

STRESZCZENIE

Opracowanie i walidacja nowego modelu transgenicznego opartego o system edycji genów CRISPR/Cas9 do potencjalnego wykorzystania w badaniach zależności pomiędzy układem noradrenergicznym i dopaminowym w kontekście choroby Parkinsona.

Choroba Parkinsona (PD) jest powoli postępującą, zwyrodnieniową chorobą ośrodkowego układu nerwowego charakteryzującą się zanikiem komórek nerwowych układu dopaminowego w istocie czarnej (*Substantia Nigra*, SN) i polu brzusznej nakrywki (*Ventral Tegmental Area*, VTA). Jednakże, PD jest związana nie tylko z neurodegeneracją w obrębie układu dopaminowego, odpowiedzialnego bezpośrednio za powstawanie symptomów (bradykineza, sztywność mięśniowa, spowolnienie ruchowe), ale także z zaburzeniami w funkcjonowaniu innych systemów pozapiramidowych, w szczególności **układu noradrenergicznego**. Zgodnie z hipotezą Braaka zmiany patologiczne, nie przekładające się jeszcze na charakterystyczne objawy choroby, zaczynają się już wcześniej w rdzeniu przedłużonym i miejscu sinawym (*Locus Coeruleus*, LC), a następnie rozprzestrzeniają się do struktur pnia mózgu. Zaobserwowano, iż w PD degeneracja komórek LC może nawet przewyższać utratę komórek dopaminowych. Dane eksperymentalne wskazują również na istotną zależność pomiędzy poziomem noradrenaliny w mózgu, a podatnością na neurotoksyny indukujące parkinsonizm u myszy. Mimo to, podjęto niewiele prób polegających na badaniu **długotrwałego** wpływu degeneracji noradrenergicznej na funkcjonowanie układu dopaminowego, przede wszystkim z braku odpowiednich modeli zwierzęcych. Celem badań było zatem:

- zbadanie wpływu efektów konstytutywnej mutacji, prowadzącej do degeneracji układu noradrenergicznego na efekty w układzie dopaminowym;
- stworzenie modelu myszy charakteryzującego się **selektywną, mózgowo-specyficzną, progresywną degeneracją układu noradrenergicznego** i zbadanie czy taka mutacja będzie prowadzić do spontanicznych, negatywnych zmian w układzie dopaminowym;
- wykorzystanie modelu dla badania **wzajemnych zależności pomiędzy w/w układami neuroprekąźnictwa** w kontekście wczesnej, przedklinicznej fazy PD.

W pierwszej fazie projektu wykazano, że istotnie postępująca neurodegeneracja układu noradrenergicznego może u dorosłych myszy docelowo wywołać **negatywne zmiany w funkcjonowaniu układu dopaminowego** (Barut et al., *Neurochem Int*, 2022), w tym podwyższenie ekspresji markerów mikro- i astrogleju, cytokin prozapalnych czy markerów stresu oksydacyjnego w rejonie SN/VTA. Model zwierzęcy, który wykorzystano w tym celu (myszy transgeniczne stworzone w oparciu o system Cre/loxP, z **delecją czynnika transkrypcyjnego TIF-1A** odpowiedzialnego za sterowanie aktywnością polimerazy I, pod kontrolą promotora beta-hydroksylazy dopaminowej, Dbh) nie był jednak odpowiednim narzędziem z uwagi na równoległą degenerację obwodowego układu sympatycznego.

Głównym zadaniem było zatem stworzenie modelu, w którym mutacja wywołana przez delecję TIF-1A zachowałaby progresywny charakter, była wywołana u dorosłego zwierzęcia a przy tym została **selektywnie ukierunkowana jedynie do komórek LC**, co w znacznie lepszym stopniu odzwierciedlałoby wczesną fazę degeneracji obserwowaną w PD zgodnie z hipotezą Braaka. W tym celu zastosowano po raz pierwszy w naszym laboratorium **system edycji genów CRISPR/Cas9**. Zaprojektowano Cre-zależny lentiwirusowy wektor ekspresyjny, wykazujący ekspresję nukleazy Cas9 po kontrolą neuronalnie specyficznego promotora ludzkiej synapsyny. Fragment sekwencji zawierający Cas9, został podwójnie oflankowany miejscami LoxP, które znajdują się w odwrotnej orientacji, znanymi również jako DIO (ang. *Double-Floxed Inverted Open Read Frame*). Ten autorski konstrukt, w którym w jednej cząsteczce zawarto całą maszynę CRISPR, wraz z Cre zależnym miejscem, został po raz pierwszy zastosowany w ramach tej pracy celem włączenia ekspresji genów poprzez rekombinację za pośrednictwem rekombinazy Cre, znajdującej się pod kontrolą promotora

