dr n. med. Marcin Trejter

AUTOREFERAT

Poznań 2016

Spis treści

1. Imię i nazwisko _____ 3
2. Wykaz posiadanych dyplomów i stopni naukowych_____ 3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych_____ 3
4. Przebieg pracy zawodowej_____ 4
5. Osiągnięcie naukowe i jego omówienie
   5.1 Tytuł i cykl prac_____ 5
   5.2 Omówienie osiągnięcia naukowego_____ 6
6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych
   6.1 Analizy bibliometryczne_____ 28

1. Imię i nazwisko

Marcin Trejter
mtrejter@gmail.com
Skórzewo ul. Wiosenna 42
60- 185 Poznań

2. Wykaz posiadanych dyplomów i stopni naukowych.

1.1 Dyplom ukończenia Akademii Medycznej w Poznaniu im. K. Marcinkowskiego Wydział Lekarski I – 1999;

1.2 Rozprawa doktorska.
Stopień naukowy doktora nauk medycznych na podstawie rozprawy doktorskiej pt.: „System neuromedyn U i S oraz ich receptorów w osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej szczura. Badania nad rolą tego systemu w regulacji wzrostu kory nadnercza" uzyskany w dniu 11. kwietnia 2007
Promotor: Prof. dr hab. Ludwik K. Malendowicz
Recenzenci: Prof. dr hab. Krzysztof Nowak
Prof. dr hab. Wiesław H. Trzeciak

2. Informacje o dotychczasowym zatrudnienie w jednostkach naukowych.

3.1 Stanowisko asystenta w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii Akademii Medycznej od 1999- do 2008

3.2 Stanowisko adiunkta w Katedrze i Zakładzie Histologii Embriologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu od X. 2008 – X. 2016

4. Przebieg pracy zawodowej.

Jako student III roku wydziału lekarskiego aktywnie uczestniczyłem w pracach Koła Naukowego w Katedrze i Zakładzie Histologii prowadzonego przez Prof. dr hab. Ludwika K. Malendowicza. Tutaj pod okiem prowadzącego zdobywałem niezbędne umiejętności do analizy preparatów histologicznych, oceny indeksów mitotycznych oraz poznawałem nowe techniki badawcze.

Pozytywne wzajemne relacje panujące w zespole mojego opiekuna motywowały mnie do aktywnego udziału w pracach badawczych. Z chęcią zdobywałem nowe umiejętności. Wiele godzin spędzałem na analizach obrazów histologicznych, analizując podziały komórkowe. Poznałem statystyczne sposoby analizy uzyskanych wyników. Szeroki wachlarz możliwości, który został przede mną postawiony oraz życzliwość wszystkich osób w Zakładzie Histologii pozwoliły mi na aktywny udział w prowadzonych doświadczeniach. Zacząłem wykonywać analizy morfometryczne oglądanych przeze mnie preparatów histologicznych, wykonywałem barwienia immunohistochemiczne, przygotowywałem preparaty histologiczne oraz podjąłem próbę założenia hodowli komórek nadnerczowych.

Prace przy hodowli komórek prowadziłem łącznie z innymi studentami aktywnie działającymi w kole naukowym. Wiele godzin spędzałem na ocenach preparatów histologicznych wyliczając indeksy mitotyczne w nadnerczach, w grasicach i w warstwach regenerujących nadnerczy. Wykonywałem różnego rodzaju zabiegi na zwierzętach doświadczalnych : enukleacje, gonadektomie, usuwanie tarczycy. Dokonywałem wstrzyknięć podskórnych i dootrzewnowych u szczurów w doświadczeniach. Brałem udział w licznych sekcjach szczurów pobierając od nich narządy np. nadnercza, przysadki, podwzgórza, jądra, jajniki. Już jako student starałem się analizować dostępne prace w zakresie działania i regulacji osi podwzgórzowo- przysadkowo-nadnerczowej.

Z chwilą ukończenia studiów byłem już współautorem 6. publikacji których łączny IF = 8,034

Po ukończeniu studiów zostałem zatrudniony w Katedrze Histologii jako asystent. Zacząłem prowadzić zajęcia ze studentami pierwszego i drugiego roku wydziału lekarskiego i lekarsko-dentystycznego z histologii i cytofizjologii. Jednocześnie brałem udział w prowadzonych doświadczeniach pod kierownictwem prof. dr hab. Ludwika K. Malendowicza stając się członkiem zespołu.

Prowadzone badania umożliwiły mi napisanie rozprawy doktorskiej w roku 2007.

Przed uzyskaniem stopnia doktora nauk medycznym byłem współautorem 28. publikacji z łącznym IF-41,83 a po 9. publikacji o IF-18,66

5.1 Tytuł i cykl prac :

„Analiza transkryptomu w komórkach nadnerczy dojrzałych płciowo szczurów samców i samic."

- praca na podstawie cyklu trzech publikacji.

1. **Trejter, M.,** Hochół, A., Tyczewska, M., Ziółkowska, A., Jopek, K., Szyszka, M., Malendowicz, L.K., Ruciński, M., (2015):

   Sex-related gene expression profiles in the adrenal cortex in the mature rat: Microarray analysis with emphasis on genes involved in steroidogenesis.

   Int. J. Mol. Med. 35, 702-714

   IF 2,088

   Punktacja Min. Nauki: 20.000

2. **Trejter, M.,** Jopek, K., Celichowski, P., Tyczewska, M., Malendowicz, L.K., Ruciński, M., (2015):

   Expression of estrogen, estrogen related and androgen receptors in adrenal cortex of intact adult male and female rats

   Folia Histochem Cytobiol. 53, 133-144

   IF 1,364

   Punktacja Min. Nauki: 15.000

3. **Trejter, M.,** Hochół, A., Tyczewska, M., Ziółkowska, A., Jopek, K., Szyszka, M., Malendowicz, L.K., Ruciński, M., (2015):

   Visinin-likepeptide 1 in adrenal gland of the rat. Gene expression and its hormonal control.

   Peptides 63, 22-29

   IF 2,618

   Punktacja Min. Nauki: 25.000

Łączny IF (ww. publikacji): 6,07

Łączna Punktacja Min. Nauki: 60

5.2 Omówienie prac będących podstawą osiągnięcia naukowego

„Analiza transkryptomu w komórkach nadnerczy dojrzałych płciowo szczurów samców i samic "

W 1913 r Hatai zauważył, że nadnercza u dorosłych samic szczurów są większe niż nadnercza u samców. Z opublikowanej pracy z wynika, że te różnice płciowe w wielkości nadnerczy wynikają z hamującego wpływu testosteronu na oś HPA (podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczową). W późniejszych latach doniesienie to potwierdzili m.in Hashimoto (1940), Mandl (1962) oraz Malendowicz (1974) Carlson i wsp. (1937) opisuje różnice w wielkości komórek kory nadnercza szczura, jednak nie podaje żadnych konkretnych danych morfometrycznych w poszczególnych warstwach. W 1954 r. Bachmann publikuje dane, iż dorosłe samice szczurów mają cięższe nadnercza niż samce w tym samym wieku. Różnica ta występuje tylko po osiągnięciu dojrzałości płciowej i jest zależna od hormonów płciowych. Natomiast Pappritz i wsp. (1972) nie zauważa różnic w proliferacji komórek nadnerczy u samic i samców od ostatnich dni ciąży do 12 tygodnia życia. W 1961 Kitay publikuje pracę, w której zauważona większe stężenie kortykosteronu w osoczu u samic względem samców. W analizach morfometrycznych warstwy kłębkowej (ZG) wykonanych przez Malendowicza i wsp. (1986) wykazano, że średnie wielkości komórek, jąder, mitochondriów, SER i kropli lipidowych są takie same u obu płci, natomiast w warstwie pasmowatej (ZF) średnia objętość komórek wraz z jej parametrami sterologicznymi jest większa u samic. Ponadto u samic szczurów wyższy jest poziom hormonu adrenokortykotropowego (ACTH) i odpowiedzi kortykosteronu na stres, reakcje te są modyfikowane przez gonadektomię i hormony płciowe (Leśniewska i wsp. 1990).

Z powyższego krótkiego przeglądu piśmiennictwa wynika, że u różnych gatunków ssaków struktura i czynność kory nadnercza jest różna u płciowo dojrzałych samców i samic, przy czym uzależniona jest ona zarówno od estrogenów jak i androgenów. Wspomniane hormony płciowe mogą regulować aktywność biologiczną kory nadnercza na drodze pośredniej - poprzez działanie na poziomie podwzgórza oraz przysadki mózgowej (oś HPA - podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowa), jak również bezpośrednio - na poziomie samych komórek korowonadnerczowych. Działanie bezpośrednie zarówno estrogenów jak i androgenów może być wywierane za pośrednictwem specyficznych receptorów, jak również poprzez ich interferencję (w szczególności androgenów lub ich pochodnych) w szlakach steroidogenezy.

Do tej pory opublikowano niewiele informacji na temat różnic w ekspresji genów w nadnerczach w odniesieniu do płci. Dostępna literatura jest dość skąpa w informacje na temat receptorów androgenów i estrogenów w nadnerczach, jednocześnie nie zawiera danych na temat analizy ekspresji genów w nadnerczach samców i samic szczurów. Istnieją prace skupiające się na badaniu pojedynczych genów w obrębie nadnerczy samców i samic np. Hcrtr2 (Jöhren i wsp. 2001, 2004). Molekularne podstawy tych różnic są jednak mało poznane.

