**(2-3):284-290.
167. Einat H, Manji HK: **Cellular plasticity cascades: genes-to-behavior pathways in animal models of bipolar disorder.** *Biological psychiatry* 2006, **59**(12):1160-1171.
168. Mitchell HA, Ahern TH, Liles LC, Javors MA, Weinschenker D: **The effects of norepinephrine transporter inactivation on locomotor activity in mice.** *Biological psychiatry* 2006, **60**(10):1046-1052.
169. Stromberg C: **Interactions of antidepressants and ethanol on spontaneous locomotor activity and rotarod performance in NMRI and C57BL/6 mice.** *Journal of psychopharmacology* 1988, **2**(2):61-66.
170. Gideons ES, Kavalali ET, Monteggia LM: **Mechanisms underlying differential effectiveness of memantine and ketamine in rapid antidepressant responses.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2014, **111**(23):8649-8654.
171. Irifune M, Shimizu T, Nomoto M: **Ketamine-induced hyperlocomotion associated with alteration of presynaptic components of dopamine neurons in the nucleus accumbens of mice.** *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 1991, **40**(2):399-407.
172. Paxinos G, Franklin, K. B. J.: **Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Fourth Edition.** *Academic Press* 2012:p. 360.
173. Piechota M, Korostynski M, Ficek J, Tomski A, Przewlocki R: **Seqinspector: position-based navigation through the ChIP-seq data landscape to identify gene expression regulators.** *BMC Bioinformatics* 2016, **17**(1):85.
174. Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL: **TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq.** *Bioinformatics* 2009, **25**(9):1105-1111.
175. Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR, Pimentel H, Salzberg SL, Rinn JL, Pachter L: **Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks.** *Nature protocols* 2012, **7**(3):562-578.
176. Benjamini YH, Yosef.: **Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing.** *Journal of the Royal Statistical Society, Series B* 1995, **57**(1):289-300.
177. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA: **Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources.** *Nature protocols* 2009, **4**(1):44-57.

178. Tasic B, Menon V, Nguyen TN, Kim TK, Jarsky T, Yao Z, Levi B, Gray LT, Sorensen SA, Dolbeare T *et al*: **Adult mouse cortical cell taxonomy revealed by single cell transcriptomics**. *Nature neuroscience* 2016, **19**(2):335-346.
179. Burgess HA, Reiner O: **Alternative splice variants of doublecortin-like kinase are differentially expressed and have different kinase activities**. *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**(20):17696-17705.
180. Schenk GJ, Engels B, Zhang YP, Fitzsimons CP, Schouten T, Kruidering M, de Kloet ER, Vreugdenhil E: **A potential role for calcium / calmodulin-dependent protein kinase-related peptide in neuronal apoptosis: in vivo and in vitro evidence**. *The European journal of neuroscience* 2007, **26**(12):3411-3420.
181. Nadler JJ, Zou F, Huang H, Moy SS, Lauder J, Crawley JN, Threadgill DW, Wright FA, Magnuson TR: **Large-scale gene expression differences across brain regions and inbred strains correlate with a behavioral phenotype**. *Genetics* 2006, **174**(3):1229-1236.
182. Conti B, Maier R, Barr AM, Morale MC, Lu X, Sanna PP, Bilbe G, Hoyer D, Bartfai T: **Region-specific transcriptional changes following the three antidepressant treatments electroconvulsive therapy, sleep deprivation and fluoxetine**. *Molecular psychiatry* 2007, **12**(2):167-189.
183. Silveira DC, Sogawa Y, Holmes GL: **The expression of Fos following kainic acid-induced seizures is age-dependent**. *The European journal of neuroscience* 2002, **15**(2):329-344.
184. Bisagno V, Cadet JL: **Expression of immediate early genes in brain reward circuitries: Differential regulation by psychostimulant and opioid drugs**. *Neurochemistry international* 2019, **124**:10-18.
185. Ujike H, Takaki M, Kodama M, Kuroda S: **Gene expression related to synaptogenesis, neuritogenesis, and MAP kinase in behavioral sensitization to psychostimulants**. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2002, **965**:55-67.
186. Kim YB, Jang J, Chung Y, Baeg EH, Kim HT, Mook-Jung I, Kim SU, Jung MW, Chung YK: **Haloperidol and clozapine increase neural activity in the rat prefrontal cortex**. *Neuroscience letters* 2001, **298**(3):217-221.
187. Hernandez L, Hoebel BG: **Haloperidol given chronically decreases basal dopamine in the prefrontal cortex more than the striatum or nucleus accumbens as simultaneously measured by microdialysis**. *Brain research bulletin* 1989, **22**(4):763-769.
188. Fumagalli F, Frasca A, Racagni G, Riva MA: **Antipsychotic drugs modulate Arc expression in the rat brain**. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 2009, **19**(2):109-115.
189. Iasevoli F, Fiore G, Cicale M, Muscettola G, de Bartolomeis A: **Haloperidol induces higher Homer1a expression than risperidone, olanzapine and sulpiride in striatal sub-regions**. *Psychiatry research* 2010, **177**(1-2):255-260.
190. Shiloh R, Zemishlany Z, Aizenberg D, Valevski A, Bodinger L, Munitz H, Weizman A: **Mianserin or placebo as adjuncts to typical antipsychotics in resistant schizophrenia**. *International clinical psychopharmacology* 2002, **17**(2):59-64.
191. Tanda G, Bassareo V, Di Chiara G: **Mianserin markedly and selectively increases extracellular dopamine in the prefrontal cortex as compared to the nucleus accumbens of the rat**. *Psychopharmacology* 1996, **123**(2):127-130.
192. Newman-Tancredi A: **The importance of 5-HT1A receptor agonism in antipsychotic drug action: rationale and perspectives**. *Current opinion in investigational drugs* 2010, **11**(7):802-812.
193. Kaufman J, DeLorenzo C, Choudhury S, Parsey RV: **The 5-HT1A receptor in Major Depressive Disorder**. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 2016, **26**(3):397-410.
194. Duman RS: **Ketamine and rapid-acting antidepressants: a new era in the battle against depression and suicide**. *F1000Research* 2018, **7**.

195. Mion G, Villevieille T: **Ketamine pharmacology: an update (pharmacodynamics and molecular aspects, recent findings)**. *CNS neuroscience & therapeutics* 2013, **19**(6):370-380.
196. Kapur S, Seeman P: **NMDA receptor antagonists ketamine and PCP have direct effects on the dopamine D(2) and serotonin 5-HT(2) receptors-implications for models of schizophrenia**. *Molecular psychiatry* 2002, **7**(8):837-844.
197. Salat K, Siwek A, Starowicz G, Librowski T, Nowak G, Drabik U, Gajdosz R, Popik P: **Antidepressant-like effects of ketamine, norketamine and dehydronorketamine in forced swim test: Role of activity at NMDA receptor**. *Neuropharmacology* 2015, **99**:301-307.
198. Li N, Lee B, Liu RJ, Banasr M, Dwyer JM, Iwata M, Li XY, Aghajanian G, Duman RS: **mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists**. *Science* 2010, **329**(5994):959-964.
199. Shi Q, Guo L, Patterson TA, Dial S, Li Q, Sadovova N, Zhang X, Hanig JP, Paule MG, Slikker W, Jr. et al: **Gene expression profiling in the developing rat brain exposed to ketamine**. *Neuroscience* 2010, **166**(3):852-863.
200. Liu F, Paule MG, Ali S, Wang C: **Ketamine-induced neurotoxicity and changes in gene expression in the developing rat brain**. *Current neuropharmacology* 2011, **9**(1):256-261.
201. Cipriani A, Furukawa TA, Salanti G, Chaimani A, Atkinson LZ, Ogawa Y, Leucht S, Ruhe HG, Turner EH, Higgins JPT et al: **Comparative efficacy and acceptability of 21 antidepressant drugs for the acute treatment of adults with major depressive disorder: a systematic review and network meta-analysis**. *Lancet* 2018, **391**(10128):1357-1366.
202. Weikop P, Kehr J, Scheel-Kruger J: **The role of alpha1- and alpha2-adrenoreceptors on venlafaxine-induced elevation of extracellular serotonin, noradrenaline and dopamine levels in the rat prefrontal cortex and hippocampus**. *Journal of psychopharmacology* 2004, **18**(3):395-403.
203. Ide S, Fujiwara S, Fujiwara M, Sora I, Ikeda K, Minami M, Uhl GR, Ishihara K: **Antidepressant-like effect of venlafaxine is abolished in mu-opioid receptor-knockout mice**. *Journal of pharmacological sciences* 2010, **114**(1):107-110.
204. Kalman J, Palotas A, Juhasz A, Rimanoczy A, Hugyecz M, Kovacs Z, Galsi G, Szabo Z, Pakaski M, Feher LZ et al: **Impact of venlafaxine on gene expression profile in lymphocytes of the elderly with major depression--evolution of antidepressants and the role of the "neuro-immune" system**. *Neurochemical research* 2005, **30**(11):1429-1438.
205. Pei Q, Zetterstrom TS, Sprakes M, Tordera R, Sharp T: **Antidepressant drug treatment induces Arc gene expression in the rat brain**. *Neuroscience* 2003, **121**(4):975-982.
206. Yau JL, Noble J, Hibberd C, Seckl JR: **Short-term administration of fluoxetine and venlafaxine decreases corticosteroid receptor mRNA expression in the rat hippocampus**. *Neuroscience letters* 2001, **306**(3):161-164.
207. Consortium EP: **An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome**. *Nature* 2012, **489**(7414):57-74.
208. Zhou Y, Won J, Karlsson MG, Zhou M, Rogerson T, Balaji J, Neve R, Poirazi P, Silva AJ: **CREB regulates excitability and the allocation of memory to subsets of neurons in the amygdala**. *Nature neuroscience* 2009, **12**(11):1438-1443.
209. Binder EB: **The role of FKBP5, a co-chaperone of the glucocorticoid receptor in the pathogenesis and therapy of affective and anxiety disorders**. *Psychoneuroendocrinology* 2009, **34 Suppl 1**:S186-195.
210. Frodl T, Carballedo A, Hughes MM, Saleh K, Fagan A, Skokauskas N, McLoughlin DM, Meaney J, O'Keane V, Connor TJ: **Reduced expression of glucocorticoid-inducible genes GILZ and SGK-1: high IL-6 levels are associated with reduced hippocampal volumes in major depressive disorder**. *Translational psychiatry* 2012, **2**:e88.
211. Ishihara K, Oshimura M, Nakao M: **CTCF-dependent chromatin insulator is linked to epigenetic remodeling**. *Molecular cell* 2006, **23**(5):733-742.
212. Donczew R, Hahn S: **Mechanistic Differences in Transcription Initiation at TATA-Less and TATA-Containing Promoters**. *Molecular and cellular biology* 2018, **38**(1).

