



mgr Justyna Barut

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

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Biochemii Mózgu
Instytutu Farmakologii
im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

Promotor:
dr hab. Grzegorz Kreiner
Promotor pomocniczy:
dr Piotr Chmielarz

Kraków, 2023

Badania opisane w niniejszej pracy doktorskiej zostały zrealizowane w ramach funduszy pochodzących z projektu 2017/25/B/NZ7/02406 (OPUS 13) pn. „Badanie wpływu postępującej neurodegeneracji układu noradrenergicznego na funkcjonowanie układu dopaminowego w kontekście presymptomatycznej fazy choroby Parkinsona” finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki

Składam serdeczne podziękowania:

dr hab. Grzegorzowi Kreinerowi

za nieocenione wsparcie i inspirujące przewodnictwo
Pańska wiedza, doświadczenie i cierpliwość były kluczowe dla mojego rozwoju naukowego

dr Piotrowi Chmielarzowi

za poświęcony czas, konstruktywne sugestie i motywujące rozmowy, które wpłynęły pozytywnie
na moje badania

dr Katarzynie Rafa-Zablockiej

za doskonałą współpracę, zaangażowanie i profesjonalizm
za pozytywną atmosferę w naszym zespole

dr Andrii'emu Domanskyi'emu

za pomoc w projektowaniu plazmidów i przekazaną wiedzę

Pracownikom Zakładu Biochemii Mózgu

za życzliwość, gotowość do pomocy oraz koleżeńską atmosferę

dr Monice Herian

prof. dr hab. Krystynie Golembiowskiej

z Zakładu Farmakologii, Instytutu Farmakologii
im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk
za wykonanie analizy poziomu neurotransmiterów

dr Magdalenie Walczak, dr Tomaszowi Pradelowi,

prof. dr hab. Tomaszowi Blasiakowi

z Zakładu Neurobiologii i Chronobiologii, Instytutu Zoologii,
Uniwersytetu Jagiellońskiego
za wykonanie pomiarów źrenicy oka oraz elektrofizjologicznych

Spis treści

| | |
|--|-----------|
| Spis treści | 1 |
| Streszczenie | 7 |
| Summary | 9 |
| 1. Wstęp | 11 |
| 1.1. <i>Choroba Parkinsona</i> | 11 |
| 1.1.1. Inne neurony zaangażowane w chorobę Parkinsona | 14 |
| 1.1.2. Teorie dotyczące prodromalnej fazy choroby Parkinsona | 15 |
| 1.1.3. Genetyczne formy choroby Parkinsona..... | 16 |
| 1.1.4. Molekularne podłoże choroby parkinsona | 17 |
| 1.1.4.1. Szlaki zaangażowane w PD..... | 17 |
| 1.1.4.2. α -Synukleina (α -Syn) | 18 |
| 1.2. <i>Modele choroby Parkinsona</i> | 19 |
| 1.2.1. Komórkowe modele PD..... | 19 |
| 1.2.2. Modele farmakologiczne | 21 |
| 1.2.3. Modele genetyczne..... | 21 |
| 1.2.3.1. Modele oparte o modyfikacje genów związanych z dziedzicznymi formami PD..... | 21 |
| 1.2.3.2. Rekombinacja zlokalizowana Cre/loxP w badaniach nad PD | 22 |
| 1.2.3.3. Modele oparte o ablację czynnika transkrypcyjnego TIF-IA..... | 23 |
| 1.2.3.4. Edycja genomu <i>in vivo</i> za pomocą somatycznej transgenezy | 24 |
| 1.2.4. Mysie modele podań preformowanych włókien α -Syn (PFF) | 24 |
| 1.3. <i>System edycji genów CRISPR/Cas9</i> | 25 |
| 1.3.1. CRISPR/Cas9 – mechanizm działania | 26 |
| 1.3.2. Zastosowanie CRISPR/Cas9 w modelach genetycznych choroby Parkinsona..... | 28 |
| 1.4. <i>Układ noradrenergiczny w chorobie Parkinsona</i> | 29 |
| 1.4.1. Znaczenie uszkodzenia systemu noradrenergicznego we wczesnej fazie choroby parkinsona | 31 |
| <i>Graficzne podsumowanie projektu</i> | 33 |
| 2. Cele pracy | 34 |
| 3. Materiały i metody | 35 |
| 3.1. <i>Mysie modele badawcze</i> | 35 |
| 3.1.1. Myszy C57/BL6N | 35 |
| 3.1.2. Myszy Dbh ^{Cre} | 35 |
| 3.1.2.1. Warunki genotypowania linii Dbh ^{Cre} | 36 |
| 3.1.3. Linia TIF-IA ^{DbhCre} | 37 |
| 3.1.3.1. Warunki genotypowania linii TIF-IA ^{DbhCre} | 37 |
| 3.1.4. Linia TIF-IA ^{DATCreERT2} | 37 |
| 3.1.4.1. Warunki genotypowania linii TIF-IA ^{DATCreERT2} | 38 |
| 3.2. <i>Przygotowanie plazmidowych wektorów transferowych CRISPR/Cas9</i> | 38 |
| 3.2.1. Plazmidy transferowe pCDH i pLenti do wektorów lentiwirusowych..... | 39 |
| 3.2.2. Projekt neuronalnego plazmidowego wektora Cre-zależnego CRISPR/Cas9 | 40 |
| 3.2.2.1. Klonowanie molekularne pCDH-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS..... | 41 |
| 3.2.2.2. Klonowanie molekularne pCDH-hU6-EGFP_g1-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS | 45 |

| | | |
|----------|---|----|
| 3.2.2.3. | Klonowanie molekularne plentiCRISPR-hU6-Aarl-filler-Aarl-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS oraz pCDH-hU6-Aarl-filler-Aarl-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS | 48 |
| 3.2.3. | Projekt astrocytarnego plazmidowego wektora CRISPR/Cas9..... | 53 |
| 3.2.4. | Projektowanie fragmentu RNA-przewodnika (gRNA) i wklonowanie sekwencji do gotowych plazmidów..... | 55 |
| 3.2.5. | Hodowla HEK293T..... | 58 |
| 3.2.6. | Transfekcja plazmidem ekspresyjnym..... | 59 |
| 3.3. | <i>Produkcja i weryfikacja skuteczności działania wektorów lentiwirusowych (LV)</i> | 59 |
| 3.3.1. | Hodowla komórek oraz transfekcja plazmidami pakującymi i plazmidem transferowym | 59 |
| 3.3.2. | Izolacja wektorów lentiwirusowych (LV) | 60 |
| 3.3.3. | Określenie miana wektorów lentiwirusowych (LV)..... | 60 |
| 3.4. | <i>Walidacja działania funkcjonalnego wektora in vitro</i> | 61 |
| 3.4.1. | Hodowle mysich pierwotnych neuronów korowych i dopaminowych | 61 |
| 3.4.2. | Hodowle mysich pierwotnych astrocytów | 62 |
| 3.4.3. | Transdukcja komórek <i>in vitro</i> | 63 |
| 3.4.4. | Barwienia immunofluorescencyjne neuronów i astrocytów <i>in vitro</i> | 65 |
| 3.4.5. | Obrazowanie i zliczanie komórek po transdukcji..... | 65 |
| 3.4.6. | Izolacja RNA z neuronów <i>in vitro</i> | 66 |
| 3.4.7. | Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT) i reakcja PCR w czasie rzeczywistym (<i>Real-Time PCR</i>) | 66 |
| 3.5. | <i>Operacje stereotaktyczne i podania wektora lentiwirusowego (LV)</i> | 67 |
| 3.6. | <i>Testy behawioralne</i> | 68 |
| 3.6.1. | Test otwartego pola (OFT)..... | 69 |
| 3.6.2. | Test pręta obrotowego – test Rotarod..... | 69 |
| 3.6.3. | Test statystycznych prętów | 69 |
| 3.6.4. | Test podniesionego labiryntu krzyżowego (EPM) | 69 |
| 3.6.5. | Test jasnego/ciemnego pudełka (LDB) | 70 |
| 3.6.6. | Test zawieszenia za ogon (TST)..... | 70 |
| 3.6.7. | Test preferencji picia roztworu sacharyny..... | 70 |
| 3.7. | <i>Rejestracja żrenicy oka oraz spontanicznej aktywności neuronów dopaminowych w SN/VTA</i> ... 70 | |
| 3.8. | <i>Analizy ex-vivo</i> | 71 |
| 3.8.1. | Analiza immunohistochemiczna i immunofluorescencyjna..... | 71 |
| 3.8.1.1. | Przygotowanie skrawków mózgu przy użyciu wibratomu (skrawki wolnoptywające)... 72 | |
| 3.8.1.2. | Barwienia immunofluorescencyjne skrawków wolnoptywających | 73 |
| 3.8.1.3. | Przygotowanie skrawków mózgu przy użyciu mikrotomu (skrawki zatopione w parafinie) | 73 |
| 3.8.1.4. | Barwienia immunohistochemiczne skrawków zatopionych w parafinie | 74 |
| 3.8.1.5. | Barwienia immunofluorescencyjne skrawków zatopionych w parafinie | 74 |
| 3.8.1.6. | Analiza mikroskopowa i zliczanie komórek..... | 75 |
| 3.8.2. | Analiza ekspresji RNA i mikroRNA (miRNA) | 76 |
| 3.8.2.1. | Izolacja RNA. Reakcja odwrotnej transkrypcji i reakcja PCR w czasie rzeczywistym | 76 |
| 3.8.3. | Analiza ekspresji miRNA | 77 |
| 3.8.4. | Analiza poziomu neurotransmiterów metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) | 78 |
| 3.8.5. | Izolacja białka i pomiar stężenia | 79 |
| 3.8.6. | Immunodetekcja białek metodą Western Blot..... | 79 |
| 3.8.7. | Immunodetekcja białek przy użyciu macierzy białkowej..... | 80 |
| 3.8.8. | Analiza proteomiczna z zastosowaniem metod znakowania izotopowego iTraQ | 81 |
| 3.8.9. | Badanie kolców dendrytycznych..... | 81 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.9. | <i>Analiza statystyczna</i> | 82 |
| 4. | Wyniki | 83 |
| 4.1. | <i>Charakterystyka linii TIF-IA^{DbhCre} - mysiego modelu degeneracji układu noradrenergicznego</i> | 83 |
| 4.1.1. | Ogólna charakterystyka myszy TIF-IA ^{DbhCre} z postępującą degeneracją układu noradrenergicznego | 83 |
| 4.1.2. | Stochastyczne efekty neurodegeneracji układu noradrenergicznego u myszy TIF-IA ^{DbhCre} – wzrost markerów stanu zapalnego w rejonie SN/VTA..... | 84 |
| 4.1.3. | Brak wpływu degeneracji układu dopaminowego na liczbę neuronów w LC, w modelu progresywnej choroby Parkinsona (myszy TIF-IA ^{DATCreERT2}) | 87 |
| 4.2. | <i>Zaprojektowanie, stworzenie i charakterystyka nowatorskiego modelu selektywnej delekcji TIF-IA w rejonie miejsca sinawego, opartego o system edycji genów CRISPR/Cas9 zastosowany u myszy ekspresjonujących rekombinazę Cre pod kontrolą promotora Dbh</i> | 90 |
| 4.2.1. | Przygotowanie wektorów CRISPR/Cas9 potrzebnych do wygenerowania nowej mysiej linii TIF-IA-CRISPR ^{DbhCre} | 90 |
| 4.2.1.1. | Neuronalny wektor Cre-zależny CRISPR/Cas9 | 90 |
| 4.2.1.2. | Neuronalny wektor CRISPR/Cas9 | 91 |
| 4.2.1.3. | Astrocytarny wektor CRISPR/Cas9..... | 92 |
| 4.2.2. | Produkcja i weryfikacja wektorów lentiwirusowych (LV) | 93 |
| 4.2.3. | Strategia indukcji neurodegeneracji opierającej się na zaburzeniu funkcjonowania polimerazy I w wybranej populacji komórek - projektowanie gRNA wyciszającego ekspresję genu <i>Rrn3</i> i <i>Polr1a</i> | 95 |
| 4.2.4. | Pozytywna weryfikacja działania systemu Cre-zależnego CRISPR/Cas9. Zastosowanie Cre-zależnego konstruktów usuwającego białko fluorescencyjne EGFP..... | 97 |
| 4.2.4.1. | Wektor plazmidowy pCDH-hU6-EGFP_g1-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS wykazuje ekspresję w transfekowanych komórkach HEK293T posiadających rekombinazę Cre | 98 |
| 4.2.4.2. | Wektor lentiwirusowy LV-pCDH-hU6-EGFP_g1-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS wykazuje działanie w transdukowanych neuronach pierwotnych zawierających rekombinazę Cre | 99 |
| 4.2.5. | Progresywna śmierć komórki jako funkcjonalny efekt wyciszenia ekspresji czynnika transkrypcyjnego TIF-IA lub białka RPA194 w modelu <i>in vitro</i> pierwotnych neuronów i astrocytów. | 102 |
| 4.2.5.1. | Wektor lentiwirusowy LV-pCDH-hU6-gTIF-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS wykazuje selektywne działanie w neuronach pierwotnych zawierających rekombinazę Cre | 104 |
| 4.2.5.2. | Wyciszenie ekspresji TIF-IA i RPA194 w neuronach <i>in vitro</i> z użyciem LV-CRISPR prowadzi do śmierci komórek | 105 |
| 4.2.5.3. | Wyciszenie ekspresji TIF-IA i RPA194 w astrocytach <i>in vitro</i> z użyciem LV-CRISPR prowadzi do śmierci zainfekowanych komórek..... | 107 |
| 4.2.6. | Optymalizacja warunków domóżgowej iniekcji LV u myszy | 111 |
| 4.2.6.1. | Dostosowanie warunków operacji stereotaktycznych na myszach C57Bl/6N | 111 |
| 4.2.6.2. | Wykazanie optymalnego doboru warunków operacji stereotaktycznych na myszach DbhCre | 113 |
| 4.2.6.3. | Selekcja optymalnego gRNA <i>in vivo</i> u myszy DbhCre | 113 |
| 4.3. | <i>Wprowadzona mutacja do LC powoduje dysregulację działania układu noradrenergicznego u myszy TIF-IA-CRISPR^{DbhCre}</i> | 116 |
| 4.3.1.1. | Usunięcie białka TIF-IA powoduje selektywną degenerację neuronów noradrenergicznych w LC | 116 |
| 4.3.1.2. | Noradrenalina i serotonina ulegają zmianom w tkance prążkowie u samców - analiza poziomu neuroprzekazników i ich metabolitów w hipokampie oraz prążkowie | 119 |

| | |
|---|------------|
| 4.3.1.3. Analiza poziomu ekspresji mRNA wybranych genów w LC potwierdza zaburzenia w funkcjonowaniu neuronów noradrenergicznych poprzez obniżenie ekspresji transportera noradrenaliny. | 121 |
| 4.4. <i>Efekty selektywnej, progresywnej degeneracji LC na funkcjonowanie układu dopaminowego (próba weryfikacji przydatności modelu do badań prodromalnej fazy PD)</i> | 123 |
| 4.4.1. Charakterystyka behawioralna myszy TIF-IA-CRISPR ^{DbhCre} | 123 |
| 4.4.1.1. Myszy TIF-IA-CRISPR ^{DbhCre} nie wykazują zmian masy ciała | 123 |
| 4.4.1.2. Samce myszy TIF-IA-CRISPR ^{DbhCre} wykazują zaburzenia motoryczne | 124 |
| 4.4.1.3. Ocena pozaruchowego behawioru – odpowiedzi na stres i lękowość myszy TIF-IA-CRISPR ^{DbhCre} pokazuje predyspozycję mutantów do rozwoju lękowości i zmniejszonej odporności na silny stres | 129 |
| 4.4.2. Poszukiwanie zmian w funkcjonowaniu neuronów dopaminowych w SN/VTA w modelu TIF-IA-CRISPR ^{DbhCre} | 131 |
| 4.4.2.1. Liczba neuronów dopaminowych w SN/VTA nie zmienia się pod wpływem mutacji w LC – analiza ilości neuronów TH+ | 132 |
| 4.4.2.2. Zmiany w ekspresji miR223 oraz genu kodującego receptor adrenergiczny α -2a u myszy z ubytkiem noradrenergicznym - analiza ekspresji genów w SN/VTA | 132 |
| 4.4.2.3. Analiza proteomiczna w rejonie SN/VTA wskazuje na zaburzenia biologicznych procesów spowodowanych uszkodzeniem LC | 134 |
| 4.4.2.4. Dysfunkcja neuronów noradrenergicznych w miejscu sinawym wywołuje zmiany proteomiczne w SN/VTA myszy TIF-IA-CRISPR ^{DbhCre} dotyczące różnych szlaków biologicznych | 138 |
| 4.4.2.5. Pupilometria: analiza źrenic oka myszy jako etap diagnostyczny w ocenie funkcjonowania neuronów noradrenergicznych w miejscu sinawym | 139 |
| 4.4.2.6. Degeneracja miejsca sinawego wpływa na wybrane właściwości elektrofizjologiczne neuronów dopaminowych w SN/VTA | 142 |
| 4.4.2.7. Obserwowane zmiany elektrofizjologiczne nie są wynikiem zaburzeń w gęstości kolców dendrytycznych | 144 |
| 5. Dyskusja | 146 |
| 5.1. <i>Przydatność konstytutywnego modelu TIF-IA^{DbhCre} dla badań długotrwałego wpływu degeneracji noradrenergicznej na neurony dopaminowe w rejonie SN/VTA</i> | 147 |
| 5.2. <i>Ocena zastosowania dwóch różnych podejść metodologicznych w celu otrzymania modeli zwierząt transgenicznych z degeneracją neuronów noradrenergicznych w LC</i> | 149 |
| 5.3. <i>Nowy system badawczy: LVCre-zależny CRISPR/Cas9. Użyteczność zastosowania systemu do edycji genów CRISPR/CAS9 w chorobach neurodegeneracyjnych</i> | 152 |
| 5.3.1. Zalety i trudności zastosowania Cre-zależnego CRISPR/Cas9 poprzez podania za pomocą lentiwirusowych wektorów celem edycji genów w komórkach nie posiadających jednoznacznie selektywnych promotorów | 153 |
| 5.4. <i>Wpływ czynników metodycznych na skuteczność wygenerowania nowego neurospecyficznego modelu TIF-IA-CRISPR^{DbhCre}</i> | 155 |
| 5.4.1. Weryfikacja Cre-zależnego miejsca | 155 |
| 5.4.2. Weryfikacja gRNA wyciszającego TIF-IA | 155 |
| 5.4.3. Weryfikacja „off targets” | 158 |
| 5.4.4. Problemy z transdukcją LV | 158 |
| 5.4.5. Problemy z weryfikacją skuteczności podań stereotaktycznych | 160 |
| 5.5. <i>Przyszły kierunek badań z użyciem LV-CRISPR-DIO</i> | 160 |
| 5.6. <i>Znaczenie uszkodzenia systemu noradrenergicznego we wczesnej fazie choroby Parkinsona</i> | 162 |
| 5.6.1. Analiza dotychczasowych badań z degeneracją LC w PD | 162 |
| 5.6.2. Potwierdzenie skuteczności LV-CRISPR-DIO w modelu TIF-IA-CRISPR ^{DbhCre} – analiza fenotypowa zwierząt | 164 |

| | |
|--|------------|
| 5.6.3. Wpływ łagodnej neurodegeneracji LC na funkcjonowanie układu dopaminowego w modelu TIF-IA-CRISPR ^{DbhCre} | 167 |
| 5.7. Różnice płciowe w PD | 170 |
| 6. Podsumowanie i wnioski | 172 |
| Bibliografia..... | 173 |

Streszczenie

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 (bradykinezja, 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 prowadziła do spontanicznych, negatywnych zmian w układzie dopaminowym;
- wykorzystanie modelu dla badania **wzajemnych zależności pomiędzy w/w układami neuroprzekąźnictwa** w kontekście wczesnej, przedklinicznej fazy PD.

W pierwszej fazie projektu wykazano, że 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-IA** 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 celem niniejszej pracy było zatem stworzenie modelu, w którym mutacja wywołana przez delecję TIF-IA 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 transferowy, 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 reading 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 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 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 przystąpiono do eksperymentów *in vivo*, w trakcie których dopracowano technologię CRISPR/Cas9 pod kątem skuteczności transdukcji i optymalizacji tzw. przewodnika RNA (*guide RNA*, 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 i ekspresji wybranych miRNA) oraz **elektrofizjologiczne** (m.in. badanie spontanicznej aktywności neuronów dopaminowych).

Efektom pracy było stworzenie i scharakteryzowanie **nowatorskiego, mysiego modelu z selektywną, domózkową delecją TIF-1A 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.

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.

Summary

Parkinson's disease (PD) is a slowly progressive, degenerative disease of the central nervous system characterized by the atrophy of dopaminergic cells in the *substantia nigra* (SN) and *ventral tegmental area* (VTA). However, PD is associated not only with neurodegeneration within the dopamine system, which is directly responsible for the development of symptoms (bradykinesia, muscle stiffness, slowness of movement), but also with disorders in the functioning of other extrapyramidal systems, in particular the **noradrenergic system**. According to Braak's hypothesis, pathological changes, which do not yet translate into characteristic symptoms of the disease, begin earlier in the *medulla oblongata* and *locus coeruleus* (LC), then spread to the structures of the brainstem. It has been observed that in PD, the degeneration of LC cells may even exceed the loss of dopamine cells. Experimental data also indicate a significant relationship between the level of norepinephrine in the brain and susceptibility to parkinsonism-inducing neurotoxins in mice. Despite this, few attempts have been made to investigate the **long-term** effects of noradrenergic degeneration on dopamine function, primarily due to the lack of suitable animal models. Therefore, the aim of the study was to:

- investigate the impact of the effects of a constitutive mutation leading to the degeneration of the noradrenergic system on the effects in the dopaminergic system;
- create a novel mouse model characterized by **selective, cerebral-specific, progressive degeneration of the noradrenergic system** and investigate whether such a mutation would lead to spontaneous, negative changes in the dopaminergic system;
- exploit the model to study the **interdependencies between the above-mentioned neurotransmission systems** in the context of the early, preclinical phase of PD.

In the first phase of the project, it was shown that significantly progressive neurodegeneration of the noradrenergic system can ultimately induce **negative changes in the functioning of the dopaminergic system** in adult mice (Barut et al., *Neurochem Int*, 2022), including an increase in the expression of micro- and astroglial markers, pro-inflammatory cytokines or markers of oxidative stress in the SN/VTA region. However, the animal model used for this purpose (transgenic mice based on Cre/loxP system, with deletion of the **transcription factor TIF-IA** responsible for controlling polymerase I activity, under the control of the dopamine beta-hydroxylase promoter, *Dbh*) was not a suitable tool due to the parallel degeneration of the peripheral sympathetic system.

The main task was therefore to create a novel model in which the mutation induced by the TIF IA deletion would remain progressive, be induced in an adult animal **and be selectively targeted only to LC cells**, which would much better reflect the early phase of degeneration observed in PD according to Braak's hypothesis. For this purpose, the **CRISPR/Cas9 gene editing system** was implemented for the first time in our laboratory. A Cre-dependent lentiviral expression vector was designed to express Cas9 nuclease under the control of a neuronally specific human synapse promoter. The fragment of the sequence containing Cas9 has been double-flanked by loxP sites that are in reverse orientation, also known as DIOs (*Double-Floxed Inverted Open Reading Frame*). This proprietary construct, which contains the entire CRISPR machinery in a single molecule, along with the Cre-dependent site, was used for the first time in this work to incorporate gene expression through recombination mediated by Cre recombinase, under the control of the *Dbh* promoter. This experimental approach enabled selective deletion of TIF-IA in the LC region of *DbhCre* mice stereotactically treated with a lentiviral vector to LC and successfully prevented possible nonspecific mutation in other cells due to nonpredictive in-vivo lentiviral vector spread and transduction. In the first phase, the construct was developed and validated *in-vitro* to demonstrate its potential on mouse primary cortical and dopamine neurons, as well as astrocytes. Following this step, *in-vivo* experiments were carried out to fine-tune the CRISPR/Cas9 technology for transduction efficiency and gRNA optimization.

The resulting model was characterized at successive time points as neurodegenerative changes developed, focusing on the long-term impact of noradrenergic degeneration on the functioning of the dopamine system (the system not directly affected by the mutation). This step included **behavioural studies** (m.in. spontaneous activity test, rotarod test, static rod test, tests for possible depressive phenotype and anxiety in animals), **histological** (IHC staining with neurodegeneration markers), **biochemical** (determination of neurotransmitter levels), **molecular** (proteomic studies, expression of miRNA, attempts to identify pathways leading to cell death), and **electrophysiological** (i.e. study of spontaneous activity of dopaminergic neurons).

As the result of the study, **a novel mouse model with selective, intracerebral TIF-1A deletion in the LC region using the CRISPR/Cas9 system** was created and characterized. The outcome proves the possibility of creation analogous mutations in other Cre-dependent transgenic lines, which significantly reduces the time needed to obtain the final experimental model, bypassing the need for time-consuming and not always effective mating between Cre-expressing animals and animals possessing flanked loxP gene to be deleted. The added value of this research approach is also a better possibility of applying the 3R principle in behavioural studies using animal models (the number of animals used to generate a cohort with the introduced mutation is similar to the number of animals intended for a final experiment).

The results of this study also confirm the **negative impact of selective degeneration of LC on the functioning of dopamine neurons in SN/VTA**, supporting the thesis that dysregulation in functioning of noradrenergic system may contribute to changes in the activity of dopamine neurons, which may be characteristic in the prodromal phase of PD. Changes in the behavioural phenotype of mutant animals (i.e. decreased motor coordination, changes in anxious and depressive behaviours) were demonstrated. An interesting observation was the differentiation of effects depending on the sex of the animals, a problem that has been raised more and more often in recent years in experimental studies on the central nervous system, but less obvious in studies on neurodegenerative diseases. At the molecular level, in animals with LC degeneration, an increase in the expression of inflammatory markers in the SN/VTA region, changes in proteomics in the pathways responsible (i.e. for mitochondrial protein fusion or glycolysis processes) were observed. Electrophysiological studies have also shown a decrease in the spontaneous activity of dopamine neurons in mutant animals. It has also been shown that differences in the diameter of the pupil of the eye in mutant mice can directly correlate with changes in LC activity, which is a valuable diagnostic marker allowing for behavioral assessment of the degree of LC degeneration after the introduction of the lentiviral vector, and in the future may also have translational significance.

Due to the creation of a model from the scratch based on a novel technique, the full molecular characterization of changes in the dopamine system was beyond the time capabilities of this work. However, the developed model provides an interesting new research tool for further studies on the interaction of noradrenergic and dopaminergic systems, not only in Parkinson's disease.

1. Wstęp

Choroby neurodegeneracyjne to szeroka grupa schorzeń o zróżnicowanym podłożu, ale o wspólnej cesze – utracie neuronów w różnych strukturach układu nerwowego. Najczęściej występujące choroby neurodegeneracyjne to choroba Alzheimera i choroba Parkinsona, ale grupa tych schorzeń obejmuje wiele innych: choroba Huntingtona, stwardnienie zanikowe boczne, choroba Picka, Creutzfeldta-Jakoba, Batteny, czy Gauchera. Niektóre z tych chorób mają znaną przyczynę, jak np. autosomalna dziedziczność mutacji genu IT15 kodującego huntingtynę (Htt) czy zakażenie prionowe w chorobie Creutzfeldta-Jakoba. Jednak większość chorób neurodegeneracyjnych ma charakter idiopatyczny, a dokładne molekularne mechanizmy prowadzące do śmierci neuronów i w konsekwencji rozwoju zróżnicowanych objawów neurologicznych, pozostają niejasne. Brak pełnego zrozumienia mechanizmów leżących u podłoża przyczyn większości chorób neurodegeneracyjnych uniemożliwia opracowanie skutecznych i bezpiecznych metod leczenia, czy choćby strategii neuroprotekcyjnych, które zatrzymają progresję choroby na etapie jeszcze bezobjawowym. Dodatkowo proces chorobowy, mający charakter postępującej i nieodwracalnej neurodegeneracji, jest diagnozowany objawowo już w zaawansowanym stadium, gdy doszło do znacznej utraty populacji komórek nerwowych, co uniemożliwia wprowadzenie skutecznych terapii modyfikujących lub opóźniających progresję choroby. Terapie chorób neurodegeneracyjnych – o ile nawet są dostępne – mają charakter objawowy.

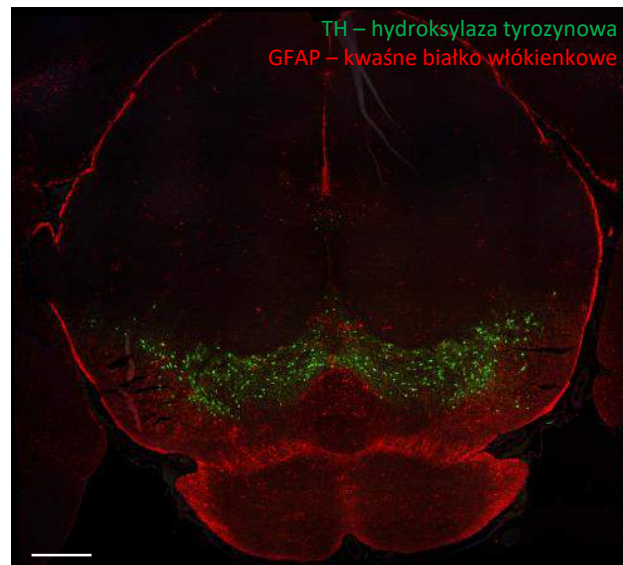
Postępujące progresywnie procesy neurozwyrodnieniowe prowadzą do trwałych uszkodzeń układu nerwowego i zmian funkcjonalnych. Uszkodzenie neuronów, obecność stanów zapalnych, glejoza oraz obecność nieprawidłowo sfałdowanych lub nadmiernie fosforylowanych białek tworzących agregaty gromadzące się w komórkach nerwowych, mogą obejmować różne obszary w mózgu, rdzeniu kręgowym i obwodowym układzie nerwowym. Te nieprawidłowe procesy prowadzą do wystąpienia objawów związanych z uszkodzeniem konkretnych struktur. Dodatkowo w niektórych chorobach neurodegeneracyjnych uszkodzeniu nie ulega tylko jeden, specyficzny obszar mózgowia, choćby nawet był on bezpośrednio odpowiadającym za charakterystyczne objawy schorzenia. Patologie w częściach mózgu często są związane ze sobą, a zaburzenie funkcjonowania jednego układu neuroprzekaźników ma wpływ na funkcjonowanie innych części mózgu, dołączając dodatkowe dolegliwości u pacjentów, które – szczególnie w etapie prodromalnym – nie są kojarzone z rozwijającym się już procesem chorobowym.

1.1. Choroba Parkinsona

Od kiedy po raz pierwszy szczegółowo opisano chorobę Parkinsona w przełomowym eseju Jamesa Parkinsona „An Essay on the Shaking Palsy” (oryginalna publikacja z 1817 r.; przedruk (Parkinson, 2002)), badacze na całym świecie włożyli wiele wysiłku w wyjaśnienie patologii choroby i podjęli próby, aby zatrzymać jej progresję. Szacuje się, że w 2019 r. u 8,5 miliona osób zdiagnozowano chorobę Parkinsona (PD) (*Parkinson's disease — Level 3 cause | The Institute for Health Metrics and Evaluation, 2020*), a liczba rozpoznawanych przypadków PD ciągle wzrasta ze względu na starzenie się populacji, szczególnie w krajach wysokorozwiniętych gdzie średnia długość wieku życia ludzkiego uległa znaczącemu wydłużeniu. W 2017 roku w samych Stanach Zjednoczonych PD dotknęła milion ludzi, a całkowite obciążenie kosztami ekonomicznymi tą chorobą wyniosło 51,9 miliarda dolarów. Przewiduje się, że do 2037 roku te szacunki wzrosną do 1,6 miliona osób chorych na PD powyżej 65. roku życia, a koszty ekonomiczne wzrosną o prawie kolejne 30 miliardów dolarów (Wenya Yang et al., 2020). Niestety, równocześnie rośnie liczba zgonów pośrednio spowodowanych tą chorobą. Podobnie jak w przypadku innych chorób neurozwyrodnieniowych, wiek jest bardzo istotnym czynnikiem ryzyka zachorowania na PD (Hou et al., 2019). U osób po 60. roku życia, choroba ta jest jedną z najczęściej diagnozowanych. Co ciekawe, większość pacjentów to mężczyźni – współczynnik stosunku

zachorowań mężczyzn do kobiet wśród ludzi dotkniętych PD wynosi 1,4. (Feigin et al., 2019). Ze względu na globalny trend wzrostu średniej długości życia, kolejne lata przyniosą dalszy wzrost zachorowań. Niektórzy autorzy wprost określają to zjawisko mianem neurodegeneracyjnej pandemii (Dorsey, Sherer, Okun, & Bloem, 2018).

PD, drugie pod względem częstości występowania schorzenie neurodegeneracyjne po chorobie Alzheimera (AD), jest skomplikowaną i zróżnicowaną chorobą charakteryzującą się postępującymi objawami motorycznymi, które często dopiero wtedy są przyczyną postawienia właściwej diagnozy. Uważa się, że objawy motoryczne są bezpośrednim efektem neurodegeneracji neuronów dopaminowych w SN/VTA (substancja czarna / pole brzuszne nakrywki, ang. *Substantia Nigra / Ventral Tegmental Area*), które są częścią zwojów podstawy mózgu, odpowiedzialnej między innymi za zachowanie ukierunkowane na cel oraz zaburzeń w ich projekcji do struktur, jak prążkowie (Nestler, Hyman, Holtzman, & Malenka, 2020)



Ryc. 1. Mikroskopowe zdjęcie przedstawiające przekrój przez mózg myszy z wybarwionymi neuronami dopaminowymi w SN/VTA za pomocą przeciwciała przeciwko hydroksylazie tyrozynowej (TH, ang. *Tyrosine Hydroxylase*) oraz astrocytami, wybarwionymi przeciwciałem przeciwko kwaśnemu białku włóknkowemu (GFAP, ang. *Glial Fibrillary Acidic Protein*). Skala 500 μ m

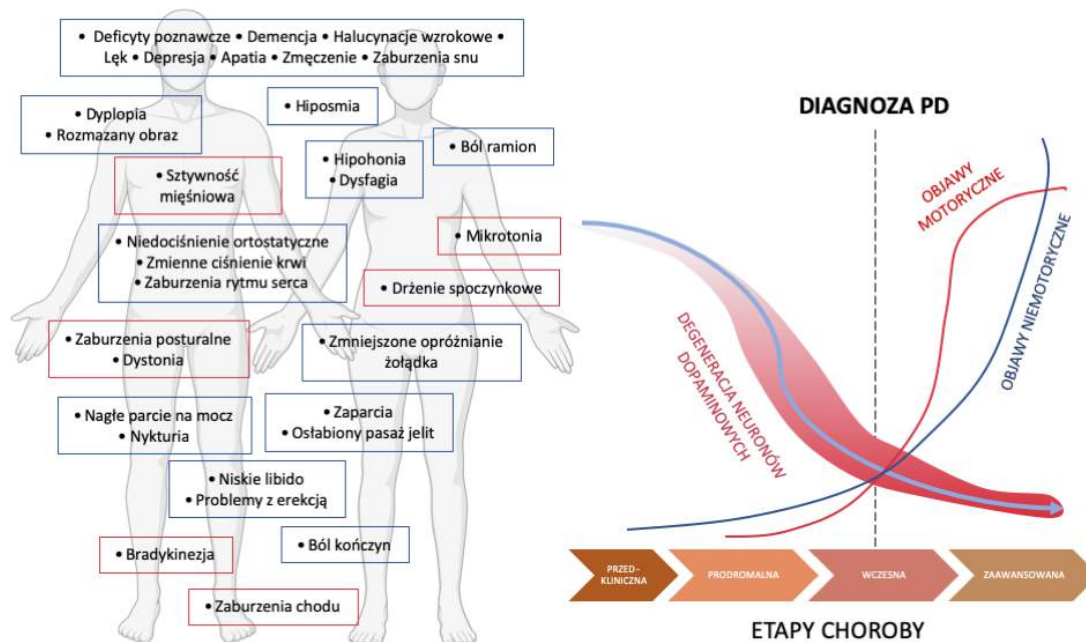
Do charakterystycznych ruchowych objawów PD należą (Moustafa et al., 2016; Xia & Mao, 2012):

- bradykinezja (czyli spowolnienie ruchowe),
- sztywność mięśniowa (spowodowana zwiększonym napięciem mięśniowym),
- drżenie spoczynkowe,
- zaburzenia chodu (jak trudności z inicjacją kroku, zmniejszenie długości kroków, festynacja, zamrożenie chodu),
- zaburzenia posturalne (niestabilność, pochylenie tułowia do przodu, dystonia),
- zubożenie mimiki twarzy, charakterystyczna „twarz maskowata”,
- mikrografia.

Kliniczna prezentacja PD jest zróżnicowana i może być zdominowana przez objawy ruchowe lub pozaruchowe. Objawy pozaruchowe PD mogą pojawić się na różnych stadiach rozwoju choroby lub nie towarzyszyć objawom motorycznym (Ryc. 2) (Chaudhuri & Schapira, 2009; Kurihara et al., 2020). Za jedną z przyczyn występowania objawów pozaruchowych uważa się dysfunkcje lub uszkodzenia innych niż SN/VTA układów i struktur ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego (Chaudhuri, Healy, & Schapira, 2006; Costa, Esteves, Empadinhas, & Cardoso, 2022). Niestety, same objawy

motoryczne są już sporym obciążeniem pacjentów, ze względu na indywidualną odpowiedź na leczenie L-DOPA (lewodopa, prekursor dopaminy przechodzący przez barierę krew-mózg) i trudność w dobraniu dawki terapeutycznej, nie powodującej dyskinez szczególnie w późniejszych fazach choroby. Obecnie dostępne terapie farmakologiczne opierają się na zmniejszaniu symptomatologii choroby, głównie przez stymulację układu dopaminowego, i chociaż łagodzą (w pewnym stopniu) typowe objawy, nigdy nie przywracają funkcji ani nie zapobiegają utracie neuronów. Istotnym czynnikiem znacząco ograniczającym wysiłki terapeutyczne jest to, że utrata neuronów rozpoczyna się dużo wcześniej, zanim pojawią się pierwsze objawy kliniczne i nawet szybka diagnoza daje małą szansę na skuteczne leczenie, ponieważ większość neuronów uległa już nieodwracalnej degeneracji (Ryc. 2).

Jedną z charakterystycznych cech PD jest patologiczna akumulacja i agregacja białka α -synukleiny (α -Syn) w postaci ciał Lewy'ego (ang. *Lewy bodies*, LB) (Spillantini et al., 1997), obecnych w mózgu prawie wszystkich pacjentów badanych pośmiertnie (W. R. G. Gibb & Lees, 1988). Dlatego szybko powiązano mutacje w genie kodującym α -Syn z dziedziczną postacią PD (Polymeropoulos et al., 1997). Obecnie uważa się, że agregacja i transmisja α -Syn w różnych obszarach mózgu jest jednym z kluczowych czynników patognomicznych w PD, choć niekoniecznie wystarczających *per se* aby bez wywołać neurodegenerację bez dodatkowych, współistniejących czynników (Surmeier, Obeso, & Halliday, 2017).



Ryc. 2. Niemotoryczne objawy choroby Parkinsona (niebieska ramka) oraz objawy motoryczne (czerwona ramka). Schemat czasowy pokazujący etapy zaawansowania choroby. Niemotoryczne objawy mogą mieć swój początek już w fazie przedklinicznej, natomiast objawy motoryczne ujawniają się dopiero w fazie wczesnej choroby, kiedy większość neuronów dopaminowych jest już zdegenerowana.

Kiedy neurony dopaminowe SN/VTA obumierają, w konsekwencji zmniejsza się liczba zakończeń dopaminowych w prążkowiu (Scherman et al., 1989). W momencie pojawienia się pierwszych objawów motorycznych, nie zawsze jeszcze jednoznacznie kojarzonych z PD, dochodzi już do śmierci co najmniej 30% neuronów w istocie czarnej, a w prążkowiu utraty aż do 60% zakończeń dopaminowych (Cheng, Ulane, & Burke, 2010). Dlatego uważa się, że degeneracja najpierw obejmuje aksony neuronów, a następnie w wyniku progresji zmian ciała neuronów. Dodatkowo w tym momencie dochodzi już do utraty około 70-80% zawartości dopaminy w skorupie ogoniastej, która razem z jądrem ogoniastym tworzy prążkowie.

1.1.1. Inne neurony zaangażowane w chorobę Parkinsona

Chociaż historycznie opisywana choroba Parkinsona skupiała się tylko na degeneracji SN/VTA, ostatnio dyskutuje się, że sama degeneracja neuronów dopaminowych zachodzi na późniejszych etapach, a uszkodzenia innych obszarów mózgu poprzedzają utratę komórek w SN/VTA, wpływając na złożone systemy neurotransmiterów, takie jak glutaminergiczne, noradrenergiczne, serotoninerdyczne i cholinergiczne (Heiko Braak, Ghebremedhin, Rüb, Bratzke, & Del Tredici, 2004). Ta zróżnicowana, postępująca neurodegeneracja może wyjaśnić różnorodną symptomatologię PD, obejmującą nie tylko objawy ruchowe, ale także inne zmiany pozamotoryczne (Chaudhuri & Schapira, 2009). Badania obrazowe u ludzi z PD wykazują różne struktury i zaangażowane w nie sieci przekazywania neuronalnego jako zmienione patologicznie w procesie chorobowym (Tab. 1). Te obszary ośrodkowego układu nerwowego, a także części obwodowego układu nerwowego również wykazują obecność patologicznych ciał i wtęretów Lewy'ego, wykazując, że w nich również toczy się proces chorobowy. Co interesujące, związane z dysregulacją innych układów niż SN/VTA, objawy pozamotoryczne PD, są nie tylko ważnymi cechami klinicznymi pomagającymi w rozpoznaniu, ale mogą poprzedzać objawy motoryczne o wiele lat (Schapira, Chaudhuri, & Jenner, 2017). Dlatego między innymi zaburzenia niemotoryczne są ciekawym polem dla poszukiwania biomarkerów wczesnych, prodromalnych stadiów choroby. Niektóre objawy niemotoryczne wymienione w Tabeli 1 są wymieniane jako objawy wczesnej fazy choroby Parkinsona (Schapira & Tolosa, 2010). Przykładowo, u 90 % pacjentów z chorobą Parkinsona przed postawieniem ostatecznej diagnozy obserwuje się deficyty węchu (N. I. Bohnen, Studenski, Constantine, & Moore, 2008).

Tab. 1. Przykładowe, niemotoryczne objawy choroby Parkinsona, wraz z przypuszczalnie powiazanymi obszarami nerwowymi, które działają dysfunkcyjnie i powiazanymi rodzajami neuroprzekazywania. DA – neurony dopaminowe; 5HT – neurony serotoninerdyczne; NA – neurony noradrenergiczne; Ach – neurony cholinergiczne; LC – miejsce sinawe. Na podstawie pracy przeglądowej (Qamar et al., 2017).

| SYMPTOMY | PRZYPUSZCZALNY OBSZAR DYSFUNKCYJNY | PRZYPUSZCZALNIE ZAANGAŻOWANE NEURONY | | | | BIBLIOGRAFIA |
|--|---|---|-----|----|-----|---|
| | | DA | 5HT | NA | ACh | |
| Zmęczenie | Jądro ogoniaste, skorupa, prądkowie brzuszne, wzgórze | +/- | + | | | (Pavese et al., 2012; Schifitto et al., 2008) |
| EDS (ang. <i>Excessive Daytime Sleepiness</i>) | prądkowie, skorupa, wzgórze, LC, podwzgórze, VTA | + | + | + | | (Happe et al., 2007; Pavese et al., 2012) |
| RBD (ang. <i>Rapid Eye Movement Behaviour Disorder</i>) | Prądkowie, skorupa | + | | | + | (Eisensehr et al., 2000; Gilman et al., 2003) |
| Lękowość | Jądro ogoniaste, prądkowie brzuszne, LC, wzgórze, ciało migdałowate, | + | + | + | | (Kaasinen et al., 2001; Remy, Doder, Lees, Turjanski, & Brooks, 2005; Tanaka, Yoshida, Emoto, & Ishii, 2000; Weintraub et al., 2005) |
| Depresja | Śródmózgowie, LC, skorupa, prądkowie, wzgórze, pień mózgu | + | + | + | | (Beucke et al., 2010; Koerts, Leenders, Koning, Portman, & Van Beilen, 2007; Murai et al., 2001; Weintraub et al., 2005; Zarow, Lyness, Mortimer, & Chui, 2003) |
| Deficyty pamięci | Prądkowie, skorupa, jądro ogoniaste, kora czołowa, pień mózgu, mózdzek, | + | | | + | (Nicolaas I. Bohnen & Albin, 2011; Marié et al., 1998; Movement & 2003, 2003; Rinne et al., 2000) |

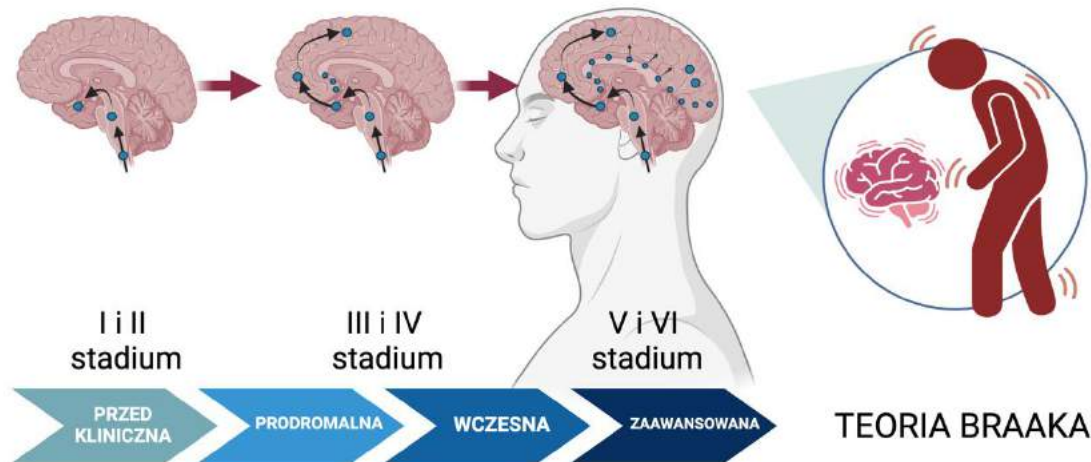
| most, wzgórze | | | | | |
|-----------------------------|--|-----|-----|---|--|
| Zaburzenia percepcyjne | Układ korowo-prążkowiowo-wzgorzowy, kora czolowa | + | + | + | (Hoffman, Fernandez, Pittman, & Hampson, 2011; Sanchez-Ramos, Ortoll, & Paulson, 1996; Wood, Hopkins, Moodley, & Chan, 2015; S. S. Zhang et al., 2016) |
| Zaburzenia układu moczowego | Jądro ogoniaste, skorupa | + | | | (Sakakibara et al., 2001) |
| Dysfunkcje seksualne | Insula, jądro ogoniaste, skorupa, wzgórze, jądro półleżące | +/- | +/- | | (Georgiadis et al., 2010; Stoléru et al., 1999) |
| Problemy sercowe | Pień mózgu, zmniejszenie pozazwojowego presynaptycznego unerwienia współczulnego serca | | | + | (Mizutani et al., 2015; Spiegel et al., 2007) |
| Zaburzenia gastryczne | Układ przywspółczulny - trzustka | +/- | | + | (Gjerløff et al., 2015) |

Powyższa tabela pokazuje zaangażowane w PD wielu układów neuroprzekąźnictwa. Powiązane z nimi objawy jak zmęczenie, dysfunkcje seksualne i zaburzenia gastryczne są przedmiotem dyskusji, czy w ich rozwoju ma także udział dysfunkcja układu dopaminowego. Co ciekawe niektóre neurony z wymienionych obszarów wykazują również podobne właściwości stymulacyjne jak neurony dopaminowe, generując spontaniczny i cykliczny impuls elektryczny (J. A. Goldberg et al., 2012; Kang & Kitai, 1990; Sanchez-Padilla et al., 2014), który w neuronach dopaminowych odpowiada za cykliczne wyrzuty dopaminy i utrzymywanie stałego poziomu tego neurotransmitera. Właściwości te dotyczą również neuronów noradrenergicznych, które znalazły się w głównym obszarze zainteresowań niniejszej pracy (Sanchez-Padilla et al., 2014). Niektóre neurony noradrenergiczne charakteryzują się również skomplikowanym rozgałęzieniem aksonów, podobnych do neuronów wychodzących z SN. Te cechy mogą przyczyniać się do wyjątkowej wrażliwości neuronów dopaminowych czy noradrenergicznych (Surmeier et al., 2017), tłumacząc dlaczego pierwsze „padają ofiarą” podczas rozwoju PD.

1.1.2. Teorie dotyczące prodromalnej fazy choroby Parkinsona

W 2003 roku, Braak i wsp. (H. Braak, Rüb, Gai, & Del Tredici, 2003; Heiko Braak, De Vos, Bohl, & Del Tredici, 2006; Heiko Braak et al., 2004) zaproponowali hipotezę o rozwoju patologii PD w strukturach w układzie nerwowym w określonej kolejności. Upośledzenie funkcji neuronów zaczyna się od struktur najbardziej obwodowych (opuszka węchowa oraz jądro grzbietowe nerwu błędnego) a następnie rozprzestrzenia się w sposób topograficzny przez mózg, miejsce sinawe, jądra szwu, istotę czarną (objawowe stadium III wg teorii Braaka) i jądro podstawne Meynerta, osiagając w końcowych stadiach choroby strukturę kory nowej (stadium V). Teorię tą potwierdzają obserwacje stwierdzające zaburzenia węchu i RBD (ang. *Rapid Eye Movement Behaviour Disorder*) we wczesnych fazach PD (Ahnaou & Drinkenburg, 2022; Heiko Braak et al., 2003; Rektor et al., 2018). Sugeruje się, że kolejność zajmowanych partii mózgu ma wpływ na pojawiające się objawy niemotoryczne oraz – w bardziej zaawansowanej fazie choroby – objawy ruchowe. Mimo, że wiele aspektów tej hipotezy nie zostało wciąż wyjaśnione, istnieje potrzeba zbadania podłoża pojawiających się symptomów niemotorycznych (wymienionych przykładowo w Tab. 1). Jednym z możliwości sprawdzenia stanu mózgowia są badania obrazowe pacjentów dotkniętych PD. Wykazano, że u pacjentów z towarzyszącymi objawami pozaruchowymi, jak zaburzenia kognitywne, występuje degeneracja obszaru miejsca sinawego (*Locus Ceruleus*, LC). Co więcej, po podaniach L-DOPA, objawy pozaruchowe nie poprawiały się (C. Zhou et al., 2021), co świadczy o tym, że PD jest złożoną chorobą wieloukładową.

Niestety brak jest badań klinicznych u pacjentów w bardzo wczesnych stadiach choroby, głównie ze względu na późne rozpoznanie PD. W materiale sekcyjnym pobranym od chorych na PD, wykazano iż degeneracja LC może być nawet procentowo większa niż w rejonie SN/VTA (Zarow et al., 2003).



Ryc. 3. Stadia choroby Parkinsona według teorii Braaka (Heiko Braak et al., 2004). Rozprzestrzenianie się zmian patologicznych zaczyna się od struktur najbardziej obwodowych, a następnie biegnie w sposób topograficzny przez mózg.

Późniejsze badania Braaka oraz innych naukowców wykazały, że wpływ na patologię może mieć gromadzenie się złożeń α -Syn, której obecność wykazano również w komórkach nerwowych układu pokarmowego. W ostatnich latach coraz więcej zwolenników zyskuje teoria, że PD może rozpoczynać się już w jelitach, skąd α -Syn przez nerw błędny przedostaje się do mózgu (Heiko Braak et al., 2006; Corbillé, Neunlist, & Derkinderen, 2016). Dodatkowo, badania mikrobiologów wykazały, że istnieje związek pomiędzy florą bakteryjną jelit a rozwojem PD. Niektórzy autorzy uważają, że zaburzenia mikrobiomu mogą sprzyjać odkładaniu się w jelitach patologicznej formy α -Syn. Dlatego sugeruje się, że zmiany we florze bakteryjnej jelit mogą być inicjatorem tej choroby (Sampson et al., 2016).

1.1.3. Genetyczne formy choroby Parkinsona

Do dnia dzisiejszego wykryto około 20 *loci* odpowiadających za 10–15% dziedzicznych form PD (de Lau & Breteler, 2006). Są to mutacje prowadzące do rozwoju jednogenowej formy PD (np. *SNCA*, *LRRK2*, *PINK1*, *PARK2*, *PRKN*) lub są istotnym czynnikiem ryzyka (np. *GBA*) (Blauwendraat, Nalls, & Singleton, 2020). Warto wspomnieć, że u większości pacjentów z idiopatyczną formą PD mogą również występować pojedyncze mutacje w ponad 40 *loci* związanych ze podwyższonym ryzykiem zachorowania na PD (Lill, 2016), dlatego podział tej choroby na dwie formy – genetyczną i idiopatyczną jest bardzo umowny.

Najczęstszą przyczyną występowania PD o podłożu genetycznym jest mutacja w genie *LRRK2* (kodujący dardarynę, kinazę bogatą w powtórzenia leucynowe, *PARK8*) (Lesage et al., 2006). *PINK1* (gen kinazy indukowanej przez fosfatazę PTEN, *PARK6*) jest kinazą białkową, która fosforyluje mitochondrialne białko opiekuńcze TRAP1 promując przetrwanie komórki. Mutacje w genie *PINK1* obniżają zdolność *PINK1* do fosforylowania TRAP1 a w związku z tym osłabiają również zdolność komórki do przetrwania (Valente et al., 2004). Również mutacje w genie białka parkiny, która nazywana jest też białkiem Parkinsona 2 (*PARK2*) powodują częstą formę PD. Parkina jest enzymem, który pośredniczy w wiązaniu uszkodzonych i nadmiernych białek przez ubiquitynę. (Kitada et al., 1998). Jedną z najbardziej rozpoznawalnych i powiązanych do choroby Parkinsona mutacji, są mutacje w genie α -Syn (*SNCA*, *PARK1/4*). (Polymeropoulos et al., 1996). Do tej pory opisano cztery warianty α -Syn powstałe na skutek alternatywnego składania pre-mRNA oraz wykryto osiem mutacji punktowych typu podstawienia w genie *SNCA* (Appel-Cresswell et al., 2013; Hoffman-Zacharska et al.,

2013; Lesage et al., 2013; Polymeropoulos et al., 1996, 1997; Proukakis et al., 2013). Wykryto również di-/tri-plikacje genu *SNCA* (Chartier-Harlin et al., 2004), które znacząco podnoszą dotkliwość choroby oraz zaobserwowano, że polimorfizmy genu kodującego α -Syn mogą zwiększać ryzyko powstania PD (Copped, 2012). Pacjenci z PD wywołaną taką mutacją wcześniej wykazują patologię w postaci LB, które w dużych ilościach gromadzą się nie tylko w strukturach bogatych w neurony i zakończenia dopaminowe, ale również w innych strukturach, jak miejsce sinawe (Polymeropoulos et al., 1996).

Obecnie coraz częściej spotyka się pogląd, że PD może wynikać z uwarunkowań epigenetycznych i procesów starzenia. Wśród czynników, które podnoszą ryzyko zachorowania na PD wymienia się m.in.: ekspozycję na pestycydy o działaniu neurotoksycznym wobec neuronów dopaminowych (parakwat, rotenon), przyjmowanie β -blokerów, spożywanie pokarmów bogatych w węglowodany, chorobę wrzodową żołądka, czy inne choroby jelit, jak m.in. IBD (ang. *Inflammatory Bowel Disease*) (Brudek, 2019; Costa et al., 2022). Zrozumienie tych złożonych procesów odpowiedzialnych za wystąpienie dziedzicznych form PD może wskazać ścieżkę rozwoju innowacyjnych, celowanych terapii. Geny zidentyfikowane w badaniach z udziałem rodzin dziedzicznie obciążonych PD stały się kandydatami do tworzenia nowych modeli zwierzęcych tej choroby. Badania na genetycznych modelach PD opartych o odwzorowanie mutacji ludzkich z jednej strony mogą prowadzić do lepszego zrozumienia szlaków neuroprzekątnictwa prowadzących do śmierci komórkowej, z drugiej strony wiadomo, że wiele z tak utworzonych modeli zwierzęcych nie spełniło pokładanych w nich nadziei (Airavaara et al., 2020).

1.1.4. Molekularne podłoże choroby parkinsona

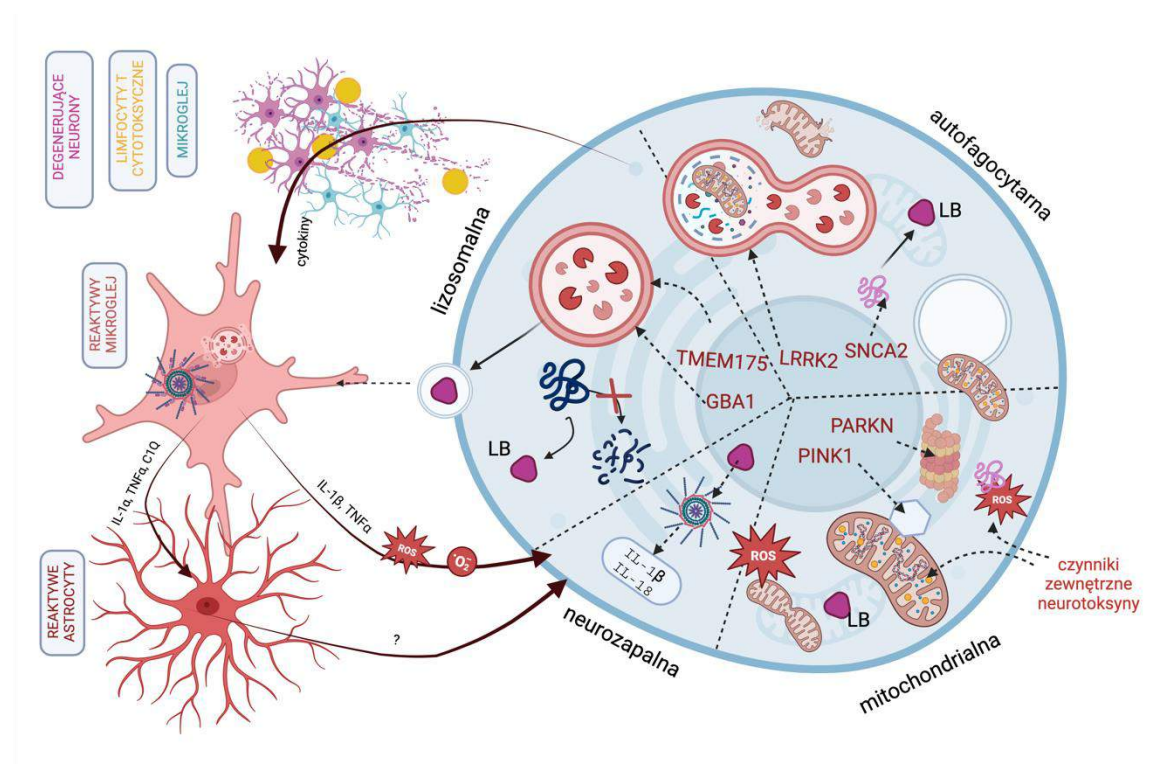
Postulowane molekularne mechanizmy idiopatycznej formy PD są m.in. powiązane ze stresem oksydacyjnym, dysfunkcją mitochondriów, zaburzeniami szlaku lizosomalnego i autofagosomalnego. Stwierdzono również zaburzenia transportu aksonalnego i obecność stanów zapalnych w neuronach, w tym głozy.

1.1.4.1. Szlaki zaangażowane w PD

Degeneracja neuronów dopaminowych jest uzależniona od różnych złożonych mechanizmów, które często są ze sobą powiązane. Występowanie zaburzeń w jednym aspekcie powoduje kaskadę destrukcyjnych dla neuronów zdarzeń. Jednym z najważniejszych aspektów dysfunkcji na poziomie komórkowym są zaburzenia funkcjonowania mitochondriów, które występują zarówno w sporadycznej, jak i genetycznej postaci PD (Bossy-Wetze, Schwarzenbacher, & Lipton, 2004). Mitochondria ze względu na swoją funkcję są bardzo podatne na czynniki stresowe, które w konsekwencji prowadzą do zaburzenia ich funkcji (Soutar et al., 2022). Istotną rolę pełni mutacja białka PINK1, która w powiązaniu z brakiem syntezy Parkiny, uniemożliwia ligację ubikwityny, która w fizjologicznych warunkach degraduje na ścieżce autofagocytozy uszkodzone mitochondria (Ge, Dawson, & Dawson, 2020). Degradacja zbędnych białek przez proteasom stanowi istotny, wewnątrzkomórkowy system kontroli, który zapobiega nagromadzeniu się nieprawidłowych, zdeformowanych lub toksycznych białek (Alvarez-Castelao, Goethals, Vandekerckhove, & Castaño, 2014). Również uszkodzenie integralności błony komórkowej mitochondriów powoduje zaburzenie metabolizmu komórkowego oraz wejście komórki na ścieżkę apoptozy. Uważa się, że stres oksydacyjny (ROS, ang. *Reactive Oxygen Species*), który między innymi może być spowodowany zewnętrznymi warunkami (jak ekspozycja na neurotoksyny) wiąże się z nieprawidłowym funkcjonowaniem kompleksu I łańcucha oddechowego (Tofaris, Razaq, Ghetti, Lilley, & Spillantini, 2003). Wiele genów kodujących lizosomalne enzymy, czy zaangażowane w transport lizosomalny, mitofagię i inne autofagocytarne funkcje, ma powiązanie z PD (Gan-Or, Dion, & Rouleau, 2015). Między innymi mutacje w genie *TMEM175* (Qu et al., 2022), który koduje lizosomalny transmembranowy kanał potasowy lub w genie *LRRK2*, który mediuje autofagocytozę, doprowadzają do zwiększonej akumulacji α -Syn, potwierdzając znaczenie systemu

lizosomalnego i autofagocytarnego w patogenezie PD (Alegre-Abarrategui & Wade-Martins, 2009; Volta, Milnerwood, & Farrer, 2015). Neurony dopaminowe charakteryzują się wyższą selektywnością i wrażliwością na niszczące efekty stymulacji procesów zapalnych w neuronach. Wiele badań, komórkowych, na modelach zwierzęcych, jak i klinicznych potwierdza ważną rolę neurozapalenia w progresji choroby Parkinsona (Tansey & Goldberg, 2010). Odpowiedź immunologiczna związana jest z aktywacją gleju oraz infiltracją peryferyjnymi komórkami immunologicznymi (Qinqin Wang, Liu, & Zhou, 2015). Wykazano również, w hodowlach mieszanych neuronalnych z mikroglejem lub astrocytami, że glęj może regulować neuronalną odpowiedź zapalną sprzyjając, lub ograniczając niszczące szkody aktywacji neurozapalnych ścieżek oraz potwierdzono obecność reaktywnych form gleju w modelach PD (Hartmann et al., 2019; Liddel et al., 2017; Yun et al., 2018; Y. Zhang et al., 2014). Powyższa tematyka została przeze mnie podjęta również w badaniach komplementarnych do niniejszej pracy doktorskiej, w ramach realizowanego przeze mnie grantu NCN Preludium 18 p.t. „Udział astrocytów w mechanizmie neuroprotekcji wywołanym przez nasilenie transmisji noradrenergicznej w mysim modelu progresywnego parkinsonizmu”.

Zaburzenie każdej z tych ścieżek: mitochondrialnej, lizosomalnej, autofagocytarnej, czy neurozapalnej, pojedynczo nie wyjaśnia patogenezy PD. Zjawiska te współlistnieją w procesie neurodegeneracji i są zależne od siebie (Ryc. 4). Niestabilność jednego aspektu funkcjonowania komórki ma konsekwencje w pozostałych.



Ryc. 4. Schematycznie przedstawione ścieżki mitochondrialna, autofagocytarna, lizosomalna i neurozapalna, których dotyczy zaburzenia w chorobie Parkinsona. LB – ciała Lewy'ego, ROS – reaktywne formy tlenu.

1.1.4.2. α -Synukleina (α -Syn)

α -Syn jest białkiem kodowanym przez gen *SNCA*, który ulega obfitej ekspresji w presynaptycznych zakończeniach ośrodkowego układu nerwowego. Dokładna funkcja α -Syn pozostaje w dużej mierze nieznana, chociaż coraz więcej dowodów potwierdza teorię, że α -Syn bierze udział w plastyczności synaptycznej i uwalnianiu neuroprzekaźników (Burré et al., 2010). Również wykazano, że większa aktywność neuronalna/synaptyczna dynamicznie reguluje fizjologiczne uwalnianie

endogennej α -Syn (Yamada & Iwatsubo, 2018). α -Syn wiąże się z błonami lipidowymi pęcherzyków synaptycznych, mitochondriów oraz aparatu Golgiego. W warunkach fizjologicznych białko to wchodzi w interakcję z białkami kompleksu SNARE (ang. *Soluble N-ethylmaleimide-Sensitive Fusion Attachment Protein Receptor*), regulując transport pęcherzykowy oraz proces endo- i egzocytarne (Burré, 2015; Burré et al., 2010). Pełni również rolę regulatora zależnego od klatryny procesu formowania pęcherzyków synaptycznych. Warto też wspomnieć, że w warunkach fizjologicznych α -Syn reguluje na wielu etapach przekazywanie dopaminergiczne (Cabin et al., 2002).

Na powiązanie α -Syn z PD, jak już wspomniano, wskazują między innymi badania genetyczne obejmujące mutacje punktowe, duplikacje lub triplikacje genu *SNCA* u pacjentów z formą dziedziczną choroby, które mogą prowadzić do zainicjowania patologicznych zmian w tym białku. Proces agregacji α -Syn obejmuje zmiany konformacyjne, które ułatwiają jego agregację w oligomery, protofibryle i nierozpuszczalne fibryle, które ostatecznie gromadzą się w ciałach Lewy'ego. Wykazano, że to α -Syn jest głównym składnikiem LB (Spillantini et al., 1997), które są tak naprawdę mieszaniną różnych białek.

Dokładny proces prowadzący do śmierci neuronów dopaminowych w PD nadal jest niepotwierdzony, jednak udowodniono, że akumulacja fosforylowanej α -Syn w agregaty może zaburzać podstawowe funkcje neuronalne, powodując dysfunkcję synaptyczną i mitochondrialną, stan zapalny oraz deregulację szlaków degradacji białek (Duffy et al., 2018; Luk et al., 2009). Aktualnie intensywnie badane są hipotezy dotyczące rozprzestrzeniania się patologicznej α -Syn w obrębie mózgu, w tym hipotezy, w której przemieszczanie się fibryl α -Syn porównuje się do zachowania prionów. Wydaje się, że to fibryle α -Syn są najbardziej podatne na przemieszczanie się i akumulację w różnych strukturach mózgu, przyczyniając się w ten sposób do progresji choroby i manifestacji różnych klinicznych cech choroby, które mogą być zależne od regionu mózgu dotkniętego patologią (H. Braak et al., 2003).

1.2. Modele choroby Parkinsona

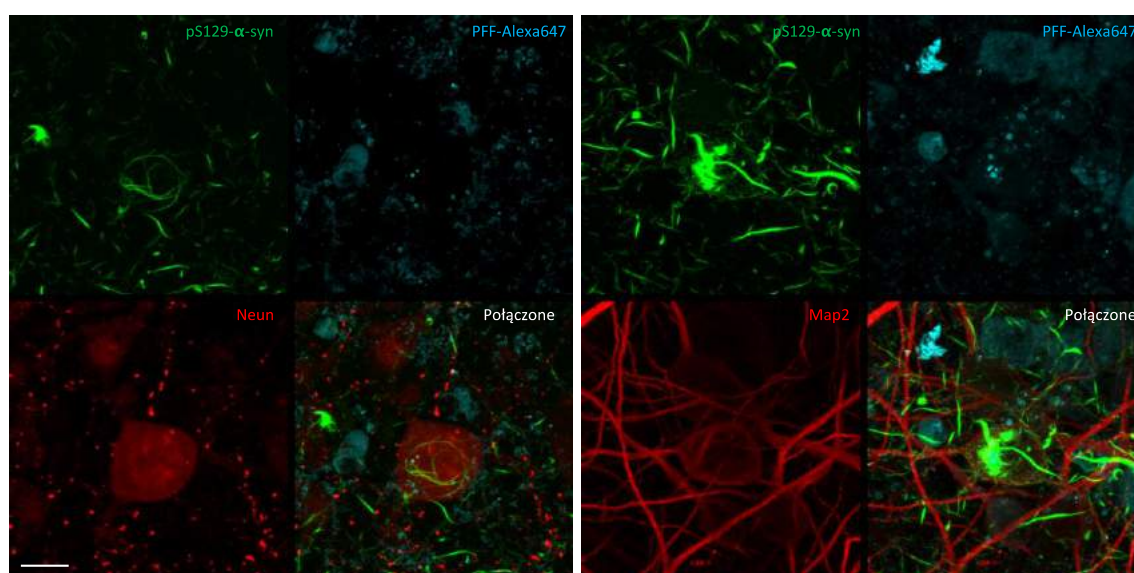
Modele zwierzęce w ogromnym stopniu przyczyniły się do postępu w zrozumieniu możliwych mechanizmów choroby Parkinsona, a także odegrały kluczową rolę w badaniach przesiewowych poszukiwań farmakoterapii i nowych strategii leczenia. Opracowane i zbadane zostało wiele modeli PD, opartych o farmakologiczne ablacje komórek neuronalnych, wywołanych toksynami lub próby odzwierciedlenia ludzkich mutacji wywołujących dziedziczne formy PD (Beal, 2010).

Najpopularniejszymi modelami choroby Parkinsona są modele oparte o podanie neurotoksyn. Modele te – z wyjątkiem rzadko stosowanych i problematycznych w wykonaniu protokołów opartych na niskich dawkach podawania neurotoksyny przez dłuższy okres czasu - charakteryzują się wywołaniem nieodwracalnej, niemal natychmiastowej śmierci neuronów SN/VTA, co nie odzwierciedla charakterystycznej progresji zmian neurodegeneracyjnych w PD (Schober, 2004). Wśród modeli genetycznych, stworzonych w oparciu o znane mutacje związane z PD, intensywnie badane są modele nadekspresji α -Syn. Oddzielną strategią są modele oparte o wywołanie dysfunkcji na poziomie molekularnym, niekoniecznie powiązanych z konkretną genetyczną mutacją odpowiadającą za występowanie PD, ale prowadzące do progresywnej śmierci komórek nerwowych.

1.2.1. Komórkowe modele PD

Badania PD na modelach komórkowych to najprostsze narzędzie do wstępnej weryfikacji hipotezy. Przydatność użycia linii komórkowych jest udowodniona w farmakologicznych badaniach toksykologicznych i przydaje się np. w badaniach przesiewowych nad związkami o potencjale neuroprotektynym. Na przykład komórkowe, uniesmiertelnione linie pochodzenia nerwowego, neuroblastomy SH-SY5Y i guza chromochłonnego PC12, odzwierciedlające degenerację neuronów dopaminowych są od lat używane jako dobry model do wstępnego wykluczenia toksyczności nowej

terapii (Xicoy, Wieringa, & Martens, 2017). Ciekawym rodzajem modeli komórkowych są eksperymenty prowadzone na pierwotnych hodowlach embrionalnych komórek śródmózgowia gryzoni, coraz bardziej doceniane ze względu na ich lepsze odzwierciedlenie fizjologii neuronów dopaminowych (Airavaara et al., 2020). Niedawno wprowadzonym modelem jest podawanie preformowanych włókien α -Syn (PFF, ang. *Pre-Formed Fibrils*), które powodują rekrutację natywnej formy α -Syn, powodując agregację i w efekcie pojawianie się złogów białkowych (Chmielarz & Domanskyi, 2021; Luk et al., 2012; Volpicelli-Daley, Luk, & Lee, 2014). Modele te umożliwiają badanie bezpośredniej odpowiedzi komórki na obecność LB i towarzyszących im patologii, jak np. zaburzeń lizosomalnych (Er, Hlushchuk, Airavaara, Chmielarz, & Domanskyi, 2020; Richard Karpowicz et al., 2017). Dzięki temu, możliwe jest prowadzenie badań o przeciwdziałaniu akumulacji białka, tak jak wykonujemy to w naszej codziennej pracy laboratoryjnej w Zakładzie Biochemii Mózgu (Ryc. 5). Wykazano również, że pierwotne hodowle dopaminowe po podaniach wyizolowanych LB pochodzących od pacjentów chorych na PD wykazują patologię, modelując przebieg choroby (Uemura et al., 2023).



Ryc. 5. Złogi α -Synukleiny (wybarwione przeciwciałem przeciwko pSyn łączące się z miejscem fosforylacji seryny w pozycji 129) zaindukowane przez preformowane włókna α -Syn (PFF), które są znakowane Alexa 647 metodą ATTO-labeling. Pierwotne neurony dopaminowe, 15 dzień hodowli, 10 dzień po dodaniach PFF. Złogi białka obecne są w ciele komórki, jak i neurytach. Skala 10 μ m. Badania własne, obrazowanie wykonane przez Autorkę przy użyciu mikroskopii konfokalnej Środowiskowej Pracowni Obrazowania IF PAN.

Osobnym zagadnieniem dotyczącym modeli komórkowych jest wytwarzanie indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC) z komórek krwi lub fibroblastów pochodzących od pacjentów przy użyciu technik reprogramowania komórkowego (Takahashi et al., 2007), co umożliwiło wygenerowanie modeli PD *in vitro*, które są odpowiednie do analizy mechanizmów chorobowych na poziomie komórkowym i molekularnym (Shi, Inoue, Wu, & Yamanaka, 2016), a także do badań przesiewowych leków (Garcia-Leon, Vitorica, & Gutierrez, 2019; Kouroupi, Antoniou, Prodromidou, Taoufik, & Matsas, 2020). Podjęto próby badań chorób neurodegeneracyjnych na mózgowych organoidach (Wray, 2021) oraz powoli i systematycznie naukowcy przystosowują nowy model 3D do badań nad chorobą Parkinsona, wytwarzając ludzkie mózgowo organoidy o fenotypie śródmózgowia (hMLOs, ang. *Human Midbrain-Like Organoids*) (Jo et al., 2021; Wulansari et al., 2021; Zagare et al., 2022).

1.2.2. Modele farmakologiczne

Popularnymi, farmakologicznymi modelami zwierzęcymi PD są modele oparte o podania neurotoksyn. Do najczęściej używanych należą MPTP (1-metylo-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropirydyny) (Langston, 2017) oraz 6-OHDA (6-hydroksydopamina) (Simola, Morelli, & Carta, 2007). W niektórych badaniach używa się również pestycydów i herbicydów (parakwat, rotenon), rzadziej rezerpiny, haloperidolu, amfetamin, czy pochodnych izochinoliny (Tieu, 2011).

MPTP jest neurotoksyną, która po przekroczeniu bariery krew-mózg zostaje przekształcona przez astrocyty w toksyczny metabolit, 1-metylo-4-fenylpirydynę (MPP⁺) (Meredith & Rademacher, 2011). MPP⁺ wiąże się w sposób nieodwracalny z transporterem dopaminowym (DAT), gdzie hamuje I kompleks łańcucha oddechowego i aktywność dehydrogenazy NADH. W konsekwencji prowadzi to do zaburzenia fosforylacji oksydacyjnej, obniżenia produkcji ATP i wzrostu syntezy wolnych form tlenu oraz oksydacyjnego uszkodzenia białek i DNA (Henchcliffe & Beal, 2008). W efekcie komórki kierowane są na drogę wewnętrznego szlaku apoptozy, zależnej od dysfunkcji mitochondriów i kaspaz (Meredith & Rademacher, 2011). Co ciekawe, wysoka toksyczność MPTP u ludzi i małp, odkryta przypadkowo w latach 80., nie przekłada się dawkozależnie na podobne efekty u gryzoni. Starszym modelem jest 6-hydroksydopamina (6-OHDA) (Ungerstedt, 1968). 6-OHDA jest analogiem dopaminy i noradrenaliny, którego transport do wnętrza neuronów odbywa się poprzez DAT i NET (transporter noradrenaliny), dzięki strukturalnemu podobieństwu tej toksyny do monoamin. 6-OHDA generuje stres oksydacyjny poprzez syntezę ROS (H₂O₂ i chinony) oraz hamowaniu kompleksu I łańcucha oddechowego, co prowadzi do uszkodzenia białek, jądra komórkowego oraz funkcji mitochondriów (Simola et al., 2007).

Podawanie neurotoksyn jest niewątpliwie skutecznym narzędziem w farmakologii, jednak głównym zastrzeżeniem takiego podejścia – poza kilkoma próbami przewlekłego podawania (Ossowska et al., 2005) – jest natychmiastowa śmierć neuronów, co w istotny sposób ogranicza możliwość obserwacji zmian molekularnych z nimi związanych, czyli z autentycznym, długim procesem neurodegeneracyjnym (Schober, 2004).

1.2.3. Modele genetyczne

Postęp w inżynierii genetycznej, jaki dokonał się w ciągu ostatnich dwudziestu lat, umożliwił powstanie wielu linii myszy transgenicznych, które wykorzystano jako alternatywne modele genetyczne różnych chorób neurodegeneracyjnych, w tym choroby Parkinsona. Wybór odpowiedniego, reprezentatywnego modelu choroby zależy od tego, czy model jest istotny pod względem trafności predykcyjnej (ang. *Predictive Validity*), trafności fasadowej (ang. *Face Validity*) lub trafności konstruktu (ang. *Construct Validity*). Pierwsze modele zwierzęce stworzone zostały w oparciu o trafność fasadową choroby, tj. odtworzenie objawów motorycznych występujących w PD. Nowe modele genetyczne i komórkowe są bardziej wszechstronne, starając się odzwierciedlić zarówno objawy behawioralne jak i ich neurochemiczne i molekularne podłoże choroby.

1.2.3.1. Modele oparte o modyfikacje genów związanych z dziedzicznymi formami PD

Jednym z najpopularniejszych są modele opierające się na mutacjach w genie kodującym α -Syn (*SNCA*, *PARK1/4*). Nadekspresja dzikiej formy α -Syn pozwala uzyskać zwierzęta z niektórymi motorycznymi symptomami, zmniejszeniem ekspresji TH i mniejszą ilością dopaminy oraz akumulacją α -Syn, jednak – co zaskakujące – brakiem degeneracji neuronów dopaminowych (Masliah et al., 2000; Richfield et al., 2002). Zmutowane formy α -Syn, jak A53T, czy A30P wykazują podobne symptomy PD, bez ubytku neuronów w SN/VTA (Ikeda et al., 2009; Oaks, Frankfurt, Finkelstein, & Sidhu, 2013). Mimo braku całkowitego odzwierciedlenia objawów PD możliwe było wyjaśnienie kilku ciekawych

kwestii o podłożu choroby. Do chwili obecnej zależności pomiędzy uwalnianiem do przestrzeni zewnątrzkomórkowej i oligomeryzacją α -Syn a procesem mitofagii pozostawały niewyjaśnione. Wykazano, że u zwierząt transgenicznych z nadekspresją zmutowanej α -Syn (A53T) dochodzi do inhibicji kompleksu I i zaburzenia funkcji mitochondriów wraz ze wzrostem ich degradacji na drodze autofagii (mitofagii) (Chinta, Mallajosyula, Rane, & Andersen, 2010). Inne modele genetyczne, jak nadekspresja LRRK2 (Ramonet et al., 2011), delecja Parkiny (Itier et al., 2003), delecja PINK1 (Kitada et al., 2007), delecja DJ-1 (M. S. Goldberg et al., 2005), czy delecja ATP13A2 (Schultheis et al., 2013) pozwalają na wygenerowanie linii transgenicznych, z charakterystycznymi cechami jak zależne od wieku zaburzenia motoryczne z łagodnymi deficytami dopaminy, lecz często brakiem degeneracji szlaku czarno-prążkowiowego, czy patologii Lewy'ego.

