

Autoreferat



dr n. med. Marta Urszula Tomczyk

Katedra i Zakład Biochemii

Wydział Lekarski

Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk, 2022

1. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE

Rok	Dyplom/stopień naukowy
2019	Uzyskanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych nadanego przez Radę Wydziału Lekarskiego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, dyscyplina: biologia medyczna, specjalność: biochemia. Rozprawa doktorska pt. „Metabolizm nukleotydów i przemiany energetyczne w sercu w eksperymentalnym modelu płasawicy Huntingtona”, promotor: prof. dr hab. Ryszard T. Smoleński.
2014-2019	Studia doktoranckie na Wydziale Lekarskim Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.
2014	Uzyskanie tytułu zawodowego magistra analityki medycznej. Praca magisterska pt. „Analiza metaboliczna serca z zastosowaniem stabilnych izotopomerów i spektrometrii mas”, promotor: prof. dr hab. Ryszard T. Smoleński.
2009-2014	Studia magisterskie na kierunku analityka medyczna na Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

2. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH.

Rok	Miejsce zatrudnienia
2018- do chwili obecnej	Adiunkt (od 2019 roku)/ asystent w Katedrze i Zakładzie Biochemii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego .
2015-2018	Młodszy specjalista w Katedrze i Zakładzie Biochemii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.
2014-2015	Doktorant w Katedrze i Zakładzie Biochemii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w ramach stypendium programu TEAM FNP pt. „Nukleotydy w patologii, diagnostyce i terapii chorób serca”.
2012-2014	Magistrant w Katedrze i Zakładzie Biochemii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w ramach stypendium programu TEAM FNP pt. „Nukleotydy w patologii, diagnostyce i terapii chorób serca”.

3. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘĆ, O KTÓRYCH MOWA W ART. 219 UST. 1 PKT 2 USTAWY.

a) tytuł osiągnięcia naukowego:

„Zmiany preferencji substratowej jako cel terapeutyczny w miopatiach związanych z chorobą Huntingtona”

b) osiągnięcie naukowe tworzy cykl 4 powiązanych tematycznie publikacji:

PRACA 1. Tomczyk M, Glaser T, Ulrich H, Slominska EM, Smolenski RT. *Huntingtin protein maintains balanced energetics in mouse cardiomyocytes*, Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 2022, 41(3), 231–238. [IF=1.449; MNiSW=40]

PRACA 2. Tomczyk M, Glaser T, Slominska EM, Ulrich H, Smolenski RT. *Purine nucleotides metabolism and signaling in huntington's disease: search for a target for novel therapies*, International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(12), 6545. [IF=6.208; MNiSW=140]

PRACA 3. Tomczyk M, Olkowicz M, Slominska EM, Smolenski RT. *High throughput procedure for comparative analysis of in vivo cardiac glucose or amino acids use in cardiovascular pathologies and pharmacological treatments*, Metabolites, 2021, 11(8), 497. [IF=5.581; MNiSW=70]

PRACA 4. Tomczyk M, Braczko A, Mierzejewska P, Podlacha M, Krol O, Jablonska P, Jedrzejewska A, Pierzynowska K, Wegrzyn G, Slominska EM, Smolenski RT. *Rosiglitazone ameliorates cardiac and skeletal muscle dysfunction by correction of energetics in huntington's disease*, Cells, 2022, 11, 2662. [IF=7.666; MNiSW=140]

Łączna wartość bibliometryczna cyklu wymienionych powyżej publikacji wynosi: IF = 20.904; punktacja MNiSW = 390.

Oświadczenia określające mój udział w powstaniu wymienionych prac znajdują się w załączniku nr 4 – wykaz osiągnięć naukowych stanowiących znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny.

Oświadczenia współautorów publikacji określające indywidualny wkład autorów w powstanie poszczególnych publikacji zamieszczono w załącznikach nr 6.1-6.4.

- c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Cel naukowy prac wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego

Celem przedstawionego osiągnięcia było wykazanie roli zaburzeń przemian substratów energetycznych i metabolizmu energetycznego w dysfunkcji mięśni szkieletowych i serca związanych z chorobą Huntingtona, opracowanie technik analitycznych służących tym badaniom oraz zasugerowanie nowych strategii terapeutycznych.

Cele szczegółowe obejmowały:

- **Identyfikację roli huntingtyny w regulacji metabolizmu energetycznego kardiomiocytów**

(Tomczyk M, Glaser T, Ulrich H, Słominska EM, Smolenski RT. *Huntingtin protein maintains balanced energetics in mouse cardiomyocytes*, Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 2022, 41(3), 231–238.)

- **Analizę roli zaburzeń metabolizmu energetycznego w dysfunkcji mięśni szkieletowych i serca w chorobie Huntingtona**

(Tomczyk M, Glaser T, Słominska EM, Ulrich H, Smolenski RT. *Purine nucleotides metabolism and signaling in huntington's disease: search for a target for novel therapies*, International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(12), 6545.)

- **Opracowanie metody analizy preferencji substratowej serca z wykorzystaniem stabilnych izotopomerów i spektrometrii mas**

(Tomczyk M, Olkowicz M, Słominska EM, Smolenski RT. *High throughput procedure for comparative analysis of in vivo cardiac glucose or amino acids use in cardiovascular pathologies and pharmacological treatments*, Metabolites, 2021, 11(8), 497.)

- **Analizę wpływu farmakologicznej modyfikacji preferencji substratowej na metabolizm energetyczny serca i mięśni szkieletowych w mysim modelu choroby Huntingtona**

(Tomczyk M, Braczko A, Mierzejewska P, Podlacha M, Krol O, Jablonska P, Jedrzejewska A, Pierzynowska K, Wegrzyn G, Słominska EM, Smolenski RT. *Rosiglitazone ameliorates cardiac and skeletal muscle dysfunction by correction of energetics in huntington's disease*, Cells, 2022, 11, 2662.)

Opis osiągnięcia habilitacyjnego

Choroba Huntingtona (HD) to rzadka, dziedziczna choroba neurodegeneracyjna, prowadząca do zaburzeń poznawczych, psychicznych i motorycznych (1). Częstość występowania HD w Europie szacuje się na 5 do 10 przypadków na 100 000 osób. U dorosłych pierwsze objawy pojawiają się między 30 a 50 rokiem życia, po czym choroba postępuje przez kolejne 15-20 lat. Genetyczną przyczyną HD jest występowanie wielokrotnych powtórzeń sekwencji nukleotydowej CAG w obrębie genu huntingtyny (*HTT*) zlokalizowanego na chromosomie 4, co skutkuje wydłużeniem odcinka poliglutaminowego w białku HTT. Liczba powtórzeń sekwencji nukleotydowej CAG w populacji waha się od 6 do 35, podczas gdy obecność ponad 36 powtórzeń określa patogenny allel HD. Jedynie w przypadku wystąpienia od 36 do 39 powtórzeń CAG w obrębie genu *HTT* objawy choroby mogą być mniejsze lub całkowicie niezauważalne (1). Powyżej 39 powtórzeń wydłużenie odcinka poliglutaminowego w eksonie 1 *HTT* prowadzi do powstania nierozpuszczalnych agregatów huntingtyny, obserwowanych zarówno we wczesnych, jak i w zaawansowanych stadiach choroby (2). Agregaty zmutowanej postaci *HTT* (mHTT) zidentyfikowano zarówno w mózgu, jak i w tkankach obwodowych np. w mięśniach szkieletowych (3).

Cel 1. Identyfikacja roli huntingtyny w regulacji metabolizmu energetycznego kardiomiocytów

(Tomczyk M, Glaser T, Ulrich H, Słominska EM, Smolenski RT. *Huntingtin protein maintains balanced energetics in mouse cardiomyocytes*, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 2022, 41(3), 231–238.)

Huntingtyna (*HTT*) jest białkiem o wielkości 348 kD, bogatym w struktury HEAT (huntingtin, elongation factor 3, PR65/A subunit of protein phosphatase 2A and mTor) odgrywającymi istotną rolę w sygnalizacji pomiędzy *HTT* a innymi białkami (4,5). Odnotowano, iż *HTT* oddziałuje z wieloma białkami między innymi czynnikiem transkrypcyjnym wiążącym CREB (CBP), fosfoproteina PACSIN1 (protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 1), receptorem wiążącym witaminę D czy też wątrobowym receptorem X (6–8). Obecność *HTT* zaobserwowano w jądrze komórkowym, retikulum endoplazmatycznym, aparacie Golgiego i endosomach (7,9). *HTT* koordynuje podział komórek i reguluje transkrypcję genów. Pośredniczy również w procesach takich jak: endocytoza, recykling pęcherzyków, transport endosomalny czy autofagia (4). Badania *in vitro* wykazały, iż białko to niezbędne jest już we wczesnej embriogenezie. Inaktywacja genu *HTT* jest letalna u myszy około siódmego embrionalnego dnia rozwoju (10). Wykazano ponadto, że myszy z knock-outem *HTT* specyficznym dla mózgu wykazują postępującą neurodegenerację, co sugeruje, że nie tylko akumulacja agregatów mHTT ale także utrata fizjologicznych funkcji przez *HTT* uczestniczyć może w rozwoju procesu neurodegeneracyjnego (11). Niemniej jednak rola *HTT* w różnicowaniu, rozwoju i

funkcjonowaniu innych typów komórek np. kardiomiocytów nie została wcześniej zbadana. Dlatego też celem **pracy nr 1** składającej się na osiągnięcie habilitacyjne była próba zróżnicowania mysich macierzystych komórek embrionalnych (ESC) z knock-outem *HTT* (metoda CRISPR) do kardiomiocytów, a następnie ocena ich metabolizmu energetycznego.