213. Heck MV, Azizov M, Stehning T, Walter M, Kedersha N, Auburger G: **Dysregulated expression of lipid storage and membrane dynamics factors in Tia1 knockout mouse nervous tissue.** *Neurogenetics* 2014, **15**(2):135-144.
214. Wagner KU, Schmidt JW: **The two faces of Janus kinases and their respective STATs in mammary gland development and cancer.** *Journal of carcinogenesis* 2011, **10**:32.
215. Hu F, Pace TW, Miller AH: **Interferon-alpha inhibits glucocorticoid receptor-mediated gene transcription via STAT5 activation in mouse HT22 cells.** *Brain, behavior, and immunity* 2009, **23**(4):455-463.
216. Landry JR, Mager DL, Wilhelm BT: **Complex controls: the role of alternative promoters in mammalian genomes.** *Trends in genetics : TIG* 2003, **19**(11):640-648.
217. Pal S, Gupta R, Kim H, Wickramasinghe P, Baubet V, Showe LC, Dahmane N, Davuluri RV: **Alternative transcription exceeds alternative splicing in generating the transcriptome diversity of cerebellar development.** *Genome research* 2011, **21**(8):1260-1272.
218. Vialou V, Feng J, Robison AJ, Nestler EJ: **Epigenetic mechanisms of depression and antidepressant action.** *Annual review of pharmacology and toxicology* 2013, **53**:59-87.
219. Wong GK, Passey DA, Huang Y, Yang Z, Yu J: **Is "junk" DNA mostly intron DNA?** *Genome research* 2000, **10**(11):1672-1678.
220. Wong JJ, Au AY, Ritchie W, Rasko JE: **Intron retention in mRNA: No longer nonsense: Known and putative roles of intron retention in normal and disease biology.** *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 2016, **38**(1):41-49.
221. Wong JJ, Ritchie W, Ebner OA, Selbach M, Wong JW, Huang Y, Gao D, Pinello N, Gonzalez M, Baidya K *et al*: **Orchestrated intron retention regulates normal granulocyte differentiation.** *Cell* 2013, **154**(3):583-595.
222. Gudipati RK, Xu Z, Lebreton A, Seraphin B, Steinmetz LM, Jacquier A, Libri D: **Extensive degradation of RNA precursors by the exosome in wild-type cells.** *Molecular cell* 2012, **48**(3):409-421.
223. Bell TJ, Miyashiro KY, Sul JY, McCullough R, Buckley PT, Jochems J, Meaney DF, Haydon P, Cantor C, Parsons TD *et al*: **Cytoplasmic BK(Ca) channel intron-containing mRNAs contribute to the intrinsic excitability of hippocampal neurons.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008, **105**(6):1901-1906.
224. Braunschweig U, Barbosa-Morais NL, Pan Q, Nachman EN, Alipanahi B, Gonatopoulos-Pournatzis T, Frey B, Irimia M, Blencowe BJ: **Widespread intron retention in mammals functionally tunes transcriptomes.** *Genome research* 2014, **24**(11):1774-1786.
225. Eswaran J, Horvath A, Godbole S, Reddy SD, Mudvari P, Ohshiro K, Cyanam D, Nair S, Fuqua SA, Polyak K *et al*: **RNA sequencing of cancer reveals novel splicing alterations.** *Scientific reports* 2013, **3**:1689.
226. Lu F, Gladden AB, Diehl JA: **An alternatively spliced cyclin D1 isoform, cyclin D1b, is a nuclear oncogene.** *Cancer research* 2003, **63**(21):7056-7061.
227. Comstock CE, Augello MA, Benito RP, Karch J, Tran TH, Utama FE, Tindall EA, Wang Y, Burd CJ, Groh EM *et al*: **Cyclin D1 splice variants: polymorphism, risk, and isoform-specific regulation in prostate cancer.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2009, **15**(17):5338-5349.
228. Felkin LE, Narita T, Germack R, Shintani Y, Takahashi K, Sarathchandra P, Lopez-Olaneta MM, Gomez-Salinerio JM, Suzuki K, Barton PJ *et al*: **Calcineurin splicing variant calcineurin Abeta1 improves cardiac function after myocardial infarction without inducing hypertrophy.** *Circulation* 2011, **123**(24):2838-2847.
229. Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL, 3rd, Buys SS, Chia D, Church TR, Fouad MN, Gelmann EP, Kvale PA, Reding DJ *et al*: **Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial.** *The New England journal of medicine* 2009, **360**(13):1310-1319.
230. Ren S, Peng Z, Mao JH, Yu Y, Yin C, Gao X, Cui Z, Zhang J, Yi K, Xu W *et al*: **RNA-seq analysis of prostate cancer in the Chinese population identifies recurrent gene fusions, cancer-**

- associated long noncoding RNAs and aberrant alternative splicings. *Cell research* 2012, **22**(5):806-821.
231. Dytrych L, Sherman DL, Gillespie CS, Brophy PJ: **Two PDZ domain proteins encoded by the murine periaxin gene are the result of alternative intron retention and are differentially targeted in Schwann cells.** *The Journal of biological chemistry* 1998, **273**(10):5794-5800.
232. Khazaei MR, Bunk EC, Hillje AL, Jahn HM, Riegler EM, Knoblich JA, Young P, Schwamborn JC: **The E3-ubiquitin ligase TRIM2 regulates neuronal polarization.** *Journal of neurochemistry* 2011, **117**(1):29-37.
233. Balastik M, Ferraguti F, Pires-da Silva A, Lee TH, Alvarez-Bolado G, Lu KP, Gruss P: **Deficiency in ubiquitin ligase TRIM2 causes accumulation of neurofilament light chain and neurodegeneration.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008, **105**(33):12016-12021.
234. Shah AK, Tioleco NM, Nolan K, Locker J, Groh K, Villa C, Stopkova P, Pedrosa E, Lachman HM: **Rare NRXN1 promoter variants in patients with schizophrenia.** *Neuroscience letters* 2010, **475**(2):80-84.
235. Jenkins A, Apud JA, Zhang F, Decot H, Weinberger DR, Law AJ: **Identification of candidate single-nucleotide polymorphisms in NRXN1 related to antipsychotic treatment response in patients with schizophrenia.** *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 2014, **39**(9):2170-2178.
236. Sako Y, Ninomiya K, Okuno Y, Toyomoto M, Nishida A, Koike Y, Ohe K, Kii I, Yoshida S, Hashimoto N *et al*: **Development of an orally available inhibitor of CLK1 for skipping a mutated dystrophin exon in Duchenne muscular dystrophy.** *Scientific reports* 2017, **7**:46126.
237. Guillaud L, Bosc C, Fourest-Lieuvin A, Denarier E, Piroillet F, Lafanechere L, Job D: **STOP proteins are responsible for the high degree of microtubule stabilization observed in neuronal cells.** *The Journal of cell biology* 1998, **142**(1):167-179.
238. Andrieux A, Salin PA, Vernet M, Kujala P, Baratier J, Gory-Faure S, Bosc C, Pointu H, Proietto D, Schweitzer A *et al*: **The suppression of brain cold-stable microtubules in mice induces synaptic defects associated with neuroleptic-sensitive behavioral disorders.** *Genes & development* 2002, **16**(18):2350-2364.
239. Delotterie D, Ruiz G, Brocard J, Schweitzer A, Roucard C, Roche Y, Suaud-Chagny MF, Bressand K, Andrieux A: **Chronic administration of atypical antipsychotics improves behavioral and synaptic defects of STOP null mice.** *Psychopharmacology* 2010, **208**(1):131-141.
240. Shimizu H, Iwayama Y, Yamada K, Toyota T, Minabe Y, Nakamura K, Nakajima M, Hattori E, Mori N, Osumi N *et al*: **Genetic and expression analyses of the STOP (MAP6) gene in schizophrenia.** *Schizophrenia research* 2006, **84**(2-3):244-252.
241. Bosc C, Andrieux A, Job D: **STOP proteins.** *Biochemistry* 2003, **42**(42):12125-12132.
242. Callaghan RC, Cunningham JK, Allebeck P, Arenovich T, Sajeev G, Remington G, Boileau I, Kish SJ: **Methamphetamine use and schizophrenia: a population-based cohort study in California.** *The American journal of psychiatry* 2012, **169**(4):389-396.
243. Mizuki Y, Kajimura N, Imai T, Suetsugi M, Kai S, Kaneyuki H, Yamada M: **Effects of mianserin on negative symptoms in schizophrenia.** *International clinical psychopharmacology* 1990, **5**(2):83-95.
244. Lahti AC, Weiler MA, Tamara Michaelidis BA, Parwani A, Tamminga CA: **Effects of ketamine in normal and schizophrenic volunteers.** *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 2001, **25**(4):455-467.
245. St-Pierre B, Flock G, Zacksenhaus E, Egan SE: **Stra13 homodimers repress transcription through class B E-box elements.** *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**(48):46544-46551.

246. Li Y, Xie M, Yang J, Yang D, Deng R, Wan Y, Yan B: **The expression of antiapoptotic protein survivin is transcriptionally upregulated by DEC1 primarily through multiple sp1 binding sites in the proximal promoter.** *Oncogene* 2006, **25**(23):3296-3306.
247. Rossner MJ, Dorr J, Gass P, Schwab MH, Nave KA: **SHARPs: mammalian enhancer-of-split- and hairy-related proteins coupled to neuronal stimulation.** *Molecular and cellular neurosciences* 1997, **10**(3-4):460-475.
248. Jiang X, Tian F, Du Y, Copeland NG, Jenkins NA, Tessarollo L, Wu X, Pan H, Hu XZ, Xu K *et al*: **BHLHB2 controls Bdnf promoter 4 activity and neuronal excitability.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2008, **28**(5):1118-1130.
249. Vreugdenhil E, Datson N, Engels B, de Jong J, van Koningsbruggen S, Schaaf M, de Kloet ER: **Kainate-elicited seizures induce mRNA encoding a CaMK-related peptide: a putative modulator of kinase activity in rat hippocampus.** *Journal of neurobiology* 1999, **39**(1):41-50.
250. Wibrand K, Messaoudi E, Havik B, Steenslid V, Lovlie R, Steen VM, Bramham CR: **Identification of genes co-upregulated with Arc during BDNF-induced long-term potentiation in adult rat dentate gyrus in vivo.** *The European journal of neuroscience* 2006, **23**(6):1501-1511.
251. Kawaai K, Tominaga-Yoshino K, Urakubo T, Taniguchi N, Kondoh Y, Tashiro H, Ogura A, Tashiro T: **Analysis of gene expression changes associated with long-lasting synaptic enhancement in hippocampal slice cultures after repetitive exposures to glutamate.** *Journal of neuroscience research* 2010, **88**(13):2911-2922.
252. Zarrinpar A, Bhattacharyya RP, Lim WA: **The structure and function of proline recognition domains.** *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2003, **2003**(179):RE8.
253. Moeller ML, Shi Y, Reichardt LF, Ethell IM: **EphB receptors regulate dendritic spine morphogenesis through the recruitment/phosphorylation of focal adhesion kinase and RhoA activation.** *The Journal of biological chemistry* 2006, **281**(3):1587-1598.
254. Buday L, Wunderlich L, Tamas P: **The Nck family of adapter proteins: regulators of actin cytoskeleton.** *Cellular signalling* 2002, **14**(9):723-731.
255. Katz ME, McCormick F: **Signal transduction from multiple Ras effectors.** *Current opinion in genetics & development* 1997, **7**(1):75-79.
256. Lipka J, Kapitein LC, Jaworski J, Hoogenraad CC: **Microtubule-binding protein doublecortin-like kinase 1 (DCLK1) guides kinesin-3-mediated cargo transport to dendrites.** *The EMBO journal* 2016, **35**(3):302-318.
257. Lazo OM, Gonzalez A, Ascano M, Kuruvilla R, Couve A, Bronfman FC: **BDNF regulates Rab11-mediated recycling endosome dynamics to induce dendritic branching.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2013, **33**(14):6112-6122.
258. Horch HW, Katz LC: **BDNF release from single cells elicits local dendritic growth in nearby neurons.** *Nature neuroscience* 2002, **5**(11):1177-1184.
259. Vreugdenhil E, Kolk SM, Boekhoorn K, Fitzsimons CP, Schaaf M, Schouten T, Sarabdjitsingh A, Sibug R, Lucassen PJ: **Doublecortin-like, a microtubule-associated protein expressed in radial glia, is crucial for neuronal precursor division and radial process stability.** *The European journal of neuroscience* 2007, **25**(3):635-648.
260. Saaltink DJ, Havik B, Verissimo CS, Lucassen PJ, Vreugdenhil E: **Doublecortin and doublecortin-like are expressed in overlapping and non-overlapping neuronal cell population: implications for neurogenesis.** *The Journal of comparative neurology* 2012, **520**(13):2805-2823.
261. Kunze A, Achilles A, Keiner S, Witte OW, Redecker C: **Two distinct populations of doublecortin-positive cells in the perilesional zone of cortical infarcts.** *BMC neuroscience* 2015, **16**:20.
262. Vazdarjanova A, Ramirez-Amaya V, Insel N, Plummer TK, Rosi S, Chowdhury S, Mikhael D, Worley PF, Guzowski JF, Barnes CA: **Spatial exploration induces ARC, a plasticity-related immediate-early gene, only in calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-positive**

- principal excitatory and inhibitory neurons of the rat forebrain.** *The Journal of comparative neurology* 2006, **498**(3):317-329.
263. Hung AC, Huang HM, Tsay HJ, Lin TN, Kuo JS, Sun SH: **ATP-stimulated c-fos and zif268 mRNA expression is inhibited by chemical hypoxia in a rat brain-derived type 2 astrocyte cell line, RBA-2.** *Journal of cellular biochemistry* 2000, **77**(2):323-332.
264. Munoz-Manchado AB, Bengtsson Gonzales C, Zeisel A, Munguba H, Bekkouche B, Skene NG, Lonnerberg P, Ryge J, Harris KD, Linnarsson S *et al*: **Diversity of Interneurons in the Dorsal Striatum Revealed by Single-Cell RNA Sequencing and PatchSeq.** *Cell reports* 2018, **24**(8):2179-2190 e2177.