Profilowanie globalnej ekspresji genów pozwala na jednoczesną analizę tysięcy genów w jednej próbce. To potężne narzędzie biologii molekularnej jest powszechnie używane, między innymi do biologicznych badań podstawowych jak i do diagnostyki. Ta metoda również została użyta do badań nad nadnerczem. W ostatnich latach wzrasta liczba wygenerowanych danych łączących ekspresje genów z biologią nadnercza. Pierwsze doniesienia w tej dziedzinie były skupione na profilach genów kodujących enzymy biorące udział w steroidogenezie w gruczolakach produkujących aldosteron (APA) i innych rakach kory nadnercza (Assie i wsp. 2005, Wilmot i wsp. 2013).

Metody profilowania genetycznego zastosowane w badaniach nad świeżo wyizolowanymi komórkami kory nadnercza lub zdefiniowanymi liniami komórkowymi (Y1, H295R ludzka linia komórek kory nadnercza), pozwalają na identyfikacje licznych genów zaangażowanych we wzrost i funkcje kory nadnercza oraz dostarczają nowe dane z wewnątrzkomórkowych szlaków regulacji wydzielania aldosteronu i kortyzolu (Schimmer i wsp. 2006).

Analiza transkryptomów zostały również przeprowadzone w doświadczeniach *in vivo*. Dzięki tej metodzie zbadano dobowe regulacje genów zaangażowanych w proces biosyntezy hormonów steroidowych w nadnerczach szczura.

U myszy z wyciszonym genem Star, liczne nadekspresje jak i obniżenie ekspresji genów zostały opisane przez (Ishiiii i wsp. 2012). Co więcej, ostatnie badania nad regulacją systemu renina-angiotensyna-aldosteron (RAA) w nadnerczach szczurów zidentyfikowały transkrypty odpowiedzialne za aktywacje układu RAA (Nnishimoto i wsp. 2014). Analizę transkryptomu przeprowadzono też w modelu regenerującego nadnercza (Tyczewska i wsp. 2014). Z powyższych danych wynika, że w eksperymentach *in vivo* metody profilowania genetycznego są używane głównie do dowiedzenia funkcji nadnercza w eksperymentalnie zmienionych warunkach, nie biorąc pod uwagę rytmu dobowego biosyntezy hormonów steroidowych. Nishimoto i wsp. 2012 zbadali różnice w ekspresji transkryptów w ZG i ZF w nadnerczach dorosłych samców szczura. Okazało się, że w ZG ekspresja 235 transkryptów była

podwyższona 2-krotnie, podczas gdy w ZF podwyższeniu uległo 231 transkryptów.- u samic względem dojrzałych płciowo samców.

Dokonaliśmy podobnej analizy nadnerczy dojrzałych płciowo samców i samic szczura W naszych badaniach, u obu płci liczba różniących się ekspresją transkryptów w ZG i ZF/R nadnerczy była znacząco wyższa niż poprzednio stwierdzona w ZG i ZF. Badania wykonane przez (Nishimoto i wsp. 2012) zidentyfikowały 466 takich transkryptów, natomiast uzyskane przez nas dane pokazały 571 vs 702 (samiec/samica) zmienionych transkryptów.

Dlatego głównym celem zaprezentowanej pracy, było scharakteryzowanie analizy transkryptomu w poszczególnych strefach kory nadnerczy - dojrzałych płciowo samców i samic szczura. Analiza ta umożliwiła określenie różnic płciowych transkryptomu nadnerczy szczura, zarówno w obrębie strefy kłębkowatej (ZG). jak i pasmowatej/siatkowatej (ZF/R).

Przy wykorzystaniu mikromacierzy ekspresyjnych firmy Affymetrix (macierze - Affymetrix® Rat Gene 1.1 ST Array), przeanalizowaliśmy ekspresję 23586 genów.

Wyniki dokonanej analizy zostały opublikowane w 3. publikacjach wchodzących w zakres głównego doniesienia naukowego.

Publikacja pierwsza:

Trejter, M., Hochól, A., Tyczewska, M., Ziółkowska, A., Jopek, K., Szyszka, M., Malendowicz, L.K., Ruciński, M., (2015):
Sex-related gene expression profiles in the adrenal cortex in the mature rat: Microarray analysis with emphasis on genes involved in steroidogenesis.
Int. J. Mol. Med. 35, 702-714

Celem pracy było porównanie globalnego profilu ekspresji genów w nadnerczach dojrzałych płciowo szczurów samic i samców, w aspekcie różnic płciowych. (rasa Wistar, samice w fazie estrus)

Profil transkryptomu określono w odniesieniu do warstwy kłębkowatej (ZG) i pasmowatej/siatkowatej (ZF/ZR) u dojrzałych płciowo samców i samic szczurów. Spośród genów różnicujących, szczególną uwagę poświecono genom uczestniczącym w procesie syntezy hormonów steroidowych.

Wyniki ekspresji genów poddano analizie na wykresie typu scatter plot - 17 genów wykazało zróżnicowanie równocześnie w ZG jak i w ZF/R. Natomiast 15 z nich zróżnicowało się tylko i wyłącznie w ZG w porównaniu do 233 genów w ZF/R. W warstwie kłębkowatej (ZG), 8 genów uległo podwyższonej minimum 2 krotnie ekspresji, a 24 minimum 2 krotnemu obniżeniu. Natomiast w warstwach pasmowatej i siatkowatej (ZF/ZR) podwyższeniu uległo

87 genów vs 146 obniżeniu. Łącznie u samców zanotowano podwyższoną ekspresję dla 448 genów i obniżoną dla 123, a u samic 519 genów z podwyższoną ekspresją względem 183 o obniżonej ekspresji.

Następnie przeprowadziliśmy analizę funkcjonalną SEA z wykorzystaniem pakietu GeneAnswers z BioConductor, która między innymi pozwala na interpretację listy genów w kontekście ich udziału w pewnym, konkretnym procesie biologicznym (GO.BP). Wyniki analizy genów, które uległy zmianom ekspresji ujawniły 17 grup genów z różnych profili funkcjonalnych.

Ponieważ analiza ta dała raczej niezadowalające wyniki, postanowiliśmy przeanalizować nasze wyniki za pomocą systemu DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery).

Przeprowadzono odrębne analizy dla ZG i ZF/R. Dla ZG z wybraną wartością odcięcia ($p < 0,05$), wyodrębniono 3 klastry, a w przypadku ZF/R otrzymano 5 klastrów. Wszystkie te klastry (ZG i ZF/R) dotyczyły 516 genów. Wskazuje to, że wiele genów uczestniczyło w więcej niż jednym klastrze adnotacji. W ZG zliczono 90 genów regulowanych w górę lub w dół a w ZF/R liczba ta była znacznie wyższa - 426. Dla ZG klaster 1 i 2 połączył geny biorące udział w regulacji transportu jonów, natomiast klaster 3 zawierał geny które w opisie związane są z odpowiedzią na hormony.

W przypadku ZF/R 1 klaster łączył geny regulujące biosyntezę i metabolizm steroidów. Klaster 2 zawierał geny związane, przede wszystkim, z frakcjami komórkowymi, a klaster 3 (z 13 subklastrami) łączył geny związane przede wszystkim, z procesami utleniania/redukcji. Klaster 4 składał się z genów regulujących reakcje na składniki odżywcze i pozakomórkowe bodźce lub bodźce hormonów steroidowych. Klaster 5 zawierał również geny zaangażowane w odpowiedzi na bodźce, wśród których były: "odpowiedź na bodziec hormonalny" (podklaster 2) i "reakcja na bodziec hormonów peptydowych" (podklaster 7).

Następnie przeanalizowano listę genów, których ekspresja została wyraźnie zmieniona w ZG i ZF/R, w nadnerczach dorosłych samic szczurów w porównaniu do samców.

Spośród tych genów poziomy ekspresji dioksygenazy cysteiny typu 1 (Cdo1); białko łączenia, alfa 1 (Gja1); dehydrogenazy izocytrynianowej 1 (Idh1) i fosfolipazy A2, grupy IVA (Pla2g4a) były niższe a syntazy tlenku 1 (Nos1) była wyższa w ZG u samic szczurów w porównaniu z samcami. Bardziej wyraźne różnice zaobserwowano w strefach ZF/R. Wśród 19 genów, stanowiących wyżej wymieniony podklaster, poziomy ekspresji 7 genów były wyższe, a 10 niższe w nadnerczach szczurów samic względem samców. Wyższe poziomy ekspresji obserwowano m.in dla: alfa-2-makroglobuliny (A2m); białka morfogenetycznego

kości 7 (Bmp7); cytochromu P450, rodzina 11 podrodzina a, polipeptyd1 (Cyp11a1); insulino podobnego czynnika wzrostu wiążącego białko 2 (Igfbp 2); syntazy tlenku azotu (Nos1), receptora jądrowego (Nr0b1), tkankowego aktywatora plazminogenu (Plat). Niższe poziomy ekspresji u samic względem samców obserwowano m.in. dla: proto-onkogenu B (Cbl); E3 ligazy białka ubikwityny (Cblb); dioksygenazy cysteiny (Cdo1); dehydrogenazy dihydropirydymidowej (Dpyd); Foxo1; Gja1; Idh1; mucyny 4 (Muc 4); kinazy fosfoinozytolu 3, podjednostki regulacyjnej 1 alfa (Pik3r1); sulfotransferazycytozolowej (Sult1a1) i transformującego czynnika wzrostu beta, receptora III (Tgfbr3).