Badania przeprowadzone w **pracy nr 1** wykazały, że pomimo braku ekspresji *HTT* komórki ESC z powodzeniem zróżnicowano do kardiomiocytów. Niemniej jednak zaobserwowano, iż kardiomiocyty te (cechujące się brakiem *HTT* (*HTT KO*)) wykazywały zmniejszoną kurczliwość zarówno w porównaniu z komórkami kontrolnymi (WT) jak i komórkami kontrolnymi poddanymi procedurze CRISPR (*SCR*). Jedną z przyczyn zmian w kurczliwości komórek *HTT KO* może być obniżone stężenie adenylo-5'-trifosforanu (ATP) i dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NAD^+) w odniesieniu do komórek *SCR* (**Praca 1, Rycina 1**). Zaburzenia wewnątrzkomórkowych stężeń ATP oraz NAD^+ w kardiomiocytach *HTT KO* sugerują, iż pogorszenie metabolizmu energetycznego serca w HD może być wynikiem utraty fizjologicznych funkcji przez *HTT*. Hipotezę tę utwierdza fakt, iż toksyczne agregaty mHTT nie akumulują się w sercach mysich modeli choroby Huntingtona, co sugeruje, że to nie one stanowią molekularną przyczynę kardiomiopatii towarzyszącej HD (12). Wyniki omawianych badań wpisują się zatem w nurt sugerujący dualność mechanizmów prowadzących do zaburzeń metabolizmu energetycznego w HD – utratę fizjologicznych funkcji *HTT* oraz wewnątrzkomórkową akumulację agregatów jej zmodyfikowanej genetycznie formy - mHTT. Wydaje się zatem, iż obecnie testowane terapie, których celem jest obniżenie wewnątrzkomórkowych ilości mHTT mogą nie pełnić roli terapeutycznej w kardiomiopatii związanej w HD.

Co ciekawe, nasze wcześniejsze obserwacje zarówno w modelach *in vitro* jak i *in vivo* HD, wykazały obniżone wewnątrzkomórkowe stężenia ATP oraz NAD^+ , którym towarzyszyły zaburzenia przemian nukleotydów adeninowych (13–16). W piśmiennictwie istnieją dane sugerujące, że *HTT* może regulować również syntezę i degradację puryn (17). W **pracy nr 1** składającej się na osiągnięcie habilitacyjne wykazano obniżoną całkowitą pulę puryn (hipoksantyny, ksantyny, kwasu moczowego) w nadsączu komórkowym pochodzącym od kardiomiocytów *HTT KO* w odniesieniu do kardiomiocytów *SCR* (**Praca 1, Rycina 2**). Dane te kontrastowały z zaobserwowaną wcześniej przez nasz zespół znaczną akumulacją katabolitów nukleotydów adeninowych w surowicy mysich modeli HD (13), którą tłumaczyłaby zwiększona degradacja nukleotydów adeninowych, zarówno w mięśniach szkieletowych jak i w sercu. Jednak dane uzyskane w omawianej pracy (brak zwiększonej akumulacji puryn w nadsączu komórkowym pochodzącym od kardiomiocytów *HTT KO*), sugerują iż główną przyczyną obserwowanego wzrostu katabolitów nukleotydów adeninowych w surowicy (mysich modeli HD, a także pacjentów z HD) może być ich zwiększona degradacja głównie w mięśniach szkieletowych.

Podsumowując, omawiana praca wykazała zaburzenia metabolizmu energetycznego i przemian nukleotydów w kardiomiocytach pozbawionych HTT. Wydaje się zatem, że huntingtyna stanowi ważne wielofunkcyjne białko odgrywające istotną rolę nie tylko w utrzymaniu prawidłowej funkcji i metabolizmu komórek układu nerwowego, ale także komórek nieneuronalnych tj. kardiomiocytów.

Cel 2. Analiza roli zaburzeń metabolizmu energetycznego w dysfunkcji mięśni szkieletowych i serca w chorobie Huntingtona

(Tomczyk M, Glaser T, Slominska EM, Ulrich H, Smolenski RT. *Purine nucleotides metabolism and signaling in huntington's disease: search for a target for novel therapies*, International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(12), 6545.)

Wcześniejsze doniesienia publikacyjne wykazały, że u pacjentów cierpiących na HD, poza zaburzeniami ośrodkowego układu nerwowego (tj. zaburzeniami poznawczymi, psychicznymi i motorycznymi) obserwuje się również zaburzenia funkcji mięśni szkieletowych. Pacjenci z HD charakteryzują się zmniejszoną siłą mięśniową w porównaniu do osób zdrowych (18). Badania z wykorzystaniem mysich modeli doświadczalnych wykazały ponadto towarzyszącą HD atrofię mięśni szkieletowych (19). Odnotowano, iż obecność agregatów mHTT w mięśniach szkieletowych powodowała zmniejszenie rozmiaru, a także zmianę typu włókien mięśniowych (19–23). Co ciekawe liczne badania epidemiologiczne wykazały, iż choroby sercowo-naczyniowe stanowią drugą co do częstości przyczynę zgonów w populacji pacjentów z HD (24,25). Wśród pacjentów z HD zaobserwowano m.in. obniżoną częstość akcji serca czy też zmienność rytmu (26–28). Dane te potwierdziły również badania *in vivo*. Wykazały one, iż mysie modele HD charakteryzują się obecnością zaburzeń kurczliwości mięśnia sercowego prowadzących do kardiomiopatii rozstrzeniowej. Zmianom tym towarzyszyła ponadto zwiększona ekspresja genów płodowych (zmiana charakterystyczna dla patologicznego remodelingu serca) oraz obecność włókienia śródmiąższowego (29). Co ciekawe, serca jednego z mysich modeli HD (R6/2) nie odpowiadały w takim samym stopniu na długotrwałe traktowanie izoproterenolem (związkiem stymulującym hipertrofię serca), jak serca myszy typu dzikiego, co sugeruje dysfunkcję w ścieżce sygnalizacyjnej prowadzącej do przebudowy serca (30). Odnotowano również, że serca mysich modeli HD charakteryzowały się również zwiększoną liczbą komórek apoptotycznych (31). Wydaje się zatem, iż jedną z możliwych przyczyn obserwowanych dysfunkcji stanowić mogą zaburzenia metabolizmu energetycznego spowodowane przez wewnątrzkomórkową akumulację mHTT oraz dysfunkcję HTT.

Praca nr 2 wchodząca w skład cyklu jest pracą przeglądową (powstała w wyniku międzynarodowej współpracy naukowej) stanowiącą podsumowanie dotychczasowych danych eksperymentalnych jak i klinicznych dotyczących zaburzeń metabolizmu energetycznego (w tym

przemian nukleotydów i sygnalizacji purynergiczej) w mózgu, mięśniach szkieletowych oraz w sercu zarówno pacjentów jak i w modelach doświadczalnych HD (**Praca 2, Ryciny 1-3**).

Analiza piśmiennictwa jak i prac własnych w omawianej publikacji podkreśliła istotność zaburzeń towarzyszących neurodegeneracji w patofizjologii HD, przedstawiając ją tym samym jako chorobę wieloukładową. Ponadto zebrane dane sugerują, iż zaburzenia metabolizmu energetycznego mogą stanowić jedną z przyczyn dysfunkcji narządów (mózgu, mięśni szkieletowych, serca) dotkniętych HD. Wydaje się zatem, że terapie mające na celu poprawę metabolizmu energetycznego przez zastosowanie na przykład agonistów receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksysomów (PPAR) prowadzić mogą do poprawy funkcji układu nerwowego, mięśni szkieletowych czy też serca w HD.

Cel 3. Opracowanie metody analizy preferencji substratowej serca z wykorzystaniem stabilnych izotopomerów i spektrometrii mas

(**Tomeczyk M**, Olkowicz M, Słominska EM, Smolenski RT. *High throughput procedure for comparative analysis of in vivo cardiac glucose or amino acids use in cardiovascular pathologies and pharmacological treatments*, *Metabolites*, 2021, 11(8), 497.),

Serce jest narządem o bardzo dużym zapotrzebowaniu energetycznym i wysokiej szybkości syntezy i zużycia ATP. Za produkcję ATP w sercu w ok. 90% odpowiadają procesy fosforylacji oksydacyjnej, dla których niezbędnym substratem jest tlen (32). W stanie spoczynku zużycie ATP wynosi 60-150 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ tkanki, jednak w czasie wysiłku może wzrosnąć ono nawet pięciokrotnie (33). W celu pokrycia tak wysokiego zapotrzebowania energetycznego, serce może zużywać szerokie spektrum substratów takich jak kwasy tłuszczowe, glukoza, mleczan czy też ciała ketonowe. W warunkach fizjologicznych, kwasy tłuszczowe oraz węglowodany (glukoza) stanowią główne paliwo energetyczne dla serca. ATP powstałe w wyniku β -oksydacji kwasów tłuszczowych stanowi od 60 do 80% całkowitej puli produkowanego ATP. Za pozostałą część produkcji odpowiedzialne są: glikoliza (ok. 20%) oraz przemiany mleczanu (ok. 15%). Tylko ok. 5% produkcji ATP pochodzi z przemian pirogronianu, ciał ketonowych, aminokwasów czy też octanu (34).

Udział poszczególnych substratów energetycznych w produkcji całkowitej puli ATP podlega regulacji. Stany chorobowe (np. nadciśnienie, choroba niedokrwienna) indukują zmiany w aktywnościach enzymów szlaków metabolicznych modyfikując tym samym preferencję substratową serca. Co ciekawe, nasze wcześniejsze badania wskazywały, że zarówno w kardiomiopatii jak i miopatii towarzyszącej HD występuje zmniejszone utlenianie jednego z substratów energetycznych - glukozy (13,23). Odwrócenie tego trendu tzn. zwiększenie utleniania glukozy w narządach dotkniętych HD może przyczynić się do poprawy ich metabolizmu energetycznego, a co za tym idzie ich funkcji. Wynika to

z faktu, iż glukoza stanowi korzystniejszy substrat pod względem bilansu tlenowego. Jej utlenianie generuje najwięcej cząsteczek ATP w odniesieniu do ilości cząsteczek tlenu niezbędnych do tego procesu w porównaniu z innymi substratami energetycznymi.