1.2.3.2. Rekombinacja zlokalizowana Cre/loxP w badaniach nad PD

Rekombinazy DNA są powszechnie stosowane w celu umożliwienia inwersji, delecji lub integracji transgenów w sposób specyficzny dla komórki. System tzw. rekombinacji zlokalizowanej Cre/loxP jest powszechnie stosowaną metodą, w której rekombinaza Cre rozpoznaje specyficzne palindromiczne miejsca loxP o długości 34 bp w sekwencji DNA (B. Gibb et al., 2010). Inwersja lub delecja za pośrednictwem Cre ma miejsce, gdy flankujące miejsca loxP są zorientowane odpowiednio w przeciwnych lub równoległych orientacjach. Co ważne, ekspresja rekombinazy Cre napędzana jest przez promotory specyficzne dla typu komórki, umożliwiając ukierunkowaną manipulację genami w docelowej populacji komórek (Madisen et al., 2012; Tanya Daigle et al., 2018). Ze względu na łatwość i wszechstronność tego systemu, wygenerowano setki różnych linii transgenicznych różnych gatunków zwierząt, gdzie Cre jest ekspresjonowane w różnych komórkach (Gong et al., 2007; Madisen et al., 2012; Tanya Daigle et al., 2018). Zależne od Cre genetyczne „przełączniki” FLEX (odwrotne wycięcie; znane również jako podwójnie odwrócona otwarta ramka odczytu) lub przełączniki DIO (ang. *Double-Inverted Open Reading Frame*) odwracają sekwencje DNA, aby umożliwić aktywację lub wyciszenie genów (Schnütgen et al., 2003). Podejście to jest szeroko stosowane w tzw. neuronaukach, umożliwiając specyficzną dla typu komórki aktywację optogenetyczną i chemogenetyczną, czy nadekspresję lub delecje genów (Erwin et al., 2020; Gong et al., 2007; Madisen et al., 2012). Połączenie obu tych systemów daje bardzo duże możliwości w osiągnięciu zamierzonych celów procesu transgenezy.

W oparciu o system Cre/loxP stało się możliwe modelowanie selektywnej, indukowanej śmierci neuronów dopaminowych. Wykorzystywane są w tym celu myszy, w których rekombinaza Cre znajduje się w neuronach ekspresjonujących DAT, czyli transporter dopaminowy. Dzięki działaniu systemu Cre/loxP wprowadzona mutacja ogranicza się tylko do komórek, w których rekombinaza Cre uruchomi mutację. Rozwinięciem systemu Cre/loxP jest system oparty o rekombinazę indukowaną CreERT2. W tym przypadku, rekombinaza Cre została połączona z domeną łączącą ligand zmutowanego receptora estrogenowego ERT2, co uniemożliwia przyłączenie endogennego liganda, estradiolu, jednak reaguje na tamoksyfen – syntetyczny ligand, którego podanie uruchamia proces rekombinacji (Donocoff, Teteloshvili, Chung, Shoulson, & Creusot, 2020). Dużą zaletą takiego podejścia jest indukcja śmierci neuronów dopaminowych już u dorosłych myszy, co lepiej odzwierciedla ludzką naturę PD. Pomimo obaw dotyczących specyficzności ekspresji Cre (Papathanou, Dumas, Pettersson, Olson, & Wallén-Mackenzie, 2019) i spontanicznej, niezależnej od tamoksyfenu rekombinacji („nieszczelności”) CreERT2 (Kristianto, Johnson, Zastrow, Radcliff, & Blank, 2017), te linie myszy okazały się niezwykle przydatne w badaniu funkcji wielu genów w neuronach dopaminowych.

Ponieważ mitochondrialna dysfunkcja jest powiązana z rozwojem PD i jej progresją, mutacje celowane w funkcjonowanie mitochondriów stały się celem modeli genetycznych odtwarzających ten aspekt PD. Jednym z modeli używanym w systemie Cre jest model myszy $Cox10^{DATCre}$, który cechuje się zaburzeniami funkcjonowania łańcucha oddechowego w neuronach dopaminowych, dzięki wycięciu

genu *Cox10* odpowiedzialnego za dojrzewania jednej z podjednostek katalitycznych kompleksu IV łańcucha oddechowego. Charakterystycznymi cechami tego modelu jest spadek liczby neuronów dopaminowych w SN/VTA i obniżenie poziomu dopaminy w prążkowie wraz z upośledzeniem funkcji ruchowych (Pinto et al., 2016). Innym ciekawym modelem są myszy MitoPark TFAM^{DATCre}, u których występuje uszkodzenie genu kodującego mitochondrialny czynnik transkrypcyjny A (TFAM), co doprowadza do niedoboru białek łańcucha oddechowego, a w konsekwencji degeneracji neuronów dopaminowych oraz spadku poziomu dopaminy w różnych strukturach mózgowia (prążkowie, pole brzuszne nakrywki, struktury korowe) wraz z wystąpieniem objawów motorycznych (Ekstrand et al., 2007). Uważa się, że myszy MitoPark są jednymi z pierwszych modeli genetycznych prezentujących większość kluczowych cech choroby Parkinsona, ponieważ zwierzęta te gromadzą wtręty wewnątrzneuronalne zawierające białka mitochondrialne i składniki błonowe. Co ciekawe, model ten pomimo bardzo wiernego odzwierciedlenia progresywnej sekwencji zmian neurodegeneracyjnych i parkinsonizmu u myszy, nie zawiera jednak α -Syn i nie prowadzi do powstania LB. Jednak nie wszystkie mutacje genetyczne wpływające na mitochondria skutkują wywołaniem degeneracji. Na przykład delekcja mitofuzyny 2, która reguluje fuzję zewnętrznego błony mitochondrialnej, w neuronach dopaminowych u myszy *Mfn2*^{DATCre} spowodowała fragmentację mitochondriów i niedobór łańcucha oddechowego, prowadząc do utraty dopaminergicznych projekcji aksonalnych wraz z obniżeniem poziomu dopaminy w prążkowie, ale przy braku degeneracji neuronów SN/VTA (S. Lee et al., 2012).

1.2.3.3. Modele oparte o ablację czynnika transkrypcyjnego TIF-IA

Czynnik transkrypcyjny TIF-IA jest istotnym czynnikiem regulującym aktywność polimerazy I w wybranych populacjach komórek neuronalnych. In vitro, ablacja czynnika TIF-IA prowadzi do dezintegracji funkcji jąderka i śmierci komórkowej na drodze apoptozy zależnej od białka p-53 (Yuan et al., 2005). Jąderko komórkowe, jako miejsce syntezy rRNA, stanowi istotny ośrodek regulacji różnych procesów zachodzących w odpowiedzi na stres komórkowy a zaburzenie jego funkcji może być również współwystępujące z rozwojem chorób neurodegeneracyjnych (Parlato & Kreiner, 2013). Usunięcie TIF-IA w dojrzałych neuronach wywołuje ich postępującą degenerację. Efekt ten został wykorzystany w dwóch stworzonych w ramach współpracy z German Cancer Research Center liniach myszy transgenicznych, TIF-IA^{DATCreERT2} i TIF-IA^{D1Cre}, gdzie gen kodujący czynnik transkrypcyjny TIF-IA był usuwany selektywnie odpowiednio z komórek dopaminowych rejonu SN/VTA (Rieker et al., 2011) oraz prążkowie (Kreiner et al., 2013a), co powodowało wierne odtworzenie sekwencji zmian neurodegeneracyjnych obserwowanych odpowiednio w chorobie Parkinsona i Huntingtona. Istotną cechą wszystkich modeli opartych o ablację TIF-IA jest wywołanie zmian o charakterze progresywnym, rozwijających się na przestrzeni kilku tygodni, co pozwala na rzeczywiste odzwierciedlenie kinetyki procesów neurodegeneracyjnych jak również daje możliwość badania ścieżek molekularnych zaangażowanych w ich rozwój. Przykładem linii transgenicznej, wykazującej indukowaną, progresywną śmierć neuronów dopaminowych i szereg zmian zbieżnych z PD jest model TIF-IA^{DATCreERT2}, w którym w neuronach ekspresjonujących DAT, warunkowo, po indukcji mutacji tamoksyfenem, dochodzi do delekcji genu kodującego czynnik transkrypcyjny TIF-IA (Parlato et al., 2008; Rieker et al., 2011). Model ten nie wykazuje co prawda ekspresji α -Syn i LB, jednak – co ciekawe – zaburzenia syntezy rybosomalnego RNA są obserwowane *post mortem* u chorych na PD. Badanie sekwencji zmian molekularnych w modelach opartych o delekcję TIF-IA dostarczyło zresztą wielu dowodów na zbieżność procesów prowadzących do śmierci komórkowej z danymi pochodzącymi z materiału klinicznego *post mortem* (G. Kreiner et al., 2013a; Rieker et al., 2011). Myszy TIF-IA^{DATCreERT2} są aktualnie wykorzystywane w naszym laboratorium w badaniach m.in. nad możliwościami neuroprotekcji w PD, co zostało niedawno wykazane pod wpływem nasilenia transmisji noradrenergicznej przez podawaną chronicznie reboksetynę, lek z grupy selektywnych inhibitorów wychwytu noradrenaliny (Kreiner et al., 2019).


1.2.3.4. Edycja genomu *in vivo* za pomocą somatycznej transgenezy

Edycję genomu komórek linii niegerminalnych u dojrzałego zwierzęcia przeprowadza się w procesie somatycznej transgenezy, gdzie nośnikiem danych najczęściej są wirusy rodziny parwowirusów (specyficzny wirus, to AAV, ang. *Adeno-Associated Viruses*) lub lentiwirusów (LV, specyficzny wirus HIV-1, ludzki wirus niedoboru odporności, ang. *Human Immunodeficiency Virus Type-1*). Oba typy wirusów umożliwiają ekspresję białek, shRNA, czy rekombinacje Cre/loxP oraz infekują niedzielące się neurony. Główną różnicą między tymi dwoma typami wirusów jest wielkość genomu, AAV umożliwiają użycie insertu o wielkości 4.2 kb, podczas gdy LV o wiele więcej, około 9 kb, co wiąże się również z możliwościami rozprzestrzenienia się w tkance mózgu. LV ze względu na dużą wielkość ograniczone są do miejsca podania, a AAV łatwo przemieszczają się w przestrzeni neuronalnej. Drugą różnicą jest możliwość integracji do genomu, AAV w odróżnieniu od LV pozostają episomalne, czyli nie są zintegrowane z genomem gospodarza (Grinevich et al., 2016). Wektory AAV zaliczane są do bezpiecznych i najmniej immunogennych wektorów wirusowych, lecz dane literaturowe sugerują, że zbyt duża liczba cząsteczek wektora może wywołać toksyczność w odpowiedzi na iniekcje obwodowe (Gernoux, Wilson, & Mueller, 2017), jak i domózgowe, gdzie jednak efekt neurotoksyczny jest zależny od dawki (Lavin, Jin, Lea, & Wickersham, 2020). Wysokie miano AAV powoduje zaburzenia w naczyniach mózgowych krwionośnych oraz wpływa na infiltrację miejsca podania przez limfocyty (w większości cytotoksyczne limfocyty T) (Guo et al., 2023), a także może skutkować nabyciem przez niego właściwości transportu antero-, retro- bądź transynaptycznego (Haery et al., 2019). Użycie lentiwirusów do wyciszania genów w komórkach postmitotycznych zostało dokładnie opisane. Zarówno wektory AAV jak i LV są szeroko stosowane w badaniach związanych z PD zarówno do modelowania choroby jak i do dostarczenia czynników terapeutycznych. Przykładowo, dostarczanie poprzez AAV nadekspresji α -Syn jest popularną i skuteczną metodą wygenerowania różnych modeli tej choroby. Szeroko opisywane są dysfunkcje związane z PD wywołane przez ten sposób generacji mutantów obejmujące zmiany neurochemiczne prądkowia, biochemiczne α -Syn i behawioralne wynikające z ekspresji α -Syn w śródmózgowiu za pośrednictwem AAV (Huntington & Srinivasan, 2021). Również mutageneza za pośrednictwem LV ma duży udział w badaniach PD. Dzięki tej metodzie możliwe było zbadanie neuroprotektynnego potencjału GDNF (ang. *Glial Cell-Line Derived Neurotrophic Factor*). Wektory lentiwirusowe wyrażające regulowany GDNF zostały dostarczone do prądkowia szczurów, aby umożliwić włączenie ekspresji GDNF w dwóch punktach czasowych - podczas degeneracji układu nigrostriatalnego lub po całkowitym uszkodzeniu tego układu przez 6-OHDA. W grupie zwierząt, u których ekspresja GDNF była włączona podczas degeneracji, pozostałe neurony zostały ochronione przed degeneracją i nastąpiło odwrócenie deficytów motorycznych. Aktywacja ekspresji GDNF po uszkodzeniu układu nigrostriatalnego nie uratowało neuronów ani nie odwróciło deficytów motorycznych (Quintino et al., 2018). Co sugeruje potencjał tego czynnika troficznego w badaniach neuroprotektynnych (Chmielarz et al., 2020; Er & Airavaara, 2023).

1.2.4. Mysie modele podań preformowanych włókien α -Syn (PFF)

Innym sposobem modelowania choroby Parkinsona, jest domózgowe lub ogólnoustrojowe podawanie preformowanych włókien α -Syn (*α -Syn Pre-Formed Fibrils*, PFF) lub ekstraktów mózgowych zawierających ciała Lewy'ego pochodzących od pacjentów z chorobą Parkinsona. PFF są generowane egzogenicznie z rekombinowanych monomerów α -Syn. Podanie PFF do prądkowia u myszy powoduje pojawienie się w mózgu agregatów podobnych do LB w obszarach połączonych anatomicznie, które również odpowiadają obszarom dotkniętym u ludzi chorych na PD. Jednakże, w tym modelu obserwujemy tylko bardzo niewielką śmierć neuronów dopaminowych i to tylko po bardzo długim czasie od podań PFF. Obserwowane objawy motoryczne są również bardzo słabo wyrażone. Co znacząco utrudnia zastosowanie modelu w badaniach substancji neuroprotektynnych i wskazuje na

potencjalny udział dodatkowego czynnika lub czynników w patogenezie choroby Parkinsona. (Airavaara et al., 2020). W naszym laboratorium Zakładu Biochemii Mózgu Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN, z powodzeniem stosujemy i udoskonalamy myszy model domózgowych podań PFF, a także poszukujemy nowych, obiecujących farmakoterapii, które mogą ograniczyć akumulację i rozprzestrzenianie się α -Syn (Alwani et al., 2023). Podania PFF do prądkowia skutkują w akumulacji patologicznej formy α -Syn nie tylko w substancji czarnej, ale również w innych strukturach mózgowych, w tym miejscu sinawym.



| iPSC od pacjentów | linie komórkowe / pierwotne neurony | modele farmakologiczne | modele genetyczne | indukowana synucleinopatia |
|---|--|--|--|----------------------------|
| WYBRANE ZALETY MODELI CHOROBY PARKINSONA | | | | |
| ludzkie komórki / tło genetyczne | szybkie / powtarzalne / niskie koszty | możliwe obserwacje behawioralne | | |
| łatwe do manipulacji i badań mechanizmów | | bardzo dobrze poznane / bogata bibliografia | możliwe modelowanie niemotorycznych objawów | |
| uproszczony system komórkowy - łatwy do interpretacji | | możliwe do obserwacji interakcje skomplikowanych układów komórkowych i badań ich funkcji | | |
| WADY MODELI CHOROBY PARKINSONA | | | | |
| koszty generacji | linie komórkowe - zmienność genetyczna | zwiększone modele nie odzwierciedlają całkowicie patologii u ludzi | | |
| uproszczony system komórkowy - nie odzwierciedla złożonych komórkowych połączeń | | brak progresywnego charakteru PD | złożony system neuronalny uniemożliwia ograniczenie zmian patologicznych do wybranej populacji komórek | |
| sztuczny system komórkowy - warunki hodowli nie odzwierciedlają mikrośrodowiska w mózgu | | konieczność generowania kohort zwierząt i grup o wystarczającej liczebności do badań | | |

Ryc. 6. Wyszczególnione wady i zalety danego modelu choroby Parkinsona. iPSC – induced pluripotent stem cells; PFF – α -Synuclein preformed fibrils

1.3. System edycji genów CRISPR/Cas9

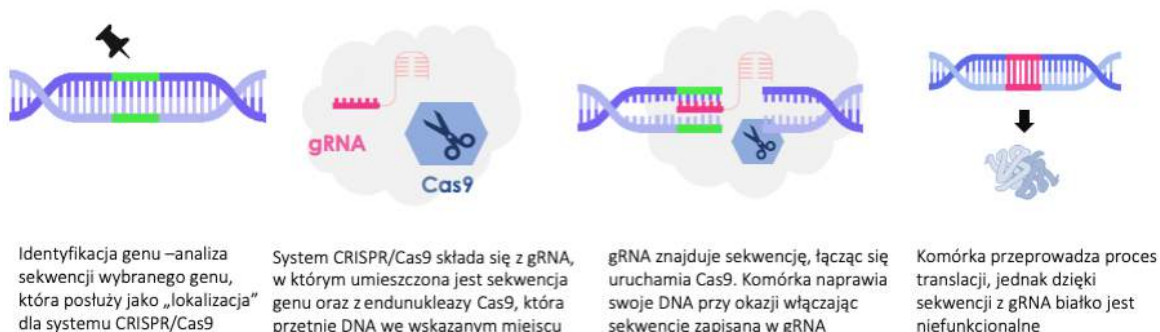
Rozwój biotechnologii w XXI wieku dramatycznie zwiększył szybkość i wydajność, z jaką można wygenerować zwierzęta transgeniczne. Nukleazy z motywem palca cynkowego (ZFN, ang. *Zinc finger nucleases*), białka TALEN (ang. *TALE Nuclease*), a ostatnio również system CRISPR (ang. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) - Cas (ang. *CRISPR-Associated*) to trzy nowe, skuteczne i efektywne technologie edycji genów. Metody te wykorzystują naturalne mechanizmy naprawy DNA w celu wprowadzenia zmian, podstawienia pojedynczych nukleotydów, czy delecje dużych segmentów DNA. W przeciwieństwie do tradycyjnych podejść do edycji DNA za pośrednictwem nukleazy, ZFN i TALEN, rozpoznawanie DNA przez system CRISPR/CAS9 zachodzi przez 20-nukleotydowe sekwencje RNA, a nie duże białka (Doudna & Charpentier, 2014a).

W 2020 roku nagrodę Nobla w dziedzinie chemii za pracę nad CRISPR/Cas9, metodą edycji DNA, otrzymały dwie badaczki: Emmanuelle Charpentier i Jennifer Doudna. Komitet Noblowski nagrodził te dwie naukowczynie za przełomowe odkrycie możliwości szybkiego i efektywnego przekształcania układu odpornościowego drobnoustrojów w narzędzie do edycji genów, które charakteryzuje się dużą precyzją (Westermann, Neubauer, & Köttgen, 2021). Odkrycie potężnego narzędzia do edycji genów CRISPR/Cas9 jest uznawane za jeden z najważniejszych kamieni milowych dekady w dziedzinie biotechnologii a nawet i w szerszym aspekcie podstawowych nauk medycznych.

Ze względu na łatwość użycia, skuteczność, opłacalność i możliwość edycji wielu genów jednocześnie, CRISPR/Cas9 wydaje się być obecnie najbardziej obiecującą technologią edycji genów (Castro, Bjelic, Malhotra, Huang, & Alsaffar, 2021). Społeczność naukowa jest całkowicie zaskoczona eksplozją badawczą, którą wywołała ta metoda i pokłada w tej technice wielkie nadzieje, związane również z potencjalnym wykorzystaniem w przyszłości systemu CRISPR/Cas9 w terapiach genetycznych chorób uznawanych dotychczas za nieuleczalne.

1.3.1. CRISPR/Cas9 – mechanizm działania

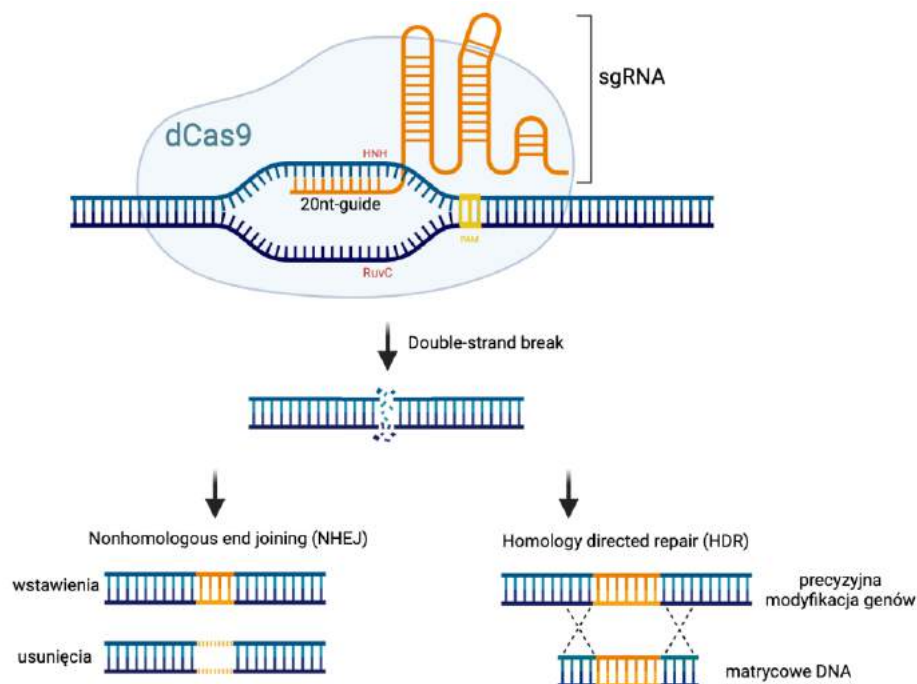
Historia odkrycia CRISPR sięga początków lat dwutysięcznych. Pierwsze doniesienia mówią o odkryciu tego układu w naturze, w genomach wielu prokariota. CRISPR/Cas to mechanizm odporności nabytej prokariota, który ewoluował w celu identyfikacji i zniszczenia kwasu nukleinowego gatunków inwazyjnych, takich jak fagi, wirusy, archeony i inne (Barrangou et al., 2007; Sorek, Kunin, & Hugenholtz, 2008). Różnorodność tego systemu jest bardzo duża, obejmuje sześć typów enzymów Cas (I-VI) i co najmniej 29 podtypów (Koonin, Makarova, & Zhang, 2017). Najlepiej zbadaną i poznaną, a także najbardziej atrakcyjną platformą do zastosowań w edycji genów jest system CRISPR typu II, składający się z endonukleazy Cas9, bakteryjnego RNA CRISPR (crRNA) i transaktywującego crRNA (tracrRNA) (Jiang & Doudna, 2017). Nucleaza Cas9 kierowana przez crRNA w połączeniu z pełniącym funkcje rusztowania tracrRNA rozcina DNA w precyzyjnie wybranym miejscu genomu. Dodatkowa specyficzność jest zapewniana przez obecność motywu PAM (ang. *Protospacer Adjacent Motif*), będącego regionem w obrębie inwazyjnego DNA, który pomaga bakteriom w odróżnianiu szkodliwego materiału genetycznego od własnego. Jeśli sekwencja jest homologiczna do crRNA oraz zawiera odpowiednio oddalony motyw PAM, system CRISPR/Cas9 celuje w obcy materiał genetyczny poprzez indukcję dwuniciowych pęknięć helisy DNA (DSB, ang. *Double-Strand Break*) (Garneau et al., 2010). Motywy PAM składają się z kilku nukleotydów (zazwyczaj 2-5) i różnią się od siebie w zależności od typu systemu CRISPR/Cas (Mojica, Díez-Villaseñor, García-Martínez, & Almendros, 2009). Wykazano konieczność występowania PAM na końcu tzw. sekwencji *protospacer* (krótki fragment pochodzący z wirusowego lub plazmidowego DNA) dla systemu CRISPR typu II, udowadniając, że mutacje fagowego DNA w obrębie sekwencji PAM pozwalają wirusowi uniknąć inaktywacji przez system obronny gospodarza (Deveau et al., 2008). Również brak motywu PAM w obrębie powtórzeń prostych w genomie bakterii chroni ich DNA przed hydrolizą przez CRISPR/Cas (Westra et al., 2013). Te odkrycia zainspirowały naukowców do dalszego zgłębiania tematu, co ostatecznie doprowadziło do wniosków, że system CRISPR/Cas9 można zastosować jako skuteczne narzędzie do edycji genomu różnych organizmów. Obecnie technika ta dostarcza nowych narzędzi do szerokiego zakresu manipulacji genetycznych, w tym mutacji punktowych, delecji i insercji małych i dużych segmentów DNA do genomu, aktywacji i inaktywacji genów w oparciu o CRISPR (Khatibi, Sahebkar, & Aghaee-Bakhtiari, 2021).



Ryc. 7. Uproszczony schemat działania sgRNA oraz endonukleazy Cas9.

Stosowany narzędziowo system CRISPR/Cas9 składa się z dwóch głównych komponentów: (i) Cas9 - endonukleazy, która indukuje powstawanie DSB w DNA w specyficznej, wybranej lokalizacji oraz (ii) sgRNA (ang. *Single Guide RNA*) – będącym połączeniem crRNA (ang. *CRISPR RNA*) i tracrRNA (ang. *Trans-Activating CRISPR RNA*), który nakierowuje Cas9 w docelowe miejsce i gwarantuje precyzyjne i swoiste edytowanie genomu (Doudna & Charpentier, 2014b; Jinek et al., 2012). Cas9 zawiera dwie domeny nukleazowe, HNH i RuvC, z których każda przecina jedną nici docelowego dwuniciowego DNA (Jinek et al., 2012). Nukleaza Cas9 i sgRNA łączą się, tworząc rybonukleoproteinę Cas9 (RNP), która może przyłączać się do określonego miejsca w DNA. Do wiązania białka Cas9 z docelowym DNA niezbędna jest również obecność sekwencji PAM (Ran et al., 2013). Białko Cas9 z bakterii *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) jest najczęściej używanym i zbadanym białkiem w technologii CRISPR/Cas9. Motywem PAM dla tej nukleazy jest najczęściej kanoniczny PAM NGG, a następnie niekanoniczny PAM NAG (gdzie N oznacza dowolny nukleotyd) (Ran et al., 2013).

Pierwszym krokiem do wprowadzenia modyfikacji w wybranym miejscu w genomie jest zaindukowanie powstania DSB w tym rejonie, które mogą być naprawione w dwóch typach procesu rekombinacji: łączenie niehomologicznych końców DNA (NHEJ, ang. *Non-homologous End Joining*) oraz rekombinacja homologiczna (HDR, ang. *Homology-Directed Repair*) (Ryc. 8). W post-mitotycznych komórkach najczęściej dwuniciowe pęknięcia są naprawiane przez NHEJ, w wyniku czego może dojść do powstania w tym miejscu mutacji typu indel (insercja/delecja). Mutacje te wprowadza się w sekwencji kodującej docelowe białko, ponieważ mogą doprowadzić do przesunięcia ramki odczytu genu (ORF, ang. *Open Reading Frame*) i pojawienia się przedwczesnych kodonów STOP (PSC, ang. *Premature Stop Codon*), które kończą translację białka. Mimo przebiegu dalszej transkrypcji bez zakłóceń, nie powstanie funkcjonalne białko. Zwykle również nie zostanie wytworzony skrócony (do miejsca występowania PSC) peptyd, ponieważ w komórce mRNA są usuwane w procesie degradacji transkryptów niosących przedwczesny kodon stop (Ceccaldi, Rondinelli, & D'Andrea, 2016). Drugą metodą rekombinacji jest rekombinacja homologiczna, HDR, który zachodzi, jeżeli w pobliżu znajduje się matryca naprawcza zawierające sekwencje komplementarną do miejsca, w którym doszło do pęknięcia nici DNA. Mechanizm ten może być wykorzystany do wprowadzenia ściśle określonych zmian w danym miejscu DNA, jak mutacji punktowych, insercji (np. wprowadzenie fragmentu sekwencji do innej sekwencji kodującej białko czy zastąpienie fragmentu DNA miejscem kodującym gen markerowy) czy dokładnie zdefiniowanych precyzyjnych delecji (np. usunięcie sekwencji kodującej fragment białka). Szlak NHEJ jest w komórkach post-mitotycznych, takich jak neurony, bardziej rozpowszechniony niż HDR, ponieważ jest aktywny przez około 90% cyklu komórkowego i nie jest zależny od powiązanego dawcy homologii (matrycy donorowej). Ponadto, wykorzystując kilka sgRNA ukierunkowanych na jeden lub więcej genów, w razie potrzeby można osiągnąć delecję dużych fragmentów i równoczesne usunięcie wielu genów (Cong et al., 2013).



Ryc. 8. Mechanizm edycji genomu CRISPR/Cas9. sgRNA kieruje endonukleazę Cas9 do wybranej sekwencji genomu, według zdefiniowanej przez naukowców 20-nt sekwencji prowadzącego do konkretnego miejsca na RNA. Indukowane przez nukleazy pęknięcia dwuniciowe (DSB) można naprawić poprzez mechanizmy łączenia niehomologicznych końców (NHEJ) lub rekombinacji homologicznej (HDR).

1.3.2. Zastosowanie CRISPR/Cas9 w modelach genetycznych choroby Parkinsona

Obecnie technologia CRISPR/Cas9 jest powszechnie używana w badaniach naukowych, między innymi do tworzenia nowych modeli komórkowych i zwierzęcych z pożądanymi mutacjami, delecjami lub podstawieniami w konkretnej lokalizacji w genomie (Yoshimi et al., 2021; J. P. Zhang et al., 2017), do śledzenia biologicznych procesów komórkowych (Hong, Lu, Duan, Liu, & Zhang, 2018; Ma et al., 2016), do wielkoskalowych badań funkcjonalnych (CRISPR screening) (Tian et al., 2019), czy jak również w badaniach przedklinicznych oraz potencjalnych terapiach dla wielu chorób o podłożu genetycznym (M. Chen et al., 2019; Savić & Schwank, 2016). W dziedzinie chorób neurodegeneracyjnych technologia CRISPR/Cas9 stwarza ogromne możliwości, zarówno na polu tworzenia lepszych modeli badawczych, wielogenomowych badań przesiewowych, czy opracowywania nowych podejść terapeutycznych. Jednym z korzyści stosowania CRISPR jest możliwość wykorzystania ludzkich hodowli neuronalnych uzyskanych z iPSC, w których duży udział w poprawie reprogramowania fibroblastów w neurony miało zastosowanie metody CRISPR (Black et al., 2016). Wykorzystanie systemu CRISPR i przekształcenia iPSC do neuronów zaowocowało wykorzystaniem tych technik do badań choroby Parkinsona (Ahfeldt et al., 2020; Chang et al., 2021; Y. Chen et al., 2019; Kantor et al., 2018; Kuzumaki et al., 2019; Langley et al., 2018; Mahato et al., 2020; Neal et al., 2018; Obara et al., 2017; Potting et al., 2017; Pu et al., 2020; Soldner et al., 2016; Suda et al., 2018; Vermilyea et al., 2020; Vetchinova et al., 2018; Haibo Zhou et al., 2020; W. Zhou et al., 2019).

Modele zwierzęce choroby Parkinsona wygenerowane dzięki CRISPR obejmują różne gatunki kręgowców i bezkręgowców. Zostały wykonane badania na muszkach owocówkach, modelu delecji genu *Pink1* (Ham et al., 2021), czy delecji *Tango14*, jako nowego genu asocjacyjnego z PD i zmianami metabolizmu lipidów (Xue et al., 2022). Danio Pręgowane również jest dobrym modelem PD, w delecji genu *Dj-1*. Wykazano cechy choroby Parkinsona, jak obniżony poziom TH, czy dysfunkcje mięśni szkieletowych (Edson et al., 2019), a badania proteomiczne ujawniły obniżenie białek związanych z metabolizmem mitochondriów, autofagią, odpowiedzią stresową, regulacją redox i odpowiedzią

przeciwzapalną (Hughes et al., 2020). Jednym z najczęściej używanych zwierząt do modelowania PD są myszy. Dzięki technice CRISPR zbadano nowe geny z badań asocjacyjnych jako powiązane z PD i odzwierciedlające cechy choroby u zwierząt. PNPLA9, enzym hydrolityczny, może preferencyjnie hydrolizować peroksydowane fosfolipidy, spowodowane w procesie ferroptozy. U myszy wyeliminowanie *Pnpla9* spowodowało progresywne zaburzenia motoryczne i akumulację peroksydowanych fosfolipidów (Sun et al., 2021). Naukowcy również wygenerowali model myszy zwany MCI-Park w celu wytworzenia neuronów dopaminowych pozbawionych *Ndusf2*, który koduje kompleks mitochondrialny I. Zwierzęta z delecją NDUSF2 wykazywały zmiany neurodegeneracyjne (González-Rodríguez et al., 2021). Wyciszenie *Cdk5* u myszy skutkowało defektem aktywności motorycznej i zakłóceniami w zachowaniu równowagi aktywności/spoczynku. Liczba i długość dendrytów i funkcjonalnych synaps w mózgu mutantów uległa zmniejszeniu (Hu Zhou et al., 2022). Stworzono również kilka linii transgenicznych szczurzych mutantów, pierwszy raz używając CRISPR w mózgu szczurów, które posiadają Cre w neuronach ekspresjonujących DAT, co czyni je przygotowane do selektywnych mutacji, jak w opisywanych przeze mnie badaniach w niniejszej rozprawie doktorskiej (Bäck et al., 2019). Interesujące jest w ostatnich latach zainteresowanie wytwarzaniem modeli transgenicznych zwierząt dużych, które mają więcej wspólnych cech z ludzkimi, jak chociażby wielkość mózgu u świni, czy emocjonalne i poznawcze zdolności jak u ssaków naczelnych (Weili Yang, Chen, Li, & Li, 2021). U wielu większych modeli, które działały funkcjonalnie u gryzoni (w pewnym stopniu naśladowały cechy PD) nie powiodły się próby odwzorowania choroby Parkinsona. Modele miniaturowych świń gatunku Bama z mutacjami nonsensownymi *Snca* (p.E46K, p.H50Q, p.G51D) nie wykazały fenotypu specyficznego dla PD, takich jak utrata neuronów dopaminowych w istocie czarnej (Zhu, Zhong, Ge, Lu, & Lu, 2018). Podwójne tzw. knock-outy *Park2* i *Pink1* u świń, podobnie jak w modelu mysim, nie wykazywały żadnych klinicznych objawów choroby Parkinsona (X. Zhou et al., 2015), jak również potrójne knock-outy (*Parkin*, *Dj-1* i *Pink1*) nie wykazały fenotypu parkinsonowskiego (X. Wang et al., 2016). Natomiast, delecja *Pink1* u naczelnych skutkowała wysoką śmiertelnością i ciężką neurodegeneracją, co powiązано z fizjologicznie niskim poziomem ekspresji tego genu u ssaków naczelnych (Weili Yang, Li, & Li, 2019). Wykorzystano tą cechę w kolejnych badaniach, gdzie za pomocą wektora AAV podanego bezpośrednio do mózgu małpy dostarczono CRISPR/Cas9 wyciszający *Pink1* i *Dj-1*, co skutkowało zaawansowaną degeneracją neuronów dopaminowych i akumulacją α -synukleiny (H. Li et al., 2021). Warto podkreślić, że naukowcy coraz chętniej sięgają po narzędzia CRISPR w modelowaniu chorób neurodegeneracyjnych. Spektrum badań jest szerokie, natomiast brak w nich skupienia się na objawach pozamotorycznych, stawiając głównie na analizę typowych zmian PD, jak ubytek neuronów dopaminowych, obecność stanu zapalnego czy typowy ruchowy behavior.

Ciekawym wykorzystaniem narzędzi CRISPR do przygotowywania potencjalnych terapii są próby uzupełnienia degenerujących neuronów dopaminowych, nowymi, przeprogramowanymi z astrocytów. Przeprowadzono konwersję astrocytów na neuronalne GABAergiczne za pomocą CRISPR knock-in, wprowadzając za pomocą AAV do prądkowia modelowej myszy z indukowaną 6-OHDA formą PD nadekspresję kilku czynników transkrypcyjnych, uzyskując poprawę objawów ruchowych (Giehl-Schwab et al., 2022). Wytypowano również kilka innych potencjalnych ścieżek takich przemian (Aravantinou-Fatorou & Thomaidou, 2020; Papadimitriou et al., 2023).

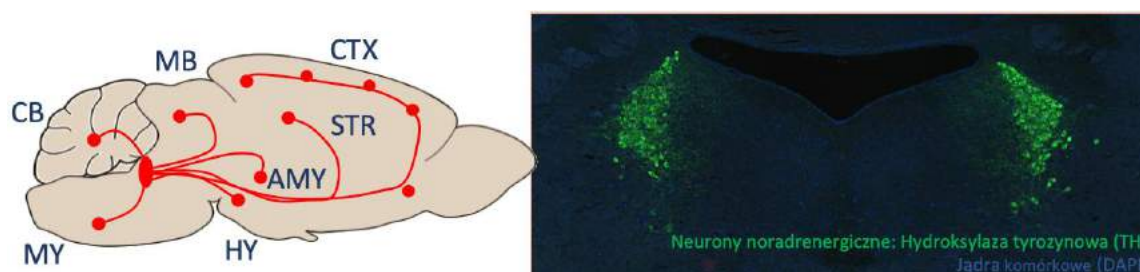
1.4. Układ noradrenergiczny w chorobie Parkinsona

Noradrenalina (NA; inaczej norepinefryna, NE) zidentyfikowana została już w latach 40. XX w. jako neurotransmitter w nerwach współczulnych ssaków. Należy do grupy amin katecholowych. Jej prekursonem jest tyrozyna, która poprzez hydroksylazę tyrozynową (TH) oraz dekarboksylazę L-aminokwasów aromatycznych (AADC) przekształcana jest w dopaminę. Następnie enzym β -hydroksylaza dopaminowa (DBH) katalizuje ostatni etap powstawania noradrenaliny. Noradrenalina jest neurotransmiterem działającym w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym. Syntetyzowana

jest w mózgu, w zazwojowych włóknach współczulnych oraz komórkach chromochłonnych rdzenia nadnerczy (Aston-Jones & Waterhouse, 2016).

NA jest magazynowana w wolnej formie w pęcherzykach ziarnistych w pozazwojowych zakończeniach nerwowych z których jest uwalniana praktycznie natychmiastowo w odpowiedzi m.in. na stres (Seki, Yoshida, & Jaiswal, 2018), oraz w większych pęcherzykach w połączeniu z różnymi związkami stabilizującymi, takimi jak chromogranina A (Dimsdale, O'Connor, Ziegler, & Mills, 1992). Uwolniona NA działa w przestrzeni synaptycznej łącząc się z receptorami adrenergicznymi typu α ($\alpha 1$ i $\alpha 2$) oraz $\beta 1$ (na które działa również adrenalina). Ilość przekaźnika w przestrzeni synaptycznej jest precyzyjnie regulowana; jego nadmiar jest usuwany albo poprzez wychwyty zwrotny, albo w wyniku inaktywacji przez enzym monoaminooksydazę typu A (MAO-A) (Aston-Jones & Waterhouse, 2016; Chandler, Gao, & Waterhouse, 2014).

Głównym, gęsto upakowanym (ok. 1600 komórek w mózgu gryzoni) skupiskiem neuronów noradrenergicznych jest jądro miejsca sinawego (LC), położone w grzbietowo-rostralnej części mostu. Zawiera ono ponad połowę wszystkich komórek, które uwalniają NA do mózgu. Stąd wychodzi większość aksonów pęczka grzbietowego i włókien dochodzących do mózdzku. Drogi noradrenergiczne z LC projektują na cały mózg, a aksony komórek noradrenergicznych są mocno rozgałęzione - pojedynczy neuron posiada do 250 tysięcy synaps, co pokazuje istotę i duże zapotrzebowanie na wydzielanie noradrenaliny w mózgu (Samuels & Szabadi, 2008). Neurony LC projektujące do przodomózgowia (hipokamp i septum) leżą w grzbietowej części miejsca sinawego, a neurony projektujące do mózdzku i rdzenia kręgowego położone są bardziej brzusznie. Zaobserwowano również organizację neuronów w osi przednio-tylnej, gdzie neurony zlokalizowane z przodu LC dają projekcje do podwzgórza, z tyłu do wzgórza, a rozproszone neurony w całej objętości LC projektują do kory i ciała migdałowatego. Naukowcy również zauważyli, że neurony noradrenergiczne projektujące do różnych struktur różnią się od siebie morfologią (Aston-Jones & Waterhouse, 2016; Poe et al., 2020).



Ryc. 9. Projekcje noradrenergiczne z LC przedstawione schematycznie w mózgu myszy. Kora nowa: cortex (CTX), prążkowie: striatum (STR), podwzgórze: hypothalamus (HY), ciało migdałowate: amygdala (AMY), śródmózgowie: midbrain (MB), mózdzek: medulla (MY), and cerebellum (CB). Wybarwione LC w mózgu myszy przy użyciu przeciwciała przeciwko hydroksylazy-hydrozynowej (TH, ang. *Tyrosine Hydroxylase*). Zdjęcie i grafika autorskie.

Dzięki tym bogatym projekcjom, LC odpowiadając na różne sensoryczne stymulacje moduluje aktywność neuronalną w ważnych ośrodkach mózgowych powodując różne behawioralne konsekwencje. Jego aktywację mogą powodować stresory fizyczne (np. hipoglikemia, spadek ciśnienia krwi, objętości krwi, zaburzenia termoregulacji) oraz stresory psychologiczne. Miejsce sinawe, oprócz produkcji noradrenaliny pełni rolę w regulacji stopnia pobudzenia mózgu, fazy snu REM i w niektórych funkcjach autonomicznych (np. termoregulacji). Włókna aferentne unerwiające LC są bardzo zróżnicowane. Zawierają opiaty, glutaminian, GABA, serotoninę, adrenalinę, histaminę, peptyd oreksynę/hipokretynę. Uważa się, że LC otrzymuje projekcje z nawet 111 różnych struktur, głównie

znajdujących się w pniu mózgu i przodomózgowiu (Schwarz et al., 2015). Na komórkach LC występują również autoreceptory, głównie $\alpha 2$ -adrenergiczne ($\alpha 2$ -AR), dlatego neurony te odpowiadają również na uwolnienie noradrenaliny (Maletic, Eramo, Gwin, Offord, & Duffy, 2017; McKinney et al., 2023).

NA zwiększa pobudzenie i czujność, wspiera czuwanie, uwydatnia zapamiętywanie i przypomnienie sobie oraz umożliwia koncentrację, a także zwiększa niepokój i lęk, którego nadmiar prowadzi do zaburzeń lękowych. Mechanizm wychwytu zwrotnego NA, a w konsekwencji zwiększenie dostępności neuroprzekaźnika w szczelnie synaptycznej, jest wykorzystywany w terapii przeciwdepresyjnej za pomocą wielu leków (np. dezipramina). Z kolei agoniści $\alpha 2$ -AR są często stosowani jako środki uspokajające i wzmacniające anestezję przy operacjach, jak również w leczeniu uzależnienia alkoholowego i narkotykowego (Hussain, Reddy, & Maani, 2023; Maletic et al., 2017).

1.4.1. Znaczenie uszkodzenia systemu noradrenergicznego we wczesnej fazie choroby parkinsona

Pomimo wspomnianych już wcześniej dowodów klinicznych na istnienie korelacji pomiędzy układami noradrenergicznym a dopaminowym w PD (Heiko Braak et al., 2004), popartych również eksperymentami prowadzonymi na małpach (Masilamoni, Groover, & Smith, 2017), jak dotychczas podjęto bardzo niewiele prób badania długotrwałego wpływu degeneracji noradrenergicznej na funkcjonowanie układu dopaminowego, przede wszystkim z braku odpowiednich modeli zwierzęcych. Klasyczne podejście farmakologiczne polegające na wywołaniu lezji noradrenergicznej przez DSP-4 dostarczyło wprawdzie dowodów na kontrolowanie przez układ noradrenergiczny uwalniania dopaminy w prążkowie, ale nie przyniosło rozstrzygnięcia, prawdopodobnie z powodu funkcjonalnej odwracalności lezji (Srinivasan & Schmidt, 2004). Istnieją dane podkreślające neuroprotekcyjną rolę NA, wskazujące na dużą zależność pomiędzy poziomem NA w mózgu, a podatnością na neurotoksyny, które wykorzystywane są do modelowania PD u myszy (Kadoguchi et al., 2014; Karen S. Rommelfanger, Weinshenker, & Miller, 2004; Srinivasan & Schmidt, 2003). Badano także oddziaływanie mirtazapiny (leku przeciwdepresyjnego, który jest antagonistą receptorów $\alpha 2$ -AR i receptorów serotoninowych 5-HT₂, 5-HT₃ oraz agonistą 5-HT_{1A}, co w efekcie prowadzi do nasilenia neuroprzekaźnictwa noradrenergicznego i serotonergicznego w ośrodkowym układzie nerwowym) i wykazano poprawę motoryki zwierząt w modelu MPTP (Kadoguchi et al., 2014).

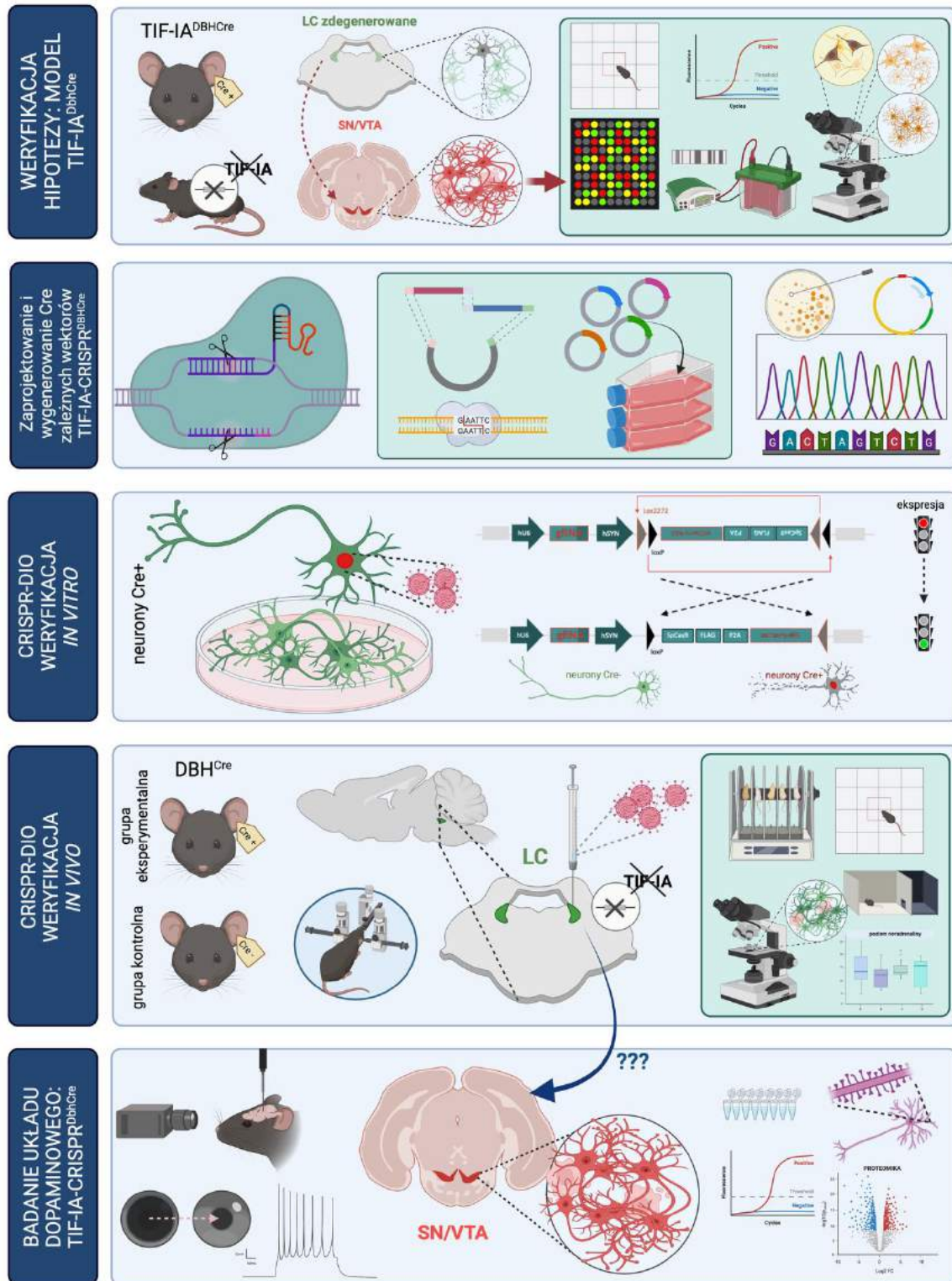
Pojawiła się również propozycja, że noradrenalina może służyć jako mechanizm kompensacyjny w neurodegeneracji dopaminergicznej w PD (K. S. Rommelfanger & Weinshenker, 2007), potwierdzona przez badania nad genetycznym, mysim modelem parkinsonizmu opartym o uszkodzenie mitochondrialne DNA w neuronach dopaminowych. Badania te wykazały, że wzrost poziomu noradrenaliny był bezpośrednio powiązany z utratą komórek dopaminowych (Pickrell, Pinto, & Moraes, 2013). Zdolność noradrenaliny do kompensowania (przynajmniej w pewnym stopniu) utraty komórek dopaminowych została również potwierdzona w naszych eksperymentach z reboksetyną (wysocze selektywnym inhibitorem wychwytu zwrotnego NA), przeprowadzonych na modelu transgenicznym TIF-IA^{DATCreERT2} (Kreiner et al., 2019). Myszy zmutowane po podaniach reboksetyny wykazywały dłużej utrzymujące się zdolności motoryczne w teście Rotarod a tempo spadku liczby neuronów dopaminowych w SN/VTA oraz obniżenie poziomu dopaminy w prążkowie uległo zahamowaniu (Kreiner et al., 2019).

Badania nad wczesną fazą PD są bardzo istotne, choć nie zawsze doceniane. Rozpoznanie wczesnych mechanizmów prowadzących do postępującej śmierci neuronów już w późniejszej fazie PD, powinno umożliwić lepszy punkt wyjścia dla poszukiwania markerów diagnostycznych PD na etapie prodromalnym oraz odpowiednio wczesne wdrożenie ew. terapii neuroprotekcyjnych. Choćby nawet nie spowodowało to wynalezienie remedium na chorobę, może przyczynić się do spowolnienia jej rozwoju i utrzymania jak najdłużej w bezobjawowej formie (Kreiner, 2015). Poza tym, potencjalne

terapię przyczynowe miałyby największe szanse na wykazanie skuteczności właśnie na bardzo wczesnych etapach PD (Chmielarz & Saarma, 2020).

Bezpośrednią inspiracją do podjęcia opisanych w niniejszej pracy badań były wnioski wyciągnięte z naszej poprzedniej pracy, gdzie dokonano pozytywnej weryfikacji hipotezy o potencjalnie neuroprotektoryjnej roli noradrenaliny w PD (Kreiner et al., 2019). W ramach kontynuacji tego tematu zdecydowaliśmy się na podjęcie badań nad możliwym, odwrotnym efektem, wywołanym przez neurodegenerację układu noradrenergicznego. Początkowo, prowadząc badania na modelu opartym o konstytutywną delecję TIF-1A w neuronach noradrenergicznych, a po otrzymaniu wstępnych, obiecujących danych, przystępując do stworzenia w oparciu o system edycji genów CRISPR/Cas9 modelu z postępującą, selektywną degeneracją LC.

Graficzne podsumowanie projektu



2. Cele pracy

Punktem wyjścia do niniejszej pracy była tzw. teoria Braaka o sekwencyjnym rozwoju poszczególnych faz neurodegeneracji w chorobie Parkinsona (PD) oraz wcześniejsze badania przeprowadzone w Zakładzie Biochemii Mózgu Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN, dokumentujące pozytywny wpływ stymulacji przekąźnictwa noradrenergicznego w transgenicznym, mysim modelu parkinsonizmu (linia TIF-IA^{DATCreERT2}).

Weryfikacja hipotezy badawczej, oparta na danych z piśmiennictwa, opisujących prawdopodobnie wcześniejszą, prodromalną fazę rozwoju degeneracji w chorobie Parkinsona, dotyczącą rejon miejsca LC przed degenacją rejonu SN/VTA bezpośrednio odpowiadającego za objawową fazę choroby, wymagała stworzenia modelu zwierzęcego, opartego na selektywnej delecji neuronów noradrenergicznych w LC. Modele takie co prawda istnieją (m.in. wywołanie chemosympatektomii przez podanie neurotoksyny, DSP4), jednak nie odzwierciedlają progresywnego i powolnego charakteru neurodegeneracji w PD. Ponadto, sprawdzone już narzędzie badawcze w postaci uruchomienia kaskady zmian neurodegeneracyjnych zbliżonych do obserwowanych w PD przez delecję czynnika transkrypcyjnego TIF-IA i wywołanie tzw. stresu jąderkowego, wydawało się znacznie bardziej obiecującym podejściem niż modele czysto farmakologiczne.

Podsumowując, głównym celem pracy było stworzenie odpowiedniego modelu badawczego i określenie wpływu postępującej degeneracji neuronów noradrenergicznych w LC na funkcjonowanie układu dopaminowego w kontekście prodromalnej fazy choroby Parkinsona.

Cel ten obejmował trzy etapy badań (cele szczegółowe):

1. Zbadanie wpływu konstytutywnej mutacji w dostępnym modelu TIF-IA^{DbhCre}, prowadzącej do degeneracji układu noradrenergicznego, na funkcjonowanie układu dopaminowego w rejonie SN/VTA (celem potwierdzenia zasadności dalszych badań);
2. Wykorzystanie systemu edycji genów CRISPR/Cas9 *in vivo* dla stworzenia od podstaw nowego modelu myszy transgenicznych opartego o delecję TIF-IA ograniczoną do ośrodkowego układu nerwowego (charakteryzującego się selektywną, mózgowo-specyficzną degeneracją układu noradrenergicznego w rejonie LC) i jego ogólna charakterystyka;
3. Wykorzystanie modelu dla badania wzajemnych zależności pomiędzy układem noradrenergicznym a dopaminowym, w kontekście wczesnej, przedklinicznej fazy PD, w szczególności potwierdzenie hipotezy czy neurodegeneracja LC może prowadzić do spontanicznych, negatywnych zmian w układzie dopaminowym.

3. Materiały i metody

3.1. Mysie modele badawcze

Eksperymenty prowadzono na myszach obu płci, dzikich i zmutowanych, pochodzących z własnej hodowli GMO, prowadzonej w Zakładzie Biochemii Mózgu IF PAN. Zwierzęta zapewnione miały podstawowe warunki bytowania, zgodne z odpowiednimi przepisami: w trakcie hodowli zwierzęta przetrzymywane były w samowentylowanych klatkach IVC, natomiast w trakcie eksperymentu w standardowych klatkach PII, po 2-6 osobników tej samej płci w klatce, w pomieszczeniu spełniającym standardowe kryteria bytowania zwierząt doświadczalnych. Pomieszczenia hodowlane i bytowe zwierząt były centralnie klimatyzowane (temp. 22 °C ±2 °C), wilgotność ok. 55 % ±10 %, wymiana powietrza min. 10 x godz. przy zmniejszonej obsadzie, cykl świetlny 12/12, sterowany automatycznie, wymiana ściółki min. 1x w tygodniu (lub częściej w zależności od potrzeby). Zwierzęta były pod stałym, codziennym dozorem personelu Zwierzętarni oraz osoby zatrudnionej w projekcie, monitorującej parametry temperatury i wilgotności powietrza. Zwierzęta miały zapewniony swobodny dostęp do paszy i wody oraz przebywały we wzbogaconym środowisku (kartonowe tulejki, materiał gniazdowy). Doświadczenia wykonane były zgodnie z procedurami opisanymi w wnioskach (951/2012, 2012; 22/2019) zatwierdzonych przez II Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Krakowie oraz w oparciu o zgodę nr 109/2018 na zamknięte użycie organizmów genetycznie modyfikowanych wydaną przez Ministerstwo Środowiska z dn. 10.09.2018 r. Wszystkie eksperymenty – o ile nie podano inaczej - prowadzono na osobnikach dorosłych, po osiągnięciu 12 tygodnia życia. Eksperymenty przeprowadzono zarówno na samcach, jak i samicach myszy, a szczegółowe informacje o podziale płciowym w poszczególnych grupach eksperymentalnych zostały dokładnie przedstawione w sekcji opisującej grupy dla konkretnych eksperymentów.

3.1.1. Myszy C57/BL6N

Na potrzeby realizacji wstępnych doświadczeń, sprawdzających miejsce podania i rozprzestrzenianie się wektora w tkance mózgowej oraz charakterystykę wektorów lentiwirusowych a także usprawniających warunki ich domóżgowej iniekcji zostały użyte myszy typu dzikiego, szczep C57Bl/6N, zarówno samce jak i samice, stanowiące tło genetyczne dla wszystkich linii transgenicznych wykorzystanych w projekcie.

3.1.2. Myszy Dbh^{Cre}

Linia myszy transgenicznych szczegółowo opisana przez Parlato i wsp. (Parlato i wsp., 2007), otrzymana z German Cancer Research Center (Deutsches Krebsforschungszentrum, DKFZ) w Heidelbergu, charakteryzująca się stabilną ekspresją Cre pod promotorem β -hydroksylazy dopaminowej (DBH, ang. *Dopamine β -hydroxylase*), enzymu występującego w komórkach noradrenergicznych oraz adrenergicznych, zarówno w Ośrodkowym Układzie Nerwowym (OUN) jak i na obwodzie. W ramach niniejszej pracy myszom DbhCre podawano domóżgowo Cre-zależny wektor lentiwirusowy, doprowadzając do mutacji powodującej usunięcie czynnika transkrypcyjnego TIF-1A w zainfekowanych neuronach wykazujących ekspresję Cre, celem wywołania selektywnej degeneracji wyłącznie w komórkach noradrenergicznych miejsca sinawego.

3.1.2.1. Warunki genotypowania linii Dbh^{Cre}

Myszy Dbh^{Cre} genotypowano przy użyciu reakcji PCR (ang. *Polimerase Chain Reaction*) celem wyselekcjonowania heterozygot. Do izolacji DNA i genotypowania wykorzystano komercyjny zestaw do genotypowania (*AccuStart™ II Mouse Genotyping Kit*, QuantaBio/VWR) postępując zgodnie z zaleceniami producenta. Materiał pobrany z biopsji ogona był zawieszany w roztworze *Extraction Reagent* (100 µl), a następnie trawiony w 95 °C przez 30 min. Po schłodzeniu próbek do temperatury pokojowej dodawano *Stabilization Buffer* (100 µl), a następnie przechowywano w 4 °C. Do amplifikacji docelowych fragmentów na matrycy wyizolowanego DNA w reakcji PCR użyto termocyklera (Bio-Rad T100) i postępowano zgodnie z poniższym protokołem, używając odczynników dołączonych do zestawu, w tym polimerazy *Taq*. Wykorzystano następujące sekwencje starterów:

iCre FWD 5' - CTG CCA GGG ACA TGG CCA GG

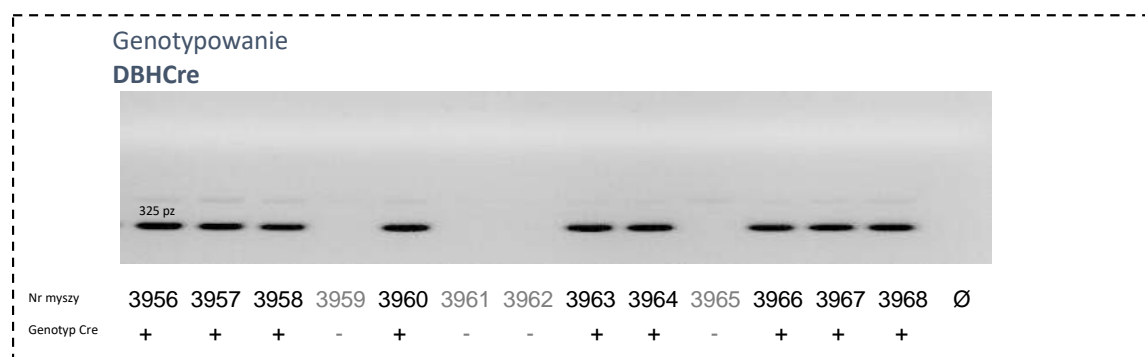
iCre REV 5' - GCA CAG TCG AGG CTG ATC AGC

Tab. 2 Składniki mieszaniny reakcyjnej w reakcji PCR genotypowania myszy Dbh^{Cre} i warunki reakcji

| Składniki mieszaniny reakcyjnej | objętość 25 µl | stężenie końcowe |
|---------------------------------------|----------------|------------------|
| 10 µM iCre_FWD | 2,5 µl | 0.5 µM |
| 10 µM iCre_REV | 2,5 µl | 0.5 µM |
| AccuStart II GelTrack PCR SuperMix 2x | 12,5 µl | 1-krotne |
| matrycowe DNA | 2,5 µl | |
| H ₂ O | 5 µl | |

| Warunki reakcji PCR | czas | temperatura |
|----------------------|---------|-------------|
| Denaturacja wstępna: | 1 min. | 94 °C |
| 40 cykli: | 10 sek. | 94 °C |
| | 15 sek. | 60 °C |
| | 20 sek. | 72 °C |
| Schłodzenie: | 4 °C | ∞ |

Przeprowadzono rozdział elektroforetyczny w 1 % żelu agarozowym (Roche, nr. kat. 11685678001) w warunkach 110 V, 30 min. w roztworze TBE (TRIS-boran, EDTA: 90 mM Tris Base, 90 mM kwas borowy, 2mM EDTA pH 8,0) z dodatkiem MIDORI Green (VWR, nr. Kat. 102307-968), uwzględniając negatywną kontrolę (brak matrycy DNA) oraz marker wielkości DNA. Żel po rozdzieleniu uwidocznił w świetle UV (Vilber, E-BOX CX5 TS) celem identyfikacji genotypów zwierząt. Osobniki z ekspresją rekombinazy Cre (Cre⁺) charakteryzowały się pozytywnym sygnałem na poziomie 325 par zasad (pz).



Ryc. 10 Przykładowy obraz żelu uzyskany w procedurze genotypowania myszy Dbh^{Cre}

3.1.3. Linia TIF-IA^{DbhCre}

Linia myszy utworzona w oparciu o system warunkowej rekombinacji Cre/loxP. Linia powstała przez skrzyżowanie osobników wykazujących ekspresję rekombinazy Cre pod kontrolą promotora DBH (DbhCre) z myszami posiadającymi oflankowaną sekwencjami loxP część genu *Rrn3* (egzon 12 – 14) kodującego białko TIF-IA (TIF-IA^{flox/flox}) (Yuan et al., 2005). W efekcie, w komórkach wykazujących ekspresję rekombinazy Cre następuje usunięcie oflankowanej sekwencjami loxP części genu *Rrn3*, co powoduje utratę czynnika transkrypcyjnego TIF-IA, kluczowego dla sterowania aktywnością Polimerazy I. Mutacja prowadzi do zahamowaniu syntezy rRNA w neuronach noradrenergicznych i w konsekwencji do selektywnej degeneracji wszystkich komórek noradrenergicznych. W parowaniach myszy otrzymywano mioty zawierające zarówno osobniki Cre+/TIF-IA^{flox/flox}, opisywane dalej jako myszy TIF-IA^{DbhCre}, oraz osobniki nie wykazujące ekspresji rekombinazy Cre (Cre-, tzw. *littermates*), które służyły jako zwierzęta kontrolne w eksperymentach (Barut et al., 2022)

3.1.3.1. Warunki genotypowania linii TIF-IA^{DbhCre}

Procedurę genotypowania myszy TIF-IA^{DBHCre} wykonywano analogicznie jak w rozdziale 3.1.2.1. W oddzielnych reakcjach PCR określano występowanie genu rekombinazy Cre oraz sekwencji loxP, wykorzystując następujące sekwencje starterów:

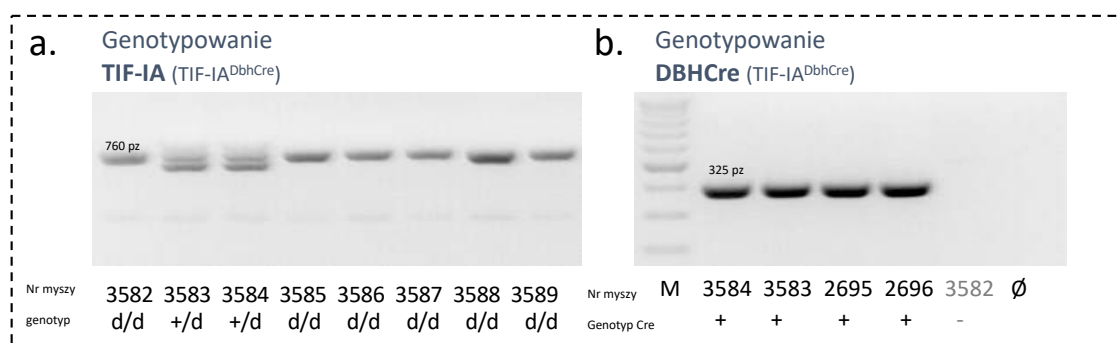
iCre FWD 5' - CTG CCA GGG ACA TGG CCA GG

iCre REV 5' - GCA CAG TCG AGG CTG ATC AGC

TIF-IA floxed_FWD: 5' - CCG GTG GTC CTG CTT ACA CTA GAG ATG TGG

TIF-IA floxed_REV: 5' - AAT ATA ATT TGC AGC AGC CTG CCT GAT GAT GG

Po rozdzielaniu na żelu elektroforetycznym identyfikowano produkty reakcji genotypowania na obecność rekombinazy Cre jak opisano w rozdziale 3.1.2.1 oraz na obecność genu znakowanego sekwencjami loxP: 760 par zasad (zwierzę zmutowane) lub 680 par zasad (zwierzę kontrolne).



Ryc. 11 Przykładowy obraz z żelu uzyskany w procedurze genotypowania myszy TIF-IA^{DbhCre}. Myszy zawierające gen znakowany sekwencją loxP oznaczone jako d/d (robocze oznaczenie stosowane w naszym laboratorium dla jednoznacznego określenia genotypu celem uniknięcia pomyłek przy zapisie odręcznym), myszy kontrolne: +/+, heterozygoty: +/d.

3.1.4. Linia TIF-IA^{DATCreERT2}

Myszy TIF-IA^{DATCreERT2} wykorzystywano jako referencyjny model progresywnego parkinsonizmu, dostępny w Zakładzie Biochemii Mózgu IF PAN. Linia ta umożliwia indukowaną, selektywną ablację genu *Rrn3* w komórkach ekspresjonujących gen transportera dopaminy DAT (*Slc6a3*), czyli w neuronach dopaminowych, prowadząc w efekcie to ich progresywnej neurodegeneracji (Rieker et al., 2011). Jest to linia indukowana dzięki zastosowaniu rekombinazy CreERT2 pod kontrolą promotora genu *Slc6a3*, która jest aktywowana tylko po podaniu tamoksyfenu

(Feil *et al.*, 1997), w naszej procedurze stosowanego dootrzewnowo zwierzętom po osiągnięciu wieku 11 tygodni (Rieker *et al.*, 2011; Kreiner *et al.*, 2019). Tamoksyfen był rozpuszczany w oleju słonecznikowym (20 mg/kg) i następnie przefiltrowywany przez filtr nitrocelulozowy o średnicy porów 0,22 μm . Tak przygotowaną zawiesinę podawano w dawce 2 mg/kg masy ciała w objętości 5 $\mu\text{l/g}$ masy ciała, raz dziennie przez 5 kolejnych dni.

3.1.4.1. Warunki genotypowania linii TIF-IA^{DATCreERT2}

Myszy TIF-IA^{DATCreERT2} genotypowano analogicznie jak opisano w rozdziale 3.1.2.1. W reakcji PCR badano występowanie miejsc kodujących allele CreERT2 oraz loxP, z wykorzystaniem następujących sekwencji starterów:

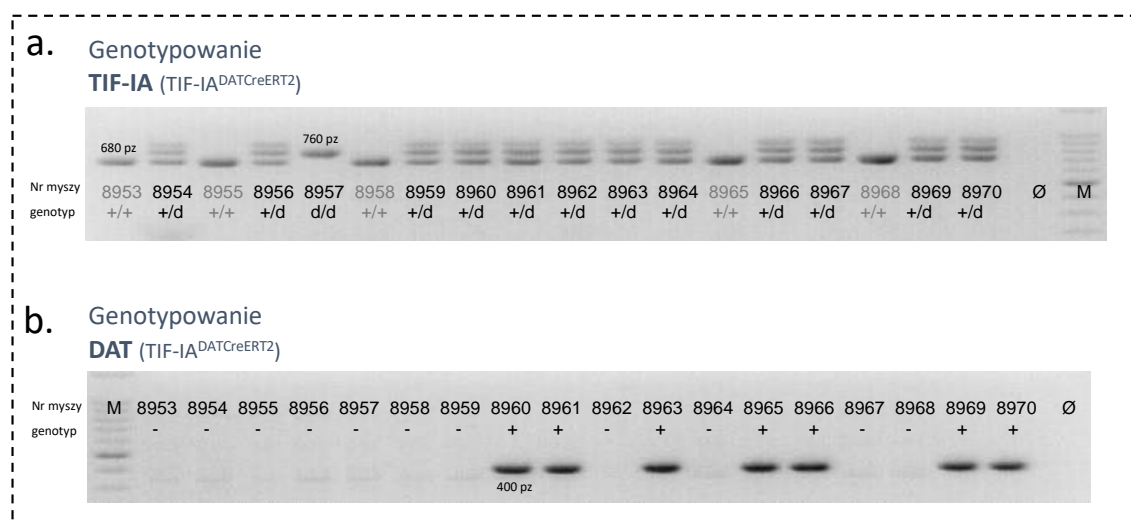
Cre_FWD: 5'-GGC TGG TGT GTC CAT CCC TGA A

Cre_REV: 5'-GGT CAA ATC CAC AAA GCC TGG CA

TIF-IA floxed_FWD: CCG GTG GTC CTG CTT ACA CTA GAG ATG TGG

TIF-IA floxed_REV: AAT ATA ATT TGC AGC AGC CTG CCT GAT GAT GG

Po rozdzielaniu na żelu elektroforetycznym identyfikowano produkty reakcji genotypowania na obecność rekombinazy Cre jak opisano w rozdziale 3.1.2.1 (400 par zasad) oraz na obecność genu znakowanego sekwencjami loxP: 760 par zasad (zwierzę zmutowane) lub 680 par zasad (zwierzę kontrolne).



Ryc. 12. Przykładowy obraz z żelu uzyskany w procedurze genotypowania myszy TIF-IA^{DATCreERT2}. Myszy zawierające gen znakowany sekwencją loxP oznaczone jako d/d (robocze oznaczenie stosowane w naszym laboratorium dla jednoznacznego określenia genotypu celem uniknięcia pomyłek przy zapisie odręcznym), myszy kontrolne: +/+, heterozygoty: +/d.

3.2. Przygotowanie plazmidowych wektorów transferowych CRISPR/Cas9

Celem wygenerowania zwierząt z selektywną, progresywną delecją czynnika transkrypcyjnego TIF-IA w neuronach noradrenergicznych miejsca sinawego (nie wpływającą bezpośrednio na funkcjonowanie obwodowego układu sympatycznego) zastosowano połączenie systemów Cre/loxP oraz CRISPR/Cas9. W tym celu zaprojektowano i stworzono konstrukt genetyczny służący Cre-zależnej ekspresji systemu CRISPR/Cas9 – tj. nukleazy Cas9 i przewodnikowego RNA komplementarnego do genu TIF-IA. Ze względu na spodziewaną wielkość konstrukt, do podań domózgowych wybrano wektor lentiwirusowy, który następnie podawano bezpośrednio do miejsca sinawego myszy DbhCre z wykorzystaniem stolika stereotaktycznego i mikrostrzykawki. W ten sposób ograniczono ablację czynnika TIF-IA anatomicznie do miejsca podania wektora lentiwirusowego,

natomiast specyficzność do komórek noradrenergicznych zapewniała ekspresja rekombinazy Cre po kontrolą promotora DBH.

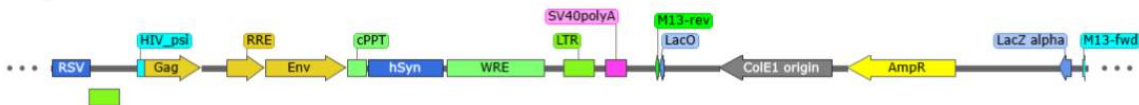
Dla przygotowania tak złożonego układu projekt zakładał wykonanie serii klonowań, aby stworzyć różne typy wektorów transferowych, które następnie zostaną zapakowane w cząsteczki lentiwirusa i wykorzystane do transdukcji neuronów. Dodatkowo, oprócz systemu Cre-zależnego, przewidziano wygenerowanie wektorów lentiwirusowych, które będą wykazywały ekspresję systemu CRISPR/Cas9 w dwóch typach komórek: neuronach oraz astrocytach. Docelowe wektory plazmidowe otrzymano z wykorzystaniem metod klonowania molekularnego, które rozpoczęto w trakcie stażu na Uniwersytecie w Helsinkach, a następnie kontynuowano w laboratorium Zakładu Biochemii w IF PAN. W ramach współpracy otrzymano dostępne, gotowe plazmidy, z których powielono i oczyszczono odpowiednie fragmenty, a następnie różnymi metodami przeprowadzono ich ligację. Podczas pracy w IF PAN, usługę syntezy starterów reakcji oraz sekwencjonowania zlecono firmie Genomed S.A. (standardowa procedura w tego typu metodyce).

3.2.1. Plazmidy transferowe pCDH i pLenti do wektorów lentiwirusowych

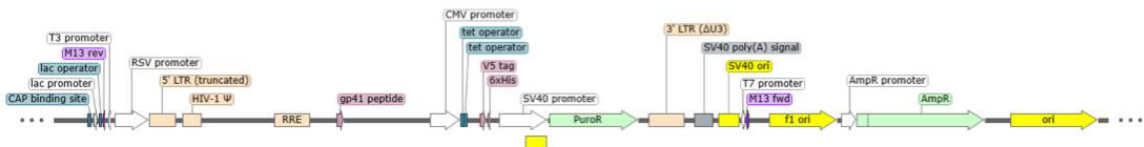
Wektory plazmidowe, które zostały wygenerowane w kolejnych punktach metodyki opisujących etapy klonowania opierały się na dwóch plazmidach transferowych, pCDH i pLenti, które umożliwiają pakowanie docelowego wektora transferowego w cząsteczce lentiwirusa 3 generacji. Lentiwirusowe wektory transferowe są skutecznymi nośnikami do dostarczania i ekspresji wybranego genu do prawie każdej komórki ssaków - w tym komórek nie dzielących się i zwierząt modelowych. Podczas pakowania konstrukt w cząsteczki lentiwirusowe, można uzyskać wysoce wydajną transdukcję, nawet w przypadku najtrudniejszych do transfekcji komórek, takich jak neurony pierwotne. Konstrukt ekspresyjny w komórkach docelowych jest zintegrowany z genomowym DNA i zapewnia stabilną, długotrwałą ekspresję genu docelowego. W opisywanych doświadczeniach opieraliśmy się na trzeciej generacji najpopularniejszego systemu ekspresji lentiwirusowej opartego na HIV-1, który składa się z trzech głównych komponentów:

- o lentiwirusowego wektora transferowego (pCDH- lub pLenti)
- o pakujących plazmidów lentiwirusowych
- o linia komórkowa produkująca cząsteczki pseudowirusowe (komórki HEK293T).

a. pCDH-hSYN



b. pLenti-puro



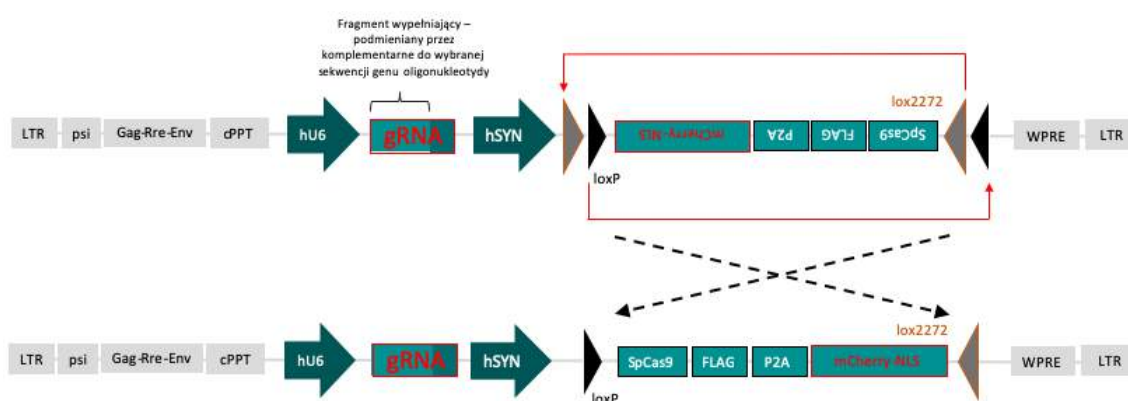
Ryc. 13. Schemat plazmidów transferowych (a.) pCDH; (b.) pLenti. HIV-1₅-LTR, HIV-1₃-LTR, HIV-1psi_{pack}, gag, RRE, Env, cPPT - elementy odpowiedzialne za pakowanie, transdukcję, stabilną integrację wirusowego konstrukt ekspresyjnego z genomowym DNA; AmpR - gen oporności na antybiotyk selekcyjny, ampicylinę; f1_{origin} / ColE1_{origin} – miejsce początku replikacji DNA; LacO – lac operon

3.2.2. Projekt neuronalnego plazmidowego wektora Cre-zależnego CRISPR/Cas9

Na potrzeby realizacji projektu, wspólnie z Dr. Andrii Domanskyim z Uniwersytetu w Helsinkach, zaprojektowano Cre-zależny lentiwirusowy wektor transferowy, który opiera się na systemie CRISPR/Cas9 i wykazuje ekspresję nukleazy Cas9 po kontrolą neuronalnie specyficznego promotora ludzkiej synapsyny. Wektor ten został zaprojektowany w ten sposób, aby zawierać w sobie wszystkie niezbędne fragmenty DNA:

- elementy odpowiedzialne za pakowanie, transdukcję, stabilną integrację wirusowego konstruktów ekspresyjnego z genomowym DNA;
- gRNA (RNA-przewodnik) pod promotorem hU6; w kolejnych etapach fragment gRNA jest projektowany, aby wyciszać ekspresję wybranego genu i odpowiednie oligonukleotydy wklonowane są do wektora (**dla uproszczenia nomenklatury w kolejnych etapach ten fragment nazywany jest gRNA**)
- Cas9 wraz z białkiem fluorescencyjnym mCherryNLS połączonych samotną peptydem 2A, oflankowane miejscami loxP/lox2272 w odwrotnej orientacji, pod promotorem neuronalnym – synapsyną.

Fragment sekwencji zawierający Cas9, został podwójnie oflankowany miejscami loxP, które znajdują się w odwrotnej orientacji, znanymi również jako DIO (ang. *Double-Floxed Inverted Open reading Frame*). Ten autorski konstrukt, w którym w jednej cząsteczce zawarto całą maszynę CRISPR, wraz z Cre zależnym miejscem DIO, został po raz pierwszy zastosowany w ramach niniejszej pracy celem kontroli ekspresji Cas9 poprzez rekombinację za pośrednictwem rekombinazy Cre.



Ryc. 14. Projekt plazmidowego wektora pCDH-hU6-gRNA-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS (w skrócie nazywany CRISPR-DiO)

Pierwszym krokiem było otrzymanie uniwersalnego plazmidu pCDH-hU6 *AarI*-filler-*AarI* hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS, w którym zamiast miejsca gRNA znajduje się fragment sekwencji z obu stron mający miejsca cięcia dla enzymu *AarI* (specyficzne miejsca cięcia, które pozwolą wklonować gRNA) kodujący dodatkowe miejsce cięcia dla enzymu restrykcyjnego *MscI* (dodatkowe miejsce cięcia jest znacznikiem diagnostycznym, w celu selekcji, czy gRNA zostało wklonowane). Do tak otrzymanego plazmidu wklonowano docelowe gRNA poprzez cięcie *AarI* i ligację gRNA.

Wykonano następujące kroki (opisane szczegółowo w podrozdziale 3.2.2.1):

- Otworzono plazmid pCDH-hSYN przy użyciu enzymu restrykcyjnego EcoRI i wstawiono przy użyciu systemu *NEBuilder HiFi Assembly Master Mix* (New England Biolab, nr. kat. E2621S), czyli zestawu do bezszwowego klonowania umożliwiającego równoczesne wstawienie kulku fragmentów DNA (pozwoli to zachować miejsce trawienia EcoRI na obu końcach strawionego fragmentu) dodatkowe 3 fragmenty:
 1. Cas9-P2A-mCherryNLS – uzyskany przy pomocy trawienia restrykcyjnego Sall/XbaI z wektora pLentiCRISPR-EGFP_g1-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS i wstawione w odwrotnej orientacji
 2. lox2722/loxP amplifikowane z plazmidu pOTTC102
 3. lox2722/loxP w odwrotnej orientacji amplifikowane z plazmidu pOTTC102
- Otworzono otrzymany plazmid pCDH-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS przy użyciu enzymu restrykcyjnego SpeI i wstawiono przy użyciu systemu NEBuilder amplifikowany fragment hU6-AarI-filler-AarI (opisane w podrozdziale 3.2.2.3)
- Aby otrzymać kontrolny plazmid z gRNA usuwającym białko fluorescencyjne GFP, otworzono plazmid pCDH-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS za pomocą enzymu restrykcyjnego SpeI i wstawiono przy użyciu systemu NEBuilder amplifikowany fragment hU6-EGFP_g1 z plazmidu pLentiCRISPR-EGFP_g1-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS
- Uniwersalny plazmid pCDH-hU6-AarI-filler-AarI-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS trawiono za pomocą enzymu AarI i wstawiano otrzymane wcześniej sekwencje gRNA (opisane w podrozdziale 3.2.4).