Dodatkowa Tabela S1. Listy transkryptów (Transkrypt ID), odpowiadających im identyfikatorów genów (Gene ID) i nazw genów, które ulegały regulacji po podaniu leku w tkance. Analiza statystyczna wykonana została przy pomocy jednoczynnikowej ANOVA dla każdej tkanki – NAc i PFCx (FDR <0,0001).

NAc			PFCx			NAc i PFCx		
Transkrypt ID	Gen ID	Nazwa genu	Transkrypt ID	Gen ID	Nazwa genu	Transkrypt ID	Gen ID	Nazwa genu
ENSMUST0000000543	ENSMUSG0000000531	Grasp	ENSMUST0000000080	ENSMUSG0000000078	Klf6	ENSMUST0000003640	ENSMUSG0000003545	Fosb
ENSMUST0000003310	ENSMUSG0000003226	Ranbp2	ENSMUST0000000188	ENSMUSG0000000184	Ccnd2	ENSMUST0000020145	ENSMUSG00000019970	Sgk1
ENSMUST0000003635	ENSMUSG0000003541	Ier3	ENSMUST0000007433	ENSMUSG00000098306	Gm28040	ENSMUST0000020308	ENSMUSG00000020108	Ddit4
ENSMUST00000009790	ENSMUSG00000009646	Pla2g12b	ENSMUST00000011492	ENSMUSG00000027710	Acad9	ENSMUST0000021413	ENSMUSG00000021025	Nfkbia
ENSMUST00000020692	ENSMUSG00000020423	Btg2	ENSMUST00000016670	ENSMUSG00000016526	Dyrk3	ENSMUST0000021674	ENSMUSG00000021250	Fos
ENSMUST00000023268	ENSMUSG00000022602	Arc	ENSMUST00000020118	ENSMUSG00000019960	Dusp6	ENSMUST0000023779	ENSMUSG00000023034	Nr4a1
ENSMUST00000023829	ENSMUSG00000023067	Cdkn1a	ENSMUST00000020579	ENSMUSG00000020330	Hmnr	ENSMUST0000024839	ENSMUSG00000024042	Sik1
ENSMUST00000025025	ENSMUSG00000024190	Dusp1	ENSMUST00000021135	ENSMUSG00000020783	Ncbp3	ENSMUST0000029846	ENSMUSG00000028195	Cyr61
ENSMUST00000025236	ENSMUSG00000024378	Stard4	ENSMUST00000022212	ENSMUSG00000021701	Plk2	ENSMUST0000035101	ENSMUSG00000032515	Csrnp1
ENSMUST00000025767	ENSMUSG00000024847	Aip	ENSMUST00000023610	ENSMUSG00000022893	Adamts1	ENSMUST0000039388	ENSMUSG00000034936	Arl4d
ENSMUST00000030047	ENSMUSG00000028362	Tnfsf8	ENSMUST00000025003	ENSMUSG00000024176	Sox8	ENSMUST0000042818	ENSMUSG00000035828	Pim3
ENSMUST00000030623	ENSMUSG00000028820	Sfpq	ENSMUST00000027215	ENSMUSG00000026049	Tex30	ENSMUST0000047906	ENSMUSG00000034640	Tiparp
ENSMUST00000031017	ENSMUSG00000029135	Fosl2	ENSMUST00000028111	ENSMUSG00000026770	Il2ra	ENSMUST0000064922	ENSMUSG00000052837	Junb
ENSMUST00000033053	ENSMUSG00000030789	Itgax	ENSMUST00000028829	ENSMUSG00000027351	Spred1	ENSMUST0000069620	ENSMUSG00000055866	Per2
ENSMUST00000035908	ENSMUSG00000033730	Egr3	ENSMUST00000029421	ENSMUSG00000027832	Ptx3	ENSMUST0000082432	ENSMUSG00000007682	Dio2
ENSMUST00000036884	ENSMUSG00000033863	Klf9	ENSMUST00000031446	ENSMUSG00000070498	Tmem132b	ENSMUST00000102752	ENSMUSG00000007617	Homer1
ENSMUST00000037029	ENSMUSG00000033960	9430020K01Rik	ENSMUST00000032194	ENSMUSG00000030103	Bhlhe40	ENSMUST00000108229	ENSMUSG00000028248	Pnir
ENSMUST00000040514	ENSMUSG00000038894	Irs2	ENSMUST00000038287	ENSMUSG00000034765	Dusp5	ENSMUST00000128851	ENSMUSG00000030795	Fus
ENSMUST00000041531	ENSMUSG00000037246	H2-M10.5	ENSMUST00000042970	ENSMUSG00000041695	Kcnj2	ENSMUST00000129577	ENSMUSG00000026034	Clk1
ENSMUST00000045903	ENSMUSG00000032536	Trak1	ENSMUST00000043794	ENSMUSG00000063646	Jakmip1	ENSMUST00000137596	ENSMUSG00000027993	Trim2
ENSMUST00000048207	ENSMUSG00000040554	Aip1	ENSMUST00000047425	ENSMUSG00000041308	Sntb2	ENSMUST00000153056	ENSMUSG00000021134	Srsf5
ENSMUST00000052164	ENSMUSG00000048337	Npy4r	ENSMUST00000049393	ENSMUSG00000037007	Zfp113	ENSMUST00000165033	ENSMUSG00000038418	Egr1
ENSMUST00000053949	ENSMUSG00000044461	Shisa2	ENSMUST00000049621	ENSMUSG00000048001	Hes5	ENSMUST00000183191	ENSMUSG00000098061	Gm26945
ENSMUST00000056028	ENSMUSG00000042978	Sbk1	ENSMUST00000050027	ENSMUSG00000037362	Nov	ENSMUST00000195025	ENSMUSG00000103220	Gm37728
ENSMUST00000057859	ENSMUSG00000048285	Frmd6	ENSMUST00000050575	ENSMUSG00000045691	Thtpa	ENSMUST00000197342	ENSMUSG00000039735	Fnbp1l
ENSMUST00000059692	ENSMUSG00000031651	Triml1	ENSMUST00000050970	ENSMUSG00000029642	Polr1d	ENSMUST00000204013	ENSMUSG00000029817	Tra2a

ENSMUST0000072887	ENSMUSG00000051885	Olfr664	ENSMUST00000053855	ENSMUSG00000046818	Ddit4l			
ENSMUST0000074056	ENSMUSG00000061769	Klra6	ENSMUST00000055738	ENSMUSG00000031431	Tsc22d3			
ENSMUST0000074168	ENSMUSG00000059429	Olfr365	ENSMUST00000055770	ENSMUSG00000049539	Hist1h1a			
ENSMUST0000077816	ENSMUSG00000058019	Ces5a	ENSMUST00000057243	ENSMUSG00000048572	Tmem252			
ENSMUST0000080094	ENSMUSG00000057149	Olfr1301	ENSMUST00000059449	ENSMUSG00000050097	Ces2b			
ENSMUST0000082446	ENSMUSG00000064380	Gm26448	ENSMUST00000062125	ENSMUSG00000048429	1810026J23Rik			
ENSMUST0000083715	ENSMUSG00000065649	Snora74a	ENSMUST00000067543	ENSMUSG00000032501	Trib1			
ENSMUST0000088198	ENSMUSG00000067679	Obp1b	ENSMUST00000068792	ENSMUSG00000055296	Tmem245			
ENSMUST0000093658	ENSMUSG00000070167	Snora57	ENSMUST00000069097	ENSMUSG00000028842	Ago3			
ENSMUST0000093852	ENSMUSG00000066687	Zbtb16	ENSMUST00000071732	ENSMUSG00000092086	Gm6793			
ENSMUST0000095759	ENSMUSG00000071341	Egr4	ENSMUST00000073639	ENSMUSG00000089789	Rdh1			
ENSMUST0000098549	ENSMUSG00000074195	Clca4b	ENSMUST00000074043	ENSMUSG00000037465	Klf10			
ENSMUST0000099888	ENSMUSG00000075184	F930017D23Rik	ENSMUST00000074651	ENSMUSG00000052783	Grk4			
ENSMUST00000107094	ENSMUSG00000052684	Jun	ENSMUST00000079413	ENSMUSG00000024222	Fkbp5			
ENSMUST00000108483	ENSMUSG00000030366	Ceacam12	ENSMUST00000079884	ENSMUSG00000058508	Gm10042			
ENSMUST00000114107	ENSMUSG00000025964	Adam23	ENSMUST00000080694	ENSMUSG00000058176	Gm5407			
ENSMUST00000116892	ENSMUSG00000080542	Gm22710	ENSMUST00000082517	ENSMUSG00000064451	Snora23			
ENSMUST00000117445	ENSMUSG00000069825	Spata22	ENSMUST00000082761	ENSMUSG00000096205	Gm22068			
ENSMUST00000117909	ENSMUSG00000060508	Nlrp9b	ENSMUST00000082838	ENSMUSG00000064772	Gm25202			
ENSMUST00000119036	ENSMUSG00000095820	Gm15098	ENSMUST00000083153	ENSMUSG00000065087	Snord22			
ENSMUST00000126381	ENSMUSG00000033685	Ucp2	ENSMUST00000083529	ENSMUSG00000065463	Snord45c			
ENSMUST00000126658	ENSMUSG00000074653	Lrrc31	ENSMUST00000083928	ENSMUSG00000065862	Gm24029			
ENSMUST00000127492	ENSMUSG00000055407	Map6	ENSMUST00000083936	ENSMUSG00000065870	Rnu3a			
ENSMUST00000128180	ENSMUSG00000079603	Gm13218	ENSMUST00000084007	ENSMUSG00000094306	Gm24924			
ENSMUST00000129988	ENSMUSG00000086070	8430436N08Rik	ENSMUST00000091789	ENSMUSG00000041607	Mbp			
ENSMUST00000135243	ENSMUSG00000036427	Gpi1	ENSMUST00000093183	ENSMUSG00000046345	Smco1			
ENSMUST00000141218	ENSMUSG00000019970	Sgk1	ENSMUST00000093684	ENSMUSG00000095969	Rnu1a1			
ENSMUST00000144016	ENSMUSG00000015090	Ptgds	ENSMUST00000098307	ENSMUSG00000074026	Gm6091			
ENSMUST00000147545	ENSMUSG00000048701	Ccdc6	ENSMUST00000101463	ENSMUSG00000015568	Lpl			
ENSMUST00000147610	ENSMUSG00000025512	Chid1	ENSMUST00000101973	ENSMUSG00000096659	Gm25679			