Dbh. Takie podejście eksperymentalne umożliwiło selektywną delecję TIF-IA w rejonie LC u myszy DbhCre, którym podano stereotaktycznie wektor lentiwirusowy do LC i skutecznie zapobiegło ew. niespecyficznemu mutacji w innych komórkach w związku z trudnym do monitorowania *in-vivo* rozprzestrzenianiem się i transdukcją wektora lentiwirusowego. W pierwszej fazie rozwoju modelu, po opracowaniu konstruktów, przetestowano i wykazano poprawne działanie systemu *in-vitro* na mysich hodowlach pierwotnych neuronów korowych i dopaminowych, a także astrocytarnych. Po zakończeniu tego etapu prac przystąpiono do eksperymentów *in-vivo*, w trakcie których dopracowano technologię CRISPR/Cas9 pod kątem skuteczności transdukcji i optymalizacji gRNA.

Powstały model został scharakteryzowany w kolejnych punktach czasowych w miarę rozwoju zmian neurodegeneracyjnych, koncentrując się na długotrwałym wpływie degeneracji noradrenergicznej na funkcjonowanie układu dopaminowego (nie dotkniętego bezpośrednio mutacją) i obejmował **badania behawioralne** (m.in. test spontanicznej aktywności, koordynacji ruchowej rotarod, test statycznych prętów, testy w kierunku wykazania ew. fenotypu depresyjnego i lęklivosti zwierząt), **histologiczne** (barwienia IHC z udziałem markerów neurodegeneracji), **biochemiczne** (oznaczenia poziomu neurotransmiterów), **molekularne** (badania proteomiczne, próba identyfikacji szlaków prowadzących do śmierci komórkowej) oraz **elektrofizjologiczne** (m.in. badanie spontanicznej aktywności neuronów dopaminowych).

Efektem pracy było stworzenie i scharakteryzowanie **nowatorskiego, mysiego modelu z selektywną, domózkową delecją TIF-IA w rejonie LC z wykorzystaniem systemu CRISPR/Cas9**. Otwiera to drogę do analogicznego tworzenia mutacji w innych liniach z rekombinazą Cre, co znacząco skraca czas potrzebny na uzyskanie finalnego modelu eksperymentalnego, omijając konieczność czasochłonnego i nie zawsze efektywnego parowania pomiędzy zwierzętami z ekspresją Cre oraz flankowanym przez miejsca loxP genem przewidzianym do usunięcia. Wartością dodaną takiego podejścia badawczego jest też lepsza możliwość stosowania zasady 3R w badaniach behawioralnych z użyciem modeli zwierzęcych (liczba zwierząt zużyta do generowania kohorty z wprowadzoną mutacją jest równa liczbie zwierząt przeznaczonych na późniejszy eksperyment).

Wyniki niniejszej pracy potwierdzają także **wpływ selektywnej degeneracji LC na negatywne oddziaływanie na funkcjonowanie neuronów dopaminowych w SN/VTA**, podtrzymując tezę, że dysregulacja w działaniu układu noradrenergicznego może przyczynić się do zmian w działaniu neuronów dopaminowych, które mogą być charakterystyczne w początkowej fazie PD. Wykazano zmiany w fenotypie behawioralnym zwierząt zmutowanych (m.in. obniżenie koordynacji ruchowej, zmiany zachowań lęklwych i depresyjnych). Ciekawą obserwacją było zróżnicowanie efektów w zależności od płci zwierząt, problem podnoszony w ostatnich latach coraz częściej w badaniach eksperymentalnych nad ośrodkowym układem nerwowym, ale mniej oczywisty w badaniach dotyczących zmian neurodegeneracyjnych. Na poziomie molekularnym zaobserwowano u zwierząt z degeneracją LC podniesienie w rejonie SN/VTA ekspresji markerów stanu zapalnego, zmiany w proteomie w zakresie szlaków odpowiadających m.in. za mitochondrialną fuzję białek czy procesy glikolizy. Badania elektrofizjologiczne wykazały także obniżenie spontanicznej aktywności neuronów dopaminowych u zwierząt zmutowanych. Wykazano także, że zmiany w średnicy źrenicy oka u myszy zmutowanych mogą bezpośrednio korelować ze zmianami aktywności LC, co jest cennym markerem diagnostycznym, pozwalającym na behawioralną ocenę stopnia degeneracji LC po wprowadzeniu wektora lentiwirusowego, a w przyszłości mogącym mieć także znaczenie translacyjne.

W związku z tworzeniem modelu od podstaw w oparciu o nowatorską technikę, pełna charakterystyka molekularna zmian w układzie dopaminowym wykracza już poza możliwości czasowe tej pracy. Opracowany model stanowi jednak interesujące, nowe narzędzie badawcze do dalszych badań nad wzajemną interakcją układów noradrenergicznego i dopaminowego, nie tylko w chorobie Parkinsona.