3.2.2.1. Klonowanie molekularne pCDH-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS

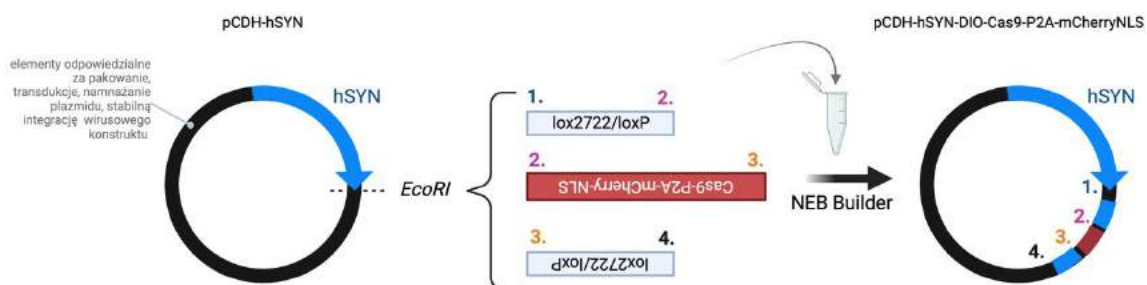
Ze względu na szerokie metodyczne aspekty pracy, której celem było m.in. stworzenie od podstaw nowych narzędzi molekularnych, w sekcji metody znajdują się sekwencje wektorów wyjściowych i użytych starterów. Natomiast otrzymane konstrukty genetyczne oraz zaprojektowane gRNA, stanowiące o nowatorstwie projektu oraz będące przedmiotem pracy eksperymentalnej i prowadzonej na bieżąco weryfikacji zastosowanych rozwiązań zostały opisane w sekcji wyników.

Na potrzeby realizacji projektu wykonano kilka rund klonowań, aby otrzymać docelowy, plazmidowy wektor transferowy, który jest częścią składową w produkcji rekombinowanych wektorów lentiwirusowych. Pierwszym etapem było stworzenie plazmidowego wektora, który będzie miał wstawione miejsca loxP/lox2722, które oflankują maszynię enzymu Cas9:

pCDH-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS

Aby wykonać jak najmniej rund klonowań do ligacji fragmentów użyto systemu NEBuilder, który pozwala na równoczesne połączenie DNA dzięki nakładającym się na siebie końcom, sładany następnie przez egzonukleazę we właściwej kolejności.

Do projektowania konstruktyw i zaplanowania sekwencji klonowania wykorzystano programy ApE (<https://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape/>) oraz SnapGene. Startery do klonowania zaprojektowano za pomocą programu *NEB Builder Assembly Tool*.



Ryc. 15. Schematycznie przedstawiony pierwszy etap stworzenia wektora Cre-zależnego przy pomocy kierunkowej mutagenazy: utworzenie pCDH-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS. hSyn – promotor ludzkiej synapsyny. 1.; 2.; 3.; 4.; - komplementarne fragmenty DNA (otrzymane m.in. przez odpowiednie zaprojektowanie starterów użytych w amplifikacji).

Wektor pCDH-hSYN strawiono przy pomocy enzymu restrykcyjnego EcoRI (Thermo Scientific, nr. kat. FD0275).

Tab. 3. Trawienie enzymem restrykcyjnym EcoRI Fast Digest

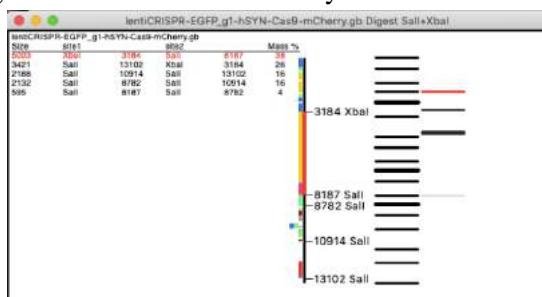
| pCDH-hSYN | Bufor Fast Digest | EcoRI | woda | Warunki reakcji |
|--------------|-------------------|-------|------|-----------------|
| 5 µl (10 µg) | 2 µl | 1 µl | 8 µl | 37 °C 1 godz. |

Wektor pLentiCRISPR-EGFP_g1-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS strawiono przy pomocy podwójnego cięcia enzymami restrykcyjnymi XbaI i SalI (Thermo Scientific, nr. kat. FD0684, FD0644).

Tab. 4. Podwójne trawienie enzymami restrykcyjnymi XbaI/SalI Fast Digest

| pLentiCRISPR-EGFP_g1-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS | Bufor Fast Digest | XbaI | SalI | woda | Warunki reakcji |
|---|-------------------|------|------|------|-----------------|
| 5 µl (10 µg) | 2 µl | 1 µl | 1 µl | 7 µl | 37 °C 1 godz. |

Przeprowadzono rozdział elektroforetyczny w 1 % żelu agarozowym w warunkach 110 V, 1 godz. w roztworze TBE z dodatkiem MIDORI Green. Uwidoczniony pod lampą UV zlinearyzowany plazmidowy szkielet pCDH-hSYN o wielkości 6321 pz wycięto sterylnym ostrzem i umieszczono w próbówce typu Eppendorf. Ze strawionego plazmidu pLentiCRISPR-EGFP_g1-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS wyselekcjonowano i wycięto prążki o wielkości 5003 pz przy pomocy poniższego schematu (Ryc. 16) będące fragmentem Cas9-P2A-mCherryNLS.



Ryc. 16. Wielkość prążków plazmidu pLentiCRISPR-EGFP_g1-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS otrzymanych po trawieniu XbaI/SalI z zaznaczonym na czerwono docelowym fragmencie DNA. Zdjęcie z programu ApE.

Wycięte fragmenty DNA z żelu oczyszczono za pomocą zestawu *Monarch DNA Gel Extraction Kit* (New England BioLabs, nr. kat. T1020L) zgodnie ze wskazaniami producenta wraz z dodatkowymi

modyfikacjami, aby zwiększyć wydajność izolacji: po płukaniu kolumn odparowano resztki alkoholu (5 min. w 70 °C z otwartym wieczkiem próbówki) oraz inkubowano kolumnę z roztworem elucyjnym podgrzanym do 70 °C (5 min. w 70 °C, wieczko próbówki zamknięte). Następnie wykonano elucję DNA w 15 µl i wykonano pomiar stężenia DNA. Wyizolowane DNA przechowywano na lodzie, a następnie zamrożono w -20 °C.

Aby uzyskać dwa fragmenty lox2722/loxP o różnej orientacji wykonano amplifikacje sekwencji plazmidu pOTT102. Do reakcji użyto następujących starterów:

5LOX_for: GAGCGCAGTCGAATTCGGTACCGGATCCTCTAGAGTCG
 5LOX_rev: AACCGTTAAGTCGACGTAATAGGGCGCGCCATAACTTC

3LOX_for: GTGGCAGCGCTCTAGACATGGTGGCTAGCATAACTTCGTAT
 3LOX_rev: CCATCGAAGAGAATTGATAAGCTTGATATCGAATTCATAACTTCGTATAGC

Reakcję PCR przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (New England BioLabs, nr. kat. M0530) zgodnie z zaleceniami producenta. Wykonano następującą mieszaninę reakcyjną:

Tab. 5. Składniki mieszaniny reakcyjnej polimerazy Phusion i warunki reakcji PCR

| Składniki mieszaniny reakcyjnej | objętość 50 µl | stężenie końcowe |
|---------------------------------|----------------|---------------------|
| 10 µM 5LOX_for / 3LOX_for | 2,5 µl | 0.5 µM |
| 10 µM 5LOX_rev / 3LOX_rev | 2,5 µl | 0.5 µM |
| 5X Phusion HF Bufor | 10 µl | 1-krotne |
| 10 mM dNTPs | 1 µl | 200 µM |
| matrycowe DNA | 0,5 µl | <10 ng (plazmid) |
| Polimeraza Phusion DNA | 1 µl | 1.0 units/50 µl PCR |
| H ₂ O | 32,5 µl | |

| Warunki reakcji PCR | czas | temperatura |
|----------------------|--|-------------|
| Denaturacja wstępna: | 30 sek. | 98 °C |
| 27 cykli: | { 10 sek. 20 sek. 20 sek. } | 98 °C |
| | | 60 °C |
| | | 72 °C |
| | | 72 °C |
| Końcowa elongacja: | 5 min. | 72 °C |
| Schłodzenie: | 4 °C | ∞ |

Krótkoterminowo utrzymywano temperaturę 4 °C, przechowywano w -20 °C

Przeprowadzono rozdział elektroforetyczny w 1,5 % żelu agarozowym w warunkach 120 V, 1 godz. w roztworze TBE. Fragmenty DNA o wielkości 195 pz dla lox2722/loxP_for oraz 167 pz dla lox2722/loxP_inv (odwrócony) wycięto, wyizolowano z żelu i zmierzono ich stężenie. Do pomiaru stężenia próbek DNA, a także wszystkich innych prób z kwasami nukleinowymi wykorzystywanymi w niniejszej pracy (DNA, cDNA, RNA), użyto spektrofotometru NanoDrop (Thermo Scientific).

Otrzymane wszystkie fragmenty DNA połączono razem używając *NEBuilder HiFi Assembly Master Mix* (New England BioLabs, nr. kat. E2621), opartego na metodzie Gibson Assembly i postępowano zgodnie z zaleceniami producenta, (przy zmniejszonej objętości reakcji – modyfikacja protokołu na podstawie własnych doświadczeń wstępnych).

Tab. 6. Składniki mieszaniny reakcyjnej ligacji (4 fragmenty) i warunki reakcji

| <i>Składniki mieszaniny reakcyjnej</i> | <i>objętość 50 µl</i> | <i>stężenie końcowe (zakres)</i> |
|---|-----------------------|----------------------------------|
| <i>pCDH-hSYN /EcoRI</i> | <i>1 µl</i> | <i>(50 – 100 ng wektora)</i> |
| <i>Cas9-P2A-mCherryNLS /XbaI/SalI</i> | <i>1 µl</i> | <i>(50 – 100 ng wektora)</i> |
| <i>lox2722/loxP</i> | <i>0,25 µl</i> | <i>(10 - 50 ng insert)</i> |
| <i>lox2722/loxP_inv</i> | <i>0,25 µl</i> | <i>(10 - 50 ng insert)</i> |
| <i>NEBuilder Master Mix</i> | <i>2,5 µl</i> | <i>2x stężona</i> |
| | | |
| <i>Warunki reakcji</i> | <i>czas</i> | <i>temperatura</i> |
| <i>Ligacja :</i> | <i>60 min.</i> | <i>50 °C</i> |
| <i>Schłodzenie:</i> | <i>4 °C</i> | <i>∞</i> |
| <i>Krótkoterminowo utrzymywano temperaturę 4 °C, przechowywano w -20 °C</i> | | |

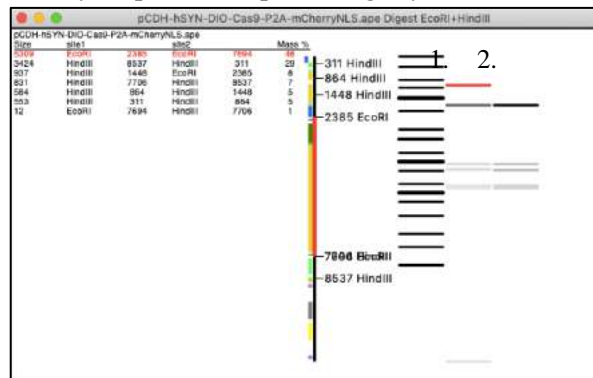
Następnie wykonano transformację bakteryjną z otrzymaną mieszaniną ligacyjną. Przez 20 min. rozmrażano bakterie kompetentne *One Shot TOP10 (Chemically competent E. coli*, Invitrogen, nr kat. C4040-06) lub DH5alfa, które zostały przygotowane samodzielnie. W warunkach sterylnego powietrza, w bliskości palnika połączono po 10 µl bakterii z 0,5 µl mieszaniny ligacyjnej oraz z 1 ng pozytywnej kontroli, tj. wyjściowym plazmidem pCDH-hSYN oraz kontrolą negatywną, tj. strawionym wektorem, bez insektów. Próbkówki typu eppendorf z mieszaniną delikatnie stuknięto w celu wymieszania składników i inkubowano przez 20 min. na lodzie. W międzyczasie rozgrzano termoblok do 42 °C. Próbkę umieszczono w termobloku na dokładnie 45 sek., a następnie schłodzono na lodzie przez 2 min. Do próbek dodano 250 µl uprzednio podgrzanego do 37 °C medium bakteryjnego SOC (New England BioLabs, nr. kat. B9020S) i umieszczono w wytrząsarce bakteryjnej w temperaturze 37 °C na około 1 godz. Wyciągnięto z lodówki uprzednio przygotowane szalki Petriego z agarem LB (A&A Biotechnology, nr. kat. 2021-1000) wraz z antybiotykiem selekcyjnym, ampicyliną w stężeniu końcowym 100 µg/ml (A&A Biotechnology, nr. kat. 2017-25), aby ogrzać je do temperatury pokojowej. Całość mieszaniny transformacyjnej wysiano na szalki w obecności zapalonego palnika, rozprowadzono sterylną głaszczką i inkubowano w 37 °C przez noc. Następnego dnia wyselekcjonowano 5 kultur bakteryjnych, dobrze odseparowanych kolonii i przygotowano z nich hodowle bakteryjne umieszczając zanurzony uprzednio w kulturze bakteryjnej tips w 3 ml roztworu LB (A&A Biotechnology, nr. kat. 2020-1000). Hodowlę bakteryjną umieszczono w wytrząsarce bakteryjnej w temperaturze 37 °C i inkubowano przez noc. Z 3 ml otrzymanej zawiesiny bakteryjnej pobrano 200 µl i połączono z 50 % glicerolem, a następnie zamrożono w -80 °C, w celu zachowania żywych bakterii do kolejnych etapów klonowania umożliwiających szybkie namnożenie materiału. Następnego dnia hodowlę zwirowano w 4000 g, a z uzyskanego peletu bakteryjnego izolowano plazmidowe DNA przy użyciu kitu *Plasmid Mini* (A&A Biotechnology, nr. kat. 020-250) według wskazań producenta. Wykonano elucję DNA w 20 µl i wykonano pomiar stężenia DNA za pomocą urządzenia Nanodrop. Następnie wykonano cięcia diagnostyczne przy pomocy enzymów restrykcyjnych EcoRI i HindIII (Thermo Scientific, nr. kat. FD0274, FD0504).

Opisana procedura transformacji bakteryjnej i cięcia restrykcyjnego została powtarzana w kolejnych krokach klonowania molekularnego według przedstawionego wyżej schematu.

Tab. 7. Trawienie enzymami restrykcyjnymi EcoRI/HindIII fast digest

| pCDH-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS | Bufor Fast Digest | EcoRI | HindIII | woda | Warunki reakcji |
|-----------------------------------|-------------------|-------|---------|------|-----------------|
| 5 µl (500 ng) | 2 µl | 1 µl | 1 µl | 7 µl | 37 °C 15 min. |

Przeprowadzono rozdzielanie elektroforetyczne w 1 % żelu agarozowym w warunkach 120 V, 1 godz. w roztworze TBE z dodatkiem MIDORI Green. Jako kontrolę na żelu uwzględniono również strawiony w powyższych warunkach plazmid wyjściowy pCDH-hSYN. Uwidoczniono prążki i wyselekcjonowano pozytywne klony na podstawie poniższego rysunku:



Ryc. 17. Trawienie plazmidu (po kolei od lewej za markerem masowym): pCDH-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS (1) oraz pCDH-hSYN (2) enzymami EcoRI i HindIII wraz z zaznaczonym na czerwono prążkiem, który pozwala w łatwy sposób odróżnić, czy wyselekcjonowany klon jest pozytywny.

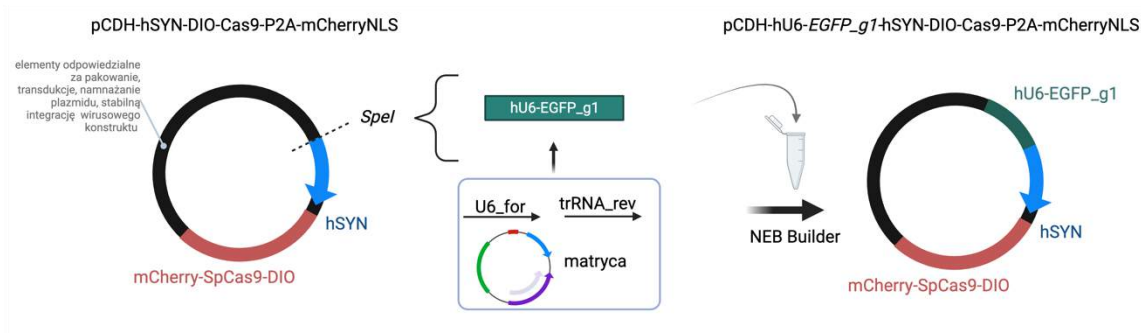
DNA plazmidowe wyselekcjonowanych klonów wraz ze starterami wysłano do firmy Genomed w celu przeprowadzenia sekwencjonowania. Pozytywne klony potwierdzone w sekwencjonowaniu zachowano i powielono materiał do dalszego klonowania. W tym celu z przygotowanych banków bakteryjnych w glicerolu pobrano przez zamoczenie sterylną końcówką i wrzucono do sterylnej kolby bakteryjnej z 200 ml pożywki LB z ampicyliną. Hodowlę bakteryjną umieszczono w wytrząsarce bakteryjnej w temperaturze 37 °C i inkubowano przez noc. Następnego dnia hodowlę zwirowano w 4000 g, a z uzyskanego peletu bakteryjnego izolowano plazmidowe DNA przy użyciu kitu Plasmid Midi AX (A&A Biotechnology, nr. kat. 092-10) według wskazań producenta. Wykonano elucję DNA w 100 µl i wykonano pomiar stężenia DNA.

3.2.2.2. Klonowanie molekularne pCDH-hU6-EGFP_g1-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS

Po otrzymaniu wyjściowego wektora pCDH-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS wklonowano do niego wstawkę zawierającą hU6-gEGFP, czyli sekwencję gRNA pod promotorem hU6, który wycisza białko fluorescencyjne EGFP (ang. *Enhanced Green Fluorescent Protein*).

pCDH-hU6 EGFP_g1 hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS

Dzięki wykorzystaniu cięcia restrykcyjnego oraz systemu ligacji opartego na *NEBuilder* można było w szybki sposób uzyskać wektor kontrolny, który mógł już zostać użyty do weryfikacji systemu DiO-CRISPR, równocześnie, kiedy trwały ostatnie rundy klonowań wektora transferowego pCDH-hU6-*AarI-filler-AarI*-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS oraz dobór gRNA.



Ryc. 18. Schematycznie przedstawiony etap stworzenia wektora kontrolnego pCDH-hU6-EGFP_g1-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS. U6_for, trRNA_rev – startery wykorzystane do amplifikacji.

Wektor pCDH-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS strawiono przy pomocy enzymu restrykcyjnego BcuI (SpeI) (Thermo Scientific, nr. kat. FD1253).

Tab. 8. Trawienie enzymem restrykcyjnym BcuI Fast Digest

| pCDH-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS | Bufor Fast Digest | BcuI | woda | Warunki reakcji |
|-----------------------------------|-------------------|------|------|-----------------|
| 5 µl (10 µg) | 2 µl | 1 µl | 8 µl | 37 °C 1 godz. |

W tym samym czasie przeprowadzono amplifikację sekwencji hU6-EGFP_g1 plazmidu plentiCRISPR-EGFP_g1-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS. Do reakcji użyto następujących starterów, które pozwalają zachować miejsce cięcia BcuI po jednej ze stron:

U6_for: TTTTATCGATACTAGGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAG
trRNA_rev: CACTTGCCTACTAGTTCAAAAAAGCACCGACTCGGTG

Reakcję PCR przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase*, zgodnie z zaleceniami producenta.

Tab. 9. Składniki mieszaniny reakcyjnej z użyciem polimerazy Phusion High-Fidelity i warunki reakcji PCR

| Składniki mieszaniny reakcyjnej | objętość 50 µl | stężenie końcowe |
|---------------------------------|----------------|---------------------|
| 10 µM U6_for | 2,5 µl | 0.5 µM |
| 10 µM trRNA_rev | 2,5 µl | 0.5 µM |
| 5X Phusion HF Bufor | 10 µl | 1-krotne |
| 10 mM dNTPs | 1 µl | 200 µM |
| matrycowe DNA | 1 µl | 10 ng (plazmid) |
| Polimeraza Phusion DNA | 1 µl | 1.0 units/50 µl PCR |
| H ₂ O | 32 µl | |

| Warunki reakcji PCR | czas | temperatura |
|----------------------|---------|-------------|
| Denaturacja wstępna: | 30 sek. | 98 °C |
| 27 cykli: | 10 sek. | 98 °C |
| | 20 sek. | 60 °C |
| | 20 sek. | 72 °C |
| | 5 min. | 72 °C |
| Schłodzenie: | 4 °C | ∞ |

Krótkoterminowo utrzymywano temperaturę 4 °C, przechowywano w -20 °C

Przeprowadzono rozdział elektroforetyczny pofragmentowanego wektora i amplifikowanej wstawki w 1 % żelu agarozowym w warunkach 110 V, 1 godz. w roztworze TBE z dodatkiem MIDORI

Green Uwidoczniony pod lampą UV zlinearyzowany plazmidowy szkielet pCDH-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS o wielkości 11650 pz oraz amplikon hU6-EGFP_g1 o wielkości 433 pz wycięto sterylnym ostrzem, DNA plazmidowe oczyszczono z żelu i zmierzono stężenie. Wyizolowane DNA przechowywano na lodzie, a następnie oba fragmenty DNA połączono razem za pomocą systemu przeznaczanego do szybkiego składania wielu fragmentów DNA w pojedynczej reakcji (*NEBuilder HiFi Assembly Master Mix*) i postępowano zgodnie z zaleceniami producenta (przy zmniejszonej objętości reakcji – modyfikacja własna protokołu).

Tab. 10. Składniki mieszaniny reakcyjnej reakcji ligacji i warunki reakcji

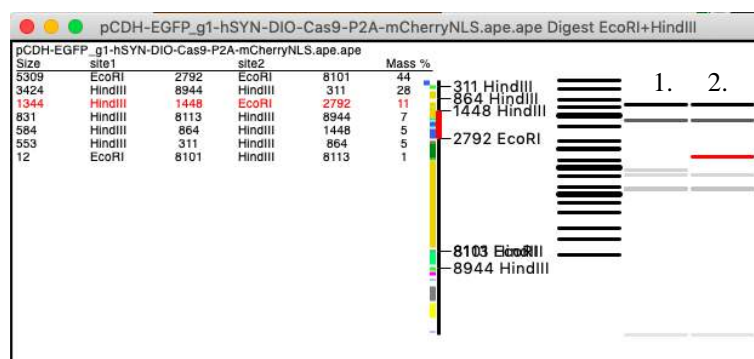
| | | |
|---|-------------------------------------|----------------------------------|
| <i>Składniki mieszaniny reakcyjnej</i> | <i>objętość 5 μl</i> | <i>stężenie końcowe (zakres)</i> |
| <i>pCDH-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS /BcuI</i> | <i>2 μl</i> | <i>(50 - 100 ng wektora)</i> |
| <i>hU6-EGFP_g1</i> | <i>0,5 μl</i> | <i>(10 - 50 ng insert)</i> |
| <i>NEBuilder Master Mix</i> | <i>2,5 μl</i> | <i>2x stężona</i> |
| | | |
| <i>Warunki reakcji</i> | <i>czas</i> | <i>temperatura</i> |
| <i>Ligacja</i> | <i>15 min.</i> | <i>50 °C</i> |
| <i>Schłodzenie:</i> | <i>4 °C</i> | <i>∞</i> |
| <i>Krótkoterminowo utrzymywano temperaturę 4 °C, przechowywano w -20 °C</i> | | |

Następnie przeprowadzano transformację bakteryjną uwzględniając kontrole w postaci wyjściowego wektora, a także pociętego wyjściowego wektora bez insertu. Do transformacji użyto innego typu bakterii kompetentnych: *NEB Stable Competent E. coli* (New England BioLabs, nr. kat.C3040H), które rekomendowane są do klonowania wektorów lentiwirusowych. Ten typ bakterii używano we wszystkich ostatnich etapach klonowania, gdzie otrzymywano docelowy plazmid ze wstawionym gRNA, a także przechowywano w bankach glicerolowych w -80 °C. Postępowano zgodnie z wyżej opisanym protokołem transformacji bakteryjnej, ale wprowadzając zmiany: szok cieplny w 42 °C wykonano w 30 sek., wytrząsanie z LB wykonano w 30 °C, a inkubację szalek z agarem z antybiotykiem selekcyjnym, ampicyliną przeprowadzono w 30 °C przez 24 godz. Następnego dnia wybrano 5 kultur bakteryjnych, z których zaszczepiono hodowle płynne. Kolejnego dnia wyizolowano plazmidowe DNA i przeprowadzono trawienie diagnostyczne enzymami restrykcyjnymi EcoRI i HindIII.

Tab. 11. Podwójne trawienie restrykcyjne enzymami EcoRI/HindIII Fast Digest

| pCDH- hU6-EGFP_g1hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS | Bufor Fast Digest | EcoRI | HindIII | woda | Warunki reakcji |
|---|-------------------|-----------|-----------|-----------|-----------------|
| 5 μ l (500 ng) | 2 μ l | 1 μ l | 1 μ l | 7 μ l | 37 °C 15 min. |

Przeprowadzono rozdział elektroforetyczny w 0,5 % żelu agarozowym w warunkach 120 V, 1 godz. w roztworze TBE. Jako kontrolę na żelu puszczone również strawiony w powyższych warunkach plazmid wyjściowy bez wstawki. Na podstawie poniższego rysunku wybrano pozytywne klony:



Ryc. 19 Trawienie plazmidu pCDH-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS (1) oraz pCDH-hU6-EGFP_g1-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS (2) enzymami EcoRI i HindIII wraz z zaznaczonym na czerwono prążkiem, który pozwala w łatwy sposób odróżnić, czy wyselekcjonowany klon jest pozytywny.

Wybrane pozytywne DNA plazmidowe zsekwencjonowano, namnożono i wyizolowano zestawem Plasmid Midi AX, a następnie użyto w kolejnym etapie.

3.2.2.3. Klonowanie molekularne plentiCRISPR-hU6-AarI-filler-AarI-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS oraz pCDH-hU6-AarI-filler-AarI-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS

W tym kroku otrzymano:

plentiCRISPR-hU6-AarI-filler-AarI-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS

pCDH-hU6-AarI-filler-AarI-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS

do którego w jednej rundzie klonowania można wstawić każdy zsyntetyzowany gRNA. Bezszwowe wstawianie dowolnej sekwencji oligonukleotydów bazuje na wykorzystaniu enzymów restrykcyjnych typu IIS, tnących DNA w ściele określonej odległości od rozpoznawanej sekwencji DNA (Ryc. 20).

W wyjściowym plazmidzie wykorzystywano enzym typu IIS BsmBI (Esp3I), natomiast w nowym plazmidzie CRISPR-DIO nie było to możliwe ze względu na wiele miejsc cięcia dla tego enzymu. Dlatego zaprojektowano nowe miejsca cięcia dla enzymu restrykcyjnego typu IIS, AarI. Dodatkowo do sekwencji wprowadzono miejsce cięcia diagnostycznego MscI, który jest dobrym znacznikiem, czy doszło do usunięcia fragmentu AarI-filler-AarI podczas trawienia i wstawienia sekwencji gRNA. W oryginalnym plazmidzie, zamiast miejsca diagnostycznego MscI znajdował się fragment wypalający o wielkości około 1800 bp.



Ryc. 20. Schemat systemu opartego na enzymach typu IIS do bezszwowego wstawiania dowolnej sekwencji oligonukleotydów, które stwarzają prawidłowo działający sgRNA.

Aby otrzymać tak zaprojektowaną wstawkę AarI-filler-AarI wraz z jego promotorem hU6 zdecydowano się jako pierwsze zmodyfikować miejsce wklonowania gRNA w plazmidzie wyjściowym, Cre-niezależnym (krok 1), a następnie amplifikować miejsce hU6-AarI-filler-AarI (krok 2) i przenieść do docelowego wektora CRISPR-DIO (krok 3). Dodatkowo pozawala to na możliwość wykonania takiej samej procedury klonowania w obu plazmidach, co ułatwia kolejne kroki doświadczenia, gdzie wektor Cre-niezależny jest używany jako pozytywna kontrola.

Wykonano kolejne kroki:

1. Wklonowanie AarI-filler-AarI do plentiCRISPR-hU6-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS
2. Amplifikacja miejsca hU6-AarI-filler-AarI
3. Wklonowanie hU6-AarI-filler-AarI do pCDH-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS

Wektor plentiCRISPR-hU6-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS strawiono przy pomocy enzymu restrykcyjnego BsmBI (Esp3I) (Thermo Scientific, nr. kat. FD0454).

Tab. 12. Trawienie restrykcyjne enzymem BsmBI (Esp3I) Fast Digest

| plentiCRISPR-hU6-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS | Bufor Fast Digest | BsmBI | woda | Warunki reakcji |
|---|-------------------|-------|-------|-----------------|
| 5 µl (1,5 µg) | 2 µl | 1 µl | 12 µl | 37 °C 2 godz. |

Przeprowadzono rozdział elektroforetyczny w 0,5 % żelu agarozowym w warunkach 110 V, 1 godz. w roztworze TBE z MIDORI Green. Jako kontrolę użyto niestrawioną, kolistą plazmidową DNA wektora wyjściowego. Zlinearyzowany plazmid, który po rozdziale elektroforetycznym znajduje się powyżej niepociętego plazmidu wycięto i wyizolowano zestawem *Monarch DNA Gel Extraction Kit*. Zmierzono stężenie, DNA przechowywano na lodzie.

W tym samym czasie wykonano hybrydyzację oligonukleotydów, które budują wstawkę AarI-filler-AarI. Wykorzystano do tego zaprojektowane sekwencje oligonukleotydów:

BsmBI_to_AarI_for: 5' CACCCGATCGCAGGTGGATGGCCAGACACCTGCAGCT
 BsmBI_to_AarI_rev: 5' AAACAGCTGCAGGTGTCTGGCCATCCACCTGCGATC

Tab. 13 Składniki mieszaniny reakcyjnej hybrydyzacji oligonukleotydów i warunki reakcji.

| | | |
|--|-----------------------|--------------------|
| <i>Składniki mieszaniny reakcyjnej</i> | <i>objętość 10 µl</i> | |
| 100 µM BsmBI_to_AarI_for | 1 µl | |
| 100 µM BsmBI_to_AarI_rev | 1 µl | |
| 10x T4 bufor do ligacji | 1 µl | |
| H ₂ O | 7 µl | |
| <i>Warunki reakcji</i> | <i>czas</i> | <i>temperatura</i> |
| Wstępna denaturacja: | 5 min. | 95 °C |
| Hybrydyzacja | 0,1 °C / sek. ↓ | 95 °C → 25 °C |
| Schłodzenie: | 4 °C | ∞ |
| Krótkoterminowo utrzymywano temperaturę 4 °C, przechowywano w -20 °C | | |

Następnie połączono otrzymany insert wraz z wektorem w reakcji ligacji przy użyciu ligazy T4 (Thermo Scientific, nr. kat. 15224017).

Tab. 14 Składniki mieszaniny reakcyjnej ligacji T4 i warunki reakcji

| | | |
|--|-----------------------|--------------------|
| <i>Składniki mieszaniny reakcyjnej</i> | <i>objętość 10 µl</i> | |
| Wektor plentiCRISPR-hU6-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS / BsmBI | 7 µl | |
| Insert AarI-filler-AarI (rozcieńczony 250 razy) | 1 µl | |
| 10x T4 bufor do ligacji | 1 µl | |
| Ligaza T4 (1 U/µl) | 1 µl | |
| <i>Warunki reakcji</i> | <i>czas</i> | <i>temperatura</i> |
| Ligacja | 60 min. | pokojowa |
| Schłodzenie: | 4 °C | ∞ |
| Krótkoterminowo utrzymywano temperaturę 4 °C, przechowywano w -20 °C | | |

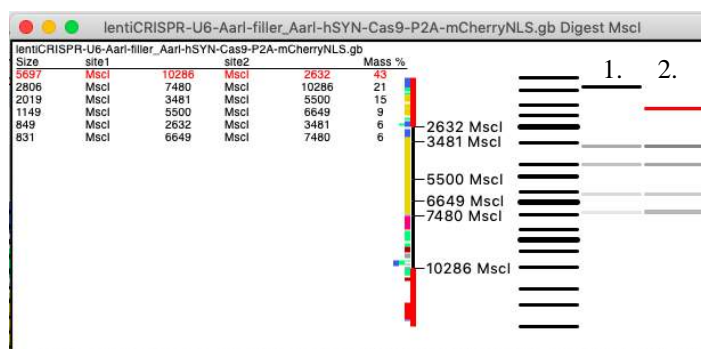
Przeprowadzono transformację bakteryjną uwzględniając kontrolę, sam wektor bez insertu wykorzystując bakterie kompetentne NEB Stable Competent E. coli. Następnego dnia wybrano 5 kultur bakteryjnych, z których założono hodowle płynne. Kolejnego dnia wyizolowano plazmidowe DNA i przeprowadzono trawienie diagnostyczne enzymem restrykcyjnym MscI (Thermo Scientific, nr. kat. FD1214).

Tab. 15 Trawienie diagnostyczne enzymem MscI Fast Digest

| plentiCRISPR-hU6-AarI-filler-AarI-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS | Bufor Fast Digest | MscI | woda | Warunki reakcji |
|--|-------------------|------|-------|-----------------|
| 5 µl (500 ng) | 2 µl | 1 µl | 12 µl | 37 °C 15 min. |

Przeprowadzono rozdział elektroforetyczny w 0,5 % żelu agarozowym w warunkach 110 V, 1 godz. w roztworze TBE z MIDORI Green. Jako kontrolę użyto strawiony przez enzym restrykcyjny

MscI plazmid wyjściowy plentiCRISPR-hU6-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS. Na podstawie poniższego schematu wybrano pozytywne klony.



Ryc. 21. Trawienie plazmidu plentiCRISPR-hU6-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS (1) oraz plentiCRISPR-hU6-AarI-filler-AarI-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS (2) enzymem MscI wraz z zaznaczonym na czerwono prążkiem, który pozwala w łatwy sposób odróżnić, czy wyselekcjonowany klon jest pozytywny.

Wybrane pozytywne DNA plazmidowe zsekwencjonowano i użyto w kolejnym etapie klonowania.

Wektor pCDH-hSYN-DiO-Cas9-P2A-mCherryNLS strawiono przy pomocy enzymu restrykcyjnego BcuI (SpeI) (Thermo Scientific, nr. kat. FD1253).

Tab. 16. Trawienie restrykcyjne enzymem BcuI (SpeI) Fast Digest

| pCDH-hSYN-DiO-Cas9-P2A-mCherryNLS | Bufor Fast Digest | SpeI | woda | Warunki reakcji |
|-----------------------------------|-------------------|------|-------|-----------------|
| 5 µl (2 µg) | 2 µl | 1 µl | 12 µl | 37 °C 1 godz. |

Przeprowadzono rozdział elektroforetyczny w 1 % żelu agarozowym w warunkach 120 V, 1 godz. w roztworze TBE z MIDORI Green. Jako kontrolę użyto niestrawionego, kolisty plazmidowy DNA wektora wyjściowego. Zlinearyzowany plazmid, który po rozdzieleniu elektroforetycznym znajduje się powyżej zamkniętego plazmidu wycięto i wyizolowano zestawem *Monarch DNA Gel Extraction Kit* według opisu z sekcji 3.2.2.1. Zmierzone stężenie, DNA przechowywano na lodzie.

W tym samym czasie, aby uzyskać sekwencję hU6-AarI-filler-AarI wykonano amplifikację sekwencji otrzymanego w poprzednim kroku plazmidu plentiCRISPR-hU6-AarI-filler-AarI-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS. Do reakcji użyto starterów zaprojektowanych w celu przeprowadzenia ligacji opartej na *NEBuilder*:

U6_for: TTTTATCGATACTAGGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAG
trRNA_rev: CACTTGCCTACTAGTTCAAAAAGCACCGACTCGGTG

Reakcję PCR przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* zgodnie z zaleceniami producenta.

Tab. 17. Składniki mieszaniny reakcyjnej polimerazy Phusion i warunki reakcji PCR

| Składniki mieszaniny reakcyjnej | objętość 50 μ l | stężenie końcowe |
|---------------------------------|---------------------|--------------------------|
| 10 μ M U6_for | 2,5 μ l | 0.5 μ M |
| 10 μ M trRNA_rev | 2,5 μ l | 0.5 μ M |
| 5X Phusion HF Bufor | 10 μ l | 1-krotne |
| 10 mM dNTPs | 1 μ l | 200 μ M |
| matrycowe DNA | 0,5 μ l | 10 ng (plazmid) |
| Polimeraza Phusion DNA | 1 μ l | 1.0 units/50 μ l PCR |
| H ₂ O | 32,5 μ l | |

| Warunki reakcji PCR | czas | temperatura |
|----------------------|---------------------------------|-------------|
| Denaturacja wstępna: | 30 sek. | 98 °C |
| 25 cykli: | { 10 sek. 20 sek. 60 sek. | 98 °C |
| | | 61 °C |
| | | 72 °C |
| Końcowa elongacja: | 5 min. | 72 °C |
| Schłodzenie: | 4 °C | ∞ |

Krótkoterminowo utrzymywano temperaturę 4 °C, przechowywano w -20 °C

Przeprowadzono rozdział elektroforetyczny w 1,5 % żelu agarozowym w warunkach 120 V, 1 godz. w roztworze TBE. Fragmenty DNA o wielkości 446 pz wycięto, wyizolowano z żelu i zmierzono stężenie.

Otrzymany linearny wektor oraz insert połączono razem używając *NEBuilder HiFi Assembly Master Mix* i postępowano zgodnie z zaleceniami producenta, przy zmniejszonej objętości mieszaniny reakcyjnej.

Tab. 18. Składniki mieszaniny reakcyjnej ligacji metodą Gibson-Assembly (2 fragmenty) i warunki reakcji

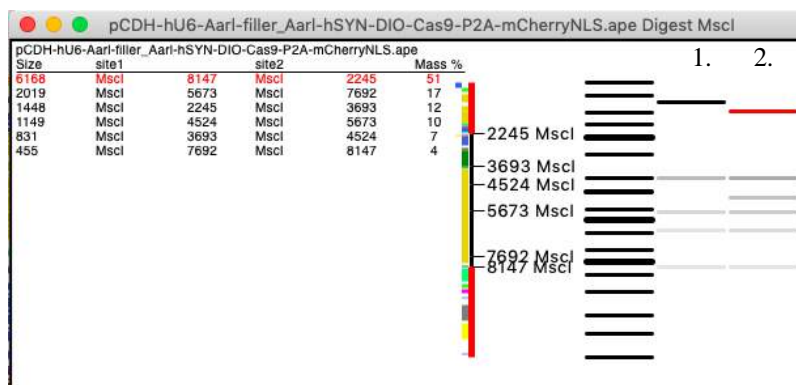
| Składniki mieszaniny reakcyjnej | objętość 50 μ l | stężenie końcowe (zakres) |
|---------------------------------------|---------------------|---------------------------|
| pCDH-hU6-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS | 1 μ l | (50 – 100 ng wektora) |
| hU6-Aarl-filler-Aarl | 0,25 μ l | (10 - 50 ng insert) |
| NEBuilder Master Mix | 2,5 μ l | 2x stężona |

| Warunki reakcji | czas | temperatura |
|-----------------|---------|-------------|
| Ligacja : | 15 min. | 50 °C |
| Schłodzenie: | 4 °C | ∞ |

Krótkoterminowo utrzymywano temperaturę 4 °C, przechowywano w -20 °C

Następnie próbki umieszczano na lodzie i przeprowadzano transformację bakteryjną, uwzględniając kontrolę, sam wektor bez insertu wykorzystując bakterie kompetentne *NEB Stable Competent E. coli*. Następnego dnia wybrano 5 kultur bakteryjnych, z których założono hodowle płynne. Kolejnego dnia wyizolowano plazmidowe DNA i przeprowadzono trawienie diagnostyczne enzymem restrykcyjnym MscI (analogicznie do Tab. 15).

Przeprowadzono rozdział elektroforetyczny w 0,5 % żelu agarozowym w warunkach 110 V, 1 godz. w roztworze TBE z MIDORI Green. Jako kontrolę użyto strawiony przez enzym restrykcyjny MscI plazmid wyjściowy pCDH-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS bez wstawki. Na podstawie poniższego schematu wybrano pozytywne klony.



Ryc. 22. Trawienie plazmidu pCDH-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS (1) oraz pCDH- hU6Aarl-filler-Aarl-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS (2) enzymem MscI wraz z zaznaczonym na czerwono prążkiem, który pozwala w łatwy sposób odróżnić, czy wyselekcjonowany klon jest pozytywny.

Wybrane pozytywne DNA plazmidowe zsekwencjonowano i użyto w kolejnym etapie 3.2.4.

3.2.3. Projekt astrocytarnego plazmidowego wektora CRISPR/Cas9

Korzystając z posiadanych już narzędzi oraz przewidując możliwość wykorzystania techniki CRISPR/Cas9 w celu badania udziału astrocytów w procesach neurodegeneracyjnych, zaprojektowano dodatkowo wektor plazmidowy kierujący ekspresję CRISPR/Cas9 do astrocytów dzięki specyficznemu promotorowi GFAP. Wektor ten został zaprojektowany w sposób, aby zawierał w sobie wszystkie niezbędne kodujące fragmenty DNA:

- elementy odpowiedzialne za pakowanie, transdukcję, stabilną integrację wirusowego konstruktów ekspresyjnego z genomowym DNA
- guide RNA (gRNA) pod promotorem hU6
- Cas9 wraz z białkiem fluorescencyjnym mCherryNLS, pod promotorem astrocytarnym – kwaśnym białkiem włóknienkowym, GFAP (ang. *Glial Fibrillary Acidic Protein*).

Aby wklonować nowy promotor wykonano następujące kroki (opisane w kolejnym podrozdziale): amplifikację nowego promotora hGFAP z innego plazmidu, strawienie plazmidu wyjściowego i ampikonu, a następnie ligacja obu sekwencji.

Aby otrzymać promotor hGFAP wykonano amplifikację danej sekwencji na matrycy plazmidu pCDH-hGFAP-MSC-T2A-EGFP (GFAP: 681 pz). Do reakcji użyto dwóch zaprojektowanych specjalnie starterów, aby do sekwencji promotora GFAP dodać miejsca cięcia EcoRI/XbaI:

```
hGFAP_For          CCTGAATTCAACATATCCTGGTG
hGFAP_Rev          TATCTAGAGCGAGCAGCGGA
```

Reakcję PCR przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, zgodnie z zaleceniami producenta.

Tab. 19. Składniki mieszaniny reakcyjnej polimerazy Phusion oraz warunki reakcji

| Składniki mieszaniny reakcyjnej | objętość 50 μ l | stężenie końcowe |
|---------------------------------|---------------------|--------------------------|
| 10 μ M hGFAP_for | 2,5 μ l | 0.5 μ M |
| 10 μ M hGFAP_rev | 2,5 μ l | 0.5 μ M |
| 5X Phusion HF Bufor | 10 μ l | 1-krotne |
| 10 mM dNTPs | 1 μ l | 200 μ M |
| matrycowe DNA | 0,5 μ l | 20 ng (plazmid) |
| Polimeraza Phusion DNA | 1 μ l | 1.0 units/50 μ l PCR |
| H ₂ O | 32,5 μ l | |

| | | | |
|---|-------------|--------------------|-------|
| <i>Warunki reakcji PCR</i> | <i>czas</i> | <i>temperatura</i> | |
| <i>Denaturacja wstępna:</i> | 30 sek. | 98 °C | |
| 25 cykli: | } 10 sek. | 98 °C | |
| | | 20 sek. | 61 °C |
| | | 60 sek. | 72 °C |
| <i>Końcowa elongacja:</i> | 5 min. | 72 °C | |
| <i>Schłodzenie:</i> | 4 °C | ∞ | |
| <i>Krótkoterminowo utrzymywano temperaturę 4 °C, przechowywano w -20 °C</i> | | | |

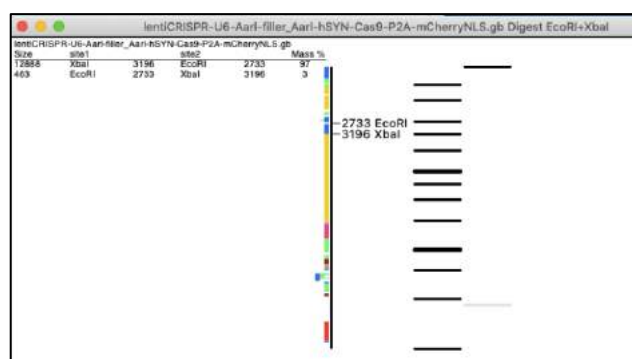
Przeprowadzono rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR w 1 % żelu agarozowym w warunkach 120 V, 40 min. w roztworze TBE z MIDORI Green. Fragmenty DNA o wielkości 698 pz wycięto, wyizolowano z żelu analogicznie do poprzednio wykonanych procedur i zmierzono stężenie.

Następnie wektor lentiCRISPR-hU6-AarI-filler-AarI-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS oraz uzyskany amplikon hGFAP strawiono przy pomocy enzymów restrykcyjnych EcoRI/XbaI (Thermo Scientific, nr kat. ER0271, ER0681). Warunki reakcji podwójnego trawienia restrykcyjnego ustalono za pomocą dostępnego kalkulatora on-line na stronie producenta.

Tab. 20. Trawienie restrykcyjne enzymem EcoRI/XbaI

| | | | | | |
|--|----------------|--------|------|--------|-----------------|
| pLentiCRISPR-AarI-filler-AarI-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS | Bufor Tango 2x | EcoRI | XbaI | woda | Warunki reakcji |
| 5 µl (2 µg) | 4 µl | 0,5 µl | 1 µl | 9,5 µl | 37 °C 12 godz. |
| hGFAP | Bufor Tango 2x | EcoRI | XbaI | woda | Warunki reakcji |
| 5 µl (1 µg) | 4 µl | 0,5 µl | 1 µl | 9,5 µl | 37 °C 12 godz. |

Przeprowadzono rozdział elektroforetyczny w 1 % żelu agarozowym w warunkach 110 V, 1 godz. w roztworze TBE, uwzględniając jako kontrolę niestrawiony plazmid. Po rozdziale wycięto z żelu docelowe prążki: amplikon o długości 693 pz, a także linearny wektor o długości 12888 pz, pozostawiając usunięty stary promotor hSYN (463 pz) (Ryc. 23).



Ryc. 23. Schemat cięcia restrykcyjnego plazmidu pLentiCRISPR-AarI-filler-AarI-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS enzymami EcoRI/XbaI.

Połączono otrzymany insert wraz z wektorem w reakcji ligacji przy użyciu ligazy T4 w stosunku 1:3:

Tab. 21. Składniki mieszaniny reakcyjnej ligacji T4 oraz warunki reakcji

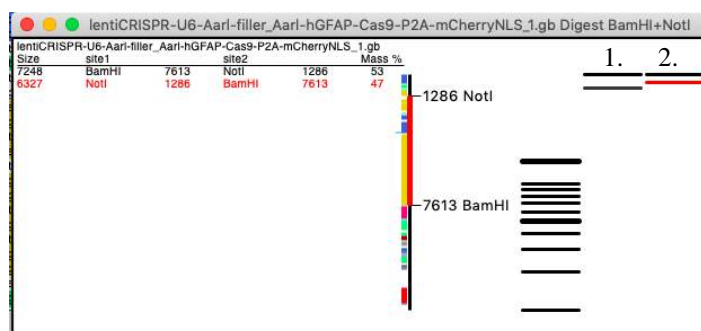
| | | |
|---|----------------|-----------------------|
| <i>Składniki mieszaniny reakcyjnej</i> | | <i>objętość 10 µl</i> |
| <i>Wektor plentiCRISPR-hU6-AarI-filler-AarI-Cas9-P2A-mCherryNLS / EcoRI/XbaI (100 ng)</i> | | <i>7 µl</i> |
| <i>Insert hGFAP / EcoRI/XbaI (33 ng)</i> | | <i>1 µl</i> |
| <i>10x T4 bufor do ligacji</i> | | <i>1 µl</i> |
| <i>Ligaza T4 (1 U/µl)</i> | | <i>1 µl</i> |
| | | |
| <i>Warunki reakcji</i> | <i>czas</i> | <i>temperatura</i> |
| <i>Ligacja</i> | <i>60 min.</i> | <i>pokojowa</i> |
| <i>Schłodzenie:</i> | <i>4 °C</i> | <i>∞</i> |
| <i>Krótkoterminowo utrzymywano temperaturę 4 °C, przechowywano w -20 °C</i> | | |

Przeprowadzono transformację bakteryjną uwzględniając kontrolę (wektor bez insertu) wykorzystując bakterie kompetentne *NEB Stable Competent E. coli*. Następnego dnia wybrano 5 kultur bakteryjnych, z których założono hodowle płynne. Kolejnego dnia wyizolowano plazmidowe DNA i przeprowadzono trawienie diagnostyczne enzymami restrykcyjnymi BamHI/NotI (Thermo Scientific, nr. kat. ER0055, ER0591).

Tab. 22. Trawienie restrykcyjne (diagnostyczne) enzymami BamHI/NotI

| pLentiCRISPR-AarI-filler-AarI-hGFAP-Cas9-P2A-mCherryNLS | Bufor Tango 2x | BamHI | NotI | woda | Warunki reakcji |
|---|----------------|--------|------|--------|-----------------|
| 5 µl (500 ng) | 4 µl | 0,5 µl | 1 µl | 9,5 µl | 37 °C 12 godz. |

Przeprowadzono rozdział elektroforetyczny w 0,5 % żelu agarozowym w warunkach 110 V, 1 godz. w roztworze TBE z MIDORI Green. Na podstawie poniższego schematu wybrano pozytywne klony.



Ryc. 24. Trawienie restrykcyjne enzymami BamHI/NotI plazmidu pLentiCRISPR-AarI-filler-AarI-Cas9-P2A-mCherryNLS (1.) oraz pLentiCRISPR-AarI-filler-AarI-hGFAP-Cas9-P2A-mCherryNLS (2.). Zaznaczone na czerwono są prążki, które pozwalają rozróżnić plazmid z nowym promotorem, od wyjściowego plazmidu bez promotora.

Materiał DNA z pozytywnych klonów wysłano do sekwencjonowania w celu potwierdzenia selekcji pozytywnego plazmidu z nową sekwencją promotora GFAP.

3.2.4. Projektowanie fragmentu RNA-przewodnika (gRNA) i wklonowanie sekwencji do gotowych plazmidów

Odpowiedni dobór guide RNA jest kluczowym etapem w stworzeniu funkcjonalnego wektora CRISPR/Cas9. Na potrzeby niniejszego projektu zaplanowano usunięcie białka TIF-1A lub RPA194,

aby wywołać progresywną degenerację transdukowanej komórki. Wybrane gRNA wklonowano do wszystkich 3 wektorów CRISPR/Cas9, a następnie przeprowadzono weryfikację *in vitro*, a następnie *in vivo*.

Aby zaprojektować gRNA, składającym się z około 20 nukleotydów, trzeba wybrać odpowiedni egzon kodujący z danego genu oraz sekwencję wraz z miejscem PAM, która będzie unikalna dla całego genomu. Standardową procedurą jest wybranie kodującego egzonu pierwszego, zaraz po pierwszym kodonie ATG, aby przesunąć ramkę odczytu w całej sekwencji genu. Do przetestowania w eksperymencie wybrano po trzy wersję gRNA z każdego wybranego egzonu *Rrn3* kodującego białko TIF-IA oraz *PolR1a*, sekwencji kodującej podjednostkę A polimerazy I (białko RPA194), obie niezbędne dla funkcjonowania polimerazy I. W obu genach wybrano egzon pierwszy i drugi, w genie *Rrn3* dodatkowo egzon 12 i 13, ze względu na to, że w mysich mutantach TIF-IA^{DbhCre} usunięty został fragment DNA zawierający egzony 12-14 (Yuan et al., 2005).

Pierwsze znaleziono odpowiednią sekwencję genu w bazie NCBI gene database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). Dla przykładu, dla genu *Rrn3*, jest to: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/106298>. Sekwencję ściągnięto w formacie *GeneBank* (.gb) i posłużono się programem ApE, aby znaleźć sekwencję kodującą dany egzon (CDS, ang. *Coding Sequence*). Dla przykładu, dla mysiego genu *Rrn3*, pierwszy egzon:

Sekwencja pierwszego egzonu kodującego genu *Rrn3*:

```
ATGGCGGCCCGCTGCTTCACACGCGCTTGTCGGGCGATGTGACGGCAGCGGCCTCTGCCACGCTGA  
GTGCGTCGCGGACTGG
```

Sekwencję analizowano on-line przy pomocy platformy CRISPOR <http://crispor.tefor.net/>, wybrano referencyjny genom myszy oraz odpowiedni PAM, który zależy od rodzaju używanego enzymu Cas9 (NGG). Z wygenerowanej listy teoretycznych sekwencji (przykładowo egzon pierwszy genu *Rrn3*: <http://crispor.tefor.net/crispor.py?batchId=gEavCRD3qRoGTkmCouEB>), które mogą tworzyć gRNA, opierając się na najlepszej specyficzności oraz jak najmniejszej ilości „off targets” wybrano po minimum dwie sekwencje na dany egzon kodujący. Dla każdej sekwencji zaprojektowano parę starterów, oligonukleotydów, które są do siebie homologiczne i zawierają na końcach sekwencję oligo_FOR: 5' CACCG- 20 nt 3' oraz oligo_REV: 5' AAAC- 20 pz -C 3', kompatybilną do miejsc trawienia enzymem restrykcyjnym AarI (Ryc. 20). Wszystkie gotowe sekwencje wraz z oligonukleotydami zawarto w tabeli (Tab. 39).

Aby wklonować wybraną sekwencję gRNA do wektora plentiCRISPR-hU6-AarI-filler-AarI-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS, plentiCRISPR-hU6-AarI-filler-AarI-hGFAP-Cas9-P2A-mCherryNLS oraz pCDH-hU6-AarI-filler-AarI-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS każdorazowo wykonywano następujące kroki:

- Strawiono wszystkie plazmidy enzymem restrykcyjnym AarI i wykonano oczyszczanie DNA zestawem typu Clean Up DNA, gdzie wycięta wstawka AarI-filler-AarI ze względu na niewielką wielkość nie zostanie osadzona na kolumnie wiążącej DNA.
- Wykonano hybrydyzację oligonukleotydów wraz z fosforylacją T4 PNK, dobierając metodą prób i błędów optymalne warunki dla tego procesu
- Wykonano ligację T4 (dobierając kilkakrotnie odpowiedni stosunek wektora do insertu, wraz z testowaniem odpowiedniej ilości ligazy oraz optymalną długością procesu ligacji) otrzymując plazmidy ze wstawionym gRNA
- W celu selekcji, czy sekwencja gRNA została poprawnie wstawiona w miejsce cięcia AarI każdorazowo wykonywano trawienie diagnostyczne enzymem restrykcyjnym MscI, a następnie

potwierdzano przez sekwencjonowanie miejsca wstawienia. Ostatecznie otrzymano wszystkie zakładane wersje plazmidów

Wektor plazmidowy plentiCRISPR-hU6-AarI-filler-AarI-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS, plentiCRISPR-hU6-AarI-filler-AarI-hGFAP-Cas9-P2A-mCherryNLS oraz pCDH-hU6-AarI-filler-AarI-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS strawiono enzymem restrykcyjnym AarI (Thermo Scientific, nr. kat. ER1581).

Tab. 23. Trawienie restrykcyjne enzymem AarI w celu wklonowania gRNA.

| CRISPR-hU6-AarI | 10x bufor AarI | 50x TF oligo AarI | AarI | woda | Warunki reakcji |
|-----------------------|----------------|-------------------|-------------------|-------------|-----------------|
| 5 μ l (2 μ g) | 2 μ l | 1 μ l | 0,5 μ l (1 U) | 0,5 μ l | 37 °C 12 godz. |

Po całonocnym trawieniu restrykcyjnym opierając się na poprzednich próbach, zamiast rozdziału na żelu wykonano doczyszczanie plazmidu zestawem Monarch PCR & DNA Clean Up Kit (New England BioLabs, nr. kat. T1030S). Wycięta wstawka AarI-filler-AarI jest bardzo krótką sekwencją, którą nie da się odzyskać z izolacji, dlatego oczyszczanie DNA metodą clean-up jest rozwiązaniem bardziej wydajnym, niż odzysk DNA z żelu po rozdziale elektroforetycznym. Postępowano zgodnie z zaleceniami producenta dodatkowo wprowadzając modyfikację: na etapie elucji użyto ogrzanego do 70 °C roztworu EB (ang. *Elution Buffer*), a także kolumny inkubowano 5 min. w 70 °C.

W tym samym czasie wykonano hybrydyzację oligonukleotydów, które budują gRNA. Wykorzystano do tego zaprojektowane sekwencje oligonukleotydów oraz wykonano fosforylację używając do tego enzymu T4 PNK (Thermo Scientific, nr. kat. EK0031).

Tab. 24. Składniki mieszaniny reakcyjnej łączenia oligonukleotydów z fosforylacją oraz warunki reakcji

| | | |
|---|--------------------------------------|--------------------|
| <i>Składniki mieszaniny reakcyjnej</i> | <i>objętość 10 μl</i> | |
| 100 μ M <i>guide_1</i> | 1 μ l | |
| 100 μ M <i>guide_1_REV</i> | 1 μ l | |
| 10x T4 bufor do ligacji | 1 μ l | |
| T4 PNK | 0,5 μ l | |
| H ₂ O | 7 μ l | |
| <i>Warunki reakcji</i> | <i>czas</i> | <i>temperatura</i> |
| Fosforylacja | 30 min. | 37 °C |
| Wstępna denaturacja: | 5 min. | 95 °C |
| Hybrydyzacja | 0,1 °C / sek. ↓ | 95 °C → 25 °C |
| Schłodzenie: | 4 °C | ∞ |
| <i>Krótkoterminowo utrzymywano temperaturę 4 °C, przechowywano w -20 °C</i> | | |

Połączono otrzymany insert wraz z wektorem w reakcji ligacji przy użyciu ligazy T4.

Tab. 25 Składniki mieszaniny reakcyjnej ligacji T4 oraz warunki reakcji

| | |
|--|--------------------------------------|
| <i>Składniki mieszaniny reakcyjnej</i> | <i>objętość 10 μl</i> |
| Wektor CRISPR / AarI | 7 μ l |
| Insert gRNA (rozcieńczony 250 razy) | 1 μ l |
| 10x T4 bufor do ligacji | 1 μ l |
| Ligaza T4 | 1 μ l |

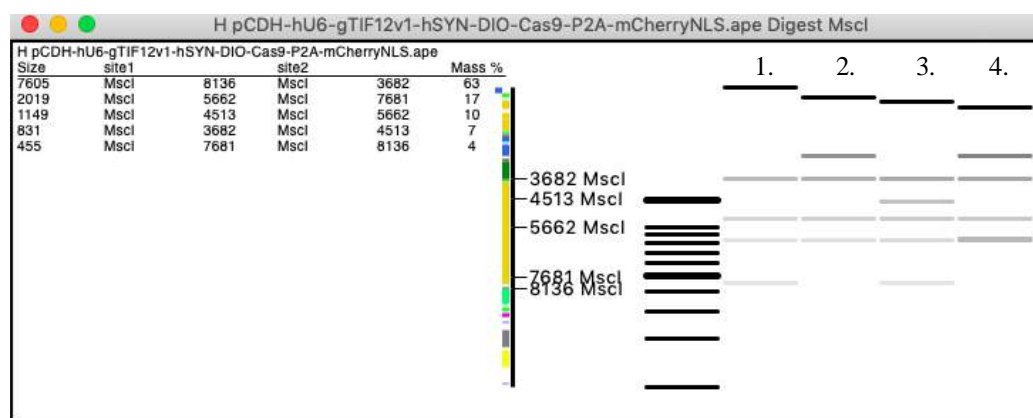
Warunki reakcji
Ligacja
Schłodzenie:

czas
60 min.
4 °C

temperatura
pokojowa
∞

Przeprowadzono transformację bakteryjną uwzględniając kontrolę, sam wektor bez insertu wykorzystując bakterie kompetentne *NEB Stable Competent E. coli*. Następnego dnia wybrano 5 kultur bakteryjnych, z których założono hodowle płynne. Wydajność reakcji może być ograniczona przez niepełne cięcie enzymem AarI, co również widoczne jest na płycie kontrolnej, w której też obecne są kolonie niestrawionego plazmidu. Kolejnego dnia wyizolowano plazmidowe DNA i przeprowadzono trawienie diagnostyczne enzymem restrykcyjnym MscI.

Przeprowadzono rozdział elektroforetyczny w 0,5 % żelu agarozowym w warunkach 110 V, 1 godz. w roztworze TBE z MIDORI Green. Jako kontrolę użyto strawiony przez enzym restrykcyjny MscI plazmid wyjściowy plentiCRISPR-hU6-AarI-filler-AarI-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS lub pCDH-hU6-AarI-filler-AarI-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS. Na podstawie poniższego schematu wybrano pozytywne klony.



Ryc. 25. Trawienie diagnostyczne plazmidu (po kolei od lewej za markerem): pCDH-gRNA-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS (1), pCDH-hU6-AarI-filler-AarI-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS (2), plentiCRISPR-hU6-gRNA-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS (3), plentiCRISPR-hU6-AarI-filler-AarI-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS (4) enzymem MscI

Wybrane pozytywne DNA plazmidowe zsekwencjonowano, namnożono i wyizolowano zestawem Plasmid Midi AX, a następnie użyto w kolejnych etapach, opisanych w rozdziałach 3.2.6 oraz 3.3.1.

3.2.5. Hodowla HEK293T

Komórki linii HEK293T (ang. *Human Embryonic Kidney 293 Cells*) są to komórki wywodzące się z embrionalnych ludzkich komórek nerki, i wykazujące ekspresję dużego antygeny SV40 T. Jest to jedna z najpopularniejszych linii komórkowych wykorzystywana w wielu dziedzinach nauki. Komórki te używano w celu wykorzystania ich do produkcji wektorów lentiwirusowych, a także do weryfikacji działania plazmidów. Hodowlę adherentnych komórek prowadzono w butelkach o objętości 75 ml (TPP, nr kat. 90076) i utrzymywano w inkubatorze (RSBiotech Galaxy S) w temperaturze 37° C, atmosferze 5 % CO₂ oraz wilgotności powietrza na poziomie 95 %. Do hodowli używano pożywkę Advanced DMEM (ang. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; Gibco, nr kat. 12491023), z podwyższoną zawartością glukozy (4500 mg/L) i uzupełnionej do 5 % (v/v) płodową surowicą bydlęcą FBS (ang. *Fetal Bovine Serum*, Gibco, nr kat. 10500064), 1 % (v/v) roztworem Glutamax (Gibco, nr kat. 35050061) oraz 1 % (v/v) roztworem antybiotyku penicyliny ze streptomycyną (100 U/ml, Gibco, nr kat. 15140148). Warunki pracy z komórkami były sterylne, w komorze laminarnej (ESCO Class II

BSC), po odpowiednim oczyszczeniu powierzchni 70 % alkoholem oraz 15 minutową sterylizacją lampą UV. Pasaż prowadzono, kiedy komórki osiągnęły 90 % konfluencji wykorzystując do tego sterylny PBS bez zawartości jonów (ang. *Phosphate-Buffered Saline*, Gibco, nr kat. 20012027) oraz rozcieńczoną w PBS 0,005 % trypsynę z EDTA (Gibco, nr kat. R001100). Część komórek, na początkowym etapie hodowli bankowano (zachowywano zamrożone komórki do wykorzystania w późniejszym czasie) w zawiesinie FBS z DMSO (Sigma, nr kat. D2650) i utrzymywano w oparach ciekłego azotu.

3.2.6. Transfekcja plazmidem ekspresyjnym

Komórki HEK293T pasażowano na płytki 96 dołkowe (TPP, nr kat. Z707902), a na następny dzień, kiedy osiągnęły konfluencję 70 % wykonywano transfekcję plazmidem ekspresyjnym. W tym celu przygotowywano roztwór DNA w pożywce Opti-MEM (Gibco, nr. kat. 11058021) o docelowym stężeniu 1 µg/µl wraz z PEI (ang. *Poly(ethyleneimine) Solution*, 1 mg/ml, Sigma-Aldrich, nr kat. 764965-1G). Współczynnik R, oznaczający stosunek µl PEI do µg DNA wynosił 4. Roztwór wytrząsnięto i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 min., a następnie delikatnie dodano do odpowiednich dołków na płytce. Po 24 godz. sprawdzano poziom transfekcji przez obserwację białek fluorescencyjnych.

3.3. Produkcja i weryfikacja skuteczności działania wektorów lentiwirusowych (LV)

Decyzja o wdrożeniu samodzielnej produkcji podyktowana była koniecznością przygotowania wielu wektorów testowych w niewielkich ilościach oraz później, produkcją dużej ilości wektorów do podań *in vivo*. Dostosowanie wydajnej produkcji lentiwirusów wymagało wielu prób i analizy porównawczej, ale przyniosło wymierne oszczędności finansowe i czasowe. W produkcji użyto systemu trzeciej generacji zapewniającego wysoki poziom bezpieczeństwa.

3.3.1. Hodowla komórek oraz transfekcja plazmidami pakującymi i plazmidem transferowym

Każdorazowo do wyprodukowania objętości 150 µl wektorów lentiwirusowych (LV) wykorzystywano 6 butelek HEK293T (o niskim stopniu pasażowania), które pierwszego dnia procedury pasażowano na 18 szalek o średnicy 10 °cm (TPP, nr. kat. 93100) otrzymując około $1,1 \times 10^6$ komórek na szalce. Komórki na szalkach hodowano w specjalnym medium: pożywka Advanced DMEM, z obniżoną ilością do 3 % (v/v) FBS, 1 % (v/v) roztworem Glutamax, 25 mM HEPES (Gibco, nr. kat. 15630056) oraz antybiotykiem Normocyną (100 µg/ml, Invivogen, nr kat. 15140148). Następnego dnia, po osiągnięciu przez komórki minimum 75 % konfluencji wykonano transfekcję plazmidami pakującymi oraz plazmidem transferowym. W tym celu przygotowano zawiesinę DNA plazmidowego w pożywce Opti-MEM, wykorzystując plazmid transferowy oraz plazmidy pakujące 3 generacji. Lentiwektor transferowy zawiera elementy odpowiedzialne za pakowanie, , stabilną integrację wirusowego konstrukt ekspresyjnego z genomowym DNA i ekspresję sekwencji docelowego genu. Wektory pakujące dostarczają wszystkich białek niezbędnych do stworzenia cząsteczki wirusa oraz transkrypcji i pakowania kopii RNA konstrukt ekspresyjnego w rekombinowane cząstki wirusowe.

Tab. 26. Produkcja lentiwirusów plazmidami pakującymi III generacji

| Wektor | Ilość (µg) na 1 szalkę (na 10 ml pożywki) | Wielkość plazmidu (kb) | Funkcja |
|---------------------|---|------------------------|---|
| Plazmid transferowy | 4 | 12 | Koduje sekwencję, która ma zostać zapakowana w lentiwirusie |
| pMDLg/pRRE | 2 | 8.8 | Koduje HIV-1/GAG/POL |
| pRSV/REV | 2 | 4.2 | Koduje HIV-1-REV (białko regulatorowe) |
| pMD2.G | 2 | 5.8 | Koduje glikoproteinę VSV (białko otoczki wirusa) |

Mieszaninę DNA wymieszano z roztworem *polietylenoiminy* (PEI) w stosunku 1:4, czyli na jedną szalkę użyto 40 µl PEI (1 µg/µl). Roztwór wytrząsnięto i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 min., a następnie delikatnie dodano do każdej szalki. Komórki przechowywano w inkubatorze w temperaturze 37° C, atmosferze 5 % CO₂ przez 72 godz. i przechodzą do procedury izolacji lentiwirusów.

3.3.2. Izolacja wektorów lentiwirusowych (LV)

72 godz. po transfekcji pożywkę z dna komórek, która zawiera wyprodukowane cząsteczki lentiwirusa w sterylnych warunkach zebrano do falkonów o pojemności 50 ml i zwirowano przez 5 min. w 300 g w celu oczyszczenia. Martwe komórki oraz części komórkowe, które się odkleiły od dna szalek w tym etapie tworzą pelet na dnie falkona. Następnie supernatant przefiltrowano filtrem 0,45 µm (Millipore, nr. kat. X338.1) i przelano do oczyszczonych i wysterylizowanych wielorazowych kolb ultrawirówkowych (Beckman, nr. kat. 355618). Kolby zakręcono, a następnie zważono i rozłożono w rotorze (Beckman 50.2Ti), aby zachować równowagę. Zawiesinę wirowano przez 1,5 godz. w 120000 g w ultrawirówce (Beckman). Po tym czasie przeniesiono kolby wirówkowe pod sterylny laminar i usunięto nadsącz. Resztki pożywki starannie usunięto z kolby i pozostawiono do lekkiego wysuszenia przez 2 – 3 min. Widoczne białe, niewielkie pelety składające się z wirusów zawieszono w DPBS (ang. *Dulbecco's PBS*, Gibco, nr. kat. 14200075), otrzymując w sumie w 150 µl zawiesiny z LV z jednej tury izolacji z wyjściowej ilości 18 szalek komórek o średnicy 10 cm. Następnie LV rozporcjowano na lodzie po 11 µl do sterylnych próbek typu Eppendorf i przechowywano w -80° C. Ze względu na dużą wrażliwość lentiwirusów na zmiany temperatury, wektory po jednokrotnym rozmrożeniu nie były zamrażane ponownie.

3.3.3. Określenie miana wektorów lentiwirusowych (LV)

Aby zmierzyć ilość cząsteczek lentiwirusów otrzymanych podczas izolacji metodą ultrawirowania posłużono się testem Elisa (MyBioSource nr. kat. 168055). Dołki w tym teście pokryte są przeciwciałami anty-HIV-1 p24, które wiążą białko p24 obecne w testowanej próbce (białko b24 jest głównym składnikiem wirusów typu HIV-1). Posłużono się załączonym protokołem używając czytnika spektrofotometrycznego (BioTek Synergy Mx), aby zmierzyć substrat otrzymany po reakcji enzymatycznej streptawidyny-HRP. Wyniki naniesiono na standardową krzywą białka p24 i wyliczono ilość cząsteczek w roztworach.

Niestety test ELISA-p24 może zafałszować rzeczywiste wyniki, ponieważ niefunkcjonalne cząsteczki wirusa (puste, bez sekwencji ekspresyjnej lub fragmenty wirusa który uległ zniszczeniu) również mogą się dołączyć do przeciwciała użytego w teście. Aby oszacować funkcjonalne stężenie izolowanych plazmidów i dobrać odpowiednią objętość, jaką należy transdukować neurony *in vitro* i *in vivo* wykonano próbną transdukcję neuronów rozcieńczonymi wirusami (titracja). W tym celu pierwotną hodowlę neuronów korowych (opis hodowli 3.4.1) infekowano mieszkankami odpowiednio rozcieńczonych w PBS wektorów wirusowych. Każde warunki eksperymentalne powtórzono 2-krotnie.

Zainfekowane komórki inkubowano przez 7 dni do czasu dalszej analizy (procedura immunofluorescencji opisana w podrozdziale 3.4.4). Następnie korzystając z faktu, że liczba cząsteczek wirusa która transdukuje każdą komórkę jest opisywana przez rozkład Poissona, obliczono MOI (ang. *Multiplicity of Infection*; mnogość infekcji) czyli stosunek liczby dodanych cząsteczek wirusa do liczby komórek na dołku, a następnie obliczono liczbę cząsteczek wirusa zdolnych do transdukcji, która znajduje się w 1 ml zawiesiny wirusa.

$$MOI = -\ln X$$

X – część komórek niezainfekowana wirusem

$$TU/ml = \frac{K96 \times MOI}{LV}$$

K96 – liczba komórek na dołku płytki 96-dołkowej

TU/ml – jednostki transdukujące (ang. *Transduction Units*) w 1ml zawiesiny wirusa

LV – objętość dodanego wirusa [ml]

Każdorazowo po izolacji lentiwirusów sprawdzano daną partię infekując neurony w hodowli pierwotnej.

3.4. Walidacja działania funkcjonalnego wektora *in vitro*

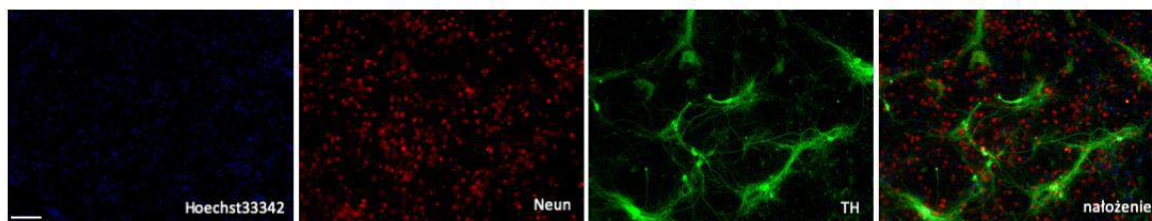
Stworzony w ramach pracy doktorskiej system Cre-zależnej ekspresji Cas9, jest pierwszym takim systemem przeznaczonym do pracy z neuronami w którym wszystkie elementy systemu CRISPR – zarówno Cas9 jak i sgRNA zawierają się w jednym wektorze. Ponieważ konstrukt ten ma dużo potencjalnych przyszłych zastosowań, dzięki łatwości w przygotowaniu docelowego wektora (wkładowanie wybranego gRNA, rozdział 3.2.4) ważnym aspektem tego eksperymentu była jego walidacja na hodowlach *in vitro*. W tym celu zaplanowano serię eksperymentów z wektorem kontrolnym, który dzięki wstawionemu gRNA, który wycisza ekspresję białka fluorescencyjnego EGFP w obrazowy sposób pokaże działanie konstrukt. Eksperymenty polegały na podaniu wirusa, który wywoła ekspresję EGFP oraz CRE w neuronach, a następnie podanie wirusa CRISPR-DiO wyciszającego ekspresję EGFP. Wektor CRISPR-DiO, który ma na celu usunięcie białka TIF-1A lub RPA194 i wywołanie śmierci zainfekowanej komórki był podawany w drugiej kolejności, kiedy weryfikacja wektora kontrolnego przebiegła pomyślnie. Analogicznie przeprowadzono eksperymenty na astrocytach. Infekowano komórki lentiwirusami, które wywołują ekspresję EGFP, a następnie wirusami lenti-CRISPR-GFAP, który wycisza *EGFP*, lub *Rrn3* lub *Polr1a*.

3.4.1. Hodowle mysich pierwotnych neuronów korowych i dopaminowych

Płytki 96- i 384-dołkowe PhenoPlate (PerkinElmer nr. kat. 6055302, 6057302), które posiadają specjalne dno dostosowane do obrazowania konfokalnego oraz 6-dołkowe (TPP, nr. kat. 92006) pokrywano niskocząsteczkową poliornityną (Sigma-Aldrich, nr. kat. P4538) dzień wcześniej i przechowywano do dnia izolacji w 4° C. Przed izolacją płytki odpłukiwano 3-krotnie sterylną wodą dejonizowaną.

Pierwotne neurony dopaminowe izolowano z płodów mysich szczepu C57BL/6N pochodzących z hodowli własnej Instytutu Farmakologii PAN w 13,5 dniu ciąży. Samicę uśmiercano przez dyslokację rdzenia i pobierano płody na szalkę z ochłodzonym roztworem PBS z 1 % BSA (Sigma-Aldrich, nr. kat. A9418). Na lodzie wyciągnięto płody z worków owodniowych, następnie za pomocą lupy dokładnie wyizolowano z nich śródmózgowie. Tkankę ze wszystkich płodów złączono w jednej próbówce i za pomocą igły pofragmentowano na mniejsze części. Fragmenty tkanki umieszczono w roztworze trypsyny 0,5 % (MP Biomedicals nr. kat. TRP0004.25) i inkubowano w cieplarni w temperaturze 37° C przez 20 min. Po tym czasie do roztworu dodano mieszaninę enzymu DNA-zy o stężeniu 1 ng/ml (Roche nr. kat. 11284932001) z 50 % FBS i HBSS bez jonów (Gibco, nr. kat. 14175-

095) i mechanicznie rozbijano strawioną tkankę używając pipetę 1 ml. Zawiesinę komórek zbierano w falkonie 15 ml. Czynność powtarzano trzykrotnie, aż do uzyskania całkowitego rozbicia tkanek. Zawiesinę zwirowano i zawieszano w pożywce hodowlanej, składającej się z pożywki DMEM/F-12 (Gibco, nr. kat. 21331-020), suplementu N2 (Gibco nr. kat. 17502048), 2 mM L-glutaminy (Gibco, nr. kat. 25030149), 25 mM buforu HEPES oraz antybiotyku Prymocyny (Invivogen, nr. kat. ant-pm-1). Czynność powtórzono trzykrotnie, w celu dokładnego odpłukania komórek. Komórki naniesiono na płytki z komorą do zliczania komórek (Bio-Rad nr. kat. 145-0011) i zliczono za pomocą automatycznego licznika komórek (Bio-Rad TC20). Komórki wysiewano na wcześniej przygotowane płytki 384 dołkowe w ilości 20 tys. na dołek i inkubowano w temperaturze 37° C, atmosferze 5 % CO₂ oraz wilgotności powietrza na poziomie 95 %. Po 4 dniach zmieniono 50 % medium na nowe. Weryfikację hodowli na obecność neuronów dopaminowych weryfikowano podczas barwienia immunofluorescencyjnego na obecność hydroksylazy tyrozynowej (Ryc. 26) (opisane w rozdziale 3.4.4)



Ryc. 26. Pierwotna hodowla neuronów dopaminowych w 5 dniu hodowli. Skala 100 µm.

Pierwotne neurony korowe izolowano analogicznie jak neurony dopaminowe, ale używając do tego celu płodów mysich z 17-dniowej ciąży. Wyizolowane mózgi płodów, które w tym dniu ciąży wykształcają już cienkie kości czaszki, umieszczano w szalkach z zimnym HBSS, usuwano błonę naczyńiówkę i oddzielano korę mózgu od innych wewnętrznych struktur. Wyizolowaną tkankę analogicznie trawiono i zawieszano w pożywce hodowlanej składającej się z pożywki Neurobasal (Gibco, nr. kat. 12349-015), suplementu B-27 (Gibco, nr. kat. 17504044), 1 % (v/v) roztworu Glutamax i antybiotykiem Prymocyną. Po zliczeniu komórki wysiewano na płytki 384-dołkowe w ilości 15 tys. na dołek, 96 dołkowe w ilości 60 tys. na dołek lub 6 dołkowe w ilości 1,2 miliona na dołek. Po 4-5 dniach wymieniało 50 % medium hodowlanego na nowe.

3.4.2. Hodowle mysich pierwotnych astrocytów

Analogicznie do procedury izolacji neuronów, przygotowano butelki hodowlane 75cm. Pierwotne astrocyty izolowano z 2 dniowych osesków mysich szczepu C57BL/6N pochodzących z hodowli własnej. Wykonywano dekapitację ostrymi nożyczkami, izolowano mózg i wyciągano całe półkule kory mózgowej, które zawieszano w schłodzonym HBSS bez jonów. Na sterylnej szalce i pracując pod komorą laminarną pocięto mózgi skalpelem na drobne części (Swann-Morton nr kat. 0208). Tkankę zawieszono w trypsynie 1 % (v/v) i inkubowano w cieplarni w temperaturze 37° C przez 15 min. Po tym czasie do roztworu dodano mieszaninę enzymu DNA-zy o stężeniu 1 ng/ml i mechanicznie rozbito przez wciąganie roztworu do pipety serologicznej. Inkubowano 20 min. w 37° C, z dodatkowymi dwoma przerwami na mechaniczne rozbijanie tkanki. Następnie zawiesinę komórkową przefiltrowano przez sitko 70 µm (Falcon, nr kat. 352360) oraz przepłukano 10 ml PBS bez jonów. Komórki odwirowano (300 g, 10 min.) i zawieszono w ciepłym medium hodowlanym składającym się z *Advanced* DMEM uzupełnionym 10 % (v/v) HS (końska surowica, Thermofisher Scientist, nr kat. 16050130), 1 % (v/v) roztworem Glutamax i antybiotykiem Prymocyną. Hodowle utrzymywano w inkubatorze w temperaturze 37° C, atmosferze 5 % CO₂ oraz wilgotności powietrza na poziomie 95 %, zmieniając medium na świeże co 2-3 dni. Po około 2 – 3 tygodniach komórki pasażowano używając

trypsyny 0,1 %, poprzedzonej 20 min. inkubacją komórek z przefiltrowanym PBS z dodatkiem 1 mM EDTA. Komórki wysiewano po 10 tys. na dołek, na wcześniej pokryte poli-ornityną płytki 384-dołkowe. Po 2 dniach inkubacji zmieniono medium na medium hodowlane z dodatkiem 2,5 μ M arabinozydu cytozyny (AraC, Sigma-Aldrich, nr kat. C1768-100 mg) w celu zahamowania dalszego wzrostu komórek i usunięcia progenitorów, który uniemożliwiłby ocenę ilościową komórek na płytce. Po kolejnych 2 dniach zmieniano medium na hodowlane.