ENSMUST00000150632	ENSMUSG00000034175	Rhbdd3	ENSMUST00000103475	ENSMUSG00000076666	Ighv14-4			
ENSMUST00000151505	ENSMUSG00000025465	Echs1	ENSMUST00000104850	ENSMUSG00000093935	Gm25529			
ENSMUST00000157463	ENSMUSG00000088088	Rmrrp	ENSMUST00000105038	ENSMUSG00000078240	Gm3550			
ENSMUST00000157560	ENSMUSG00000088185	Scarna2	ENSMUST00000106899	ENSMUSG00000026180	Cxcr2			
ENSMUST00000157773	ENSMUSG00000088398	Gm26306	ENSMUST00000108216	ENSMUSG00000017421	Zfp207			
ENSMUST00000158080	ENSMUSG00000088705	Gm25549	ENSMUST00000108295	ENSMUSG00000002058	Unc119			
ENSMUST00000158608	ENSMUSG00000089233	Gm22202	ENSMUST00000108297	ENSMUSG00000049225	Pdp1			
ENSMUST00000162800	ENSMUSG00000025955	Akr1cl	ENSMUST00000108670	ENSMUSG00000052921	Arhgef15			
ENSMUST00000166527	ENSMUSG00000093948	Gm10378	ENSMUST00000113028	ENSMUSG00000045414	1190002N15Rik			
ENSMUST00000170953	ENSMUSG00000090862	Rps13	ENSMUST00000113402	ENSMUSG00000079457	Gm7609			
ENSMUST00000172190	ENSMUSG00000090417	Vmn2r94	ENSMUST00000113596	ENSMUSG00000079477	Rab7			
ENSMUST00000173672	ENSMUSG00000092274	Neat1	ENSMUST00000114140	ENSMUSG00000034254	Agpat1			
ENSMUST00000173770	ENSMUSG00000092550	Gm20496	ENSMUST00000114703	ENSMUSG00000026748	Plxdc2			
ENSMUST00000174877	ENSMUSG00000001027	Scn4a	ENSMUST00000115257	ENSMUSG00000036699	Zcchc12			
ENSMUST00000176972	ENSMUSG00000093771	AU023070	ENSMUST00000115894	ENSMUSG00000069053	Uba1y			
ENSMUST00000177413	ENSMUSG00000093663	Gm7171	ENSMUST00000116784	ENSMUSG00000080434	Gm23177			
ENSMUST00000182560	ENSMUSG00000002107	Celf2	ENSMUST00000116918	ENSMUSG00000095035	Gm22346			
ENSMUST00000190666	ENSMUSG00000100826	Snhg14	ENSMUST00000117721	ENSMUSG00000021327	Zkscan3			
ENSMUST00000191518	ENSMUSG00000099937	Gm28872	ENSMUST00000119013	ENSMUSG00000084390	Gm15425			
ENSMUST00000193379	ENSMUSG00000102817	Gm6185	ENSMUST00000121552	ENSMUSG00000082894	Gm6480			
ENSMUST00000193900	ENSMUSG00000102925	Gm37150	ENSMUST00000122610	ENSMUSG00000084559	Mir1906-2			
ENSMUST00000194138	ENSMUSG00000097451	Rian	ENSMUST00000123192	ENSMUSG00000040667	Nup88			
ENSMUST00000196431	ENSMUSG00000106448	Gm43486	ENSMUST00000123994	ENSMUSG00000028542	Slc6a9			
ENSMUST00000198432	ENSMUSG00000070702	Csn1s1	ENSMUST00000124608	ENSMUSG00000021998	Lcp1			
ENSMUST00000198757	ENSMUSG00000027797	Dcl1	ENSMUST00000124751	ENSMUSG00000027419	Pcsk2			
ENSMUST00000199134	ENSMUSG00000044365	Cxxc4	ENSMUST00000124840	ENSMUSG00000026809	1700026L06Rik			
ENSMUST00000200932	ENSMUSG00000079423	Gm3286	ENSMUST00000126534	ENSMUSG00000033685	Ucp2			
ENSMUST00000200956	ENSMUSG00000107352	Gm43660	ENSMUST00000127008	ENSMUSG00000074457	S100a16			
ENSMUST00000201654	ENSMUSG00000107232	1700017L05Rik	ENSMUST00000127890	ENSMUSG00000037926	Ssh2			
ENSMUST00000202425	ENSMUSG00000107148	Gm42888	ENSMUST00000130877	ENSMUSG00000037446	Tulp1			

ENSMUST00000203186	ENSMUSG00000107624	Gm44005	ENSMUST00000131147	ENSMUSG00000087028	Gm13387			
ENSMUST00000203269	ENSMUSG00000107873	Gm19065	ENSMUST00000132697	ENSMUSG00000022799	Arhgap31			
ENSMUST00000203341	ENSMUSG00000030275	Etnk1	ENSMUST00000132720	ENSMUSG00000028932	Psmc2			
ENSMUST00000203992	ENSMUSG00000108256	Gm43923	ENSMUST00000133616	ENSMUSG00000055188	Rbm3os			
			ENSMUST00000134741	ENSMUSG00000042625	Safb2			
			ENSMUST00000135430	ENSMUSG00000078894	2210418O10Rik			
			ENSMUST00000136387	ENSMUSG00000071337	Tia1			
			ENSMUST00000138092	ENSMUSG00000025511	Tspan4			
			ENSMUST00000138295	ENSMUSG00000086919	Gm11497			
			ENSMUST00000138468	ENSMUSG00000027598	Itch			
			ENSMUST00000139720	ENSMUSG00000030770	Parva			
			ENSMUST00000140600	ENSMUSG00000040687	Madd			
			ENSMUST00000140665	ENSMUSG00000008690	Ncaph2			
			ENSMUST00000141837	ENSMUSG00000018566	Slc2a4			
			ENSMUST00000142645	ENSMUSG00000040760	Appl1			
			ENSMUST00000142701	ENSMUSG00000029458	Brap			
			ENSMUST00000142950	ENSMUSG00000047115	Fam221a			
			ENSMUST00000143129	ENSMUSG00000073274	Gm14636			
			ENSMUST00000143264	ENSMUSG00000074733	Zfp950			
			ENSMUST00000143329	ENSMUSG00000039913	Pak7			
			ENSMUST00000143918	ENSMUSG00000057738	Sptan1			
			ENSMUST00000143952	ENSMUSG00000047804	Akap10			
			ENSMUST00000145013	ENSMUSG00000020273	Papalg			
			ENSMUST00000146233	ENSMUSG00000040483	Xaf1			
			ENSMUST00000146404	ENSMUSG00000085950	Gm13589			
			ENSMUST00000148561	ENSMUSG00000028248	Pnizr			
			ENSMUST00000148843	ENSMUSG00000066037	Hnrnpr			
			ENSMUST00000150428	ENSMUSG00000038244	Mical2			
			ENSMUST00000150704	ENSMUSG00000036099	Vezt			
			ENSMUST00000150801	ENSMUSG00000073274	Gm14636			

			ENSMUST00000155318	ENSMUSG00000020674	Pxdn			
			ENSMUST00000155984	ENSMUSG00000056342	Usp34			
			ENSMUST00000156089	ENSMUSG00000023088	Abcc1			
			ENSMUST00000156158	ENSMUSG00000042726	Trafd1			
			ENSMUST00000157194	ENSMUSG00000087819	Gm25117			
			ENSMUST00000157729	ENSMUSG00000088354	Gm27592			
			ENSMUST00000158323	ENSMUSG00000088948	Gm23262			
			ENSMUST00000160159	ENSMUSG00000020181	Nav3			
			ENSMUST00000160210	ENSMUSG00000026335	Pam			
			ENSMUST00000161155	ENSMUSG00000040265	Dnm3			
			ENSMUST00000162142	ENSMUSG00000022351	Sqle			
			ENSMUST00000163625	ENSMUSG00000028782	Adgrb2			
			ENSMUST00000164606	ENSMUSG00000026740	Dnajc1			
			ENSMUST00000164787	ENSMUSG00000040420	Cdh18			
			ENSMUST00000166799	ENSMUSG00000010066	Cacna2d2			
			ENSMUST00000167053	ENSMUSG00000039716	Dock3			
			ENSMUST00000167323	ENSMUSG00000090698	Apold1			
			ENSMUST00000167514	ENSMUSG00000092622	Khdc3			
			ENSMUST00000169308	ENSMUSG00000025731	0610011F06Rik			
			ENSMUST00000169413	ENSMUSG00000027894	Slc6a17			
			ENSMUST00000170927	ENSMUSG00000002297	Dbf4			
			ENSMUST00000174201	ENSMUSG00000056888	Glipr1			
			ENSMUST00000174274	ENSMUSG00000022394	L3mbtl2			
			ENSMUST00000174716	ENSMUSG00000037470	Uggt1			
			ENSMUST00000174941	ENSMUSG00000095209	Gm22398			
			ENSMUST00000174946	ENSMUSG00000092687	Gm25744			
			ENSMUST00000174949	ENSMUSG00000093388	Gm22655			
			ENSMUST00000175055	ENSMUSG00000092796	Gm22692			
			ENSMUST00000175073	ENSMUSG00000092814	Gm23638			
			ENSMUST00000175099	ENSMUSG00000092840	Gm24331			

			ENSMUST00000175167	ENSMUSG00000092908	Gm25731				
			ENSMUST00000175169	ENSMUSG00000095747	Gm22475				
			ENSMUST00000175195	ENSMUSG00000094528	Gm22914				
			ENSMUST00000175237	ENSMUSG00000092978	Gm25070				
			ENSMUST00000175318	ENSMUSG00000093059	Gm24809				
			ENSMUST00000175329	ENSMUSG00000093070	Gm25952				
			ENSMUST00000175424	ENSMUSG00000105494	Gm44310				
			ENSMUST00000175449	ENSMUSG00000093190	Gm22875				
			ENSMUST00000175462	ENSMUSG00000093203	Gm22411				
			ENSMUST00000175494	ENSMUSG00000094486	Gm23268				
			ENSMUST00000175516	ENSMUSG00000095943	Gm25197				
			ENSMUST00000175561	ENSMUSG00000093302	Gm23801				
			ENSMUST00000175618	ENSMUSG00000093359	Gm23292				
			ENSMUST00000176093	ENSMUSG00000010110	Stx5a				
			ENSMUST00000176759	ENSMUSG00000038331	Satb2				
			ENSMUST00000176801	ENSMUSG00000022321	Cdh10				
			ENSMUST00000176930	ENSMUSG00000093684	Gm27857				
			ENSMUST00000176989	ENSMUSG00000093503	Vmn2r-ps4				
			ENSMUST00000177346	ENSMUSG00000037112	Sik2				
			ENSMUST00000177427	ENSMUSG00000093780	Gm22395				
			ENSMUST00000177653	ENSMUSG00000096214	Gm22634				
			ENSMUST00000177656	ENSMUSG00000095947	Gm25195				
			ENSMUST00000178007	ENSMUSG00000093965	Gm24370				
			ENSMUST00000178056	ENSMUSG00000080316	Spaca6				
			ENSMUST00000178068	ENSMUSG00000095989	Gm23049				
			ENSMUST00000178123	ENSMUSG00000095425	Gm24417				
			ENSMUST00000178183	ENSMUSG00000095245	Gm24753				
			ENSMUST00000178283	ENSMUSG00000094702	Gm24485				
			ENSMUST00000178469	ENSMUSG00000096206	Gm22317				
			ENSMUST00000178492	ENSMUSG00000094807	Gm24975				