Kluczowym etapem koniecznym do weryfikacji postawionej powyżej hipotezy było opracowanie metody oceny preferencji substratowej serca (wykorzystującej stabilne izotopomery substratów energetycznych jak i spektrometrię mas) pozwalającej na prześledzenie zmian wywołanych stosowaniem związków wpływających na zmianę udziału poszczególnych substratów w przemianach energetycznych. Związkami zastosowanymi w tym celu były: jodoocetan (inhibitor glikolizy), glargina (analog insuliny, zwiększający obwodowe zużycie glukozy) oraz trimetazydyna i ranolazyna (inhibitory β -oksydacji kwasów tłuszczowych). Odnotowano, że opracowana w **pracy nr 3** metoda pozwala na porównanie efektywności wejścia glukozy do glikolizy (stosunek ^{13}C alaniny/ ^{13}C glukozy), wydajności jej dalszych przemian przez acetylo-CoA do cyklu Krebsa (stosunek ^{13}C glutaminianu/ ^{13}C glukozy) oraz udziału przemian glukozy w ogólnym metabolizmie energetycznym (stosunek ^{13}C glutaminianu/ ^{13}C alaniny) w odpowiedzi na zastosowaną modyfikację preferencji substratowej serca. Opracowana metoda umożliwia również ocenę udziału aminokwasów rozgałęzionych (leucyny i waliny) w metabolizmie energetycznym serca. Tak jak w przypadku oceny udziału glukozy w metabolizmie energetycznym serca, metoda ta polegała na podskórnej iniekcji znakowanej izotopowo ^{13}C leucyny lub waliny, a następnie oceny wzbogacenia frakcji ^{13}C glutaminianu. Oceniono możliwości metody przez zastosowanie związków modyfikujących przemiany rozgałęzionych aminokwasów, w tym inhibitora kinazy dehydrogenazy rozgałęzionych alfa ketokwasów (BT2). Końcowy schemat opracowanych metod znajduje się na **Rycinie 6 pracy nr 3**.

Podsumowując, opracowane w **pracy nr 3** metody pozwalają na szybkie analizy porównawcze zużycia glukozy i aminokwasów w sercu myszy. Metody te mogą znaleźć zastosowanie w ocenie wpływu terapii modyfikujących przemiany substratów energetycznych na preferencję substratową serca *in vivo*.

Cel 4. Analiza wpływu farmakologicznej modyfikacji preferencji substratowej na metabolizm energetyczny serca i mięśni szkieletowych w mysim modelu choroby Huntingтона

(**Tomczyk M**, Braczko A, Mierzejewska P, Podlacha M, Krol O, Jablonska P, Jedrzejewska A, Pierzynowska K, Wegrzyn G, Slominska EM, Smolenski RT. *Rosiglitazone ameliorates cardiac and skeletal muscle dysfunction by correction of energetics in huntington's disease*, Cells, 2022, 11, 2662.).

W **pracy nr 4** składającej się na osiągnięcie habilitacyjne zbadano wpływ stosowania agonisty receptorów PPAR- rozyglitazonu na funkcję i metabolizm energetyczny mięśni szkieletowych i serca w jednym z mysich modeli choroby Huntingtona (R6/1). Rozyglitazon jest syntetycznym agonistą PPAR- γ stosowanym klinicznie w celu zniesienia insulinooporności u pacjentów z cukrzycą typu II (35). Co ciekawe, był on również testowany jako środek neuroprotekcyny w HD. Jego zastosowanie zmniejszało toksyczność indukowaną przez agregaty mHTT w komórkach prądkowia (36). Co więcej, podanie rozyglitazonu znacząco poprawiło funkcje motoryczne myszy N171-82Q (37). Podobne obserwacje odnotowano również w szczurzym modelu HD indukowanym kwasem chinolinowym (38). Wyniki uzyskane w **pracy nr 4**, po raz pierwszy wykazały, iż stosowanie agonisty PPAR- γ w mysim modelu HD poprawia również funkcjonalność mięśni szkieletowych (obserwowano podwyższoną siłę mięśniową) (**Praca 4, Rycina 1**), a także funkcję skurczową serca (odnotowano polepszenie frakcji skracania) (**Praca 4, Rycina 2**).

Z wykorzystaniem opracowanej w **pracy nr 3** metody zbadano następnie preferencję substratową serca i mięśni szkieletowych w mysim modelu HD po podaniu rozyglitazonu. Odnotowano zwiększone utlenianie glukozy w sercu jak i w mięśniach szkieletowych myszy R6/1 po zastosowaniu agonisty PPAR- γ (**Praca 4, Rycina 3**). W celu weryfikacji hipotezy sugerującej, iż modyfikacja preferencji substratowej wpłynąć może na poprawę metabolizmu energetycznego narządów dotkniętych HD, kolejnym etapem badań była ocena stężeń nukleotydów adeninowych (ATP, adenozy-5'-difosforanu (ADP) i adenozy-5'-monofosforanu (AMP)), fosfokreatyny i kreatyny, a także utlenionej i zredukowanej formy NAD^+ w sercach i mięśniach szkieletowych mysiego modelu HD traktowanego agonistą PPAR- γ . Zaobserwowano podwyższenie puli nukleotydów adeninowych oraz całkowitej puli fosfokreatyny i kreatyny zarówno w sercach jak i mięśniach szkieletowych myszy R6/1 traktowanych rozyglitazonem w odniesieniu do grupy kontrolnej (**Praca 4, Rycina 4**).

Zmianom tym towarzyszyła również zmniejszona akumulacja katabolitów nukleotydów (inozyny, hipoksantyny, a także kwasu moczowego) w surowicy zwierząt poddanych farmakoterapii (**Praca 4, Ryciny 6A-6C**). Obniżenie stężenia katabolitów adeninowych w surowicy zwierząt sugeruje ich użyteczność, nie tylko jako potencjalnych biomarkerów choroby Huntingtona (co zostało opisane i przedyskutowane w naszej poprzedniej pracy (13) jak i w **pracy nr 1** składającej się na osiągnięcie habilitacyjne), ale również jako wskaźnik skuteczności terapii mających na celu poprawę metabolizmu energetycznego w HD.

Wcześniejsze badania eksperymentalne wykazały, iż zaburzeniom metabolizmu energetycznego w miopatiach związanych z HD towarzyszyły zmiany w strukturze mitochondriów (39–41). Ponadto badania z zastosowaniem rozyglitazonu w mysich modelach eksperymentalnych wykazywały zwiększoną biogenezę mitochondriów zarówno w mózgu jak i w tkankach obwodowych

(36,42,43). Dlatego też kolejnym etapem badań była ocena gęstości mitochondriów (poprzez zbadanie aktywności syntazy cytrynianowej) w mięśniach szkieletowych i sercach myszy HD, którym podawano rozyglitazon. Wykazano, podwyższoną aktywność tego enzymu zarówno w sercach jak i w mięśniach szkieletowych myszy R6/1 traktowanych agonistą PPAR- γ w odniesieniu do zwierząt kontrolnych, co sugeruje zwiększenie gęstości mitochondriów (**Praca 4, Ryciny 5C i 5F**).

Liczne badania eksperymentalne wiążą dysfunkcję mitochondriów w HD nie tylko z zaburzeniami w ich strukturze, ale również obecnością zmian w ich funkcjonalności (w tym zaburzeniami funkcji łańcucha oddechowego czy też zaburzonej gospodarki jonów wapnia) prowadzącymi do indukcji stresu oksydacyjnego (44–46). Wykazano, że wewnątrzkomórkowa agregacja mHTT prowadziła do zwiększonej produkcji reaktywnych form tlenu (ROS) (47). Co ciekawe, podwyższony poziom ROS w sercach i mięśniach szkieletowych myszy R6/1 odnotowano również w omawianej **pracy nr 4 (Praca 4, Rycina 8B, 8D Supplement)**.

Powszechnie wiadomo, że mitochondrialny kompleks I i III, a zwłaszcza kompleks I, uważany jest za jedno z głównych miejsc produkcji ROS w komórce (48). Zaobserwowano, że mitochondria izolowane z mięśnia *soleus* myszy R6/1, pomimo zmniejszonej aktywności kompleksu II i braku zmian w aktywności kompleksu IV, wykazywały podwyższoną aktywność kompleksu I (**Praca 4, Rycina 7 Supplement**). Podobną tendencję w aktywności kompleksu I stwierdziliśmy również w mitochondriach wyizolowanych z serca myszy R6/1 (**Praca 4, Rycina 6 Supplement**). Wydaje się zatem, iż obserwowana zarówno w sercach jak i w mięśniach szkieletowych zwiększona aktywność kompleksu I może tłumaczyć zwiększoną produkcję ROS, a tym samym dysfunkcję mitochondriów w tkankach obwodowych dotkniętych HD. W 2011 roku Sanz i współautorzy wykazali, iż terapia rozyglitazonem wpłynęła na zmniejszenie aktywności mitochondrialnego kompleksu oddechowego I i III bez modyfikacji kompleksu II w mitochondriach wątroby, prowadząc tym samym do zmniejszenia wewnątrzkomórkowej produkcji ROS (49). Podobny efekt rozyglitazonu na kompleks I łańcucha oddechowego zaobserwowano również w mitochondriach izolowanych z mięśni szkieletowych pacjentów z cukrzycą typu 2 leczonych rozyglitazonem (50). W **pracy nr 4** również zaobserwowano ten efekt, bowiem leczenie rozyglitazonem prowadziło do zmniejszenia aktywności kompleksu I zarówno w mitochondriach izolowanych z mięśnia szkieletowego jak i serca mysiego modelu HD (**Praca 4, Ryciny 5A-B, 5D-E**). Zmiana ta przyczyniać się może do zahamowania nadprodukcji ROS, poprawiając tym samym funkcjonalność mięśni szkieletowych i serca mysiego modelu HD. Dodatkowym argumentem jest poprawa całkowitego statusu antyoksydacyjnego osocza (TAOS), (jednego ze wskaźników równowagi oksydacyjnej) u myszy R6/1, którym podawano rozyglitazon w odniesieniu do zwierząt z grupy kontrolnej (**Praca 4, Rycina 6D**).

Podsumowując w **pracy nr 4** wykazano iż, rozyglitazon przyczynił się do poprawy siły mięśniowej oraz funkcji serca myszy R6/1 poprzez: zwiększenie ilości mitochondriów, zwiększenie utleniania glukozy oraz zmniejszenie aktywności mitochondrialnego kompleksu I (**Praca 4, Rycina 7**). Zmiany te wpłynęły na poprawę metabolizmu energetycznego mięśnia sercowego i mięśni szkieletowych (wzrost całkowitej puli nukleotydów adeninowych oraz całkowitej puli fosfokreatyny i kreatyny), a także zmniejszenie stężenia katabolitów nukleotydów adeninowych w surowicy. Ponadto zmiany w funkcjonalności łańcucha oddechowego, wpłynąć mogły na obniżenie stresu oksydacyjnego i poprawę statusu antyoksydacyjnego osocza. Wydaje się zatem iż związek ten może być interesującym narzędziem terapeutycznym w leczeniu nie tylko neurodegeneracji, ale także kardiomiopatii i miopatii związanych z HD.