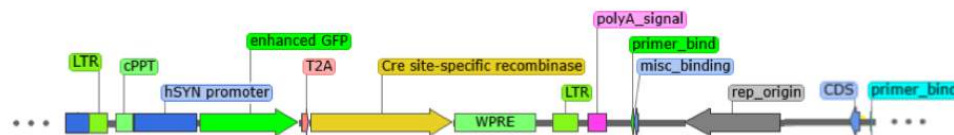
3.4.3. Transdukcja komórek *in vitro*

W celach transdukcji neuronów używano 2-dniową hodowlę neuronalną dopaminową lub korową. W zależności od eksperymentu używano następujące neuronalne lentiwirusy w różnych kombinacjach:

- LV-pCDH-hSYN-GFP-T2A-Cre

W celu uzyskania ekspresji białka fluorescencyjnego GFP oraz Cre w neuronach (Ryc. 27).

a. pCDH-hSYN-GFP-T2A-Cre



Ryc. 27. Schemat plazmidu pCDH-hSYN-GFP-T2A-Cre; LTR, gag, RRE, Env, cPPT - elementy odpowiedzialne za pakowanie, transdukcję, stabilną integrację wirusowego konstruktów ekspresyjnych z genomowym DNA; rep_origin – miejsce początku replikacji DNA; polyA_signal – sygnał poliadenylacji; T2A – samorozcinający tag; enhanced GFP – fluorescencyjny znacznik EGFP; Cre-site specific recombinase – rekombinaza Cre

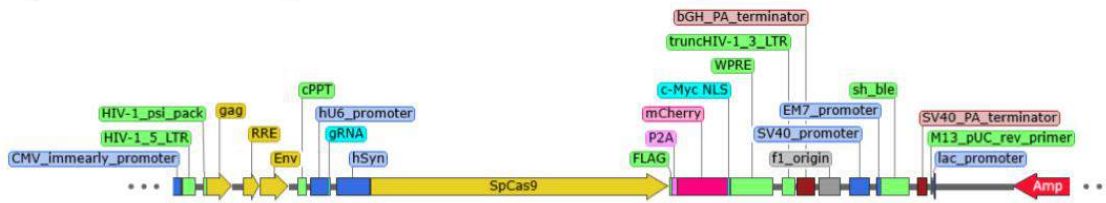
- LV-CRISPR-hU6-EGFP_g1-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS
- LV-pCDH-hU6-EGFP_g1-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS

W celu uzyskania ekspresji CRISPR i Cas9 i ekspresji gRNA, w tym przypadku celowanego w usunięcie białka fluorescencyjnego GFP.

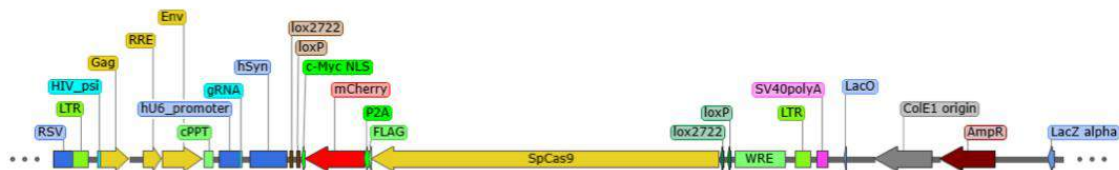
- LV-CRISPR-hU6-TIF-IA_g-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS
- LV-CRISPR-hU6-Polr1a_g-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS
- LV-pCDH-hU6-TIF-IA_g-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS
- LV-pCDH-hU6-Polr1a_g-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS

W celu uzyskania ekspresji CRISPR i Cas9 i ekspresji gRNA (różne wersje gRNA, Tab. 39), które usuwa białko TIF-IA lub Polr1a, powodując zahamowanie syntezy rRNA i w efekcie śmierć komórki na drodze apoptozy zależnej od białka p53 (Yuan et al., 2005) (Ryc. 28).

a. pLentiCRISPR-hU6-gRNA-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS



b. pCDH-hU6-gRNA-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS



Ryc. 28. Schemat plazmidów (a.) pLenti-CRISPR-hU6-gRNA-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS; (b.) pCDH-hU6-gRNA-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS. HIV-1_5_LTR, HIV-1_3_LTR, HIV-1psi_pack, gag, RRE, Env, cPPT - elementy odpowiedzialne za pakowanie, transdukcję, stabilną integrację wirusowego konstruktu ekspresyjnego z genomowym DNA; AmpR - gen oporności na antybiotyki selekcyjny, ampicylinę; f1_origin / ColE1_origin - miejsce początku replikacji DNA; LacO - lac operon Schemat plazmidu ekspresyjnego plentiCRISPR-hU6-gRNA-hGFAP-Cas9-P2A-mCherryNLS HIV-1_5_LTR, HIV-1_3_LTR, HIV-1psi_pack, gag, RRE, Env, cPPT - elementy odpowiedzialne za pakowanie, stabilną integrację wirusowego konstrukt ekspresyjnego z genomowym DNA; Amp - gen oporności na antybiotyki selekcyjny, ampicylinę; gRNA - gRNA pod ludzkim promotorem U6 (hU6_promoter); hSyn - promotor ludzkiej synapsyny; SpCas9 - endonukleaza Cas9; lox2722 / loxP - miejsca flankujące lox; mCherry - znacznik fluorescencyjny mCherry; FLAG - znacznik tag; P2A - samorozcinający tag; c-Myc NLS - sekwencja lokalizacji jądrowej, kieruje do lokalizacji jądrowej białko mCherry; WPRE - posttranskrypcyjny element regulacyjny; bGH_PA_terminator / SV40_PA_terminator - sekwencje zakańczające ekspresję białka; f1_origin - miejsce początku replikacji DNA; sh_ble - gen oporności na bleomycynę; ColE1_origin - miejsce początku replikacji DNA; LacO - lac operon

W celu transdukcji komórek astrocytarnych używano 5-dniowych komórek, po 1 pasażu. W zależności od eksperymentu używano następujące astrocytarne lentiwirusy:

- LV-pCDH-hGFAP-MCS-T2A-EGFP

W celu uzyskania ekspresji białka fluorescencyjnego GFP w astrocytach (Ryc. 29)

a. pCDH-hGFAP-MCS-T2A-EGFP



Ryc. 29. Schemat plazmidu pCDH-hGFAP-MCS-T2A-EGFP. HIV-1_5_LTR, HIV-1_3_LTR, HIV-1psi_pack, gag, RRE, Env, cPPT - elementy odpowiedzialne za pakowanie, transdukcję, stabilną integrację wirusowego konstrukt ekspresyjnego z genomowym DNA; AmpR - gen oporności na antybiotyki selekcyjny, ampicylinę; f1_origin / ColE1_origin - miejsce początku replikacji DNA; LacO - lac operon; T2A - samorozcinający tag; EGFP - fluorescencyjny znacznik EGFP

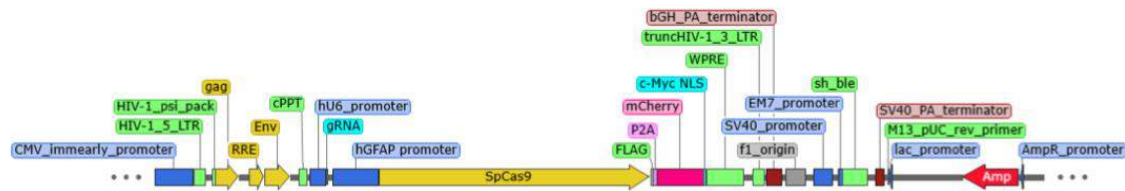
- LV-CRISPR-hU6-EGFP_g1-hGFAP-Cas9-P2A-mCherryNLS

W celu uzyskania ekspresji CRISPR, Cas9 i gRNA usuwającego GFP.

- LV-CRISPR-hU6-TIF-IA_g- hGFAP-Cas9-P2A-mCherryNLS
- LV-CRISPR-hU6-PolR1a_g- hGFAP-Cas9-P2A-mCherryNLS

W celu uzyskania ekspresji CRISPR i Cas9 i ekspresji gRNA (różne wersje gRNA, Tab. 39) (Ryc. 30).

a. pLentiCRISPR-hU6-gRNA-hGFAP-Cas9-P2A-mCherryNLS



Ryc. 30. Schemat plazmidu plentiCRISPR-hU6-gRNA-hGFAP-Cas9-P2A-mCherryNLS HIV-1_5_LTR, HIV-1_3_LTR, HIV-1psi_pack, gag, RRE, Env, cPPT - elementy odpowiedzialne za pakowanie, stabilną integrację wirusowego konstrukt ekspresyjnego z genomowym DNA; Amp - gen oporności na antybiotyk selekcyjny, ampicylinę; gRNA - gRNA pod ludzkim promotorem U6 (hU6_promoter); hGFAP_promoter – promotor astrocytarny; SpCas9 – endonukleaza Cas9; mCherry – znacznik fluorescencyjny mCherry; FLAG – znacznik tag; P2A – samorozcinający tag; c-Myc NLS – kieruje do lokalizacji jądrowej białko mCherry; WPRE - posttranskrypcyjny element regulacyjny; bGH_PA_terminator / SV40_PA_terminator – sekwencje zakańczające ekspresję białka; f1_origin – miejsce początku replikacji DNA; sh_ble – gen oporności na bleomycynę

Wirusy wyjmowano z zamrażalnika i przenoszono na lodzie pod sterylny laminar. Po zmianie połowy pożywki hodowlanej na świeżą wykonywano infekcję komórek wirusami używając 0,5 µl na płytkę 384-dołkową, 1 µl na płytkę 96-dołkową i 11 µl na płytkę 6-dołkową. Po 10 dniach inkubacji przystępowano do kolejnych etapów eksperymentów.

3.4.4. Barwienia immunofluorescencyjne neuronów i astrocytów *in vitro*

Komórki wysiane na płytkach utrwalano w 4 % paraformaldehydzie (PFA, Sigma-Aldrich nr. kat. 158127) w temperaturze pokojowej. Po 15 min. inkubacji przepłukano komórki dwukrotnie PBS i wykonano 20-minutową permeabilizację detergentem niejonowym PBST, tj. 0,2 % roztworem Triton X-100 w PBS (MP Biomedicals, nr. kat. 807426). Następnie zmieniono roztwór na blokujący, 5 % NPS (ang. *Normal Pig Serum*), tj. roztwór surowicy świńskiej w PBST (Sigma nr. kat. S-4000). Po 1 godz. rozpoczęto inkubację z odpowiednimi przeciwciałami I-rzędowymi, którą prowadzono w 4° C do następnego dnia (**Tab. 31**). W przypadku barwień podwójnych i potrójnych przeciwciała pochodziły z innych gatunków zwierząt.

Następnego dnia procedury, komórki odpłukano trzykrotnie PBS i inkubowano przez 1 godz. w temperaturze pokojowej z odpowiednimi przeciwciałami fluorescencyjnymi II rzędowym zawieszonym w PBS (Tab. 32). Po inkubacji komórki odpłukano trzykrotnie PBS i inkubowano przez 10 minut w PBS z barwnikiem Hoechst 33342 (Thermo Scientific nr kat. 62249) o stężeniu 1 µM. Barwnik ten pozwala na zobrazowanie jąder komórkowych, w świetle ultrafioletowym. Następnie komórki odpłukano dwukrotnie i pozostawiono w PBS, przechowując w lodówce, w 4° C, chroniąc od światła. W przeciągu 2 tygodni od procedury barwienia wykonywano zdjęcia preparatów.

3.4.5. Obrazowanie i zliczanie komórek po transdukcji

Przedstawione w pracy zdjęcia mikroskopowe hodowli *in vitro* zostały wykonane z użyciem mikroskopu konfokalnego Leica TCS SP8 WLL oraz mikroskopu fluorescencyjnego Leica Thunder DMI8. Do analizy obrazu zastosowano program FIJI ImageJ (wersja 2.1.0/1.53c). Komórki TH, Neun, GFAP, mCherry i GFP pozytywne zliczano manualnie na całej powierzchni płytek 384-dołkowych, lub na wybranym losowo z dołka kwadracie.

3.4.6. Izolacja RNA z neuronów *in vitro*

Pierwotne neurony korowe wysiane na płytkę 6-dołkową, w 10 dniu po transdukcji przeznaczono na analizę RNA. Płytkę przenoszono na lód pod sterylnym laminarem, usuwano pożywkę hodowlaną i w celu lizy komórkowej zalewano 400 μ l roztworu FenoZol Plus (A&A Biotechnology, nr. kat. 203-100P), a następnie jednorazowymi skrobaczkami zdrapano komórki. Zawiesinę przenoszono do próbek typu eppendorf i izolowano RNA zestawem do izolacji *Total RNA Mini Plus* (A&A nr. kat. 036-100) postępując zgodnie z zaleceniami producenta. Otrzymywano 30 μ l wyizolowanego RNA, zawieszono w wodzie wolnej od RNAz (DEPC H₂O).

3.4.7. Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT) i reakcja PCR w czasie rzeczywistym (*Real-Time PCR*)

Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono z użyciem *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystem, nr kat. 4368814). Do syntezy cDNA na matrycy RNA użyto 1000 ng RNA dla każdej próbki. Mieszaninę reakcyjną przygotowano według wskazań producenta i przeprowadzono przy standardowych parametrach.

Tab. 27. Składniki mieszaniny reakcyjnej reakcji odwrotnej transkrypcji i warunki reakcji

| | | |
|---|--------------------------------------|--------------------|
| <i>Składniki mieszaniny reakcyjnej</i> | <i>objętość 20 μl</i> | |
| <i>RNA (1000 ng)</i> | <i>10 μl</i> | |
| <i>25x dNTP (po 100 mM)</i> | <i>0,8 μl</i> | |
| <i>10x RT Random Primers</i> | <i>2 μl</i> | |
| <i>10x RT bufor</i> | <i>2 μl</i> | |
| <i>Inhibitor RNAz</i> | <i>1 μl</i> | |
| <i>MultiScribe RT</i> | <i>1 μl</i> | |
| <i>H₂O</i> | <i>3,2 μl</i> | |
| | | |
| <i>Warunki reakcji PCR</i> | <i>czas</i> | <i>temperatura</i> |
| | <i>10 min.</i> | <i>25 °C</i> |
| | <i>120 min.</i> | <i>37 °C</i> |
| | <i>5 min.</i> | <i>85 °C</i> |
| <i>Schłodzenie:</i> | <i>4 °C</i> | <i>∞</i> |
| <i>Krótkoterminowo utrzymywano temperaturę 4 °C, przechowywano w -20 °C</i> | | |

Reakcję PCR w czasie rzeczywistym (*Real-Time PCR*) prowadzono z użyciem sond TaqMan (Applied Biosystems, *GFP*: Mr03989638_mr, *Hprt1*: Mm03024075_m1) oraz *TaqMan Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems, nr kat. 4369542), postępując zgodnie z załączonym protokołem. cDNA oraz mieszaninę reakcyjną naniesiono na płytki MicroAmp Fast Optical 96-Well (Applied Biosystem, nr. kat. 4346906), zaklejono folią ochronną *MicroAmp Optical Adhesive Film* (Applied Biosystem, nr. kat. 4311971) oraz krótko zwirowano. Reakcję przeprowadzono w urządzeniu Quant Studio (Applied Biosystem).

Tab. 28. Składniki mieszaniny reakcyjnej PCR w czasie rzeczywistym i warunki reakcji

| | |
|--|---|
| <i>Składniki mieszaniny reakcyjnej</i> | <i>objętość na 1 reakcję (10 μl)</i> |
| <i>Sonda TaqMan (20x)</i> | <i>0,5 μl</i> |
| <i>PCRMaster Mix</i> | <i>5 μl</i> |
| <i>H₂O</i> | <i>1,5 μl</i> |
| <i>cDNA (100 ng)</i> | <i>3 μl</i> |

| | | |
|------------------------|---------------------|-------------|
| Warunki reakcji rt-PCR | czas | temperatura |
| Aktywacja enzymów: | 20 sek. | 95 °C |
| 40 cykli: | { 1 sek. 20 sek. | 95 °C |
| | | 60 °C |

Badania względnego poziomu ekspresji między próbkami badanymi, a kontrolnymi dokonano w oparciu o metodę $\Delta\Delta Ct$. Wyniki ekspresji dla badanego genu były normalizowane względem genu reporterowego *Hprt1*. Wykonano 3 techniczne powtórzenia. Do każdej z reakcji użyto 100 ng matrycy cDNA.

3.5. Operacje stereotaktyczne i podania wektora lentiwirusowego (LV)

Przed przystąpieniem do operacji zostało przygotowane miejsce pracy poprzez wyczyszczenie i nałożenie jednorazowych flizelinowych powierzchni na blaty oraz sterylizację wszystkich narzędzi chirurgicznych w temperaturze 120 °C. Myszy były adoptowane (tzw. *handling*) przez kilka dni poprzedzających operację. Przed operacją myszy otrzymywały serię iniekcji lekami (Tab. 29). W stan głębokiej narkozy zwierzęta wprowadzane były dootrzewnowym zastrzykiem z roztworem ketaminy (Ketamina 100 mg/ml, Biowet) i wodorotlenku medetomidyny (Sedator 1 mg/ml, Eurovet Animal Health BV). Śpiące i znieczulone myszy dostawały podskórne zastrzyki o silnym działaniu analgetycznym, zabezpieczającym zwierzę w trakcie zabiegu (opiod: butorfanol winianu, Torphadine 10 mg/ml, Dechra), oraz wiele godzin po jego zakończeniu (lek z grupy NLPZ: Meloksykam 5 mg/ml, Boehringer Ingelheim). Podskórnie zwierzęta otrzymały osłonowo antybiotyk (enrotrofloksacyna, Enroflobiox 5 % 50 mg/ml, Vetoquinol). W miejscu operacji podskórnie został podany roztwór lignokainy (ang. *Lignocainum Hydrochloricum* WZF 2 %, Polfa) w celu znieczulenia miejscowego.

Tab. 29. Spis leków używanych do operacji stereotaktycznej myszy

| Środek | Sposób podania | Dawka |
|--------------------------|---|-------------------------|
| Ketamina Medetomidyna | Dootrzewnowo rozpuszczone w sterylnej soli fizjologicznej | 37,5 mg/kg 0,5 mg/kg |
| Lignocaina | Podskórnie w miejscu cięcia | 5 mg/kg |
| Enrotrofloksacyna | podskórnie | 5 mg/kg |
| Meloksykam | podskórnie | 5 mg/kg |
| Butorfanol | podskórnie | 0,4 mg/kg |
| Atipamezol | podskórnie | 1,5 mg/kg |

Po upewnieniu się, że zwierzę jest głęboko znieczulone (brak odruchów dotykowych, brak odruchu rogówkowego, równomierny i spokojny oddech), usuwano sierść ze skóry czaszki między uszami i umieszczano je na macie grzewczej w aparacie stereotaktycznym (Stoelting, nr kat. 51730D) unieruchamiając głowę specjalnymi bolcami. Skórę głowy przemywano jodyną i 70 % etanolem. Gałki oczne zostały zabezpieczone przed wyschnięciem kroplami do oczu w żelu Lubrithal. Poprzez nacięcie skóry odsłonięto grzbietową część czaszki i oczyszczono powierzchnię kości z opony twardej poprzez potarcia patyczkami higienicznymi. Ustalono punkty przecięcia się szwów na czaszce i wypoziomowano głowę i ustalono miejsce do nawiercenia otworów opierając się na dostępnej literaturze i na podstawie współrzędnych z atlasu mózgu. Ponieważ u różnych szczepów myszy koordynaty mogą się nieznacznie różnić, na podstawie próbnych iniekcji u myszy z hodowli własnej ustalono następujące koordynaty do iniekcji do miejsca sinawego, gdzie podawane były lentiwirusy powodujące mutacje w neuronach:

- - 5,45 w płaszczyźnie przód/tył (A/P)
- - 0,9 / + 0,9 w płaszczyźnie lewo/prawo (L)
- - 3,8 w płaszczyźnie brzusznej/grzbietowej (D/V)

Wektory LV (spis użytych wektorów w podaniu domózwym Tab. 30), które przechowywane były na lodzie nabierano do sterylnej mikrostrzykawki Neuros (Stoelting-Hamilton, nr kat. 53496) poprzez igłę o rozmiarze 33 ga. tępo zakończoną (Stoelting-Hamilton, nr kat. 53437) przy użyciu pompy iniekcyjnej (Stoelting, nr kat. 53311). Igłę wprowadzano do mózgu na odpowiednią głębokość, odczekano 3 min. w celu ułożenia się naruszonych tkanek i zawartość 2 μ l lentiwirusa powoli wypuszczano do struktury mózgu (400 nl/min.). Po zakończonym podaniu odczekano dodatkowe 5 min. i powoli wysuwano igłę i strzykawkę do góry. Procedurę powtórzono po drugiej stronie mózgu. Podczas iniekcji wirusa zwierzętom podano podskórnie 1 ml soli fizjologicznej. Bezpośrednio po operacji skóra czaszki została zaszyta i podano dootrzewnowo zastrzyk odwracający działanie wodorotlenku medetomidyny, chlorowodorek atipamezolu (Atipam 5 mg/ml, Eurovet Animal Health BV). Zwierzęta umieszczano w klatce na płycie grzewczej, a po wybudzeniu się przenoszono do klatki domowej. Po zabiegu zwierzęta przechodziły okres rekonwalescencji, gdzie są pod stałym nadzorem i w razie potrzeby otrzymują środki przeciwbólowe i przeciwzapalne. Stan myszy po operacji ustalany był na podstawie obserwacji swobodnego zachowania w klatce domowej, np. zdolności budowania gniazda, monitorowanie wagi oraz oznak bólu.

Tab. 30. Lista użytych lentiwirusów w operacjach stereotaktycznych

| | | | |
|---|---|--|---------------|
| 1 | Wirus kontrolny do próbnych operacji, ekspresja GFP w neuronach. | LVV-pCDH-hSYN-GFP-T2A-Cre | |
| 2 | Lentiwirus CRISPR, Cre-niezależny, ekspresja mCherry w neuronach. Ustalenie koordynatów miejsca sinawego. | LVV-CRISPR-hU6-TIF1v1_g-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS | |
| 3 | Lentiwirus CRISPR-DiO, ekspresja mCherry w neuronach. Testowane różne gRNA, podane pojedynczo lub mieszaninie dwóch różnych LVV z różnymi gRNA. Po operacjach zwierzęta przechodziły testy behawioralne, a pobrane tkanki z mózgu były procesowane na dalszych etapach. | LVV-CRISPR-hU6-gRNA-hSYN-DiO-Cas9-P2A-mCherryNLS | |
| | | gRNA 1 | gRNA 2 |
| | | TIF-IA 1v1 | - |
| | | TIF-IA 1v2 | - |
| | | TIF-IA 1v1 | TIF-IA 1v2 |
| | | TIF-IA 12v1 | - |
| | | TIF-IA 12v3 | - |
| | | TIF-IA 12v1 | TIF-IA 12v3 |
| | | TIF-IA 13v1 | |
| | | Polr1a 1v1 | |

3.6. Testy behawioralne

Testy behawioralne miały na celu zbadanie wpływu mutacji na ogólny fenotyp zwierząt, ze szczególnym zwróceniem uwagi na aspekty motoryczne. W zależności od postawionego celu badawczego przeprowadzono testy w różnych interwałach czasowych:

- co 1 miesiąc od podania wektora lentiwirusowego (wywołania mutacji) – dla wstępnej selekcji i wyboru najefektywniejszej sekwencji gRNA;
- w 4 oraz 6 miesiącu od podania wektora lentiwirusowego i indukcji mutacji – przy zasadniczych eksperymentach, mających na celu zbadanie wpływu postępującej neurodegeneracji w miejscu sinawym na zachowanie zwierząt (wyniki przedstawione w niniejszej pracy).

3.6.1. Test otwartego pola (OFT)

Test otwartego pola (ang. *Open Field Test*, OFT) wykonano w celu zbadania spontanicznej ruchliwości zwierząt. Zwierzę umieszczane było na okres 30 min. w jasno oświetlonej białej klatce (400 lux) o powierzchni podłogi o wymiarach 40 × 40 cm. Zachowanie zwierząt było rejestrowane przez kamerę wideo a następnie analizowane przy użyciu systemu Noldus EthoVision. W nagraniach analizowano przebyty dystans jako miara zachowania eksploracyjnego oraz czas spędzony w centralnej części klatki jako miara zachowań lękowych. Po zakończeniu czynności zwierzęta wróciły do swoich klatek domowych.

3.6.2. Test pręta obrotowego – test Rotarod

Test wykonano w celu zbadania sposobu koordynacji ruchu zwierząt. Pierwszego dnia testu został wykonany jednorazowy trening, podczas którego zwierzęta przez czas 5 min. uczyły się przemieszczać na ruszającym się wale. Po zakończeniu czynności zwierzęta wróciły do swoich klatek domowych. Następnego dnia wykonano eksperyment. Zwierzęta zostały umieszczone na okrągłym, kręcącym się wale ze stałą prędkością 6 rpm (obroty na minutę) na 5 min, a następnie obroty pręta zostały przyspieszone do 40 rpm w czasie 5 minut. Zanotowano czas, do jakiego mysz była w stanie utrzymać się na obracającym się pręcie, co było wyznacznikiem koordynacji motorycznej. Po zakończeniu czynności zwierzęta wróciły do swoich klatek domowych.

3.6.3. Test statystycznych prętów

Alternatywny test wykonany celem zbadania sposobu koordynacji ruchu zwierząt (test komplementarny to testu Rotarod, trudniejszy i bardziej czasochłonny do przeprowadzenia jednak uważany za bardziej czuły dla wykrycia ew. nieprawidłowości motorycznych u zwierząt). Test statycznych prętów (ang. *Static Rods Test*) został wykonany po kilkukrotnym, szybkim treningu polegającym na przyzwyczajeniu myszy do nowego środowiska. W tym teście wykorzystuje się serię pięciu prętów drewnianych o długości 6° cm i malejących średnicach (pręt 1 – 27 mm; pręt 2 – 21 mm; pręt 3 – 15 mm; pręt 4 – 11 mm; pręt 5 – 8 mm), z których każdy prostopadle przykręcony jest jednym końcem do belki nośnej. Urządzenie znajduje się minimum 25 cm nad miękką powierzchnią (lignina na podłożu), aby mysz nie była zachęcona do skoku z pręta. Podczas treningu, myszy luźno przemieszczały się po prętach, a następnie zostały zachęczone popchnięciem dłoni operatora do wejścia na koniec pręta. W trakcie testu, mysz umieszczono na pręcie, 2 cm od dystalnego końca, odwróconą tyłem do belki nośnej. Zarejestrowano czas odwrócenia się myszy o 180° w kierunku stałego końca pręta, a następnie czas przejścia do belki nośnej. Tę czynność powtarzano na kolejnych prętach od największej średnicy, która była najłatwiejsza do przejścia, do coraz mniejszej. Maksymalny czas testowania dla każdego pręta to 3 minuty. Po zakończeniu czynności zwierzęta wróciły do swoich klatek domowych.

3.6.4. Test podniesionego labiryntu krzyżowego (EPM)

Test podniesionego labiryntu krzyżowego (ang. *Elevated Plus Maze*, EPM) wykonano celem zbadania zachowań lękowych zwierząt. Pleksiglasowy labirynt krzyżowy został podniesiony do wysokości 50 cm i składał się z dwóch ramion otwartych (35 × 5 cm) i dwóch ramion zamkniętych (35 × 5 × 15 cm), umieszczonych prostopadle do siebie z centralnej platformy (5 × 5 cm). Eksperymenty zostały przeprowadzone w oświetleniu o niskiej intensywności. Zwierzę zostało umieszczone w centralnej części labiryntu, przodem do otwartego ramienia. Czas pomiaru eksperymentu dla każdego zwierzęcia wynosił 5 minut i został zarejestrowany kamerą przy pomocy systemu *Noldus Etho Vision*. Ze względu na problemy programu z automatyczną rejestracją przekroczenia 4 łapami myszy w

różnych korytarzach zostały wprowadzone ręcznie korekcie. Zmierzono parametry określające poziom lęku u zwierząt: % wejść do otwartych ramion i czas spędzony w otwartych ramionach.

3.6.5. Test jasnego/ciemnego pudełka (LDB)

Test wykonano celem zbadania zachowań lękowych zwierząt. Test jasnego/ciemnego pudełka (ang. *Light-Dark Box*, LDB) wykorzystuje fakt preferencji gryzoni do ciemnych przestrzeni i unikania jasno oświetlonych, otwartych, co nasila się pod wpływem lęku. Myszy umieszczano pojedynczo na środku ciemnego ramienia tyłem do przejścia łączącego oba przedziały pudełka, tzw. kompartmenty, o wymiarach 18 x 16 x 20 cm: jasne (biała podłoga i ściany, natężenie oświetlenia: 400 luksów) z ciemnym (czarna podłoga i ściany, 50 luksów). Przez 5 min. mierzono czas spędzany w jasnym i ciemnym kompartmentcie, opóźnienie (tzw. latencję) w wejściu do jasnego kompartmentu oraz liczbę przejść między obiema częściami (przekroczenie wszystkimi łapami granicy między jasnym a ciemnym kompartmentem).

3.6.6. Test zawieszenia za ogon (TST)

Test wykonano celem zweryfikowania potencjalnych zachowań depresyjnych u zwierząt, w związku z uszkodzeniem przewodnictwa noradrenergicznego. Test ten umożliwia pomiar bezradności behawioralnej u gryzoni w sytuacji nieuniknionego stresu, a wydłużenie tzw. czasu bezruchu w stosunku do zwierząt kontrolnych jest interpretowane jako fenotyp depresyjny. Myszy za pomocą plastra mocowano pojedynczo za ogon do platformy zawieszanej na wysokości 30 cm nad podłożem. W czasie 6 minut badania mierzono łączny czas trwania wszystkich epizodów bezruchu, kiedy zwierzę zaprzestawało wysiłków w celu uwolnienia się z dyskomfortowej sytuacji. Pomiar był prowadzony metodą zautomatyzowaną przy użyciu systemu *Noldus EthoVision*.

3.6.7. Test preferencji picia roztworu sacharyny

Test wykonano celem zweryfikowania potencjalnych zachowań depresyjnych u zwierząt, w związku z uszkodzeniem przewodnictwa noradrenergicznego. Zwierzęta o fenotypie depresyjnym nie różnicują, w przeciwieństwie do zwierząt normalnych, spożycia wody słodkiej pomimo naturalnej preferencji do takiego smaku. Test preferencji picia roztworu sacharyny wymagał rozdzielania zwierząt do osobnych klatek. Każdą mysz umieszczono w swojej klatce i pozostawiono na 7 dni, aby zwierzęta przywykły do nowych warunków. Po aklimatyzacji zmieniono butelkę z wodą na dwa poidelka z miarką, które znajdowały się w oddzielnych rogach klatki. W jednym poidelku znajdowała się woda, a w drugim 0,02 % roztwór sacharyny w wodzie. Po 24 godzinach zarejestrowano ubytek cieczy, a następnie na kolejną dobę zmieniono roztwory stronami, aby wykluczyć prawdopodobieństwo preferencji myszy do picia z jednej strony klatki. Kolejny odczyt wykonano po 48 godzinach.

3.7. Rejestracja źrenicy oka oraz spontanicznej aktywności neuronów dopaminowych w SN/VTA

Pomiary źrenicy oka i elektrofizjologiczne wykonywane przez dr Magdalenę Walczak oraz dr Tomasza Pradela w ramach współpracy z Zakładem Neurobiologii i Chronobiologii, Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych, Uniwersytetu Jagiellońskiego, kierowanego przez prof. dr hab. Tomasza Błasiaka.

24 zwierzęta (12 zwierząt kontrolnych i 12 zmutowanych, samce) przygotowane zostały według poprzednich procedur. Zwierzętom podano wektor LV do mózgu w 10 tygodniu życia. Następnie przez 5 miesięcy przebywały w klatkach hodowlanych. Po transporcie do Instytutu Zoologii zwierzęta przeszły kwarantannę. W 6 miesiącu po podaniach domózgowych LV, zwierzęta zostały wprowadzone

do stan głębokiego znieczulenia, poprzez wstrzyknięcie dootrzewnowe uretanu zawieszonego w soli fizjologicznej (1,5 g / 1000 g masy ciała; Sigma Aldrich). Kontrola znieczulenia była wykonywana poprzez sprawdzanie refleksów ocznych, a w razie konieczności aplikowane były dodatkowe dawki środka znieczulającego. Monitorowano i utrzymywano temperaturę ciała na poziomie 37°C za pomocą automatycznego podgrzewacza (TCP-02, WMT). Zwierzęta były umieszczane na bolcach usznych w ramie stereotaktycznej (SF-1450AP; ASI Instruments Inc., Warren, MI). Przez pierwsze 10 min. trwania operacji wykonywano pomiar źrenicy oczu. W tym celu użyto kamery (Basler Aca) wraz z oprogramowaniem automatycznie rejestrującym zmiany średnicy oka. Następnie wykonano nacięcie na górze głowy, usuwając skórę i tkanki w celu odsłonięcia kości czaszki. Wykonano kraniotomię, aby umożliwić wszczępienie elektrody do elektrokortylogramu (ECoG) i wprowadzenie mikropipety w obszarze VTA/SN. Wszystkie odsłonięte powierzchnie mózgu pokryto olejem mineralnym, aby uniknąć wysychania tkanki.

Procedura rejestracji neuronów wykonywana była zgodnie z opisaną wcześniej procedurą (Walczak & Błasiak, 2017). Rejestracje ECoG przeprowadzono za pomocą srebrnej elektrody kulowej, umieszczonej nadtwardówkowo nad prawą półkulą, na granicy kory ruchowej i somatosensorycznej. Rejestracje elektrofizjologiczne prowadzono za pomocą mikropipet wyciągniętych z kapilary szklanej borokrzemowej. Koniec mikropipety rejestracyjnej umieszczono w obszarze SN/VTA. Otrzymane sygnały zostały wzmocnione i przefiltrowane pasmem przepustowym za pomocą wzmacniacza mikroelektrodowego A-M Systems (model 1800; Carlsborg, WA). Sygnały analogowe zostały zdigitalizowane za pomocą interfejsu Micro 1401 mkII wyposażonego w oprogramowanie spike2 do przechowywania i dalszej analizy (Cambridge Electronic Design Inc., Cambridge). Po zakończonej procedurze zwierzęta zostały uśmiercone, a mózgi utrwalone w PFA 4 % w celu znakowania immunofluorescencyjnego.

3.8. Analizy *ex-vivo*

Zwierzęta były uśmiercane poprzez dyslokację rdzenia kręgowego i dekapitację ostrymi nożyczkami. Do dalszych badań wykorzystywano albo całe mózgi, albo izolowane bezpośrednio po dekapitacji struktury. W zależności od przeznaczenia pobrany materiał był inaczej przetwarzany. Mózgi myszy z pierwszych operacji stereotaktycznych, które miały na celu dopracowanie procedury i oszacowanie efektywności wywołanej mutacji, utrwalano w 4 % paraformaldehydzie i cięto na skrawki na wibratomie (Leica VT1200), które następnie barwiono immunofluorescencyjnie z użyciem wybranych przeciwciał. Sposób ten pozwala na szybkie wykonanie doświadczenia i zobrazowanie docelowej struktury. Mózgi zwierząt TIF-IA^{DbhCre}, TIF-IA^{DATCreEnt2} oraz z właściwego eksperymentu TIF-IA-CRISPR^{DbhCre}, mającego na celu zbadanie efektów mutacji na poziomie komórkowym, po utrwaleniu zatapiało w parafinie, a następnie cięto na skrawki z użyciem mikrotomu, co pozwala na uzyskanie lepszego materiału wyjściowego (grubość skrawka na poziomie 7-8 μM). Skrawki wykorzystano do barwień immunofluorescencyjnych (IHC/F) i immunohistochemicznych (IHC). Z pozostałych mózgow wyizolowane zostały docelowe struktury: LC, SN/VTA, hipokamp i prążkowie, które zostały zamrożone bezpośrednio po pobraniu na suchym lodzie i przechowywane w -80 °C do czasu dalszych analiz (ekspresja RNA, miRNA; HPLC; proteomika). Szczegóły procedur opisano poniżej.

3.8.1. Analiza immunohistochemiczna i immunofluorescencyjna

Na potrzeby wzmocnienia sygnału białek fluorescencyjnych, umiejscowienia komórek dopaminowych i zlokalizowania LC i SN/VTA wykonano barwienia immunofluorescencyjne oraz immunohistochemiczne. W procedurze używano następujących przeciwciał:

Tab. 31. Spis przeciwciał pierwszorzędowych używanych w barwieniach IHC i IHC/F

| Przeciwciało | pochodzenie | rozcieńczenie | Producent i nr. kat. |
|---------------------|-------------------|-----------------|--|
| anty-GFP | kurczak królik | 1:2000 1:500 | Millipore, A10262 Millipore, A11122 |
| anty-mCherry | szczur | 1:500 | Chromotec, 5f8 |
| anty-NeuN | mysz | 1:500 | Abcam, AB104224 |
| anty-TH | owca | 1:1000 | Millipore, AB1542 |
| anty- GFAP | kurczak | 1:2000 | Millipore, AB5541 |
| anty- Iba1 | szczur | 1:1000 | Abcam, AB283346 |
| anty-B23 (anty-NPM) | mysz | 1:2000 | Millipore, MAB4500 |
| anty-8-OHdG | koza | 1:200 | Millipore, AB5830 |

Tab. 32. Spis przeciwciał drugorzędowych używanych w barwieniach

| przeciwciało | pochodzenie | rozcieńczenie | Producent i nr. kat. |
|-------------------------------------|-------------|---------------|----------------------|
| Alexa Fluor 488 anty - królicze IgG | osioł | 1:500 | Invitrogen, #A21206 |
| Alexa Fluor 488 anty - mysie IgG | osioł | | Invitrogen, #A21202 |
| Alexa Fluor 488 anty - owcze IgG | mysie | | Invitrogen, #A11015 |
| Alexa Fluor 488 anty - kurczak IgG | królicze | | Invitrogen, #A78948 |
| Alexa Fluor 594 anty - szczurze IgG | osioł | | Invitrogen, #A21209 |
| Alexa Fluor 594 anty - królicze IgG | osioł | | Invitrogen, #A21207 |
| Alexa Fluor 594 anty - kurczak IgG | osioł | | Invitrogen, #A78951 |
| Alexa Fluor 647 anty - mysie IgG | osioł | | Invitrogen, #A31571 |
| Alexa Fluor 647 anty - owcze IgG | osioł | | Invitrogen, #A78952 |
| Biotynylowane anty-kozie IgG | osioł | | 1:5000 |
| Biotynylowane anty-mysie IgG | koza | 1:5000 | Thermo Fisher, 31803 |

3.8.1.1. Przygotowanie skrawków mózgu przy użyciu wibratomu (skrawki wolnopływające)

Pobrane mózgi umieszczane były w probówkach 15 ml w 4 % roztworze PFA i przez 48 godz. delikatnie wypłukiwane na kołysce rotacyjnej w 4 °C. Po tym czasie roztwór zmieniono na 0,4 % PFA i przechowywano do czasu dalszej procedury. W celu przygotowania skrawków wybrany mózg został przecięty, odcinając przodomózgowie, a następnie przyklejony klejem cjanoakrylowym (Superglue) do podstawki odciętej stroną, aby cięcie mózgu odbywało się od strony mózdzku w przekroju czołowym. Podstawkę z mózgiem umieszczono w waniencie wibratomu, która znajduje się na ruchomej platformie i zalano PBS. Zautomatyzowana platforma ma możliwość poruszania się góra/dół oraz przód/tył. Skrawki z wybranej struktury pocięte zostały na grubość 40 µm z częstotliwością pracy ostrza na poziomie 85 w skali 100 Hz oraz z prędkością cięcia ok. 1,23 mm/s. Wszystkie skrawki, które reprezentowały miejsce sinawe lub substancję czarną zbierano za pomocą pędzelka (Citadel Small Layer Brush, Games Workshop) do osobnych dołków w płytce 48-dołkowej (Biologix nr kat. 07-6048) wypełnionej PBS. Podczas wyboru skrawków posłużono się opracowanym atlasem mózgu myszy (Paxinos i Franklin, 2001).

3.8.1.2. Barwienia immunofluorescencyjne skrawków wolnopływających

Wybrane skrawki umieszczono za pomocą pędzelka pojedynczo w nowej płytce 48-dółkowej i zalano roztworem PBST. Inkubowano przez 15 min. na wytrząsarce rotacyjnej o niskich obrotach w temperaturze pokojowej. Następnie blokowano niespecyficzne miejsca wiązania przez 30 min. w 5 % NPS, po czym zmieniono na odpowiednie przeciwciała I-rzędowe (wykaz i stężenia -

Tab. 31) w objętości 100 μ l. W przypadku barwień podwójnych i potrójnych przeciwciała pochodziły z innych gatunków zwierząt. Inkubacja z przeciwciałem odbywała się na wytrząsarce, w 4 °C. Następnego dnia zebrano przeciwciała ze skrawków i przepłukano preparaty roztworem PBST, 3-krotnie po 10 min. w objętości 150 μ l. Odpowiednie przeciwciała fluorescencyjne II-rzędowe (Tab. 32) rozcieńczono w PBST i inkubowano z przemywaniem na wytrząsarce przez 1 godz. w temperaturze pokojowej. Następnie odpłukano skrawki przez 5 min. w PBST i kolejno 2-krotnie przez 5 min. w PBS. W celu zamontowania skrawków na szkiełku mikroskopowym (SuperFrost Plus, Thermo Scientific, nr kat. 631-0848) przygotowano niewielką kuwetę wypełnioną PBS. Skrawki po kolei umieszczano w płynie w kuwecie i zbierano po 4 na jedno szkiełko poprzez zanurzenie szkiełka do roztworu i ustawienie skrawku w docelowej pozycji. Szkiełka ze skrawkami podsuszano przez 2 min. usuwając nadmiar PBS i nakrapiano medium montujące z barwnikiem jądrowym, *Vectashield HardSet Antifade Mounting Medium with DAPI* (Vector Laboratories, nr kat. H-1500-10). Skrawki przykryto szkiełkiem podstawowym (Menzel Glaser, Thermo Scientific, nr kat. B-1220) pilnując, żeby nie były obecne bąbelki powietrza. Gotowe preparaty przechowywano w temperaturze 4 °C bez dostępu światła.

3.8.1.3. Przygotowanie skrawków mózgu przy użyciu mikrotomu (skrawki zatopione w parafinie)

Pobrane mózgi umieszczane były w probówkach 15 ml w 4 % roztworze PFA i przez noc delikatnie wypłukiwane na kołyszce rotacyjnej w 4 °C. Następnego dnia, w temperaturze pokojowej wykonywano płukania dwukrotnie przez 1 godz. w 0,83 % NaCl, jednokrotnie przez 1 godz. w roztworze 0,83 % NaCl z 95 % etanolem w stosunku 1:1, a kolejno dwukrotnie przez 1 godz. w 70 % etanolu. Następnie zmieniano roztwór na nowy 70 % etanol i zostawiano w lodówce do czasu kolejnych etapów. Kolejnego dnia mózgi odpłukiwano w roztworach etanolu: jednokrotnie przez 1,5 godz. w 85 % etanolu, 1,5 godz. w 95 % etanolu oraz 1 godz. w 100 % etanolu. Następnie zmieniano roztwór na nowy 100 % etanol i zostawiano w lodówce do następnego dnia. Kolejnym etapem były płukania w ksylenie (Sigma Aldrich, nr kat. 534056), które wykonywano pod wyciągiem w szklanych fiolkach i zanurzenie mózgow w bloku parafinowym w stacji do parafinowania (Leica EG1150 H). W tym celu mózgi odpłukiwano dwukrotnie przez 1 godz. w ksylenie, w roztworze ksyleny z parafiną w stosunku 1:1 w 60 °C przez 1 godz., a następnie 3-krotnie przez 1 godz. w parafinie. Uzupełniono plastikowe, jednorazowe kuwety parafiną do $\frac{1}{4}$ objętości i pojedynczo umieszczono w nich mózgi, zalewając od razu płynną parafiną. Kuwety podpisano i zaznaczono orientację mózgu. Pozostawiono na bloku chłodzącym do czasu zastygnięcia parafiny, a następnie przechowywano w lodówce w 4 °C.

W dniu cięcia skrawków podgrzano łaźnię wodną z PBS do 37 °C i uruchomiono półautomatyczny mikrotom rotacyjny (Leica RM2245). Blok parafinowy orientowano w uchwycie mikrotomu tak aby cięcie zacząć od tyłomózgowia i cięto skrawki o grubości 7 μ m z rejonu LC i SN/VTA. Skrawki parafinowe przenoszono do łaźni wodnej, gdzie dzięki ciepłu dokonywano ich rozprostowania i zbierano po 4 skrawki na szkiełko mikroskopowe typu SuperFrost Plus. Preparaty suszono w temperaturze pokojowej przez noc, a następnie przechowywano w zamkniętym pudełku.

3.8.1.4. Barwienia immunohistochemiczne skrawków zatopionych w parafinie

Wybrane szkiełka ze skrawkami parafinowymi poddawane zostały dwudniowej procedurze w celu wyznakowania immunohistochemicznego, wykorzystującego 3'-diami-nobenzydynę DAB (Sigma-Aldrich, nr kat. D4293-50SET). Wszystkie etapy (poza całonocną inkubacją z przeciwciałem I-rzędowym) miały miejsce w temperaturze pokojowej, a płukania w roztworach ksylenu odbywały się pod wyciągiem. Pierwszego dnia przeprowadzono deparafinizację skrawków, która polegała na serii płukań w zmniejszającym się stężeniu etanolu (3 x 10 min. w ksylenie, 2 x 5 min. w etanolu 100 %, 2 x 5 min. w etanolu 95 %, 2 x 5 min. 2 etanolu 70 %, a następnie 1 x 10 min. w PBS) w celu rehydratacji, czyli przywrócenia nawilżenia tkance. Następnie, aby odkryć miejsca wiązania się przeciwciał, preparaty umieszczono w kuwecie z roztworem Vector Antigen Unmasking Solution, Citrate-Based (Vector Laboratories, nr kat. H-3300-250) i gotowano 3 min. na najwyższej mocy kuchenki mikrofalowej. Po zagotowaniu roztworu moc mikrofalówki zmniejszono do 360 Watt i podgrzewano kolejne 8 min. Po tym czasie pozwolono na ostygnięcie roztworu przez 30 min. w temperaturze pokojowej. Preparaty przepłukano 4-krotnie wodą destylową, a następnie 3-krotnie przez 5 min. w PBS. Następnie blokowano endogenną aktywność peroksydazy poprzez inkubację skrawków przez 30 min. w mieszaninie 5 % H₂O₂ w PBS, po czym preparaty płukano 3-krotnie przez 5 min. roztworem PBS. Z użyciem Advanced PAP-Pen (Merck nr kat. Z377821) zaznaczono obszar skrawków, preparaty wypoziomowano w kuwecie (komorze wilgotnościowej) i blokowano niespecyficzne miejsca wiązania przeciwciał przez inkubację w 5 % roztworze NPS. Pierwszorzędowe przeciwciała (

Tab. 31) rozcieńczono w roztworze PBS z dodatkiem 5 % NPS i inkubowano w jego obecności skrawki umieszczając na noc w 4 °C. Kolejnego dnia preparaty ze skrawkami płukano 3-krotnie przez 10 min. w PBS, po czym inkubowano skrawki z II-rzędowym biotynylowanym przeciwciałem (Tab. 32), skierowanym przeciwko odpowiednim antygenom rozcieńczonym w PBS. Kolejny raz przepłukano preparaty 3-krotnie przez 10 min. w PBS i inkubowano 30 min. z roztworem kompleksu awidyna-biotyna sprzężonym z peroksydazą chrzanową (Vectastain ABC HRP Kit, Vector Laboratories, nr kat. PK-4000) przygotowanym według zaleceń producenta. Po odpłukaniu 3-krotnie przez 10 min w PBS wykonano ostatnią czynność, czyli ekspozycję skrawków na roztwór DAB. Czas inkubacji danego eksperymentu był taki sam. Reakcję blokowano wodą z kranu, a następnie wysuszano skrawki poprzez ekspozycję preparatów na zwiększające się stężenie etanolu, aż do ksylenu (1 min. 70 % etanol, 1 min. 95 % etanol, 1 min. 100 % etanol, 5 min. ksylen). Skrawki pokryto medium montującym (Sigma Aldrich nr. kat. 06522) na które nałożono szkiełko podstawowe. Utrwalone preparaty przechowywano w temperaturze pokojowej.

3.8.1.5. Barwienia immunofluorescencyjne skrawków zatopionych w parafinie

Pierwsze etapy barwienia immunofluorescencyjnego były przygotowywane analogicznie jak w rozdziale 3.8.1.4. Etap deparafinizacji, rehydratacji, odkrywania miejsc antygenowych przeprowadzono zgodnie z powyższym protokołem. Po wystudzeniu preparatów po zagotowaniu w mikrofalówce od razu przystępowano do etapu blokowania niespecyficznych miejsc wiązania przeciwciał, które po zaznaczeniu obszaru skrawka markerem immunohistochemicznym (tzw. *PAP-pen*), wykonywane było w 5 % NPS, a następnie, analogicznie jak w poprzednim rozdziale przygotowano i inkubowano skrawki z przeciwciałami I-rzędowymi (Tab. 31), uwzględniając inne rozcieńczenia przeciwciał wymagane do barwień immunofluorescencyjnych. Następnego dnia procedury, skrawki odpłukano 3-krotnie przez 5 min. w PBS i inkubowano przez 1 godz. w temperaturze pokojowej z odpowiednimi przeciwciałami fluorescencyjnymi II rzędowym zawieszonym w PBS (Tab. 32), chroniąc preparaty przed światłem. Po upływie czasu, skrawki odpłukano z resztek przeciwciał 3-krotnie przez 5 min. w PBS i inkubowano przez 10 min. w PBS z barwnikiem jądrowym Hoechst 33342 o stężeniu 1 μM. Następnie preparaty

plukano 2-krotnie przez 5 min. w PBS i używając medium montujące *Prolong Gold Antifade Mountant* (Termo Fisher nr kat. P36934) nakryto szkiełkiem podstawowym. Gotowe preparaty przechowywano w lodówce, w 4 °C, chroniąc od światła. W przeciągu 2 tygodni od procedury barwienia wykonywano zdjęcia preparatów.

3.8.1.6. Analiza mikroskopowa i zliczanie komórek

Przedstawione w pracy zdjęcia mikroskopowe skrawków mysiego mózgu zostały wykonane z użyciem mikroskopu konfokalnego Leica DM6. Do analizy obrazu zastosowano program FIJI ImageJ (wersja 2.1.0/1.53c). Komórki TH, mCherry, GFAP, Iba1, B23, 8-OhDG pozytywne zliczano według opisanych niżej schematów, w zależności od doświadczenia:

W przypadku obliczeń ilości komórek TH+, GFAP+, Iba1+ w SN i VTA myszy TIF-IA^{DbhCre} (sekcja wyniki **4.1.2, Ryc. 31**) z części mózgowia obejmującej SN/VTA wybarwiono skrawki co 84 µm przeciwciałem TH, aby uwidocznili neurony dopaminowe wraz z odpowiednimi przeciwciałami przeciwko astrocytom lub mikroglejowi. Zliczono 3 kolejne skrawki przedstawiające strukturę SN/VTA, z których środkowy skrawek reprezentował tą samą bregmę (- 3,1 A/P). Średnia z pomiarów reprezentowała N = 1. Iba1 i GFAP – pozytywne komórki zliczane były w obrębie struktury, którą wyznaczały neurony TH – pozytywne.

W przypadku obliczeń zmian ekspresji B23 i 8-OHdG w SN/VTA myszy TIF-IA^{DbhCre} (sekcja wyniki **4.1.2, Ryc. 31**) z części mózgowia obejmującej SN/VTA wybarwiono skrawki odpowiadający bregmie -3,1 A/P. Zliczano pole o powierzchni 400 x 400 µm, u każdego zwierzęcia umiejscowione w tym samym miejscu skrawka.

W przypadku obliczeń ilości komórek TH+ w SN i VTA myszy TIF-IA^{DATCreErt2} (sekcja wyniki **4.1.3, Ryc. 33**) z części mózgowia obejmującej SN/VTA wybarwiono skrawki co 112 µm przeciwciałami skierowanymi przeciwko TH, aby uwidocznili neurony dopaminowe. Zliczono 3 kolejne skrawki przedstawiające strukturę SN/VTA, z których środkowy skrawek reprezentował tą samą bregmę (- 3,1 A/P).

W przypadku obliczeń ilości komórek TH+ w miejscu sinawym myszy TIF-IA^{DATCreErt2} (sekcja wyniki **4.1.3, Ryc. 34**), z części mózgowia wybarwiono skrawki odpowiadający bregmie -5,45 (A/P) obejmujący miejsce sinawe, następnie wybrano po 3 skrawki co 84 µm w stronę przodu oraz tyłu mózgu względem wskazanej bregmy, wybarwiono przeciwciałami skierowanymi przeciwko TH, aby uwidocznili neurony noradrenergiczne. Z uzyskanych 7 przekrojów przedstawiono zliczenia odpowiadające przekrojowi przez LC.

W przypadku weryfikacji miejsca podania wirusa w miejscu sinawym myszy TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} (sekcja wyniki **4.2.6.1, Ryc. 52**), z części mózgowia obejmującej miejsce sinawe w szerszym zakresie (-5,88 do -5,02 A/P) wybarwiono skrawki co 80 µm przeciwciałami skierowanymi przeciwko mCherry, aby uwidocznili miejsce podania wirusa.

W przypadku zliczeń neuronów w strukturze LC myszy TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} i oszacowania ilości degenerowanych neuronów przez wektor CRISPR-DIO (sekcja wyniki **4.3.1.1, Ryc. 53**)

z części mózgowia wybarwiono skrawki odpowiadający bregmie -5,45 (A/P) obejmujący miejsce sinawe, następnie wybrano po 3 skrawki co 84 µm w stronę przodu oraz tyłu mózgu względem wskazanej bregmy, wybarwiono przeciwciałami skierowanymi przeciwko TH, aby uwidocznili neurony noradrenergiczne. Z uzyskanych 7 przekrojów przedstawiono zliczenia odpowiadające przekrojowi przez LC.

W przypadku zliczeń komórek glejowych w strukturze LC (sekcja wyniki **4.3.1.1, Ryc. 55**) z części mózgowia odpowiadającej bregmie -5,45 (A/P) wybarwiono skrawki przeciwciałami skierowanymi przeciwko Iba1 i GFAP, aby uwidocznili zmiany w stanie zapalnym w analizowanej strukturze. Komórki zliczano na wybranym skrawku z każdego osobnika na całej powierzchni struktury.

W przypadku zliczeń neuronów w SN/VTA myszy TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} i sprawdzenia, czy występuje degeneracja neuronów po podaniach wirusa do LC (sekcja wyniki **4.4.2.1, Ryc. 72**), z części mózgowia odpowiadającej bregnie -5,45 (A/P) wybarwiono skrawek przeciwciałem przeciwko TH, aby uwidocznić neurony dopaminowe. Zliczono wszystkie neurony dopaminowe na jednym wybranym skrawku z każdego osobnika.

W przypadku zliczeń neuronów w SN/VTA myszy TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} po analizie źrenicy oka oraz elektrofizjologii (sekcja wyniki **4.4.2.5, Ryc. 80**), z części mózgowia odpowiadającej bregnie -5,45 (A/P) wybarwiono skrawek przeciwciałem przeciwko TH, aby uwidocznić neurony dopaminowe. Zliczono wszystkie neurony dopaminowe na jednym wybranym skrawku z każdego osobnika.

3.8.2. Analiza ekspresji RNA i mikroRNA (miRNA)

W celu analizy ekspresji wybranych mRNA i miRNA wykonano izolację RNA z wyseparowanych struktur mózgu. Hipokamp i LC przygotowano do analizy całościowego RNA, a SN/VTA dodatkowo w celu analizy mikro RNA.

3.8.2.1. Izolacja RNA. Reakcja odwrotnej transkrypcji i reakcja PCR w czasie rzeczywistym

W celu analizy ekspresji mRNA wybranych genów, wyizolowano całościowe RNA. Tkankę po zawieszeniu w roztworze fenozolu homogenowano w urządzeniu TissueLyser II (Qiagen) w obecności metalowych kulek, a następnie postępowano analogicznie do izolacji RNA z neuronów *in vitro*, opisanego w punkcie 3.4.6 używając zestawu do izolacji A&A Total RNA Mini Plus. Produktem końcowym było 30 µl RNA zawieszonego w wodzie wolnej od RNaz (DEPC H₂O). W zależności od użytej tkanki otrzymywano 2 µg do 10 µg całkowitego RNA. RNA przekazywano do dalszych procedur, a długoterminowo przechowywano w -80 °C.

Do syntezy cDNA na matrycy RNA użyto 1 µg RNA dla każdej próbki, którą przeprowadzono analogicznie jak w rozdziale 3.4.7. Do reakcji PCR w czasie rzeczywistym, również wykonaną analogicznie do protokołu opisanego w sekcji *in vitro*, użyto gotowych sond TaqMan (Tab. 33) oraz zestawu TaqMan Gene Expression Master Mix.

Tab. 33. Spis sond TaqMan użytych do reakcji PCR w czasie rzeczywistym w badaniach *ex vivo*

| TaqMan | Thermo Fisher, nr kat. |
|-----------------------------|------------------------|
| <i>Hprt1</i> Mm03024075_m1 | #4331182 |
| <i>Slc6a2</i> Mm00436661_m1 | |
| <i>Dbh</i> Mm00460472_m1 | |
| <i>Map1b</i> Mm00485261_m1 | |
| <i>Th</i> Mm00447557_m1 | |
| <i>Nrf1</i> Mm01135606_m1 | |
| <i>Sod2</i> Mm01313000_m1 | |
| <i>Gpx1</i> Mm04207457_g1 | |
| <i>Bax</i> Mm00432051_m1 | |
| <i>Bcl2</i> Mm00477631_m1 | |
| <i>Itga3</i> Mm00442910_m1 | |
| <i>Aif1</i> Mm00479862_g1 | |
| <i>TNFα</i> Mm00443258_m1 | |

| | |
|---|----------|
| <i>IL-6</i> Mm00446190_m1 | |
| <i>IL-1β</i> Mm00434228_m1 | |
| <i>IL-10</i> Mm01288386_m1 | |
| <i>Adra1a</i> Mm00442668_m1 | |
| <i>Adra1b</i> Mm00431685_m1 | |
| <i>Adra1d</i> Mm01328600_m1 | |
| <i>Adra2a</i> Mm07295458_s1 | |
| <i>Adra2c</i> Mm00431686_s1 | |
| <i>Adrbk1</i> Mm00804778_m1 | |
| <i>Adrbk2</i> Mm02524224_s1 | |
| <i>Adrbk3</i> Mm02601819_g1 | |
| <i>miR7</i> Mm04238251_s1 | #4426961 |
| <i>miR34b</i> Mm04238162_s1 | |
| <i>miR34c</i> Mm04238161_s1 | |
| <i>miR128</i> Mm04238250_s1 | |
| <i>miR155</i> Mm01716204_m1 | |

Badania względnego poziomu ekspresji między próbkami badanymi, a kontrolnymi dokonano w oparciu o metodę $\Delta\Delta Ct$. Wyniki ekspresji dla genów były normalizowane względem genu *Hprt1*. W eksperymencie wykorzystano 7 zwierząt i wykonano 2 techniczne powtórzenia. Do każdej z reakcji użyto 100 ng matrycy cDNA.

3.8.3. Analiza ekspresji miRNA

Izolację mikro RNA (miRNA) wykonano zestawem *miRNeasy Mini* (Qiagen, nr kat. 217084) postępując zgodnie z zaleceniami producenta. Tkanekę umieszczono w roztworze do lizy i homogenowano w urządzeniu TissueLyser II w obecności metalowych kulek. Przeprowadzono przewidziany w protokole etap ekstrakcji białka i rozdział DNA i RNA za pomocą chloroformu. Zebraną frakcję wodną zawierającą RNA procesowano dalej na przeznaczonych do tego kolumnach z włókna szklanego. Otrzymano 30 μ l RNA zawieszonego w wodzie wolnej od RNaz w stężeniu od 35 do 80 ng/ μ l.

Następnie wykonano eksperyment *TaqMan Small RNA Assays* (ThermoFisher, nr kat. 4427975, lista użytych sond TaqMan, Tab. 34 przy użyciu zestawu *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*.

Tab. 34. Lista użytych sond *TaqMan Small RNA Assays*

| TaqMan | Nr kat |
|---------------------------|-------------------------------|
| <i>miR 223</i> , RT007896 | ThermoFisher, nr kat. 4427975 |
| <i>miR 153</i> , RT001191 | |

Pierwsze przygotowano osobną mieszaninę reakcyjną dla każdego testu *Small TaqMan Assay*, wykorzystując dołączone do każdego zestawu inne startery odwrotnej transkrypcji, specyficzne dla danego mikroRNA. Przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji według poniższego schematu.

Tab. 35. Składniki mieszaniny reakcyjnej odwrotnej transkrypcji *miRNA Assay* i warunki reakcji

| | | |
|---|--------------------------------------|--------------------|
| <i>Składniki mieszaniny reakcyjnej</i> | <i>objętość na 1 reakcję (15 µl)</i> | |
| <i>100mM dNTP</i> | <i>0,8 µl</i> | |
| <i>MultiScribe RT (50 U/µl)</i> | <i>1 µl</i> | |
| <i>10x RT bufor</i> | <i>1,5 µl</i> | |
| <i>Inhibitor RNAsz</i> | <i>0,19 µl</i> | |
| <i>H₂O</i> | <i>4,16 µl</i> | |
| <i>RNA (1 - 10 ng)</i> | <i>5 µl</i> | |
| <i>5x RT Primer</i> | <i>3 µl</i> | |
| <i>Warunki reakcji odwrotnej transkrypcji</i> | <i>czas</i> | <i>temperatura</i> |
| | <i>30 min.</i> | <i>16 °C</i> |
| | <i>30 min.</i> | <i>42 °C</i> |
| | <i>5 min.</i> | <i>85 °C</i> |
| <i>Schłodzenie:</i> | <i>4 °C</i> | <i>∞</i> |
| <i>Krótkoterminowo utrzymywano temperaturę 4 °C, przechowywano w -20 °C</i> | | |

Następnie przygotowano reakcję PCR w czasie rzeczywistym. W tym celu naniesiono na dołki na płytce 96-dołkowej FastStart mieszaninę reakcyjną, a następnie dodano matrycę cDNA.

Tab. 36. Składniki mieszaniny reakcyjnej reakcji PCR Small RNA Assay i warunki reakcji PCR w czasie rzeczywistym

| | | |
|--|--------------------------------------|--------------------|
| <i>Składniki mieszaniny reakcyjnej</i> | <i>objętość na 1 reakcję (10 µl)</i> | |
| <i>TaqMan Small RNA Assay (20x)</i> | <i>0,5 µl</i> | |
| <i>PCRMaster Mix</i> | <i>5 µl</i> | |
| <i>H₂O</i> | <i>3,84 µl</i> | |
| <i>cDNA</i> | <i>0,67 µl</i> | |
| <i>Warunki reakcji rt-PCR</i> | <i>czas</i> | <i>temperatura</i> |
| <i>Aktywacja UNG</i> | <i>2 min.</i> | <i>50 °C</i> |
| <i>Aktywacja enzymów:</i> | <i>20 sek.</i> | <i>95 °C</i> |
| | } <i>3 sek.</i> | <i>95 °C</i> |
| <i>40 cykli:</i> | | <i>30 sek.</i> |

Badania względnego poziomu ekspresji między próbkami badanymi, a kontrolnymi dokonano w oparciu o metodę $\Delta\Delta C_t$. W eksperymencie wykorzystano 7 zwierząt i wykonano 2 techniczne powtórzenia.

3.8.4. Analiza poziomu neurotransmiterów metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)

Pomiary poziomu neurotransmiterów były wykonane we współpracy z dr Moniką Herian w Zakładzie Farmakologii, Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN, kierowanego przez prof. dr hab. Krystynę Gołębiewską.

Stężenia dopaminy (DA) oraz jej metabolity: kwas dihydroksyfenylooctowy (DOPAC), 3-metoksytyramina (3-MT) oraz kwas homowanilinowy (HVA), noradrenalinę (NA) z jej metabolitem 3,4-dwuhydroksyfenyloglikol (MOPEG), serotoninę (5-HT) oraz jej produkt rozpadu, kwas 5-hydroksyindolooctowy (5-HIAA) w tkankach były mierzone za pomocą wysokoprzepustowej chromatografii cieczowej z detekcją elektrochemiczną. Analizie poddano 30 zwierząt TIF-IA-

CRISPR^{DbhCre}, z podziałem na samce i samice w 4 i 6 miesiącu po indukcji mutacji. Tkanki hipokampa i prążkowiec były homogenizowane w 20-krotnej objętości (v/w) zimnego 0,1 M HClO₄. Homogenaty były następnie odwirowywane przy 15 000 × g przez 15 min. w temperaturze 4°C. Uzyskany nadsącz był filtrowany przez membranę 0,2 μm (Alltech). Otrzymana porcja (5 μl) była wprowadzana do systemu HPLC, który zawierał detektor amperometryczny (LC-4C) z komórką detekcyjną z przepływem krzyżowym (BAS, IN, USA), pompę 626 Alltech i kolumnę analityczną GOLD Hypersil (3 μm, 100 × 3 mm, Thermo Scientific). Temperatura kolumny była utrzymywana na poziomie 30 °C. Zastosowano zewnętrzny standard zawierający NA, DA i DOPAC w stężeniach 50 ng/ml oraz HVA w stężeniu 100 ng/ml. Faza ruchoma składała się z 0,1 M KH₂PO₄, 0,5 mM Na₂EDTA, 80 mg/l sodu 1-oktansulfonianu i metanolu (4%), dostrojonego do pH 3,7 za pomocą 85% H₃PO₄. Przepływ fazy ruchomej wynosił 0,6 ml/min. Potencjał elektrody (elektroda węglowa 3 mm) był ustawiony na poziomie 0,7 V z czułością 5 nA/V. Do zbierania i analizy danych używano oprogramowania Chromax 2007 (Pol-Lab).

3.8.5. Izolacja białka i pomiar stężenia

Ekstrakty białkowe sporządzono z SN/VTA myszy TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} w 6 miesiącu od przeprowadzonych operacji oraz z myszy TIF-IA^{DbhCre} w 13 tygodniu życia. W dniu izolacji białka, SN/VTA umieszczano w próbkach z buforem lizującym RIPA (Sigma Aldrich, nr kat. R0278) oraz inhibitorami proteaz i fosfataz (Sigma Aldrich nr kat. P8340, P0044, P5726), a następnie rozdrabniano przy użyciu metalowych kulek w urządzeniu *TissueLyser II*. Gdy tkanka była całkowicie rozdrobniona, homogenaty inkubowano przez 20 min. na lodzie, a następnie wirowano przez 20 min. z prędkością 12000 × g. Zebrany supernatant rozporcjowywano do nowych próbek i przechowywano w temperaturze -80 °C.

Oznaczenie stężenia białek w homogenatach wykonywano metodą kolorymetryczną przy użyciu zestawu *BCA Protein Assay Kit* (Bio-Rad, nr kat. 5000201) zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta. Pomiar ten opiera się o modyfikację metody biuretowej, która polega na reakcji redukcji jonów Cu²⁺ do Cu⁺ w środowisku alkalicznym, w której uczestniczą wiązania peptydowe obecne m. in. w białkach. Kwas bicynchoninowy (ang. *Bicinchonic Acid*, BCA) reaguje z jonami miedziowymi wytwarzając stabilny kompleks o maksimum absorpcji przy długości fali 562 nm lambda. W celu wyznaczenia liniowej funkcji zależności stężenia białek od wartości absorpcji określonej za pomocą czytnika spektrofotometrycznego (BioTek Synergy Mx), sporządzano krzywą standardową będącą wzrastającymi stężeniami rozcieńczeń BSA (Sigma, nr kat. A9418) w buforze do lizy. Wykonano po dwa rozcieńczenia BSA oraz każdej z oznaczanych próbek.

3.8.6. Immunodetekcja białek metodą Western Blot

Ekspresje wybranych białek zaangażowanych w procesy neurodegeneracyjne oznaczono w SN/VTA samców myszy myszy TIF-IA^{DbhCre}. Elektroforetyczny rozdział białek przeprowadzono w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) z wykorzystaniem gotowych żeli poliakrylamidowych 4-15 % *Criterion TGX Precast Gels* (Bio-Rad, nr. kat. 5671081). Próbkę przygotowano mieszając objętość odpowiadającą 15 μg całkowitego białka z buforem obciążającym Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad, nr. kat. 1610737) oraz 2-merkaptoetanołem (Sigma-Aldrich, nr. kat. M3701), a następnie poddano je denaturacji w 95 °C przez 5 min. i schłodzono na lodzie. Jako marker wielkości białek zastosowano *PrecisionPlusProtein DualColorStandards* (Bio-Rad, nr. kat. 1610394). Rozdział elektroforetyczny prowadzono w buforze do elektroforezy (25 mM Tris, 192 mM glicyna, 0,1 % SDS, pH 8,3) przy napięciu 90 V przez 30 min., a następnie przy napięciu 120 V przez 90 min. Po tym czasie żele równoważono w buforze do transferu (48 mM Tris, 39 mM glicyna, 20 % metanol, 1,3 mM SDS, pH 9,2) w 4 °C przez 20 min. Półsuchy elektrotransfer białek z żelu poliakrylamidowego na 0,2 μm membranę nitrocelulozową (Bio-Rad, nr. kat. 1620174) prowadzono w aparacie *ENDURO Semi-Dry*

Laboratory Blotter (Labnet International) przy napięciu 20 V przez 35 min. Aby oszacować wydajność transferu, membrany podbarwiono odczynnikami 1% *Ponceau S* (Bio-Rad, USA), wycięto poziomo prążki w taki sposób by móc równolegle oznaczać białka o różnej masie cząsteczkowej. Fragmenty membran wypłukano w buforze TBS-T (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,4) odpłukując odczynnik Ponceau S, następnie blokowano w 5 % mleku odtłuszczonym (S.M. Gostyń) rozpuszczonym w buforze TBS-T, na delikatnie wytrząsając przez 1 h RT. Inkubację z odpowiednimi przeciwciałami pierwszorzędowymi prowadzono wytrząsając delikatnie w 4 °C przez noc. Następnie membrany płukano 3-krotnie przez 5-10 min. w buforze TBS-T i inkubowano z przeciwciałem drugorzędowym kozim przeciwko przeciwciałom króliczym IgG skuniugowane z HRP-streptawidyna (Vector Laboratories, PI10001) przez 1 godz. RT. Fragmenty membran przepłukano 3-krotnie przez 10 min. w buforze TBS-T, następnie przez 5 min. inkubowano z odczynnikami *Clarity Western ECL Substrate* (Bio-Rad, nr. kat. 1705060). Detekcję sygnału zmierzono z wykorzystaniem systemu obrazowania PXi4 i oprogramowania GeneSys (Syngene). Poziom sygnału oceniano za pomocą analizy gęstości optycznej otrzymanych punktów z wykorzystaniem programu Multi Gauge V3.0 (Fujifilm).

Tab. 37. Tab. Lista przeciwciał użytych w metodzie western blot.

| Przeciwciało wykrywające: | pochodzenie | rozcieńczenie | Producent i nr. kat. |
|---------------------------|-------------|---------------|----------------------------------|
| Kalnexyna | królik | 1:1000 | Enzo Life Sciences, ADI-SPA-860 |
| GFAP | królik | 1:2000 | Novus, cat no. NB300-141, 1:5000 |
| Iba1 | królik | 1:1000 | Proteintech, 10904-1-AP |
| IL-β | królik | 1:500 | Abcam, Ab9787 |
| IL-6 | królik | 1:500 | Proteintech, 21685-1-AP |
| IL-10 | królik | 1:500 | Thermo Fisher, PA5-85660 |

3.8.7. Immunodetekcja białek przy użyciu macierzy białkowej

Metodą powyższą zastosowano do identyfikacji białek pro- i przeciwzapalnych w oparciu o mikromacierz firmy RayBiotech. Tkanki SN/VTA VTA samców myszy myszy TIF-IA^{DbhCre} traktowano zgodnie z protokołem producenta (RayBiotech). Zamówione membrany zawierały 40 wstępnie naniesionych przeciwciał przeciwko białkom wymienionym w tabeli Tab. 38. W skrócie, tkankę homogenizowano w buforze do lizy komórek dołączonego do kitu, a stężenie białka oceniano za pomocą zestawu BCA Protein Assay Kit opisanego w 3.8.5. Membrany zostały zablokowane buforem blokującym, a następnie naniesiono 500 μg białka z połączonych próbek (4 osobniki spulowane na jeden test, po 2 testy dla mutantów TIF-IA^{DbhCre} i 2 testy dla kontroli typu dzikiego). Po całonocnej inkubacji z białkami, testy macierzowe przemyto i inkubowano z biotynylowanym zestawem przeciwciał drugorzędowych, a następnie inkubowano z kompleksem HRP-streptawidyna. Detekcję sygnału zmierzono z wykorzystaniem systemu obrazowania PXi4 i oprogramowania GeneSys (Syngene). Poziom sygnału oceniano za pomocą analizy gęstości optycznej otrzymanych punktów z wykorzystaniem programu Multi Gauge V3.0 (Fujifilm).

Tab. 38. Lista przeciwciał naniesionych na membranę macierzy białkowej.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|--------|-------|-------|-------|--------|--------|-------------|--------|--------|------------|---------------|-----------|
| A | POS | POS | NEG | NEG | BLANK | BLC | CD30 LIGAND | CCL11 | CCL24 | FAS LIGAND | CX3CLI | G-CSF |
| B | GM-CSF | IFN-γ | IL-1A | IL-1B | IL-2 | IL-3 | IL-4 | IL-6 | IL-9 | IL-10 | IL-12 P40/P70 | IL-12 P70 |
| C | IL-13 | IL-17 | I-TAC | KC | leptin | LIX | XCL1 | MCP-1 | M-CSF | MIG | MIP-1A | MIP1G |
| D | RANTES | SDF | TCA-3 | TECK | TIMP-1 | TIMP-2 | TNFA | STNFR1 | STNFR2 | BLANK | BLANK | POS |

3.8.8. Analiza proteomiczna z zastosowaniem metod znakowania izotopowego iTraQ

Przygotowanie materiału przeprowadzono we własnym zakresie. Wykonanie analiz proteomicznych zlecono Środowiskowemu Laboratorium Proteomiki i Spektrofotometrii Mas Instytutu Farmakologii PAN im. Jerzego Maja. Otrzymane, surowe dane były następnie przedmiotem analiz własnych prowadzonych już w ramach niniejszej pracy.

Analizie poddano 16 zwierząt TIF-IA-CRISPR^{DbhCre}, z podziałem na samce i samice. Ustalono reprezentatywną mapę proteomu przy użyciu spektrometru masowego ultrafleXtreme (Bruker Daltonics) metodą LC-MALDI z zastosowaniem metod znakowania izotopowego iTraQ.

Zidentyfikowane białka analizowano w dwóch grupach samic i osobno samców. W programie Perseus wygenerowano volcano plot z analizą statystyczną. Przy dalszej analizie białek uwzględniono tylko te, które okazały się istotnie statystycznie ($p < 0,05$) różniące od kontroli. Klasyfikacji białek ze względu na ich funkcję dokonano korzystając z ogólnodostępnego narzędzia na stronie www.string-db.org, które dostarcza informacji na temat funkcji i wzajemnych interakcji białek, dzięki znajomości kodujących je genów. Następnie, wprowadzono listę białek wraz parametrami określającymi czy wskazane białko zwiększa ilość, czy maleje w grupie eksperymentalnej, określono organizm objęty badaniem (mysz domowa, *Mus musculus*), i zinterpretowano listę grup białek pod kątem ontologii genów, GO (ang. *Gene Ontology*), które opisuje sposób funkcjonowania komórek – właściwości ich genów i procesów w kontekście komórkowym.

3.8.9. Badanie kolców dendrytycznych

Aby zobrazować kolce dendrytyczne barwieniem metodą Golgiego został użyty zestaw *FD Rapid Golgi Stain* (FD Neuro Technologies, nr. Kat. PK401A), zgodnie z protokołem producenta zawartym w zestawie. W skrócie, mózgi zwierząt (3 mutanty TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} oraz 3 kontrole) bezpośrednio po pobraniu zanurzono w roztworze do utrwalania, sporządzonym przez zmieszanie równych objętości roztworów A i B. Roztwór zmieniono po 24 godz. i przechowywano przez 16 dni w ciemności. Po tym czasie mózgi przeniesiono do roztworu C, przechowywano w temperaturze pokojowej w ciemności przez 1 tydzień, a następnie pocięto na przekroje o grubości 150 μm za pomocą wibratomu z komorą cięcia wypełnioną roztworem C. Następnie skrawki zamontowano kilkoma kroplami roztworu C na szkiełku mikroskopowym pokrytym żelatyną (FD Neuro Technologies, nr. Kat. P0101). Nadmiar roztworu C usunięto ze szkiełka za pomocą paska bibuły filtracyjnej, a skrawki pozostawiono do wyschnięcia przez noc w temperaturze pokojowej. Na koniec procedury skrawki wybarwiono przy użyciu roztworów D i E. Wybarwione skrawki pokryto medium montującym DPX i przykryto szkiełkiem nakrywkowym.

Do analizy wybierano drugorzędowe lub trzeciorzędowe dendryty neuronów SN/VTA (bregma - 2.82 do -3.88). Kryteria wyboru neuronów utrwalonych odczynnikiem Golgiego do analiz morfologicznych opierały się na 1) zachowaniu ciągłości dendrytu (czyli bez obcięcia żadnego fragmentu), 2) ciemnej, jednolitej impregnacji wzdłuż całego dendrytu, 3) izolacji od sąsiednich wybarwionych neuronów i 4) wyborze drugorzędowej/trzeciorzędowej gałęzi dendrytycznej o długości co najmniej 50 μm .

Zarejestrowano stopy zdjęć (15 do 30 obrazów, w odległości 0,5 μm) w osi z na mikroskopie konfokalnym Leica TS8. Wstępne ustawienia obiektywu i przysłony zostały początkowo dostosowane, a następnie utrzymane na stałym poziomie podczas obrazowania serii skrawków, aby zapewnić, że wszystkie obrazy zostały zdigitalizowane w takiej samej rozdzielczości. Każda wypukłość w bezpośrednim sąsiedztwie trzonu dendrytycznego, niezależnie od ich cech morfologicznych, była zaliczona jako kolce. Kolce liczono na drugorzędowym/trzeciorzędowym dendrycie, zaczynając od

początku odgałęzienia i prowadząc pomiar wzdłuż odległości co najmniej 50 μm . Liczba kolców w danej odległości od początku gałęzi została następnie uśredniona z pomiarów wszystkich neuronów z tego samego zwierzęcia (co najmniej 8 komórek/zwierzę), a dane te zostały połączone ze średnią innych zwierząt należących do tej samej grupy eksperymentalnej.

3.9. Analiza statystyczna

Wyniki eksperymentów zawartych w niniejszej rozprawie zostały przedstawione w postaci średniej arytmetycznej wszystkich pomiarów zebranych dla danego wariantu doświadczalnego wraz z odchyleniami w postaci błędu standardowego średniej (ang. *Standard Error Of The Mean*, SEM) z zaznaczeniem jako punkty wartości uzyskane przez pojedyncze osobniki. Punkt odniesienia grup eksperymentalnych stanowiły wyniki uzyskane dla wariantów kontrolnych w danej procedurze doświadczalnej lub wyniki otrzymane dla kontrolnego punktu czasowego. W celu sprawdzenia spełnienia warunków rozkładu normalnego prób danej grupy zastosowano kolejno test Shapiro – Wilka oraz spełnienia warunków jednorodności ich wariancji test Fishera. Do oceny istotności statystycznej różnic pomiędzy dwoma wariantami doświadczalnymi spełniającymi założenia testu parametrycznego zastosowano test t-studenta. W przypadku nierównych wariancji zastosowano poprawkę Welcha, a jeżeli dane nie spełniały założeń rozkładu normalnego, zastosowano nieparametryczny test Manna-Whitneya. W przypadku porównań trzech grup eksperymentalnych zastosowano test Kruskala-Wallisa (brak spełnienia warunków rozkładu normalnego) z testem post-hoc Dunna. Do porównań wielokrotnych zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA), a następnie odpowiednie dla zestawu danych testy post-hoc (m. in. Post hoc Šídák'a).