Ponadto, analizy genów z ZF/R reprezentowane w klastrze 1 - podklaster „metabolizm procesów steroidowych" pokazały wiele genów o płciowo zróżnicowanej zmienionej ekspresji. Geny o niższej ekspresji u samic w porównaniu do samców to 4 geny: ATP-binding cassette (Abca1); cytochrom p450 rodzina 27, podrodzina a, polipeptyd 1 (Cyp27a10); lipazy (Lipe) oraz sulfotransferazy (Sult1a1). Pozostałe geny wykazywały wyższy poziom ekspresji u samic: cytochromu P450, rodzina 11 podrodzina B (Cyp11a1); cytochrom P450, podrodzina 11b, polipeptyd 1 (Cyp11b1); cytochrom p450,podrodzina 51 (Cyp51); kwasu tłuszczowego wiążącego białko 6 (Fabp6); dehydrogenazy 7 hydroksysteroidowej 17-beta (Hsd17b7); izopentenyl-difosforan delta izomeraza 1 (Idi1); syntazy lanosterolu (Lss); receptor jądrowy, podrodzina 0, grupa B (Nr0b1); skwalen epoksydazy (Sqle) oraz białko ostrej regulacji steroidogenezy - (Star).

Za pomocą RT-QPCR potwierdziliśmy zmiany poziomów transkryptomów w zależności od płci, oznaczając ich poziom w ZG i lub ZF/R nadnerczy dojrzałych płciowo samców i samic szczura. We wszystkich przypadkach wyniki RT-QPCR potwierdziły wykazane różnice przy pomocy mikromacierzy. Poziomy ekspresji Star, Cyp11a1 i Nr0b1 były znacznie wyższe w ZF/R u samic szczurów, jednak nie obserwowano różnic w ZG . W poziomach ekspresji mRNA cytochromu P450 rodzina 11 podrodzina B polipeptyd 2 (Cyp11b2) w ZG nie zauważono żadnych różnic związanych z płcią, natomiast obserwowano wyraźnie wyższy poziom ekspresji Cyp11b1 u samic w ZF/R. Poziomy mRNA dla Lipe były znacznie wyższe u samców w ZF/R, podczas gdy w ZG jej ekspresja była podobna u obu płci. Zarówno w ZG jak i w ZF/R poziom ekspresji receptora dla hipokretyn typ 2 (Hcrtr2) był znacznie mniejszy u samic niż u samców

Nasze analizy wykazały, że najbardziej wyraźne różnice w ekspresji genów w zależności od płci zachodzą w warstwach ZF/R kory nadnercza szczura. Wyniki te sugerują wyższą aktywność steroidogenezy w ZF/R u samic niż u samców i są w zgodzie z wynikami poprzednich badań wskazujących wyższe wydzielanie kortykosteronu przez nadnercza samic

szczura. Obserwacje te pokrywają się również z badaniami dowodzącymi tego, że stymulacja wysoko wyspecjalizowanych komórek kory nadnercza (wydzielanie hormonów steroidowych) łączy się zawsze z inhibicją lub spowolnieniem ich podstawowych procesów biologicznych takich jak tempo proliferacji (Dallman 1984). Zgodnie z analizą DAVID, różnice w ekspresji genów były znacznie zwiększone w zestawach genów zaangażowanych w metabolizm hormonów steroidowych, natomiast ich poziom ekspresji w ZF/R dorosłych samic szczura był znacznie wyższy niż ten w nadnerczach samców. Z drugiej strony analiza DAVID nie wykazała różnic w tej grupie transkryptów w ZG. Wynika to z tego, że grupa genów bezpośrednio zaangażowana w syntezę hormonów wykazuje dymorfizm płciowy u szczurów w ZF/R ale nie w ZG. W tym aspekcie, badania El Wakil'a i wsp. (2013) na temat różnic płciowych w ekspresji genów w mysich nadnerczach ujawniły, że tylko 2 geny Nr5a1 i Nr0b1 różnią się ekspresją, z wyższym poziomem ekspresji u samic myszy, nie wykazały natomiast znaczących różnic w ekspresji genów zaangażowanych w biosyntezę steroidów. Potwierdziliśmy to na genach kodujących znane czynniki transkrypcyjne i w przypadku Nr0b1 wykazaliśmy, że różnica ta wynika z jego wyższej ekspresji w ZF/R ale nie w ZG. Co więcej, zaprezentowane dane wykazały, że w ZF/R samic szczura jest wyższa ekspresja Cyp11a1, Cyp11b1, Fabp6, Hsd17b7, Idi1 i Star. Te różnice mogą być zależne od gatunku (mysz - badania El Wakil i wsp. i szczur - badania obecne) i metody pobierania próbek, np. oddzielnej analizy ZG i ZF/R w naszych badaniach w porównaniu do analizy całego nadnercza u myszy. W przeciwieństwie do „genów steroidogenezy" w ZF/R samic, ekspresja przeważającej liczby genów związanych z podziałami komórkowymi, procesami utleniania i redukcji oraz odpowiedzią na składniki odżywcze jak i pozakomórkowej stymulacji lub stymulację hormonami steroidowymi była obniżona. Wyniki te wydają się być raczej niespodziewane. Uzasadnione są negatywne wzajemne relacje pomiędzy wysoce wyspecjalizowanymi a podstawowymi procesami metabolicznymi w komórkach. W opisywanych tu badaniach poziom ekspresji wybranych genów zaangażowanych w regulacje biosyntezy hormonów steroidowych był potwierdzony za pomocą RT-QPCR.

Jak wiadomo cholesterol jest prekursorem steroidogenezy w nadnerczu.

Cholesterol może pochodzić z różnych źródeł:

a) neogenezy w retikulum endoplazmatycznym z Acetylo-CoA,

b) mobilizacja estrów cholesterolu gromadzonych w postaci wewnątrzkomórkowych kropel tłuszczu. Reakcja ta jest katalizowana przez hydroksylazę estru cholesterolowego

3) z estrów cholesterolu pochodzących z kompleksów białkowo-lipidowych występujących w osoczu krwi wywodzących się z: lipoprotein o niskiej gęstości (LDL), receptorozależnej endocytozy lub selektywnego wychwytu HDL przez receptor zmiatający klasy B1 –(SR-B1) Hu i wsp. (2010).

Wcześniejsze dane wykazują, że stężenie lipidów, cholesterolu, fosfolipidów i glicerydów jest podobne w nadnerczach dojrzałych płciowo samic i samców szczura, aczkolwiek ich zawartość, związana z wielkością nadnercza, jest wyższa u samic. Natomiast Lipe jest główną hydrolazą cholestrolową w nadnerczu (Kraemeri wsp. 2004). Specyficzna aktywność tych enzymów w 105 000 g supernatantu z homogenatów nadnerczowych jest wyższa u samców niż u samic szczura . W opisywanych badaniach wykazaliśmy wyższy poziom mRNA Lipe w ZF/R samców, podczas gdy ekspresja w ZG była porównywalna u obu płci. W związku z tym, wyższej aktywności Lipe w ZF/R samców towarzyszy wyższa ekspresja genu Lipe. Ponadto zademonstrowaliśmy, że w ZG następuję wyższy niż w ZF/R poziom ekspresji Lipe.
Bardzo dobrze opisany został gen Star (StAR – białko ostrej regulacji steroidogenezy), kodujący białko zaangażowane w ostrej regulacji syntezy hormonów steroidowych. To białko jest odpowiedzialne za transport cholesterolu z zewnętrznej błony mitochondrialnej do wewnętrznej błony mitochondrialnej (Stocco 2001). Wcześniejsze badania immunohistochemiczne i immunofluorescencyjne wykazały obecność białka Star zarówno w ZG jak i w ZF/R kory nadnercza szczura (Lo i wsp. 1998). W mysich nadnerczach stwierdzono, że poziom mRNA Star (zmierzony za pomocą RT-QPCR) jest lekko podwyższony u samców względem samic ale różnice te nie są statystycznie istotne (Bastida i wsp. 2007). W opisywanym tu badaniu ekspresja mRNA Star była znacznie wyższa w ZF/R samic szczura, podczas gdy żadnych różnic nie zaobserwowano w ZG. Zgodnie z naszą wiedzą po raz pierwszy wykazano specyficzną i związaną z płcią różnicę w ekspresji genu Star w korze nadnerczy szczura.

Cyp11a1 koduje enzym desmolazę 20-22 cholesterolu P450ssc, który katalizuje pierwszy etap szlaku biosyntezy hormonów steroidowych (Simpson i wsp. 1987). Ten enzym ulega ekspresji we wszystkich strefach kory nadnercza (Ishimura i wsp. 1997). Zgodnie z doniesieniami, poziom transformacji cholesterolu do pregnenolonu (cleavage activity bocznego łańcucha) jest niższy u samców niż u samic szczura (Kitay 1968). Ponadto, poziom adrenodoksyny w zdekapsułowanych (tzn. pozbawionych komórek ZG) nadnerczach jest niższy u samców niż u samic szczura. W opisywanych tu badaniach wykazano wyższy poziom ekspresji genu Cyp11a1 w ZF/R samic szczura (w porównaniu z samcami). Tak

samo, w przypadku genu Star, poziom mRNA Cyp11a1 był porównywalny w ZG dorosłych samców i samic szczura. Zatem poprzednio stwierdzony wyższy poziom syntezy pregnenolonu w korze nadnerczy samic szczura zależy od podwyższonej ekspresji genu Cyp11a1 w ZF/R i jest odpowiedzialny za wszystkie wymienione różnice. Określiliśmy również poziom ekspresji 2 genów kodujących enzymy ścieżki steroidogenezy u szczura **tj.** Cyp11b2 - syntaza aldosteronu odpowiedzialna za syntezę aldosteronu i Cyp11b1 - 11β-hydroksylaza steroidowa, odpowiedzialna za syntezę kortykosteronu. Hybrydyzacja in situ oraz immunohistochemia potwierdziły ekspresję syntazy aldosteronu tylko w ZG u szczura (Ishimurai wsp. 1997). Te wyniki są zgodne z poprzednimi (potwierdzonymi RT-QPCR), które potwierdzają wysoką ekspresję Cyp11b2 w tej strefie (Oaks i Raff 1995). Nasze badania potwierdziły te wcześniejsze obserwacje a ponadto zademonstrowaliśmy, że poziom ekspresji genu Cyp11b2 był podobny w ZG samców i samic szczura. Dane te stoją w zgodności z tymi uzyskanymi z poprzednich badań nad brakiem różnic związanych z płcią w syntezie aldosteronu u szczura (Malendowicz 1994). Z drugiej strony, w mysich nadnerczach poziom mRNA syntazy aldosteronu okazał się być delikatnie wyższy w nadnerczach samic, w porównaniu do samców (Bastida i wsp. 2007). Gen Cyp11b1 koduje 11β-hydroksylazę steroidową, która katalizuje konwersję deoksykortykosteronu do kortykosteronu. W nadnerczach szurów ten enzym zlokalizowany jest w komórkach ZF/R. (El Wakili wsp. 2013). Aktywność 11β-hydroksylazy steroidowej jest porównywalna u samców jak i samic szczura. Jednak poziom cytochromu P-450, podrodziny 11B (Cyp 11b1), w mitochondriach nadnerczy szczurów jest niższy u samców niż u samic (Brownie i wsp. 1988). W opisywanych tu badaniach wykazaliśmy, że poziom ekspresji genu Cyp11b1 był znacząco wyższy w ZF/R samic, podczas gdy nie zaobserwowano różnic w ZG kory nadnerczy.