Podsumowanie

Badania wykonane w ramach osiągnięcia habilitacyjnego wykazały iż huntingtyna stanowi wielofunkcyjne białko niezbędne do zachowania prawidłowej funkcji i metabolizmu energetycznego nie tylko komórek ośrodkowego układu nerwowego, ale również komórek nieneuronalnych tj. kardiomiocyty. Dysfunkcja tego białka przyczynia się do rozwoju zaburzeń funkcji serca towarzyszących chorobie Huntingtona. Uzyskane wyniki wykazały iż jednym ze wspólnych czynników patofizjologicznych w narządach dotkniętych HD (zarówno w mózgu, mięśniach szkieletowych jak i w sercu) jest obniżenie metabolizmu energetycznego w komórkach oraz zmiany udziału poszczególnych substratów metabolicznych (tj. glukozy). Obserwowano to zarówno w modelach *in vitro* jak i *in vivo*. Zmiana preferencji substratowej *in vivo* w mysim modelu HD z zastosowaniem jednego z agonistów receptorów PPAR, rozyglitazonu (związku o potwierdzonej już skuteczności terapeutycznej w OUN w HD) spowodowała zwiększenie utleniania glukozy przyczyniając się tym samym do poprawy metabolizmu energetycznego oraz funkcji serca i mięśni szkieletowych mysiego modelu HD. Wyniki te sugerują, iż substancje modyfikujące utlenianie glukozy tj. agoniści PPAR stanowić mogą nowy obiecujący kierunek leczenia miopatii towarzyszących HD. Zbadanie udziału glukozy w metabolizmie energetycznym serca możliwe było dzięki opracowaniu autorskiej metody oceny preferencji substratowej z wykorzystaniem stabilnych izotopomerów i spektrometrii mas. Metoda ta może znaleźć zastosowanie w badaniach *in vivo* oceniających wpływ terapii modyfikujących przemiany substratów energetycznych.

Należy pamiętać, że choroba Huntingtona jest nieuleczalną chorobą wieloukładową o skomplikowanej patofizjologii. Niestety, zarówno badania podstawowe jak i testowane obecnie klinicznie terapie HD skupiają się głównie na badaniu ośrodkowego układu nerwowego pomijając rolę zaburzeń towarzyszących neurodegeneracji tj. zaburzenia funkcji mięśni szkieletowych czy też serca. Biorąc pod uwagę ekspresje huntingtyny w większości komórek naszego organizmu i coraz to częściej

podkreślaną przez badaczy i klinicystów towarzyszącą HD dysfunkcją narządów obwodowych, konieczne wydaje się bardziej kompleksowe podejście do tej choroby - uwzględniające również inne układy dotknięte HD. Stanowi to cel nie tylko prac ujętych w osiągnięciu habilitacyjnym ale również pozostałych prowadzonych przeze mnie badań.

Wnioski końcowe

- 1. Wykazano, iż huntingtyna odgrywa ważną rolę w regulacji metabolizmu energetycznego i przemian nukleotydów adeninowych w kardiomiocytach.**
- 2. Zaburzenia przemian substratów energetycznych i metabolizmu energetycznego mogą stanowić przyczynę dysfunkcji mięśni szkieletowych i serca obserwowanych w chorobie Huntingtona.**
- 3. Opracowana metoda oceny preferencji substratowej serca *in vivo* pozwala na porównawczą ocenę zmian udziału glukozy czy też aminokwasów w metabolizmie energetycznym w patologii lub zmian wywołanych farmakologicznie.**
- 4. Podanie rozyglitazonu w mysim modelu choroby Huntingtona wpłynęło na poprawę metabolizmu energetycznego i zmianę preferencji substratowej w sercu i mięśniach szkieletowych prowadząc do korekty miopatii towarzyszących HD.**

Znaczenie i potencjalne wykorzystanie uzyskanych wyników

- Przedstawione prace podkreślają istotność zaburzeń towarzyszących neurodegeneracji w patofizjologii choroby Huntingtona (HD), przedstawiając ją tym samym jako chorobę wieloukładową.
- Wyniki prezentowanych badań wpisują się w nurt sugerujący dualność mechanizmów prowadzących do zaburzeń metabolizmu energetycznego w HD – utratę fizjologicznych funkcji huntingtyny (HTT) oraz wewnątrzkomórkową akumulację agregatów jej zmodyfikowanej genetycznie formy (mHTT).
- Obecność zmian metabolizmu energetycznego w kardiomiocytach pozbawionych huntingtyny sugeruje iż podłożem ich zaburzeń w sercu jest utrata fizjologicznych funkcji HTT, zatem terapie mające na celu obniżenie wewnątrzkomórkowych ilości mHTT mogą nie być skuteczne w kardiomiopatii związanej w HD.

- Znaczące zmiany stężeń badanych w surowicy mysich modeli HD katabolitów nukleotydów (tj. inozyny, hipoksantyny, kwasu moczowego) w odpowiedzi na eksperymentalną terapię sugeruje ich użyteczność jako wskaźników skuteczności procedur mających na celu poprawę metabolizmu energetycznego komórki.
- Opracowana metoda oceny preferencji substratowej serca *in vivo* może być zastosowana nie tylko w badaniach podstawowych ale również w badaniach przedklinicznych oceniających wpływ eksperymentalnych terapii na przemiany energetyczne.
- Farmakologiczna optymalizacja udziału poszczególnych substratów w metabolizmie energetycznym serca i mięśni szkieletowych może stanowić interesujący cel terapeutyczny miopatii towarzyszących HD.

4. INFORMACJA O WYKAZYWANIU SIĘ ISTOTNĄ AKTYWNOŚCIĄ NAUKOWĄ REALIZOWANĄ W WIĘCEJ NIŻ JEDNEJ UCZELNI, INSTYTUCJI NAUKOWEJ, W SZCZEGÓLNOŚCI ZAGRANICZNEJ.

REALIZOWANE ZAGADNIENIA NAUKOWE:

I. ROLA PRZEMIAN NUKLEOTYDÓW ADENINOWYCH W ROZWOJU PATOLOGII SERCOWO-NACZYNIOWYCH

Swoją karierę naukową rozpoczęłam w 2012 roku jako magistrant oraz wolontariusz w dwóch projektach naukowych realizowanych w Katedrze i Zakładzie Biochemii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (TEAM, STRATEGMED), w ramach których wykonywałam analizy aktywności enzymów szlaku katabolizmu nukleotydów adeninowych na powierzchni zastawek serca oraz naczyniach krwionośnych pozyskanych ze zwierzęcych modeli doświadczalnych. W kolejnych latach aktywnie uczestniczyłam również w projekcie OPUS, badającym rolę jednego z enzymów szlaku przemian nukleotydów adeninowych, ekto-5'-nukleotyduazy (CD73) w rozwoju m.in. choroby zastawkowej i dysfunkcji śródbłonna naczyniowego. Badania przeprowadzone z moim udziałem pozwoliły m.in. na poznanie profilu przemian nukleotydów adeninowych w naczyniach oraz na powierzchni zastawek serca w stanie fizjologicznym oraz wykazanie istotnej roli zaburzeń przemian nukleotydów w rozwoju patologii układu sercowo-naczyniowego tj. miażdżycy czy też choroby zastawkowej. Ich efekty przedstawiono w poniższych publikacjach:

- 1P. Kutryb-Zajac B, Zukowska P, **Toczek M**, Zabielska M, Lipinski M, Rybakowska I, Chlopicki S, Slominska E, Smolenski RT. *Enzymes of extracellular nucleotide catabolism*

- in aortoiliac bifurcation in atherosclerotic ApoE/LDLR double knockout mice.* Nucleotides, nucleosides and nucleic acids, 2014, 33(4-6),323-28. [IF=1.018; MNiSW=15]
- 2P. **Toczek M**, Kutryb-Zajac B, Kapczynska M, Lipinski M, Slominska E, Smolenski RT. *Extracellular nucleotide catabolism in heart valves.* Nucleotides, nucleosides and nucleic acids, 2014, 33(4-6), 329-32. [IF=1.018; MNiSW=15]
- 3P. Zukowska P, Kutryb-Zajac B, **Toczek M**, Smolenski RT, Slominska EM. *The role of ecto-5'- nucleotidase in endothelial dysfunction and vascular pathologies.* Pharmacological Reports, 2015, 67 (4), 675-681. [IF=2.251; MNiSW=25]
- 4P. Kutryb-Zajac B, Mateuszuk L, Zukowska P, Jaształ A, Zabielska MA, **Toczek M**, Jablonska P, Zakrzewska A, Sitek B, Rogowski J, Lango R, Slominska EM, Chlopicki S, Smolenski RT. *Increased activity of vascular adenosine deaminase in atherosclerosis and therapeutic potential of its inhibition.* Cardiovascular Research, 2016, 112(2), 590-605. [IF=5.878; MNiSW=40]
- 5P. Zukowska P, Kutryb-Zajac B, Jaształ A, **Toczek M**, Zabielska MA, Borkowski T, Khalpey Z, Smolenski RT, Slominska EM. *Deletion of CD73 in mice leads to aortic valve dysfunction.* Biochimica Et Biophysica Acta - Molecular Basis of Diseases, 2017, 1863 (6), 1464-1472. [IF=5.108; MNiSW=40]
- 6P. Mierzejewska P, Zabielska MA, Kutryb-Zajac B, **Tomczyk M**, Koszalka P, Smolenski RT, Slominska EM. *Impaired L-arginine metabolism marks endothelial dysfunction in CD73-deficient mice,* Molecular and Cellular Biochemistry, 2019, 458, 133-142. [IF=2.795; MNiSW=70]

Wyniki badań powstały w ramach realizacji 3 projektów badawczych w których uczestniczyłam jako wykonawca:

- 1PB. Program STRATEGMED finansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju pt. „Śródbłonek Naczyniowy w Chorobach Cywilizacyjnych: od Badań Poznawczych do Oferty Innowacyjnego Leku o Działaniu Śródbłonkowym”, okres trwania projektu: 2010 – 2015.
- 2PB. Projekt OPUS finansowany przez Narodowe Centrum Nauki pt. „Regulacja ekspresji ekto-5'-nukleotydyazy – zmiany w patologii i zastosowania w terapii”, okres trwania projektu: 2011 – 2014.
- 3PB. Projekt TEAM finansowany przez: Fundację na rzecz Nauki Polskiej pt. „Nukleotydy w patologii, diagnostyce i terapii chorób serca”, okres trwania projektu: 2013 – 2015