Poziomy ekspresji genów zbadane za pomocą reakcji qRT-PCR porównywano za pomocą względnej analizy porównawczej $\Delta\Delta C_t$ i przedstawiono w postaci mediany wszystkich pomiarów dla danego wariantu wystandaryzowanego względem genu referencyjnego. Wyniki przedstawiono jako znormalizowane względem odpowiedniej kontroli. Istotność zaobserwowanych różnic weryfikowano przy użyciu testu t-studenta / Manna-Whitneya (spełniające warunki jak opisane wyżej).

W analizie genomiczno-proteomicznej uzyskanych wyników z iTraQ wykorzystano dane otrzymane z programu Perseus i String. Analiza GO różnicujących białek wykazała siłę grupy białek w danym klastrze (podzielonym na udział w biologicznych procesach, molekularnych funkcjach i komponenty komórkowej), jako \log_{10} (białka zidentyfikowane/białka zaraportowane w danym komponencie). Wyliczony został FDR (ang. *False Discovery Rate*), czyli wyznaczenie jak znaczący jest udział danej grupy białek w klastrze, przedstawiony jako wartość p z poprawką Benjamini – Hochberga. Ze względu na niewystarczającą grupę zidentyfikowanych różnicujących białek nie wskazano parametrów, czy dany proces jest rosnący, czy malejący w danej grupie eksperymentalnej.

Na wykresach zastosowano oznaczenia poziomów istotności różnic między grupami: * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$, **** dla $p < 0,0001$. Obliczenia oraz graficzną reprezentację otrzymanych wyników uzyskano za pomocą programu GraphPad Prism 9 (wersja 9.3.1). Dane dotyczące liczebności grup zostały zawarte w opisach rycin lub w tekście.

Graficzne przedstawienie rycin i schematów zostało wykonane w programie BioRender oraz Microsoft Power Point. Schematy plazmidów zostały wygenerowane w programie SnapGene.

4. Wyniki

Wyniki niniejszej pracy zostały zgrupowane w trzech częściach:

- **4.1** – wyniki wstępne, związane z wybranymi etapami charakterystyki, stworzonego wcześniej modelu konstytutywnej delecji TIF-IA w neuronach noradrenergicznych, stanowiące potwierdzenie zasadności dalszych badań w kierunku negatywnego oddziaływania degeneracji noradrenergicznej na układ dopaminowy (wyniki opublikowane w *Neurochem Int*, 2022); wyniki uzyskane z analizy morfologicznej neuronów w miejscu sinawym (LC) w modelu mysiego parkinsonizmu myszy TIF-IA^{DatCreERT2}.
- **4.2 / 4.3** – wyniki dokumentujące stworzenie i późniejszą charakterystykę nowatorskiego modelu selektywnej delecji TIF-IA w rejonie LC, opartego o wykorzystanie systemu edycji genów CRISPR/Cas9, zastosowanego u myszy ekspresjonujących rekombinazę Cre pod kontrolą promotora DBH;
- **4.4** – wyniki będące próbą wykazania zasadności stosowania nowego modelu w badaniach prodromalnej fazy choroby Parkinsona.

Co do założenia, eksperymenty przeprowadzono oddzielnie na kohortach samców i samic. Nie zawsze było to możliwe z uwagi na niewystarczająco liczne grupy zwierząt. Podobnie, nie zawsze było możliwe przeprowadzenie kompletu eksperymentów, zarówno behawioralnych jak i *ex vivo*, w każdym z założonych punktów czasowych ewaluacji modelu TIF-IA- CRISPR^{DbhCre}.

4.1. Charakterystyka linii TIF-IA^{DbhCre} - mysiego modelu degeneracji układu noradrenergicznego

Do wstępnej weryfikacji hipotezy badawczej wykorzystano linię transgeniczną z delecją czynnika transkrypcyjnego TIF-IA w komórkach ekspresjonujących DBH, charakteryzującą się postępującą neurodegeneracją układu noradrenergicznego. Otrzymane wyniki, uzyskane pomimo ograniczeń modelu TIF-IA^{DbhCre}, stały się podstawą do kontynuacji badań już w oparciu o stworzony w ramach niniejszej pracy selektywny model z domózgową delecją TIF-IA, ograniczoną do LC. Rozdział 4.1 skrótowo podsumowuje uzyskane rezultaty w ramach badań, które zostały opublikowane w 2022 roku (Barut et al., *Neurochem Int* 2022).

4.1.1. Ogólna charakterystyka myszy TIF-IA^{DbhCre} z postępującą degeneracją układu noradrenergicznego

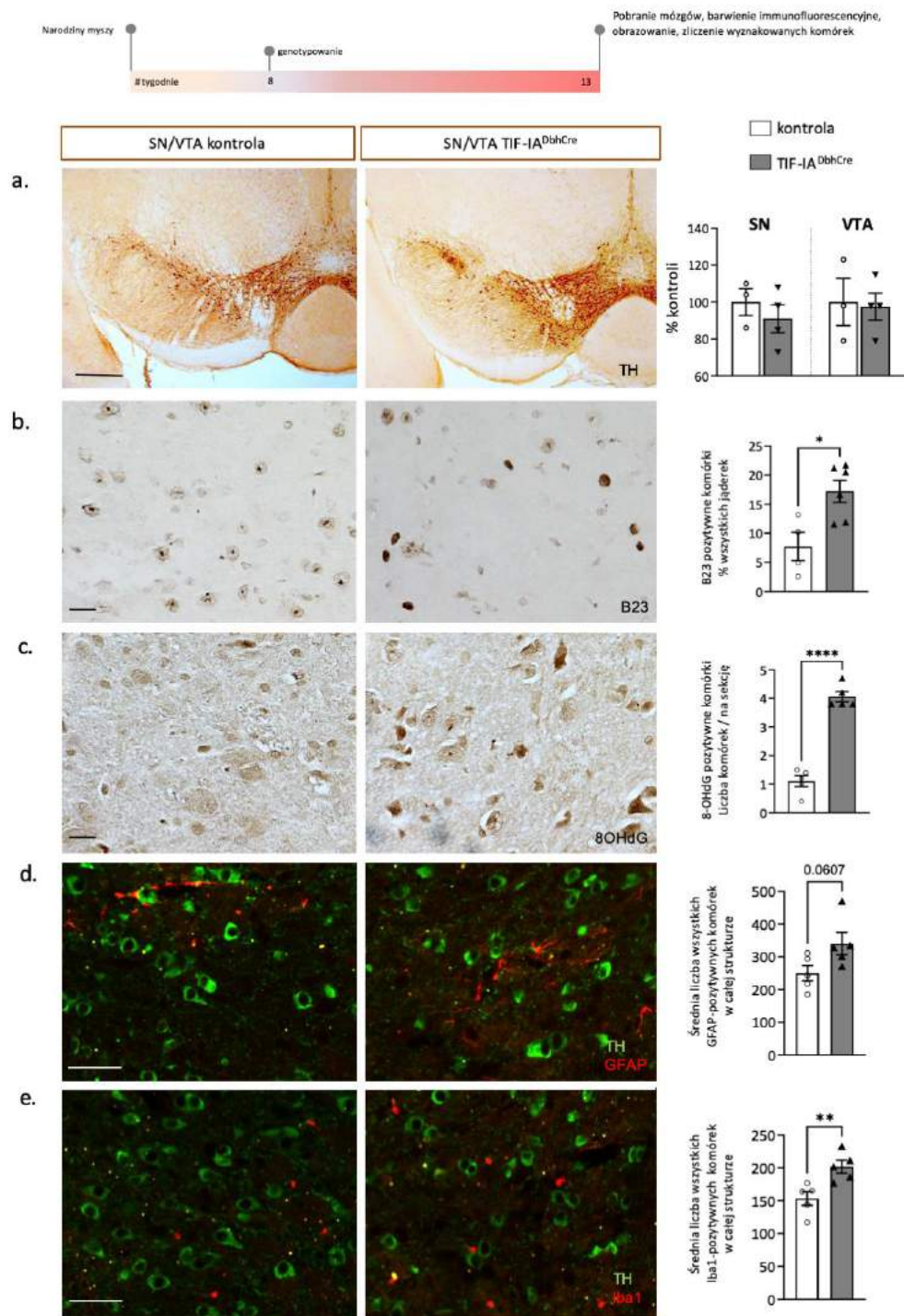
W modelu TIF-IA^{DbhCre} degeneracji ulegają neurony noradrenergiczne zlokalizowane w mózgu – głównie w LC, a także komórki z ekspresją DBH występujące obwodowo. Ze względu na degenerację pozaośrodkowych struktur, myszy przejawiały od urodzenia znaczące upośledzenie fenotypowe: zmniejszona ruchliwość spontaniczna, ptoza, brak przyrostu na wadze skutkujące letalnością przed upływem 3-go miesiąca życia. Mutacja w tym modelu jest konstytutywna, co oznacza, że zmiany degeneracyjne dotyczyły zwierząt już od urodzenia, będąc wywołane na etapie początku ekspresji rekombinazy Cre, ok. 16,5 dnia prenatalnego. Podczas zliczeń komórek z przekrojów LC u myszy 6, 10 i 12 - tygodniowych wykazano, że u mutantów neurony noradrenergiczne ulegają degeneracji, a ubytek komórek wyrażających DBH nasila się w czasie. W 12 tygodniu życia zwierząt dochodzi do niemal całkowitej utraty komórek TH+ w LC. Wykazano również, że degeneracji ulegają komórki występujące obwodowo wyrażające DBH, między innymi komórki chromochłonne rdzenia nadnerczy. Dysfunkcje te są najprawdopodobniej bezpośrednio odpowiedzialne za letalność zwierząt w okolicy 12-go tygodnia życia. Skutków degeneracji komórek ekspresjonujących DBH nie poprawiało podanie prekursora

noradrenaliny, L-threo-3,4-dihydroksyfenyloseriny (DOPS), wydłużając życie zwierząt jedynie ok. 1-2 tygodni. Wyniki te zostały zebrane jeszcze przed przystąpieniem do realizacji niniejszej pracy doktorskiej a ich szczegółowe zestawienie zawiera Fig. 1 w publikacji p.t. “*Genetic lesions of the noradrenergic system trigger induction of oxidative stress and inflammation in the ventral midbrain.*” (Barut et al., 2022).

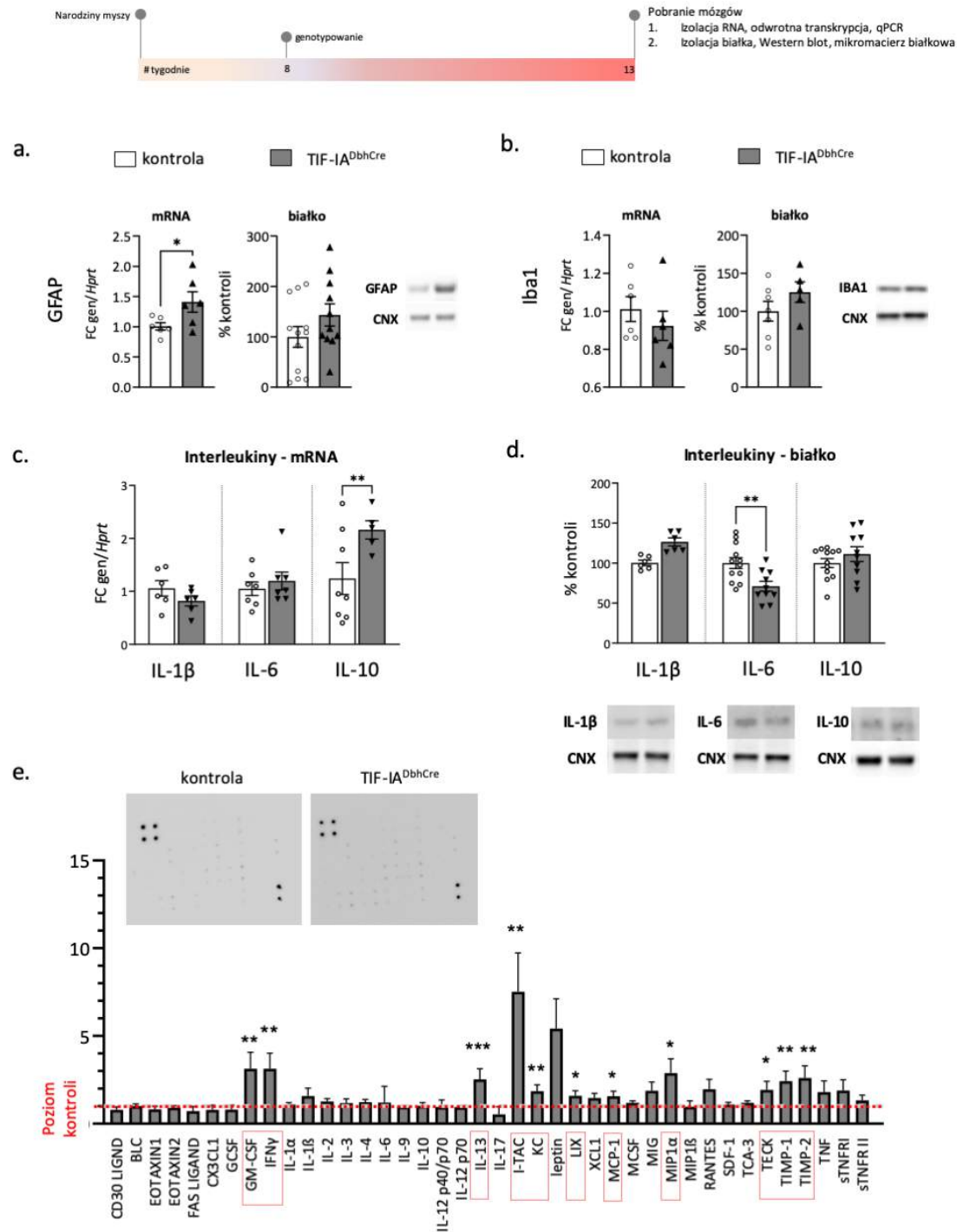
4.1.2. Stochastyczne efekty neurodegeneracji układu noradrenergicznego u myszy TIF-IA^{DbhCre} – wzrost markerów stanu zapalnego w rejonie SN/VTA

Aby zbadać długotrwałe oddziaływanie degeneracji układu noradrenergicznego na układ dopaminowy analizowano zmiany obecne w rejonie SN/VTA. Mimo braku zmian w ilości neuronów dopaminowych w SN/VTA myszy o genotypie mutanta, zmierzonych za pomocą zliczenia komórek TH+ (Ryc. 31 a), zaobserwowano szereg zmian świadczących o dysfunkcji układu dopaminowego. W barwieniach immunohistochemicznych wykazano wzrost liczby komórek z dysfunkcyjnymi jąderkami wybarwionymi przy użyciu B23 (nukleofosmina, NPM1), gdzie o stresie jąderkowym świadczy translokacja NPM1 do nukleoplazmy (jednoczynnikowa ANOVA, $F_{1,8} = 9,70$, $p < 0,05$) (Ryc. 31 b). Wykazano także, wzrost ekspresji markera stresu oksydacyjnego, 8-OHdG (ang. *8-Hydroxydeoxyguanosine*) u zwierząt o genotypie mutanta ($F_{1,8} = 125,90$, $p < 0,0001$) (Ryc. 31 c). Oznaczono markery neurozapalenia w postaci aktywacji mikrogleju i astrocytów, co może świadczyć o stanie zapalnym w rejonie SN/VTA. 12-tygodniowe myszy z mutacją TIF-IA^{DbhCre} wykazywały znaczny wzrost ekspresji mRNA GFAP w SN/VTA (1.4 - krotna zmiana w stosunku do kontroli; jednoczynnikowa ANOVA $F_{1,10} = 5,11$, $p < 0,05$) i tendencję wzrostową poziomu białka oznaczonego metodą Western blot (Ryc. 32 a), a także w barwieniach immunofluorescencyjnych skrawków śródmózgowia (Ryc. 31 d). Mimo, że poziom mRNA i białka markerowego mikrogleju, Iba1 nie różniły się istotnie między myszami o genotypie mutanta i kontrolnymi (Ryc. 32 e), aktywność mikrogleju była podwyższona w SN/VTA myszy TIF-IA^{DbhCre} o genotypie mutanta, co pokazano za pomocą barwień immunofluorescencyjnych i zliczeń komórek Iba1+ ($F_{1,8} = 11,27$, $p < 0,01$) (Ryc. 31 e)

U 12-tygodniowych mutantów stwierdzono również podniesienie ekspresji cytokin prozapalnych (Ryc. 32 c - d). Badania PCR w czasie rzeczywistym ekspresji mRNA genów zapalnych, *Il-1 β* , *Il-6* i *Il-10*, wykazały 2-krotny wzrost ekspresji mRNA *Il-10* u mutantów (jednoczynnikowa ANOVA, $F_{5,33} = 4,48$, $p < 0,01$; post hoc $p = 0,009$). Analiza Western blot nie wykazała żadnych znaczących zmian w poziomie białka Il-10 lub Il-1 β między grupami. Zauważono jednak, że poziom Il-6 zmniejszył się istotnie o 32% ($F_{5,50} = 6,12$, $p < 0,001$; post hoc $p = 0,007$) w grupie mutantów. Te zmiany w markerach stanu zapalnego skłoniły nas do zbadania odpowiedzi zapalnej za pomocą mikromacierzy białkowych (Ryc. 32 e). Aby zbadać, w jaki sposób mutacja powodująca degenerację miejsca sinawego wpływa na inne cytokiny w rejonie SN/VTA, wykonaliśmy półilościową matrycę białkową dla 40 głównych cytokin i chemokin. Te badania wykazały podwyższony poziom kilku czynników prozapalnych, takich jak: GM-CSF ($F_{1,6} = 15,42$; $p < 0,01$), IFN γ ($F_{1,6} = 26,08$; $p < 0,01$), Il-13 ($F_{1,6} = 109,10$; $p < 0,0001$), I-TAC (CXCL11) ($F_{1,6} = 26,30$; $p < 0,01$), KC (CXCL1) ($F_{1,6} = 26,37$; $p < 0,01$), LIX (CXCL5) ($F_{1,6} = 8,40$; $p < 0,05$), MCP1 (CCL2) ($F_{1,6} = 8,11$; $p < 0,05$), MIP1 α ($F_{1,6} = 11,00$; $p < 0,05$) lub TECK ($F_{1,6} = 7,33$; $p < 0,05$). U zwierząt TIF-IA^{DbhCre} stwierdzono także podwyższenie poziomu białek neuroprotektynnych, takich jak TIMP1 ($F_{1,6} = 125,54$; $p < 0,0001$) i TIMP2 ($F_{1,6} = 21,25$; $p < 0,01$) w porównaniu do zwierząt kontrolnych.



Ryc. 31. Zmiany zaobserwowane w obszarze SN/VTA u 12-tygodniowych myszy TIF-IA^{DbhCre}. (a.) Reprezentatywne obrazy pokazujące neurony TH⁺ w SN/VTA z analizą ilościową; skala = 300 μ m (b.) Barwienie immunohistochemiczne pokazujące cytoplazmatyczną lokalizację nukleolarnego białka B23 (NPM1) w sekcjach SN/VTA mutantów wraz z analizą ilościową komórek; Skala = 50 μ m; (c.) Sekcje SN/VTA myszy kontrolnych i myszy TIF-IA^{DbhCre} analizowane w celu wykrycia 8-hydroksydeoksyguanozyny (8-OHdG) jako markera uszkodzenia DNA spowodowanego reaktywnymi formami tlenu (ROS); Skala = 50 μ m; (d.) Reprezentatywne zdjęcie pokazujące ekspresję markera astrogleju (GFAP) w rejonie SN/VTA za pomocą barwienia immunofluorescencyjnego wraz z ilościową oceną komórek GFAP⁺ w obszarze SN/VTA; Skala = 50 μ m; (e.) Reprezentatywne zdjęcie pokazujące ekspresję markera mikrogleju (Iba1) w rejonie SN/VTA za pomocą barwienia immunofluorescencyjnego wraz z ilościową oceną komórek Iba1⁺ w obszarze SN/VTA; Skala = 50 μ m. Do oceny istotności statystycznej wykorzystano jednoczynnikową analizę wariancji dla prób niezależnych. N = 5. Wyniki przedstawiono jako średnią dla grup \pm SEM. Istotność statystyczna przedstawiona jako *. * p < 0,05; ** p < 0,01; **** p < 0,0001.



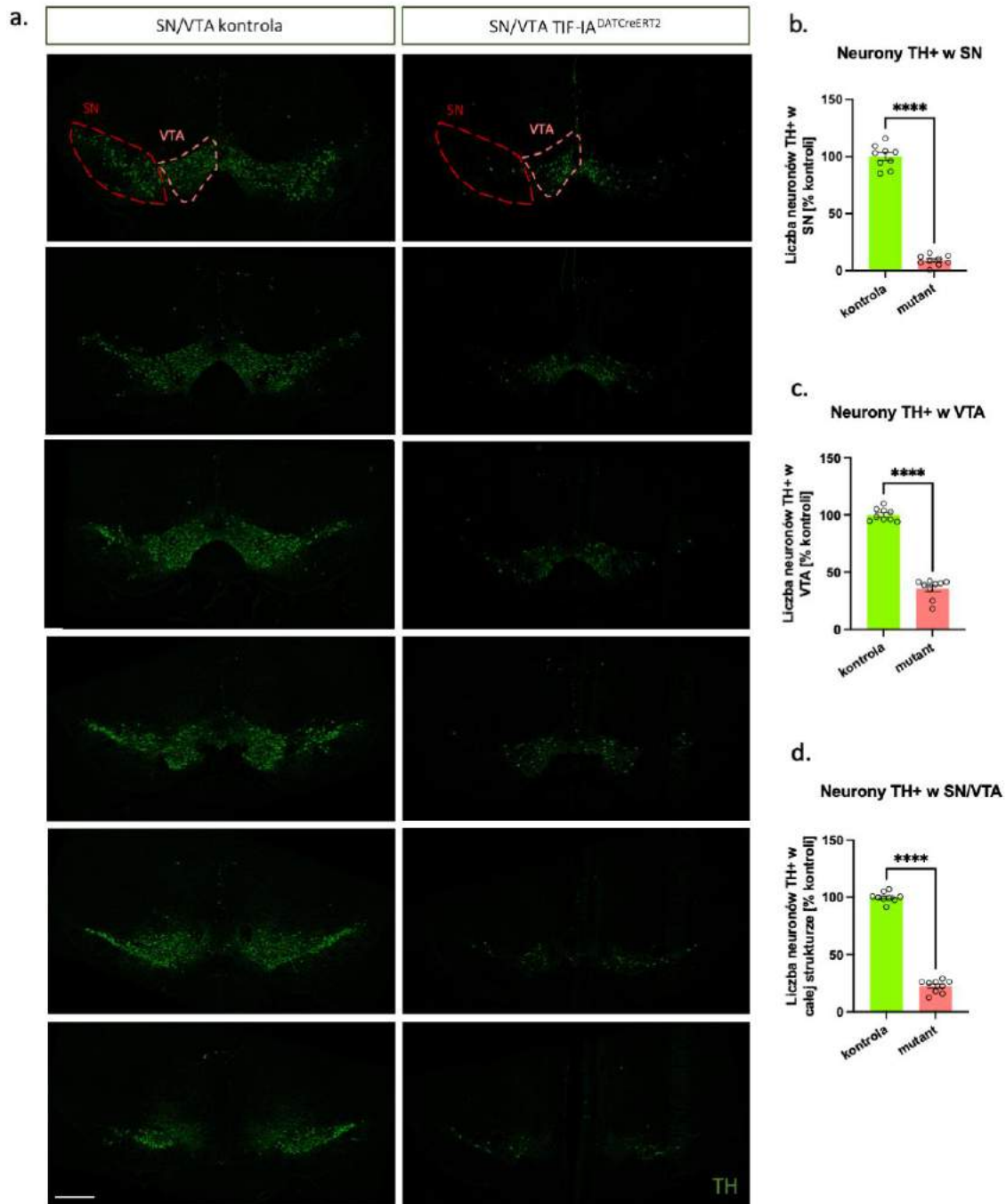
Ryc. 32. Zwiększone poziomy markerów zapalnych w SN/VTA myszy TIF-IA^{DbhCre}. (a.) Analiza poziomu ekspresji mRNA oraz poziomu białka GFAP, N = 6 - 12; (b.) Analiza poziomu ekspresji mRNA oraz poziomu białka Iba1, N = 6 - 7; (c.) Analiza poziomu ekspresji mRNA *Il-1β*, *Il-6* i *Il-10*, N = 6 - 8. (d.) Analiza poziomu białek IL-1β, IL-6 i IL-10, N = 6 - 12; (e.) Wyniki pomiarów macierzy białkowej dla czynników zapalnych, słupki przedstawiają krotną zmianę zwierząt TIF-IA^{DbhCre} w porównaniu z kontrolą typu dzikiego (linia czerwona), istotne wyniki zakreślone są w czerwony kwadrat, N = 8. GFAP – kwaśne białko włóknkowe gleju; Iba1 - białko łączące się z jonami wapnia adaptora; CNX - kalnexamina (białko reporterowe); IL – interleukina. Wyniki przedstawiono jako relatywne poziomy ekspresji genów, wraz z znaczącą średnią dla grup ± SEM, znormalizowane względem poziomu ekspresji genu standaryzującego, *Hprt1*, w obu badanych grupach. FC – fold change, wartość wskazująca wielokrotność różnicy (log₂) sygnałów fluorescencji pomiędzy transkryptomami grup badanych – kontroli i mutantów. Do oceny istotności statystycznej wykorzystano jednoczynnikową analizę wariancji dla prób niezależnych. Istotność statystyczna przedstawiona jako *. * p < 0,05, ** p < 0,01; ***p < 0,001; **** p < 0,0001.

4.1.3. Brak wpływu degeneracji układu dopaminowego na liczbę neuronów w LC, w modelu progresywnej choroby Parkinsona (myszy TIF-IA^{DATCreERT2})

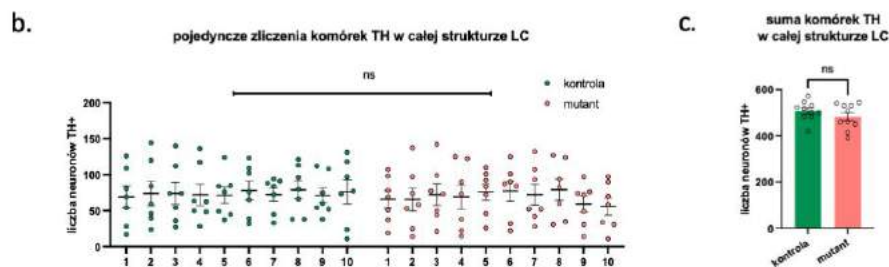
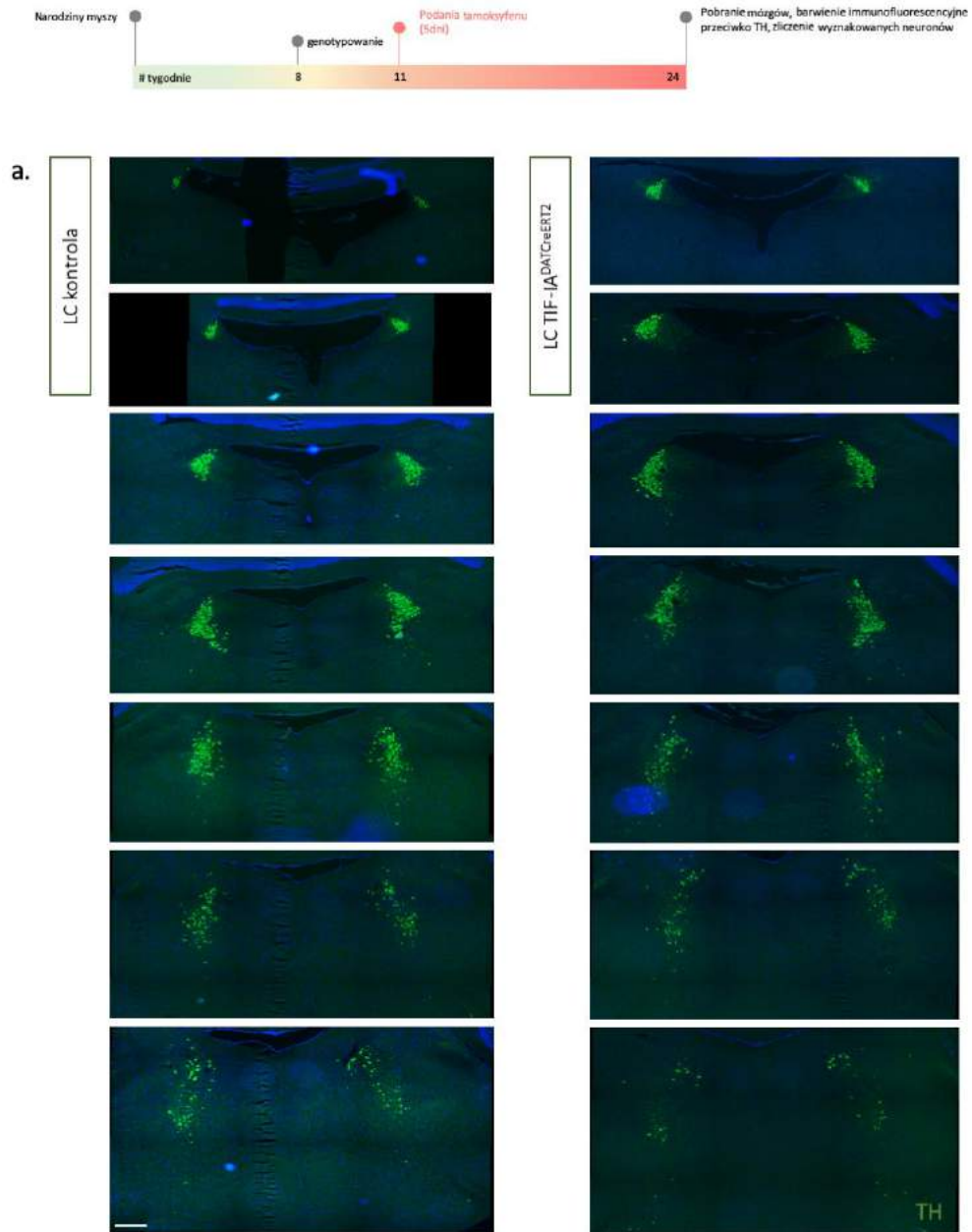
Myszy TIF-IA^{DATCreERT2} charakteryzują się progresywną degeneracją komórek dopaminowych, ekspresjonujących DAT i stanowią wykorzystywaną w naszym laboratorium modelową linię odzwierciedlającą postępującą PD. Nasze wcześniejsze badania wskazują, że u myszy tego szczepu istotna degeneracja neuronów dopaminowych zlokalizowanych w śródmózgowiu jest obserwowana od 7 tygodnia od indukcji poprzez podanie tamoksyfenu i nasila się w czasie. Degeneracji układu dopaminowego towarzyszą charakterystyczne zmiany behawioralne, nasilające się wraz z ubytkiem neuronów (Rieker *et al.*, 2011; Kreiner *et al.*, 2019). Zwierzęta te były wykorzystane w innych doświadczeniach. Wykorzystując pobrane z nich i utrwalone w PFA mózgi, postanowiono zbadać czy degeneracja układu dopaminowego w rejonie SN/VTA nie oddziałuje w sposób niespecyficzny także na układ noradrenergiczny w rejonie LC. Grupie zwierząt (N = 10, samce i samice) podano tamoksyfen, a następnie, po 13 tygodniach pobrano mózgi do dalszej analizy. Wykonano barwienia immunofluorescencyjne z przeciwciałami skierowanymi przeciwko TH w rejonie SN/VTA, aby potwierdzić spodziewane efekty mutacji, tj. degenerację neuronów dopaminowych w śródmózgowiu i równocześnie zweryfikowano ew. zmiany w liczbie neuronów noradrenergicznych w LC. Celem tego eksperymentu, wykonanego z uwagi na dostęp do materiału pobranego z myszy TIF-IA^{DATCreERT2} wykorzystanych w innych doświadczeniach, było upewnienie się, że efekty negatywnego oddziaływania degeneracji układu noradrenergicznego na układ dopaminowy są specyficzne kierunkowo, tj. czy przypadkiem odwrotne zaburzenie funkcjonowania układu dopaminowego nie wpływa na degenerację w układzie noradrenergicznym

Z części mózgowia obejmującej SN/VTA zliczono ilość neuronów TH+. Stwierdzono, że mutacja powoduje degenerację SN/VTA. Występuje redukcja o 91,5 % (test t-studenta, $t = 24,62$, $df = 16$, $p < 0,0001$) ilości neuronów TH+ w SN oraz o 64,3 % w regionie VTA (test Manna Whitney'a, $U = 0$, $p < 0,0001$), co daje średni spadek ilości neuronów dopaminowych o 77,7 % (test Manna Whitney'a, $U = 0$, $p < 0,0001$) (**Ryc. 33**)

Z części mózgowia obejmującej LC zliczono ilość wyznakowanych neuronów TH+ (**Ryc. 34**). Nie zaobserwowano zmiany w ilości neuronów noradrenergicznych w mysim modelu progresywnej degeneracji neuronów dopaminowych (test t-studenta, $t = 0,1418$, $df = 38$, $p = 0,8880$). Opierając się na tym uzyskanym wyniku można założyć, że degeneracja układu noradrenergicznego nie jest wtórnym, towarzyszącym efektem śmierci neuronów dopaminowych.



Ryc. 33. Analiza SN/VTA u myszy TIF-1ADATCreERT2. (a.) Przykładowe barwienia immunofluorescencyjne skrawków odzwierciedlających równo oddalone przekroje obejmujące całą strukturę SN/VTA u wybranej przykładowej myszy mutantka i myszy kontrolnej wybarwionej przeciwciałem anti-TH w celu zliczenia neuronów dopaminowych w celu ilościowej weryfikacji efektów mutacji. Wykresy przedstawiające zliczenie neuronów TH+ w: (b.) części SN; (c.) części VTA, (d.) całości struktury SN/VTA. Wyniki przedstawiono jako średnią ± SEM. N = 9. Do oceny istotności statystycznej wykorzystano test t-studenta oraz Manna-Whitneya. SN – istota czarna; VTA – pole brzuszne nakrywki; TH – hydroksylaza tyrozynowa; Istotność statystyczna przedstawiona jako *. **** $p < 0,0001$; Skala 250 μm



Ryc. 34. Analiza ilościowa komórek TH⁺ w miejscu sinawym (LC) u myszy TIF-IA^{DATCreERT2}. (a.) Obrazy mikroskopowe przedstawiające barwienie immunofluorescencyjne skrawków odzwierciedlających równo oddalone przekroje obejmujące całą strukturę LC u wybranej, przykładowej myszy mutantka i myszy kontrolnej na obecność TH⁺ w celu analizy ilościowej dla oszacowania zmian między grupami. (b.) Zliczenie neuronów TH⁺ przedstawione osobno z każdego osobnika (nr 1 – 10, kolor zielony - myszy kontrolne; 1 – 10, kolor czerwony - myszy TIF-IA^{DATCreERT2}) z zaznaczoną średnią ilością neuronów ± SEM; punkty na wykresie oznaczają liczbę neuronów TH⁺ z każdego skrawka osobno. (c.) Średnia suma komórek TH⁺ w LC ± SEM. LC – miejsce sinawe; TH – hydroksylaza tyrozynowa; N = 10. Do oceny istotności statystycznej wykorzystano dwuczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz t-test studenta; Skala 500 μm

4.2. Zaprojektowanie, stworzenie i charakterystyka nowatorskiego modelu selektywnej delecji TIF-IA w rejonie miejsca sinawego, opartego o system edycji genów CRISPR/Cas9 zastosowany u myszy ekspresjonujących rekombinazę Cre pod kontrolą promotora Dbh

4.2.1. Przygotowanie wektorów CRISPR/Cas9 potrzebnych do wygenerowania nowej mysiej linii TIF-IA-CRISPR^{DbhCre}

Aby otrzymać funkcjonalne wektory do przeprowadzenia eksperymentów *in vitro* i *in vivo*, zaprojektowano odpowiednie plazmidy i przeprowadzono serię klonowań, opisane w części metodycznej. Do klonowań wykorzystano dostępne sekwencje z innych plazmidów, których funkcjonalność sprawdzono i wykorzystywano do wcześniejszych eksperymentów.

4.2.1.1. Neuronalny wektor Cre-zależny CRISPR/Cas9

W niniejszej pracy wykorzystano system CRISPR/Cas9, aby przeprowadzać ukierunkowaną mutagenezę w komórkach somatycznych, nie dzielących się neuronach noradrenergicznych. Docelowy wektor transferowy Cre-zależny CRISPR/Cas9 został tak zaprojektowany, aby modyfikacje genetyczne wprowadzić do specyficznej populacji komórek, które zawierają ekspresję rekombinazy Cre. Dzięki takiemu rozwiązaniu nie ma możliwości, żeby wektor wykazywał ekspresję Cas9 w komórkach nie wykazujących ekspresji rekombinazy Cre, a tym samym spowodował degenerację transdukowanych neuronów. Wektor plazmidowy został zaprojektowany, aby spełniać przyjęte założenia:

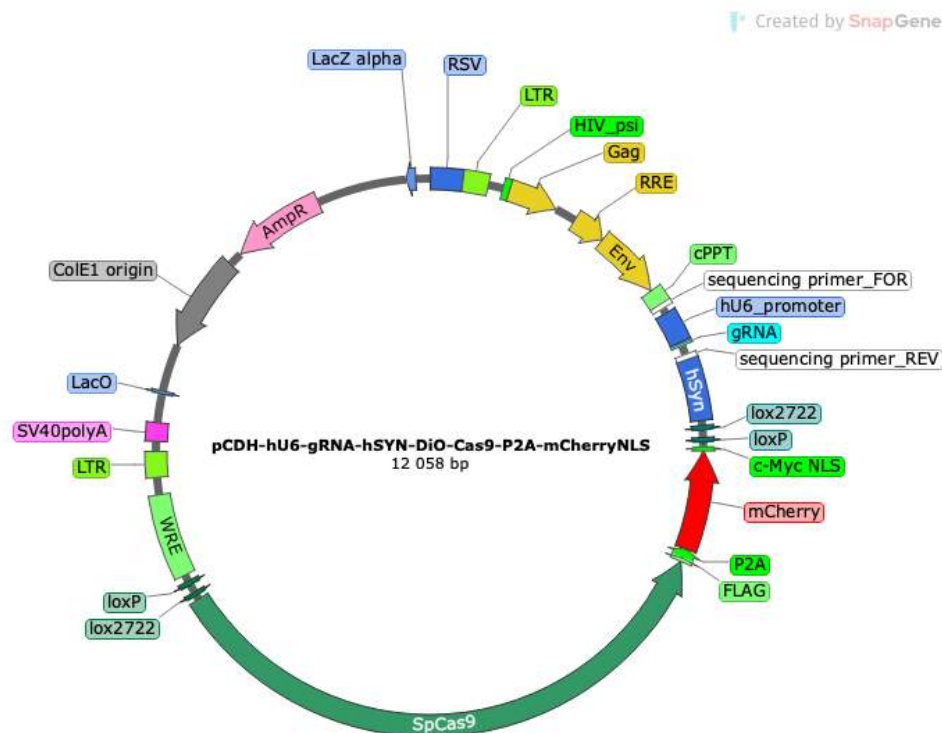
- posiada silny promotor neuronalny;
- wykazuje zależną od Cre ekspresję Cas9 i znacznika fluorescencyjnego;
- wszystkie niezbędne fragmenty DNA zawierają się w jednej cząsteczce plazmidu;
- jest cząsteczką uniwersalną i zmiana gRNA pozwala na wycieszenie dowolnych genów;
- pozwala na zapakowanie do wektora lentiwirusowego.

Uzyskany wektor zawiera w sobie wszystkie niezbędne kodujące fragmenty DNA, m.in.:

- elementy odpowiedzialne za pakowanie, transdukcję, stabilną integrację wirusowego konstruktów ekspresyjnego z genomowym DNA;
- gen oporności na selekcyjny antybiotyk, ampicylinę;
- gRNA pod promotorem hU6;
- Cas9 wraz z białkiem fluorescencyjnym mCherryNLS, oflankowane miejscami loxP/lox2722 w odwrotnej orientacji (DIO), pod promotorem neuronalnym – synapsyną.

Otrzymany plazmid pCDH-hU6-*AarI-filler-AarI*-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS (Ryc. 35) charakteryzuje się dodatkowym miejscem cięcia dla enzymu restrykcyjnego MscI, który podczas trawienia pozwala na łatwiejsze zidentyfikowanie plazmidowych klonów, u których uzyskano pozytywny rezultat wklonowania gRNA. Poszczególne kroki, które pozwoliły na wytworzenie tego konstruktów opisane są szczegółowo w rozdziale: 3.2.2.

Używany w kolejnych rozdziałach skrót „wektor CRISPR-DIO” odnosi się do neuronalnego wektora Cre-zależnego pCDH-hU6-gRNA-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS.



Ryc. 35. Mapa wektora plazmidowego pCDH-hU6-gRNA-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS. LTR, HIV-1psi, gag, RRE, Env, cPPT - elementy odpowiedzialne za pakowanie, stabilną integrację wirusowego konstruktów ekspresyjnego z genomowym DNA; AmpR - gen oporności na antybiotyk selekcyjny, ampicylinę; gRNA - gRNA pod ludzkim promotorem U6 (hU6_promoter); hSyn - promotor ludzkiej synapsyny; lox2722 / loxP - miejsca flankujące lox; mCherry - znacznik fluorescencyjny mCherry; c-Myc NLS - sekwencja lokalizacji jądrowej, kieruje do lokalizacji jądrowej białko mCherry; SpCas9 - endonukleaza Cas9; FLAG - znacznik tag; P2A - samorozcinający peptyd; WPRE - posttranskrypcyjny element regulacyjny; bGH_PA_terminator / SV40polyA_terminator - sekwencja zakańczająca ekspresję białka; ColE1_origin - miejsce początku replikacji DNA; LacO - lac operon

4.2.1.2. Neuronalny wektor CRISPR/Cas9

Podczas doświadczeń korzystano również z neuronalnego wektora transferowego CRISPR/Cas9, który nie jest zależny od Cre. Wykorzystano go głównie do celów porównawczych w oszacowaniu uzyskanego miana lentiwirusów, efektywności transdukcji neuronów *in vitro*, a także weryfikacji działania gRNA. Plazmid plentiCRISPR-hU6-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS (Ryc. 36) otrzymano dzięki uprzejmości laboratorium Uniwersytetu w Helsinkach, gdzie był stworzony i używany do standardowych procedur. Aby zachować takie same procedury podczas klonowania opisywanego plazmidu oraz plazmidu Cre-zależnego, dokonano modyfikacji, tj. wstawiono insert AarI-filler-AarI, dzięki któremu przy użyciu enzymów restrykcyjnych AarI możliwe jest wklonowanie docelowego gRNA. Potrzebne procedury opisane w rozdziale metod 3.2.2.3.

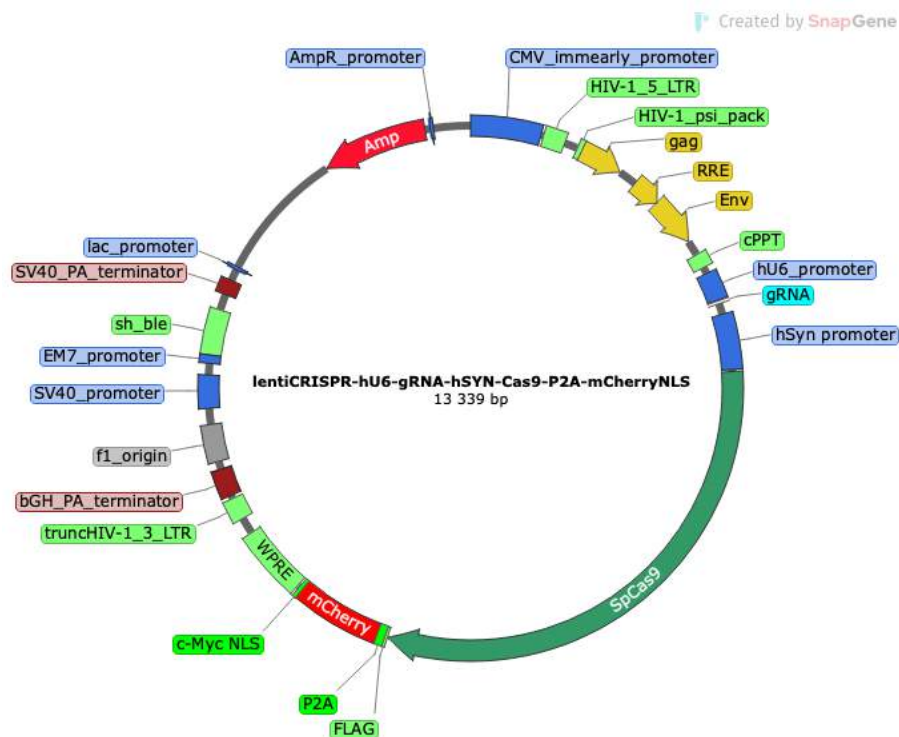
Neuronalny wektor CRISPR/Cas9 zawiera w sobie wszystkie niezbędne kodujące fragmenty DNA, m.in.:

- elementy odpowiedzialne za pakowanie, transdukcję, stabilną integrację wirusowego konstruktów ekspresyjnego z genomowym DNA;
- gen oporności na antybiotyk selekcyjny, ampicylinę;
- gRNA pod promotorem hU6;
- Cas9 wraz z białkiem fluorescencyjnym mCherryNLS pod promotorem neuronalnym - synapsyną.

Tak jak w przypadku plazmidu Cre-zależnego pCDH-hU6-AarI-filler-AarI-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS, otrzymany plazmid plentiCRISPR-hU6-AarI-filler-AarI-hSYN-Cas9-P2A-

mCherryNLS charakteryzuje się dodatkowym miejscem cięcia dla enzymu restrykcyjnego MscI, który podczas trawienia pozwala na łatwiejsze zidentyfikowanie plazmidowych klonów, u których uzyskano pozytywny rezultat wklonowania gRNA. Zdjęcie żelu obrazującego trawienie restrykcyjne otrzymanych plazmidów znajduje się na Ryc. 40.

Używany w kolejnych rozdziałach skrót „wektor CRISPR” odnosi się do neuronalnego wektora Cre-niezależnego pCDH-hU6-gRNA-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS.



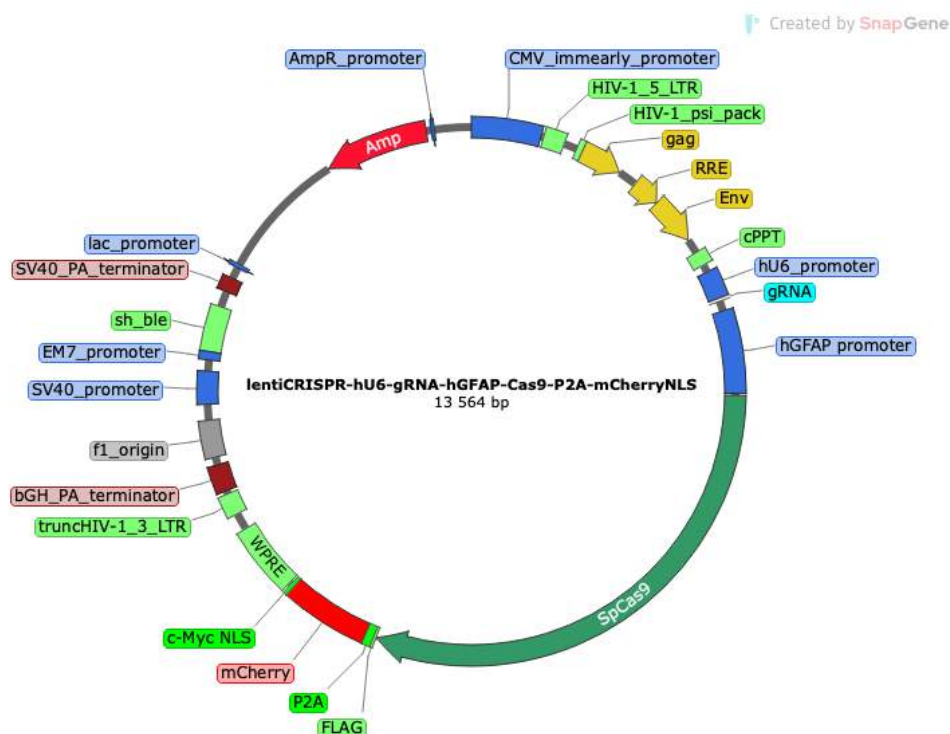
Ryc. 36. Mapa wektora plazmidowego plentiCRISPR-hU6-gRNA-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS. HIV-1_5_LTR, HIV-1_3_LTR, HIV-1psi_pack, gag, RRE, Env, cPPT - elementy odpowiedzialne za pakowanie, , stabilną integrację wirusowego konstruktów ekspresyjnego z genomowym DNA; AMP - gen oporności na antybiotyk selekcyjny, ampicylinę; gRNA - gRNA pod ludzkim promotorem U6 (hU6_promoter); hSyn - promotor ludzkiej synapsyny; SpCas9 - endonukleaza Cas9; mCherry - znacznik fluorescencyjny mCherry; FLAG - znacznik tag; P2A - samorozcinający tag; c-Myc NLS - sekwencja lokalizacji jądrowej, kieruje do lokalizacji jądrowej białko mCherry; WPRE - posttranskrypcyjny element regulacyjny; bGH_PA_terminator / SV40_PA_terminator - sekwencje zakańczające ekspresję białka; f1_origin - miejsce początku replikacji DNA; sh_ble - gen oporności na bleomycynę

4.2.1.3. Astrocytarny wektor CRISPR/Cas9

Ze względu na zainteresowanie również transdukcją astrocytów zaprojektowano wektor na matrycy wyżej opisanego wektora neuronalnego plentiCRISPR-hU6-AarI-filler-AarI-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS (Ryc. 37). Plazmid używano, aby zweryfikować działanie zaprojektowanych gRNA, a także w projekcie Preludium, aby wykonać dwa zadania badawcze, w których badano wpływ usunięcia astrocytów z rejonu SN/VTA na szybkość formowania przez komórki patologicznych złogów α -synukleiny. Aby otrzymać docelowy plazmid wykonano zamianę promotorów synapsyny na kwaśne białko włóknikowe, GFAP, charakterystyczne dla astrocytów. W tym celu wykonano punkty opisane w sekcji metod 3.2.3.

Otrzymany astrocytarny wektor zawiera w sobie wszystkie niezbędne kodujące fragmenty DNA, m.in.:

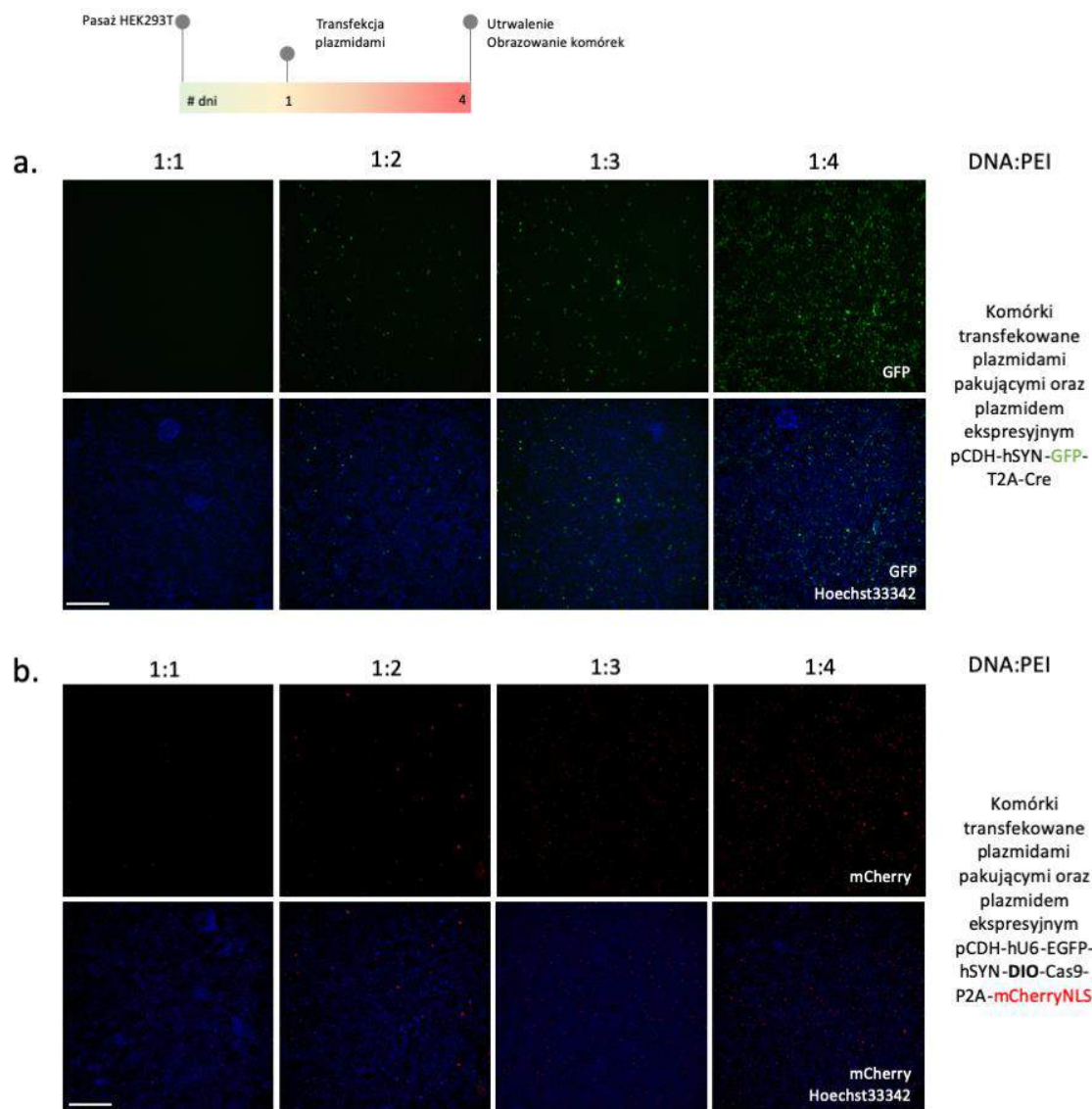
- elementy odpowiedzialne za pakowanie, transdukcję, stabilną integrację wirusowego konstrukt ekspresyjnego z genomowym DNA
- gRNA pod promotorem hU6
- Cas9 wraz z białkiem fluorescencyjnym mCherryNLS pod promotorem astrocytarnym – hGFAP



Ryc. 37. Mapa wektora plazmidowego plentiCRISPR-hU6-Aar1-filler-Aar1-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS HIV-1_5_LTR, HIV-1_3_LTR, HIV-1psi_pack, gag, RRE, Env, cPPT - elementy odpowiedzialne za pakowanie, stabilną integrację wirusowego konstrukt ekspresyjnego z genomowym DNA; AMP - gen oporności na antybiotyk selekcyjny, ampicylinę; gRNA - gRNA pod ludzkim promotorem U6 (hU6_promoter); hGFAP_promoter – promotor astrocytarny; SpCas9 – endonukleaza Cas9; mCherry – znacznik fluorescencyjny mCherry; FLAG – znacznik tag; P2A – samorozcinający tag; c-Myc NLS – kieruje do lokalizacji jądrowej białko mCherry; WPRE - posttranskrypcyjny element regulacyjny; bGH_PA_terminator / SV40_PA_terminator – sekwencje zakańczające ekspresję białka; f1_origin – miejsce początku replikacji DNA; sh_ble – gen oporności na bleomycynę

4.2.2. Produkcja i weryfikacja wektorów lentiwirusowych (LV)

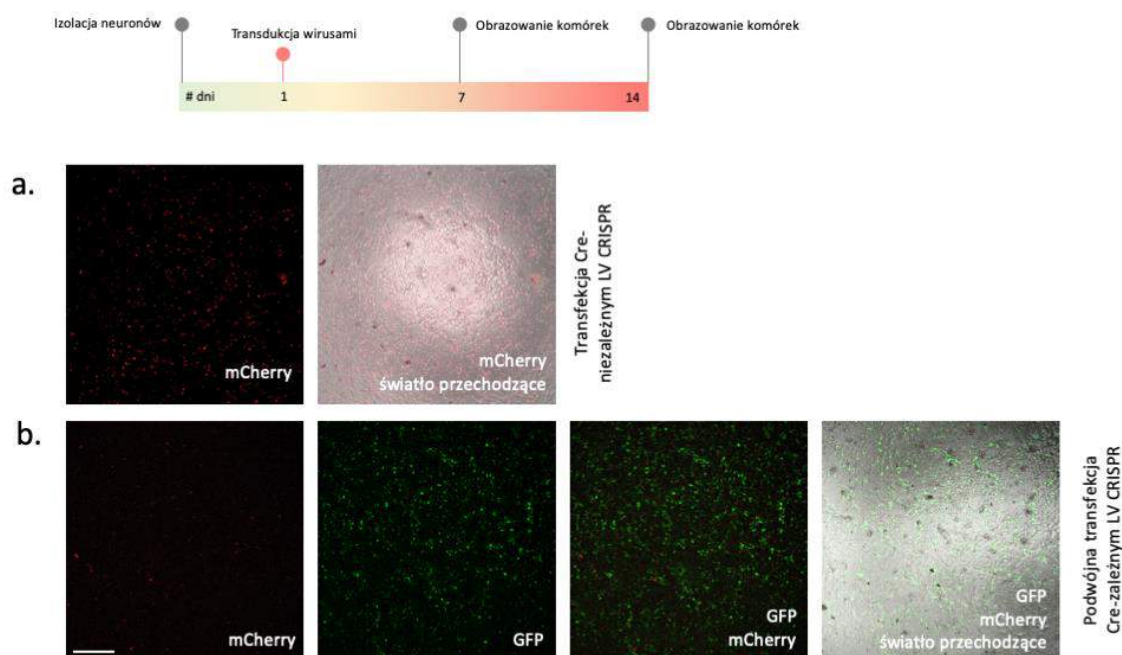
Pierwszym krokiem po uzyskaniu wektorów plazmidowych, było przygotowanie wektorów lentiwirusowych metodą transfekcji komórek HEK293T plazmidami pakującymi III generacji. W tym celu uzyskane plazmidy transferowe oraz plazmidy pakujące były namnażane, a następnie komórki HEK293T były transfekowane z użyciem PEI (szczegółowo opisane w podrozdziale metodyka 3.3). Ze względu na problemy z osiągnięciem wysokiego miana wirusów optymalizowano procedury, a następnie każdorazowo postępowano według wyznaczonego protokołu oraz wykonywano próbną transdukcję komórek *in vitro*. Jedną z optymalizacji było dostosowanie odpowiedniego stężenia DNA oraz stosunku PEI podczas transfekcji. Wykonywano próbne transfekcje plazmidami pakującymi i plazmidem transferowym, aby znaleźć optymalny stosunek DNA:PEI, w których ekspresja białka fluorescencyjnego będzie najwyższa, a śmiertelność komórek pakujących HEK293T będzie najniższa. Mimo zastosowania takich samych warunków podczas transfekcji, zaobserwowano, że plazmidy CRISPR/Cas9 transfekują mniejszą ilość komórek pakujących niż plazmidy kontrolne. Do kolejnych eksperymentów wybrano najlepsze stężenie, czyli 10 µg DNA na 10 ml medium hodowlanego oraz najniższe skuteczne stężenie PEI, czyli 40 µg, tj. stosunek DNA:PEI wynosi 1:4 (Ryc. 38).



Ryc. 38. Transfekcja komórek HEK293T plazmidami do produkcji lentiwirusów, z DNA i PEI w różnym stosunku. (a.) transfekcja komórek z użyciem plazmidów pakujących oraz plazmidem transferowym pCDH-hSYN-GFP-Cre; (b.) transfekcja komórek z użyciem plazmidów pakujących oraz plazmidem transferowym pCDH-hU6-EGFP-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS. Skala 250 μ m.

Ze względu na homologiczne sekwencje w LTR, wszystkie wektory lentiwirusowe mają skłonność do rekombinacji w niektórych szczepach bakteryjnych *E. coli*. Podczas transformacji bakteryjnej używano bakterii kompetentnych o niskiej częstotliwości rekombinacji (jak m.in. dedykowane do wektorów lentiwirusowych bakterie NEB Stable), a ostateczne wersje konstruktów plazmidowych dodatkowo sekwencjonowano lub trawiono diagnostycznie. Ze względu na odległość sekwencji LTR od siebie założono, że może mieć to wpływ na efektywność pakowania cząsteczki wirusa. Z tego względu oprócz testów ELISA p24, gdzie mierzony jest tzw. niefunkcjonalne miano (które również mierzy m.in. wolne białko p24, które nie zostało wbudowane do cząsteczki wirusa) wykonywano również transdukcję komórek *in vitro* i zliczenie zainfekowanych komórek. Testy ilościowe i funkcjonalne obliczenie miana infekcyjnego wirusów przeprowadzono na wektorach kontrolnych (z gRNA przeciwko białku EGFP). Test ELISA p24 wykazał, że koncentracja białka p24 po procesie izolacji wirusa wynosi średnio 123 pg/ml. Podczas pomiaru funkcjonalnego miana (które mierzy tylko dojrzałe cząsteczki wirusa), komórki zainfekowano wektorami CRISPR oraz wykonano podwójną transdukcję wektorami CRISPR-DIO w połączeniu z wirusem niosącym ekspresję Cre, aby docelowa sekwencja mogła zostać uruchomiona w obecności Cre. Zaobserwowano, że infekcja

korowych neuronów pierwotnych CRISPR uzyskuje miano transfekcji $6,9 \times 10^7$ TU/ml. W przypadku podwójnej transdukcji i oceny miana wirusa CRISPR-DIO za liczbę neuronów w stosunku do których obliczono miano wirusa przyjęto wszystkie neurony w hodowli, ale w rzeczywistości CRISPR-DIO zainfekuje tylko te, które posiadają Cre (eksperymenty opisane i wytłumaczone w kolejnym podrozdziale 4.2.4). Na rycinie (Ryc. 39) przedstawiono przykładowy obraz mikroskopu neuronów po transdukcji wektorem CRISPR (Cre-niezależnym): plentiCRISPR-hU6-EGFP_g1-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS oraz wektorem CRISPR-DIO (Cre-zależnym): pCDH-hU6-EGFP_g1-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS. Wyliczone na jego podstawie wydajności to dla wektora pCDH-hSYN-GFP-Cre: $4,53 \times 10^8$ TU/ml, dla wektora pCDH-hU6-EGFP_g1-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS: $2,85 \times 10^7$ TU/ml.



Ryc. 39. Pomiar miana uzyskanego lentiwirusa. (a.) Widoczna ekspresja mCherry po transdukcji neuronów LV-CRISPR/Cas9, obrazowana przyżyciowo w 14 dniu (b.) niewielka ekspresja mCherry po 14 po Podwójnej-transfekcji neuronów LV-CRISPR/Cas9-DIO, obrazowana przyżyciowo w 14 dniu hodowli. Skala 250 μ m.

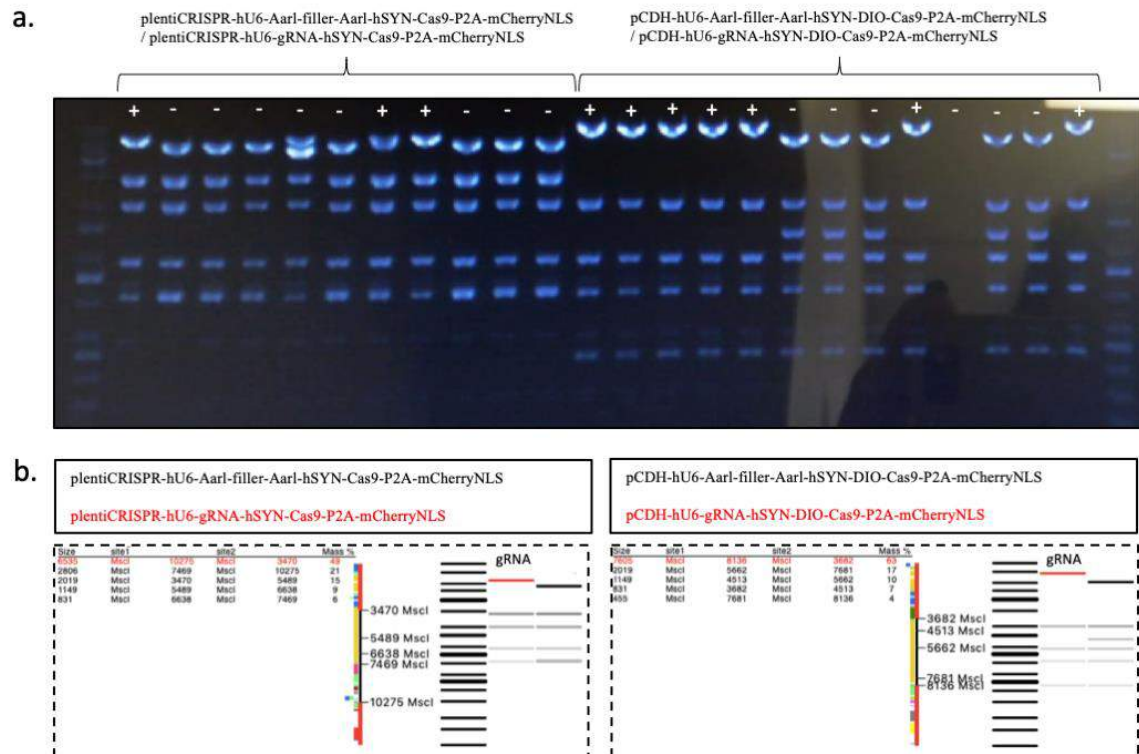
4.2.3.Strategia indukcji neurodegeneracji opierającej się na zaburzeniu funkcjonowania polimerazy I w wybranej populacji komórek - projektowanie gRNA wyciszającego ekspresję genu *Rrn3* i *Polr1a*

Odpowiedni dobór guide RNA jest kluczowym etapem w stworzeniu funkcjonalnego wektora CRISPR/Cas9. Na potrzeby niniejszego projektu zaplanowano usunięcie białka TIF-1A lub RPA194, aby wywołać progresywną degenerację transdukowanej komórki. Wybrane gRNA wklonowano do wszystkich 3 wektorów CRISPR/Cas9, a następnie przeprowadzono weryfikację *in vitro*, a następnie *in vivo*.

Tab. 39. Wybrane sekwencje gRNA wraz z sekwencją PAM (zaznaczoną na czerwono) oraz oligonukleotydy, które stworzą wybraną sekwencję i będą mogły zostać wklonowane po cięciu enzymem restrykcyjnym AarI. Nazwa gRNA oznacza: pierwsze 3 litery – targetowane białko (TIF – TIF-IA, lub POL – *PolR1a*), pierwszy numer – numer egzonu, „v” z drugim numerem (*version*) – wersję gRNA

| | egzon | gRNA | sekwencja | oligonukleotydy | |
|-----|--------|---------|-----------------------------------|--|---|
| Rm3 | 1 | TIF1v1 | CTGCCACGCTGAGTGCCTCG CGG | CACCGCTGCCACGCTGAGTGCCTCG AAACCGACGCACTCAGCGTGGCAGC | |
| | 1 | TIF1v2 | ACGCTGAGTGCCTCGCGGAC TGG | CACCGACGCTGAGTGCCTCGCGGAC AAACGTCCGCGACGCACTCAGCGCT | |
| | 1 | TIF1v4 | AGTCCGCGACGCACTCAGCG TGG | CACCGAGTCCGCGACGCACTCAGCG AAACCGCTGAGTGCCTCGCGGACTC | |
| | 1 | TIF1v5 | GCGCTTGTCTGGGCGATGTGA CGG | CACCGCGCTTGTCTGGGCGATGTGA AAACTCACATCGCCCCACAAGCGC | |
| | 2 | TIF2v1 | GCTCTTAACGCGAGCATAT CGG | CACCGCTCTTAACGCGAGCATAT AAACATATGCTCGCGTTAGAGAGCC | |
| | 2 | TIF2v2 | CCGAAAAAAAACTGTTCCGGTT TGG | CACCGCCGAAAAAAAACTGTTCCGGTT AAACAACCGAACAGTTTTTTTCGGC | |
| | 12 | TIF12v1 | CAAATAACCCCGCCATCATC AGG | CACCGCAAATAACCCCGCCATCATC AAACGATGATGGCGGGGTTATTTGC | |
| | 12 | TIF12v3 | TAACCCCGCCATCATCAGGC AGG | CACCGTAACCCCGCCATCATCAGGC AAACGCTGATGATGGCGGGGTTAC | |
| | 13 | TIF13v1 | GCACATGTACCTTACTAACC AGG | CACCGCACATGTACCTTACTAACC AAACGGTTAGTAAGGTACATGTGC | |
| | 13 | TIF13v2 | AAGCCTTTGTTCCCGAATCC TGG | CACCGAAGCCTTTGTTCCCGAATCC AAACGGATTCCGGAACAAAGGCTTC | |
| | 13 | TIF13v4 | TTCCCGAATCCTGGTTAGTA AGG | CACCGTTCCCGAATCCTGGTTAGTA AAACTACTAACCAGGATTCGCGAAC | |
| | Polr1a | 1 | Pol1v1 | TTCGGCCGAATACATTCCGA AGG | CACCGTTCGGCCGAATACATTCCGA AAACTCGGAATGTATTTCGGCCGAAC |
| | | 1 | Pol1v3 | ATGCCCTGAAGCCGCTCCA TGG | CACCGATGCCCTGAAGCCGCTCCA AAACTGGAGGCGGCTTCAGGGCATC |
| | | 2 | Pol2v1 | CCCAGGTAGTCCACGTATCG AGG | CACCGCCCAGGTAGTCCACGTATCG AAACCGATACGTGGACTACCTGGGC |
| 2 | | Pol2v2 | CATTACGAACCCTCGATACC TGG | CACCGCATTACAAATCCTCGATACC AAACCGTATCGAGGATTTGTAATGC | |

W celu selekcji, czy sekwencja gRNA została poprawnie wstawiona w miejsce cięcia AarI każdorazowo wykonywano trawienie diagnostyczne enzymem restrykcyjnym MscI, a następnie sekwencjonowano miejsce wstawienia. Ostatecznie otrzymano wszystkie zakładane wersje plazmidów.



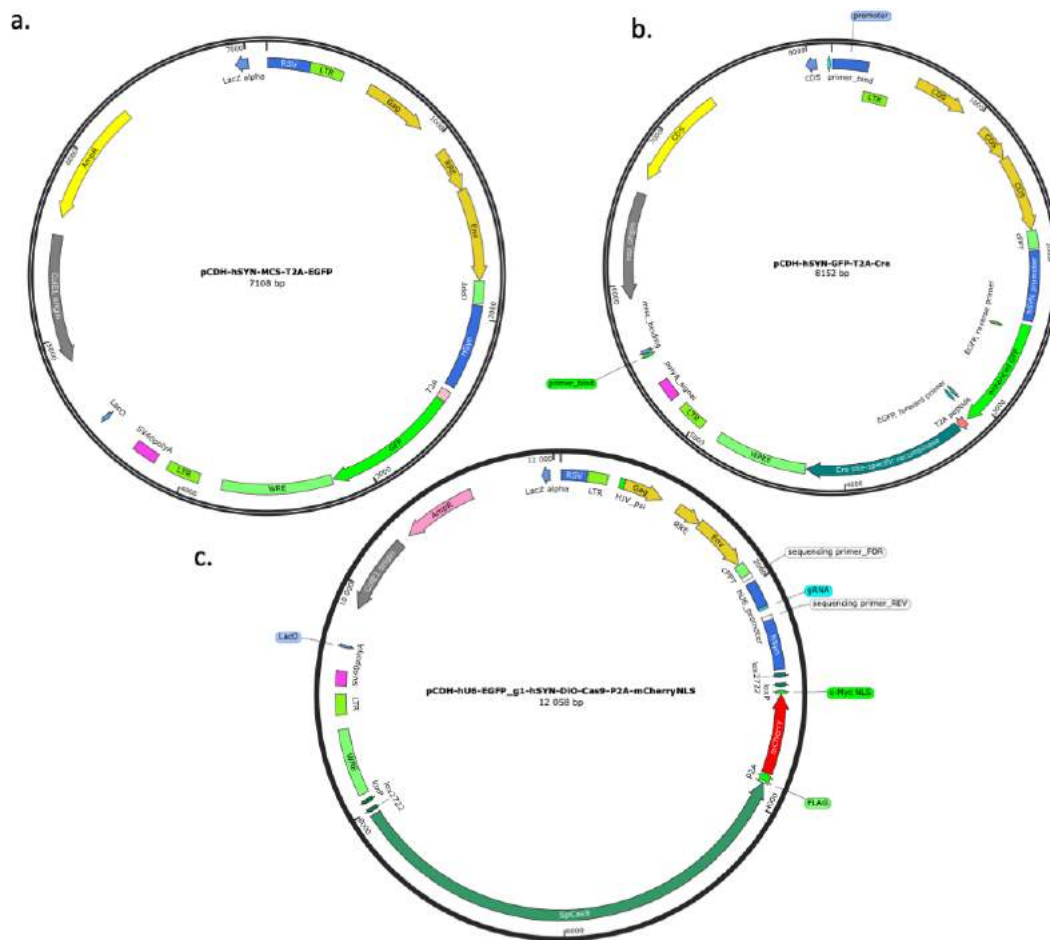
Ryc. 40. Trawienie restrykcyjne plazmidów CRISPR enzymem MscI. (a.) Przykładowy obraz po trawieniu enzymem restrykcyjnym MscI z zaznaczonymi pozytywnymi i negatywnymi klonami po wstawieniu gRNA; (b.) Schemat ułatwiający analizę restrykcyjną żelu z programu ApE.

4.2.4. Pozytywna weryfikacja działania systemu Cre-zależnego CRISPR/Cas9. Zastosowanie Cre-zależnego konstruktów usuwającego białko fluorescencyjne EGFP.

Ponieważ zaprojektowany przez nas system Cre-zależnej ekspresji CRISPR/Cas9, który w całości zawiera się w jednej cząsteczce wektora jest pierwszym tak zastosowanym rozwiązaniem, wymagane jest przeprowadzenie serii wstępnych doświadczeń. W tym celu wykorzystano plazmid CRISPR-DiO, do którego wstawiono gRNA, które wycisza ekspresję białka fluorescencyjnego EGFP (sekwencja gRNA: GGCGAGGAGCTGTTACCG). Dzięki takiemu rozwiązaniu możliwe jest sprawdzenie nie tylko, czy wektor działa, ale również czy jest specyficzny do komórek, które wykazują ekspresję Cre. Docelowy wektor CRISPR/Cas9, zawierający gRNA usuwający TIF-1A, wycisza ekspresję białka niezbędnego do funkcjonowania komórek. Ze względu na to, że mutacja ta prowadzi do śmierci stransdukowanych komórek a kinetyka tego procesu będzie nakładać się na kinetykę ekspresji mCherry, uniemożliwia to wykorzystanie zliczeń komórek mCherry pozytywnych do dokładnego oszacowania wydajności transdukcji. Tym samym zliczenia wydajności transdukcji musiały się opierać na zliczeniach spadku ilości komórek, przy założeniu, że każda stransdukowana komórka uległa śmierci komórkowej. Weryfikację prowadzono etapami, aby w każdym momencie móc zareagować, jeżeli zauważono by nieprawidłowości. Pierwszym etapem była, transfekcja komórek HEK293T plazmidami, a następnie transdukcja neuronów *in vitro* wyprodukowanymi wektorami lentiwirusowymi.

W opisywanych doświadczeniach używano trzy plazmidy – pierwszy i drugi wyprodukowane w *Institute of Biotechnology, HiLIFE, University of Helsinki*, otrzymane dzięki uprzejmości dr Andriego Domansky'ego: pCDH-hSYN-GFP-T2A-Cre, który zapewni ekspresję w komórkach czynnika Cre oraz białka fluorescencyjnego GFP oraz plazmid kontrolny pCDH-hSYN-MSC-T2A-EGFP, bez Cre, który zapewnia ekspresję GFP, oraz trzeci, wygenerowany przez nas pCDH-hU6-EGFP_g1-hSYN-

DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS, który ma za zadanie wyciszyć ekspresję białka fluorescencyjnego EGFP. Następnie wykonywano procedurę izolacji lentiwirusów poprzez produkcję wirusów w komórkach HEK293T i ultrawirowanie.



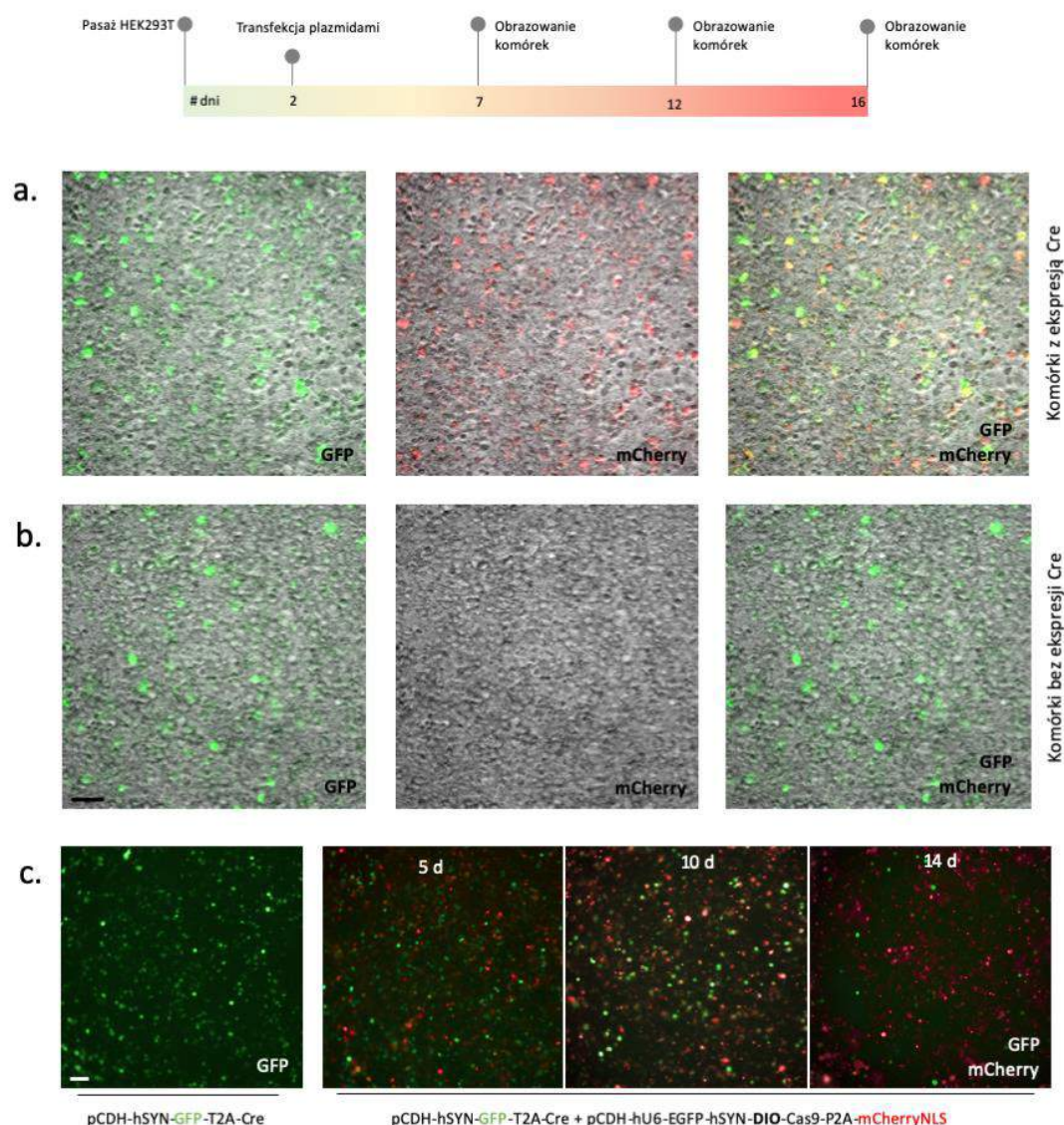
Ryc. 41. Mapy wektorów plazmidowych użytych w doświadczeniach transfekcji HEK293T i transdukcji neuronów pierwotnych w celu weryfikacji działania systemu CRISPR-DiO. (a.) wektor pCDH-hSYN-MCS-T2A-EGFP; (b.) wektor pCDH-hSYN-GFP-T2A-Cre; (c.) wektor pCDH-hU6-EGFP_g1-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS

4.2.4.1. Wektor plazmidowy pCDH-hU6-EGFP_g1-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS wykazuje ekspresję w transfekowanych komórkach HEK293T posiadających rekombinazę Cre

Po otrzymaniu wektorów plazmidowych wykonano transfekcję komórek HEK293T, aby ocenić na tym etapie czy wektory są funkcjonalne i czy są specyficzne do komórek ekspresjonujących rekombinazę Cre. W tym celu wysiano komórki na płytkę 96-dołkową w ilości 5 tys. na dołek i po 2 dniach hodowli wykonano transfekcję plazmidami w stężeniu 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ i PEI w stosunku 1:4, a po 2 godzinach zmieniono medium hodowlane na nowe. Po 4 dniach wykonano przyżyciowe zdjęcia dwóch grup badawczych: pierwsza transfekowana dwoma plazmidami: plazmidem ekspresjonującym GFP oraz Cre wraz z plazmidem pCDH-hU6-EGFP_g1-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS (Ryc. 42 a) oraz drugiej grupie kontrolnej transfekowanej plazmidem ekspresjonującym samo GFP, bez Cre wraz z plazmidem EGFP-CRISPR-DIO (Ryc. 42 b). Wykazano, że wektor CRISPR-DiO jest specyficzny do komórek posiadających Cre i nie wykazuje funkcjonalnego działania w komórkach, które nie posiadają tej rekombinazy.