			ENSMUST00000178964	ENSMUSG00000096309	Gm25208			
			ENSMUST00000179621	ENSMUSG00000096349	Gm22513			
			ENSMUST00000179675	ENSMUSG00000094826	Gm23804			
			ENSMUST00000180144	ENSMUSG00000096112	Gm26269			
			ENSMUST00000180209	ENSMUSG00000096184	Gm23304			
			ENSMUST00000180257	ENSMUSG00000093791	Gm24092			
			ENSMUST00000180691	ENSMUSG00000097231	Gm26852			
			ENSMUST00000181107	ENSMUSG00000097736	9530059O14Rik			
			ENSMUST00000181440	ENSMUSG00000097163	BC051077			
			ENSMUST00000181534	ENSMUSG00000097356	Gm26774			
			ENSMUST00000181637	ENSMUSG00000097226	Gm26600			
			ENSMUST00000181705	ENSMUSG00000097265	Gm26803			
			ENSMUST00000181775	ENSMUSG00000097390	Gm26785			
			ENSMUST00000182480	ENSMUSG00000004562	Arhgef40			
			ENSMUST00000182991	ENSMUSG00000098240	Gm4575			
			ENSMUST00000183251	ENSMUSG00000090812	Samd15			
			ENSMUST00000183340	ENSMUSG00000098898	Gm27754			
			ENSMUST00000184215	ENSMUSG00000098798	Gm27288			
			ENSMUST00000184463	ENSMUSG00000098823	Mir8111			
			ENSMUST00000184596	ENSMUSG00000098494	Gm27690			
			ENSMUST00000184994	ENSMUSG00000098284	A330093E20Rik			
			ENSMUST00000185136	ENSMUSG00000098638	Gm27743			
			ENSMUST00000185253	ENSMUSG00000068349	Gml			
			ENSMUST00000186169	ENSMUSG00000100779	Gm29292			
			ENSMUST00000186933	ENSMUSG00000032565	Nudt16			
			ENSMUST00000187605	ENSMUSG00000056211	R3hdm1			
			ENSMUST00000187900	ENSMUSG00000056211	R3hdm1			
			ENSMUST00000188435	ENSMUSG00000101773	2210420H20Rik			
			ENSMUST00000189301	ENSMUSG00000041872	Il17f			
			ENSMUST00000189430	ENSMUSG00000099615	Gm28362			

			ENSMUST00000190006	ENSMUSG00000101447	Gm28826			
			ENSMUST00000190826	ENSMUSG00000063522	2010109I03Rik			
			ENSMUST00000191338	ENSMUSG00000025915	Sgk3			
			ENSMUST00000191756	ENSMUSG00000103191	Gm37646			
			ENSMUST00000192225	ENSMUSG00000026575	Nme7			
			ENSMUST00000192386	ENSMUSG00000103625	Gm37357			
			ENSMUST00000193214	ENSMUSG00000104277	Gm38299			
			ENSMUST00000193585	ENSMUSG00000103241	Gm38089			
			ENSMUST00000194532	ENSMUSG00000102289	Gm31258			
			ENSMUST00000194661	ENSMUSG00000096967	Gm26621			
			ENSMUST00000194716	ENSMUSG00000103672	Gm37621			
			ENSMUST00000194772	ENSMUSG00000028068	lqgap3			
			ENSMUST00000195406	ENSMUSG00000094763	Gm1647			
			ENSMUST00000197090	ENSMUSG00000105287	Gm43577			
			ENSMUST00000197165	ENSMUSG00000104592	Gm42721			
			ENSMUST00000197673	ENSMUSG00000061882	Ccdc62			
			ENSMUST00000197850	ENSMUSG00000032482	Cspg5			
			ENSMUST00000198359	ENSMUSG00000104629	Trav13n-1			
			ENSMUST00000198504	ENSMUSG00000072845	Tmprss11a			
			ENSMUST00000198568	ENSMUSG00000105931	Gm43014			
			ENSMUST00000199277	ENSMUSG00000039883	Lrrc17			
			ENSMUST00000199703	ENSMUSG00000079451	Tmprss11g			
			ENSMUST00000199788	ENSMUSG00000104793	Gm43756			
			ENSMUST00000199972	ENSMUSG00000106536	Gm42508			
			ENSMUST00000200030	ENSMUSG00000105210	Mir3544			
			ENSMUST00000200213	ENSMUSG00000108394				
			ENSMUST00000202192	ENSMUSG00000041147	Brca2			
			ENSMUST00000202707	ENSMUSG00000038456	Dennd2a			
			ENSMUST00000203092	ENSMUSG00000107881	Gm44250			
			ENSMUST00000203285	ENSMUSG00000107599	Gm43981			

			ENSMUST00000203708	ENSMUSG00000107706	Gm44022					
			ENSMUST00000203742	ENSMUSG00000032652	Crebl2					
			ENSMUST00000204808	ENSMUSG00000108072	Gm20362					
			ENSMUST00000205001	ENSMUSG00000107894	Gm10388					
			ENSMUST00000205775	ENSMUSG00000108446						
			ENSMUST00000206038	ENSMUSG00000060034	Ctf2					
			ENSMUST00000206348	ENSMUSG00000002603	Tgfb1					
			ENSMUST00000206449	ENSMUSG00000108365						
			ENSMUST00000206566	ENSMUSG00000108634	Gm38534					
			ENSMUST00000206747	ENSMUSG00000097178	2310002F09Rik					

Dodatkowa Tabela S2. Lista 113 transkryptów regulowanych podaniem leków psychotropowych w NAC lub PFCx. Przedstawiono wyniki dwuczynnikowej ANOVA. FDR dla czynnika lek (fdr_treat) < 0,001. Dla każdego transkryptu przedstawiono jego identyfikator (Transkrypt ID) z bazy Ensembl, identyfikator genu (gene ID), symbol genu, grupę (1-4) regulowanych transkryptów, liczbę wszystkich transkryptów dostępną w bazie Ensembl, typ transkryptu i statystykę: wartość p i FDR dla czynnika lek (fdr_treat), tkanka (fdr_tissue) i interakcji (fdr_treat_tissue).

Transkrypt ID_Ensembl	Gen ID_Ensembl	Gen symbol	Grupa (klaster)	Liczba transkryptów	Typ transkryptu	pvalue_treat	pvalue_tissue	pvalue_treat.tissue	fdr_treat	fdr_tissue	fdr_treat.tissue
ENSMUST0000002989	ENSMUSG00000002910	Arrdc2	1	1	protein_coding	8,17E-12	4,67E-07	0,057647	9,84E-09	4,35E-06	0,328130652
ENSMUST00000020145	ENSMUSG00000019970	Sgk1	1	13	protein_coding	2,09E-17	8,75E-05	0,000236	1,24E-13	0,00045343	0,014740825
ENSMUST00000020308	ENSMUSG00000020108	Ddit4	1	1	protein_coding	1,58E-18	4,16E-12	0,017055	1,37E-14	1,02E-10	0,176758181
ENSMUST00000021413	ENSMUSG00000021025	Nfkbia	1	1	protein_coding	7,88E-18	0,186452	0,688758	4,93E-14	0,29229842	0,88373557
ENSMUST00000029846	ENSMUSG00000028195	Cyr61	1	1	protein_coding	4,90E-17	0,195429	0,008411	2,30E-13	0,30314036	0,119521965
ENSMUST00000036884	ENSMUSG00000033863	Klf9	1	1	protein_coding	7,62E-15	1,09E-14	0,03994	2,30E-11	3,68E-13	0,275764208
ENSMUST00000042818	ENSMUSG00000035828	Pim3	1	1	protein_coding	2,42E-16	1,17E-08	0,094106	1,01E-12	1,55E-07	0,411883428
ENSMUST00000049138	ENSMUSG00000032840	2410131K14Rik	1	1	protein_coding	2,19E-11	4,15E-06	0,00098	2,07E-08	3,04E-05	0,03426131
ENSMUST00000062405	ENSMUSG00000049892	Rasd1	1	1	protein_coding	1,01E-14	0,00019	0,667841	2,93E-11	0,00089304	0,874428736
ENSMUST00000126381	ENSMUSG00000033685	Ucp2	1	11	retained_intron	2,19E-15	0,014115	0,80801	7,26E-12	0,03615897	0,931494285
ENSMUST00000126534	ENSMUSG00000033685	Ucp2	1	11	protein_coding	1,99E-11	0,253878	0,25306	1,96E-08	0,37099333	0,620985009
ENSMUST00000131043	ENSMUSG00000086040	Wipf3	1	6	retained_intron	2,16E-11	0,000272	0,37425	2,06E-08	0,00122013 2	0,713180729

ENSMUST00000137596	ENSMUSG00000027993	Trim2	1	19	retained_intron	4,08E-14	0,179821	0,334207	1,04E-10	0,28400777	0,684960671
ENSMUST00000141218	ENSMUSG00000019970	Sgk1	1	13	retained_intron	7,25E-13	1,09E-07	0,0038	1,26E-09	1,17E-06	0,075807049
ENSMUST00000167323	ENSMUSG00000090698	Apold1	1	1	protein_coding	1,72E-15	0,182096	0,055146	5,89E-12	0,28688270 3	0,321635122
ENSMUST00000173672	ENSMUSG00000092274	Neat1	1	3	lincRNA	7,70E-17	0,077684	0,014083	3,47E-13	0,14648072 1	0,159087989
ENSMUST00000195025	ENSMUSG00000103220	Gm37728	1	1	TEC	3,11E-20	7,35E-06	0,359499	4,22E-16	5,08E-05	0,703630405
ENSMUST00000000543	ENSMUSG00000000531	Grasp	2	1	protein_coding	4,24E-13	1,97E-07	0,000365	7,96E-10	2,00E-06	0,019086322
ENSMUST00000003640	ENSMUSG00000003545	Fosb	2	7	protein_coding	1,53E-24	4,68E-06	6,57E-11	7,14E-20	3,39E-05	1,82E-06
ENSMUST00000015456	ENSMUSG00000015312	Gadd45b	2	1	protein_coding	8,96E-12	0,025383	0,023897	1,06E-08	0,05891356 1	0,211662695
ENSMUST00000020118	ENSMUSG00000019960	Dusp6	2	1	protein_coding	4,21E-17	4,20E-26	1,07E-05	2,06E-13	4,85E-24	0,002529642
ENSMUST00000020692	ENSMUSG00000020423	Btg2	2	1	protein_coding	1,16E-10	1,37E-09	0,000101	7,70E-08	2,19E-08	0,008850216
ENSMUST00000021674	ENSMUSG00000021250	Fos	2	4	protein_coding	4,93E-22	2,41E-14	4,27E-06	1,39E-17	7,88E-13	0,001499322
ENSMUST00000023268	ENSMUSG00000022602	Arc	2	2	protein_coding	1,18E-11	0,000141	0,00014	1,31E-08	0,00068754	0,010812794
ENSMUST00000023610	ENSMUSG00000022893	Adamts1	2	3	protein_coding	2,93E-13	1,21E-08	0,002759	6,00E-10	1,60E-07	0,062621961
ENSMUST00000023779	ENSMUSG00000023034	Nr4a1	2	1	protein_coding	1,79E-26	5,02E-07	4,11E-12	2,02E-21	4,64E-06	2,31E-07
ENSMUST00000023829	ENSMUSG00000023067	Cdkn1a	2	3	protein_coding	3,83E-14	2,91E-15	0,068665	1,00E-10	1,05E-13	0,35539663
ENSMUST00000024839	ENSMUSG00000024042	Sik1	2	1	protein_coding	3,41E-19	7,95E-15	3,24E-06	3,20E-15	2,72E-13	0,001277465
ENSMUST00000025003	ENSMUSG00000024176	Sox8	2	3	protein_coding	5,22E-11	3,10E-29	7,68E-09	4,00E-08	5,31E-27	2,29E-05
ENSMUST00000025025	ENSMUSG00000024190	Dusp1	2	3	protein_coding	2,64E-14	9,67E-05	0,000329	7,09E-11	0,00049457	0,017898483
ENSMUST00000030398	ENSMUSG00000028645	Slc2a1	2	5	protein_coding	3,05E-13	0,001806	0,200998	6,14E-10	0,00631258 9	0,566212612
ENSMUST00000031017	ENSMUSG00000029135	Fosl2	2	3	protein_coding	3,16E-21	1,43E-06	1,55E-11	7,13E-17	1,18E-05	5,81E-07
ENSMUST00000032194	ENSMUSG00000030103	Bhlhe40	2	4	protein_coding	3,94E-13	7,69E-45	0,005107	7,56E-10	1,52E-41	0,089743925
ENSMUST00000033930	ENSMUSG00000031530	Dusp4	2	1	protein_coding	9,50E-14	0,000193	0,011614	2,14E-10	0,00090558 8	0,142482452
ENSMUST00000035101	ENSMUSG00000032515	Csrnp1	2	1	protein_coding	3,25E-18	9,02E-07	7,37E-05	2,62E-14	7,83E-06	0,007500616
ENSMUST00000038287	ENSMUSG00000034765	Dusp5	2	1	protein_coding	6,81E-18	0,616084	7,29E-08	4,63E-14	0,71668218 5	0,000111235
ENSMUST00000039388	ENSMUSG00000034936	Arl4d	2	1	protein_coding	6,99E-18	3,92E-17	2,55E-05	4,63E-14	1,73E-15	0,004061476
ENSMUST00000040514	ENSMUSG00000038894	Irs2	2	1	protein_coding	6,01E-16	8,28E-12	3,24E-05	2,18E-12	1,93E-10	0,004574927
ENSMUST00000047906	ENSMUSG00000034640	Tiparp	2	3	protein_coding	7,84E-20	3,81E-20	0,000913	8,84E-16	2,28E-18	0,032971936