Nr0b1 koduje białko Dax1 (dosage-sensitive sex reversal, adrenalhypoplasiacritical region, on chromosome X, gene 1), które jest odpowiedzialne za rozwój i utrzymanie osi steroidogenicznej (Beuschlein i wsp. 2002). Dane eksperymentalne sugerują, że białko DAX1 jest negatywnym regulatorem steroidogenezy. Dymorfizm płciowy ekspresji Dax-1 (Nr0b1) w nadnerczach myszy wykazano za pomocą RT-QPCR, western blotting i immunohistochemię (Mukai i wsp. 2002). Należy wspomnieć, że w mysich nadnerczach poziom mRNA Dax1 był tylko delikatnie wyższy w nadnerczach samic niż samców (El Wakil i wsp. 2013). Zgodnie z naszą wiedzą, po raz pierwszy wykazaliśmy, że poziom ekspresji Nr0b1 jest znacząco wyższy w ZF/R u samic szczura, podczas gdy nie obserwowano żadnych różnic w ZG. W pracach Jöhren'a i wps. (2001, 2003, 2004) opisano ekspresję Hcrtr2 w korze nadnerczy szczura zależną od płci. Wykazano, że ekspresja tego genu występuje w ZG i ZR,

jednocześnie zauważono wyższy poziom ekspresji w nadnerczach samców szczura. W naszej pracy również potwierdziliśmy fakt, że, poziom ekspresji Hcrtr2 w ZG i ZF/R był znacząco niższy w nadnerczach u samic. Wyniki te potwierdzają odpowiednie przygotowanie naszych tkanek (ZG i ZF/R) do analizy w opisywanych tu badaniach. **W rezultacie prezentowane badania stanowią pierwszy opis związanych z płcią profili ekspresji kory nadnercza u szczurów. Wykazano duża liczbę różnic w ekspresji transkryptów w ZG i ZF/R nadnercza (702 u samic vs 571 u samców). Różnice w ekspresji genów zaangażowanych w metabolizm hormonów steroidowych i ich poziomy ekspresji w ZF/R u dorosłych samic szczura były również znacząco wyższe niż te u samców.**

Natomiast w ZF/R nadnerczy samic, w porównaniu z samcami, przeważająca liczba ekspresji genów które posiadają tzw. łatki określające je jako :związanych z podziałami komórkowymi, procesami utleniania i redukcji, odpowiedzi na substancje odżywcze i stymulację pozakomórkową oraz stymulację hormonami steroidowymi była obniżona.

Publikacja druga:

Trejter, M., Jopek, K., Celichowski, P., Tyczewska, M., Malendowicz, L.K., Ruciński, M., (2015):
Expression of estrogen, estrogen related and androgen receptors in adrenal cortex of intact adult male and female rats
Folia Histochem Cytobiol. Vol. 53 133-144

Ekspresja genu receptora dla androgenów (AR) w nadnerczach szczura jest dobrze poznana. Wcześniejsze badania wykazały, że liczba miejsc wiązania androgenów jest wyraźnie wyższa w nadnerczach samców niż samic (Calandra i wsp. 1978). Ponadto, za pomocą testu immunoblot, wykryto stosunkowo wysokie poziomy AR w nadnerczach u szczurów płci męskiej i żeńskiej (Bentvelsen i wsp. 1996). W barwieniach immunohistochemicznych AR-dodatnią reakcję obserwowano w ZF i ZR.

Przedstawiana w pracy analiza mikromacierzy nie wykazała jednak różnic płciowych w poziomie ekspresji badanych genów: AR, receptora dla estrogenów alfa (ERα), receptora dla estrogenów beta (ERβ), receptora dla estrogenów 1 związanego z białkiem G (GPR30; GPER1), receptora alfa związanego z estrogenem (ERRα), receptora beta związanego z

estrogenem (ERRβ), receptora gamma związanego z estrogenem (ERRγ), w korze nadnerczy samców i samic szczurów.

Uzyskane dane macierzowe potwierdzono metodą QPCR. Zgodnie z oczekiwaniami, metoda ta wykazała wyższy poziom ekspresji genu AR zarówno w ZG, jak i ZF/R u samców względem samic szczura (krotność zmian ekspresji ang. fold change 1,9 do 3,54). Ciekawe jest to, że zarówno w męskich, jak i żeńskich nadnerczach, poziom ekspresji genu AR był podobny w ZG i ZF/R.

Nie biorąc pod uwagę GPR30, efekty biologiczne estrogenów są związane z występowaniem licznych izoform receptora, które regulują ekspresję genów docelowych poprzez wiązanie z ERE (ERE - estrogen response element - sekwencja DNA wiążąca estrogen i warunkująca odpowiedź na estrogen). Pierwszy ER (estrogen receptor), obecnie znany jako ERα, sklonowano w 1986/1987, podczas gdy drugi - ERβ w 1996. Oba receptory zidentyfikowano w korze nadnerczy różnych gatunków zwierząt, jednakże względna ekspresja obydwu rodzajów receptorów różniła się znacznie. W przeciwieństwie do ludzkiej kory nadnerczy, w korze nadnerczy szczura mRNA ERα jest znacznie bardziej obfite niż ERβ (Kuiper i wsp.1997). Podobnie, w nadnerczach kur względna ekspresja mRNA ERα jest wyższa niż mRNA ERβ (Błachuta i wsp. 2012).

W niniejszym badaniu potwierdzono ekspresję genów ERα i ERβ w korze nadnerczy szczura. Potwierdzono także, wyższy poziom ekspresji mRNA ERα w porównaniu do mRNA ERβ. Co więcej, wykazano, że w obrębie tej samej płci poziomy mRNA ERα i ERβ są podobne w ZG i ZF/R. Ponadto, ujawniono, że w ZF/R samic względne poziomy ekspresji ERα i ERβ są wyraźnie wyższe niż u samców.

Jak wspomniano wcześniej, nie-genomowy siedmio-transbłonowy receptor GPR30 wiąże się szybko z sygnałową estrogeno-zależną proteiną G (Revankar i wsp. 2005). Receptor ten ulegał wysokiej ekspresji w rdzeniu i w ZG ludzkiego nadnercza, w hodowli bydlęcych rdzeniowych komórek nadnercza oraz w mysim rdzeniu nadnerczy. W ZG i rdzeniu nadnerczy samców i samic szczurów obserwowano wysokie poziomy mRNA GPR30 oraz wysoką immunoreaktywność względem GPR30. Najnowsze badania rozszerzyły wcześniejsze obserwacje. Wykazano ekspresję genu GPR30 w obu warstwach ZG i ZF/R kory nadnerczy szczura. Poziom ekspresji tego genu był w obu porównaniach podobny i prawie taki sam u samców i samic. Warto wspomnieć, że ekspresja GPR30 została wykazana w ludzkim ZG, w komórkach gruczolaka produkującego aldosteron (APA) i w linii komórek nadnerczowych HAC15 (Caroccia i wsp. 2014).

Obecnie znamy trzy receptory spokrewnione z receptorem estrogenowym (Estrogen Related Receptor) ERRs: ERRα, ERRβ i EERγ. ERRα i ERRβ wykazują wysoki stopień homologi z analogicznymi receptorami dla estrogenu ERα i ERβ. ERR ulega ekspresji w wielu narządach. Jako czynnik transkrypcyjny aktywuje ekspresję wielu genów docelowych. Ostatnio stwierdzono transkrypcję ERRα w ludzkich nadnerczach zarówno u osób dorosłych, jaki i w płodach ludzkich. W nadnerczach dorosłych ludzi wykrywa się immunoreaktywność dla ERRα we wszystkich strefach kory, jednak nie w rdzeniu. Sugeruje się, że ERRα odgrywa ważną rolę w regulacji wytwarzania steroidów nadnerczy. Prezentowane badania rozszerzyły te wcześniejsze obserwacje. Wykazano obecność transkryptów ERRα w ZG oraz ZF/R kory nadnerczy szczura. W obu warstwach kory poziomy ekspresji badanych genów były podobne i nie wykazano różnic związanych z płcią.

Jeśli chodzi o ERRβ, jego ekspresję wykazano również w mysich nadnerczach. Podobnie jak w przypadku ERRα, w prezentowanych badaniach wykazano obecność transkryptów ERRβ w ZG i ZF/R kory nadnercza szczura. I tak samo jak poprzednio, zarówno w ZG i ZF/R nie wykazano różnic w ekspresji EERβ. Z funkcjonalnego punktu widzenia należy podkreślić, że myszy heterozygotyczne dla ERRβ mają zmniejszone wydzielanie kortykosteronu w odpowiedzi na stres, natomiast te homozygotyczne dla ERRβ mają wyższe podstawowe poziomy kortykosteroidów (Byerly i wsp. 2013).