Następnie sprawdzono, czy plazmid pCDH-hU6-EGFP_g1-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS efektywnie wyciszy ekspresję GFP w komórkach Cre pozytywnych. W tym celu wykonano transfekcje w takich samych warunkach jak opisane wyżej plazmidami pCDH-hSYN-GFP-T2A-Cre z pCDH-hU6-

EGFP_g1-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS oraz pCDH-hSYN-GFP-T2A-Cre pojedynczo jako kontrolę (Ryc. 42 c). Zdjęcia przyżyciowo wykonano po 5, 10 i 14 dniach od transfekcji. Stwierdzono, że im dłuższy czas działania wektora plazmidowego, tym mniej komórek wykazuje ekspresję GFP a coraz więcej ekspresję mCherry. Wynik ten może wynikać z dłuższego czasu potrzebnego do zadziałania rekombinazy Cre, a także z czasu obrotu białkiem GFP i efektywnym usunięciem go z komórki, kiedy nie wykazuje już fluorescencji.

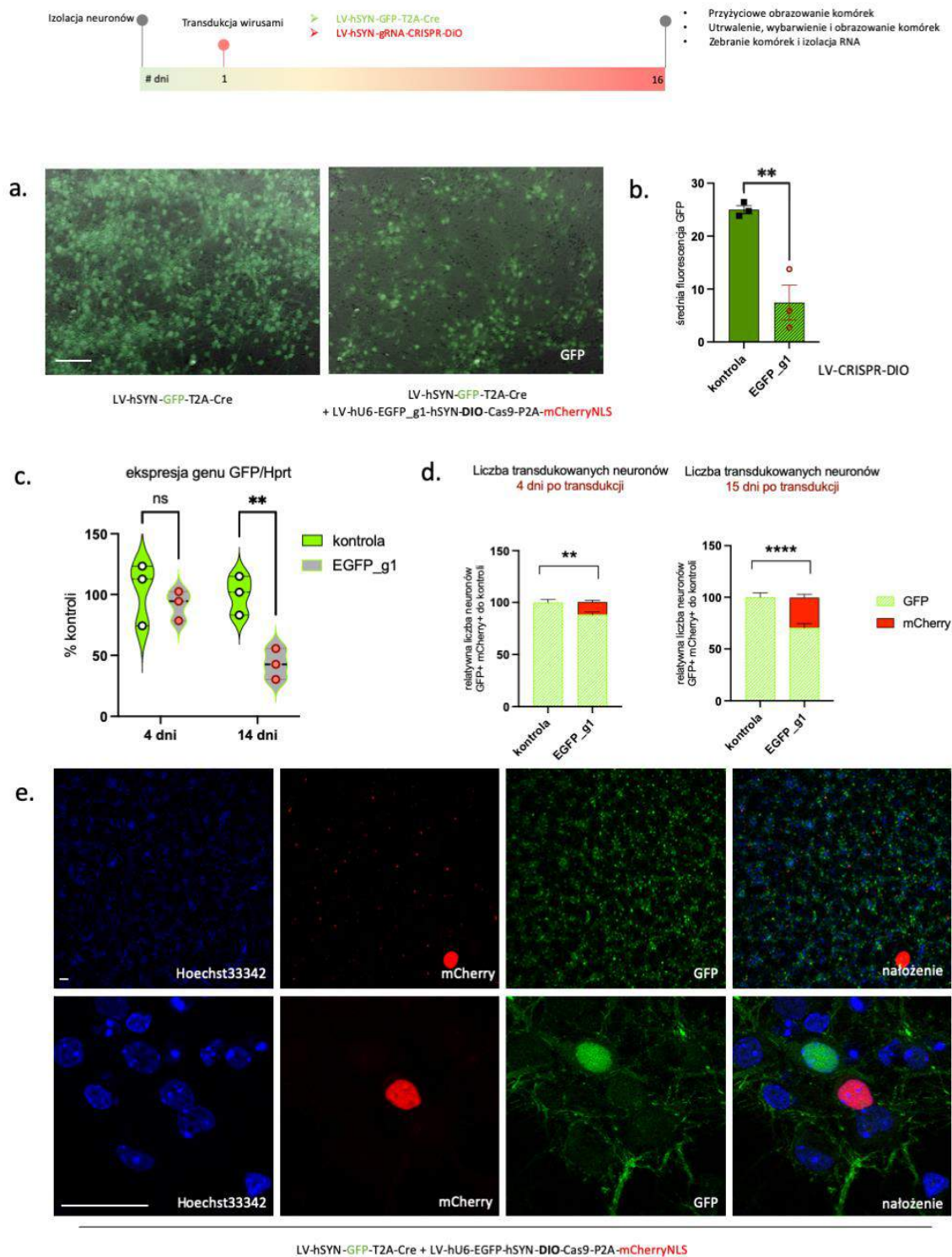


Ryc. 42. Przyżyciowe obrazowanie transfekowanych komórek HEK293T plazmidem pCDH-hU6-EGFP_g1-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS wraz z plazmidem: (a.) pCDH-hSYN-GFP-T2A-Cre; (b.) pCDH-hSYN-MSC-T2A-EGFP; (c.) Komórki HEK293T transfekowane kontrolnym plazmidem z GFP (14 dzień po transfekcji) oraz po 5, 10 i 14 dniach od podwójnej transfekcji plazmidami pCDH-hU6-EGFP_g1-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS i pCDH-hSYN-GFP-T2A-Cre. Skala 100 μ m.

4.2.4.2. Wektor lentiwirusowy LV-pCDH-hU6-EGFP_g1-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS wykazuje działanie w transdukowanych neuronach pierwotnych zawierających rekombinazę Cre

Aby potwierdzić działanie wirusa kontrolnego, LV-EGFP_g1-hSYN-CRISPR-DIO, tj. selektywność do komórek ekspresjonujących Cre, a także skuteczność w działaniu gRNA kontrolnego (nacelowanego w białko EGFP) wykonano transdukcje pierwotnych neuronów dopaminowych (Ryc. 43

a, b, d, e) lub korowych (Ryc. 43 c). W tym celu założono hodowle neuronalne i następnego dnia po izolacji zainfekowano komórki dwoma lentiwirusami: LV-hSYN-GFP-CRE oraz LV-EGFP_g1-hSYN-CRISPR-DIO oraz pojedynczym lentiwirusem LV-hSYN-GFP-CRE, jako kontrolę. Po 6 dniach wykonano przyżyciowe zdjęcia obu grup badawczych: (Ryc. 43 a). Pokazano spadek ilości białka fluorescencyjnego GFP w grupie badawczej zainfekowanej wirusem CRISPR/Cas9 wyciszającym ekspresję GFP na poziomie 70% (test t-studenta, $t = 5,207$, $df = 4$, $p = 0,0065$) w pomiarach parametrów intensywności GFP obrazów uzyskanych w mikroskopii fluorescencyjnej (Ryc. 43 b) oraz na poziomie 57% (dwuczynnikowa ANOVA, post hoc Šídáka $F_{1,4} = 13,67$; $p = 0,008$) w badaniu RNA po 15 dniach po infekcji (Ryc. 43 c). Przyżyciowe obrazowanie na wczesnym etapie transdukcji komórek (4 dni) nie wykazuje ekspresji mCherry (lub na niskim poziomie), znacznika fluorescencyjnego naszych wektorów CRISPR. Po 16 dniach hodowli preparat utrwalano, a markery fluorescencyjne dodatkowo wybarwiano przeciwciałami, co daje specyficzny obraz umiejscowienia białek fluorescencyjnych (Ryc. 43 e). Lentiwirus CRISPR-DIO usuwający GFP infekuje 12 % komórek po 4 dniach i 29,1 % po 15 dniach (Ryc. 43 d). Liczba zliczonych komórek GFP pozytywnych po infekcji opisywanym wirusem znacząco spada, po 4 dniach transdukcji do $88,32 \pm 2,472$ % kontroli (test Manna-Whitneya, $U = 21,50$, $p = 0,0088$) oraz po 15 dniach transdukcji do $70,54 \pm 3,889$ % kontroli (test t-studenta, $t = 5,191$, $df = 20$, $p < 0,0001$).



Ryc. 43. Transdukcja pierwotnych neuronów dopaminowych lentiwirusami LV-hSYN-GFP-CRE oraz LV-EGFP_g1-hSYN-CRISPR-DIO. (a.) Przyżyciowe obrazowanie neuronów w 6 dniu po infekcji; Skala 100 μ m (b.) Średnia powierzchnia z 3 losowych obrazów zajmowana przez komórki z ekspresją GFP po transdukcji; (c.) Średnia ekspresja genu kodującego białko GFP z transdukowanych neuronów N = 3; (d.) Średnia ilość neuronów GFP i mCherry-pozytywnych zliczona z 6 losowych zdjęć z dwóch eksperymentów. (e.) Wybarwiony preparat neuronalny na GFP, mCherry i Hoechst33342, utrwalony po 14 dniach po transfekcji; Skala 30 μ m. Do oceny istotności statystycznej wykorzystano test t-studenta (średnia powierzchnia) oraz dwuczynnikową analizę wariancji z powtórzonymi pomiarami ANOVA, uzupełnioną testem post-hoc Šidáka (ekspresja genów). Istotność statystyczna przedstawiona jako *. ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$

4.2.5. Progresywna śmierć komórki jako funkcjonalny efekt wyciszenia ekspresji czynnika transkrypcyjnego TIF-IA lub białka RPA194 w modelu *in vitro* pierwotnych neuronów i astrocytów.

Ostatecznym etapem weryfikacji funkcjonalności uzyskanych wektorów była transdukcja pierwotnych neuronów i astrocytów i ocena działania konstruktów poprzez zliczenia komórek. Oceniono selektywność wektora Cre-zależnego do neuronów posiadających tę rekombinazę oraz sprawdzono działania wektora CRISPR niezależnego od Cre z docelowym gRNA (podrozdział 4.2.5.1). Następnie przy zastosowaniu CRISPR-DIO zweryfikowano różne zaprojektowane gRNA z tabeli (Tab. 39)

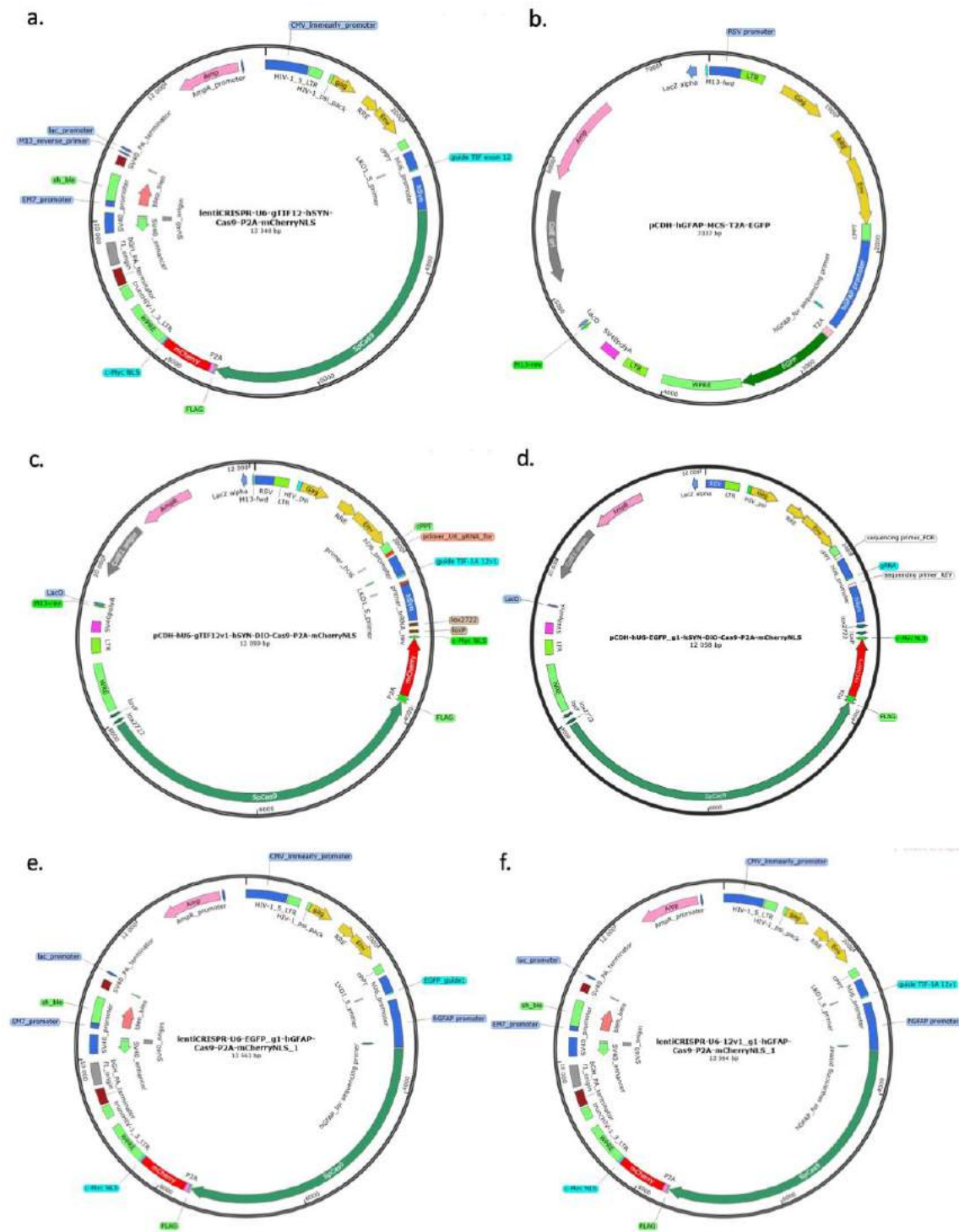
i wybrano wektor o najsilniejszym działaniu (podrozdział 4.2.5.2), a także wklonowano i zastosowano wybrany gRNA do wektora CRISPR pod promotorem GFAP, selektywny do astrocytów (podrozdział 4.2.5.3). W opisywanych doświadczeniach używano następujące wirusy:

Wektory pomocnicze, które pomagają osiągnąć docelową ekspresję genów w transdukowanych komórkach:

- LV-hSYN-GFP-T2A-Cre, który zapewnił ekspresję w neuronach czynnika Cre oraz białka fluorescencyjnego GFP;
- kontrolny LV-hSYN-MS2-T2A-EGFP, ekspresjonujący GFP w neuronach;
- LV-hGFAP-MS2-T2A-EGFP, ekspresjonujący GFP w astrocytach.

Wektory CRISPR/Cas9:

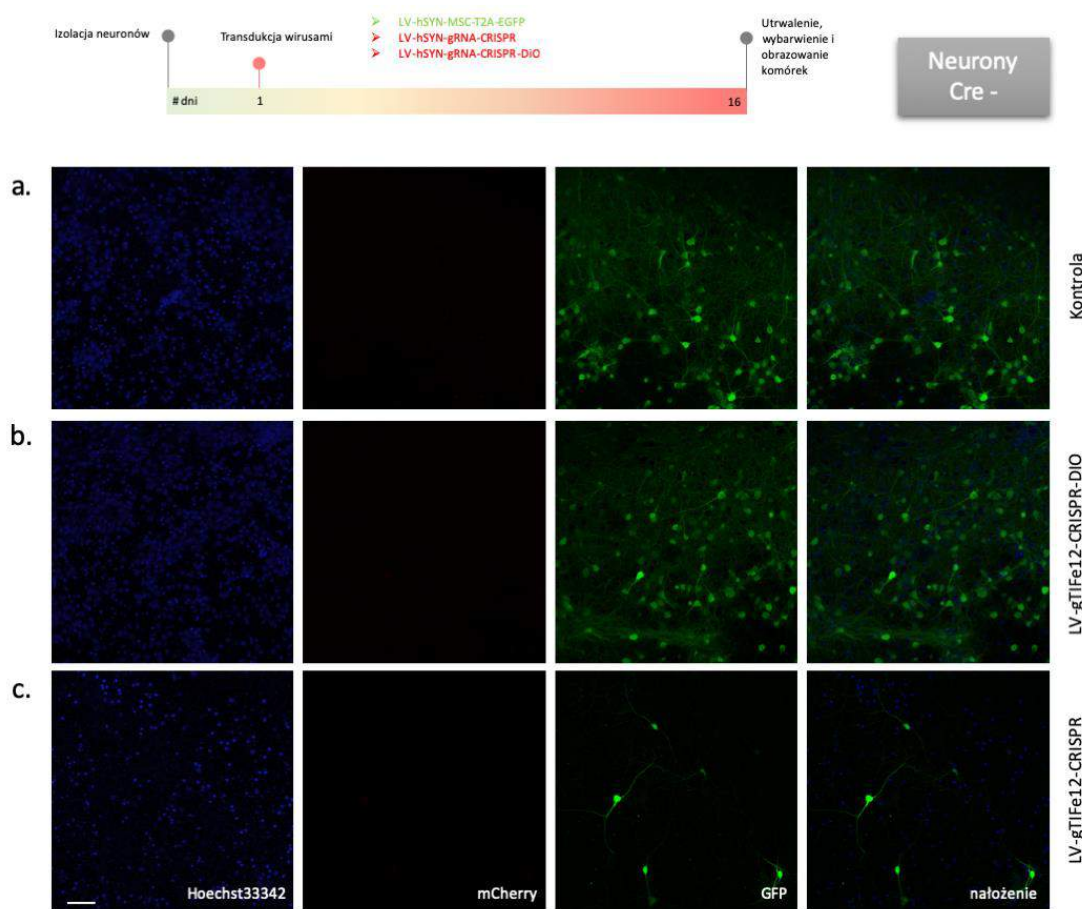
- LV-hU6-TIF_g1-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS, Cre-niezależny wektor, z różnymi wariantami gRNA wyciszającymi ekspresję białka TIF-IA w neuronach;
- kontrolny LV-hU6-EGFP_g1-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS, Cre-zależny wektor który ma za zadanie wyciszyć ekspresję białka fluorescencyjnego EGFP, bez szkody na żywotność komórek w neuronach;
- LV-hU6-gTIF/PolR1-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS, Cre-zależny wektor, z różnymi wariantami gRNA wyciszający ekspresję białka TIF-IA lub RPA194 w neuronach;
- kontrolny LV-hU6-EGFP-hGFAP-Cas9-P2A-mCherryNLS, który ma za zadanie wyciszyć ekspresję białka fluorescencyjnego EGFP, bez szkody na żywotność komórek w astrocytach;
- LV-hU6-gTIF/gPolR1-hGFAP-Cas9-P2A-mCherryNLS, Cre-niezależny wektor, z różnymi wariantami gRNA wyciszającym ekspresję białka TIF-IA lub RPA194 w astrocytach.



Ryc. 44. Mapy wektorów plazmidowych. (a.) pLenti- hU6-TIF_g1-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS; (b.) pCDH-hGFAP-MSC-T2A-EGFP (c.) pCDH- hU6-EGFP_g1-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS' (d.) pCDH-hU6-gTIF/PolR1-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS; (e.) pLenti- hU6-EGFP-hGFAP-Cas9-P2A-mCherryNLS; (f.) pLenti- hU6-gTIF/gPolR1-hGFAP-Cas9-P2A-mCherryNLS

4.2.5.1. Wektor lentiwirusowy LV-pCDH-hU6-gTIF-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS wykazuje selektywne działanie w neuronach pierwotnych zawierających rekombinazę Cre

Pierwotne hodowle neuronów korowych transdukowano dzień po wysianiu lentiwirusem kontrolnym, LV-pCDH-hSYN-MSCT2A-EGFP, aby zapewnić ekspresję GFP. Równocześnie dodawano wirusy CRISPR: wektor lentiwirusowy wyciszający ekspresję białka TIF-1A w egzonie 12, Cre-niespecyficzny LV-CRISPR-hU6-gTIFe12-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS, a także wektor lentiwirusowy wyciszających ekspresją białka TIF-1A, Cre-specyficzny LV-CRISPR-hU6-gTIFe12-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS. Po 16 dniach hodowli komórki utrwalano, wybarwiono wzmacniając fluorescencję znaczników GFP oraz mCherry i obrazowano. Pokazano, że usunięcie czynnika transkrypcyjnego TIF-1A powoduje zmniejszenie ilości neuronów po 15 dniach od infekcji. Wykazano, że spadek ilości neuronów GFP-pozytywnych zachodzi tylko z wirusem Cre-niespecyficznym, udowadniając, że zaprojektowany system CRISPR-DIO jest selektywny, a infekcja komórek nieposiadających Cre nie wpływa negatywnie na ich przeżywalność (Ryc. 45). Na Ryc. 45 przedstawiono wyniki z wybranym gRNA celującym w egzon 12, który został wybrany ze wszystkich testowanych gRNA. Selekcję i schemat działających gRNA opisano i przedstawiono w następnym podrozdziale dotyczącym walidacji *in vitro* wektora Cre-specyficznego.



Ryc. 45. Podwójna transdukcja pierwotnych neuronów korowych lentiwirusami LV-pCDH-hSYN-MSCT2A-EGFP wraz z LV-gTIF-hSYN-CRISPR-DIO lub LV-gTIF-hSYN-CRISPR, pokazane po utrwaleniu i wzmocnieniu sygnału z białek fluorescencyjnych w 16 dniu hodowli. (a.) Kontrolne neurony z pojedynczą ekspresją GFP; (b.) Podwójna infekcja komórek wektorem z GFP oraz wektorem CRISPR Cre-zależnym; (c.) Podwójna infekcja komórek wektorem z GFP i wektorem CRISPR. Skala 50 µm.

4.2.5.2. Wyciszenie ekspresji TIF-IA i RPA194 w neuronach *in vitro* z użyciem LV-CRISPR prowadzi do śmierci komórek

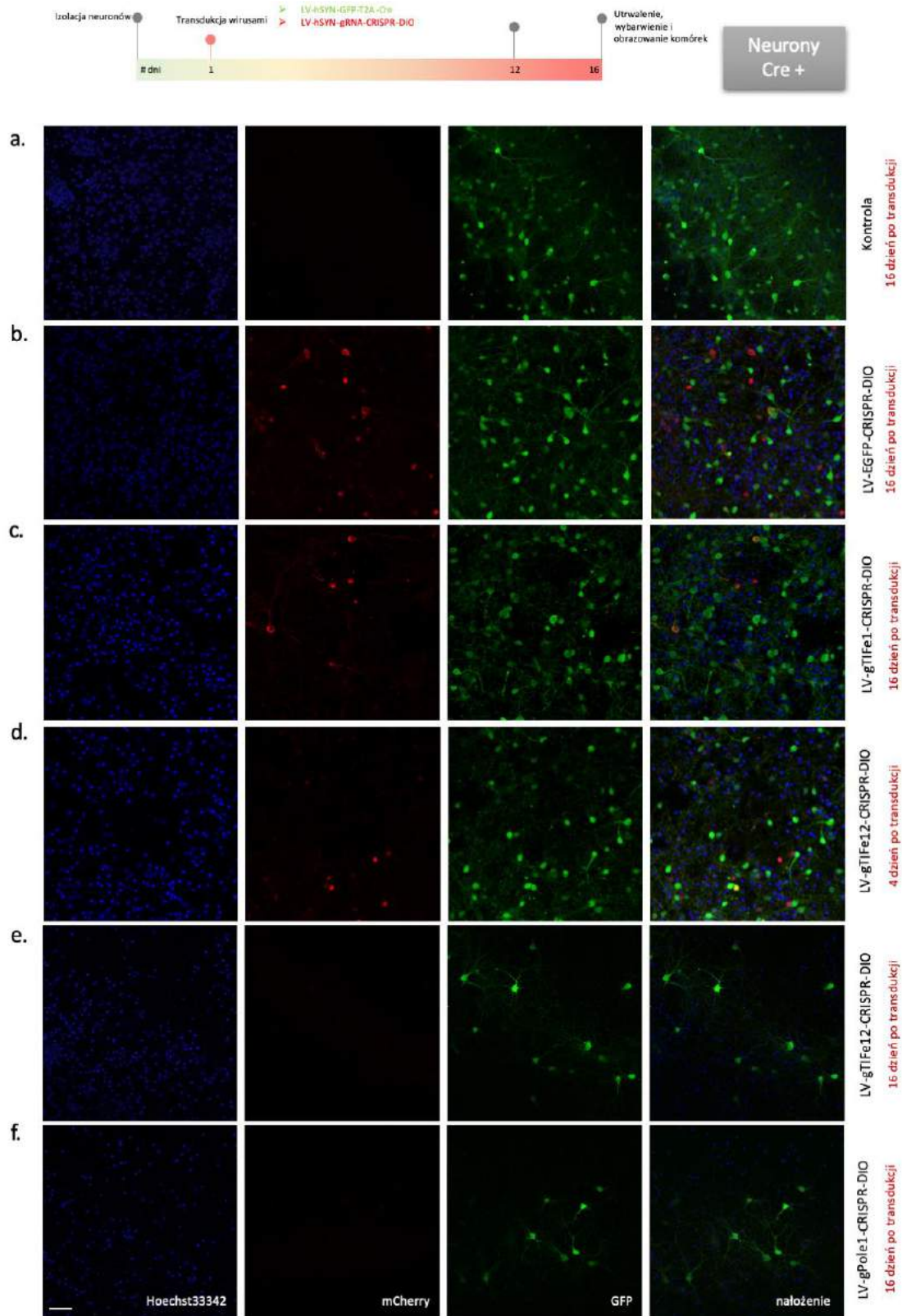
Pierwotne hodowle neuronów korowych i hipokampalnych transdukowano dzień po wysianiu lentiwirusem kontrolnym, LV-hSYN-GFP-T2A-Cre, aby zapewnić ekspresję w neuronach czynnika Cre oraz białka fluorescencyjnego GFP. Równocześnie dodawano wirusy Cre-zależne LV-CRISPR-hU6-gTIF_g1/gPolR1_g1-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS z różnymi gRNA: wektor LV kontrolny wyciszający EGFP, wektory LV wyciszające ekspresję białka TIF-IA lub RPA194 w różnych kombinacjach (gRNA, Tab. 39)

). Tą samą procedurę transdukcji powtórzono w 12 dniu hodowli, aby zweryfikować skuteczność działania w krótszym odstępie czasu (na 4 dni). Jako kontrolny wektor CRISPR użyto jak w poprzednim doświadczeniu wektora z gRNA usuwającym EGFP. W 16 dniu hodowli preparaty utrwalano i wybarwiono wzmacniając fluorescencję znaczników GFP oraz mCherry i zobrazowano. Kontrolnie wykazano (jak w doświadczeniu przedstawionym w 4.2.4.2) transdukcję neuronów posiadających Cre przez wektor CRISPR-DIO usuwający EGFP. Stwierdzono, że wektor ten powoduje usunięcie GFP z komórek (Ryc. 46 b) przy jednoczesnym braku spadku ilości neuronów w hodowli (Ryc. 47). Przetestowano różne kombinacje wektorów wyciszających ekspresję białka TIF-IA lub RPA194 (Tab. 40) i wytypowano działające gRNA (tj. zmniejszające ilość neuronów w hodowli, zaznaczone w tabeli znakiem ✓) do dalszych eksperymentów. Użyte razem, oddalone od siebie o około 20 nukleotydów gRNA powoduje rozcięcie nici DNA w dwóch miejscach. Wyniki przedstawiono z 3 niezależnych eksperymentów, w każdym eksperymencie uwzględniając duplikat każdego warunku.

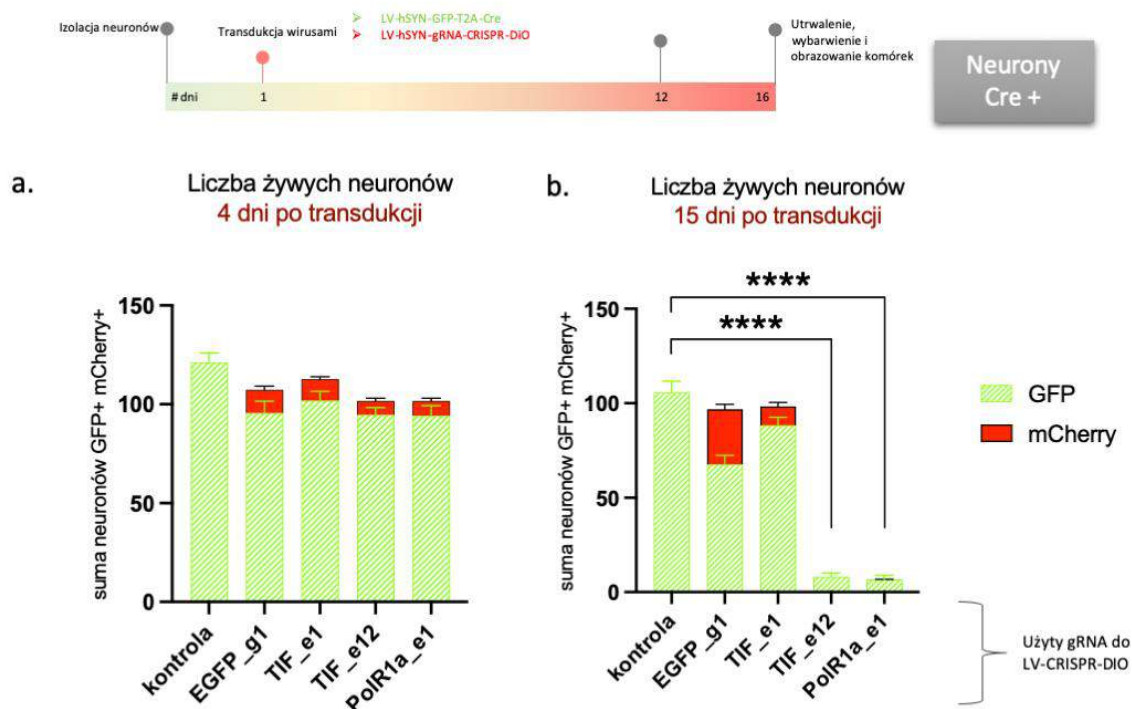
Tab. 40. Lista użytych wektorów LV do transdukcji użytych pojedynczo lub łączonych.

| | TIF-IA | | | | | | | | | | PolR1 | | | | |
|------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------|--------------|-----------------------|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
| pojedyncze | TIF1v1 x | TIF1v2 x | TIF1v4 x | TIF1v5 x | TIF2v1 ✓ | TIF2v2 x | TIF12v1 ✓ | TIF12v3 ✓ | TIF13v1 ✓ | TIF13v2 x | TIF13v4 x | Pol1v1 ✓ | Pol1v3 ✓ | Pol2v1 x | Pol2v2 x |
| łączone | TIF1v1 TIF1v2 x | TIF1v1 TIF1v4 ✓ | TIF1v1 TIF1v5 x | TIF2v1 TIF2v2 ✓ | TIF12v1 TIF12v3 ✓ | TIF13v1 TIF13v2 x | TIF13v1 TIF13v4 ✓ | TIF12v1 TIF13v1 ✓ | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | Pol1v1 Pol1v3 ✓ | Pol2v1 Pol2v2 x | | | |

Za wyznacznik efektywnego działania gRNA przyjęto usunięcie 50 % neuronów z hodowli po 15 dniach od infekcji. Zaobserwowano, że w działających gRNA znacznik mCherry po tym czasie całkowicie jest niewidoczny, sugerując apoptozę zainfekowanych komórek. Zaobserwowano, że pojedyncze użycie gRNA wyciszający ekspresję egzonu 1 białka TIF-IA po 15 dniach nie powoduje śmierci komórek (Ryc. 46 c). Zastosowanie wektora CRISPR-DIO z gRNA wyciszający egzon 12 okazał się najskuteczniejszy. Po 4 dniach infekcji widoczne są komórki ze znacznikiem wirusa, mCherry (Ryc. 46 d), a po 15 dniach wszystkie zainfekowane komórki są zdegenerowane (Ryc. 46 e). Podobny rezultat uzyskano transdukując komórki LV-CRISPR wyciszającemu egzon 1 *PolR1a* (Ryc. 46 f). Wybarwione komórki zliczono pokazując stałą liczbę neuronów w dołkach kontrolnych po 4 dniach infekcji i 16 dniach (Ryc. 47). Liczba neuronów mCherry-pozytywnych jest stała w obu punktach czasowych podczas infekcji wirusem kontrolnym wyciszającym EGFP, a także po infekcji wirusem, który mimo wstawionej wersji gRNA mającej usunąć ekspresję białka TIF-IA nie zadziałał prawidłowo, czyli nie spowodował progresywnej śmierci komórek (na wykresie pokazano również przykładowy wynik zliczenia komórek po transdukcji wirusem, który nie wykazał efektywności w infekcji komórek, TIF1v4). Wybrany, pozytywny lentiwirus o wstawionym gRNA TIF12v1 w połączeniu z TIF12v3 powodował śmierć 16,09 % neuronów po 4 dniach (nieistotnie statystycznie, $p > 0,05$) i 92,26 % po 15 dniach ($F_{4, 50} = 126,9$; $p < 0,0001$) (Ryc. 46 b). Równie efektywny w indukcji śmierci neuronów okazał się wektor wyciszający ekspresję białka RPA194 kodowane przez *PolR1a*, który powodował śmierć 16,09 % neuronów po 4 dniach i 93,52 % po 15 dniach ($F_{4, 50} = 126,9$; $p < 0,0001$).



Ryc. 46. Transdukcja pierwotnych neuronów korowych różnymi wersjami lentiwirusów. (a.) kontrola, transfekcja LV-hSYN-GFP-T2A-Cre; (b.) podwójna transdukcja LV-hSYN-GFP-T2A-Cre wraz LV-EGFP_g1-hSYN-CRISPR-DIO; (c.) podwójna transdukcja LV-hSYN-GFP-T2A-Cre wraz LV-gTIF1v1-hSYN-CRISPR-DIO; (d.) podwójna transdukcja LV-hSYN-GFP-T2A-Cre wraz LV-gTIF12v1-hSYN-CRISPR-DIO (po 4 dniach); (e.) podwójna transdukcja LV-hSYN-GFP-T2A-Cre wraz LV-gTIF12v1-hSYN-CRISPR-DIO; (f.) podwójna transdukcja LV-hSYN-GFP-T2A-Cre wraz LV-gPol1v1-hSYN-CRISPR-DIO; Zdjęcia pokazane po utrwaleniu i wzmożeniu sygnału z białek fluorescencyjnych w 16 dniu hodowli. Skala 50 μm .



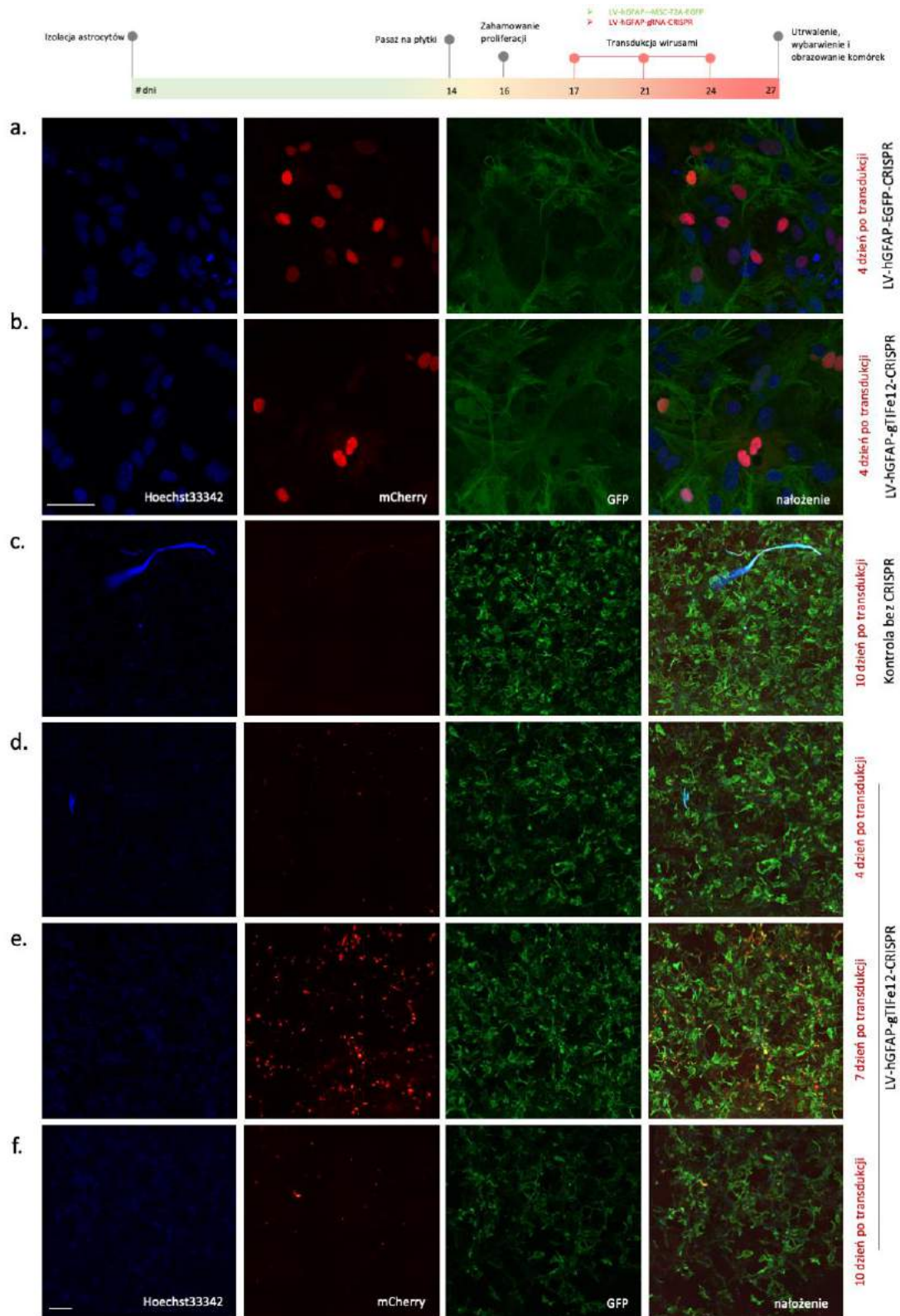
Ryc. 47. Zliczenia ilości komórek po transdukcji wirusami LV-hSYN-GFP-T2A-Cre, LV-EGFP_g1-hSYN-CRISPR-DIO, LV-gTIF1v1-hSYN-CRISPR-DIO, LV-gTIF12v1-hSYN-CRISPR-DIO i LV-gPol1v1-hSYN-CRISPR-DIO po (a.) 4 dniach i (b.) po 15 dniach. Wyniki przedstawiono jako średnią dla grup \pm SEM. N = 3, w każdym N uwzględniono 2 powtórzenia. Do oceny istotności statystycznej wykorzystano dwuczynnikową analizę wariancji ANOVA, uzupełnioną testem post-hoc Šidáka. Istotność statystyczna przedstawiona jako *. ****-p < 0,0001

Wszystkie wersje wirusów, które okazały się skuteczne, zakwalifikowano do sprawdzenia efektywności *in vivo* (opisane w rozdziale 4.2.6.3).

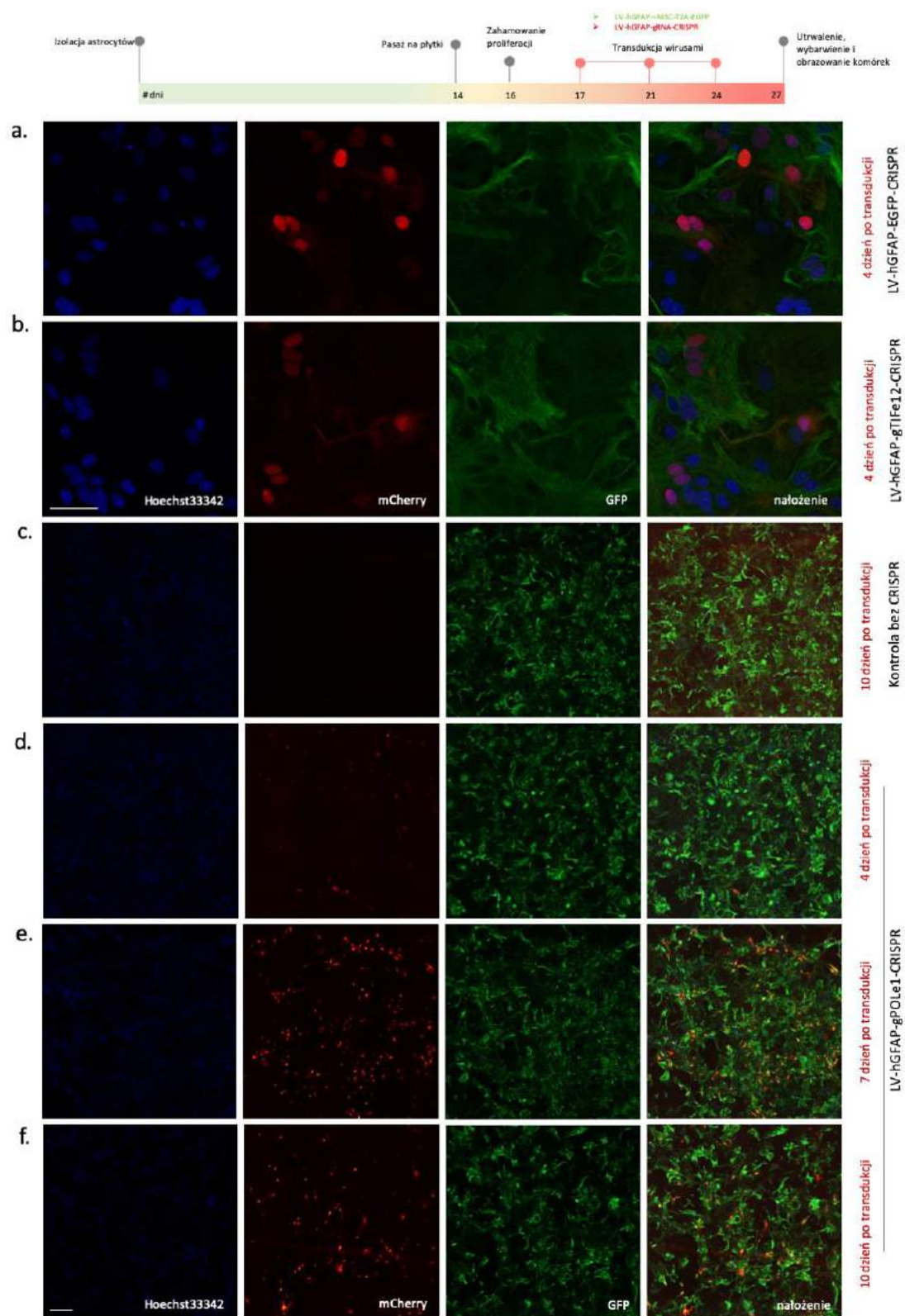
4.2.5.3. Wyciszenie ekspresji TIF-IA i RPA194 w astrocytach *in vitro* z użyciem LV-CRISPR prowadzi do śmierci zainfekowanych komórek

Pierwotne hodowle astrocytów pasażowano i wysiewano na płytki do obrazowania. W drugim dniu hodowli blokowano proliferację komórek i po 24 godzinach zmieniano medium na hodowlane. Po 24 godzinach we wszystkich grupach badawczych wykonywano transdukcję wirusem kontrolnym LV-hGFAP-MSC-T2A-EGFP, który zapewnił ekspresję GFP i znakowanie komórek GFAP-pozytywnych. Następnie komórki transdukowano kontrolnym CRISPR, który wycisza ekspresję białka EGFP lub badanym wektorem CRISPR powodującym śmierć komórek, prawdopodobnie na drodze zależnej od białka p53 apoptozy jak opisano we wcześniejszych pracach, dzięki wyciszeniu ekspresji czynnika transkrypcyjnego TIF-IA lub RPA194. Zarówno w przypadku wyciszenia TIF-IA jak i RPA194 uzyskano podobne wyniki doprowadzając do progresywnej śmierci astrocytów blokując prawidłowe funkcjonowanie polimerazy 1 (Ryc. 48, Ryc. 49). Kontrolny wirus spowodował usunięcie EGFP i ekspresję mCherry w zainfekowanych komórkach, bez zmiany ilości żywych astrocytów (Ryc. 48 a, Ryc. 49 a) (4 dzień po infekcji). Po 4 dniach również wyraźnie widoczny jest znacznik mCherry umiejscowiony w jądrach komórek, po transfekcji LV-hU6-gTIF12v1-hGFAP-Cas9-P2A-mCherryNLS (Ryc. 48 b), lub LV-hU6-gPolR1a1v1-hGFAP-Cas9-P2A-mCherryNLS (Ryc. 49 b). W tym czasie nie zaobserwowano również dużych zmian ilości żywych komórek. Następnie przeprowadzono eksperyment z różnymi czasami infekcji wirusami z gRNA rozpoznającym sekwencję dwóch miejsc w genie *Rrn3*: LV-hU6-gTIF12v1-hGFAP-Cas9-P2A-mCherryNLS wraz z LV-hU6-gTIF12v3-hGFAP-Cas9-P2A-mCherryNLS (Ryc. 48 c-f) oraz wirusami z gRNA rozpoznającym sekwencję dwóch miejsc

w genie *Polr1a*: LV-hU6-gPolr1a1v1-hGFAP-Cas9-P2A-mCherryNLS wraz z LV-hU6-gPolr1a1v2-hGFAP-Cas9-P2A-mCherryNLS (Ryc. 49 c-f). Wykazano, że największa ilość astrocytów mCherry-pozytywnych jest 7 dni po infekcji lentiwirusami CRISPR (Ryc. 48 e, Ryc. 49 e). Pokazano również, że w porównaniu do kontroli (Ryc. 48 c, Ryc. 49 c) infekcja wirusem CRISPR wyciszającym TIF-IA, lub RPA194 powoduje progresywną śmierć astrocytów w 10 dniu (Ryc. 48 f, Ryc. 49 f).



Ryc. 48. Transdukcja pierwotnych astrocytów różnymi wersjami lentiwirusów. (a.) kontrola: podwójna transdukcja LV-hGFAP-MSC-T2A-EGFP z LV-hU6-EGFP_g1-hGFAP-Cas9-P2A-mCherryNLS; 10 dzień po transdukcji (b.) podwójna transdukcja LV-hGFAP-MSC-T2A-EGFP z LV-hU6-gTIF12v1-hGFAP-Cas9-P2A-mCherryNLS; 10 dzień po transdukcji; Skala 50 μm . (c.) kontrolna transdukcja LV-hGFAP-MSC-T2A-EGFP; 10 dzień po transdukcji (d-f.) różne czasy podwójna transdukcji LV-hGFAP-MSC-T2A-EGFP wraz z LV-gTIF12-hGFAP-CRISPR (d.) 4 dni; (e.) 7 dni; (f.) 10 dni; Preparaty po utrwaleniu i wzmocnieniu sygnału z białek fluorescencyjnych obrazowano w wybranym dniu hodowli. Skala 75 μm .



Ryc. 49. Transdukcja pierwotnych astrocytów różnymi wersjami lentiwirusów. (a.) kontrola: podwójna transdukcja LV-hGFAP-MSC-T2A-EGFP z LV-hU6-EGFP_g1-hGFAP-Cas9-P2A-mCherryNLS; 10 dzień po transdukcji (b.) podwójna transdukcja LV-hGFAP-MSC-T2A-EGFP z LV-hU6-gPOLe1-hGFAP-Cas9-P2A-mCherryNLS; 10 dzień po transdukcji; Skala 50 μm (c.) kontrolna transdukcja LV-hGFAP-MSC-T2A-EGFP; 10 dzień po transdukcji (d-f.) różne czasy podwójnej transdukcji LV-hGFAP-MSC-T2A-EGFP wraz z LV- gPOLe1-hGFAP-CRISPR (d.) 4 dni; (e.) 7 dni; (f.) 10 dni; Preparaty po utrwaleniu i wzmocnieniu sygnału z białek fluorescencyjnych obrazowano w wybranym dniu hodowli. Skala 75 μm .

4.2.6. Optymalizacja warunków domózgowej iniekcji LV u myszy

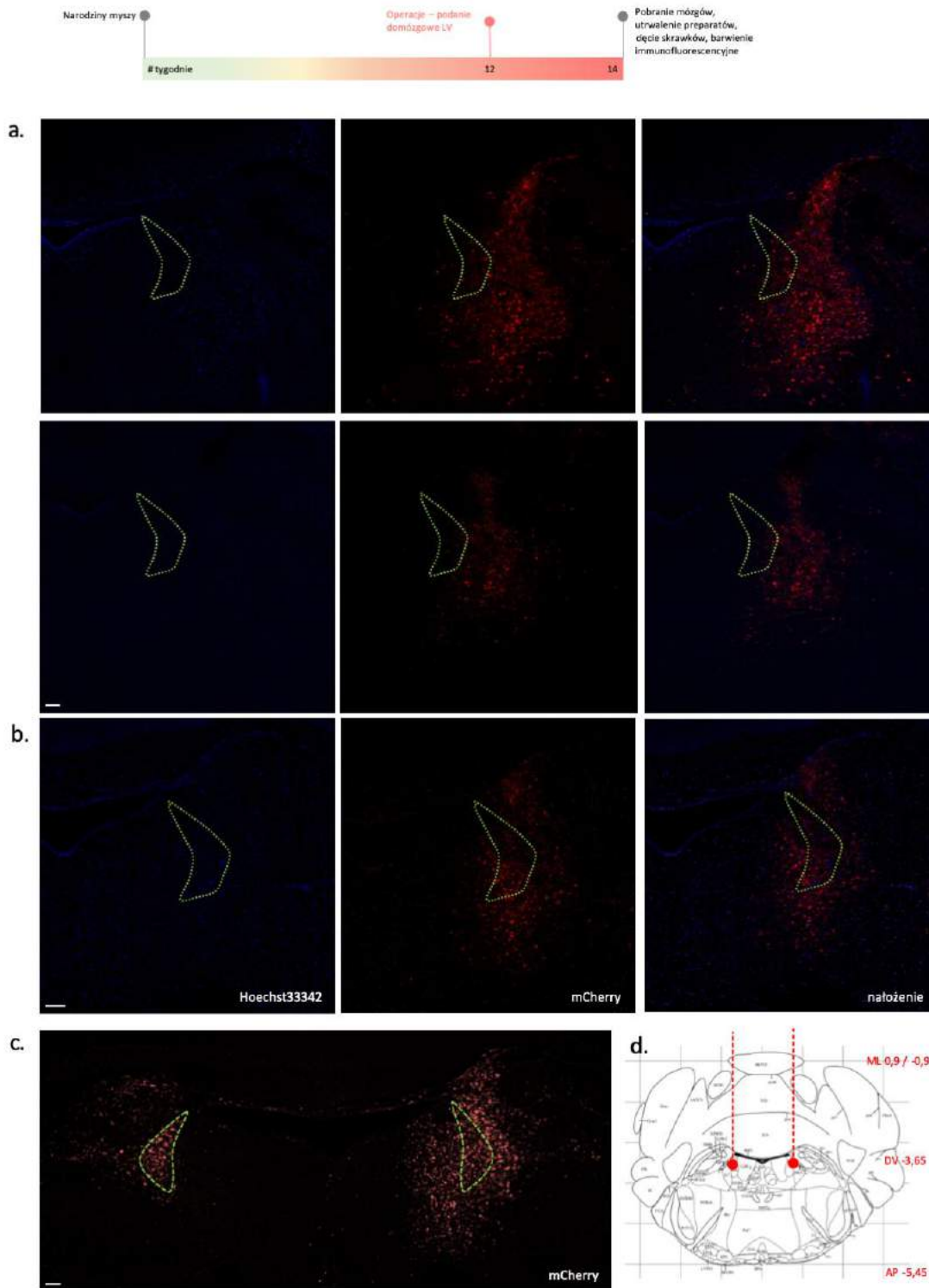
Aby zapewnić jak najwyższą powtarzalność operacji stereotaktycznych oraz wysoką skuteczność działania wirusa przeprowadzono pierwsze kroki w celu:

- optymalizacji miejsca podania wirusa (miejsce sinawe)
- doboru odpowiedniej ilości wstrzykiwanego wirusa
- ustalenia czasu działania wirusa
- możliwości weryfikacji mutacji

Na dwa pierwsze punkty odpowiedziano wykorzystując do tego myszy typu dzikiego C57Bl/6N oraz wirusa Cre-niespecyficznego LV-hU6-gTIF-e1-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS, z wariantem gRNA wyciszający początkowy fragment pierwszego egzonu *Rrn3* w neuronach. Kolejny punkt walidacji wymagał użycia modelu myszy transgenicznych DbhCre oraz Cre-specyficznego lentiwirusa LV-hU6-gTIF-e1-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS, który specyficznym w neuronach z ekspresją Cre również wycina fragment egzonu pierwszego *Rrn3*. Podczas pierwszych podań opisanych w tym podrozdziale nie było jeszcze wiadomo, że gRNA nakierowujący Cas9 na egzon 1 genu *Rrn3* nie powoduje śmierci komórek.

4.2.6.1. Dostosowanie warunków operacji stereotaktycznych na myszach C57Bl/6N

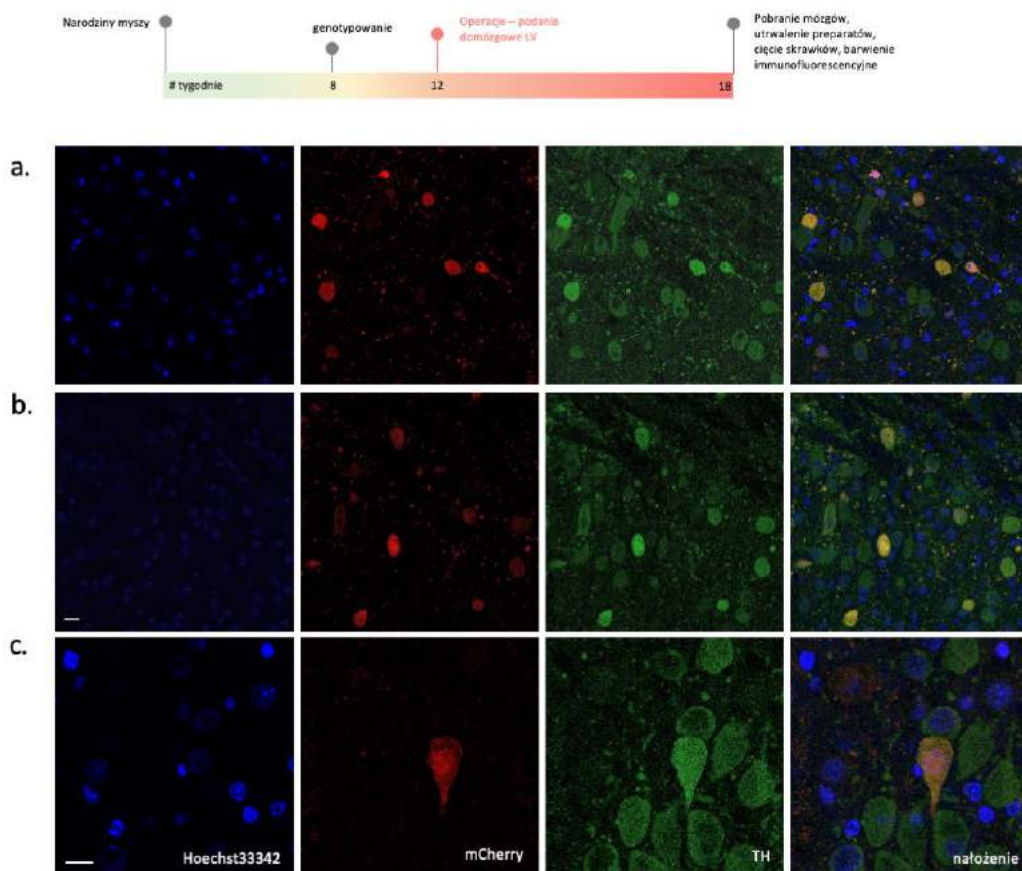
12-tygodniowe myszy C57Bl/6N poddawano operacji stereotaktycznej (N = 20, samice i samce) i bilateralnie podawano przygotowanego wcześniej lentiwirusa w celu weryfikacji miejsca iniekcji i rozprzestrzeniania się wirusa w tkance. Równocześnie testowano ilość potrzebnego wirusa do pokrycia całej struktury. W tym celu podawano różne objętości wirusa o tym samym mianie w lewą półkulę i prawą. Po 2 tygodniach myszy uśmiercano i obrazowano skrawki mózgu, aby oszacować penetrację wirusa w tkance. Ryc. 50 a i b obrazuje, jak dostosowywano koordynaty względem bregmy, aby pokrycie wirusem było jak najbardziej optymalne. Ostatecznie ustalono koordynaty: ML 0,9 / - 0,9; DV - 3,65; AP - 5,45 i szybkość przepływu na 400 nl/min. z 5 minutowym opóźnieniem w wyciągnięciu igły. Ustalonych parametrów trzymano się w kolejnych operacjach. Na Ryc. 50 c pokazano porównanie podania 1 µl wirusa (strona lewa) do 2 µl wirusa (strona prawa).



Ryc. 50. Ekspresja mCherry w miejscu sinawym myszy C57Bl/6, 2 tygodnie po obustronnej domózgowej iniekcji wektora LV-hU6-gTIFe1-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS nacelowanego na usunięcie fragmentu egzonu 1 białka TIF-IA. (a.) dostosowywanie miejsca podania wirusa i weryfikacja koordynatów operacji stereotaktycznych; podanie 1 μ l wirusa (b.) ostateczny obraz ekspresji wirusa z wybranymi koordynatami; podanie 1 μ l wirusa (c.) uwidocznione różnice w ilości podanego wirusa na stronę; podanie 0,7 μ l wirusa na stronę lewą oraz 1,5 μ l na stronę prawą (d.) zaznaczony schemat z atlasu mózgu z miejscem podania do miejsca sinawego, koordynaty: ML 0,9 / -0,9; DV - 3,65; AP - 5,45; Ekspresja mCherry została dodatkowo wzmocniona barwieniem immunofluorescencyjnym z użyciem przeciwciała anti-mCherry. Ramką zaznaczone jest miejsce sinawe. Skala 100 μ m.

4.2.6.2. Wykazanie optymalnego doboru warunków operacji stereotaktycznych na myszach DbhCre

Podczas pierwszych operacji ustalano możliwości weryfikacji mutacji i szacowano potrzebny czas do ekspresji wirusa Cre-zależnego CRISPR/Cas9. Przeprowadzono serię operacji w 4 turach (N = 27, samice i samce) z 2 tygodniowym odstępem czasu. 12-tygodniowe myszy DbhCre poddawano iniekcji takiej samej porcji lentiwirusa LV-hU6-gTIFe1-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS, z gRNA usuwającym fragment z egzonu 1 genu *Rrn3*. Po 2, 4, 6 i 8 tygodniach po operacji myszy uśmiercano i pobierano tkanki. Obraz ekspresji mCherry (który nie był umiejscowiony tylko w jądrach, jak wskazuje NLS, ale w całej cytoplazmie komórki) uzyskano w 33% operowanych osobników po upływie 6 tygodni od podania. We wcześniejszych punktach czasowych (2 i 4 tygodnie), jak i późniejszych (8 tygodni) nie odnotowano obecności białka fluorescencyjnego. Próbną operację przeprowadzono w podobnym czasie, co weryfikację *in vitro*, nie wiedząc jeszcze, że wybrany egzon 1 w genie *Rrn3* nie powoduje znaczącej śmierci komórek. Z tego powodu prawdopodobne jest, że była możliwość znalezienia punktu czasowego, w którym uwidoczniło się ekspresję wirusa (ze względu na brak śmierci komórek zainfekowanych) (Ryc. 51).



Ryc. 51. Mikroskopowy obraz ekspresji mCherry, w miejscu sinawym myszy DbhCre, 6 tygodni po obustronnej domózgowej iniekcji wektora LV-hU6-gTIF-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS nacelowanego na wyciszenie ekspresji fragmentu egzonu 1 białka TIF-IA; (a. – c.) reprezentacyjny obraz uzyskany z różnych myszy; ekspresja mCherry została wzmocniona barwieniem immunofluorescencyjnym; (d.) schematyczny przekrój mózgu z zaznaczonym miejscem sinawym, w którym obecna jest ekspresja TH i mCherry. Skala 50 μ m.

4.2.6.3. Selekcja optymalnego gRNA *in vivo* u myszy DbhCre

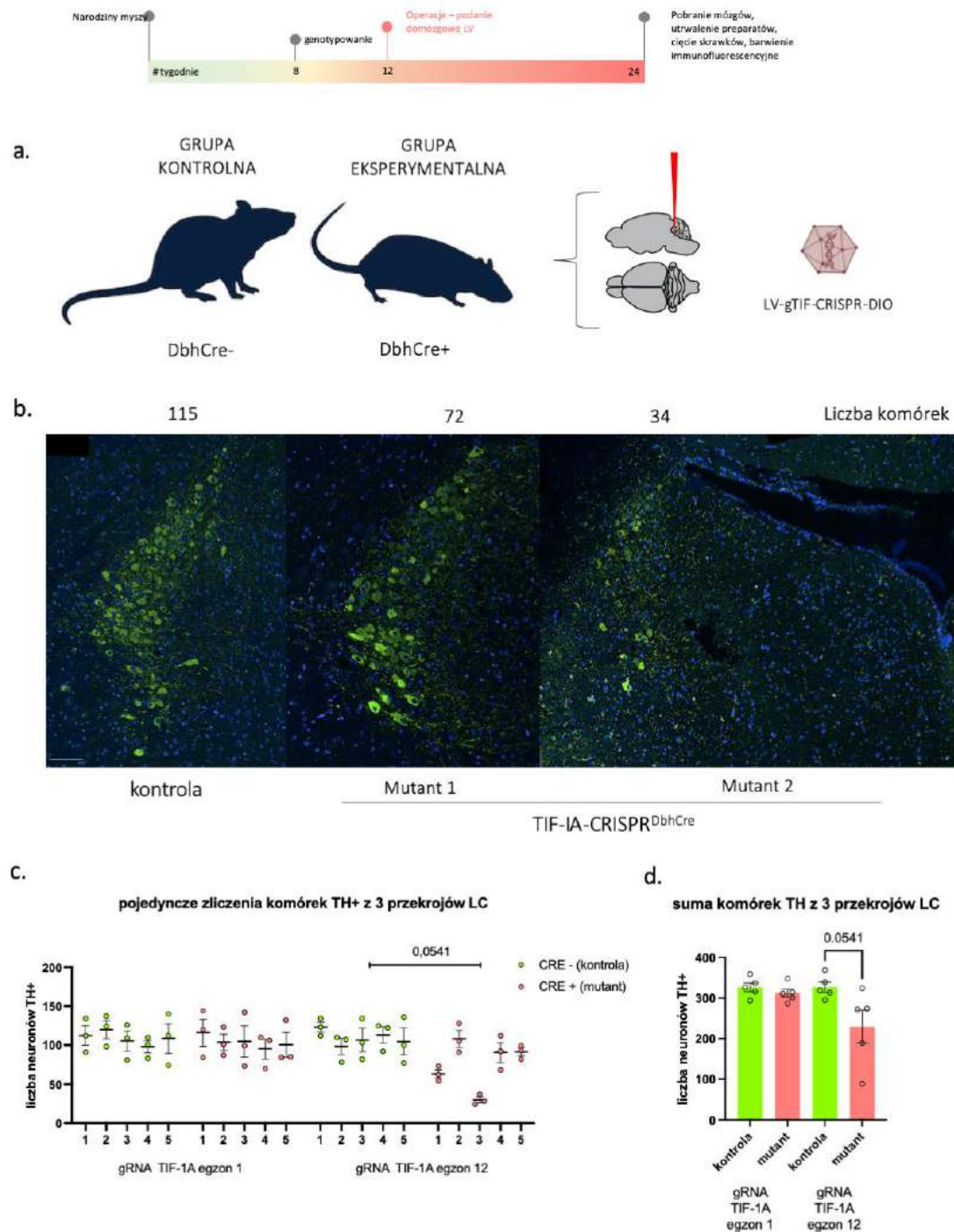
Wykonano operacje na grupie zwierząt (80 zwierząt, samce i samice, DbhCre + oraz DbhCre-), podając domózgowo, do LC takie same porcje wektora LV-hU6-gTIF-hSYN-DIO-Cas9-P2A-

mCherryNLS. Operacje przeprowadzano w dwóch grupach, ze względu na konieczność zebrania wystarczającej kohorty zwierząt. Zastosowano 5 różnych wersji łączonych oraz 4 pojedyncze z gRNA usuwającym białko TIF-IA, sugerując się Tab. 40, pokazującą zweryfikowane gRNA na neuronach *in vitro*. Jako kontroli używano myszy DbhCre-, którym podawano ten sam wektor, co grupie eksperymentalnej (Ryc. 52 a).

Tab. 41. Lista użytych wektorów LV do domózgowych podań.

| | | TIF-IA | | | | | | | | |
|---------|--------|--------|---------|---------|---------|------------|--------|---------|---------|---------|
| łączone | TIF1v1 | TIF2v1 | TIF12v1 | TIF13v1 | TIF12v1 | pojedynczo | TIF2v1 | TIF12v1 | TIF12v3 | TIF13v1 |
| | TIF1v4 | TIF2v2 | TIF12v3 | TIF13v4 | TIF13v1 | | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | | | | | |

Po 3 miesiącach od operacji myszy uśmiercono i pobrano mózgi do analizy ilości neuronów TH pozytywnych w miejscu sinawym. Wykonano barwienia immunofluorescencyjne i zliczono po 3 slajdy z największą ilością komórek TH. Wykazano, że przynajmniej jedne wersje gRNA, nacelowane w wyciszenie ekspresji białka TIF-IA w egzonie 12 wykazują prawidłowe działanie, osiągając tendencję do spadku liczby neuronów TH+ u 2 z 5 analizowanych zwierząt (Ryc. 52 b - d). Wszystkie kolejne eksperymenty wykonywano w takim samym schemacie podawania dwóch łączonych wektorów - LV-hU6-gTIFe12v1-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS wraz z LV-hU6-gTIFe12v3-hSYN-DIO-Cas9-P2A-mCherryNLS.



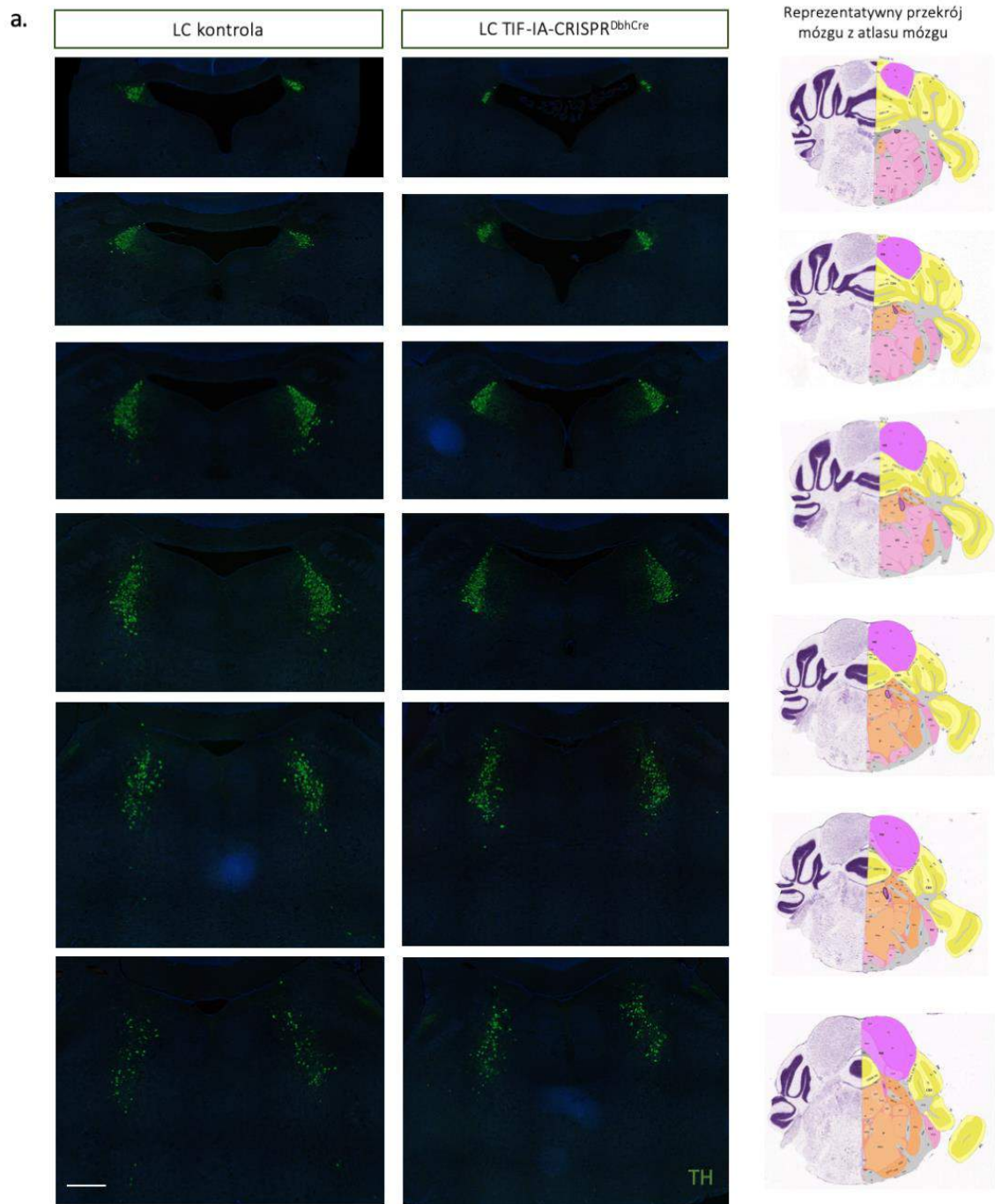
Ryc. 52. Zliczenia neuronów noradrenergicznych w miejscu sinawym myszy TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} w testowym eksperymencie (a.) schemat przeprowadzonego eksperymentu; (b.) reprezentacyjny mikroskopowy obraz miejsca sinawego myszy TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} 3 miesiące po obustronnej domożgowej iniekcji wektora LV-hU6-gTIF-hSYN-Cas9-P2A-mCherryNLS wyciszającego ekspresję fragmentu egzonu 12 białka TIF-1A u myszy kontrolnej oraz u mutantów; (c.) pojedyncze zliczenia 3 slajdów z największą ilością komórek TH w miejscu sinawym obrazujące różnice międzysobnicze po domożgowych podaniach wektorów. Przedstawiono przykładowe zliczenie mutantów, które nie wykazały istotnej różnicy po podaniach LV wyciszającego fragment egzonu 1 białka TIF-1A oraz po podaniach LV wyciszającego fragment egzonu 12 białka TIF-1A, które pokazuje poprawne działanie, wykazując tendencję do zmniejszenia ilości komórek; poziome linie symbolizują średnią \pm SEM, punkty na wykresie oznaczają liczbę neuronów TH+ z każdego skrawka osobno.; (d.) zliczenia ilości komórek TH+ w miejscu sinawym przedstawione jako suma komórek TH z 3 slajdów miejsca sinawego. Wyniki przedstawiono jako średnią dla grup \pm SEM. Do oceny istotności statystycznej wykorzystano dwuczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz test t-studenta dla grup niezależnych. Skala 100 μ m.

4.3. Wprowadzona mutacja do LC powoduje dysregulację działania układu noradrenergicznego u myszy TIF-IA-CRISPR^{DbhCre}

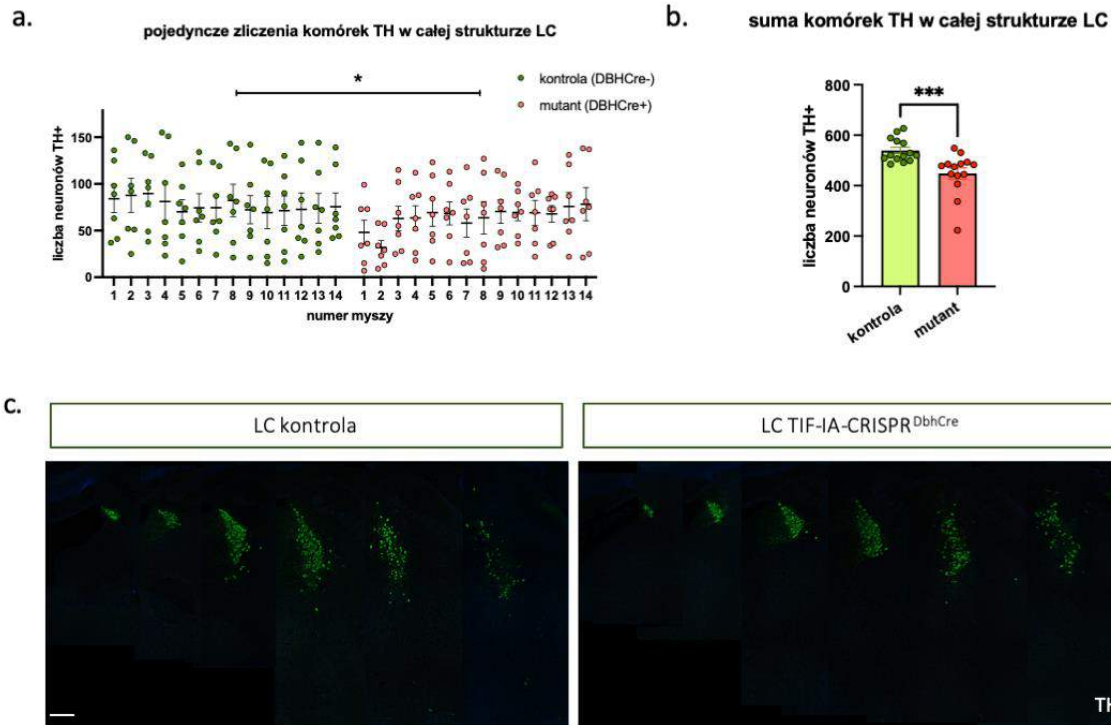
Na potrzeby zaplanowanych eksperymentów przygotowano kohortę 40 myszy – kontroli i transgenicznymi liniami DbhCre (po 10 samców i 10 samic w obrębie każdej grupy), celem przeprowadzenia także badań behawioralnych. Myszy w odpowiednim wieku (12 tygodni) poddawano operacjom stereotaktycznym i podawano wektor CRISPR wyciszający ekspresję *Rrn3*, kodującego białko TIF-IA, który zweryfikowano w poprzedzającym doświadczeniu. Jako kontrole używano myszy DbhCre⁻, którym podawano ten sam wektor, co grupie eksperymentalnej. W całym przedstawionym eksperymencie badającym wpływ układu noradrenergicznego na dopaminowy wykorzystano 4 kohorty zwierząt o różnej liczebności. Zwierzęta następnie poddawane były testom behawioralnym. Po ich zakończeniu, zgodnie z zasadą 3R, pobierane były mózgi do przeprowadzania dalszych testów *ex vivo*.

4.3.1.1. Usunięcie białka TIF-IA powoduje selektywną degenerację neuronów noradrenergicznych w LC

Ze względu na ograniczenia liczebności nie z każdej wygenerowanej kohorty zwierząt pobierano mózgi do kontroli ilości neuronów noradrenergicznych w miejscu sinawym. Zliczenia neuronów miejsca sinawego wykonano na 3 kohortach zwierząt, 6 miesięcy od podań wektora. W pierwszej kohorcie uwzględniając do zliczeń 10 zwierząt z grupy, a w drugiej i trzeciej pozostałe, które nie wykorzystano do innych badań *in vivo* (po 6 zwierząt). W grupach mutantów i kontroli rozkład płci rozkładać się po równo. Podczas weryfikacji i zliczeń odrzucono analizę myszy, u których przypadkowo nie pobrano wszystkich sekcji obejmujących miejsce sinawe. Dlatego w ostatecznej analizie całościowego zliczenia neuronów w miejscu sinawym zakwalifikowano 14 zwierząt. Podczas cięcia utrwalonego mózgu określano położenie miejsca sinawego poprzez rozpoznawalne struktury anatomiczne jak przyłkaczek (łac. *Paraflocculus*) oraz komora czwarta (łac. *Ventriculi Quarti*). Każde zwierzę charakteryzuje się różnicami osobniczymi i struktury te mogą być minimalnie przesunięte względem siebie. Na wygląd komór mózgu również szczególnie duży wpływ ma sposób utrwalenia tkanki, która może być mocniej rozszerzona, lub zwężona w miejscu pustych przestrzeni. Przykładowe zdjęcia losowego zwierzęcia ze zliczenia zestawione z reprezentatywnym miejscem z atlasu mózgu przedstawiono na Ryc. 53. Podliczono ilość wyznakowanych neuronów, a następnie przedstawiono na wykresie jako pojedyncze zliczenia w każdym osobniku, aby dobrze przedstawić wizualizację otrzymanych danych. Myszy o genotypie mutantu wykazywały się zmniejszoną ilością neuronów noradrenergicznych (dwuczynnikowa ANOVA: $F_{1,168} = 5$, $p = 0,021$). Dane ze zliczeń przedstawiono również jako średnią sumę wszystkich neuronów z grupy zwierząt (Ryc. 54 a i b). Wykazano znamienne statystycznie różnice w ilości neuronów noradrenergicznych między grupą kontrolną, a grupą badaną TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} z podanym wektorem wirusowym używając nieparametrycznego testu Manna-Whitneya dla grup niezależnych. Myszy TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} wykazują spadek liczby komórek TH⁺ o średnio 16,7 % ($U = 21,5$; $p < 0,001$) w porównaniu do grupy kontrolnej. Należy przy tym zaznaczyć, że na średnią składają się także zwierzęta o znacznie większym spadku komórek TH⁺ (nawet do 70%) oraz takie, w których nie zaobserwowano różnicy (analiza pojedynczych osobników pokazuje, że 40 % mutantów ma średnią liczbę neuronów noradrenergicznych na poziomie kontroli). Przyczyną może być bliska obecność komory mózgu, która może przejmować wektor LV, jeżeli zostanie naruszona.