ENSMUST00000048289	ENSMUSG00000037868	Egr2	2	7	protein_coding	2,32E-13	4,25E-05	0,004386	4,85E-10	0,00023970	0,0824184
ENSMUST00000055738	ENSMUSG00000031431	Tsc22d3	2	6	protein_coding	4,91E-16	0,823474	0,187129	1,84E-12	0,87726414	0,550162795
ENSMUST00000057859	ENSMUSG00000048285	Frmd6	2	1	protein_coding	7,06E-13	5,17E-11	0,002184	1,24E-09	1,06E-09	0,054143718
ENSMUST00000064922	ENSMUSG00000052837	Junb	2	1	protein_coding	2,77E-20	0,065747	1,43E-07	4,22E-16	0,12809865	0,000181051
ENSMUST00000067543	ENSMUSG00000032501	Trib1	2	2	protein_coding	8,42E-17	3,46E-22	0,000892	3,65E-13	2,56E-20	0,032549711
ENSMUST00000069620	ENSMUSG00000055866	Per2	2	2	protein_coding	2,60E-16	0,492965	0,485087	1,05E-12	0,60897411	0,782413263
ENSMUST00000074043	ENSMUSG00000037465	Klf10	2	1	protein_coding	3,96E-13	4,26E-34	0,000492	7,56E-10	1,40E-31	0,022937004
ENSMUST00000079413	ENSMUSG00000024222	Fkbp5	2	6	protein_coding	4,54E-14	1,55E-20	0,249639	1,14E-10	9,66E-19	0,617892253
ENSMUST00000082432	ENSMUSG00000007682	Dio2	2	1	protein_coding	2,69E-17	5,58E-22	0,000472	1,44E-13	4,02E-20	0,022316398
ENSMUST00000091789	ENSMUSG00000041607	Mbp	2	16	protein_coding	4,62E-11	3,29E-05	0,001208	3,66E-08	0,00019132	0,038447597
ENSMUST00000093852	ENSMUSG00000066687	Zbtb16	2	1	protein_coding	1,07E-12	3,85E-37	0,000588	1,72E-09	2,03E-34	0,025483818
ENSMUST00000095759	ENSMUSG00000071341	Egr4	2	1	protein_coding	1,71E-15	9,00E-10	7,42E-09	5,89E-12	1,49E-08	2,29E-05
ENSMUST00000102752	ENSMUSG00000007617	Homer1	2	11	protein_coding	8,67E-20	1,66E-11	7,77E-07	8,88E-16	3,68E-10	0,00054966
ENSMUST00000107094	ENSMUSG00000052684	Jun	2	1	protein_coding	3,03E-11	0,106594	4,74E-06	2,66E-08	0,18846357	0,001571659
ENSMUST00000119013	ENSMUSG00000084390	Gm15425	2	1	processed_pseudo gene	1,14E-14	4,46E-20	0,030745	3,22E-11	2,65E-18	0,241567714
ENSMUST00000127492	ENSMUSG00000055407	Map6	2	9	protein_coding	8,21E-12	1,05E-12	0,000118	9,84E-09	2,79E-11	0,009765995
ENSMUST00000144016	ENSMUSG00000015090	Ptgds	2	5	retained_intron	2,89E-12	0,584009	0,010054	4,18E-09	0,68929409	0,131941548
ENSMUST00000147545	ENSMUSG00000048701	Ccdc6	2	4	protein_coding	1,35E-11	1,44E-07	0,00022	1,45E-08	1,51E-06	0,014135553
ENSMUST00000165033	ENSMUSG00000038418	Egr1	2	2	protein_coding	3,33E-16	1,13E-11	0,012716	1,29E-12	2,57E-10	0,150077977
ENSMUST00000184255	ENSMUSG00000099104	Gm17087	2	2	translated_process ed_pseudogene	1,18E-10	5,55E-14	0,019395	7,77E-08	1,74E-12	0,189431601
ENSMUST00000194534	ENSMUSG00000104339	C130089K02Rik	2	1	TEC	1,93E-11	2,83E-13	0,281777	1,93E-08	8,08E-12	0,646059169
ENSMUST00000197129	ENSMUSG00000105233	Gm20568	2	1	processed_pseudo gene	5,08E-11	0,978348	0,054449	3,92E-08	0,98572434	0,319770246
ENSMUST00000030623	ENSMUSG00000028820	Sfpq	3	6	protein_coding	4,26E-11	3,59E-17	0,001246	3,50E-08	1,59E-15	0,039092421
ENSMUST00000042970	ENSMUSG00000041695	Kcnj2	3	1	protein_coding	7,76E-15	9,80E-37	0,033161	2,30E-11	4,78E-34	0,251475743
ENSMUST00000083888	ENSMUSG00000065822	Snord15a	3	1	snoRNA	1,21E-10	0,265721	0,601674	7,88E-08	0,38393146	0,843542716
ENSMUST00000101327	ENSMUSG00000019189	Rnf145	3	6	protein_coding	1,16E-13	0,001507	0,244077	2,51E-10	0,00540627	0,612630653
ENSMUST00000113028	ENSMUSG00000045414	1190002N15Rik	3	1	protein_coding	4,59E-12	3,76E-21	0,000415	6,13E-09	2,48E-19	0,020641938
ENSMUST00000136387	ENSMUSG00000071337	Tia1	3	28	retained_intron	1,19E-10	1,69E-06	0,073244	7,77E-08	1,37E-05	0,366419212
ENSMUST00000142688	ENSMUSG00000049252	Lrp1b	3	12	protein_coding	4,51E-11	4,30E-11	0,290891	3,66E-08	8,91E-10	0,653758601

ENSMUST00000143918	ENSMUSG00000057738	Sptan1	3	16	retained_intron	5,86E-12	5,42E-10	0,493812	7,41E-09	9,38E-09	0,787111714
ENSMUST00000151951	ENSMUSG00000030207	Fam234b	3	5	retained_intron	2,53E-11	0,741756	0,483054	2,34E-08	0,81640510	0,781328345
ENSMUST00000155318	ENSMUSG00000020674	Pxdn	3	6	retained_intron	1,05E-11	1,01E-05	0,041334	1,20E-08	6,74E-05	0,280447206
ENSMUST00000167053	ENSMUSG00000039716	Dock3	3	11	retained_intron	8,44E-14	0,001432	0,040032	1,94E-10	0,00517530	0,276060667
ENSMUST00000182560	ENSMUSG00000002107	Celf2	3	28	retained_intron	1,72E-13	2,68E-19	0,005239	3,65E-10	1,46E-17	0,091006373
ENSMUST00000185616	ENSMUSG00000025964	Adam23	3	12	retained_intron	1,22E-11	9,73E-23	0,001965	1,33E-08	7,69E-21	0,050791794
ENSMUST00000187605	ENSMUSG00000056211	R3hdm1	3	16	retained_intron	2,98E-11	1,69E-05	2,11E-05	2,65E-08	0,00010668	0,003673644
ENSMUST00000192140	ENSMUSG00000103038	Gm37124	3	1	TEC	7,85E-11	0,431675	0,178505	5,67E-08	0,55163533	0,539901972
ENSMUST00000194138	ENSMUSG00000097451	Rian	3	19	TEC	2,25E-12	0,811925	0,343188	3,38E-09	0,86868276	0,691743952
ENSMUST00000194923	ENSMUSG00000104132	Gm36952	3	1	TEC	9,33E-11	6,17E-06	0,564006	6,49E-08	4,34E-05	0,8256299
ENSMUST00000195237	ENSMUSG00000103047	Gm37310	3	1	TEC	1,06E-12	0,604258	0,316734	1,72E-09	0,70669683	0,671794482
ENSMUST00000196343	ENSMUSG00000028134	Ptbp2	3	13	retained_intron	5,45E-11	0,211144	0,392488	4,12E-08	0,32166027	0,726242143
ENSMUST00000196431	ENSMUSG00000106448	Gm43486	3	1	TEC	4,65E-18	4,68E-08	0,006161	3,49E-14	5,49E-07	0,100303094
ENSMUST00000196998	ENSMUSG00000031229	Atrx	3	27	retained_intron	4,37E-12	0,155275	0,362261	5,93E-09	0,25347675	0,705239473
ENSMUST00000197044	ENSMUSG00000029614	Rpl6	3	8	retained_intron	1,47E-10	2,40E-06	0,377085	9,41E-08	1,87E-05	0,715337579
ENSMUST00000197850	ENSMUSG00000032482	Cspg5	3	5	protein_coding	2,52E-12	6,80E-11	0,033159	3,68E-09	1,37E-09	0,251475743
ENSMUST00000198757	ENSMUSG00000027797	Dclk1	3	15	retained_intron	2,46E-14	0,127844	0,059187	6,75E-11	0,21763873	0,332000475
ENSMUST00000200956	ENSMUSG00000107352	Gm43660	3	1	lincRNA	2,00E-11	0,295565	0,035394	1,96E-08	0,41662030	0,259720205
ENSMUST00000201368	ENSMUSG00000029106	Add1	3	15	retained_intron	3,96E-13	0,007312	0,066421	7,56E-10	0,02087641	0,349989885
ENSMUST00000202926	ENSMUSG00000106858	Gm43844	3	1	TEC	1,08E-10	9,25E-05	0,183453	7,31E-08	0,00047616	0,545880427
ENSMUST00000197548	ENSMUSG00000106001	Gm42826	3	1	TEC	3,11E-11	1,78E-06	0,719685	2,70E-08	1,43E-05	0,895795161
ENSMUST00000032071	ENSMUSG00000030002	Dusp11	4	8	protein_coding	7,99E-13	1,57E-16	0,763585	1,36E-09	6,52E-15	0,914032932
ENSMUST00000037029	ENSMUSG00000033960	9430020K01Rik	4	1	protein_coding	8,93E-13	1,39E-34	0,090783	1,50E-09	5,02E-32	0,405405025
ENSMUST00000041589	ENSMUSG00000037573	Tob1	4	1	protein_coding	7,78E-12	0,796664	0,337457	9,63E-09	0,85759164	0,687636508
ENSMUST00000049621	ENSMUSG00000048001	Hes5	4	2	protein_coding	8,32E-14	2,81E-05	0,004242	1,94E-10	0,00016638	0,080730495
ENSMUST00000108229	ENSMUSG00000028248	Pnir	4	13	protein_coding	3,51E-17	0,800696	0,77284	1,80E-13	0,86051032	0,918079635
ENSMUST00000117721	ENSMUSG00000021327	Zkscan3	4	6	protein_coding	1,05E-10	7,93E-06	0,127113	7,15E-08	5,44E-05	0,468210334
ENSMUST00000126280	ENSMUSG00000024163	Mapk8ip3	4	21	retained_intron	4,82E-11	0,358236	0,19631	3,77E-08	0,48033389	0,561228864
ENSMUST00000128851	ENSMUSG00000030795	Fus	4	16	retained_intron	2,27E-17	1,49E-08	0,713897	1,28E-13	1,93E-07	0,893539885
ENSMUST00000129577	ENSMUSG00000026034	Clk1	4	13	retained_intron	9,71E-13	1,62E-14	0,985274	1,61E-09	5,37E-13	0,99499706