Ekspresję trzeciego członka rodziny ERRs, tj. ERRγ wykazano również w nadnerczach myszy (Luo i wsp. 2014). Ekspresję mRNA ERRγ wykazano w ZG i w niższym stopniu w ZF kory myszy, potwierdzając te wyniki metodą immunohistochemiczną. W naszych badaniach poziomy ekspresji genu ERRγ były podobne w ZG u obu płci, natomiast poziom mRNA ERRγ w ZF/R był znacznie niższy u dorosłych samców. W tej kwestii Luo i wsp. (2014) zasugerował, że niedobór ERRγ zmniejsza produkcję aldosteronu przez zmniejszenie ekspresji Cyp11B1 i Cyp11B2. Ponadto sugerowano, że ERRγ aktywuje promotor DAX-1, co z kolei hamuje ERRγ poprzez współzawodnictwo - koaktywator (pętla auto-regulująca). Co więcej, wykazano, że ERRγ stymuluje ekspresję genu ERRα, podczas gdy wzrost ekspresji ERRγ powoduje jego auto-represje (samoregulacja) (Zhang i wsp. 2007).

Analiza mikromacierzy (nie potwierdzona przez QPCR) nie wykazała różnic płciowych w ekspresji trzech izoform nadnerczowej 5α-reduktazy steroidowej (Srd5a1, Srd5a2 i Srd5a3) u szczurów intact. Z tych izoform, Srd5a1 i Srd5a2 biorą udział w procesie redukcji steroidów do 5α-dihydrosteroidów, podczas gdy Srd5a3 uczestniczy w glikozylacji białek (Cantagrel i wsp. 2010). U szczurów ten szlak enzymatyczny odgrywa ważną rolę w wewnątrz-nadnerczowym procesie redukcji kortykosteronu do dihydrokortykosteronu. W korze

nadnerczy szczura układ ten regulowany jest przez hormony płciowe, jak również przez ACTH uwalniane z przysadki mózgowej. Jak wynika z badań immunohistochemicznych, 5 α-reduktaza typu 1 ulega ekspresji w komórkach ZF i ZR, ale nie w ZG (Yokoi i wsp. 1998). Dane te różnią się od przedstawianych w prezentowanej pracy wyników, wskazujących ekspresję genów 5 α-reduktazy w ZG i ZF/R zarówno u dorosłych samców, jak i samic szczurów.

W danych macierzowych (nie potwierdzonych przez QPCR) analizowano także profil ekspresji aromatazy (Cyp19a1), enzymu, który katalizuje ostatni etap szlaku biosyntezy estrogenów z androgenów. W nadnerczach dorosłych szczurów obu płci poziom ekspresji tego genu był podobny w ZG oraz ZF/R. Do tej pory pojawiło się niewiele informacji na temat ekspresji genu tego enzymu w nadnerczach zwierząt. Metodą Western blot i Northernblot stwierdzono ekspresję genu aromatazy w nadnerczach płodu świni i u świeżo-narodzonych prosiąt (Conley i wsp. 1996). Natomiast, metodą immunohistochemii wykazano obecność aromatazy w komórkach kory nadnerczy skoncentrowanych na produkcji kortykosteronu oraz w samym rdzeniu gruczołu. Autorzy sugerowali, że komórki te mogą stanowić warstwę siatkowatą, która w badanym okresie ontogenezy była słabo zdefiniowana. W przeciwieństwie do zwierząt, istnieje wiele danych dotyczących ekspresji aromatazy u ludzi. Zaobserwowano ją np. w ludzkich nadnerczach płodu i u osób dorosłych (Baquedano i wsp. 2007). Jednocześnie odnotowano bardzo wysoką ekspresję genu aromatazy w guzach kory nadnerczy, zwłaszcza tych wydzielających estrogeny (Barzon i wsp. 2008). Poza tym, funkcjonalną aromatazę zidentyfikowano także w linii komórkowej H295R.

Jak wynika z prezentowanych badań i powyższych danych, kora nadnerczy jest wyposażona w różne receptory: androgenów (AR), estrogenów (ER) i receptory wiążące estrogeny (ERR). Spośród nich tylko GPR30 jest nie-genomowym receptorem, pozostając jednocześnie aktywnie oddziaływującym na transkrypcję komórkowego DNA. Niedawno odnotowano również bliską interakcję pomiędzy Dax-1, ERRγ ,ERβ i GPER1 w HAC15 nadnerczowej linii komórkowej .

Działanie kory nadnerczy u różnych gatunków modulowane przez androgeny i estrogeny jest dobrze udokumentowane. W badaniach *in vivo*, ich działanie jest głównie pośrednie i obejmuje modulację osi podwzgórze – przysadka - nadnercza, na które z kolei wpływa głównie synteza i/lub sekrecja CRH i ACTH. Jednak bezpośrednie skutki działania hormonów płciowych w komórkach kory nadnerczy wymagają starannej analizy. Zostało udokumentowane w wielu wcześniejszych doniesieniach, że zarówno androgeny i estrogeny modyfikują aktywność enzymów w szlakach steroidogennych. Również badania nad świeżo

izolowanymi komórkami z nadnerczy pokazują modelujące działanie estro- i androgenów na produkcję kortykosteroidów. Częściowo te efekty zależą od interferencji badanych hormonów płciowych z ACTH, oddziałując na wewnątrzwydzielnicze szlaki metaboliczne, jednak te wcześniejsze obserwacje nie wykluczają możliwości działania estrogenów przez GPR30.

Obecnie, najnowsze narzędzia biologii molekularnej pozwalają na badanie zaangażowania estrogenów, receptorów wiążących estrogen i androgenów, w działaniu sterydów płciowych w komórkach kory nadnerczy. W związku z tym wyniki grupy (Rossi i wsp. praca Carocia i wsp. 2014) są fascynujące. Wykazały one, że w linii komórek kory nadnerczy HAC15 wyciszanie ERβ znacząco podniosło wydajność aldosteronu. Dane te wskazały, że w warunkach fizjologicznych estrogeny hamują syntezę aldosteronu działając na ERβ. Ponadto, wyciszenie tego genu wykazuje silną stymulację wydzielania aldosteronu poprzez nie-genomowy receptor estrogenu GPER-1.

Tak więc postęp w biologii molekularnej otwiera nowe możliwości w badaniach nad mechanizmami zaangażowanymi w działania estrogenów i androgenów w komórkach kory nadnerczy. Co więcej, prezentowane badania potwierdzają wcześniejsze doniesienia, że stosowanie tylko jednej metody oceny ekspresji genów (jak np. analiza mikromacierzy) może prowadzić do fałszywych wniosków.

Praca trzecia:

Trejter, M., Hochół, A., Tyczewska, M., Ziółkowska, A., Jopek, K., Szyszka, M., Malendowicz, L.M. Ruciński, M., (2015):

Visinin-like peptide 1 in adrenal gland of the rat.Gene expression and its hormonal control.

Peptides 63, 22-29

W 1992 roku Kuno i wsp. zidentyfikowali rodzinę białek wiążących wapń, do której należą: visinina 1 (Vsnl1) wraz z Vsnl2, Vsnl3, białko wiążące wapń (hypokalcyna, Hpca) i białko komórek nerwowych wiążące wapń (neurokalcyna, Nca). Vsnl1 należy do podgrupy białek visinino-podobnych, które należą do podgrupy sensorów wapnia (NCS), określanych jako visinin/recoverin.

Wspólną cechą wszystkich białek NCS są regiony wiążące wapń, zwane rękami EF. Visinino-podobne białka mają 4 takie rejony EF, jednak tylko trzy potencjalne miejsca wiążące Ca^{2+} są aktywne (2, 3 i 4). Rejon EF-1 jest nieaktywny we wszystkich visinino-podobnych białkach (Lin i wsp. 2002). Peptydy NCS te ulegają mirystynizacji w sposób zależny od wapnia i mogą być skojarzone z błonami biologicznymi (tzw. mirystolo-wapniowy mechanizm translokacji błon komórkowych). Visinino-podobne peptydy wykazują między sobą wysoką homologię, między Vsnl1 i Vsnl2 jest to 89 %, pomiędzy Vsnl1 i neurokalcyną delta (Ncald) 91%. Vsnl1, jak również inne białka z rodziny Vsnls, ulega silnej ekspresji w komórkach nerwowych ośrodkowego układu nerwowego (OUN) różnych gatunków zwierząt, na przykład w móżdżku szczura i hipokampie. Za pomocą RT-PCR, Northernblot i Western blot wykazano występowanie Vsnls również w narządach obwodowych: sercu, wątrobie, płucach, jądrach u ludzi i szczura oraz w skórze i żołądku szczura.

Wapń, jak wiadomo, będąc wtórnym wewnątrzkomórkowym przekaźnikiem, bierze udział m.in. w regulacji procesów transportu komórkowego oraz ekspresji różnych genów. Zmiany jego stężenia wewnątrz komórki regulowane są głównie przez mitochondria. Vsnl1 uczestniczy w regulacji wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałowych zależnych od Ca^{2+}, łącznie z cAMP, cGMP, oraz sygnałowym MAPK. W mysich trzustkowych komórkach β wysp Langerhansa nadekspresja Vsnl1 prowadzi do zwiększenia poziomów cAMP i transkrypcji prekursora mRNA insuliny. Ponadto, Vsnl1 wpływa na ekspresję genów zaangażowanych w proliferację komórkową (cyklinę D2, Ccnd2), jak również na kinazę syntazy glikogenu 3β (Gsk3b) i czynniki transkrypcyjne (cAMP białko wiążące element reagujący 1 - Creb1) (Dai i wsp. 2006).