II. PRZEMIANY SUBSTRATÓW ENERGETYCZNYCH W SERCU MYSICH MODELI CHORÓB SERCOWO-NACZYNIOWYCH

Od 2013 roku podjęłam się zbadania roli przemian substratów energetycznych w patologii chorób sercowo-naczyniowych. Pierwszym sukcesem badawczym w tej tematyce było opracowanie autorskiej metody analitycznej, pozwalającej na ocenę preferencji substratowej serca *in vivo*, która stanowiła przedmiot mojej pracy magisterskiej pt. „Analiza metaboliczna serca z zastosowaniem stabilnych izotopomerów i spektrometrii mas” (promotor prof. dr. hab. Ryszard Smoleński). Metoda ta stanowiła podłoże współpracy nawiązanej w 2014 roku (trwającej do dziś) z dr Michałem Mielcarkiem z Division of Genetics and Molecular Medicine, Kings College, Londyn, Wielka Brytania, gdzie odbyłam swój pierwszy staż naukowy. Efektem stażu była publikacja podkreślająca rolę zaburzeń metabolizmu energetycznego i przemian glukozy w mięśniach szkieletowych mysich modeli choroby Huntingtona. Kolejny staż naukowy podczas którego zastosowałam opracowaną w 2014 roku metodę analityczną, odbyłam w 2015 roku w Jagiellońskim Centrum Rozwoju Leków w Krakowie. Efektem współpracy z tą jednostką badawczą była publikacja opisująca zmiany metaboliczne w sercu mysiego modelu niewydolności serca.

W kolejnych latach udoskonaliłam oraz rozszerzyłam wspomnianą powyżej metodę, a jej opracowanie wraz z zastosowaniem w badaniach nad patofizjologią chorób sercowo-naczyniowych stanowi trzecią pracę w opisywanym osiągnięciu habilitacyjnym. Metoda ta została wykorzystana również w pracy opublikowanej w prestiżowym czasopiśmie *Metabolism*, stanowiącej jednocześnie kontynuację wieloletniej współpracy z Jagiellońskim Centrum Rozwoju Leków. Kontynuując zainteresowanie tematem przemian substratów energetycznych w sercu oraz mięśniach szkieletowych mysich modeli chorób-sercowo naczyniowych, badałam również rolę modyfikacji utleniania kwasów tłuszczowych na poprawę funkcji mięśni szkieletowych w mysich modelach dyslipidemii.

Od 2017 roku jestem również wykonawcą w projektach badawczych (HARMONIA, OPUS) oceniających rolę przemian energetycznych w rewersji niewydolności serca oraz badających znaczenie adaptacji metabolizmu energetycznego serca w miażdżycy, w których to wykonuję i nadzoruję eksperymenty *in vivo*.

Podsumowując, realizowane przez mnie badania wykazały obecność zmian w metabolizmie energetycznym serca w odpowiedzi na dyslipidemię oraz postępującą niewydolność serca. Wyniki te mogą stać się podstawą do dalszych zaawansowanych badań nad zmianami metabolicznymi w sercu w toku rozwoju miażdżycy czy też hipertrofii serca, także w kontekście wykorzystania klinicznego m.in. do stworzenia zindywidualizowanej osobniczo farmakoterapii opierającej się na modyfikacjach preferencji substratowych serca. Ich efekty przedstawiono w poniższych publikacjach:

- 7P. Czarnowska E, Bierla JB, **Toczek M**, Tyrankiewicz U, Pajak B, Domal-Kwiatkowska D, Ratajska A, Smolenski RT, Ulrike M, Chlopicki S. *Narrow time window of metabolic changes associated with transition to overt heart failure in Tgaq*44 mice*. Pharmacological reports, 2016, 68(4), 707-714. [IF=2.587; MNiSW=25]
- 8P. **Tomczyk M**, Olkowicz M, Slominska EM, Smolenski RT. *High throughput procedure for comparative analysis of in vivo cardiac glucose or amino acids use in cardiovascular pathologies and pharmacological treatments*, Metabolites, 2021, 11(8), 497. [IF=5.581; MNiSW=70]
- 9P. Olkowicz M, **Tomczyk M**, Debski J, Tyrankiewicz U, Przyborowski K, Borkowski T, Zabielska-Kaczorowska M, Szupryczynska N, Kochan Z, Smeda M, Dadlez M, Chlopicki S, Smolenski RT. *Enhanced cardiac hypoxic injury in atherogenic dyslipidaemia results from alterations in the energy metabolism pattern*. Metabolism, 2021, 14, art. 154400, 1-16. [IF=13.934; MNiSW=140]
- 10P. **Tomczyk M**, Braczko A, Jablonska P, Mika A, Przyborowski K, Jedrzejewska A, Krol O, Kus F, Sledzinski T, Chlopicki S, Slominska EM, Smolenski RT. *Enhanced muscle strength in dyslipidemic mice and its relation to increased capacity for fatty acid oxidation*, International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(22), 12251. [IF=6.208; MNiSW=140]

Wyniki badań powstały w ramach realizacji 2 projektów badawczych w których uczestniczę jako wykonawca:

- 4PB. Projekt HARMONIA finansowany przez Narodowe Centrum Nauki pt. „*Rewersja niewydolności serca podczas mechanicznego wspomaganie funkcji lewej komory – rola nukleotydów i przemian energetycznych w komórkach serca*”, okres trwania projektu: 2017 – obecnie.
- 5PB. Projekt OPUS finansowany przez Narodowe Centrum Nauki pt. „*Adaptacje metabolizmu energetycznego miocytów serca w miażdżycy – znaczenie w patologii i strategiach terapeutycznych*”, okres trwania projektu: 2017 – obecnie.

Wyniki badań powstały w efekcie odbycia 2 staży naukowych:

1S. Division of Genetics and Molecular Medicine, Kings College, Londyn, Wielka Brytania, czerwiec 2014, opiekun: dr Michał Mielcarek.

Tematyka badań: realizacja badań nad metabolizmem energetycznym i przemianami glukozy w mięśniach szkieletowych mysich modeli choroby Huntingtona.

Efekt stażu: pierwsze współautorstwo w artykule naukowym (artykuł nr 11P. w podpunkcie III).

2S. Jagiellońskie Centrum Rozwoju Leków (JCET), Kraków, Polska, marzec 2015,
kierownik jednostki: prof. dr hab. Stefan Chłopicki.

Tematyka badań: realizacja badań nad metabolizmem energetycznym serca w mysich modelach dyslipidemii oraz hipertrofii serca.

Efekt stażu: wyniki badań uzyskanych podczas pobytu w jednostce zostały zawarte w 3 artykułach naukowych (artykuły nr 7P., 9P. oraz 10P.).

III. METABOLIZM NUKLEOTYDÓW I PRZEMIANY ENERGETYCZNE W MIOPATIACH ZWIĄZANYCH Z CHOROBA HUNTINGTONA

W latach 2014-2019 byłam uczestnikiem studiów doktoranckich na Wydziale Lekarskim GUMed, które w 2019 roku zakończyłam obroną pracy doktorskiej pt. „Metabolizm nukleotydów i przemiany energetyczne w sercu w eksperymentalnym modelu płasawicy Huntingtona” (promotor: prof. dr. hab. Ryszard Smoleński, promotor pomocniczy: dr Michał Mielcarek). Podstawę mojej rozprawy doktorskiej stanowiły cztery publikacje. Pierwszą z prac była publikacja będąca efektem współpracy oraz stażu wspomnianego w podpunkcie II. (w Division of Genetics and Molecular Medicine w Kings College), dotycząca roli zaburzeń metabolizmu energetycznego i przemian glukozy w mięśniach szkieletowych mysich modeli choroby Huntingtona. Dwie następne prace poruszały tematykę przemian nukleotydów i przemian energetycznych w sercu mysich modeli choroby Huntingtona. Ostatnia z nich (badająca zmiany w komórkowym modelu choroby Huntingtona) powstała po nawiązaniu współpracy naukowej z zespołem badawczym prof. Grzegorza Węgrzyna (Katedra Biologii Molekularnej, Uniwersytet Gdański). Efektem tej współpracy było ponadto sprowadzenie do kraju oraz rozpoczęcie hodowli mysiego modelu choroby Huntingtona (R6/1). Od 2016 roku byłam również kierownikiem dwóch projektów naukowych związanych z chorobą Huntingtona (PRELUDIUM, zadanie badawcze dla młodych naukowców GUMed finansowane przez MNiSW).

Badania wykonane w ramach mojej rozprawy doktorskiej oraz prowadzonych projektów naukowych wykazały fundamentalne znaczenie przemian energetycznych i metabolizmu nukleotydów w patomechanizmie kardiomiopatii towarzyszącej chorobie Huntingtona.

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych kontynuowałam badania dotyczące roli zaburzeń metabolizmu energetycznego w miopatiach związanych z chorobą Huntingtona. Nawiązałam kolejną współpracę międzynarodową z dr Talitą Glaser oraz profesorem Henningiem Urlichem z Katedry Biochemii w Uniwersytecie São Paulo w Brazylii, której efektem są dwie prace wchodzące w cykl publikacji będących podstawą proponowanego osiągnięcia habilitacyjnego.