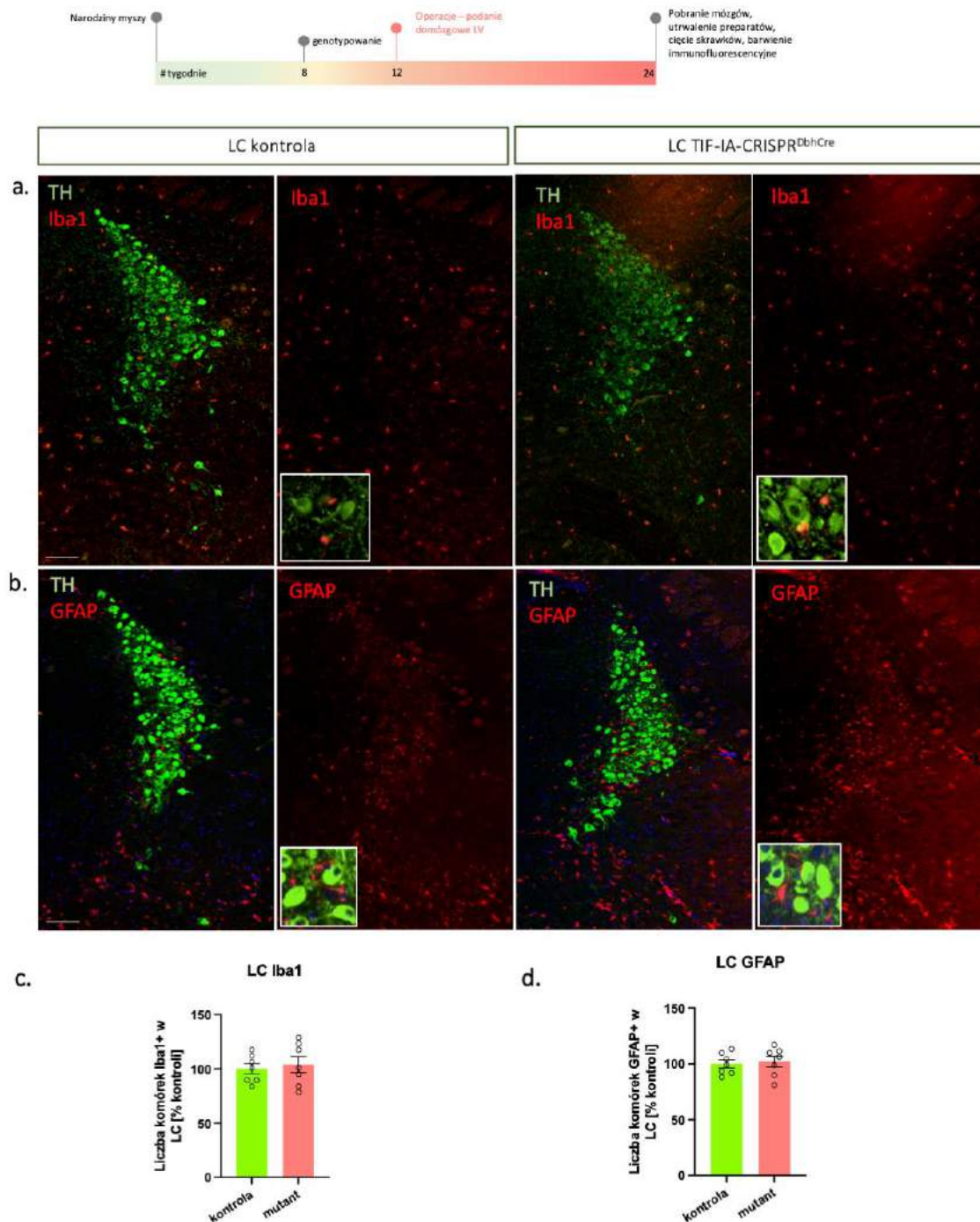


Ryc. 53. Analiza miejsca sinawego u myszy TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} 6 miesięcy po operacjach stereotaktycznych. (a.) obrazy mikroskopowe przedstawiające wyniki barwienia immunofluorescencyjnego skrawków z rejonu LC myszy TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} na obecność hydroksylazy tyrozynowej (TH) w celu zliczenia neuronów noradrenergicznych i oszacowania zmian w ich ilości między grupami; (b.) reprezentatywny przekrój mózgu przedstawiające poszczególne partie struktury LC, www.mouse.brain-map.org. LC – miejsce sinawe; Skala 250 μ m



Ryc. 54. Zliczenia neuronów noradrenergicznych w miejscu sinawym myszy TIF-IA-CRISPR^{DbhCre}. (a.) zliczenie neuronów TH+ z całego przekroju struktury miejsca sinawego przedstawione osobno dla każdego osobnika, z zaznaczoną poziomą linią średnią ilością neuronów \pm SEM (b.) zliczenie neuronów TH+ z całego przekroju struktury miejsca sinawego przedstawione jako średnia suma neuronów noradrenergicznych ze wszystkich zliczeń \pm SEM. Do oceny istotności statystycznej wykorzystano dwuczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz nieparametryczny test Manna-Whitneya dla grup niezależnych. N = 14. Istotność statystyczna przedstawiona jako *. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$; LC – miejsce sinawe; Skala 500 μ m

Dodatkowo u 7 zwierząt z grupy kontrolnej oraz grupy mutantów TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} wybarwiono losowy skrawek zawierający miejsce sinawe na obecność GFAP (marker astrogleju) oraz Iba1 (marker mikrogleju). Nie stwierdzono różnic w ekspresji Iba1 w obszarze miejsca sinawego pomiędzy zwierzętami kontrolnymi, a mutantami (test t-studenta: $t = 0,4527$, $df = 12$, $p = 0,6589$). Również liczba astrocytów w grupie mutantów pozostaje na poziomie kontroli ($t = 0,3405$, $df = 12$, $p = 0,7394$) (Ryc. 55).



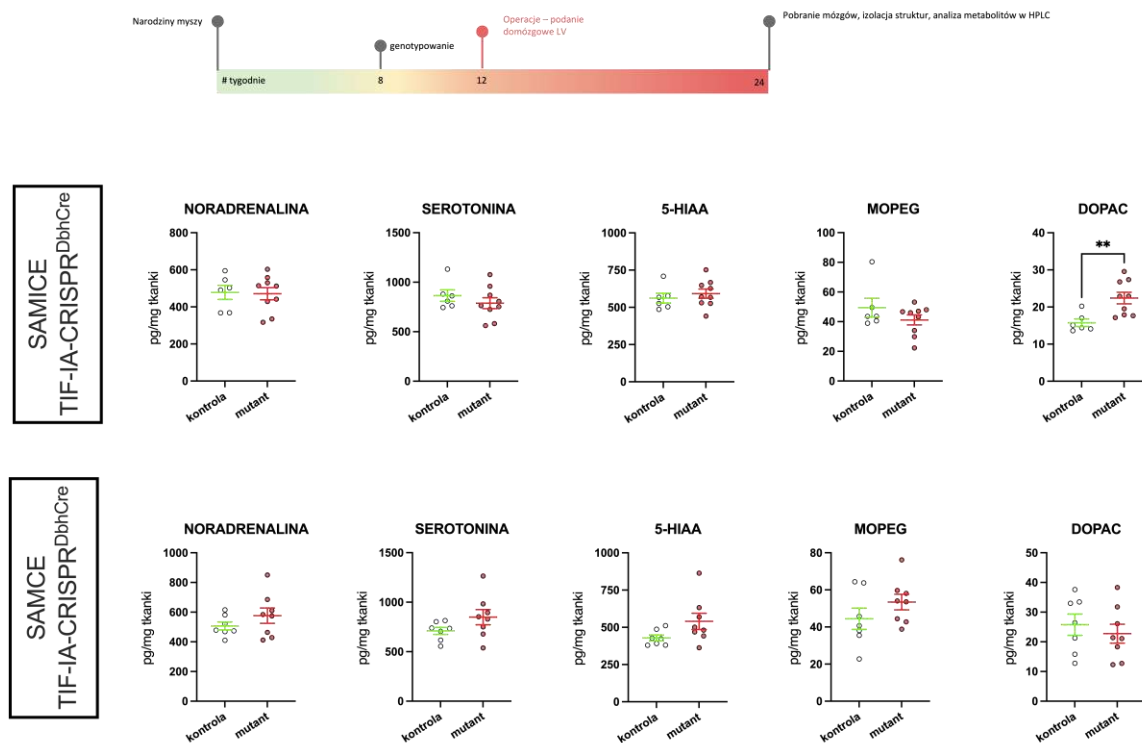
Ryc. 55. Analiza markerów glejowych w SN/VTA myszy TIF-IA-CRISPR^{D^{bh}Cre}. (a.) Przykładowe zdjęcie miejsca sinawego z wybarwionymi neuronami TH⁺ określające zakres miejsca sinawego oraz Iba1; (b.) Przykładowe zdjęcie miejsca sinawego z wybarwionymi neuronami TH⁺ oraz astrocytami GFAP⁺; (c.) średnia suma komórek Iba1-pozytywnych ± SEM; (d.) średnia suma komórek GFAP-pozytywnych ± SEM, a punkty to wartości uzyskane przez pojedyncze zliczenia; LC – miejsce sinawe; N = 7. Do oceny istotności statystycznej wykorzystano test t-studenta dla grup niezależnych Skala 100 μm

4.3.1.2. Noradrenalina i serotonina ulegają zmianom w tkance prądkowia u samców - analiza poziomu neuroprzekaźników i ich metabolitów w hipokampie oraz prądkowiu

Analizę monoamin oraz ich metabolitów przeprowadzono w 4 miesiącu po operacji dla hipokampa (celem potwierdzenia funkcjonalnych efektów uszkodzenia układu noradrenergicznego) oraz 6 miesiącu po operacji dla prądkowia (celem zbadania ew. wtórnych efektów degeneracji LC na

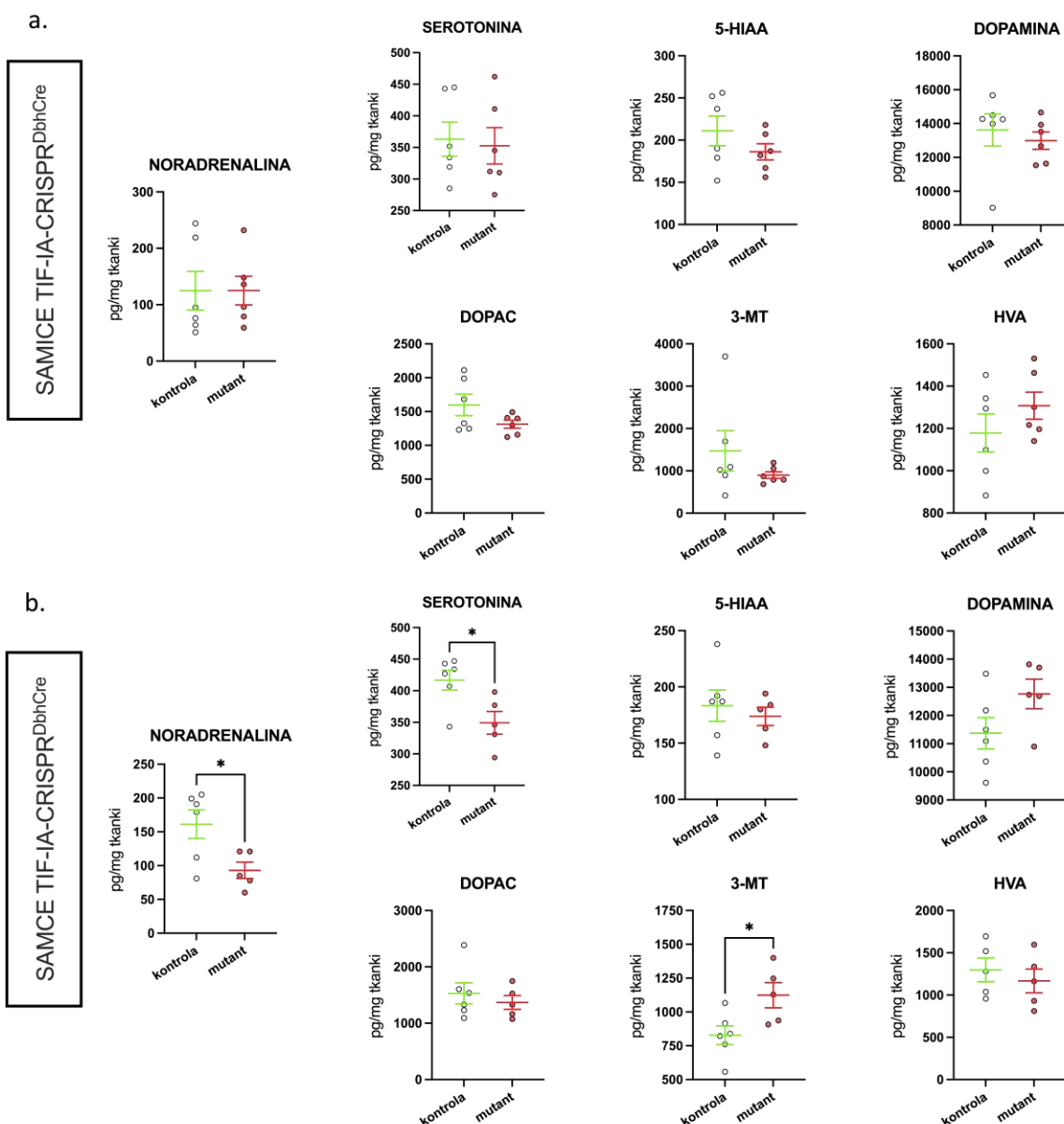
układ dopaminowy). Zebrane tkanki zamrożono na suchym lodzie, zważono i określono poziom neurotransmiterów i ich metabolitów w tkance. Otrzymaną wartość przeliczono na wagę badanej tkanki, otrzymując wartości wyrażone w pg/mg. Analizowano: dopaminę oraz jej metabolity (kwas dihydroksyfenylooctowy, DOPAC; 3-metoksytyraminę, 3-MT; kwas homowanilinowy, HVA), noradrenalinę oraz jej metabolit (3,4-dwuhydroksyfenyloglikol, MOPEG), serotoninę oraz jej produkt rozpadu – kwas 5-hydroksyindoloctowy (5-HIAA). Ze względu na wystarczająco liczną grupę, przeanalizowano osobno wyniki otrzymane z grupy samców i samic.

Analiza HPLC w hipokampie pokazała podwyższenie średniego poziomu metabolitu dopaminy, kwasu 3,4-dihydroksyfenylooctowego (DOPAC) o 6,67 pg/mg ($t = 3,174$, $df = 13$, $p = 0,0073$) u samic (Ryc. 56). Nie zaobserwowano jednak innych istotnych zmian w poziomie monoamin między grupą kontrolną i eksperymentalną, analizowana osobno w grupie samic oraz samców ($p > 0,05$).



Ryc. 56. Analiza poziomu neuroprzekaźników i ich metabolitów w hipokampie myszy TIF-IA-CRISPR^{DbhCre}, 3 miesiące po podaniach wirusa. (a.) u samic (b.) u samców. 5-HIAA – kwas 5-hydroksyindoloctowy; MOPEG - 3,4-dwuhydroksyfenyloglikol; DOPAC - kwas dihydroksyfenylooctowy. Wyniki przedstawiono jako pojedyncze punkty wraz z średnią dla grup \pm SEM. $N = 6-7$. Do oceny istotności statystycznej wykorzystano test t-studenta dla prób niezależnych. Istotność statystyczna przedstawiona jako *. ** $p < 0,01$

W 6 miesiącu po operacji i zainicjowania mutacji w miejscu sinawym wykazano różnice w poziomie monoamin w prążkowi tylko w grupie samców TIF-IA-CRISPR^{DbhCre}. W przypadku samic poziom analizowanych substancji nie zmieniał się ($p > 0,05$). Obniżeniu w grupie mutantów uległ średni poziom noradrenaliny o 68 pg/mg ($t = 2,641$, $df = 9$, $p = 0,0269$) oraz serotonininy o 68 pg/mg ($t = 2,824$, $df = 9$, $p = 0,0199$). 3-metoksytyramina, metabolit dopaminy podwyższył średni poziom w grupie mutantów o 293 pg/mg ($t = 2,622$, $df=9$, $p = 0,0277$) (Ryc. 57 b). Dopamina, 5-HIAA oraz HVA nie ulegały istotnym zmianom u mutantów ($p > 0,05$).

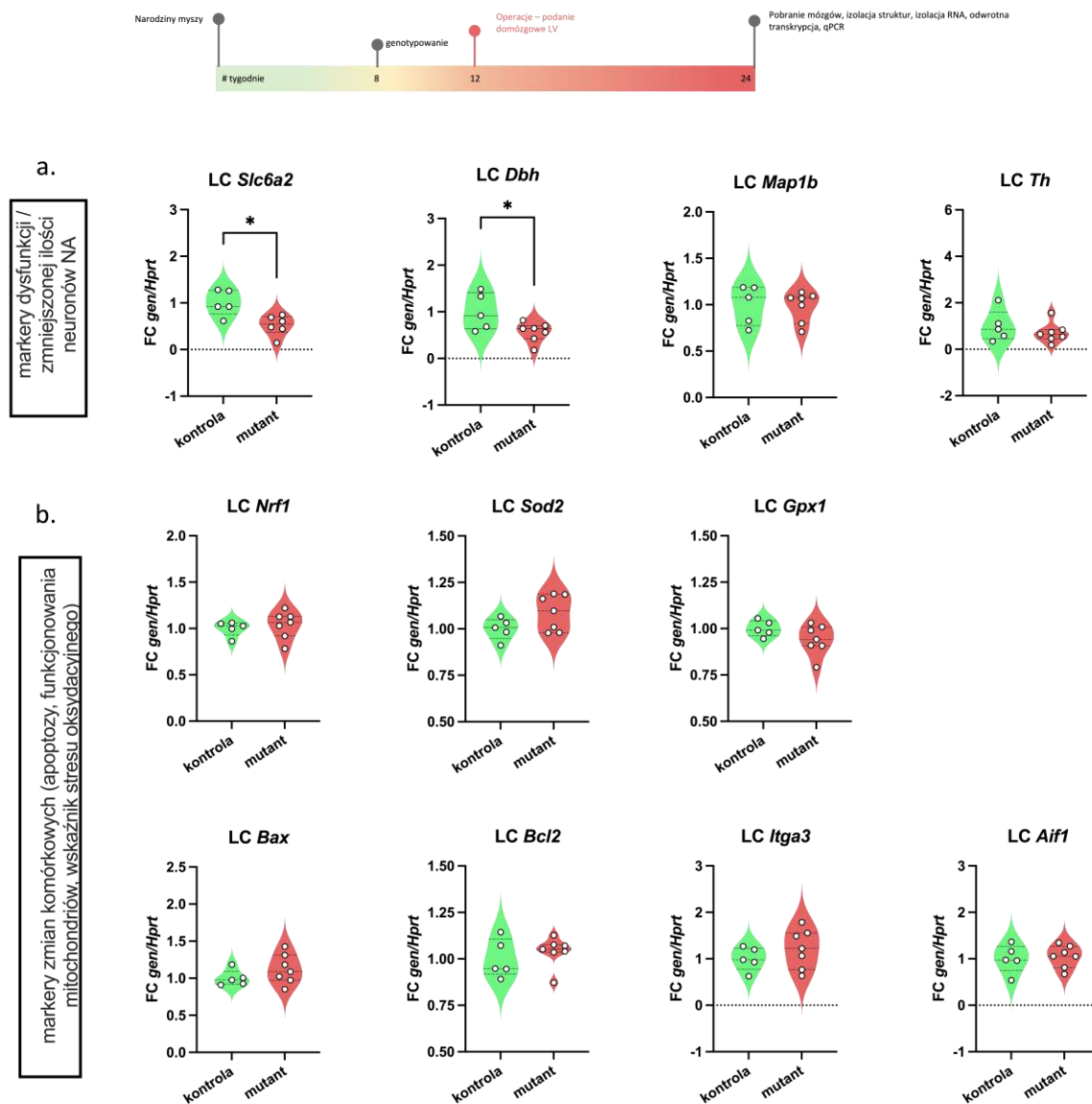


Ryc. 57. Analiza poziomu neuroprzekazników i ich metabolitów w prążkowie myszy TIF-IA-CRISPR^{DbhCre}, 6 miesięcy po podaniach wirusa. (a.) u samic (b.) u samców. 5-HIAA – kwas 5-hydroksyindoloocetowy; DOPAC - kwas dihydroksyfenyloocetowy; 3-MT – 3-metoksytyramina; HVA – kwas homowanilinowy. Wyniki przedstawiono jako pojedyncze punkty wraz z średnią dla grup \pm SEM. N = 5 - 6. Do oceny istotności statystycznej wykorzystano test t-studenta dla prób niezależnych. Istotność statystyczna przedstawiona jako *. * p < 0,05

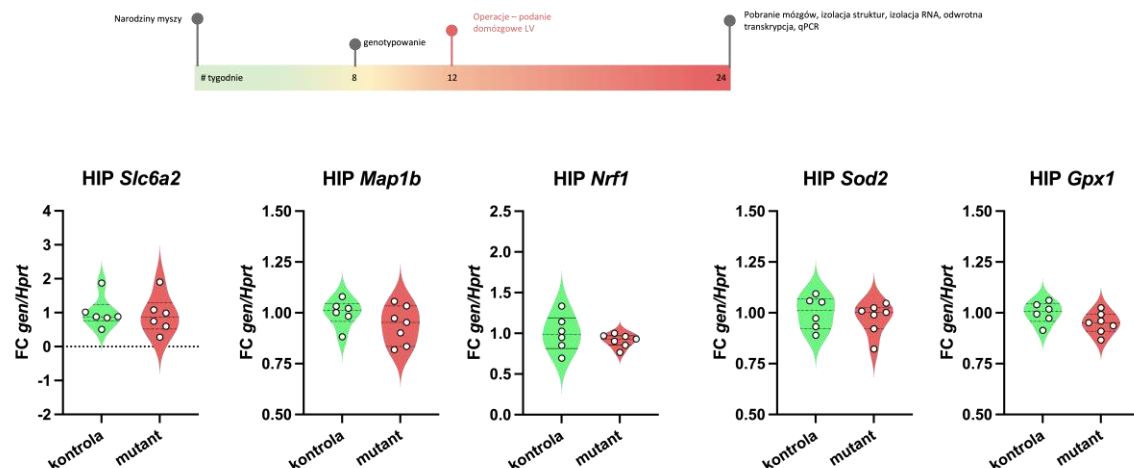
4.3.1.3. Analiza poziomu ekspresji mRNA wybranych genów w LC potwierdza zaburzenia w funkcjonowaniu neuronów noradrenergicznych poprzez obniżenie ekspresji transportera noradrenaliny.

Miejsce sinawe oraz hipokamp myszy TIF-IA-CRISPR^{DbhCre}, pobrane zwierzętom 6 miesięcy po indukcji mutacji, analizowano pod kątem zmian ekspresji wybranych genów, mających związek z przekazywaniem noradrenergicznym metodą RT-qPCR. Wykazano, że obniżenie ekspresji mRNA transportera noradrenaliny (*Net*, *Slc6a2*) o 43,5 % ($t = 2,958$, $df = 10$, $p = 0,0143$) w grupie mutantów.

Porównywalny wynik otrzymano analizując poziom ekspresji mRNA β -hydroksylazy dopaminy (*Dbh*), który uległ istotnemu obniżeniu w grupie mutantów o 43,3 % ($t = 2,477$, $df = 10$, $p = 0,0327$). Równocześnie nie zaobserwowano zmian w ilości hydroksylazy tyrozynowej (*Th*), będącej markerem neuronów wydzielających katecholaminy, ani odchyżeń w poziomie ekspresji mRNA markera neuronalnego, *Map1b*, białka związanego z mikrotubulami 1B (Ryc. 58 a.). Analiza ekspresji genów *Slc6a2* i *Map1b* w tkance hipokampa również nie wykazała zmian (Ryc. 58). Analizowano również poziom ekspresji mRNA wybranych genów będących markerami apoptozy, stresu komórkowego, stresu mitochondrialnego (*Nrf1*, *Sod2*, *Gpx1*, *Bax*, *Bcl2*, *Itga3*, *Aif1*). Nie wykazano różnic między grupą kontrolą i zwierzętami TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} ani w przypadku rejonu miejsca sinawego (Ryc. 58 b) ani w hipokampie (Ryc. 58).



Ryc. 58. Analiza poziomu ekspresji mRNA miejsca sinawego myszy TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} 6 miesięcy po podaniach wirusa. (a.) markery neuronalne, charakterystyczne dla neuronów noradrenergicznych (b.) markery zmian komórkowych. *Slc6a2*, *Net* – Transporter noradrenaliny; *Dbh* – β -hydroksylaza dopaminy; *Map1b* – ang. *Microtubule associated protein 1B*; *Th* – Hydroksylaza tyrozynowa; *Nrf1* – ang. *Nuclear respiratory factor 1*; *Sod2* – Mitochondrialna dysmutaza ponadtlenkowa 1; *Gpx1* – Peroksydaza glutationowa 1; *Bax* – ang. *Bcl-2-associated X protein*; *Bcl2* – Regulator apoptozy z rodziny białek Bcl2; *Itga3* – Podjednostka integryny alfa-3; *Aif1* – ang. *Allograft Inflammatory Factor 1*. Wyniki przedstawiono jako relatywny poziom ekspresji genów, wraz z znaczoną medianą dla grup \pm SEM, znormalizowane względem poziomu ekspresji genu standaryzującego, *Hprt*, w obu badanych grupach. FC – fold change, wartość wskazująca wielokrotność różnicy (\log_2) sygnałów fluorescencji pomiędzy transkryptomami grup badanych – kontroli i mutantów. N = 5-7. Do oceny istotności statystycznej wykorzystano test t-studenta dla prób niezależnych. Istotność statystyczna przedstawiona jako *. * $p < 0,05$



Ryc. 59. Analiza poziomu ekspresji mRNA hipokampa myszy TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} 6 miesięcy po podaniach wirusa. (a.) markery neuronalne, charakterystyczne dla neuronów noradrenergicznych (b.) markery zmian komórkowych. *Slc6a2*, *Net* – Transporter noradrenaliny; *Map1b* – ang. *Microtubule associated protein 1B*; *Nrf1* – ang. *Nuclear respiratory factor 1*; *Sod2* – Mitochondrialna dysmutaza ponadtlenkowa 1; *Gpx1* – Peroksydaza glutationowa 1. Wyniki przedstawiono jako relatywne poziomy ekspresji genów, wraz z znaczącą medianą dla grup \pm SEM, znormalizowane względem poziomu ekspresji genu standaryzującego, *Hprt*, w obu badanych grupach. FC – fold change, wartość wskazująca wielokrotność różnicy (\log_2) sygnałów fluorescencji pomiędzy transkryptomami grup badanych – kontroli i mutantów. N = 6-7. Do oceny istotności statystycznej wykorzystano test t-studenta dla prób niezależnych.

4.4. Efekty selektywnej, progresywnej degeneracji LC na funkcjonowanie układu dopaminowego (próba weryfikacji przydatności modelu do badań prodromalnej fazy PD)

4.4.1. Charakterystyka behawioralna myszy TIF-IA-CRISPR^{DbhCre}

Zwierzęta zostały poddane wybranym testom behawioralnym, celem dokonania ich charakterystyki fenotypowej. Testy wykonywane były w 4 i 6 miesiącu po indukcji mutacji, dlatego kolejne wykresy podpisane „4 miesiąc” i „6 miesiąc” nie dotyczą wieku myszy, a czasu od operacji i podania wirusa do miejsca sinawego. Testy wykonywane na tej samej kohorcie myszy przeprowadzono od najmniej inwazyjnych do najbardziej inwazyjnych (chronologia testów nie odpowiada uporządkowaniu wyników w pracy, które posegregowano pod kątem rodzaju badanego behawioru zwierząt).

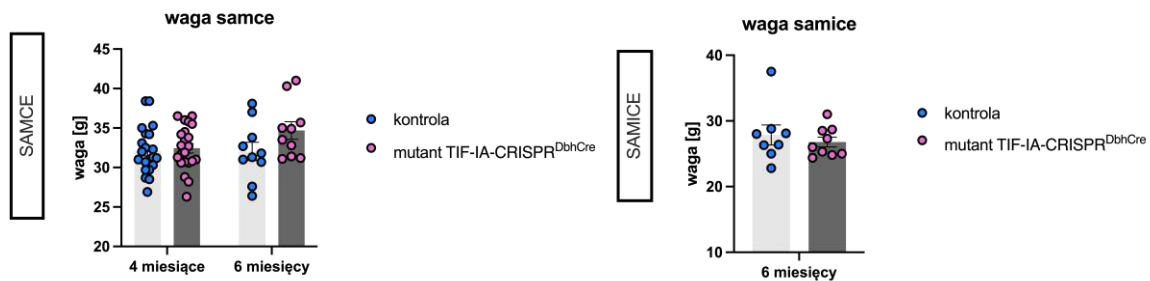


Ryc. 60. Schemat czasowy analizy behawioralnej myszy TIF-IA-CRISPR^{DbhCre}. Testy na zwierzętach wykonywane były w 4 i 6 miesiącu po podaniach wektora lentiwirusowego (od aktywacji mutacji).

4.4.1.1. Myszy TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} nie wykazują zmian masy ciała

Pomiary masy ciała u zwierząt wykonano przed przeprowadzonymi testami behawioralnymi. Stwierdzono, że masa ciała u samców nie zmienia się znacząco (dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji: $F_{1,59} = 3,0$, $p = 0,0842$). Czas od indukcji mutacji (4 miesiące, 6 miesięcy) nie miał istotnego wpływu na przyrost wagi zwierząt ($F_{1,59} = 1,6$, $p = 0,2046$), ani znamiennego wpływu nie miała

interakcja obu zmiennych ($F_{1,59} = 1,8$, $p = 0,1740$). W przypadku samic pomiar masy ciała wykonano tylko w 6 miesiącu po indukcji mutacji. Nie wykazano wpływu mutacji na przyrost masy ciała zwierząt (test t-studenta, $t = 0,6583$, $df = 15$, $P = 0,5204$).

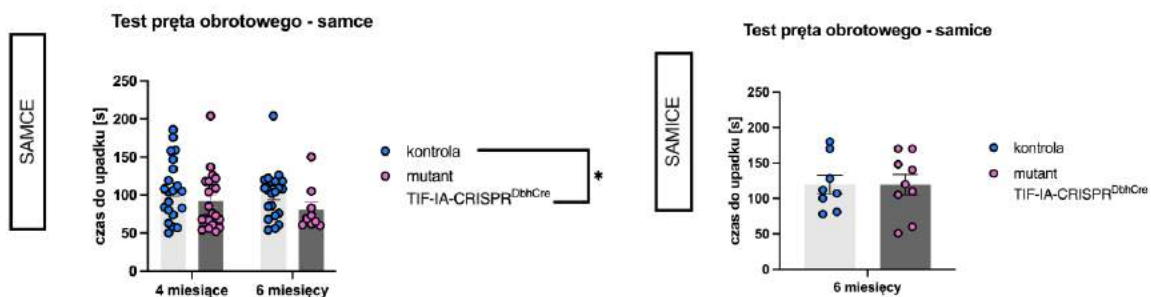


Ryc. 61. Wynik pomiaru masy ciała myszy TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} w 4 i 6 miesiącu po domózgowych podaniach wirusa. Wyniki przedstawiono jako średnią dla grup \pm SEM. Do oceny istotności statystycznej wykorzystano dwuczynnikową analizę wariancji z powtórzonymi pomiarami ANOVA (samce) oraz test t-studenta dla prób niezależnych (samice).

4.4.1.2. Samce myszy TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} wykazują zaburzenia motoryczne

Aby wykryć zaburzenia motoryczne u myszy wykorzystano trzy czułe testy pozwalające na analizę zaburzeń ruchowych: test Rotarod (pręta obrotowego), pozwalający na ocenę koordynacji ruchu myszy w wymuszonych warunkach kręcącego się wału; test prętów statycznych, oceniający koordynację ruchu myszy w niewymuszonych warunkach na statycznych prętach o różnych średnicach; test otwartego pola, pozwalający ocenić spontaniczną ruchliwość (pokonaną odległość, prędkość i preferencję poruszania się) w niewymuszonych warunkach. Ten ostatni test stanowił też dodatkową komponentę oceny zachowań lękowych.

W teście Rotarod wykazano istnienie zaburzeń ruchowych u samców myszy TIF-IA-CRISPR^{DbhCre}. Wyniki testu wykazały różnice w długości pozostawania w ruchu na obracającym się pręcie do momentu upadku z wału między samcami mutantami a zwierzętami kontrolnymi w 4, jak i 6 miesiącu po indukcji mutacji (Ryc. 62). Mutanty utrzymywały się na pręcie krócej niż myszy kontrolne (dwuczynnikowa ANOVA z powtórzonymi pomiarami: $F_{1,42} = 5,467$, $p = 0,0242$). Czas od indukcji mutacji (4 miesiące, 6 miesięcy) nie miał istotnego wpływu na długość pozostawania zwierząt na obracającym się wale ($F_{1,42} = 0,3475$, $p = 0,5604$), ani znamiennego wpływu nie miała interakcja obu zmiennych ($F_{1,27} = 0,03750$, $p = 0,8479$). W przypadku samic pomiar wykonano tylko w 6 miesiącu po indukcji mutacji. Nie wykazano wpływu mutacji na długość przebywania na obracającym się wale (test t-studenta, $t = 0,008411$, $df = 15$, $P = 0,9934$), stąd można z dużym prawdopodobieństwem zakładać, że wcześniej również nie zaobserwowano by takiego efektu.

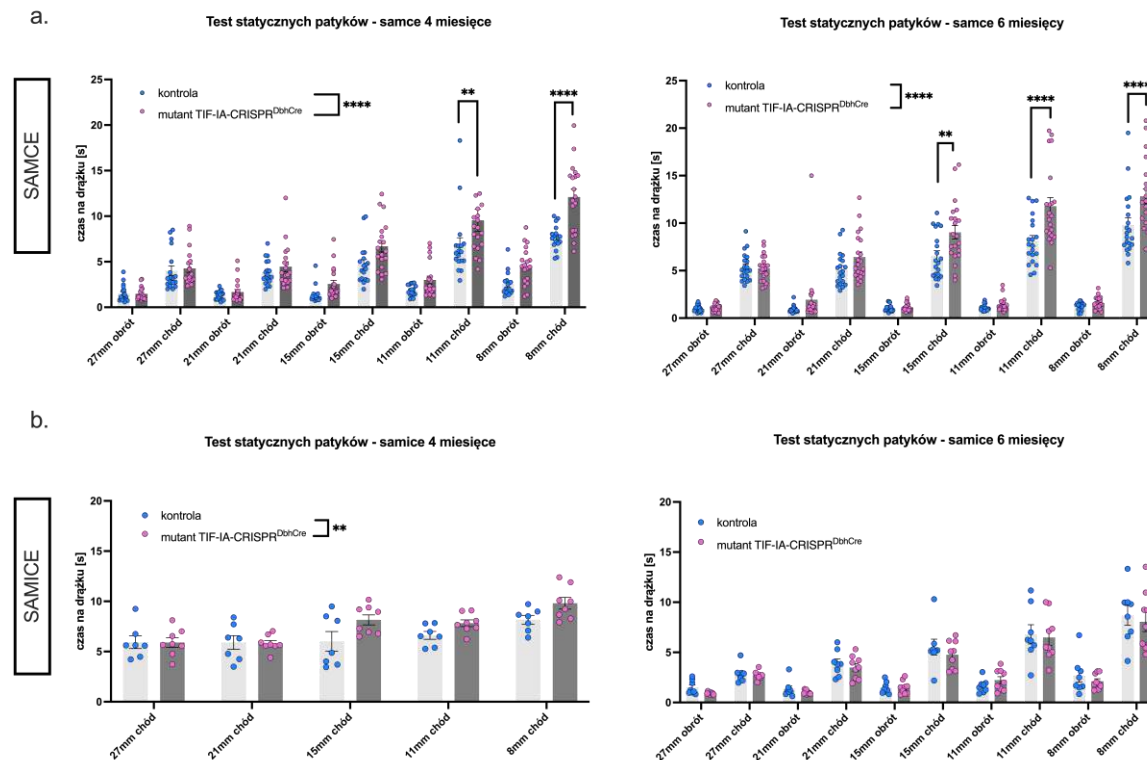


Ryc. 62. Wynik testu pręta obrotowego myszy TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} przeprowadzonego w 4 i 6 miesiącu po domózgowych podaniach wirusa. Jako miarę zdolności motorycznych zastosowano czas do upadku myszy z pręta obrotowego [s]. Wyniki przedstawiono jako średnią dla grup \pm SEM. 8 – 19. Do oceny istotności statystycznej wykorzystano dwuczynnikową analizę wariancji z powtórzonymi pomiarami ANOVA (samce) oraz test t-studenta dla prób niezależnych (samice). Istotność statystyczna przedstawiona jako *. * $p < 0,05$

Test statycznych prętów pozwala zaobserwować koordynację myszy podczas obrotu na pręcie, a następnie zmierzenie czasu przejścia długości pręta, którego pokonanie jest niewymuszone. Podczas wstępnych testów, przyzwyczajających zwierzęta do nowych warunków, myszy uczą się, że po pokonaniu pręta wrócą do klatki domowej, dlatego test ten ma również aspekt nagradzający. Zmniejszające się średnice prętów pozwalają wychwycić drobne zmiany w koordynacji ruchowej między osobnikami. Wyniki testu wykazały różnice w szybkości pokonania prętów jak i wykonania odrotu na pręcie o średniej i małej średnicy między samcami mutantów TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} a zwierzętami kontrolnymi w 4, jak i 6 miesiącu po indukcji mutacji (Ryc. 63). Myszy o genotypie mutantu przechodziły i obracały się na pręcie dłużej niż myszy kontrolne (dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji: $F_{1,347} = 38,82$, $p < 0,0001$). Wykazano również, że średnica pręta miała istotne znaczenie w szybkości pokonania tej utrudnienia, a im mniejsza średnica, tym obrót oraz chód jest wolniejszy ($F_{1,347} = 57,87$, $p < 0,0001$). Znamienne wpływy miała również interakcja obu zmiennych ($F_{1,347} = 3,318$, $p < 0,0007$). W przypadku analizy pojedynczych danych z każdego pręta wykazano, że samce mutantów pokonują pręty o największej średnicy na poziomie kontroli (test post-hoc Šidáka, $p > 0,05$). Pierwsza różnica pojawia się na pręcie o średnicy 11 mm, gdzie u samców mutantów wydłuża się czas przejścia pręta (test post-hoc Šidáka, $p = 0,0024$). Najbardziej problematyczny okazało się dla samców TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} przejście najmniejszych prętów (8 mm). Czas przejścia długości pręta przez mutantu w porównaniu do kontroli było o 3,01 sekundy dłuższe (test post-hoc Šidáka, $p < 0,0001$). Również w przypadku analizy w 6 miesiącu po indukcji mutacji, samce mutanty przechodziły i obracały się na pręcie dłużej niż myszy kontrolne (dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji: $F_{1,390} = 34,62$, $p < 0,0001$), średnica pręta miała istotne znaczenie w szybkości pokonania trudności ($F_{9,390} = 146,3$, $p < 0,0001$) oraz znamienne wpływy miała również interakcja genotypu myszy wraz ze średnicą pręta ($F_{9,390} = 4,268$, $p < 0,0001$). Zauważono również nasilenie zmian motorycznych, objawiające się u samców mutantów dłuższym czasem pokonania prętów, już o średnicy 15 mm (test post-hoc Šidáka, $p < 0,0001$), a także 11 mm (test post-hoc Šidáka, $p < 0,0001$) oraz najwęższym prętem 8 mm (test post-hoc Šidáka, $p < 0,0001$).

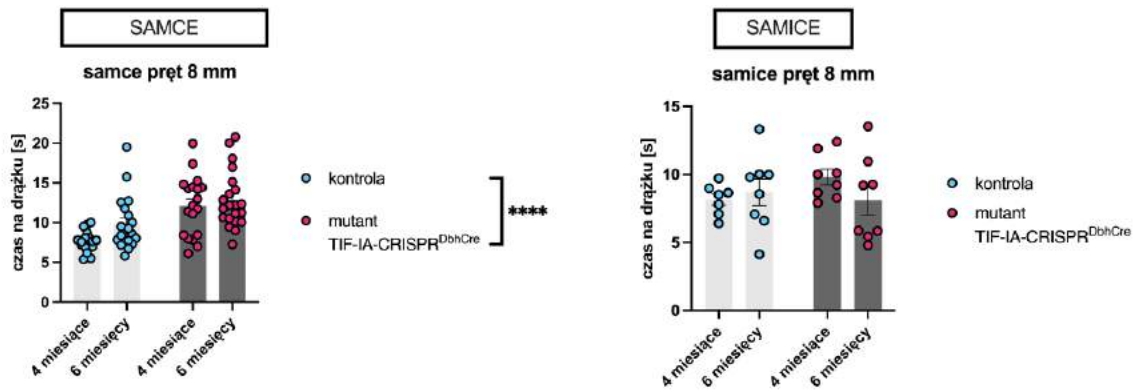
W przypadku samic pomiar wykonany w 4 miesiącu po iniekcji wirusa wykazał istotną różnicę między genotypami (dwuczynnikowa ANOVA z efektem interakcji: $F_{4,65} = 7,793$, $p = 0,0069$) oraz średnica pręta miała istotne znaczenie w szybkości pokonania trudności ($F_{4,65} = 10,69$, $p < 0,0001$). Nie wykazano natomiast istotnej interakcji genotypu myszy wraz ze średnicą pręta ($F_{4,65} = 1,644$, $p = 0,1739$). W 6 miesiącu nie zaobserwowano istotnych różnic między samicami o różnym genotypie ($F_{1,150} = 1,762$, $p = 0,1863$). Podsumowując, samce mutanty TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} wykazują zaburzenia w koordynacji ruchowej w 4 miesiącu po indukcji mutacji, która nasila się w 6 miesiącu. Samice

natomiast – jeśli wykazują różnice w motorycznych umiejętnościach – to zaczynają się one w 4 miesiącu po indukcji mutacji, natomiast zmiany te wraz z czasem nie pogłębiają się.



Ryc. 63. Wynik testu statycznych prętów przeprowadzonego w 4 i 6 miesiącu po domózgowych podaniach LV u myszy TIF-IA-CRISPR^{DbhCre}. Jako miarę zdolności motorycznych zastosowano czas obrotu i przejścia patyków [s]. Wyniki przedstawiono jako średnią dla grup ± SEM, a punkty to wartości uzyskane przez pojedyncze osobniki dla (a.) samców; (b.) samic. N = 8-19. Do oceny istotności statystycznej wykorzystano dwuczynnikową analizę wariancji z powtórzonymi pomiarami ANOVA, uzupełnioną testem post-hoc Śidaka w przypadku istotności interakcji dwóch zmiennych. Istotność statystyczna przedstawiona jako *. ** p < 0,01, **** p < 0,0001

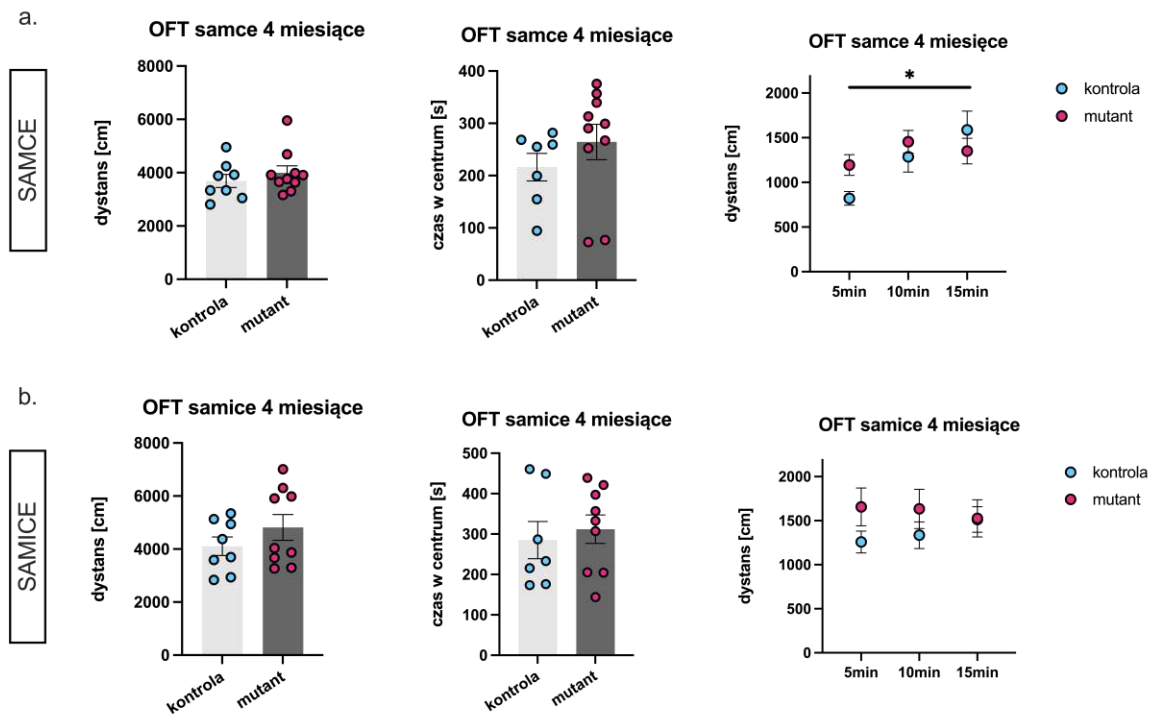
Dodatkowo przeanalizowano powyższe zmiany behawioralne w czasie. Zestawiono czas przejścia myszy po najmniejszym pręcie w 4 i 6 miesiącu po podaniu wirusa. Wyniki tego testu potwierdziły różnice w szybkości przejścia prętu pomiędzy samcami o genotypie TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} a zwierzętami kontrolnymi w 4, jak i 6 miesiącu po indukcji mutacji (Ryc. 64). Mutanty przechodziły 8 mm pręt dłużej niż myszy kontrolne (dwuczynnikowa ANOVA z powtórzonymi pomiarami: $F_{1,73} = 26,01$, $p < 0,0001$), jednak czas od indukcji mutacji (4 miesiące, 6 miesięcy), mimo pojawiającej się tendencji, nie miał istotnego wpływu na szybkość chodu zwierząt ($F_{1,73} = 3,851$, $p = 0,0535$). W przypadku samic nie wykazano wpływu genotypu na szybkość przejścia 8 mm pręta (dwuczynnikowa ANOVA z powtórzonymi pomiarami: $F_{1,27} = 0,3954$, $p = 0,5348$), ani wpływu czasu ($F_{1,27} = 0,4877$, $p = 0,4909$).



Ryc. 64. Wynik przejścia prętu 8 mm w teście statycznych prętów przeprowadzonego w 4 i 6 miesiącu po domózgowych podaniach wirusa u myszy TIF-IA-CRISPR^{DbhCre}. Wyniki przedstawiono jako średnią dla grup \pm SEM. N = 8-19. Do oceny istotności statystycznej wykorzystano dwuczynnikową analizę wariancji z powtórzonymi pomiarami ANOVA. Istotność statystyczna przedstawiona jako *. **** p < 0,0001

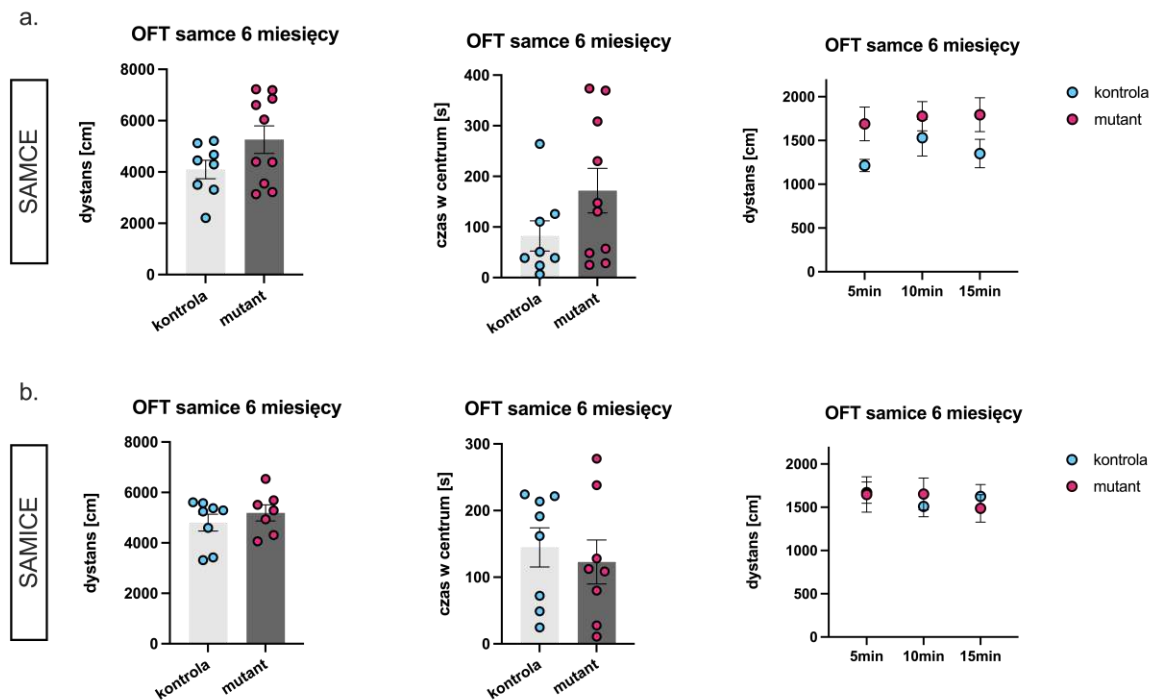
W teście otwartego pola przeprowadzono pomiar aktywności podczas swobodnej eksploracji nowej klatki przez zwierzę. Oceniono zdolności ruchowe oraz lękowość, która interpretowana jest jako tendencja myszy do przebywania poza centrum klatki, w bliskości ścian klatki. Analizom w 4 i 6 miesiącu po podaniach wirusa poddane zostały różne kohorty myszy, dlatego ich aktywność analizowana jest na osobnych wykresach. Zmierzono dystans w przedziałach czasowych: 5, 10 i 15 minutach po wejściu do nowej klatki, całkowity przebyty dystans, a także czas spędzony w najlepiej oświetlonym centrum klatki.

Genotyp myszy w 4 miesiącu po podaniach wirusa (Ryc. 65) nie miał istotnego wpływu na całkowity dystans pokonany przez samce (test t-studenta, $t = 0,8513$, $df = 16$, $P = 0,4071$) i samice ($t = 1,159$, $df = 15$, $P = 1,159$) w teście otwartego pola. Nie zaobserwowano także znamiennego wpływu genotypu w 5, 10 i 15 minucie pomiaru pokonanego dystansu, ani u samców (dwuczynnikowa ANOVA z powtórzonymi pomiarami: $F_{1,16} = 0,725$, $p = 0,4071$), ani u samic ($F_{1,15} = 1,343$, $p = 0,2647$). Natomiast istotnym parametrem okazał się pomiar dystansu w czasie u samców, gdzie zaobserwować można wzrost pokonanego dystansu im dłużej zwierzę znajdowało się w nowej klatce ($F_{1,470, 23,51} = 5,746$, $p = 0,0152$). U samic czas przebywania w nowej klatce nie miał wpływu na pokonany dystans ($F_{1,187, 17,81} = 0,09336$, $p = 0,8059$). Myszy nie wykazały większej lękowości w tym teście, przebywając podobny czas pośrodku klatki (samce: $t = 1,041$, $df = 15$, $P = 0,3144$; samice: $t = 0,4638$, $df = 11,97$, $P = 0,6504$).



Ryc. 65. Wyniki testu otwartego pola przeprowadzonego na samcach (a.) i samicach (b.) myszy TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} po 4 miesiącach od domóżgowych podaniach wirusa. Wyniki przedstawiono jako średnią dla grup \pm SEM. N = 8-9. Do oceny istotności statystycznej wykorzystano test t-studenta oraz dwuczynnikową analizę wariancji z powtórzonymi pomiarami ANOVA (w przypadku analizy interwału czasowego). Istotność statystyczna przedstawiona jako *. * p < 0,05

Analogiczne obserwacje zanotowano w 6 miesiącu po podaniach wirusa (Ryc. 66). Genotyp myszy nie miał istotnego wpływu na całkowity dystans pokonany przez samce (test t-studenta, $t = 1,707$, $df = 16$, $P = 0,1071$). Nie zaobserwowano także znamiennego wpływu genotypu w 5, 10 i 15 minucie pomiaru pokonanego dystansu, ani u samców (dwuczynnikowa ANOVA z powtórzonymi pomiarami: $F_{1,16} = 2,914$, $p = 0,1071$), ani u samic ($F_{1,14} = 0,0006764$, $p = 0,9796$). Zwierzęta również przebywały podobny czas pośrodku klatki (samce: $t = 1,594$, $df = 16$, $P = 0,1305$; samice: $t = 0,8332$, $df = 13$, $P = 0,4198$).

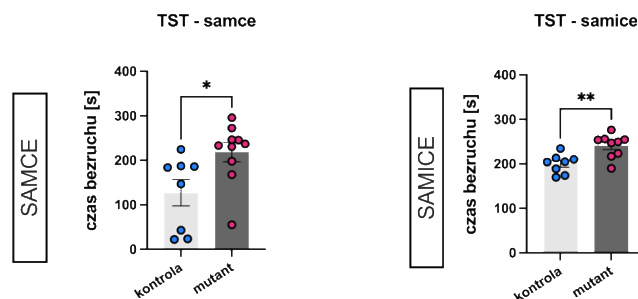


Ryc. 66. Wyniki testu otwartego pola przeprowadzonego na samcach (a.) i samicach (b.) myszy TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} po 6 miesiącach od domózgowych podaniach wirusa. Wyniki przedstawiono jako średnią dla grup \pm SEM. N = 8-10. Do oceny istotności statystycznej wykorzystano test t-studenta oraz dwuczynnikową analizę wariancji z powtórzonymi pomiarami ANOVA (w przypadku analizy interwału czasowego). Istotność statystyczna przedstawiona jako *. * p < 0,05

4.4.1.3. Ocena pozaruchowego behawioru – odpowiedzi na stres i lękowość myszy TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} pokazuje predyspozycję mutantów do rozwoju lękowości i zmniejszonej odporności na silny stres

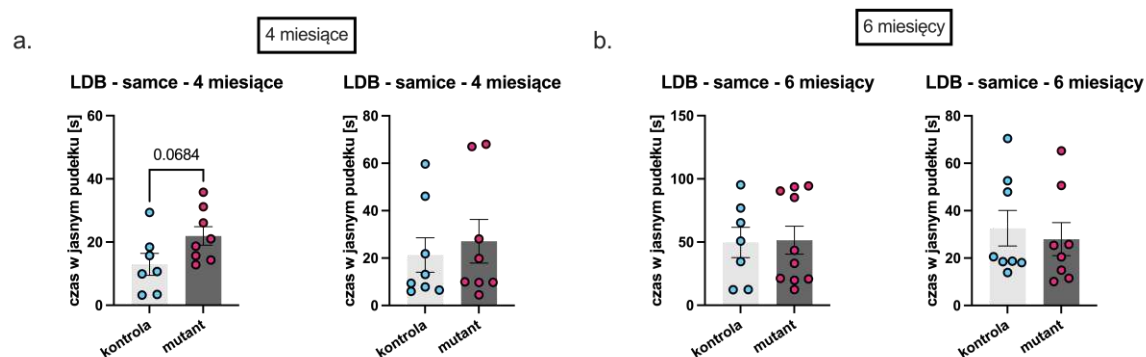
Ze względu na charakterystyczne dla choroby Parkinsona występowanie zaburzeń pozaruchowych oceniono wpływ zmienionego genotypu myszy (w którym zaburzonymu działaniu ulega układ noradrenergiczny) na odpowiedź zwierząt na stres i ich zachowanie lękowe. Ostrą odpowiedź na stres zmierzono przeprowadzając test zawieszenia za ogon (ang. *Tail Suspension Test*, TST), który wykorzystywany jest do mierzenia tzw. bezradności behawioralnej, która jest również miarą zachowań przypominających depresję. Ten test umożliwia ocenę sposobu reagowania badanych grup myszy w sytuacji niemożliwego do uniknięcia stresu. Lękowość myszy zmierzono przy wykorzystaniu testu jasnego/ciemnego pudełka (*Light-Dark Box*, LDB) oraz podniesionego labiryntu krzyżowego. Wykonano również pomiar anhedonii, czyli niezdolności odczuwania przyjemności, który u myszy najczęściej testowany jest preferencją do spożycia słodkich płynów.

Test TST przeprowadzono w 6 miesiącu po operacji i podaniu wektora wirusowego na samcach oraz samicach. W grupie myszy o genotypie mutantu zaobserwowano zwiększony czas bezruchu w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi zarówno u samców (test t-studenta, $t = 2,562$, $df = 16$, $P = 0,0209$), jak i u samic (test t-studenta, $t = 3,500$, $df = 15$, $P = 0,0032$).



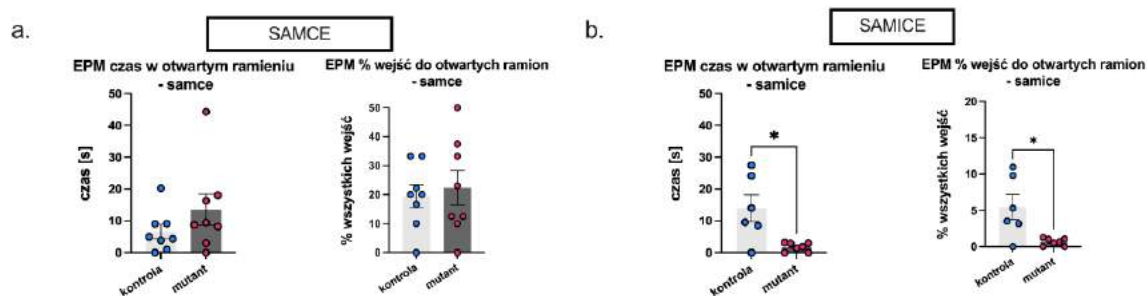
Ryc. 67. Wyniki testu zawieszenia za ogon (TST) przeprowadzonego na samcach (a.) i samicach (b.) myszy TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} po 6 miesiącach od domózgowych podań wirusa. Wyniki przedstawiono jako średnią dla grup \pm SEM, a punkty to wartości uzyskane przez pojedyncze osobniki. N = 8-10. Do oceny istotności statystycznej wykorzystano test t-studenta. Istotność statystyczna przedstawiona jako *. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Test LDB wykonano w 6 miesiącu po podaniu wektora LV (zainicjowaniu mutacji). Wykonano pomiar latencji pierwszego wejścia do jasnej części aparatu, czas całkowity spędzony w oświetlonym pudełku oraz liczbę przejść między kompartmentami. Na wykresach (Ryc. 68) przedstawiono całkowity czas spędzony w jasnej części aparatu. Analiza wszystkich uzyskanych wyników wykazała, że genotyp nie ma wpływu na czas latencji, czas spędzony w jasnym i ciemnym pudełku oraz liczbę przejść między częściami aparatu, ani u samców, ani u samic (test t-studenta, $p < 0,5$). Tendencja do zwiększonej lękowości ujawnia się w 4 miesiącu po inicjacji mutacji u samców, jednak wynik nie jest istotny statystycznie ($t = 1,987$, $df = 13$, $P = 0,0684$),



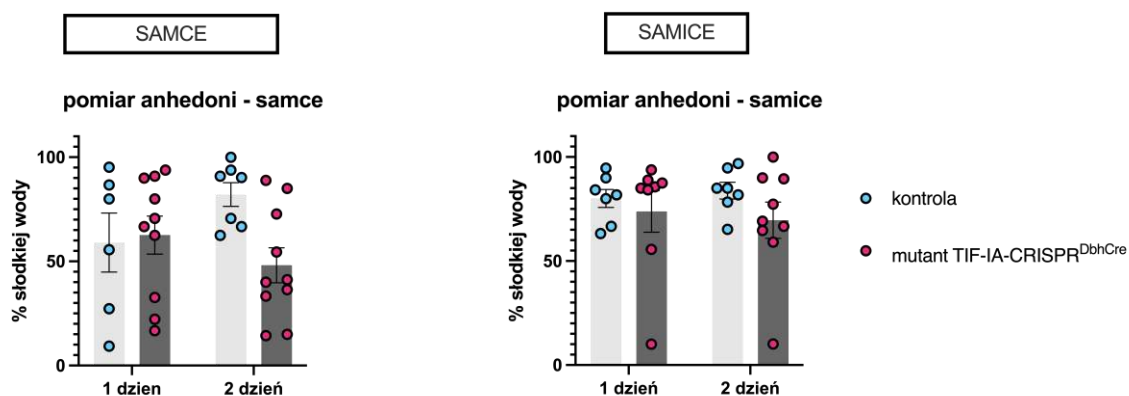
Ryc. 68. Wyniki testu jasnego/ciemnego pudełka (LDB) przeprowadzonego na samcach i samicach myszy TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} po 4 (a.) i 6 miesiącach (b.) od domózgowych podań wirusa. Wyniki przedstawiono jako średnią dla grup \pm SEM. N = 8-10. Do oceny istotności statystycznej wykorzystano test t-studenta.

Na wykresach (Ryc. 69) przedstawiono wynik testu podniesionego labiryntu krzyżowego (*Elevated Plus Maze*, EPM) w postaci czasu spędzonego w otwartym ramieniu oraz procentowego udziału wejść do otwartego ramienia aparatu. Zauważono, że w grupie samców genotyp nie ma wpływu na czas przebywania w otwartym ramieniu (test t-studenta, $t = 1,288$, $df = 14$, $p = 0,2185$), ani na liczbę wejść do otwartych ramion aparatu ($t = 0,41207$, $df = 14$, $p = 0,6875$). Samice o genotypie mutantka wykazywały znacząco krótszy czas przebywania w otwartym ramieniu aparatu (test Manna-Whitneya dla grup niezależnych, $U = 6$, $p = 0,0344$) oraz znacząco mniejszą liczbę wejść do otwartego ramienia aparatu ($U = 6$, $p = 0,0344$). Podsumowując, samice o genotypie mutantka wykazują się zwiększoną lękowością w porównaniu do myszy kontrolnych w teście podniesionego labiryntu krzyżowego.



Ryc. 69. Wyniki testu podniesionego labiryntu krzyżowego przeprowadzonego 6 miesiącach od domózwowych podań wirusa u myszy TIF-IA-CRISPR^{DbhCre}. Określono czas, który zwierzęta spędziły w otwartym ramieniu aparatu oraz procentowy udział wejść zwierzęcia do otwartego ramienia aparatu w stosunku do wszystkich wejść do ramion aparatu. (a.) dla samców (b.) dla samic. Wyniki przedstawiono jako średnią dla grup ± SEM, a punkty to wartości uzyskane przez pojedyncze osobniki. N = 6-8. Do oceny istotności statystycznej wykorzystano test t-studenta / Manna Whitney'a. Istotność statystyczna przedstawiona jako *. * p < 0,05

Aby zbadać zachowania mogące świadczyć o fenotypie depresyjnym zastosowano test preferencji sacharyny, czyli słodzika pozbawionego wartości odżywczych. Test ten pozwala zbadać zachowania mogące świadczyć o anhedonii, czyli niezdolności do odczuwania przyjemności. Przeprowadzono test w 6 miesiącu po stereotaktycznych podaniu wirusa i zainicjowaniu mutacji. Ani u samców (dwuczynnikowa ANOVA z powtórzonymi pomiarami: $F_{1,15} = 0,04188$, $p = 0,8406$), ani u samic ($F_{1,14} = 0,9482$, $p = 0,3467$) nie wykazano różnic między grupami doświadczalnymi w preferencji spożywania słodkiej wody w obu dniach trwania eksperymentu. U samców zwrócił uwagę fakt, że poszczególne osobniki miały dużą rozbieżność w preferencji picia cukrów, a średnia dobowa spożycia słodkiej wody oscylowała w granicach 50%. U samic pomiary były bardziej jednorodne, wykazujące wysoką średnią preferencję spożycia roztworu cukru (76,3%). Podsumowując, mutanty TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} nie miały obniżonej preferencji spożycia słodkiego napoju, zatem nie zaobserwowano zachowań mogących świadczyć o anhedonii.



Ryc. 70. Preferencja spożycia sacharyny w 6 miesiącu po operacjach wyrażona jako procent spożytej objętości 0,1% (waga/obj.) roztworu sacharyny wobec sumarycznej objętości spożytych płynów u samców (a.) i samic (b.) myszy TIF-IA-CRISPR^{DbhCre}. Wyniki przedstawiono jako średnią dla grup ± SEM. N = 6-10. Do oceny istotności statystycznej wykorzystano dwuczynnikową analizę wariancji z powtórzonymi pomiarami ANOVA.

4.4.2. Poszukiwanie zmian w funkcjonowaniu neuronów dopaminowych w SN/VTA w modelu TIF-IA-CRISPR^{DbhCre}

U podstaw niniejszej rozprawy doktorskiej leży hipoteza na temat wpływu dysfunkcji układu noradrenergicznego na funkcjonowanie układu dopaminowego, dlatego przy charakterystyce nowego modelu szczególną uwagę zwrócono na funkcjonowanie układu dopaminowego w rejonie SN/VTA. Po

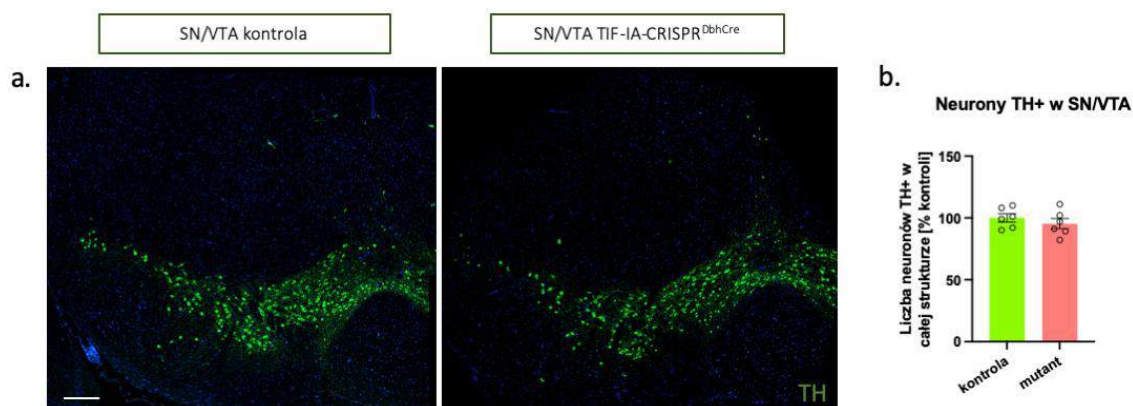
zakończeniu testów behawioralnych każda kohorta zwierząt (mutantów i kontroli) była poddawana dalszym analizom *ex vivo* na pobranym materiale z mózgów zwierząt. Wyjątek stanowi analiza spontanicznej aktywności neuronów SN/VTA wraz z pomiarem źrenicy oka, która wykonywana była na osobnej kohorcie zwierząt, przeznaczonej wyłącznie dla tych doświadczeń.



Ryc. 71. Schemat czasowy analizy markerów wczesnych zmian neurodegeneracyjnych neuronów dopaminowych w substancji czarnej i polu brzusznej nakrywki. Analiza wykonywana była w 6 miesiącu po indukcji mutacji.

4.4.2.1. Liczba neuronów dopaminowych w SN/VTA nie zmienia się pod wpływem mutacji w LC – analiza ilości neuronów TH+

Aby oszacować, czy mutacja prowadząca do dysregulacji LC i częściowej degeneracji będzie miała wpływ na liczbę neuronów w rejonie SN/VTA, wybarwiono skrawki pobrane od kontroli oraz mutantów w 6 miesiącu po indukcji mutacji. Stwierdzono, że genotyp myszy w 6 miesiącu po podaniach wirusa nie miał istotnego wpływu na liczbę neuronów dopaminowych w SN/VTA (test t-studenta, $t = 0,8719$, $df = 10$, $P = 0,4037$).



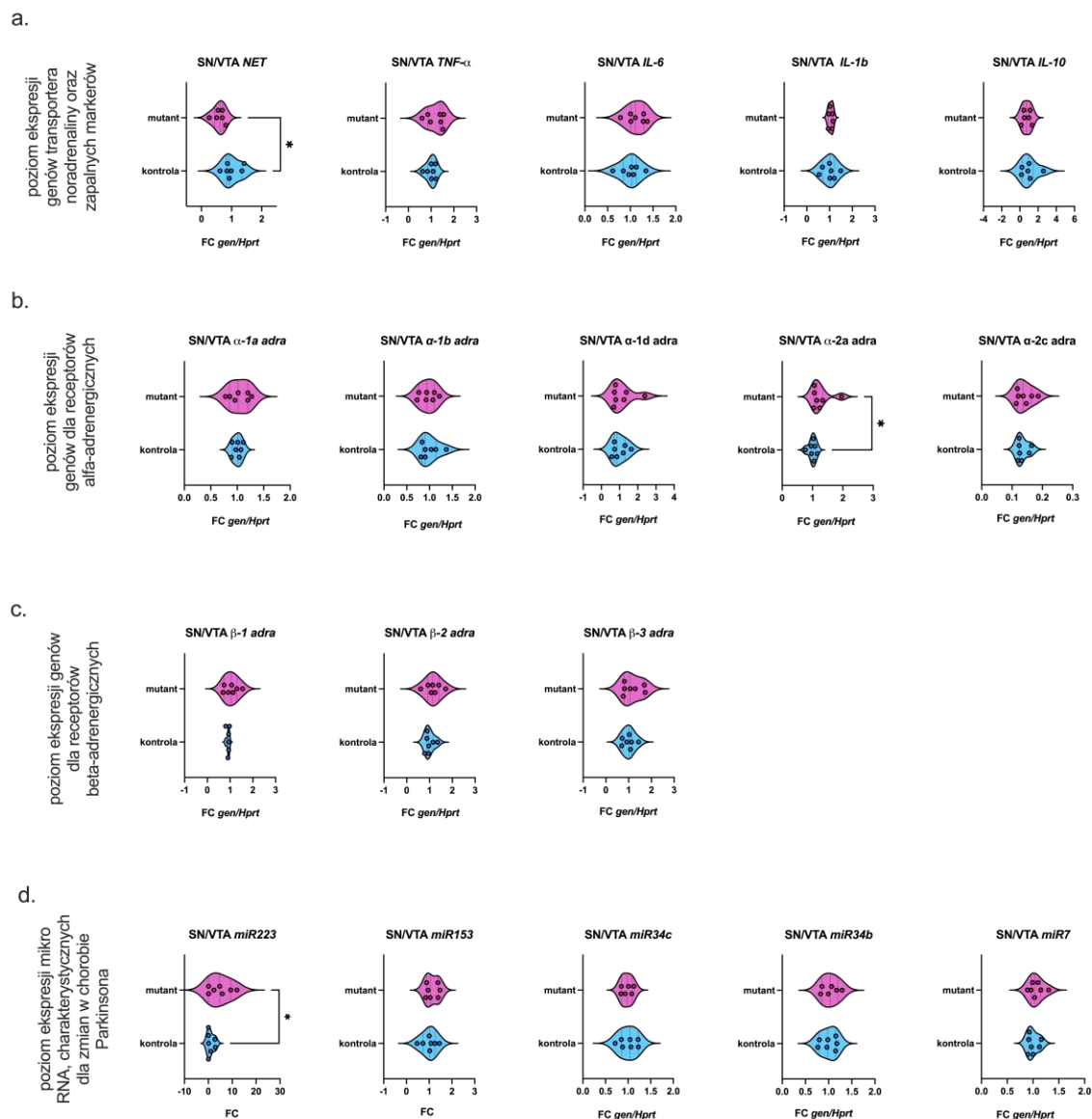
Ryc. 72. Zliczenie komórek TH-pozytywnych w SN/VTA myszy TIF-IA-CRISPR^{DhhCre} 6 miesięcy po podaniach wirusa. (a.) przekrój SN/VTA myszy kontrolnej; (b.) przekrój SN/VTA myszy o genotypie mutant; (c.) Wykres przedstawiający zliczenia neuronów dopaminowych. Wyniki przedstawiono jako średnią dla grup \pm SEM. $N = 6$. Do oceny istotności statystycznej wykorzystano test t-studenta. Skala 200 μ m.

4.4.2.2. Zmiany w ekspresji miR223 oraz genu kodującego receptor adrenergiczny α -2a u myszy z ubytkiem noradrenergicznym - analiza ekspresji genów w SN/VTA

SN/VTA pobrane zwierzętom 6 miesięcy po indukcji mutacji, analizowano pod kątem zmian ekspresji wybranych genów. Wykonano RT-qPCR sprawdzając, czy w tkance zmieni się ilość mRNA kodującego transporter noradrenaliny, który obficie występuje na zakończeniach neuronów noradrenergicznych i ciele komórki. Wykazano, że Średni poziom ekspresji mRNA transportera noradrenaliny (*Net*, *Slc6a2*) istotnie obniża się o 43,5 % ($t = 3,013$, $df = 11$, $p = 0,0118$) w grupie mutantów. Zmiany w ekspresji tego genu mogą bezpośrednio korelować z ilością zakończeń neuronów

noradrenergicznych. Nie wykazano zmian w średnim poziomie ekspresji genów kodujących TNF- α ($t = 1,174$, $df = 12$, $p = 0,2632$), ani najbardziej popularnych interleukin ($p < 0,05$). Zmierzono również ekspresję mRNA receptorów adrenergicznych α i β (Ryc. 73 b, c). Tylko w jednym przypadku, receptora α -2a adrenergicznego, który jest hamującym autoreceptorem, zmiany w ekspresji były istotnie statycznie ($U = 8$, $p = 0,0379$). Średni poziom ekspresji u mutantów jest podniesiony, natomiast analizując wyniki z pojedynczych osobników można zauważyć, że średnią znacząco podnosi jeden odstający wynik. W przypadku pozostałej ekspresji genów receptorów adrenergicznych, których zmiana nie była istotna statystycznie wartość p była wyższa niż $0,05$ ($p > 0,05$).

Wykonano również analizę wybranych miRNA, które są kojarzone jako wczesne markery PD (Cressatti et al., 2020; Wu et al., 2022). Dwie analizy ekspresji miRNA przeprowadzono przy użyciu testu *TaqMan Small RNA*, który opiera się na odwrotnej transkrypcji z docelowymi sondami Taqman MicroRNA (miR223 i 153). Pozostałe analizy mikro RNA: miR34b, miR34c i miR7 wykonano klasycznymi sondami Taqman oraz wykonano standaryzację na gen referencyjny. Wykazano, że poziom ekspresji miR223 u mutantów jest podniesiony 4,92 krotnie ($t = 2,190$, $df = 12$, $p = 0,0490$) w porównaniu do kontroli. Nie zanotowano zmian w ekspresji innych analizowanych miRNA ($p > 0,05$).

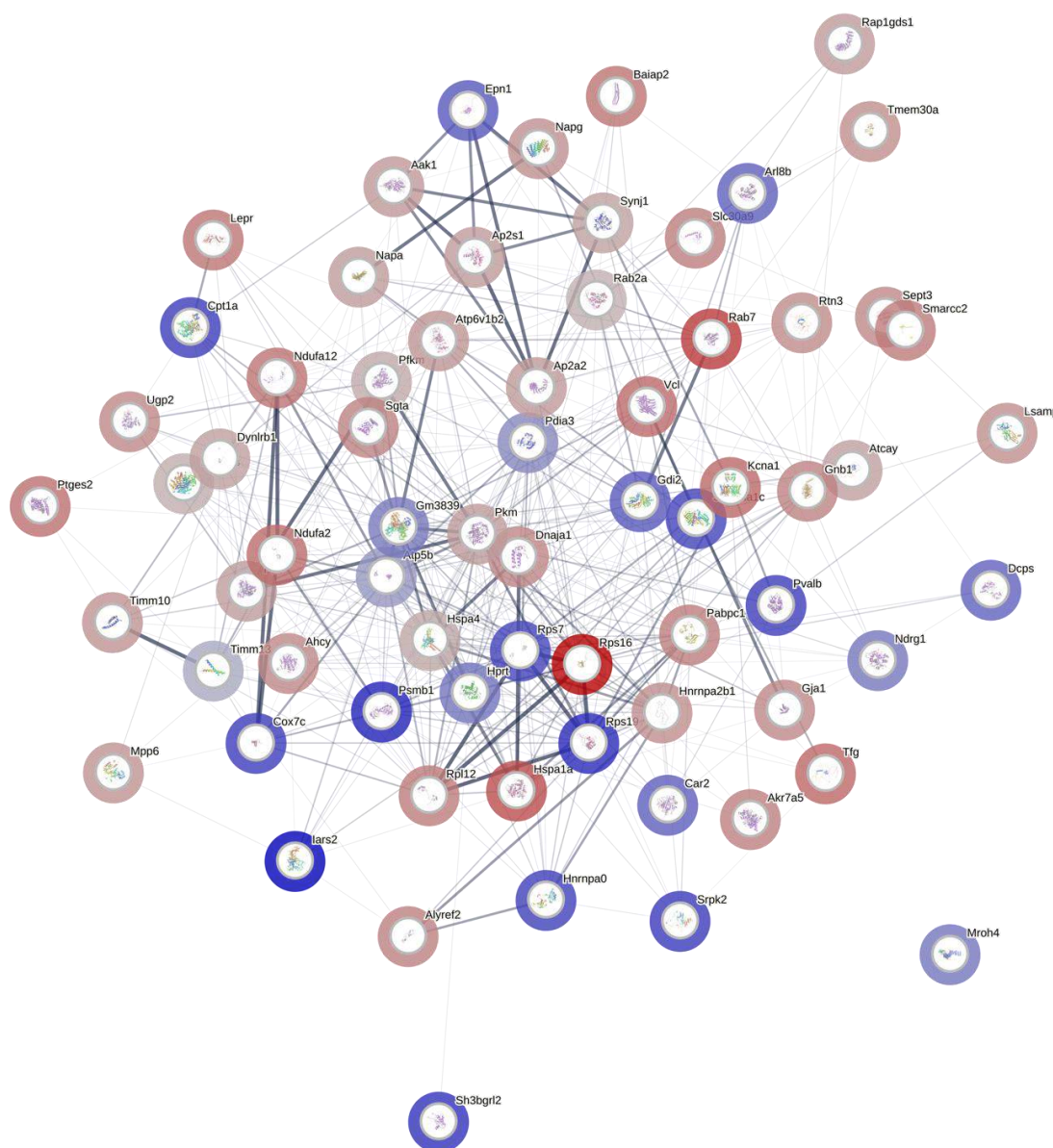


Ryc. 73. Analiza poziomu ekspresji mRNA SN/VTA 6 miesięcy po podaniach wirusa. (a.) markery zapalne i transporter noradrenaliny (b.) receptory α -adrenergiczne (c.) receptory β -adrenergiczne (d.) mikro RNA charakterystyczne w chorobie Parkinsona. *Slc6a2*, *Net* – Transporter noradrenaliny; *TNF α* – czynnik martwicy nowotworów; *IL-6* – Interleukina 6; *IL-1 β* – Interleukina 1 β ; *IL-10* – Interleukina 10; α -*adra* – receptory adrenergiczne α ; β -*adra*- receptory β adrenergiczne; *miR* – mikro RNA; Wyniki przedstawiono jako relatywny poziomu ekspresji genów, wraz z znaczoną medianą dla grup \pm SEM, znormalizowane względem poziomu ekspresji genu standaryzującego, *Hprt1*, w obu badanych grupach. FC – fold change, wartość wskazująca wielokrotność różnicy (\log_2) sygnałów fluorescencji pomiędzy transkryptomami grup badanych – kontroli i mutantów. Do oceny istotności statystycznej wykorzystano test t-studenta dla prób niezależnych. Istotność statystyczna przedstawiona jako *. * $p < 0,05$

4.4.2.3. Analiza proteomiczna w rejonie SN/VTA wskazuje na zaburzenia biologicznych procesów spowodowanych uszkodzeniem LC

Wykonano analizę proteomiczną na materiale wyizolowanym z rejonu SN/VTA, pobranym od zwierząt 6 miesięcy po indukcji mutacji. Analizę podzielono na dwie grupy, ze względu na płeć, w każdej grupie znajdowały się 4 zwierzęta (N = 4). Przeprowadzono złożoną analizę gnomocno-proteomiczną w programie String umożliwiającym pogrupowanie różnicujących się białek względem właściwości kodujących je genów i współzależnych procesów komórkowych. Przedstawiono listę 69 istotnych statystycznie, różnicujących się białek u samców, gdzie czerwona obwódka oznacza spadek

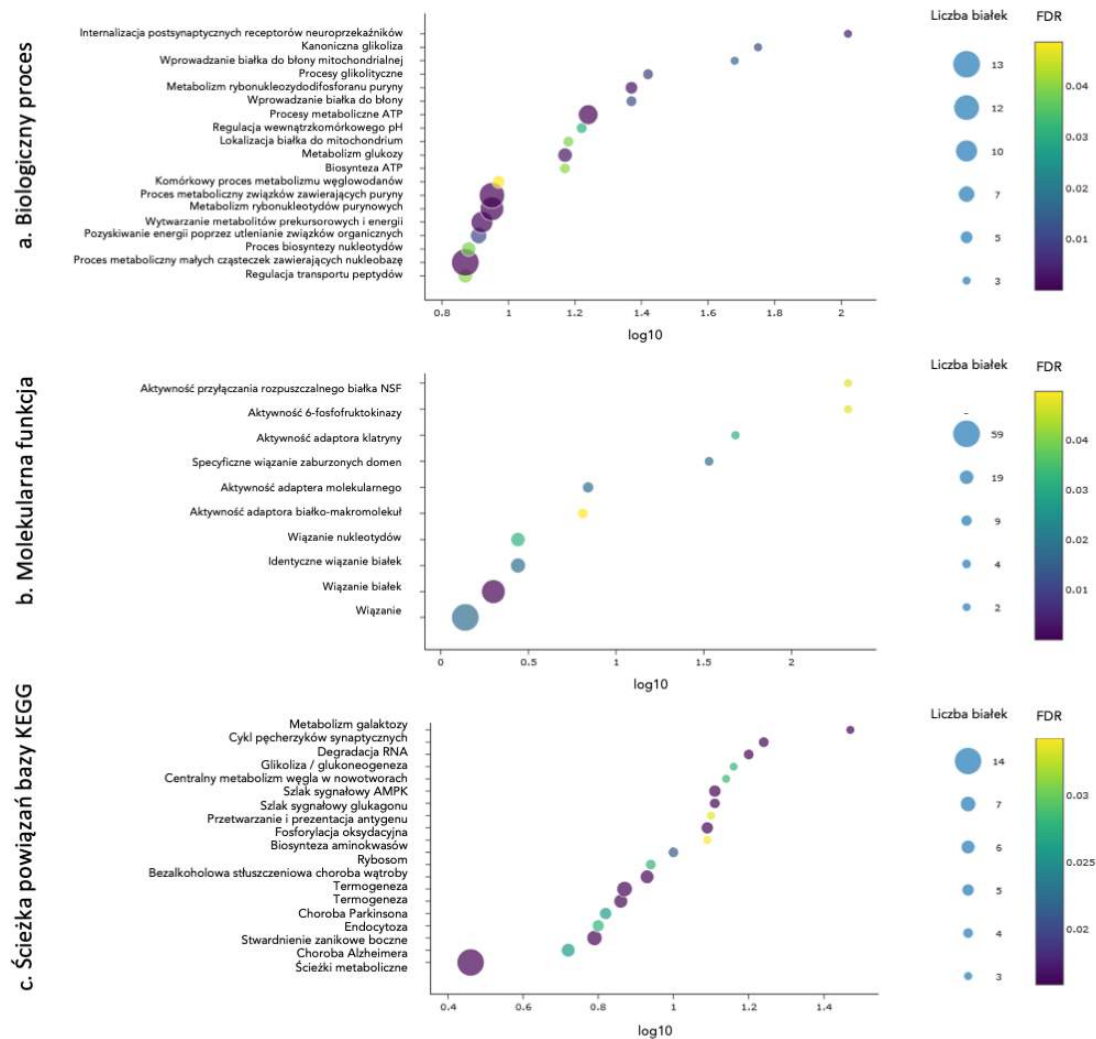
ilości badanego białka, a niebieska, wzrost (Ryc. 74). Połączenia między białkami oznaczają wzajemne korelacje. Im grubsze połączenie, tym większe powiązanie w regulowaniu danego procesu (m.in. wspólne funkcje, fizyczne wiązanie się białek). Wykazano, że zidentyfikowana grupa białek posiada istotne interakcje (491), pomiędzy zidentyfikowanymi białkami (69). Oznacza to, że białka wchodzą między sobą w więcej interakcji, niż można by się spodziewać po losowym zestawie białek o tej samej wielkości i stopnia rozkładu. Takie wzbogacenie wskazuje, że białka są przynajmniej częściowo połączone biologicznie jako grupa.