Wytwarzanie aldosteronu jest modulowane przez wiele czynników, m.in. takich jak angiotensyna II (AII), potas i hormon adrenokortykotropowy (ACTH). Dużo ścieżek sygnałowej transdukcji (kinaza białkowa C, cAMP, cGMP) wpływa na wydzielanie aldosteronu (Spät i Hunyady 2004). Wśród tych modulatorów wapń odgrywa istotną rolę w produkcji aldosteronu, gdyż wywołuje ostre i długo utrzymujące się odpowiedzi. Podwyższone stężenie Ca^{2+} w mitochondriach oraz zwiększony poziom NADPH w komórkach kory nadnerczy skorelowane jest z tempem syntezy aldosteronu. Rola wapnia w komórkach kory nadnerczy w fizjologii i patologii nie jest do końca wyjaśniona, jednak interesujący jest wzrost ekspresji Vsnl1 w gruczolakach wytwarzających aldosteron (APA) (Williams i wsp. 2012). W prezentowanej pracy z wykorzystaniem analizy mikromacierzy zaobserwowano podwyższoną ekspresję Vsnl1 głównie w warstwie kłębkowatej nadnerczy.

W literaturze niewiele jest danych na temat roli genu Vsnl1 w odniesieniu do nadnerczy oraz zmian jego ekspresji pod wpływem czynników oddziaływujących na funkcje nadnerczy. Pierwszy raport na temat lokalizacji mRNA Vsnl1 i białka w całych gruczołach nadnerczy dotyczy zarodków myszy. Metodą hybrydyzacji *in situ* i barwienia immunohistochemicznego wykazano mRNA i białka Vsnl1 w ZG nadnerczy myszy w 15,5 dniu rozwoju zarodkowego (Ola i wsp. 2012). Także Williams i wsp. (2012) zauważył podwyższenie ekspresji Vsnl1 w gruczolakach wytwarzających aldosteron.

Celem niniejszej pracy była analiza ekspresji Vsnl1 w warstwach ZG i ZF/ZR oraz rola tego genu w regulacji osi HPA. Za pomocą zestawu Affymetrix® Rat Gene 1.1 ST Array badano ekspresję genów Vsnl1 w nadnerczach dorosłych szczurów płci żeńskiej i męskiej. W tym badaniu u obu płci poziomy mRNA Vsnl1 w ZG były 30-40 razy większe niż w ZF/R oraz w rdzeniu (M) gruczołu nadnerczy. Ten wzór ekspresji genów Vsnl1 został potwierdzony przez QPCR. Jednakże, w QPCR różnice były znacznie wyższe, z wartościami krotnych rzędu 300-400. Następnie za pomocą reakcji barwienia immunohistochemicznego wykazano obecność Vsnl1 w korze nadnerczy. Substancje immunopozytywne widoczne były w cytoplazmie i komórkach tylko strefy kłębkowatej nadnerczy dorosłych samic szczura.

W poszukiwaniu czynników regulujących ekspresję genów Vsnl1 badano wpływ znanych czynników pobudzających wydzielanie aldosteronu w pierwotnej hodowli komórkowej ze świeżo izolowanych komórek warstwy ZG nadnerczy szczurów. Komórki eksponowano przez 120 minut na AII (100 nM) lub K^+ (16 mM). Jednak, ani angiotensyna II, ani K^+ nie wpłynęły na poziomy ekspresji Vsnl1. Ponieważ wyniki te były dość zdumiewające, przeprowadzono meta-analizy podobnych danych doświadczalnych zdeponowanych w bazie GeneExpression Omnibus (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo). Meta-analiza danych zgromadzona przez Romero (2007) oraz przez Nogueira (2007) pozwoliła wskazać, że stymulacja komórek ZG przez godzinę z 10 nM AII nie wpływa na poziom mRNA Vsnl1 .

Zbadano także działanie ACTH na poziom ekspresji genu Vsnl1 w warunkach *in vivo* oraz w pierwotnej hodowli komórek kory nadnercza szczura. 24-godzinna ekspozycja z ACTH (1×10^{-7}M) w 4-dniowej hodowli komórek nadnerczowych spowodowała znaczące obniżenie ekspresji badanego genu. Efekt ten obserwowano zarówno w obecności, jaki i nieobecności BSA w pożywce do hodowli. W badaniach *in vivo* przedłużone podawanie ACTH lub deksametazonu (DEX) nie zmieniło poziomu ekspresji genu Vsnl1, jednak 60 min. po podaniu kortykotropiny nastąpiła ostra supresja ekspresji badanego genu.

W regeneracji kory nadnerczy wywołanej wyłuszczeniem gruczołu z torebki łącznotkankowej, ekspresja genu Vsnl1 ulegała stopniowemu obniżaniu w czasie trwania

procesu odbudowy nadnercza (1-15 dni). Barwienia immunohistochemiczne wykazały, że w początkowej fazie regeneracji (1-3 dni), Vsnl1 był obecny we wszystkich dzielących się komórkach kory nadnerczy. W kolejnych dniach (5-8) komórki przylegające do centralnego skrzepu nie wykazały już reakcji, a w 15 dniu odbudowy reakcję barwną odnotowano tylko w komórkach przylegających do torebki łącznotkankowej gruczołu. Jednak we wszystkich badanych punktach czasowych (1-15 dni), poziom mRNA Vsnl1 był niższy niż w analogicznej grupie kontrolnej.

Prezentowane badania wykazały podobną lokalizację Vsnl1 w nadnerczach dorosłych samców i samic szczurów. Z wyżej przedstawionych danych wydaje się być uzasadnione, aby zasugerować, że wzór ekspresji genów Vsnl1 ustala się we wczesnych etapach rozwoju gruczołu nadnerczy. Wzór ekspresji Vsnl1 w regionie pod-torebkowym kory nadnerczy szczura jest podobny do tego z sonichedgehong (Shh) (Guasti i wsp. 2011). U szczura w korze nadnerczy ZG i ZF są oddzielone przez niezróżnicowaną strefę (ZU), która zawiera komórki niesteroidogenne. Komórki tej strefy biorą udział w zachowaniu architektury kory nadnerczy i rekrutacji komórek progenitorowych zlokalizowanych pod torebką nadnercza, celem szybkiego utworzenia komórek steroidogennych (Berthon i wsp. 2012). Molekularne aspekty tych wydarzeń przypominają główne szlaki sygnałowe zaangażowane w rozwój nadnerczy. Proces tworzenia i utrzymania homeostazy nadnerczy przez ścieżki sygnalne Shh i Wnt-katenina jest już dobrze udokumentowane (King i wsp. 2009).

Zarówno Shh, jak i ostatnio zidentyfikowany regulator cyklu komórkowego Dlk1 (δ-like homologue 1) wykazują ko-ekspresję w ZU nadnerczy szczura. Sugerowano, że mogą one działać razem w regulowaniu homeostazy i przebudowy nadnerczy (Guasti i wsp. 2011). Wydaje się, że w prezentowanych badaniach, komórki wykazujące ekspresję Vsnl1 są raczej mieszanej populacji komórek ZG/ZU. Co więcej, eksperymenty z regenerującymi nadnerczami pozwoliły zasugerować, że modulacja ekspresji Vsnl1 równie dobrze może odgrywać rolę w rekrutacji większej liczby komórek progenitorowych, a co za tym idzie, szybko generować więcej komórek steroidogennych (głównie ZF). Twierdzenie to wymaga jednak dalszych badań.

Specyficzna lokalizacja Vsnl1 w nadnerczach w ZG rodzi pytanie o hormonalną regulację tej ekspresji. Niespodziewanie, ani AII w warunkach *in vitro*, ani K^+ nie wpływały na poziomy ekspresji genu Vsnl1 (Nogueira i wsp. 2007). Również w przedstawionych badaniach, AII było nieskuteczne, ale pokazano, że w pierwotnej hodowli komórek kory nadnerczy szczura, stymulacja ACTH znacznie obniża ekspresję badanego genu. Podobny efekt zaobserwowano *in vivo* 60 min po podaniu ACTH, a z drugiej strony przedłużone

działanie kortykotropiny lub deksametazonu nie wywołało efektu. Te odkrycia są zagadkowe i sugerują, że Vsnl1 może być włączona do grupy genów wczesnej odpowiedzi, o ile dotyczy to działania ACTH.

Obserwacja ta wskazuje również, że bezpośrednim skutkiem działania ACTH na hodowane komórki kory nadnerczy jest obniżona ekspresja genów Vsnl1.

Ważnym pytaniem jest funkcja Vsnl1 w fizjologii i patologii nadnercza. Jak wcześniej wspomniano, ekspresja Vsnl1 jest podwyższona w gruczolakach produkujących aldosteron. Nadekspresję Vsnl1 zauważono w linii raka kory nadnerczy (NCI H295R) (Williams i wsp. 2012). Jednakże, jak podkreślili autorzy, Vsnl1 uczestniczy w patofizjologii APA z mutacjami w kanałach potasowych (KCNJ5), a nie w rozwoju innych łagodnych guzów kory. Ta grupa badawcza zasugerowała również, że Vsnl1 pełni funkcję anty-apoptotyczną w odpowiedzi na cytotoksyczność wapnia.