Ponadto dzięki kontynuacji współpracy z Katedrą Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego rozpoczęłam badania związane z regulacją przemian substratów energetycznych mających na celu poszukiwanie nowych terapii miopatii towarzyszących chorobie Huntingtona. Obiektem moich badań stał się rozyglitazon, znany agonista receptorów PPAR- γ , o udowodnionej już skuteczności terapeutycznej w ośrodkowym układzie nerwowym. Praca wykazująca pozytywne implikacje jego zastosowania dla zachowania funkcji i metabolizmu energetycznego serca i mięśni szkieletowych mysiego modelu choroby Huntingtona stanowi czwartą pracę składającą się na dzieło habilitacyjne. Efektem rozwoju współpracy naukowej z zespołem prof. Węgrzyna była również publikacja wykazująca istotne zmiany morfologiczne w strukturze włosa mysich modeli choroby Huntingtona. Opisane efekty badawcze przedstawiono w poniższych publikacjach:

- 11P. Mielcarek M*, **Toczek M***, Smeets CJLM., Franklin SA, Bondulich MK, Jolinon N, Muller T, Ahmed M, Dick JRT, Piotrowska I, Greensmith L, Smolenski RT, Bates GP. *HDAC4-myogenin axis as an important marker of HD-related skeletal muscles atrophy*. PLoS Genetics, 2015, 11(3), e1005021.* współautorstwo/equal contribution. [IF= 6.661; MNiSW=45]
- 12P. **Toczek M**, Kutryb-Zajac B, Zukowska P, Slominska E, Isalan M, Mielcarek M, Smolenski RT. *Changes in cardiac nucleotide metabolism in Huntington's disease*. Nucleotides, nucleosides and nucleic acids, 2016, 35(10/12), 707-712. [IF=0.868, MNiSW=15]
- 13P. **Toczek M**, Zielonka D, Zukowska P, Marcinkowski JT., Slominska E, Isalan M, Smolenski RT, Mielcarek M. *An impaired metabolism of nucleotides underpins a novel mechanism of cardiac remodeling leading to Huntington's disease related cardiomyopathy*. Biochimica Et Biophysica Acta- Molecular Basis of Disease, 2016, 1862 (11), 2147-2157. [IF=5.476; MNiSW=40]
- 14P. **Toczek M**, Pierzynowska K, Kutryb-Zajac B, Gaffke L, Slominska EM, Węgrzyn G, Smolenski RT. *Characterization of adenine nucleotide metabolism in the cellular model of Huntington's disease*. Nucleosides Nucleotides and Nucleic Acids, 2018, 37(11), 630-638. [IF=1.167; MNiSW=15]
- 15P. Pierzynowska K, Podlacha M, Luszczyk D, Rintz E, Gaffke L, Szczudlo Z, **Tomczyk M**, Smolenski RT, Węgrzyn G. *Hair dysmorphology in the R6/1 and R6/2 mouse models of Huntington's disease*. Gene, 2021, 765, art. 145133, 1-7. [IF=3.913; MNiSW=70]
- 16P. **Tomczyk M**, Glaser T, Ulrich H, Slominska EM, Smolenski RT. *Huntingtin protein maintains balanced energetics in mouse cardiomyocytes*, Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 2022, 41(3), 231–238. [IF=1.449; MNiSW=40]

- 17P. **Tomczyk M**, Glaser T, Slominska EM, Ulrich H, Smolenski RT. *Purine nucleotides metabolism and signaling in huntington's disease: Search for a target for novel therapies*, International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(12), 6545. [IF=6.208; MNiSW=140]
- 18P. **Tomczyk M**, Braczko A, Mierzejewska P, Podlacha M, Krol O, Jablonska P, Jedrzejewska A, Pierzynowska K, Wegrzyn G, Slominska EM, Smolenski RT. *Rosiglitazone ameliorates cardiac and skeletal muscle dysfunction by correction of energetics in huntington's disease*, Cells, 2022, 11, 2662. [IF=7.666; MNiSW=140]

Wyniki badań powstały w ramach realizacji 2 projektów badawczych w których pełniłam rolę kierownika:

- 1K. Projekt PRELUDIUM finansowany przez Narodowe Centrum Nauki pt. „*Wpływ zmian metabolizmu lipidów na funkcję mięśni szkieletowych, serca oraz proces neurodegeneracyjny w eksperymentalnym modelu płasawicy Huntingtona*”, okres realizacji: 2016-2020.
- 2K. Zadanie badawcze dla młodych naukowców GUMed finansowane przez MNiSW pt. „*Rola zaburzeń metabolizmu nukleotydów i przemian energetycznych serca oraz mięśni szkieletowych w patologii płasawicy Huntingtona*”, okres realizacji: 2016 – 2018.

Wyniki badań powstały w efekcie realizacji współpracy naukowej z 3 jednostkami naukowymi:

1. Department of Life Science, Imperial College, Londyn, Wielka Brytania; opiekun współpracy: dr Michał Mielcarek, okres współpracy: 2015- obecnie.

Opis współpracy: udział w badaniach dotyczących oceny roli przemian nukleotydów w patofizjologii kardiomiopatii towarzyszącej chorobie Huntingtona (badania z zastosowaniem mysich modeli choroby Huntingtona). Efekty współpracy to publikacja 2 artykułów naukowych (nr 12P. oraz 13P.).

2. Katedra Biologii Molekularnej, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański, Polska, kierownik jednostki: prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn, okres współpracy: 2017- obecnie (regularne pobyty i wolontariat w projektach naukowych prowadzonych przez jednostkę)

Opis współpracy: uczestnictwo w projektach naukowych dotyczących choroby Huntingtona prowadzonych przez jednostkę. Dotychczasowymi efektami współpracy są 3 artykuły naukowe (artykuły nr 14P., 15P. oraz 18P. (w tym artykule- podwójna afiliacja – GUMed i UG)) .

3. Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazylia; opiekun współpracy: prof Henning Ulrich, okres współpracy: 2018- obecnie.

Opis współpracy : udział w badaniach dotyczących roli huntingtyny w regulacji metabolizmu energetycznego kardiomiocytów (badania *in vitro*). Efekty dotychczasowej współpracy to publikacja 2 artykułów naukowych (artykuły nr 16P. oraz 17P.).

IV. POSZUKIWANIE BIOMARKERÓW CHORÓB NEURODEGENERACYJNYCH ZWIĄZANYCH Z ZABURZENIAMI METABOLIZMU ENERGETYCZNEGO KOMÓRKI

Zaobserwowany w jednej z prac składających się na moją rozprawę doktorską, wzrost hipoksantyny i urydyny w osoczu pacjentów z chorobą Huntingtona (silnie korelujący z parametrami stopnia zaawansowania oraz progresji choroby) sugerował iż związki te stanowią mogą interesujący przykład metabolitów znajdujących zastosowanie jako nowe biomarkery HD. Jest to o tyle interesujące, że badana przeze mnie choroba Huntingtona stanowi trudne do diagnozy schorzenie wykrywane najczęściej dopiero podczas manifestacji pierwszych objawów choroby. Do tej pory jedyną pewną jej diagnozę stanowią badania genetyczne wykazujące nadmierną liczbę powtórzeń CAG w obrębie genu huntingtyny. Dlatego też kolejnym celem aktualnie prowadzonych przeze mnie badań jest poszukiwanie nowych biomarkerów choroby Huntingtona oraz innych chorób neurodegeneracyjnych związanych z zaburzeniami energetyki komórki (publikacja w przygotowaniu).

Od 2021 roku badam również rolę polifosforanów w patologii, terapii oraz diagnozie chorób neurodegeneracyjnych. Efekty tych badań opisano w poniższej publikacji:

- 19P. Kus F, Smolenski RT, **Tomczyk M.** *Inorganic polyphosphate-regulator of cellular metabolism in homeostasis and disease.* Biomedicines, 2022, 10(4), 913. [IF= 4.757; MNiSW =100]

V. ROLA PRZEMIAN NAD⁺ W PATOLOGII CHORÓB SERCOWO-NACZYNIOWYCH, ONKOLOGICZNYCH ORAZ NEURODEGENERACYJNYCH

Aktywnie uczestniczę w badaniach realizowanych w Katedrze i Zakładzie Biochemii GUMed dotyczących metabolizmu i przemian NAD⁺, co stanowi dodatkowy obszar moich zainteresowań naukowych. Badania wykonane z moim udziałem wykazały, iż jeden z metabolitów przemian NAD⁺ - 4PYR (1β-D-rybofuranozylo-4-pirydono-3-karboksyamid) jest onkometabolitem, wpływającym na powstawanie przerzutów nowotworów, działając m.in. poprzez zmianę przepuszczalności komórek śródbłonna naczyniowego jak i wpływając na rozwój zapalenia. Zaobserwowaliśmy ponadto różnice w

zewnątrzkomórkowym metabolizmie NAD^+ na powierzchni komórek endotelialnych oraz potwierdziliśmy m.in. udział CD73 w hydrolizie NAD^+ . Ich efekty przedstawiono w poniższych publikacjach:

- 20P. **Tomczyk M**, Mierzejewska P, Slominska EM, Smolenski RT. *The metabolism of ecto-5'-nucleotidase (CD73) inhibitor- α,β -methylene adenosine diphosphate in BALB/c mice*. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2018, 37(12), 709-716. [IF=1.167; MNiSW=15]
- 21P. Kozalka P, Kutryb-Zajac B, Mierzejewska P, **Tomczyk M**, Wietrzyk J, Serafin PK, Smolenski RT, Slominska EM. *4-Pyridone-3-carboxamide-1- β -D-ribo-nucleoside (4PYR)-a novel oncometabolite modulating cancer-endothelial interactions in breast cancer metastasis*. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 21;23(10), 5774. [IF=6.208; MNiSW =140]
- 22P. Jablonska P, Mierzejewska P, **Tomczyk M**, Kozalka P, Franczak M, Kawecka A, Kutryb-Zajac B, Braczko A, Smolenski RT, Slominska EM. *Differences in extracellular NAD^+ and NMN metabolism on the surface of vascular endothelial cells*. Biology, 2022, 11(5), 675. [IF= 5.168; MNiSW =100]

Wyniki badań powstały w ramach realizacji projektu badawczego w którym uczestniczyłam jako wykonawca:

- 6PB. Program STRATEGMED finansowany przez: Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, pt. „Farmakoterapia śródbłonna naczyniowego i aktywacja płytek krwi zależna od prostacykliny, tlenu azotu i tlenu węgla”, okres trwania projektu: 2015 – 2020.

Realizuję także badania dotyczące roli zaburzeń przemian NAD^+ w patofizjologii miopatii związanych z chorobą Huntingtona oraz ocenie efektywności terapii mających na celu zwiększenie puli NAD^+ w komórkach poprzez zastosowanie rybozydu nikotynamidu (współpraca naukowa z firmą Chromadex, publikacja w przygotowaniu).