ENSMUST00000135243	ENSMUSG00000036427	Gpi1	4	11	retained_intron	2,57E-15	8,06E-08	0,034992	8,27E-12	8,97E-07	0,258267668
ENSMUST00000143129	ENSMUSG00000073274	Gm14636	4	2	processed_trnscpt	1,68E-11	0,007947	0,061619	1,72E-08	0,02240459	0,33840886
ENSMUST00000143606	ENSMUSG00000056763	Cspp1	4	27	retained_intron	1,13E-11	0,981234	0,291427	1,26E-08	0,98768701	0,654139539
ENSMUST00000147610	ENSMUSG00000025512	Chid1	4	9	retained_intron	7,71E-14	1,33E-06	0,919427	1,85E-10	1,11E-05	0,971555598
ENSMUST00000153056	ENSMUSG00000021134	Srsf5	4	12	retained_intron	1,90E-24	1,73E-12	0,287075	7,14E-20	4,48E-11	0,650796539
ENSMUST00000162002	ENSMUSG00000024109	Nrxn1	4	26	retained_intron	3,43E-11	3,53E-21	0,254886	2,91E-08	2,33E-19	0,622602084
ENSMUST00000164104	ENSMUSG00000092090	Gm3294	4	1	lincRNA	4,62E-11	0,004547	0,023712	3,66E-08	0,01393638	0,210903014
ENSMUST00000183191	ENSMUSG00000098061	Gm26945	4	1	lincRNA	3,37E-20	2,96E-07	0,159493	4,22E-16	2,89E-06	0,515744803
ENSMUST00000196287	ENSMUSG00000104814	Gm42979	4	1	TEC	1,34E-12	0,007528	0,229714	2,10E-09	0,02139337	0,598933194
ENSMUST00000197342	ENSMUSG00000039735	Fnbp1l	4	5	retained_intron	7,32E-14	4,90E-08	0,93108	1,79E-10	5,72E-07	0,975266941
ENSMUST00000199134	ENSMUSG00000044365	Cxxc4	4	5	retained_intron	5,51E-13	1,36E-08	0,003326	1,00E-09	1,79E-07	0,069985066
ENSMUST00000200114	ENSMUSG00000059921	Unc5c	4	8	retained_intron	9,70E-14	5,71E-09	0,113396	2,14E-10	8,06E-08	0,446423096
ENSMUST00000202425	ENSMUSG00000107148	Gm42888	4	1	TEC	1,35E-11	5,36E-35	7,76E-07	1,45E-08	2,03E-32	0,00054966
ENSMUST00000203341	ENSMUSG00000030275	Etnk1	4	4	retained_intron	8,78E-11	2,36E-12	0,324059	6,14E-08	5,97E-11	0,677601836
ENSMUST00000204013	ENSMUSG00000029817	Tra2a	4	5	retained_intron	9,76E-21	0,011574	0,055924	1,83E-16	0,03070816	0,323624366

Dodatkowa Tabela S3. Lista białek regulatorowych wiążący się do sekwencji DNA genów o wspólnej ekspresji. Przedstawiono nazwę czynnika transkrypcyjnego, wartość p i p z poprawką Bonferroni dla każdej z wyróżnionych grup transkryptów o ekspresji regulowanej podaniem leków psychotropowych.

GRUPA 1			GRUPA 2			GRUPA 3			GRUPA 4		
Nazwa	pvalue	bonferroni	Nazwa	pvalue	bonferroni	Nazwa	pvalue	bonferroni	Nazwa	pvalue	bonferroni
GR_04	2.2E-13	4.9E-11	SRF_05	9.5E-34	2.1E-31	TBP_01	1.1E-13	2.3E-11	STAT5A_01	5.6E-6	0.0012
E2F1_01	5.2E-9	1.1E-6	SRF_02	1.6E-24	3.6E-22	TBP_02	3.7E-7	8.2E-5	E2F1_04	9.1E-6	0.002
TCF3_01	1.7E-8	3.7E-6	SRF_01	7.2E-20	1.6E-17				IRF1_04	9.9E-6	0.0022
MYOG_03	1.8E-8	4.0E-6	SRF_04	1.3E-19	2.9E-17				E2F1_03	1.2E-5	0.0027
GR_11	4.4E-8	9.7E-6	TCF3_01	1.2E-18	2.6E-16				IRF1_03	1.3E-5	0.0029
NFKB1_01	4.6E-8	1.0E-5	GR_04	7.5E-18	1.6E-15				IRF1_02	3.6E-5	0.008
ZMIZ1_01	6.3E-8	1.4E-5	E2F1_03	9.8E-17	2.1E-14				RDBP_01	4.4E-5	0.0096

MYOG_01	1.2E-7	2.7E-5	NFKB1_03	2.6E-16	5.6E-14
CEBPB_11	5.5E-7	1.2E-4	CTCF_08	9.7E-15	2.1E-12
NFKB1_03	1.7E-6	3.7E-4	GR_08	3.3E-14	7.2E-12
MYOG_02	1.9E-6	4.1E-4	EGR2_04	3.5E-14	7.6E-12
CEBPD_01	2.2E-6	4.7E-4	MYOG_03	4.5E-14	9.9E-12
HIF1A_02	2.2E-6	4.8E-4	MYOG_01	1.2E-13	2.6E-11
ETS1_01	2.9E-6	6.5E-4	SRF_03	3.0E-13	6.5E-11
E2F1_03	3.7E-6	8.0E-4	STAT2_03	2.0E-12	4.3E-10
GR_08	4.0E-6	8.8E-4	EGR2_01	4.0E-12	8.8E-10
AHR_04	4.9E-6	0.0011	E2F1_04	7.8E-12	1.7E-9
CEBPB_09	5.4E-6	0.0012	EGR1_04	8.3E-12	1.8E-9
NPAS4_02	7.8E-6	0.0017	REL_03	5.5E-11	1.2E-8
CEBPB_10	1.3E-5	0.0028	MYOD_02	1.4E-10	3.0E-8
RDBP_01	1.3E-5	0.0029	EGR1_02	1.7E-10	3.7E-8
E2F1_04	1.4E-5	0.0031	EGR2_03	1.9E-10	4.2E-8
MYOD_01	3.1E-5	0.0068	ETS1_01	5.6E-10	1.2E-7
MAX_04	3.4E-5	0.0074	EGR2_02	6.6E-10	1.5E-7
CEBPD_02	6.1E-5	0.013	MYOG_02	2.1E-9	4.6E-7
MYOD_02	6.2E-5	0.014	MYOD_01	4.4E-9	9.6E-7
NFKB1_04	9.4E-5	0.021	ETS1_02	4.8E-9	1.1E-6
E2F4_05	1.5E-4	0.032	E2F1_01	1.1E-8	2.3E-6
GR_10	1.6E-4	0.035	IRF4_03	3.1E-8	6.8E-6
GR_03	2.0E-4	0.044	NFKB1_01	3.3E-8	7.3E-6
			BHLHE40_01	4.4E-8	9.6E-6
			STAT3_02	7.5E-8	1.6E-5
			NPAS4_02	8.5E-8	1.9E-5
			UBTF_01	8.6E-8	1.9E-5
			REL_02	9.2E-8	2.0E-5
			REL_04	9.2E-8	2.0E-5
			EGR1_03	1.2E-7	2.6E-5
			ETS2_03	1.6E-7	3.6E-5
			RELA_03	1.9E-7	4.2E-5

NPAS4_01	4.4E-5	0.0097
NFKB1_02	7.3E-5	0.016
STAT2_03	7.4E-5	0.016
EGR1_01	1.0E-4	0.023
EGR1_03	1.4E-4	0.03
RELB_03	1.9E-4	0.042
IRF1_01	1.9E-4	0.042

	E2F4_05	2.1E-7	4.5E-5
	HIF1A_04	2.5E-7	5.6E-5
	IRF4_01	2.9E-7	6.4E-5
	MYOD_03	3.2E-7	7.1E-5
	RELB_03	3.6E-7	7.9E-5
	RELB_04	3.6E-7	7.9E-5
	HIF1A_01	6.4E-7	1.4E-4
	MAX_04	6.5E-7	1.4E-4
	RELA_02	6.8E-7	1.5E-4
	CTCF_06	9.6E-7	2.1E-4
	AHR_04	1.2E-6	2.6E-4
	RELA_04	1.9E-6	4.1E-4
	NFKB1_04	2.6E-6	5.8E-4
	GR_10	2.8E-6	6.2E-4
	E2F1_02	3.1E-6	6.9E-4
	MAZ_01	5.2E-6	0.0011
	MAZ_01	5.5E-6	0.0012
	REL_01	5.5E-6	0.0012
	MAX_03	5.9E-6	0.0013
	JUNB_03	5.9E-6	0.0013
	IRF4_02	9.3E-6	0.002
	GR_03	9.8E-6	0.0021
	CTCF_04	1.0E-5	0.0022
	E2F4_06	1.1E-5	0.0023
	AHR_03	1.2E-5	0.0025
	EGR1_01	1.3E-5	0.0028
	ETS2_04	1.6E-5	0.0035
	RELB_02	1.6E-5	0.0036
	RELB_05	1.6E-5	0.0036
	CTCF_05	1.7E-5	0.0037
	IRF1_01	1.8E-5	0.0041
	CTCF_07	1.9E-5	0.0042

	STAT3_04	2.2E-5	0.0047
	CEBPD_01	2.4E-5	0.0053
	IRF1_04	2.4E-5	0.0053
	CBP_05	2.5E-5	0.0055
	TCF12_01	3.4E-5	0.0075
	JUNB_02	4.2E-5	0.0091
	CEBPB_09	6.7E-5	0.015
	JUNB_04	7.4E-5	0.016
	ETS2_02	7.7E-5	0.017
	STAT2_04	8.1E-5	0.018
	RUNX_03	8.1E-5	0.018
	HIF1A_02	8.6E-5	0.019
	IRF1_03	1.1E-4	0.025
	CREB1_04	1.3E-4	0.028
	ZC3H11A_01	1.3E-4	0.029
	MAFF_04	1.6E-4	0.036
	NFKB1_02	1.8E-4	0.039
	AHR_01	2.0E-4	0.044
	ATF3_04	2.1E-4	0.047
	CEBPD_02	2.3E-4	0.049

Dodatkowa Tabela S4. Tabela podsumowująca ponowną analizę wyników RNA-seq dla locus *Dclk1* z dodanym wariantem *Dclk1-m*. Przedstawiono wyniki jednoczynnikowej ANOVA dla tkanek NAc i PFCx. Dla każdego transkryptu przedstawiono zlogarytmowaną zmianę ekspresji w porównaniu do kontroli solnej, wartość p i FDR dla każdego leku.