Jako że Vsnl1 reguluje ekspresję Cyp11b2, analizowano także ekspresję tego genu. Podczas regeneracji poziom ekspresji Cyp11b2 ulegał zmniejszeniu, wykazując silną korelację z genem Vsnl1. Gen Cyp11b2 pełni funkcję markera ZG nadnerczy. Po enukleacji, za pomocą metody hybrydyzacji *in situ*, analizy transkryptomu i QPCR, zaobserwowano znaczne zmniejszenie poziomu ekspresji genu Cyp11b2 pomiędzy 2. a 20. dniem eksperymentu (Engeland i wsp. 1995). Jak wykazano w naszych badaniach, podobny wzór ekspresji stwierdzono dla Vsnl1 i Cyp11b2, dla których poziom ekspresji obu genów był dodatnio skorelowany (dodatnia korelacja r = 0,68). Dane te sugerują, że poziom ekspresji dla Vsnl1 może także posłużyć jako marker dojrzałości ZG u szczura. Co więcej, uzyskano wzór ekspresji genów Vsnl1 nadnercza w regeneracji, który sugeruje, że w zastosowanym modelu doświadczalnym, gen ten nie jest zaangażowany w kontrolę proliferacji komórek kory nadnerczy. To założenie może być udowodnione przez fakt, że podczas fazy proliferacji regeneracji nadnerczy (3.-8. dzień eksperymentu), poziom ekspresji Vsnl1 jest znacznie niższy niż w nadnerczach szczurów kontrolnych. Pomimo tych ustaleń, fizjologiczne znaczenie Vsnl1 w nadnerczach pozostaje niejasne i wymaga dalszych badań.

Na podstawie wyżej wymienionego cyklu publikacji wysunięto następujące wnioski:

- różnice płciowe w ekspresji genów w warstwie pasmowatej/siatkowatej (ZF/R) są znacznie wyższe niż różnice w ekspresji genów w warstwie kłębkowatej (ZG),
- z pośród 248. genów różnicujących, 216 różni się wyłącznie w ZF/R, a tylko 15 genów różni się w ZG,
- ekspresja genów biorących udział w steroidogenezie (Star, Cyp11a1, Cyp11b1) jest niższa w ZF u samców; wyniki te są zgodne z faktem, że poziom w osoczu glikokortykoidów jest wyższy u samic niż u samców,
- ekspresja genów zaangażowanych w metabolizm hormonów steroidowych w ZF/R jest wyższa u samic,
- ekspresja genów które w bazie GO.BP mają tzw. łatki takie jak *„związanych z podziałami komórkowymi”*, *„ związane z procesami utleniania i redukcji”* , *„odpowiedz na substancje odżywcze”* i *„stymulację pozakomórkową” oraz „stymulację hormonami steroidowymi”* w ZF/R samic jest niższa,
- poziom mRNA Lipe w ZF/R jest wyższy u samców,
- poziom Lipe w ZG jest porównywalna u obu płci,
- brak różnic płciowych w ekspresji genów zaangażowanych w steroidogenezę w warstwie ZG,
- występują różnice w ekspresji genów zależnych od płci (np. Hcrt2),
- występują różnice w ekspresji innych genów, wcześniej nie opisywanych jako zależnych od płci (np. Cdkn1c),
- ekspresja genu receptora androgenów jest wyższa u samców w korze nadnerczy,
- poza ERRγ, ekspresja wszystkich analizowanych izoform receptora estrogenu (ER) lub (ERR) była podobna u samic i samców szczura,

- dzięki korelacji z Cyp11b2, ekspresja Vsln1 może być markerem dojrzałości nadnercza ? (hipoteza)
- gen Vsnl nie jest zaangażowany w kontrolę proliferacji komórek kory nadnerczy,
- Vsnl1 wchodzi w skład grupy genów szybkiej odpowiedzi na działanie ACTH,
- długotrwałe działanie ACTH i DX nie wpływa na ekspresję Vsln1,
- Vsnl zlokalizowany jest głównie w strefie ZG - jest uzależniona najprawdopodobniej od regulacji hormonalnej (aldosteron),
- AGII i K^+ nie wpływają na ekspresję Vsln1,
- ekspresję genów Vsln1 jest najsilniejsza podczas rozwoju nadnerczy.

Przedstawiony w/w cykl prac wnosi nowe informacje na temat profilu ekspresji transkryptomu w nadnerczach szczurów samców i samic, dostarczając nowych informacji odnośnie molekularnych różnić w ekspresji genów istotnych dla funkcji nadnerczy zależnych od płci. Publikacje stanowią całość i nawzajem się uzupełniają.

Piśmiennictwo :

Assie G, Auzan C, Gasc JM, Baviera E, Balaton A, Elalouf JM, Jeunemaitre X, Plouin PF, Corvol P, Clauser E.: Steroidogenesis in aldosterone- producing adenoma revisited by transcriptome analysis. J Clin Endocrinol Metab; 90, 6638-6649 (2005)

Baquedano MS, Saraco N, Berensztein E, Pepe C, Bianchini M, Levy E, Goni J, Rivarola MA, Belgorsky A.: Identification and developmental changes of aromatase and estrogen receptor expression in prepubertal and pubertal human adrenal tissues. J Clin Endocrinol Metab; 92, 2215–22 (2007)

Barzon L, Masi G, Pacenti M,Trevisan M, Fallo F, Remo A, Martignoni G, Montanaro D, Pezzi V, Palu G.: Expression of aromatase and estrogen receptors in human adrenocortical tumors. Virchows Arch; 452, 181-91 (2008)

Bastida CM, Cremades A, Castells MT, Lopez-Contreras AJ, Lopez-García C, Sanchez-Mas J, Penafiel R.: Sexual dimorphism of ornithine decarboxylase in the mouse adrenal: infuence of polyamine deprivation on catecholamine and corticoid levels. Am J Physiol; 292, 1010-1017 (2007)

Bentvelsen FM, McPhaul MJ, Wilson CM, Wilson JD, George FW.: Regulation of immunoreactive androgen receptor in the adrenal gland of the adult rat. Endocrinol; 137, 2659-63 (1996)

Berthon A, Martinez A, Bertherat J, Val P.: Wnt/ -catenin signalling in adrenal physiology and tumour development. Mol Cell Endocrinol; 351, 87–95 (2012)

Beuschlein F, Keegan CE, Bavers DL, Mutch C, Hutz JE, Shah S, Ulrich-Lai YM, Engeland WC, Jeffs B, Jameson JL, Hammer GD: SF-1, DAX-1, and acd: molecular determinants of adrenocortical growth and steroidogenesis. Endocr Res; 28, 597-607 (2002)

Błachuta M, Wrońska-Fortuna D.: Changes in estrogen receptor ERα and ERβ expression in chicken (Gallus domesticus) adrenal gland during short-fasting and refeeding. Folia Biol; 60, 199-203(2012)

Brownie AC, Bhasker CR and Waterman MR.: Levels of adrenodoxin, NADPH-cytochrome P-450 reductase and cytochromes P-45011 beta, P-45021, P-450scc, in adrenal zona fasciculata-reticularis tissue from androgen-treated rats. Mol Cell Endocrinol; 55, 15-20 (1988)

Byerly MS, Swanson RD, Wong GW, Seth Blackshaw S.: Estrogen-related receptor β deficiency alters body composition and response to restraint stress. BMC Physiol; 13, 10 (2013)

Calandra RS, Naess O, Purvis K, Attramadal A, Djoseland O, Hansson V.: Estrogen receptors in rat adrenal-gland. J Steroid Biochem; 9, 957-962 (1978)

Calandra RS, Purvis K, Naess O, Djoseland O, Hansson V.: Androgen receptors in rat-adrenal gland. J Steroid Biochem; 9, 1009-1015 (1978)

Cantagrel V, Lefeber DJ, Ng BG, Guan Z, Silhavy JL, Bielas SL, Lehle L, Hombauer H, Adamowicz M, Swiezewska E, De Brouwer AP, Blumel P, Sykut-Cegielska J, Houliston S, Swistun D, Ali BR, Dobyns WB, Babovic-Vukasanovic D, van Bokhoven H, Wevers RA, Raet CR, Freeze HH, Morava E, Al-Gazali L, Gleeson JG.: SRD5A3 is required for converting polyprenol to dolichol and is mutated in a congenital glycosylation disorder. Cell; 142, 203–217 (2010)

Carlson H.: Gustafsson B, Moller, KL: Quantitative mikromorphologische Studien uber die Nebennier eneinjahrigen weisser Mause unter besonderer Berucksichtigung von Geschlechtsverschieden-heiten. Uppsala Lakaref Forh.; 43, 49-82 (1937)

Caroccia B, Seccia TM, Campos AG, Gioco F, Kuppusamy M, Ceolotto G, Guerzoni E, Simonato F, Mareso S, Lenzini L, Fassina A, Rossi GP.: GPER-1 and estrogen receptor-β ligands modulate aldosterone synthesis. Endocrinol; 155, 4296-304 (2014)

Conley AJ, Corbin CJ, Hinshelwood MM, Liu Z, Simpson ER, Ford JJ, Harada N.: Functional aromatase expression in porcine adrenal gland and testis. Biol Reprod; 54, 497-505 (1996)

Dai FF, Zhang Y, Kang Y, Wang Q, Gaisano HY, Braunewell KH, Chan CB, Wheeler MB.: The neuronal Ca2+ sensor protein visinin-like protein-1 is expressed in pancreatic islets and regulates insulin secretion. J Biol Chem; 4, 21942–53 (2006)

Dallman MF: Control of adrenocortical growth in vivo. Endocr Res; 10, 213-242 (1984)

El Wakil A, Mari B, Barhanin J, Lalli E.: Genomic analysis of sexual dimorphism of gene expression in the mouse adrenal gland. Horm Metab Res; 45, 870-873 (2013)

Engeland WC, Levay-Young BK, Paul JA, Fitzgerald DA.: Expression of cytochrome P450 aldosterone synthase and 11 beta-hydroxylase mRNA during adrenal regeneration. Endocr Res; 21, 449–54 (1995)

Guasti L, Paul A, Laufer E, King P.: Localization of sonic hedgehog secreting and receiving cells in the developing and adult rat adrenal cortex. Mol Cell Endocrinol; 336, 117–22 (2011)