VI. ROLA BIAŁKA CD73 W WEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH PRZEMIANACH WITAMINY B12

Prowadzę również badania (rozpoczęte jeszcze przed uzyskaniem stopnia doktora nauk medycznych) identyfikujące rolę białka CD73 w rozwoju niedokrwistości i zaburzeń neurologicznych związanych z niedoborem witaminy B12. Badania eksperymentalne wykonane w kierowanych przeze mnie projektach naukowych (zadanie badawcze dla młodych naukowców GUMed finansowane przez MNiSW, Projekt Młody Twórca Nauki finansowany przez GUMed) wykazały że myszy

charakteryzujące się deficytem CD73 cechują się obecnością objawów i zaburzeń typowych dla niedoboru witaminy B12. Wykazywały one niższe wewnątrzkomórkowe stężenie witaminy B12 pomimo jej prawidłowego stężenia we krwi, co sugeruje upośledzony wychwyty witaminy B12 do wnętrza komórki. Dodatkowo, zaobserwowaliśmy zmniejszoną aktywność przemian wymagających witaminy B12 (publikacja w przygotowaniu). Odkrycie nowego szlaku metabolicznego witaminy B12 zależnego od CD73 stanowić może przełomowe odkrycie pomagające w opracowaniu nowych narzędzi diagnostycznych jak i strategii terapeutycznych w leczeniu niedokrwistości i zaburzeń neurologicznych związanych z niedoborem witaminy B12. Badania te są w trakcie realizacji w ramach kierowanego przeze mnie projektu SONATA finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

Badania wykonywane były/są w ramach realizacji 3 projektów badawczych w których pełniłam/pełnię rolę kierownika:

- 1K. Zadanie badawcze dla młodych naukowców GUMed finansowane przez MNiSW pt. *„Rola ekto-5'- nukleotyduzy w regulacji enzymów zależnych od kobalaminy”*, okres realizacji: 2019 – 2020.
- 2K. Projekt Młody Twórca Nauki, finansowany przez Inicjatywę Doskonałości – Uczelni Badawczej (IDUB) GUMed pt. *„Dysfunkcja CD73/ekto-5'-nukleotyduzy i spowodowane tym zaburzenia wewnątrzkomórkowego metabolizmu witaminy B12 jako mechanizm niedokrwistości”*, okres realizacji: 2021–2022.
- 3K. Projekt SONATA finansowany przez Narodowe Centrum Nauki pt. *„Nowy szlak aktywacji witaminy B12 przy udziale CD73 - analiza molekularnych mechanizmów, obróbki in vivo i znaczenia klinicznego”*, okres realizacji: obecnie – 2025.

5. INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH DYDAKTYCZNYCH, ORGANIZACYJNYCH ORAZ POPULARYZUJĄCYCH NAUKĘ

Działalność dydaktyczna

1. Prowadzenie zajęć dydaktycznych (seminaria, ćwiczenia, laboratoria) z biochemii dla studentów II roku kierunku lekarskiego polsko- i anglojęzycznego oraz kierunku lekarsko-dentystycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (od 2014 roku).
2. Promotor pomocniczy rozprawy doktorskiej mgr Agaty Jędrzejewskiej pt. *„Rewersja niewydolności serca przez zmniejszenie obciążenia mechanicznego w połączeniu z modyfikacjami metabolizmu nukleotydów i przemian energetycznych.”* (od 2022 roku).

3. Drugi promotor pracy magisterskiej Filipa Kusia pt. „Bacterial inorganic polyphosphate (polyP)- analysis of its interactions with stressed E. coli's proteins and influence on eukaryotic cells' metabolism” wykonanej w Katedrze i Zakładzie Biochemii GUMed oraz Zakładzie Biologii Molekularnej, Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-GUMed (2021-2022).
4. Opieka merytoryczna nad członkami Studenckiego Naukowego Koła Biochemicznego działającego przy Katedrze i Zakładzie Biochemii (od 2014 roku).
5. Opiekun praktyk zawodowych studentów Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego oraz Wydziału Chemii Politechniki Gdańskiej realizowanych w Katedrze i Zakładzie Biochemii (2017-2018).

Działalność organizacyjna

Już podczas studiów (lata 2012-2014) zaangażowana byłam w działalność organizacyjną Uczelni jako przewodnicząca Studenckiego Biochemicznego Koła Naukowego przy Katedrze i Zakładzie Biochemii GUMed. W następnych latach uczestniczyłam w organizacji konferencji naukowych:

1. 17th Symposium on Purine and Pyrimidine Metabolism in Man, 20-24.09.2017, Gdańsk, rola habilitantki: członek komitetu organizacyjnego.
2. XXII Sympozjum Sekcji Kardiologii Eksperymentalnej PTK oraz Komitetu Nauk Fizjologicznych i Farmakologicznych PAN, 26-28.10.2017, Gdańsk, rola habilitantki: członek komitetu organizacyjnego.
3. 27th International Student Scientific Conference, 27-29.05.2022, Gdańsk, rola habilitantki: członek jury w sesji “Basic science- original reasearch 1”.

Ponadto od 2021 roku jestem koordynatorem pracy zespołu „*In vivo studies on mechanism of disease and therapy*” utworzonego w ramach Priorytetowego Obszaru Badawczego „Biochemia, Genetyka i Biologia molekularna” Inicjatywy Doskonałości – Uczelni Badawczej w GUMed. Efektem działalności we wspomnianym obszarze była m.in. organizacja webinaru pt. „Badania *in vivo* w GUMed-poznajmy się!”, a także organizacja cyklu webinarów pt. „*Badania in vivo i in vitro oczami zespołu V i IX w POB 3 – cykl spotkań o współpracy wewnątrz- i międzyuczelnianych*”. Wydarzenia te miały na celu popularyzację badań naukowych *in vivo* prowadzonych w GUMed, a także nawiązanie nowych kontaktów naukowych pomiędzy trójmiejskimi jak i krajowymi jednostkami naukowymi.

W lutym 2022 roku utworzyłam oraz objęłam kierownictwo nad Międzywydziałowym Laboratorium Badań *in vivo* w GUMed. Jednostka ta ma na celu połączenie możliwości metodycznych i aparaturowych jednostek Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, w celu wytworzenia atrakcyjnej i konkurencyjnej oferty dla podmiotów zewnętrznych. Interdyscyplinarność, doświadczenie naukowe badaczy tworzących jednostkę oraz otwartość na współpracę komercyjną jak i niekomercyjną, pozwoliły już na nawiązanie przez jednostkę nowych współprac z ośrodkami naukowymi jak i firmami z obszaru Life Science.

Popularyzacja nauki

1. Udział w organizacji i uczestnictwo w I Ogólnopolskim Dniu Diagnostyki Laboratoryjnej w Gdańsku (kwiecień 2012 roku).
2. Udział i zaprezentowanie działalności Studenckiego Koła Naukowego przy Katedrze Biochemii w ramach „Symposium Studenckich Kół Naukowych Wydziału Farmaceutycznego z OML” (grudzień 2013 roku).
3. Udział w organizacji XV Ogólnopolskiego Konkursu Wiedzy Biochemicznej „Superhelisa 2018” (organizowanym przez Katedrę i Zakład Biochemii GUMed) (maj 2018 roku).
4. Organizacja webinaru on-line „Badania *in vivo* w GUMed-poznajmy się!” oraz wygłoszenie wykładu pt. „*„Myszkowanie” w patofizjologii chorób sercowo-naczyniowych. Modele badawcze dostępne w Katedrze i Zakładzie Biochemii*” (październik 2021).

6. INNE INFORMACJE DOTYCZĄCE KARIERY ZAWODOWEJ

Członkostwo w komitetach redakcyjnych i radach naukowych czasopism

Edytor gościnny w wydaniu specjalnym pt. „*Hunting of the Huntington's disease*” czasopisma Metabolites (od czerwca 2022 do obecnie).

Recenzent w czasopismach

1. Od 2021 roku recenzent w czasopismach : Biomedicines, Biomolecules, Brain sciences, Cells, International journal of molecular sciences, Journal of personalized medicine, International journal of environmental research and public health.

2. Od 2022 roku recenzent w czasopismach: Life, Metabolites, Nutrients, Metabolic Brain Disease.

Nagrody za działalność naukową i dydaktyczną

- a. Stypendium dla najlepszych doktorantów GUMed, w latach: 2015-2018, organ przyznający nagrodę: Rektor GUMed.
- b. Stypendium pro jakościowe dla doktorantów GUMed, w latach: 2015-2018, organ przyznający nagrodę: Rektor GUMed
- c. Stypendium doktorskie dla pracowników GUMed, w latach: 2016-2018.
- d. Nagroda zespołowa II stopnia za badania katabolizmu nukleotydów i identyfikację nieznanych szlaków przemian oraz ich zmian w fizjologii i patologii, 2018, organ przyznający nagrodę: Rektor GUMed.
- e. Nagroda zespołowa I stopnia za badania nad metabolizmem nukleotydów obecnych poza komórką w patologiach naczyniowych, 2018, organ przyznający nagrodę: Rektor GUMed.
- f. Nagroda za wyróżnioną rozprawę doktorską, 2020, organ przyznający nagrodę: Rektor GUMed.
- g. Nagroda specjalna Rektora za publikację *“Purine Nucleotides Metabolism and Signaling in Huntington’s Disease: Search for a Target for Novel Theraphies”*, 2021.
- h. Nagroda specjalna Rektora za publikację *“Enhanced Muscle Strength in Dyslipidemic Mice and Its Relation to Increased Capacity for Fatty Acid Oxidation”*, 2021.
- i. Nagroda specjalna Rektora za publikację *“Enhanced cardiac hypoxic injury in atherogenic dyslipidaemia results from alterations in the energy metabolism pattern.”*, 2021.
- j. Nagroda zespołowa II stopnia pt. *„Stosowanie w nauczaniu biochemii opieki mentorskiej dla najzdolniejszych studentów”* w konkursie *„Nowoczesna edukacja w GUMed”*, 2022, organ przyznający nagrodę: Rektor GUMed.