Nazwa izoformy	Transcript ID	p.value RIS	p.fdr RIS	fold RIS	p.value HAL	p.fdr HAL	fold HAL	p.value MET	p.fdr MET	fold MET	p.value KET	p.fdr KET	fold KET	p.value WEN	p.fdr WEN	fold WEN	p.value MIA	p.fdr MIA	fold MIA	anova	anova .fdr
NAc																					
Dclk1-m	CUFF.5.4	0,000357416	0,008935406	0,542	0,000193285	0,004832122	0,271	0,063550936	0,39719335	-0,08	0,00024531	0,004247057	0,18	0,005173423	0,067254504	0,174	1,05E-07	2,72E-06	0,862	1,97E-12	5,13E-11
Cpg16	ENSMUST00000070418	0,8857104	0,9076025	0,04	0,7887602	0,9789614	0,073	0,5840726	0,9241099	0,135	0,0311764	0,0779409	0,608	0,0342217	0,2965881	0,131	0,0313359	0,1777159	0,352	0,0119831	0,0311562
Dcl	ENSMUST0000	0,49261	0,76970	0,09	0,15620	0,85727	0,31	0,00021	0,0053	0,63	0,00050	0,00424	0,61	0,89123	0,99866	0,017	0,9501	0,95865	0,014	0,015	0,035

	0167204	17	58	4	47	95	4	55	873	8	96	71	9	34	54		442	13		107	1536
Carp	ENSMUST0000 0199585	0,35466 44	0,73835 44	0,19 9	0,95384 06	0,97896 14	0	0,52662 09	0,9241 099	0	0,39104 68	0,44437 14	0	0,35599 72	0,77132 72	0,001	0,0387 223	0,17771 59	0,586	0,016 2247	0,035 1536
Cpg16	ENSMUST0000 0198437	0,48827 24	0,76970 58	0,04 4	0,08432 77	0,70273 07	0,13 5	0,43412 91	0,9241 099	0,05 3	0,01654 36	0,06893 16	0,25 5	0,97599 78	0,99866 54	0,003	0,7387 175	0,91460 26	0,037	0,023 7512	0,047 5024
Dclk1	ENSMUST0000 0054237	0,70869 31	0,90760 25	0,29 5	0,84633 41	0,97896 14	- 0,20 5	0,36097 9	0,9241 099	- 0,87 3	0,02099 22	0,07497 22	- 2,27 3	0,15667 24	0,60368 86	-0,5	0,6008 482	0,82221 33	- 0,413	0,062 125	0,100 9532
RI	ENSMUST0000 0198757	0,40253 78	0,73835 44	0,20 2	0,83518 14	0,97896 14	0,06 1	0,72452 76	0,9241 099	0,08 4	0,03007 3	0,07794 09	0,66 5	0,42283 01	0,78525 59	0,088	0,6552 734	0,85185 54	0,182	0,417 508	0,493 4185
	ENSMUST0000 0199169	0,04032 96	0,33607 98	0,45 5	0,04813 59	0,60169 93	0,35 3	0,00671 26	0,0839 081	0,46 2	0,24974 78	0,32861 56	0,14 9	0,97809 99	0,99866 54	0,008	0,0410 114	0,17771 59	0,568	0,005 9163	0,019 2114
	ENSMUST0000 0199702	0,65324 89	0,90729 02	0,15 9	0,58254 36	0,97896 14	0,24 8	0,28958 08	0,9241 099	- 0,49 4	0,18404 1	0,25561 25	- 0,49 3	0,16253 15	0,60368 86	- 0,473	0,4247 893	0,73630 15	- 0,239	0,026 2982	0,048 8396
	ENSMUST0000 0197870	0,30878 64	0,73835 44	- 0,67	0,93084 31	0,97896 14	- 0,07 4	0,75807 63	0,9241 099	- 0,23 9	0,03875 76	0,08074 51	1,24 7	0,57932 26	0,83280 71	- 0,234	0,1823 345	0,47406 96	- 0,795	0,086 4245	0,132 1787
	ENSMUST0000 0198821	0,90439 36	0,90760 25	0,07 9	0,41615 86	0,97896 14	0,56 6	0,96916 09	0,9744 748	- 0,02 5	0,03543 77	0,08054 03	1,08	0,31183 99	0,77132 72	- 0,402	0,5537 248	0,79982 48	0,289	0,179 8441	0,246 1025
	ENSMUST0000 0196745	0,90760 25	0,90760 25	0,06 3	0,20574 71	0,85727 95	0,55 3	0,66771 73	0,9241 099	- 0,19 1	0,36121 35	0,43001 61	0,50 2	0,60858 98	0,83280 71	0,197	0,5070 331	0,77849 43	0,205	0,200 9546	0,261 241
	ENSMUST0000 0200352	0,38075 68	0,73835 44	0,20 5	0,70716 27	0,97896 14	- 0,13 3	0,10235 92	0,5117 961	0,42 2	0,27012 76	0,33765 95	0,25 8	0,07475 36	0,48589 86	0,25	0,2629 904	0,62161 36	0,138	0,288 1312	0,356 7339
	ENSMUST0000 0198412	0,05818 79	0,36367 42	- 1,41 8	0,45253 4	0,97896 14	- 0,39 4	0,13264 65	0,5526 936	- 1,22 6	0,18291 66	0,25561 25	- 0,70 3	0,99866 54	0,99866 54	- 0,002	0,3646 471	0,67720 18	- 0,888	0,671 3924	0,727 3418
	ENSMUST0000 0200348	0,55862 32	0,82150 47	- 0,58 3	0,90275 72	0,97896 14	-0,14	0,77625 23	0,9241 099	0,17 2	0,55009 31	0,57301 37	- 0,36 6	0,52529 3	0,83280 71	- 0,308	0,9586 513	0,95865 13	0,022	0,825 0161	0,825 0161
	ENSMUST0000 0198154	0,35737 39	0,73835 44	- 0,35 2	0,69507 66	0,97896 14	- 0,22 4	0,44554 78	0,9241 099	- 0,74 1	0,52466 15	0,57028 43	0,28 5	0,81278 87	0,99866 54	- 0,111	0,5090 155	0,77849 43	- 0,511	0,805 967	0,825 0161
PFCx																					
Dclk1-m	CUFF.5.4	0,00186 7091	0,02427 218	0,33 8	0,05282 9244	0,64042 2125	0,12 2	0,06910 0767	0,2566 5999	0,09 4	0,04569 3834	0,23760 7936	0,10 2	0,23518 9126	0,67943 5252	- 0,074	2,61E- 05	0,00067 8984	0,679	7,91E- 10	2,06E- 08
Cpg16	ENSMUST0000 0198437	0,03080 29	0,20021 89	0,40 2	0,73033 47	0,86312 28	0,10 2	0,02215 45	0,1440 039	0,46 8	0,59699 33	0,73913 46	0,09 1	0,18376 46	0,64254 87	- 0,184	0,7216 963	0,81264 77	0,051	0,176 5227	0,363 0339
Dcl	ENSMUST0000	0,02945	0,20021	0,32	0,07389	0,64042	0,34	0,00381	0,0991	0,65	0,02296	0,19905	0,44	0,02504	0,23532	-	0,0620	0,20019	-	0,131	0,363

	0167204	72	89	4	49	21	7	48	836	9	73	02	4	84	65	0,261	485	65	0,213	5239	0339
Carp	ENSMUST0000 0199585	0,35596 78	0,61701 09	- 0,09 4	0,35591 77	0,77730 64	- 0,09 4	0,35593 76	0,6169 585	- 0,09 4	0,35611 6	0,70248 7	- 0,09 4	0,35584 62	0,71183 54	0,095	0,3850 146	0,52686 2	0	0,445 6281	0,746 3122
Cpg16	ENSMUST0000 0070418	0,11028 48	0,39446 84	0,38 2	0,31581 34	0,77730 64	0,27	0,12151 26	0,2872 116	0,45	0,15861 65	0,51550 36	0,36 7	0,78736 88	0,94492 95	- 0,038	0,7501 363	0,81264 77	- 0,102	0,816 1223	0,922 5731
Dclk1	ENSMUST0000 0054237	0,15171 86	0,39446 84	- 0,21 7	0,38993 85	0,77730 64	- 0,15 7	0,01892 08	0,1440 039	- 0,56 5	0,01079 59	0,14034 71	- 0,40 9	0,82216 18	0,94492 95	0,066	0,6122 878	0,72361 29	0,201	0,305 4171	0,567 2033
RI	ENSMUST0000 0198757	0,59394 93	0,73536 58	0,20 4	0,63863 35	0,79068 92	- 0,21 8	0,93409 93	0,9340 993	0,03 3	0,81934 03	0,86137 55	0,08 3	0,75700 84	0,94492 95	- 0,111	0,8618 108	0,89628 32	0,056	0,576 0688	0,788 3047
	ENSMUST0000 0198154	0,62885 42	0,74319 13	- 0,08 8	0,43323 45	0,77730 64	0,17 6	0,07984 9	0,2595 092	- 0,48 4	0,24825 85	0,70248 7	- 0,42 3	0,19770 73	0,64254 87	0,646	0,3225 668	0,52686 2	0,507	0,016 0512	0,083 4662
	ENSMUST0000 0197870	0,90046 63	0,90046 63	0,07 8	0,63594 58	0,79068 92	0,27 4	0,65484 81	0,7925 367	0,29	0,52518 56	0,71867 5	- 0,40 3	0,98865 15	0,98865 15	- 0,004	0,1592 015	0,41392 39	- 1,481	0,086 8521	0,320 5586
	ENSMUST0000 0200352	0,77803 15	0,80915 27	0,08 2	0,18717 19	0,77730 64	0,27 2	0,05771 31	0,2500 902	0,45 5	0,41658 84	0,70248 7	0,24 2	0,60581 36	0,94492 95	- 0,088	0,0583 555	0,20019 65	0,423	0,098 6334	0,320 5586
	ENSMUST0000 0199169	0,77527 23	0,80915 27	0,08 6	0,60948 62	0,79068 92	0,16 8	0,22145 45	0,4429 089	0,39 2	0,95510 97	0,95510 97	- 0,01 9	0,72418 9	0,94492 95	0,081	0,0692 988	0,20019 65	0,554	0,177 2624	0,363 0339
	ENSMUST0000 0198412	0,10413 13	0,39446 84	- 1,69 1	0,48566 1	0,78919 9	- 0,53 1	0,10223 83	0,2658 196	- 1,41 5	0,68665 02	0,78974 82	- 0,19 9	0,27894 13	0,71183 54	1,179	0,4874 394	0,63367 12	0,756	0,145 5418	0,363 0339
	ENSMUST0000 0199702	0,21767 71	0,51450 94	- 0,27 7	0,63240 97	0,79068 92	0,08 4	0,19292 89	0,4180 127	- 0,52 3	0,36056 79	0,70248 7	- 0,27 2	0,77722 52	0,94492 95	0,087	0,3666 983	0,52686 2	0,308	0,492 3522	0,746 3122
	ENSMUST0000 0198821	0,54931 51	0,72938 93	- 0,24	0,31486 58	0,77730 64	0,18 1	0,4596	0,6844 285	0,21 3	0,48633 71	0,70248 7	- 0,39 7	0,64198 85	0,94492 95	- 0,238	0,9678 859	0,96788 59	- 0,019	0,655 9941	0,852 7923
	ENSMUST0000 0200348	0,32657 66	0,60649 93	1,14 5	0,31844 6	0,77730 64	1,19 5	0,38718 99	0,6291 837	1,01	0,47297 19	0,70248 7	0,84 2	0,30765 77	0,71183 54	0,375	0,3723 45	0,52686 2	0,368	0,782 1506	0,922 5731
	ENSMUST0000 0196745	0,51967 24	0,72938 93	0,15 8	0,78519 93	0,88761 66	- 0,16 2	0,27234 62	0,5057 858	0,22 7	0,56030 98	0,72840 27	0,19 5	0,59980 41	0,94492 95	0,242	0,5716 58	0,70776 7	0,238	0,961 6142	0,961 6142