Hasimoto E.I.: The effect of the duration of the postoperative interval on the quantitative changes in adrenal glands of ovariectomized albino rats. Anat. Rec. 81, 205-213 (1940)

Hatai S.: On the weight of the abdominal and the thoracic viscera, the sex glands, ductess glands and the eyeballs of the albino rat (Mus norvegiucus albinus) according to body weight. Am J. Anat; 15, 87-119 (1913)

Hu J, Zhang Z, Shen WJ, Azhar S: Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. Nutr Metab; 7, 47 (2010)

Ishii T, Mitsui T, Suzuki S, Matsuzaki Y, Hasegawa T.: A genome-wide expression profile of adrenocortical cells in knockout mice lacking steroidogenic acute regulatory protein. Endocrinology; 153, 2714-2723 (2012)

Ishimura K, Fujita H.: Light and electron microscopic immunohistochemistry of the localization of adrenal steroidogenic enzymes. Microsc Res Tech; 36, 445-453 (1997)

Jöhren O, Bruggemann N, Dendorfer A, Dominiak P.: Gonadal steroids differentially regulate the messenger ribonucleic acid expression of pituitary orexin type 1 receptors and adrenal orexin type 2 receptors. Endocrinology; 144, 1219-1225 (2003)

Jöhren O, Bruggemann N, Dominiak P.: Orexins (hypocretins) and adrenal function. Horm Metab Res; 36, 370-375 (2004)

Jöhren O, Neidert SJ, Kummer M, Dendorfer A, Dominiak P.: Prepro-orexin and orexin receptor mRNAs are differentially expressed in peripheral tissues of male and female rats. Endocrinology; 142, 3324-3331 (2001)

King P, Paul A, Laufer E.: Shh signaling regulates adrenocortical development and identifies progenitors of steroidogenic lineages. Proc Natl Acad Sci USA; 106, 21185-90 (2009)

Kitay JI.: Effects of estrogen and androgenonthe adrenal cortex of the rat. In: Functions of the Adrenal Cortex. Vol 2, McKerns KW (ed). North Holland Publishing Corpany, Amsterdam; 775-811(1968)

Kitay JI.: Sex differences in adrenal cortex secretion in rat Endocrinology 68, 818-24(1961)

Kraemer FB, Shen WJ, Harada K, Patel S, Osuga J, Ishibashi S, Azhar S.: Hormone-sensitive lipase is required for high-density lipoprotein cholesteryl ester-supported adrenal steroidogenesis. Mol Endocrinol; 18, 549-557 (2004)

Kuiper GG, Carlsson BO, Grandien KA, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA.: Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β. Endocrinol; 138, 863-70(1997)

Kuno T, Kajimoto Y, Hashimoto T, Mukai H, Shirai Y, Saheki S, Tanaka C: cDNA cloning of a neural visinin-like Ca(2+)-binding protein. Biochem Biophys Res Commun.; 184(3), 1219-25 (1992)

Leśniewska B, Miskowiak B, Nowak M, Malendowicz LK.: Sex differences in adrenocortical structure and function. XXVII. The effect of ether stress on ACTH and corticosterone in intact, gonadectomized, and testosterone- or estradiol-replaced rats. Res Exp Med (Berl); 190, 95-103 (1990)

Lin L, Braunewell KH, Gundelfinger ED, Anand R.: Functional analysis of calcium-binding EF-hand motifs of visinin-like protein-1. Biochem Biophys Res Commun; 296, 827–32 (2002)

Lo YC, Brett L, Kenyon CJ, Morley SD, Mason Jo, Williams BC.: StAR protein is expressed in both medulla and cortex of the bovine and rat adrenal gland. Endocr Res; 24, 559-563 (1998)

Luo Y, Kumar P, Chen CC, Latham J, Wang L, Tudela C, Aleksander JM, Shelton JM, McKown L, Mendelson CR.: Estrogen-related Receptor γ (ERRγ) Serves a Role in Blood Pressure Homeostasis during Pregnancy. Mol Endocrinol; 28, 965–975(2014)

Malendowicz LK.: Sex differences in adrenocortical structure and function. III. The effects of post pubertal gonadectomy and gonadal hormone replacement on adrenal cholesterol side chain cleavage activity and on steroids biosynthesis by rat adrenal homogenates. Endokrinologie 75, 311-323 (1976)

Malendowicz LK, Robba C, Nussdorfer GG.: Sex differences in adrenocortical structure and function. XXII. Light- and electron-microscopic morphometric studies on the effects of gonadectomy and gonadal hormone replacement on the rat adrenal cortex. Cell Tissue Res. 244, 141-5 (1986)

Malendowicz LK.: Cytophysiology of the mammalian adrenal cortex as related to sex, gonadectomy and gonadal hormones. PTPN Press, Poznan, 1-233 (1994)

Mandl, AM.: The effects of pre- and post-pubertal ovariectomy on the adrenal glands and the pituatry. Proc. Kon. Ned. Akad. Wet.; 65, 355-365 (1962)

Mukai T, Kusaka M, Kawabe K, Idz K, Nawata H, Fujieda K, Morohashi K.: Sexually dimorphic expression of Dax-1 in the adrenal cortex. Genes; 7, 717-729 (2002)

Nishimoto K, Harris RB, Rainey WE, Seki T.: Sodium deficiency regulates rat adrenal zonaglomerulosa gene expression. Endocrinology; 155, 1363-1372 (2014)

Nishimoto K, Rigsby CS, Wang T, Mukai K, Gomez-Sanchez CE, Rainey MY, Seki T.: Transcriptome analysis reveals differentially expressed transcripts in rat adrenal zona glomerulosa and zona fasciculata. Endocrinology; 153, 1755-1763 (2012)

Nogueira EF, Vargas CA, Otis M, Gallo-Payet N, Bollag WB, Rainey WE.: Angiotensin-II acute regulation of rapid response genes in human, bovine, and rat adrenocortical cells. (2007) J Mol Endocrinol; 39, 365–74

Oaks MK, Raff H: Differentiation of the expression of aldosterone synthase and 11 beta-hydroxylase mRNA in the rat adrenal cortex by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. J Steroid Biochem Mol Biol; 54, 193-199 (1995)

Ola R, Lefebvre S, Braunewell KH, Sainio K, Sariola H.: The expression of visinin-like 1 during mouse embryonic development. Gene Expr Patterns; 12, 53–62 (2012)

Pappritz, G.: Trieb, G.: Dhom G.: Autoradiographische Untersuchungenzum Wachstum der Nebennierenrinde der Ratte. Z. Zellforsch. 126, 421-430 (1972)

Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER.: A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. Science; 307, 1625-30 (2005)

Romero DG, Ploczynski MW, Welsh BL, Gomez-Sanchez CE, Zhou MY, Gomez-Sanchez EP.: Gene expression profile in rat adrenal zonaglomerulosa cells stimulated with aldosterone secretagogues. Physiol Genomics; 32, 117–27 (2007)

Schimmer BP, Cordova M, Cheng H, Tsao A, Goryachev AB, Schimmer AD, Morris Q.: Global profiles of gene expression induced by adrenocorticotropin in Y1 mouse adrenal cells. Endocrinology; 147, 2357-2367 (2006)

Simpson ER, Mason JI, John ME, Zuber MX, Rodgers RJ, Waterman MR.: Regulation of the biosynthesis of steroidogenic enzymes. J Steroid Biochem; 27, 801 805 (1987)

Spät A, Hunyady L.: Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways. Physiol Rev; 84, 489–539 (2004)

Stocco DM.: StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. Annu Rev Physiol; 63, 193-213 (2001)

Tyczewska M, Rucinski M, Ziolkowska A, Szyszka M, Trejter M, Hochol-Molenda A, Nowak KW, Malendowicz LK: Enucleation- induced rat adrenal gland regeneration - expression profile of selected genes involved in control of adrenocortical cell proliferation. Int J Endocrinol 14: 1303-59 (2014)

Williams AN, Monticone S, Crudo V, Warth R, Veglio F, Mulatero P.: Visinin-like 1 is upregulated in aldosterone-producing adenomas with KCNJ5 mutations and protects from calcium-induced apoptosis. Hypertension; 59, 833–9 (2012)

Wilmot Roussel H, Vezzosi D, Rizk-Rabin M, Barreau O, Ragazzon B, René-Corail F, de Reynies A, Bertherat J, Assié G.: Identication of gene expression profiles associated with cortisol secretion in adrenocortical adenomas. J Clin Endocrinol Metab; 98, 1109-1121 (2013)

Yokoi H, Tsuruo Y, Miyamoto T, Ishimura K.: Steroid 5 alpha-reductase type 1 immunolocalized in the adrenal gland of normal, gonadectomized, and sex hormone-supplemented rats. Histochem Cell Biol; 109, 127-34 (1998)

Zhang Z, Teng CT.: Interplay between estrogen-related receptor alpha (ERRα) and gamma (ERRγ) on the regulation of ERRα gene expression. Mol Cell Endocrinol; 264, 128-141 (2007)

6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

6.1 Analiza bibliometryczna.

Autor jest współautorem 61 prac przy czym 39 prac w recenzowanych czasopismach z IF.

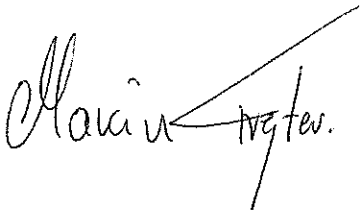
Łączna wartość IF 69,058

Łączna wartość punktacji MNiSW 603.00

Indeks Hirscha – 13

Liczba cytowań 415

Liczba prac (poza osiągnięciem):

jako pierwszy autor 6 , IF – 11,935

jako drugi, ostatni lub korespondencyjny 11, IF -17,041