Nie ubiegałam się uprzednio o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

.....
podpis wnioskodawcy

BIBLIOGRAFIA DO PODPUNKTU 3C

1. Walker FO. Huntington's disease. *Lancet*. 2007; 369 (9557) : 218–28
2. Davies SW, Turmaine M, Cozens BA, DiFiglia M, Sharp AH, Ross CA, et al. Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell*. 1997; 90(3): 537–48.
3. Moffitt H, McPhail GD, Woodman B, Hobbs C, Bates GP. Formation of polyglutamine inclusions in a wide range of non-CNS tissues in the HdhQ150 knock-in mouse model of Huntington's disease. *PLoS One*. 2009;4(11):e8025.
4. Saudou F, Humbert S. The Biology of Huntingtin. *Neuron*. 2016; 89(5):910-26.
5. Palidwor GA, Shcherbinin S, Huska MR, Rasko T, Stelzl U, Arumughan A, et al. Detection of alpha-rod protein repeats using a neural network and application to huntingtin. *PLoS Comput Biol*. 2009; 5(3):e1000304.
6. Schulte J, Littleton JT. The biological function of the Huntingtin protein and its relevance to Huntington's Disease pathology. *Curr Trends Neurol*. 2011; 5: 65–78.
7. Velier J, Kim M, Schwarz C, Kim TW, Sapp E, Chase K, et al. Wild-type and mutant huntingtins function in vesicle trafficking in the secretory and endocytic pathways. *Exp Neurol*. 1998;152(1):34-40.
8. Harjes P, Wanker EE. The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories. *Trends Biochem Sci*. 2003. 28(8):425-33.
9. Hoffner G, Kahlem P, Djian P. Perinuclear localization of huntingtin as a consequence of its binding to microtubules through an interaction with beta-tubulin: relevance to Huntington's disease. *J Cell Sci*. 2002;115(Pt 5):941–8.
10. Duyao MP, Auerbach AB, Ryan A, Persichetti F, Barnes GT, McNeil SM, et al. Inactivation of the mouse huntington's disease gene homolog Hdh. *Science*. 1995; 269(5222): 407-10.
11. Dragatsis I, Levine MS, Zeitlin S. Inactivation of Hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice. *Nat Genet*. 2000; 26(3): 300-6.
12. Kojer K, Hering T, Bazenet C, Weiss A, Herrmann F, Taanman J-W, et al. Huntingtin Aggregates and Mitochondrial Pathology in Skeletal Muscle but not Heart of Late-Stage R6/2 Mice. *J Huntingtons Dis*. 2019; 8(2):145-159.
13. Toczek M, Zielonka D, Zukowska P, Marcinkowski JT, Slominska E, Isalan M, et al. An impaired metabolism of nucleotides underpins a novel mechanism of cardiac remodeling leading to Huntington's disease related cardiomyopathy. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2016; 1862(11):2147-2157.
14. Toczek M, Kutryb-Zajac B, Zukowska P, Slominska EM, Isalan M, Mielcarek M, et al. Changes in cardiac nucleotide metabolism in Huntington's disease. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. 2016; 35(10-12):707-712.
15. Mielcarek M, Smolenski RT, Isalan M. Transcriptional signature of an altered purine metabolism in the skeletal muscle of a huntington's disease mouse model. *Front Physiol*. 2017; 8:127.
16. Toczek M, Pierzynowska K, Kutryb-Zajac B, Gaffke L, Slominska EM, Wegrzyn G, et al. Characterization of adenine nucleotide metabolism in the cellular model of Huntington's disease. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. 2018; 37(11):630-638.
17. Ismailoglu I, Chen Q, Popowski M, Yang L, Gross SS, Brivanlou AH. Huntingtin protein is essential for mitochondrial metabolism, bioenergetics and structure in murine embryonic stem cells. *Dev Biol*. 2014; 391(2):230-40.
18. Busse ME, Hughes G, Wiles CM, Rosser AE. Use of hand-held dynamometry in the evaluation of lower limb muscle strength in people with Huntington's disease. *J Neurol*. 2008;255(10):1534–40.
19. Ribchester RR, Thomson D, Wood NI, Hinks T, Gillingwater TH, Wishart TM, et al. Progressive abnormalities in skeletal muscle and neuromuscular junctions of transgenic mice expressing the Huntington's disease mutation. *Eur J Neurosci*. France; 2004.3092–114.
20. Valadão PAC, de Aragão BC, Andrade JN, Magalhães-Gomes MPS, Foureaux G, Joviano-Santos JV, et al. Abnormalities in the Motor Unit of a Fast-Twitch Lower Limb Skeletal Muscle in Huntington's Disease. *ASN Neuro*. 2019; 11: 1759091419886212.
21. Valadão PAC, de Aragão BC, Andrade JN, Magalhães-Gomes MPS, Foureaux G, Joviano-Santos JV, et al. Muscle atrophy is associated with cervical spinal motoneuron loss in BACHD mouse model for Huntington's disease. *Eur J Neurosci*. 2017;45(6): 785-796.
22. Strand AD, Aragaki AK, Shaw D, Bird T, Holton J, Turner C, et al. Gene expression in Huntington's disease skeletal muscle: A potential biomarker. *Hum Mol Genet*. 2005; 14(13):1863-76.
23. Mielcarek M, Toczek M, Smeets CJ, Franklin SA, Bondulich MK, Jolinon N, et al. HDAC4-Myogenin Axis As an Important Marker of HD-Related Skeletal Muscle Atrophy. *PLoS Genet*.; 2015. 11(3): e1005021.
24. Lanska DJ, Lavine L, Lanska MJ, Schoenberg BS. Huntington's disease mortality in the United States. *Neurology*. 1988;38(5):769–72.

25. Chiu E, Alexander L. Causes of death in Huntington's disease. *Med J Aust.* 1982;1(4):153.
26. Sharma KR, Romano JG, Ayyar DR, Rotta FT, Facca A, Sanchez-Ramos J. Sympathetic skin response and heart rate variability in patients with Huntington disease. *Arch Neurol.* 1999;56(10):1248–52.
27. Terroba-Chambi C, Bruno V, Vigo DE, Merello M. Heart rate variability and falls in Huntington's disease. *Clin Auton Res.* 2020; 31(2); 281-292.
28. Melik Z, Kobal J, Cankar K, Struel M. Microcirculation response to local cooling in patients with Huntington's disease. *J Neurol.* 2012;259(5):921–8.
29. Mielcarek M, Inuabasi L, Bondulich MK, Muller T, Osborne GF, Franklin SA, et al. Dysfunction of the CNS-heart axis in mouse models of Huntington's disease. *PLoS Genet.* 2014. 10(8): e1004550.
30. Mielcarek M, Bondulich MK, Inuabasi L, Franklin SA, Muller T, Bates GP. The Huntington's disease-related cardiomyopathy prevents a hypertrophic response in the R6/2 mouse model. *PLoS One.* 2014. 9(9): e108961.
31. Wu BT, Chiang MC, Tasi CY, Kuo CH, Shyu WC, Kao CL, et al. Cardiac Fas-Dependent and Mitochondria-Dependent Apoptotic Pathways in a Transgenic Mouse Model of Huntington's Disease. *Cardiovasc Toxicol.* 2015. 16(2):111-21.
32. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V. Energy metabolism in heart failure. *J Physiol.* 2004;555(Pt 1):1–13.
33. Tune JD, Gorman MW, Feigl EO. Matching coronary blood flow to myocardial oxygen consumption. *J Appl Physiol.* 2004;97(1):404–15.
34. Jaswal JS, Keung W, Wang W, Ussher JR, Lopaschuk GD. Targeting fatty acid and carbohydrate oxidation - A novel therapeutic intervention in the ischemic and failing heart. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research.* 2011. 1813(7):p. 1333-50.
35. Palee S. PPAR γ activator, rosiglitazone: Is it beneficial or harmful to the cardiovascular system? *World J Cardiol.* 2011. 3(5): 144–152.
36. Quintanilla RA, Jin YN, Fuenzalida K, Bronfman M, Johnson GVW. Rosiglitazone Treatment Prevents Mitochondrial Dysfunction in Mutant Huntingtin-expressing Cells. *J Biol Chem.* 2008. 283(37):25628-25637.
37. Jin J, Albertz J, Guo Z, Peng Q, Rudow G, Troncoso JC, et al. Neuroprotective effects of PPAR- γ agonist rosiglitazone in N171-82Q mouse model of Huntington's disease. *J Neurochem.* 2013. 125(3):410-9.
38. Mishra J, Chaudhary T, Kumar A. Rosiglitazone synergizes the neuroprotective effects of valproic acid against quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats: Targeting PPAR γ and HDAC pathways. *Neurotox Res.* 2014. 26(2):130-51.
39. Chaturvedi RK, Adhihetty P, Shukla S, Hennessy T, Calingasan N, Yang L, et al. Impaired PGC-1 α function in muscle in Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* 2009. 18(16):3048-65.
40. Mihm MJ, Amann DM, Schanbacher BL, Altschuld RA, Bauer JA, Hoyt KR. Cardiac dysfunction in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis.* 2007. 25(2):297-308.
41. Bozzi M, Sciandra F. Molecular mechanisms underlying muscle wasting in huntington's disease. *International Journal of Molecular Sciences.* 2020. 21(21):8314.
42. Strum JC, Shehee R, Virley D, Richardson J, Mattie M, Selley P, et al. Rosiglitazone induces mitochondrial biogenesis in mouse brain. *J Alzheimer's Dis.* 2007. 11(1):45-51.
43. Wilson-Fritch L, Nicoloso S, Chouinard M, Lazar MA, Chui PC, Leszyk J, et al. Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. *J Clin Invest.* 2004. 114(9): 1281-9.
44. Mochel F, Haller RG. Energy deficit in Huntington disease: Why it matters. *Journal of Clinical Investigation.* 2011. 121(2):493–499.
45. Kumar A, Ratan RR. Oxidative Stress and Huntington's Disease: The Good, the Bad, and the Ugly. *Journal of Huntington's Disease.* 2016. 5(3):217-237
46. Jodeiri Farshbaf M, Ghaedi K. Huntington's Disease and Mitochondria. *Neurotox Res.* 2017;32(3):518–29.
47. Hands S, Sajjad MU, Newton MJ, Wyttenbach A. In vitro and in vivo aggregation of a fragment of huntingtin protein directly causes free radical production. *J Biol Chem.* 2011. 286(52): 44512–44520.
48. Zhao RZ, Jiang S, Zhang L, Yu Z Bin. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *International Journal of Molecular Medicine.* 2019. 44(1):3-15.
49. Sanz MN, Sánchez-Martín C, Detaille D, Vial G, Rigoulet M, El-Mir MY, et al. Acute mitochondrial actions of glitazones on the liver: A crucial parameter for their antidiabetic properties. *Cell Physiol Biochem.* 2011. 28(5):899-910.
50. Rabøl R, Boushel R, Almdal T, Hansen CN, Ploug T, Haugaard SB, et al. Opposite effects of pioglitazone and rosiglitazone on mitochondrial respiration in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diabetes, Obes Metab.* 2010. 12(9): 806-14.