Ryc. 74. Podsumowanie sieci zidentyfikowanych białek odróżnicujących się od kontroli w SN/VTA u samców mutantów TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} w programie string. Spadek lub wzrost ilości białka oznaczone są kolorem obwódki – czerwone jako spadek ilości białka, a niebieskie jako wzrost, w porównaniu do grupy kontrolnej. Połączenia między białkami znaczą o wzajemnych powiązaniach, a im grubsza linia, tym większe dowody na wzajemne relacje (wskaźnik interakcji: 0,15).

Zidentyfikowane białka różnicujące wykorzystano do przeprowadzenia analizy ontologicznej w celu identyfikacji biologicznych procesów, funkcji molekularnej i komponenty komórkowej, a także określenie ścieżki powiązań z użyciem bazy KEGG (ang. *Kyoto Encyclopedies Of Genes and Genomes*) (Ryc. 75). U samców najbardziej zmieniającym się procesem biologicznym okazała się internalizacja postsynaptycznych receptorów neurotransmitterów ($\log_{10} = 2,02$ FDR 0,0034), kanoniczna glikoliza ($\log_{10} = 1,75$ FDR 0,0111) oraz proces wstawienia białka do błony mitochondrialnej ($\log_{10} = 1,68$ FDR 0,0151). Zidentyfikowane, różniące się białka mutantów TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} najistotniej brały

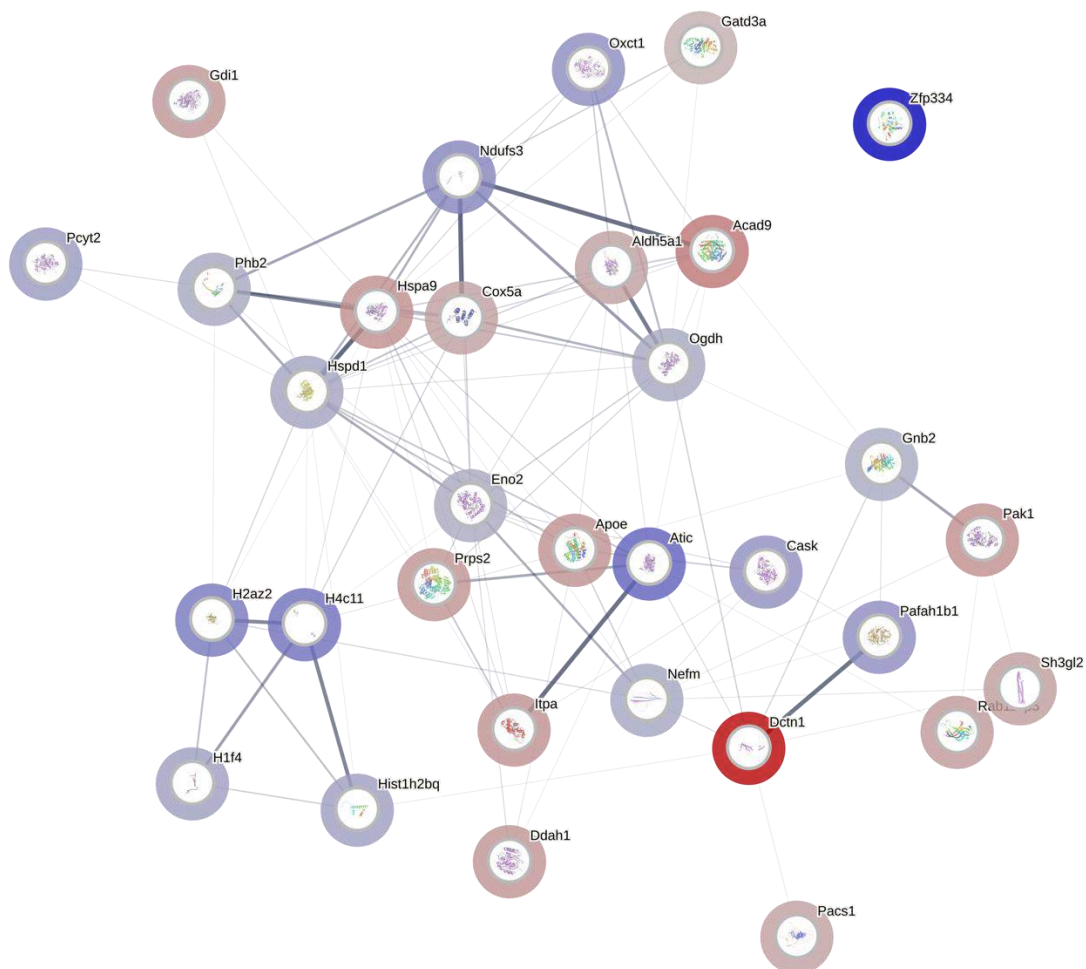
udział w takiej molekularnej funkcji jak: aktywność białek SNAP (ang. *Soluble N-ethylmaleimide-Sensitive Factor Attachment Proteins*), zaangażowanych w proces fuzji pęcherzyków do membrany, podczas transportu i egzocytozy ($\log_{10} = 2,32$ FDR 0,0476), aktywność 6-fosfofruktokinazy ($\log_{10} = 2,32$ FDR 0,0476), czyli regulacji glikolizy, czy aktywność białek adapterowych klatryny ($\log_{10} = 1,68$ FDR 0,0318), które są ważnymi elementami płaszcza klatrynowego zaangażowanego w procesy endocytozy. Powiązana z tymi procesami jest lokalizacja analizowanych białek w komponentie komórkowej. Podsumowując analiza proteomiczno-genomiczna sugeruje, że u samców TIF-IA-CRISPR^{DbhCre}, w SN/VTA występują rozregulowane procesy endocytozy komórkowej, jak i mitochondrialnej fuzji białek, a także procesów glikolizy. Dane z bazy KEGG również potwierdzają te spostrzeżenia oraz dodatkowo sugerując udział w zaburzeniach metabolizmu węglowodanów i degradacji RNA. Co ciekawe baza KEGG wskazuje na powiązania zidentyfikowanych przez nas białek do choroby Huntingtona, prionowej oraz Parkinsona.



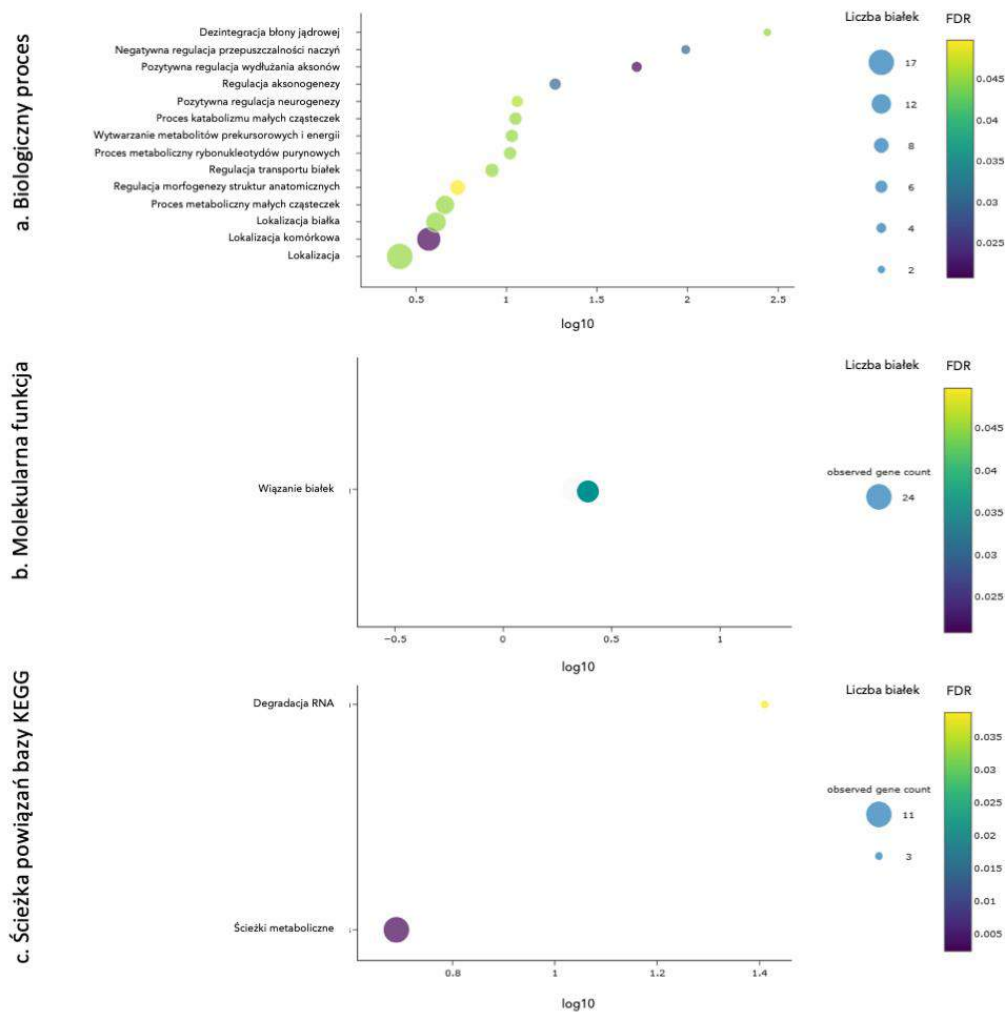
Ryc. 75. Analiza szlaków biologicznych i molekularnych funkcji ulegających zmianom w SN/VTA samców mutantów TIF-IA-CRISPR^{DbhCre}, u których częściowej degeneracji uległo miejsce sinawe. \log_{10} (białka zidentyfikowane/białka zaraportowane w danym komponentie); FDR (ang. *False Discovery Rate*) – istotność statystyczna, przedstawiona jako wartość p z poprawką Benjamini – Hochberga.

W grupie samic zidentyfikowano znacznie mniej białek (32), jednak udało się również przeprowadzić analizę ontologii ze względu na zidentyfikowaną zależność wielu białek od siebie (109 powiązań). Większość zidentyfikowanych białek (24) bierze udział w funkcji wiązania białek ($\log_{10} = 0,33$ FDR 0,0224). Zidentyfikowano, że istotnie analizowane białka zmieniające się w samicach mutantów TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} angażują się w dezintegrację błony jądrowej ($\log_{10} = 2,44$ FDR 0,045), a także w negatywną regulację przepuszczalności naczyniowej ($\log_{10} = 1,99$ FDR 0,0298) i

pozytywną regulację wydłużania aksonów ($\log_{10} = 1,72$ FDR 0,0208), regulację aksogenezy ($\log_{10} = 1,27$ FDR 0,0298) i neurogenezy ($\log_{10} = 1,06$ FDR 0,0464). Baza KEGG wskazuje na zaangażowanie zmienionych białek w degradację RNA ($\log_{10} = 1,41$ FDR 0,0387) i metabolizm ($\log_{10} = 0,69$ FDR 0,0023).



Ryc. 76. Podsumowanie sieci zidentyfikowanych białek różniących się od kontroli w SN/VTA u samic mutantów TIF-IA-CRISPR^{D^{bh}Cre} w programie string. Spadek lub wzrost ilości białka oznaczone są kolorem obwódki – czerwone jako spadek ilości białka, a niebieskie jako wzrost, w porównaniu do grupy kontrolnej. Połączenia między białkami znaczą o wzajemnych powiązaniach, a im grubsza linia, tym większe dowody na wzajemne relacje (wskaźnik interakcji: 0,15).



Ryc. 77. Analiza szlaków biologicznych i molekularnych funkcji ulegających zmianom w SN/VTA samic mutantów TIF-IA-CRISPR^{DbhCre}, u których częściowej degeneracji uległo miejsce sinawe. log₁₀ (białka zidentyfikowane/białka zareportowane w danym komponencie); FDR (ang. *False Discovery Rate*) – istotność statystyczna, przedstawiona jako wartość p z poprawką Benjamini – Hochberga.

4.4.2.4. Dysfunkcja neuronów noradrenergicznych w miejscu sinawym wywołuje zmiany proteomiczne w SN/VTA myszy TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} dotykające różnych szlaków biologicznych

Aktywność neuronalna jest kluczowa dla utrzymywania funkcjonalnej organizacji działania mózgu, a zaburzenia tej aktywności są skorelowane z różnymi występującymi neuropatologiami. Wiadomo między innymi, że w chorobie Parkinsona przeżywające neurony dopaminowe w SN/VTA wykazują zmieniony wzorzec aktywności erupcyjnej. Stąd dodatkowym pomysłem, uzupełniającym badania przeprowadzone w Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja PAN, było przeznaczenie osobnej kohorty zwierząt (N = 12, samce) do wykonania podstawowej analizy elektrofizjologicznej neuronów dopaminowych we współpracy z grupą dr hab. Tomasza Błasiaka z Zakładu Neurobiologii i Chronobiologii, Instytutu Zoologii, Uniwersytetu Jagiellońskiego. Przy okazji, wykorzystano pomysł, który pojawił się podczas wspólnego seminarium, na rejestrację źrenicy oka zwierząt, jako dodatkowego markera degeneracji LC.

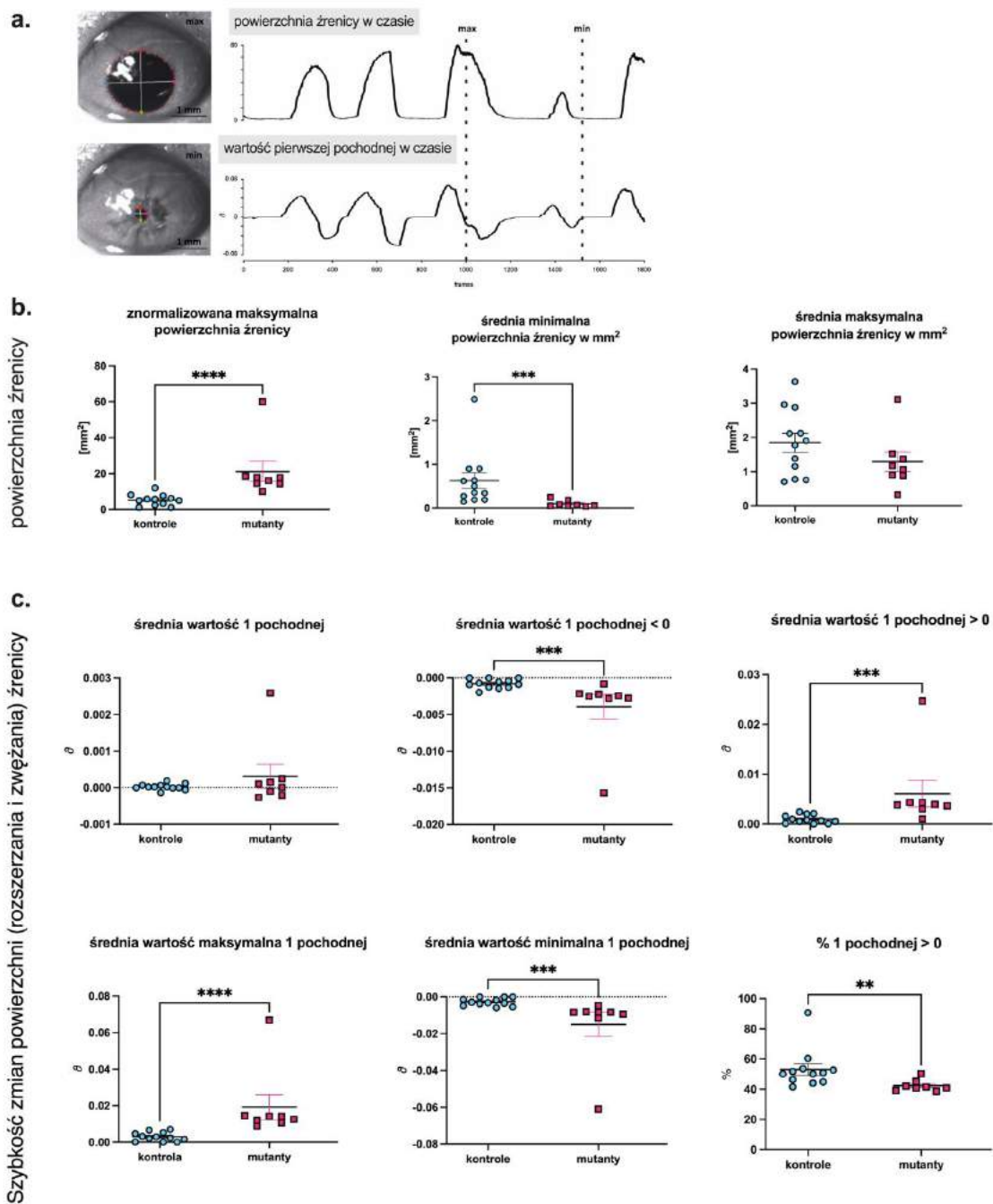
Analiza spontanicznej aktywności neuronów dopaminowych umożliwiła określenie zmian elektrofizjologicznych, które mogą mieć bezpośrednią przyczynę w zaburzeniach prawidłowego

działania układu noradrenergicznego. Dodatkowa analiza źrenicy oka u zwierząt pokazała bardzo dobrą korelację ze stopniem uszkodzenia układu noradrenergicznego.

4.4.2.5. Pupilometria: analiza źrenic oka myszy jako etap diagnostyczny w ocenie funkcjonowania neuronów noradrenergicznych w miejscu sinawym

Pomiary źrenicy oka i elektrofizjologiczne wykonywane były przez dr Magdalenę Walczak oraz dr Tomasza Pradela w Zakładzie Neurobiologii i Chronobiologii, Instytutu Zoologii, Uniwersytetu Jagiellońskiego kierowanego przez prof. dr hab. Tomasza Błasiaka.

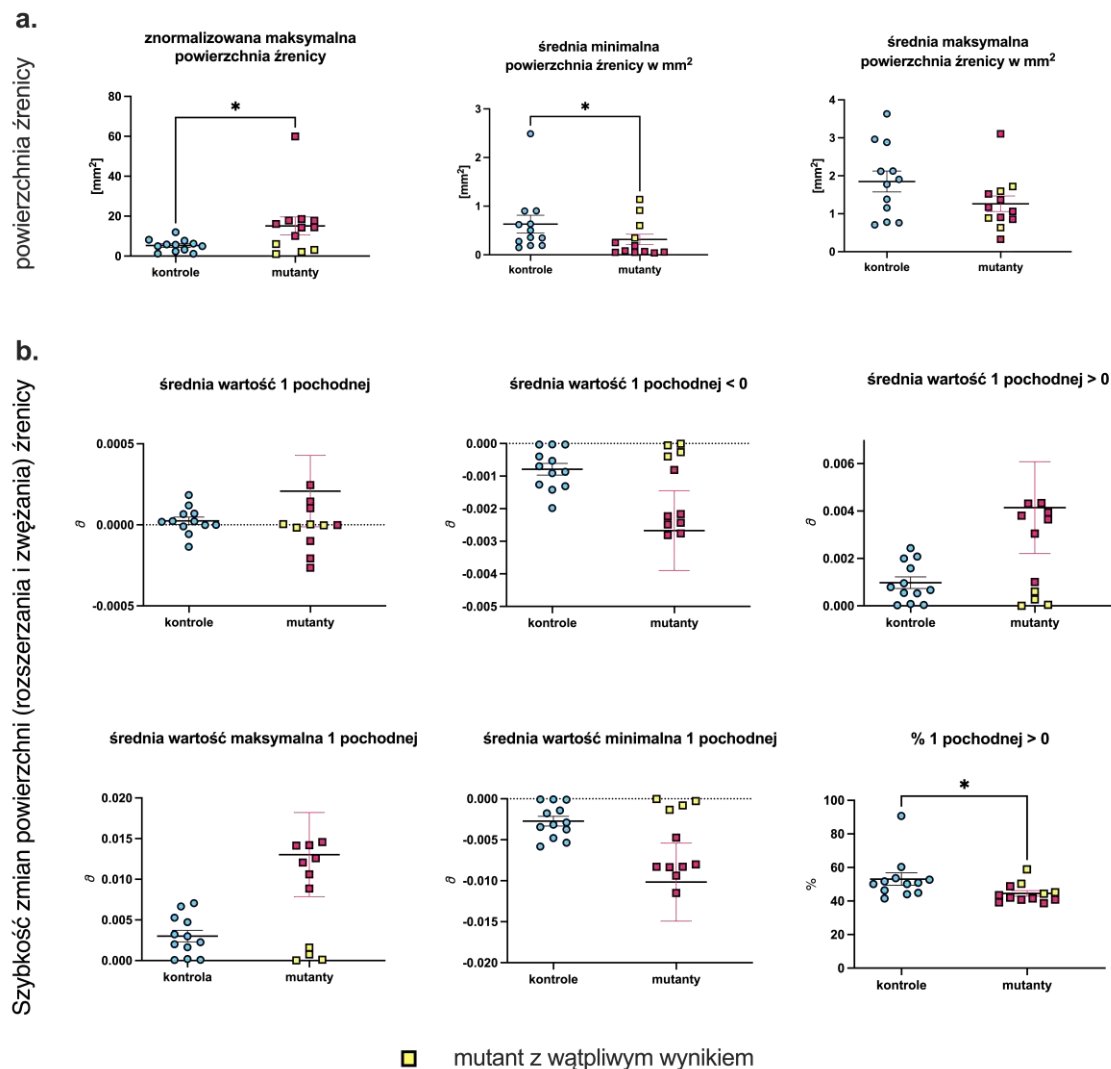
Zmiany w stanie kory mózgowej i źrenicy oka mogą być powiązane ze zmianami w sygnalizacji neuromodulacyjnej, zwłaszcza pochodzącej z układu noradrenergicznego. Na podstawie powiązania aktywacji LC na różne stymulanty wraz ze zmianami w średnicy źrenicy, sugeruje się, że zmiany w średnicy źrenicy oka mogą bezpośrednio korelować ze zmianami aktywności LC. Dlatego przed rozpoczęciem operacji i pomiarem elektrofizjologicznym neuronów, średnica źrenicy myszy została nagrana przez okres 10 minut, a ich tempo rozszerzania i zwężania zostało obliczone przy pomocy przekształceń pierwszej pochodnej. Podczas analizy grupy mutantów TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} stwierdzono, że 4 z 12 osobników charakteryzują się znacznymi odchyleniami w pomiarach i są na poziomie kontroli. Po uśmierceniu zwierząt, zliczono neurony w LC a wykonana analiza pokazała, że wytypowane osobniki mają liczbę neuronów na poziomie kontroli. Dlatego tych zwierząt nie uwzględniono w następnych eksperymentach elektrofizjologicznych. Analiza pupilometryczna dostarczyła dodatkowych, cennych dowodów, że ogólna skuteczność prawidłowo podanego wektora LV do LC jest na poziomie 66 %, co może wpływać na niższe niż oczekiwane po badaniach z użyciem modelu TIF-IA^{DbhCre} efekty mutacji. Wyniki pomiarów źrenicy myszy przedstawiono na rycinie Ryc. 78, natomiast wybrane parametry z uwzględnieniem odrzuconych osobników, u których nie doszło do wywołania somatycznej transgenezy, na kolejnej rycinie Ryc. 79. Wykazano zmiany w średniej powierzchni źrenicy mutantów, w porównaniu do kontroli (Ryc. 78 b.). Mutanty charakteryzują się podwyższonym parametrem znormalizowanej maksymalnej powierzchni źrenicy (kontrola: 5,291 mm², mutanty 21,13 mm², test Manna-Whitneya, U = 1, p < 0,0001). Normalizacja wykonywana była do minimalnej wartości rozwarcia źrenicy w danym nagraniu (średnica minimalnego rozwarcia = 1). Średnia minimalna powierzchnia źrenicy w mm² jest 6,4-krotnie mniejsza u myszy o genotypie mutantu (U = 4, p = 0,0002), w porównaniu do kontroli. Różnice między grupami widoczne również są w szybkości zmian powierzchni źrenicy. Średnia szybkość zmiany powierzchni źrenicy nie wykazuje istotnych zmian między grupami (U = 45, p = 0,8506), ale średnia szybkość zwężania (U = 6, p = 0,0005) i rozszerzania (U = 4, p = 0,0002) powierzchni źrenicy, istotnie różnicują mutanty od kontroli. Istotne różnice obserwujemy również w średniej wielkości największego rozszerzania źrenicy (U = 0, p < 0,0001) oraz średniej wielkości największego zmniejszenia źrenicy (U = 3, p = 0,0001). Równie istotną statystycznie zmianę zaobserwowano dla łącznego czasu zwiększania powierzchni źrenicy. Dla grupy kontrolnej czas ten mieścił się w przedziale od 41.53% do 90.72% z medianą na poziomie 50.52%, a dla grupy mutantów czas mieścił się w przedziale od 38.69% do 50.27% z medianą na poziomie 41.21% (U = 11, p = 0,003).



Ryc. 78. Analiza źrenicy oka. (a.) Przykładowe zdjęcie pomiarów wraz z przykładowym wykresem zapisującym parametry źrenicy oka. (b) wykresy przedstawiające pomiary źrenicy oka: znormalizowana maksymalna powierzchnia źrenicy oka (średnica minimalnego rozwarcia = 1) oraz średnia minimalna i maksymalna powierzchnia źrenicy na mm^2 . (c.) wykresy przedstawiające szybkość zmiany powierzchni źrenicy: Średnia szybkość zmiany powierzchni źrenicy wyrażona jako średnia wartość 1 pochodnej; średnia szybkość zężenia i rozszerzania źrenicy wyrażone jako średnie wartości 1 pochodnej < 0 oraz > 0 ; średnia wielkość największego rozszerzania źrenicy wyrażona jako średnia wartość maksymalna 1 pochodnej; średnia wielkość największego zężenia źrenicy wyrażona jako średnia wartość minimalna 1 pochodnej; łączny czas zwiększania powierzchni źrenicy wyrażona jako % 1 pochodnej > 0 . Do oceny istotności statystycznej wykorzystano test Manna-Whitneya dla prób niezależnych. $N = 12$. Istotność statystyczna przedstawiona jako *. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

W przypadku analizy tych samych danych, ale z uwzględnieniem wątpliwych mutantów zmiany w średniej powierzchni źrenicy oka nadal pozostają istotne. Znormalizowana maksymalna powierzchnia źrenicy jest większa u mutantów ($15,11 \text{ mm}^2$), w porównaniu do kontroli ($5,291 \text{ mm}^2$) ($U = 36$, $p = 0,0387$). Również średnia minimalna powierzchnia źrenicy w mm^2 jest 2-krotnie mniejsza u myszy o genotypie mutantu ($U = 37$, $p = 0,0449$), w porównaniu do kontroli. Uwzględnienie

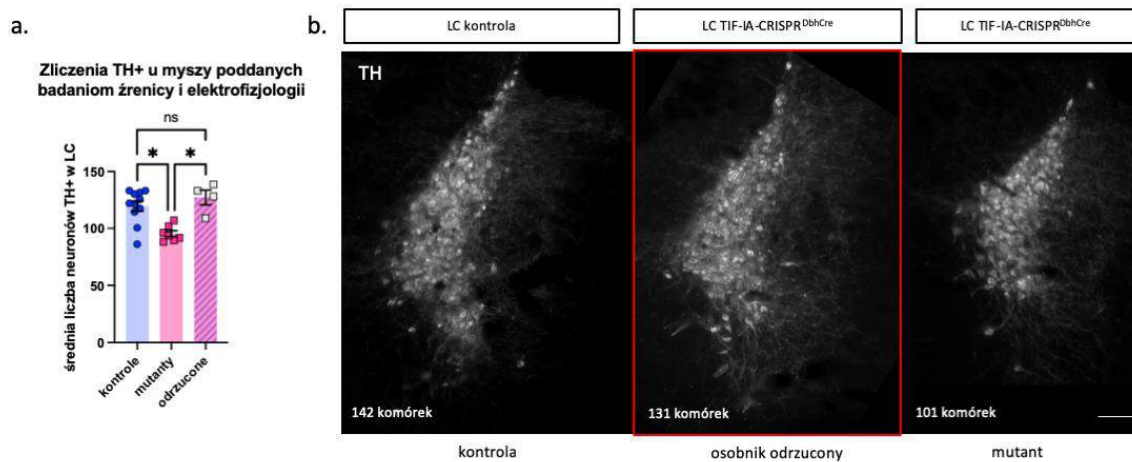
wątpliwych wyników powoduje brak istotności w średniej szybkości rozszerzania i zwężania powierzchni żrenicy. Średnia szybkość zwężania ($U = 45$, $p = 0,1217$) i rozszerzania ($U = 42$, $p = 0,0887$) powierzchni żrenicy nie różnicują mutantów od kontroli. W tych wypadkach 4 wątpliwe wyniki pojedynczych osobników wyraźnie odstają od reszty grupy (kwadraty oznaczone żółtym kolorem). Z uwzględnieniem wątpliwych wyników istotną statystycznie zmianę obserwowano także dla łącznego czasu zwiększania powierzchni żrenicy. Dla grupy kontrolnej czas ten mieścił się w przedziale od 41.53% do 90.72% z medianą na poziomie 50.52%, a dla grupy mutantów czas mieścił się w przedziale od 38.69% do 58.84% z medianą na poziomie 42.75% ($U = 28$, $p = 0,01$), czyli łączny czas zwiększania powierzchni żrenicy dla grupy mutantów z uwzględnieniem wątpliwych wyników był podwyższony.



Ryc. 79. Analiza żrenicy oka z uwzględnieniem wątpliwych mutantów. (a.) wykresy przedstawiające pomiary żrenicy oka: zmormalizowana maksymalna powierzchnia żrenicy oka (średnica minimalnego rozwarcia = 1) oraz średnia minimalna i maksymalna powierzchnia żrenicy na mm². (b.) wykresy przedstawiające szybkość zmiany powierzchni żrenicy: Średnia szybkość zmiany powierzchni żrenicy wyrażona jako średnia wartość 1 pochodnej; średnia szybkość zwężania i rozszerzania średnicy wyrażone jako średnie wartości 1 pochodnej < 0 oraz > 0; średnia wielkość największego rozszerzania żrenicy wyrażona jako średnia wartość maksymalna 1 pochodnej; średnia wielkość największego zwężania żrenicy wyrażona jako średnia wartość minimalna 1 pochodnej; łączny czas zwiększania powierzchni żrenicy wyrażona jako % 1 pochodnej > 0. Do oceny istotności statystycznej wykorzystano test Manna-Whitneya dla prób niezależnych. $N = 12$. Istotność statystyczna przedstawiona jako *. * $p < 0,01$

Aby dokonać weryfikacji odrzuconych osobników, po zapisie elektrofizjologicznym zostały pobrane mózgi w celu zobrazowania miejsca sinawego. Z każdego osobnika zostało wybrane największe skupisko neuronów noradrenergicznych w miejscu sinawym, które zostało zliczone.

Podczas analizy odrzucono dwa osobniki, których barwienie nie pozwalało na bezbłędną interpretację liczby komórek. W celu porównania ilości komórek noradrenergicznych między trzema grupami (kontrola, mutanty oraz odrzucone z analizy mutanty) zastosowano test Kruskala-Wallisa i wykazano, że różnica przynajmniej jednej z grup jest istotna statystycznie ($H = 10,30$, $p = 0,0019$). Analiza post-hoc Dunn'a potwierdziła, że mutanty istotnie różnią się ilością zliczonych neuronów od kontroli (mediana kontroli 122, mutantów 93,5, $p = 0,0276$). Wyniki z odrzuconych z analizy mutantów, z medianą na poziomie 130,5 również istotnie odróżniają grupę od grupy mutantów ($p = 0,0119$). Brak różnic zanotowano między grupą kontrolną i grupą odrzuconych mutantów, u których nie doszło do uszkodzenia LC ($p > 0,05$). Na podstawie tych obliczeń stwierdzono, że grupa odrzuconych myszy z pomiaru jest grupą osobników, w których mutacja zakończyła się niepowodzeniem (np. z powodu nieprawidłowego trafienia wektorem LV w docelową strukturę podczas podań stereotaktycznych).



Ryc. 80. Zliczenie neuronów TH pozytywnych w LC zwierząt TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} z eksperymentu elektrofizjologicznego. (a.) Zliczenia ilości komórek TH+ w miejscu sinawym przedstawione jako średnia komórek TH+ z obu stron mózgu z przekroju największego skupienia neuronów LC; Wyniki przedstawiono jako średnią dla grup \pm SEM. (b) Reprezentatywne zdjęcie zliczanego przekroju LC, kontroli, mutantów odrzuconych z analizy oraz mutantów. Do oceny istotności statystycznej wykorzystano jednoczynnikową analizę wariancji Kruskala-Wallisa dla prób niezależnych z testem post-hoc Dunn'a. $N = 11/7/4$. Istotność statystyczna przedstawiona jako *. * $p < 0,05$. Skala 100 μ m.

4.4.2.6. Degeneracja miejsca sinawego wpływa na wybrane właściwości elektrofizjologiczne neuronów dopaminowych w SN/VTA

Celem badań elektrofizjologicznych było rozpoznanie różnic między grupą kontrolną, a grupą zwierząt o genotypie mutantu w zarejestrowanych spontanicznych parametrach odpowiedzi komórek dopaminowych z rejonu SN/VTA, podczas cyklicznie zmieniających się stanów mózgowia u myszy będących pod narkozą uretanową. Przeprowadzono rejestrację spontanicznej aktywności elektrycznej neuronów dopaminowych w SN/VTA, przy jednoczesnym monitoringu zmian stanu mózgowia poprzez zapis EEG. Aktywność zarejestrowanych komórek była analizowana w celu określenia ich fenotypu (Ungless & Grace, 2012) oraz w celu odróżnienia neuronów dopaminowych od GABAergicznych. Za kryterium przyjęty został parametr szerokości generowanego potencjału czynnościowego (Walczak & Błasiak, 2017). Zarejestrowano i przeanalizowano następujące elektrofizjologiczne właściwości neuronów VTA (w większości zarejestrowanych neuronów) i SN: liczba potencjałów czynnościowych (AP) generowanych na sekundę, szerokość generowanego potencjału, miara regularności generowania potencjałów czynnościowych, poziom aktywności erupcyjnej oraz cechy aktywności erupcyjnej (% AP, częstotliwość oraz ilość potencjałów w paczce erupcji, długość paczek iskrzenia, długość interwałów czasowych pomiędzy paczkami iskrzenia) (Ryc. 81).

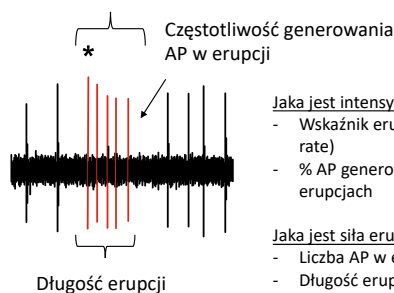
Analiza aktywności spontanicznej:



- Poziom aktywności (liczba generowanych potencjałów czynnościowych na sekundę)
- CV – miara regularności generowania potencjałów czynnościowych
- Szerokość generowanego potencjału czynnościowego (kryterium odróżniające neurony DA od GABAergicznym w VTA i SNC)

Analiza wzorca aktywności:

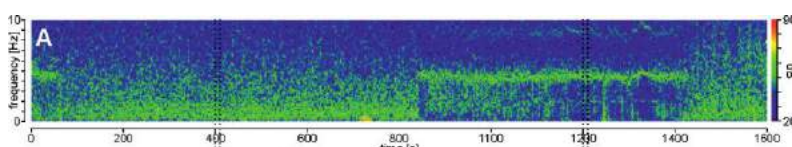
Liczba potencjałów czynnościowych (AP) w erupcji



- Jaka jest intensywność erupcji:
- Wskaźnik erupcji (ang. Bursting rate)
 - % AP generowanych w erupcjach
- Jaka jest siła erupcji:
- Liczba AP w erupcji
 - Długość erupcji
 - Częstotliwość generowania AP w erupcji

Analiza w dwóch stanach mózgowia:

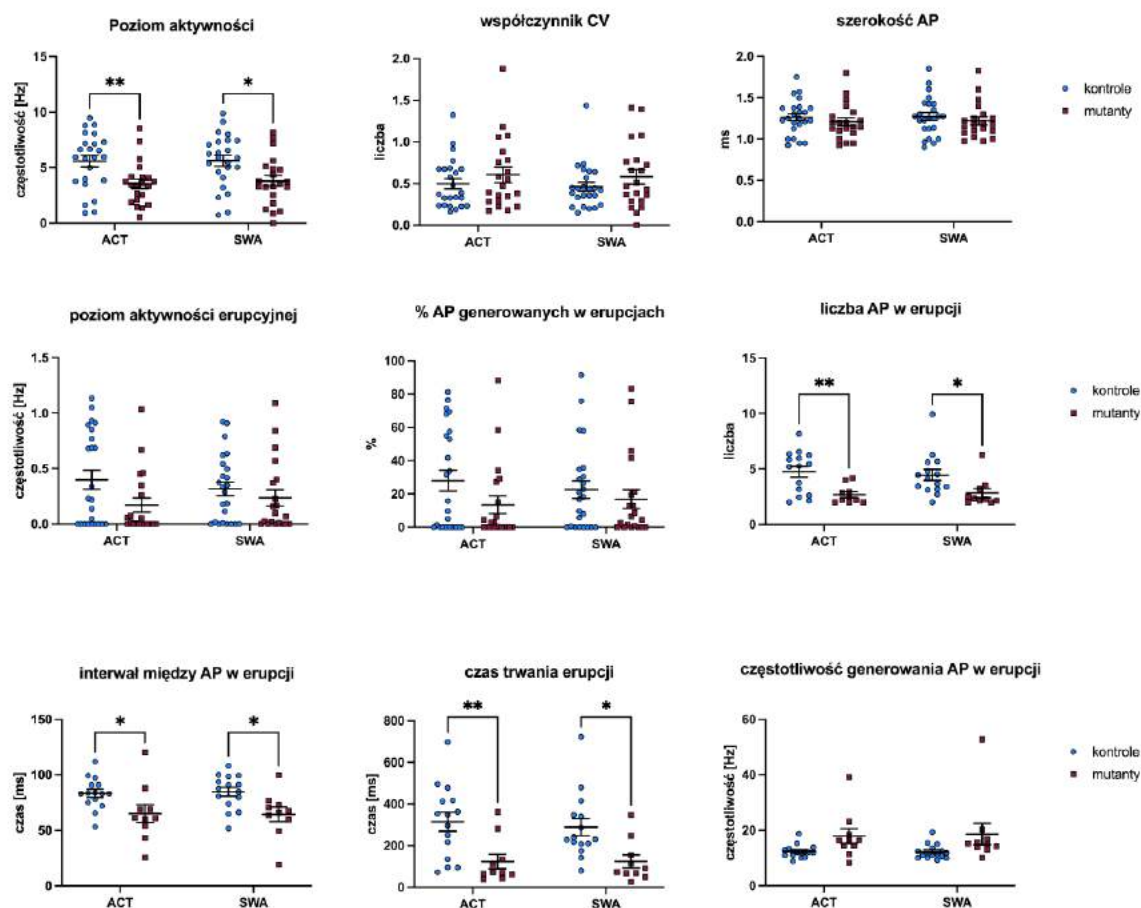
- Aktywacji korowej (ACT) oraz
- Deaktywacji korowej (SWA)



Ryc. 81. Analizowane w eksperymencie parametry elektrofizjologiczne neuronów dopaminowych substancji czarnej i pola brzusznej nakrywki (SN/VTA) 6 miesięcy po podaniach wirusa. Grafika opracowana przez dr Magdalenę Walczak.

Pomiary elektrofizjologiczne zarejestrowano w grupie 20 zwierząt, w tym 12 kontroli i 8 mutantów, zaraz po nagraniach źrenicy oka. Neurony były klasyfikowane jako dopaminowe, kiedy spełniały założone kryteria szerokości generowanego potencjału czynnościowego. W dokonanych pomiarach na Ryc. 82 przedstawiano te pomiary, pokazując, że analizowane neurony miały podobne szerokości AP ($p > 0,05$). Pomiary sklasyfikowano w zależności od aktualnego stanu mózgowia – do aktywacji korowej (ACT) oraz deaktywacji korowej (SWA). Neurony dopaminowe kontrolnych zwierząt wykazywały spontaniczny poziom aktywności (czyli liczbę generowanych potencjałów czynnościowych na sekundę) istotnie wyższy w obu stanach mózgowia w porównaniu do myszy o genotypie mutantu (dwuczynnikowa ANOVA z powtórzonymi pomiarami: $F_{1,43} = 8,839$, $p = 0,0048$). W ACT neurony dopaminowe zwierząt kontrolnych ($5,574 \text{ Hz} \pm 0,495$) w porównaniu do mutantów ($3,545 \text{ Hz} \pm 0,426$) wykazywały 1,57 krotnie wyższy poziom aktywności (test post-hoc Šidáka, $p = 0,0080$). Podobnie w stanie SWA, poziom aktywności neuronów dopaminowych kontroli, w porównaniu do mutantów był istotnie podwyższony ($5,612 \text{ Hz} \pm 0,47$ do $3,782 \text{ Hz} \pm 0,482$, $p = 0,018$). Pomiary w obu grupach zwierząt były na podobnym poziomie w dwóch stanach mózgowia (dwuczynnikowa ANOVA z powtórzonymi pomiarami: $F_{1,43} = 0,3916$, $p = 0,5348$). W pomiarach CV (ang. *Coefficient of Variation*), czyli mierze regularności generowania potencjałów czynnościowych genotyp nie miał istotnego wpływu na zmiany parametrów ($p = 0,2498$). Genotyp nie miał również istotnego wpływu w takich parametrach wzorca aktywności erupcyjnej jak poziom aktywności erupcyjnej ($p = 0,1070$), % AP w erupcji ($p = 0,1862$), czy częstotliwość generowania potencjałów w paczce erupcji ($p = 0,0398$, test post-hoc Šidáka, skorygowane p dla ACT: $p = 0,1079$, dla SWA: $p = 0,054$). Natomiast, średnia liczba AP w erupcji istotnie różni się w zależności od genotypu ($F_{1,23} = 10,43$, $p = 0,0037$). W ACT dopaminowe neurony myszy kontrolnych wykazują istotnie podwyższoną średnią liczbę AP w erupcji w porównaniu do mutantów ($4,743 \pm 0,493$, do $2,681 \pm 0,259$, test post-hoc Šidáka, $p = 0,0071$). W SWA otrzymano podobny rezultat, istotną statystycznie różnicę między grupami ($4,461 \pm 0,497$, do $2,834 \pm 0,413$, test post-hoc Šidáka, $p = 0,0381$). Długość interwałów czasowych pomiędzy paczkami iskrzenia wskazuje, że paczki potencjałów w neuronach dopaminowych mutantów TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} generowane są w krótszym odstępie czasu niż kontroli ($F_{1,23} = 6,840$, $p = 0,0155$), w obu stanach mózgowia, ACT (test post-hoc Šidáka, $p = 0,04$) oraz SWA (test post-hoc Šidáka, $p = 0,0201$). Również czas trwania erupcji w neuronach dopaminowych mutantów jest istotnie krótszy w porównaniu do kontroli ($F_{1,23} = 12,12$, $p = 0,002$), w obu stanach mózgowia. W ACT czas trwania paczek erupcji jest 2,56 krotnie krótszy u mutantów (kontrola: $315,108 \text{ ms} \pm 45,4$, mutanty:

123,408 ms \pm 34,699, test post-hoc Šídáka, $p = 0,0048$), a SWA jest krótszy o 163,25 ms (kontrola: 288,296 ms \pm 40,937, mutant: 124,039 ms \pm 31,88, $p = 0,0169$). Uzyskane wyniki pozwalają na wyciągnięcie wniosków, iż aktywność elektrofizjologiczna neuronów dopaminowych samców mutantów TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} jest zmieniona w porównaniu do grupy kontrolnej. Neurony dopaminowe zwierząt o genotypie mutantu wykazują obniżony spontaniczny poziom aktywności, a także charakteryzują się zmienionym wzorcem aktywności erupcyjnej. Paczki potencjałów w neuronach dopaminowych SN/VTA mutantów mają krótszy czas trwania erupcji oraz generowane są w krótkim odstępie czasu.

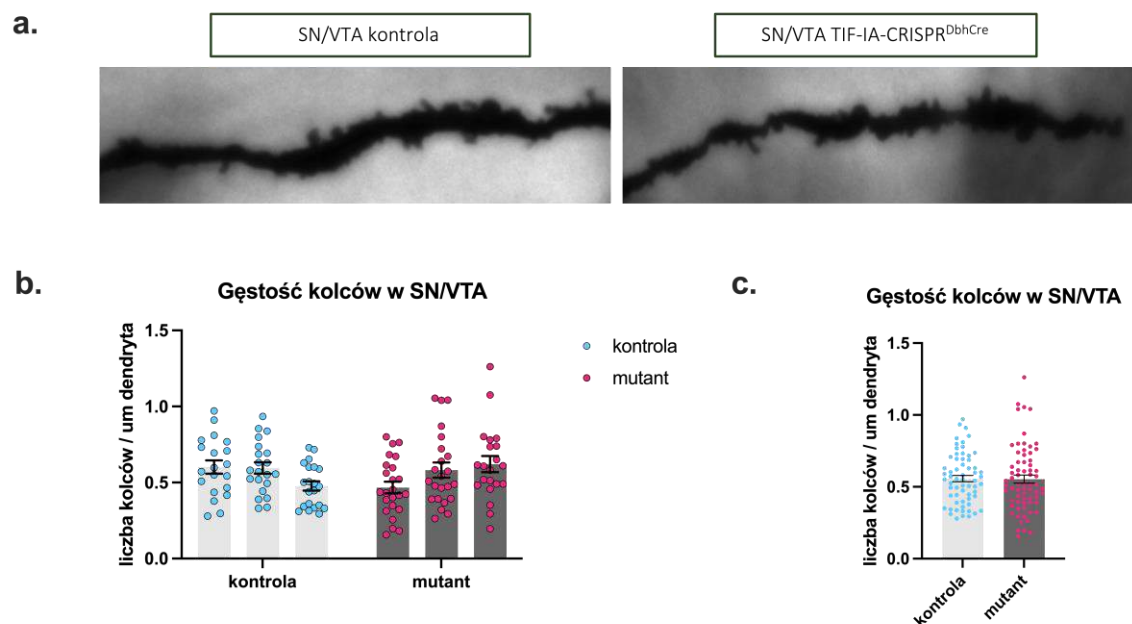


Ryc. 82. Analiza elektrofizjologiczna neuronów w VTA i SN myszy z częściową degeneracją LC, 6 miesięcy po domózgowych podaniach wirusa. Do oceny istotności statystycznej wykorzystano dwuczynnikową analizę wariancji z powtórzonymi pomiarami ANOVA, uzupełnioną testem post-hoc Šídáka w przypadku istotności interakcji dwóch zmiennych. $N = 12/8$. Istotność statystyczna przedstawiona jako *. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

4.4.2.7. Obserwowane zmiany elektrofizjologiczne nie są wynikiem zaburzeń w gęstości kolców dendrytycznych

Właściwości elektrofizjologiczne komórek nerwowych są ściśle powiązane z procesami plastyczności zachodzącymi na synapsach. Dlatego też, postanowiono sprawdzić czy obserwowane zaburzenia elektrofizjologiczne neuronów SN/VTA mają powiązanie ze zmianami w morfologii kolców dendrytycznych. Analizie poddano po 3 osobniki na grupę (samce), dlatego mniejszą ilość zwierząt próbowano zrekompenzować dodatkową analizą dendrytów. Po wybarwieniu mózgow metodą Golgiego wybrano po 4 skrawki z 4 różnych przekrojów SN/VTA. W sumie, z grupy kontrolnej przeanalizowane zostały dendryty o łącznej długości 4764,629 μm , a z grupy eksperymentalnej o łącznej długości 5407,304 μm . Dane literaturowe wspominają o średniej analizie 3000 do 5000 μm

długości dendrytów. Badanym parametrem była gęstość kolców dendrytycznych, której analiza wykazała, że liczba kolców dendrytycznych na jeden μm długości dendrytu w neuronach SN/VTA mutantów nie różni się od gęstości kolców dendrytycznych SN/VTA myszy kontrolnych (test Manna-Whitneya, $U = 2009$, $p = 0,6472$). Dodatkowo, w naszych badaniach potwierdzono poprzednie obserwacje (Jang et al., 2015), że liczba kolców dendrytycznych znajdujących się na neuronach w SN/VTA (0,5 kolca na μm dendrytu) jest znacząco niższa niż liczba kolców znajdujących się na neuronach w innych strukturach, jak np. hipokampie czy korze (1 – 2 kolce na μm dendrytu).



Ryc. 83. Analiza gęstości kolców dendrytycznych w substancji czarnej i pola brzusznej nakrywki (SN/VTA) 6 miesięcy po podaniach wirusa u kontroli i mutantów. (a.) Przykładowe zdjęcia dendrytu z kolcami dendrytycznymi neuronu w SN/VTA u kontroli i myszy o genotypie mutantu wybarwione metodą Golgiego (b.) Gęstość kolców dendrytycznych na 1 μm dendrytu, przedstawiona jako średnia ze zliczeń dla każdego osobnika na osobnym słupku; (c.) Gęstość kolców dendrytycznych na 1 μm dendrytu, przedstawiona jako średnia ze zliczeń dla grupy. Wyniki przedstawiono jako średnią dla grup \pm SEM. $N = 3$. Do oceny istotności statystycznej wykorzystano nieparametryczny test Manna-Whitneya.

5. Dyskusja

Niniejsza praca była podyktowana chęcią uzyskania dowodów na spontaniczne zmiany funkcjonowania układu dopaminowego przy postępującej w czasie neurodegeneracji układu noradrenergicznego. W tym celu konieczne było wstępne potwierdzenie zasadności badania takiej hipotezy, dokonane w oparciu o posiadany już, konstytutywny model ablacji czynnika transkrypcyjnego TIF-IA (myszy TIF-IA^{DbhCre}), a następnie stworzenie doskonalszego, miejscowo-specyficznego modelu, z selektywną delecją TIF-IA w rejonie LC, co odpowiadałoby drugiemu etapowi rozwoju PD według teorii Braaka i mogłoby odzwierciedlać prodromalną fazę PD. Była to zasadnicza część pracy, jako że stworzenie modelu *de novo* w oparciu o zastosowanie *in vivo* systemu edycji genów CRISPR/Cas9 u zwierząt z rekombinazą Cre, było z jednej strony odpowiedzią na zapotrzebowanie takiego modelu zwierzęcego, z drugiej, trudnym zadaniem wykraczającym daleko poza metodyczne kwestie, wymagającym rozwiązania szeregu problemów i pokonania ograniczeń nowej technologii w transgenice.

Natomiast bezpośrednią przesłanką do podjęcia w ogóle badań w tym kierunku, było wykazanie w naszych wcześniejszych badaniach efektu odwrotnego tj. potencjalnie neuroprotektynowego wpływu wzmocnienia transmisji noradrenergicznej w modelu mysiego parkinsonizmu z selektywną delecją TIF-IA w neuronach dopaminowych (TIF-IA^{DATCreERT2}) (Kreiner, et al., 2019).

W pierwszej fazie badań będących częścią niniejszej rozprawy, scharakteryzowano fenotyp myszy z degeneracją neuronów noradrenergicznych linii TIF-IA^{DbhCre}, w szczególności pod kątem wybranych aspektów funkcjonowania układu dopaminowego. Zgodnie z oczekiwaniami potwierdzono zaawansowaną, progresywną degenerację neuronów noradrenergicznych w ośrodkowym układzie nerwowym i zaobserwowano zmiany w funkcjonowaniu neuronów dopaminowych w rejonie SN/VTA. Jednak ze względu na ekspresjonowanie DBH również w strukturach obwodowych (nadnercza, węzły sympatyczne), wywołana mutacja negatywnie oddziaływała na ogólną kondycję zwierząt, przekładając się na całe spektrum negatywnych zmian związanych z obwodową sympatektomią, przejawiających się m.in. zapaleniem otrzewnej (obserwacje własne z materiału sekcyjnego) i ogólnym upośledzeniem, prowadzącym do letalności zwierząt przed upływem 3 miesiąca życia (Barut et al., 2022). Kolejnym, głównym celem badań było udoskonalenie modelu, tak aby móc kontynuować badanie wpływu neurodegeneracji ograniczonej wyłącznie do ośrodkowego układu noradrenergicznego na system dopaminowy, bez komplikacji wynikających z utraty komórek na obwodzie.

Przystępując do realizacji tego etapu pracy doktorskiej oszacowano najpierw dostępne możliwości dla wygenerowania nowej, mysiej linii transgeniczej z degeneracją neuronów noradrenergicznych, która byłaby ograniczona do ośrodkowego układu nerwowego, a w szczególności do największego skupiska neuronów noradrenergicznych – miejsca sinawego (LC). Początkowo przymierzono się do wykorzystania strategii opartej na projektowanej fuzji dwóch systemów warunkowej rekombinacji (Cre/loxP i Flp/FRT) dla wywołania ablacji TIF-IA, za pomocą systemu Cre/loxP powodując ograniczenie mutacji do komórek noradrenergicznych, wraz z dodatkowym zawężeniem mutacji tylko do ośrodkowego układu nerwowego poprzez wykorzystanie dodatkowo systemu Flp/FRT w którym jako promotora Flp zamierzano wykorzystać β -adducynę. Taka strategia miała zaletę w postaci posiadania już jednej składowej tego systemu, wykorzystanej do generowania linii TIF-IA^{DbhCre}. Wgłębiając się w zawiłości podstaw transgeniki, postanowiono wykorzystać nowe możliwości jakie daje niedawno odkryty system edycji genów CRISPR/Cas9 w połączeniu z rekombinacją zlokalizowaną Cre oraz – znaną nam z użyteczności w poprzednich liniach

transgenicznym – inicjację apoptozy komórek wywołaną delecją czynnika transkrypcyjnego TIF-IA (Kreiner et al., 2013a; Parlato et al., 2008; Rieker et al., 2011; Yuan et al., 2005).

Wykorzystano w tym celu zalety somatycznej transgenezy, gdzie podczas podań stereotaktycznych dokonuje się nastrzyknięcia bezpośrednio odpowiedniego rejonu mózgu wektorem wirusowym, bez konieczności krzyżowania nowego szczepu myszy. Jako formę nośnika DNA wybrano cząsteczki lentiwirusowe (LV), których przewagi, w kontekście specyfiki niniejszych badań, przedyskutowano w dalszej części pracy. Wygenerowano i zweryfikowano na pierwotnych neuronach stworzone wektory, badając funkcjonalność LV, wydajność transdukcji, wydajność inicjowania śmierci komórek w wyniku delecji TIF-IA i skuteczność działania rekombinacji zlokalizowanej. Gotowy wektor podano domózgowo, do rejonu LC myszom *DbhCre*, otrzymując postępującą degenerację neuronów noradrenergicznych w LC (średnio 16,7%, mocno zróżnicowaną osobniczo, w zakresie między 10 %, a 40 %), połączoną z behawioralnymi i molekularnymi cechami dysregulacji tego układu. Warto podkreślić, że wykorzystanie systemu edycji genów CRISPR/Cas9 u myszy *DbhCre*, gwarantowało specyficzność mutacji wyłącznie w komórkach ekspresjonujących DBH, co było bardzo istotne przy podaniach wektora LV do tak małej struktury i trudnego do przewidzenia zakresu jego rozprzestrzenienia się w mózgu. Finalnie uzyskano nowe dowody, że wpływ tej degeneracji ma negatywne oddziaływanie na funkcjonowanie neuronów dopaminowych w SN/VTA. Choć pozostaje niewyjaśnione na ile zaobserwowane zmiany behawioralne w tym modelu są związane z upośledzonym układem noradrenergicznym czy jednak z dopaminowym, to zanotowano także zmiany na poziomie parametrów biochemicznych, molekularnych i elektrofizjologicznych w rejonie SN/VTA, dostarczające dowodów na osłabienie funkcji tego ostatniego. Tym samym podtrzymano hipotezę, że neurodegeneracja układu noradrenergicznego może przyczynić się do zmian w działaniu neuronów dopaminowych, które mogą być charakterystyczne w początkowej fazie PD. Opisany model może też w przyszłości posłużyć badaniom dysfunkcji układu noradrenergicznego, związanymi choćby z zaburzeniami pamięci czy snu i czuwania, co otwiera nowe możliwości dla innych projektów.

5.1. Przydatność konstytutywnego modelu TIF-IA^{DbhCre} dla badań długotrwałego wpływu degeneracji noradrenergicznej na neurony dopaminowe w rejonie SN/VTA

Przystępując do projektu, w badaniach wstępnych wykazano, że myszy TIF-IA^{DbhCre} charakteryzowały się selektywną, postępującą degeneracją neuronów noradrenergicznych, zarówno w rejonie ośrodkowego układu nerwowego, jak i struktur obwodowych, w tym komórek chromochłonnych nadnerczy. Zwierzęta charakteryzowały się spadkiem wagi, ptozą (opadanie powieki) i zmniejszoną aktywnością lokomotoryczną. Mutacja została potwierdzona zliczeniami neuronów w rejonie LC. W 12 tygodniu życia ubytek neuronów wynosił ponad 90 %. W obszarze SN/VTA odnotowano wczesne oznaki neurodegeneracji poprzez pojedyncze komórki z podwyższonym poziomem markera FluoroJade (Barut et al., 2022).

Powyższe, wstępne wyniki zostały uzyskane jeszcze przed przystąpieniem do realizacji niniejszej pracy. Natomiast w trakcie realizacji pracy doktorskiej, w celu uzupełnienia charakterystyki linii TIF-IA^{DbhCre} pod kątem oddziaływania neurodegeneracji układu noradrenergicznego na układ dopaminowy, oznaczono markery stanu zapalnego. Jednym z analizowanych parametrów oceniających stan neuronów dopaminowych była aktywacja komórek glejowych (Ryc. 31). Analiza ilości astrocytów i mikrogleju, w zliczeniach z barwień immunohistochemicznych, poziomie ekspresji mRNA i białka, wykazała podwyższony stan odpowiedzi zapalnej. Aktywowany mikroglej jest istotnym źródłem stresu oksydacyjnego (Q. Li & Barres, 2018), może wytwarzać glutaminian oraz czynniki prozapalne, w tym TNF- α i interleukiny IL-1 β i IL-6, promując neurodegenerację (Hickman, Izzy, Sen, Morsett, & El Khoury, 2018). U pacjentów z PD, jak i innymi chorobami neurodegeneracyjnymi wykrywa się

reaktywne formy astrocytów i mikrogleju w SN/VTA (Liddel et al., 2017). Obecność aktywowanych form gleju koreluje ze wzrostem czynników prozapalnych w mózgu i płynie mózgowo-rdzeniowym (CSF) (Mogi et al., 1996). Kolejne analizy stanu zapalnego w regionie SN/VTA z wykorzystaniem dedykowanej macierzy białkowej wykazały podwyższony poziom interferonu gamma (IFN γ) i prozapalnych chemokin CC lub CXC (CXCL1, CXCL5, CXCL11) (Ryc. 32). Brak indukcji głównych cytokin zapalnych (tj. IL-1 β , IL-6 lub TNF α) może sugerować, że degeneracja neuronów noradrenergicznych u myszy TIF-IA^{DbhCre} wywołuje niski, chroniczny stan zapalny w regionie SN/VTA, który aktywuje również neuroprotektoryjne mechanizmy, jak zwiększenie ekspresji IL-10, która prawdopodobnie prowadzi do obniżenia poziomu IL-6. IL-10 jest bardzo silną cytokiną przeciwzapalną, która odgrywa kluczową rolę w zapobieganiu patologiom komórkowym wywołanym przez stan zapalny, czy autoimmunologiczny (Iyer & Cheng, 2012). Niedawne badania wskazały na jej szczególną rolę w PD (Cockey et al., 2021). Cockey ze współautorami wykazali, że w modelu synukleinopatii w mysiej linii związanej z patologiczną formą α -Syn, A53T, indukcja ekspresji IL-10 przez podanie wektorem adenowirusowym (AAV) przed pojawieniem się symptomów patologii PD nie skutkowało ochroną neuronów. Wręcz przeciwnie, wykazali oni, że IL-10, nasila patologię, a myszy wykazywały krótsze przeżycie (Cockey et al., 2021). Przeciwnie wyniki uzyskano dzięki wstępnemu podawaniu IL-6, które poprawiło symptomy indukowanej synukleinopatii u myszy (Koller, Brooks, Golde, Giasson, & Chakrabarty, 2017). Co ciekawe, myszy TIF-IA^{DbhCre} wykazują wzrost ekspresji IL-10 i spadek poziomu IL-6.

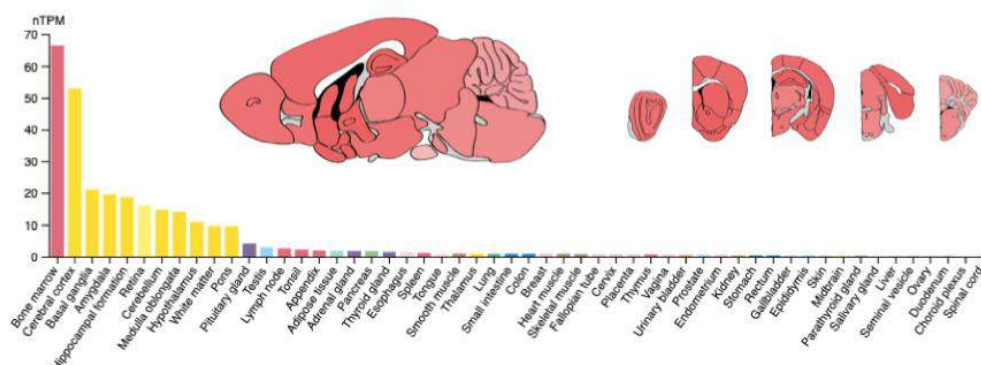
Ponadto u myszy TIF-IA^{DbhCre} zaobserwowano zwiększenie ilości komórek 8-hydroksy-2deoksyguanozyny (8OHdG) (Ryc. 31) co świadczy o wzmożonym stresie oksydacyjnym, mogącym prowadzić do uszkodzeń DNA. 8-OHdG często używany jest jako biomarker w materiale *post mortem* w chorobach neurodegeneracyjnych. Poziom 8-OHdG jest podwyższony również w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów, co pozwala monitorować progresję choroby (Gmitterová, Gawinecka, Heinemann, Valkovič, & Zerr, 2018). Kluczowym parametrem tzw. stresu nukleolarnego, obserwowanego także u pacjentów PD (G. Kreiner et al., 2013a; Rieker et al., 2011), jest transfer nukleofosminy, białka występującego w jąderkach, co w przypadku przejścia do nukleoplazmy świadczy o dezintegracji ich funkcji i zaburzeniu syntezy rRNA. W naszych badaniach zanotowaliśmy niewielki, ale znamienny statystycznie, ok. 10 % wzrost w ilości komórek z uszkodzonymi jąderkami w rejonie SN/VTA (Ryc. 31). Koncepcja o podwyższonym stresie jąderkowym jako uniwersalnym markerze w chorobach neurodegeneracyjnych potwierdza się również w progresywnym mysim modelu HD, a także w materiale z biopsji pacjentów (Sönmez et al., 2021). Podsumowując, wykazaliśmy, że brak równowagi między układami noradrenergicznym i dopaminergicznym może bezpośrednio wywoływać na neurozapalenie i – być może - wczesne oznaki neurodegeneracji w obszarach SN/VTA. Wyniki podsumowujące model TIF-IA^{DbhCre} zostały w całości opisane w pracy opublikowanej w 2022 r. w *J. Neurochem* (Barut et al., 2022).

Jednak, aby lepiej zrozumieć długoterminowy wpływ efektu neurodegeneracji w rejonie LC na układ dopaminowy, być może nawet na przeżywalność neuronów dopaminowych SN/VTA u myszy TIF-IA^{DbhCre}, konieczna byłaby ich dłuższa obserwacja i badania w kolejnych punktach czasowych. To nie było możliwe z uwagi na wczesną letalność myszy. Podjęto wprawdzie próby utrzymania myszy dłużej przy życiu przez włączenie od 9 tygodnia podawania prekursora noradrenaliny, DOPS, ale nie przyniosło to większych rezultatów. Zdołano przedłużyć czas życia o kilka tygodni, bez poprawy ogólnej kondycji zwierząt (obserwacje niepublikowane). Zatem wykorzystanie modelu TIF-IA^{DbhCre} w dłuższej perspektywie należy ocenić jako nierealne, ponadto poważne objawy obwodowe, w tym również stan zapalny otrzewnej stwierdzony w materiale sekcyjnym podczas uśmiercania zwierząt, może wpływać na uzyskiwane wyniki i przyczyniać się do powstawania artefaktów.

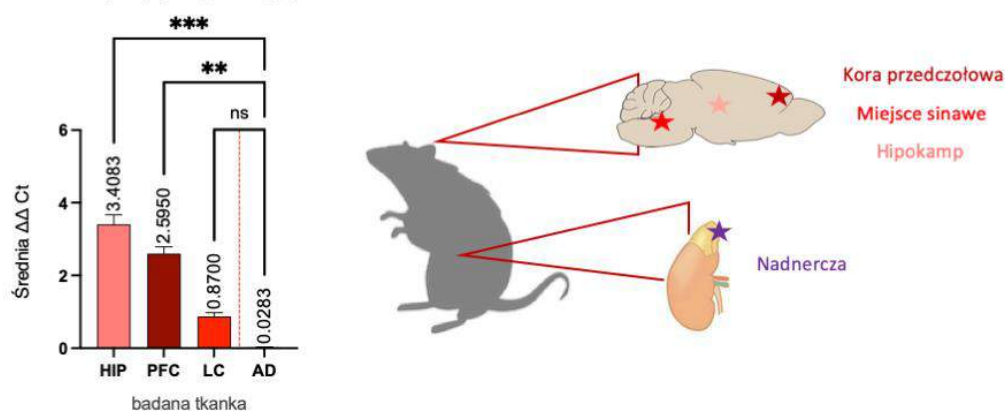
5.2. Ocena zastosowania dwóch różnych podejść metodologicznych w celu otrzymania modeli zwierząt transgenicznych z degeneracją neuronów noradrenergicznych w LC.

Aby otrzymać zwierzęta zmodyfikowane genetycznie, w których degeneracji będą ulegały tylko neurony noradrenergiczne w LC, na początku pracy nad nowym modelem neurodegeneracji rozważano dwa różne podejścia metodologiczne. Jednym ze sposobów mogło być wygenerowanie zwierząt transgenicznych, z konstytutywną mutacją, gdzie delecja czynnika transkrypcyjnego TIF-IA ograniczona byłaby do neuronów noradrenergicznych znajdujących się w mózgu. Linia taka opierałaby się na stworzeniu konstruktów, w których ekspresja Cre wymagałaby wcześniejszej rekombinacji Flp/FRT – ta natomiast ograniczona byłaby tylko do mózgu. Specyficzność komórkowa Cre byłaby dalej utrzymana przez użycie promotora DBH, podobnie jak w modelu konstytutywnym TIF-IA^{DbhCre}. W przypadku wyboru tej strategii otrzymania zwierząt transgenicznych, konieczne byłoby znalezienie odpowiedniego promotora odróżniającego miejsce sinawe od reszty układu noradrenergicznego, w tym komórek chromochłonnych nadnerczy czy węzłów sympatycznych, choć niekoniecznie specyficznego tylko dla neuronów adrenergicznych, gdyż taką specyficzność w mózgu zapewniałby promotor DBH. Promotorem takim z wyboru była β -adducyna, białko filamentu aktynowego, ze znaczną ekspresją w mózgu (Costessi, Devescovi, Baralle, & Muro, 2006). Przymierzając się do weryfikacji takiego podejścia badawczego wykonano pomiary mRNA kodującego β -adducynę, jednak z uwagi na spodziewane późniejsze problemy w przygotowaniu konstruktów dla stworzenia rekombinacji Flp/FRT zaniechano tej drogi. Okazało się również, że poziom mRNA β -adducyny w nadnerczach jest wykrywalny (Ryc. 84) – i mimo, że na bardzo niskim poziomie w porównaniu do struktur ośrodkowego układu nerwowego, to mogłoby to wykluczyć osiągnięcie zakładanego celu w postaci selektywnej degeneracji wyłącznie LC. Aby zastosować ten gen jako promotor w projektowanej mysiej linii transgenicznej, trzeba byłoby przeprowadzić jeszcze analizę mRNA tylko komórek noradrenergicznych w nadnerczach, lub znaleźć inny, specyficzny promotor. W efekcie przeważyło to o zaniechaniu powyższej drogi i skupieniu się na wykorzystaniu systemu edycji genów CRISPR/Cas9, pomimo znacznie więcej ilości niewiadomych odnośnie przygotowania konstruktów.

a. Ekspresja β -adducyny w tkankach według www.proteinatlas.org



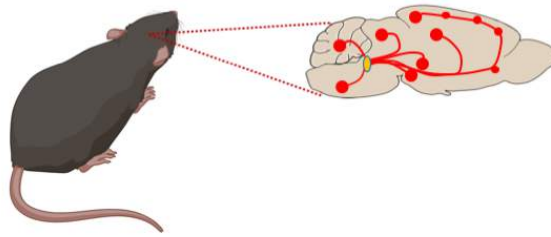
b. ekspresja genu β -Adducyny



Ryc. 84. Analiza zasadności wyboru β -adducyny jako drugiego promotora, ograniczającego mutację do OUN u projektowanych, podwójnych mutantów z delecją TIF-IA. (a.) Ekspresja genu β -adducyny 2 w różnych tkankach myszy (www.proteinatlas.org); (b.) zbadana przez nas ekspresja genu β -adducyny 2 w różnych tkankach pobranych z myszy C57/BL6N. Wyniki przedstawiono jako średnią dla grup \pm SEM. Do oceny istotności statystycznej wykorzystano jednoczynnikową analizę wariancji Kruskala-Wallisa dla prób niezależnych z testem post-hoc Dunn'a. N = 6. Istotność statystyczna przedstawiona jako *. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Źródło: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000075340-ADD2/brain>

Alternatywną metodą, której względy praktyczne przeważały, było zastosowanie mutagenyzy w komórkach somatycznych poprzez bezpośrednie podania odpowiedniego wektora wirusowego do LC. Aby tą metodą osiągnąć zakładany cel, którym była degeneracja układu noradrenergicznego, należało zaprojektować konstrukt, który selektywnie będzie działał tylko w neuronach noradrenergicznych, a także wykorzystuje sprawdzony w poprzednich badaniach model usunięcia czynnika transkrypcyjnego TIF-IA. Ze względu na dostępność w naszej hodowli myszy transgenicznym DbhCre, pierwszym wyborem było zastosowanie połączenia zalet tej linii, tj. selektywności Cre w neuronach noradrenergicznych wraz z odpowiednio zaprojektowanym wektorem wirusowym. Zaawansowane narzędzia biologii molekularnej pozwalają w różny sposób osiągnąć pożądany rezultat i uzyskanie zwierząt modyfikowanych genetycznie. Jedną z możliwości, oprócz zastosowania standardowych rozwiązań z wykorzystaniem shRNA, było stworzenie Cre-zależnego wektora opartego na systemie edycji genów CRISPR/Cas9. Mając na uwadze wady i zalety strategii wygenerowania mutantów z degeneracją LC poprzez iniekcje Cre-zależnego wektora CRISPR oraz wygenerowania linii transgenicznej z podwójnym promotorem, przeprowadzono dokładne porównanie omawianych metod, przedstawione na rycinie **Błąd! Nie można odnaleźć źródła odwołania.** Po uwzględnieniu wszystkich aspektów podjęto się realizacji strategii opartej na domózgowych podaniach Cre-zależnych wektorów lentiwirusowych.

SELEKTYWNA DEGENERACJA MIEJSCA SINAWEGO W MÓZGU



| DOMÓZGOWE PODANIA WEKTORÓW: TIF-1A-CRISPR ^{DbhCre} | PODWÓJNE MUTANTY: TIF-1A ^{DbhCre/AddFrt} |
|---|---|
| <p>WEKTOR Cre-ZALEŻNY WYCISZAJĄCY TIF-1A</p> <p>DbhCre+</p> | |
| ZALETY I WADY WYBRANEGO ROZWIĄZANIA | |
| ŁATWE WYGENEROWANIE KOHORTY MUTANTÓW MYSZY Dbh^{Cre} | JEDNORAZOWE WYGENEROWANIE LINII MUTANTÓW – POWTARZALNOŚĆ MIĘDZY KOHORTAMI |
| MOŻLIWOŚĆ STWORZENIA UNIWERSALNEGO KONSTRUKTU, KTÓRY PO MODYFIKACJACH BĘDZIE SZYBKIM NARZĘDZIEM DO OTRZYMANIA INNYCH MUTANTÓW | CZASOCHŁONNE WYGENEROWANIE LINII MUTANTÓW |
| MUTACJA DOTYCZY DOJRZAŁYCH NEURONÓW U DOROSŁYCH OSOBNIKÓW | KONIECZNOŚĆ WERYFIKACJI SPECYFICZNOŚCI DWÓCH PROMOTORÓW |
| W CELU WYGENEROWANIA MUTANTÓW TRZEBA KĄŻDORAZOWO PRZEPROWADZAĆ PODANIA STAREOTAKTYCZNE | BRAK WERYFIKACJI MUTACJI <i>IN VITRO</i> / MUTACJA MOŻE BYĆ NIESKUTECZNA, CO OKAŻE SIĘ JUŻ PO WYGENEROWANIU LINII |
| MOŻLIWOŚĆ NIESKIEJ POWTARZALNOŚCI OPERACJI | MOŻLIWOŚĆ PROBLEMÓW Z UZYSKANIEM DOBREJ LICZEBNOŚCI KOHORTY MUTANTÓW |
| MOŻLIWOŚĆ WERYFIKACJI MUTACJI NA NEURONACH <i>IN VITRO</i> | MUTACJA BĘDZIE DOTYCZYŁA BARDZO MŁODYCH OSOBNIKÓW |
| KONIECZNOŚĆ PRODUKCJI WEKTORA W POWTARZALNYCH WARUNKACH I STĘŻENIACH | BRAK KONIECZNOŚCI INGERENCJI W POJEDYNCZE OSOBNIKI (BRAK OPERACJI STEREOTAKTYCZNYCH) |

Ryc. 85. Schematyczne przedstawienie strategii uzyskania mysiego modelu progresywnej degeneracji neuronów noradrenergicznych w miejscu sinawym oraz porównanie rozważanych strategii. Zielona ramka – zalety wybranego rozwiązania; czerwona ramka – wady wybranego rozwiązania.

5.3. Nowy system badawczy: LVCre-zależny CRISPR/Cas9. Użyteczność zastosowania systemu do edycji genów CRISPR/CAS9 w chorobach neurodegeneracyjnych

Precyzyjne modyfikacje genomów wprowadzane z dużą wydajnością są istotne do zrozumienia, jaki wpływ na procesy biologiczne i stany chorobowe mają konkretne geny lub inne elementy genomu. Obecnie jesteśmy świadkami toczącego się przełomu w dziedzinie transgeniki. CRISPR/Cas9 jest metodą, która pozwala na precyzyjne i wszechstronne edytowanie genomu (Knott & Doudna, 2018). W niniejszej pracy dzięki możliwościom jakie daje system CRISPR/Cas9 dołożyliśmy kolejne kroki w zdobywaniu wiedzy na temat złożonej zależności między układami neuroprzekąźnictwa w PD. W naszych badaniach wykorzystaliśmy system CRISPR, aby osiągnąć usunięcie genu TIF-IA w populacji neuronów noradrenergicznych. Mutacja ta jest nie tylko ograniczona do miejsca podania wirusa, ale również do neuronów które wykazują ekspresję Cre, co czyni ją wysoce selektywną i do pewnego stopnia eliminuje problem podania stereotaktycznego do tak niewielkiej struktury mózgu jaką jest LC (penetracja wirusa poza LC nie przekłada się na wywołanie mutacji, gdyż nie zaistnieje ona w komórkach bez ekspresji DBH). Wykazaliśmy, że dzięki zastosowaniu Cre-zależnego wektora jesteśmy w stanie infekować komórki *in vitro* (Ryc. 43) i wprowadzać mutację w mysich pierwotnych neuronach i astrocytach. *In vitro* zweryfikowaliśmy, że wprowadzone przez nas modyfikacje wektora czynią go wysoce selektywnym do populacji komórek ekspresjonujących Cre i nie wykazują funkcjonalnego działania w innych komórkach nie posiadających tej rekombinazy (Ryc. 45).

Mimo że metoda rekombinacji zlokalizowanej zrewolucjonizowała komórkowo-specyficzne analizy funkcji genów, to nadal wymaga specyficznego krzyżowania linii zwierząt zaprojektowanych, aby osiągnąć docelowe mutacje. Takim przykładem są opisane w pierwszym rozdziale sekcji wyników zwierzęta TIF-IA^{DbhCre}. Wygenerowanie linii tych zwierząt wiązało się z krzyżowaniem zwierząt wykazujących ekspresję rekombinazy Cre pod kontrolą promotora DBH (DbhCre) z myszami posiadającymi oflankowaną sekwencjami loxP część genu *Rrn3* (egzon 12 – 14) kodującego białko TIF-IA (TIF-IA^{lox/lox}) (Yuan et al., 2005). W komórkach wykazujących ekspresję Cre następuje usunięcie oflankowanej sekwencjami loxP części genu *Rrn3*, co powoduje brak białka TIF-IA w neuronach noradrenergicznych. W parowaniach myszy otrzymywano mioty zawierające zarówno osobniki Cre+/TIF-IA^{lox/lox}, które wykazują delecję TIF-IA w komórkach ekspresjonujących DBH oraz osobniki nie wykazujące ekspresji rekombinazy Cre (Cre-), u których TIF-IA pozostaje nienaruszony (Barut et al., 2022). Warto tutaj podkreślić charakterystykę myszy DbhCre, w których ekspresja Cre zachodzi pod promotorem specyficzno-komórkowym, DBH. Użycie tego promotora bardzo dobrze ogranicza mutację tylko do komórek syntetyzujących noradrenalinę. Należy podkreślić, że komórki te w mózgu nie występują tylko w LC, a mniejsze skupiska neuronów noradrenergicznych występują też w innych miejscach mózgowia. Wśród struktur, które również odgrywają rolę w przekazywaniu noradrenergicznym znajdują się m.in. jądro pasma samotnego, część tworzącego siatkowatego, brzuszna część nakrywki, jądro górne oliwki. Jednak głównym obszarem, z którego wywodzi się przytłaczająca większość neuronów noradrenergicznych jest LC i zmiany w tej strukturze są kojarzone z etiopatologią PD (Aston-Jones & Waterhouse, 2016).

Cechy wektorów lentiwirusowych takich jak możliwość użycia dużego insertu, niewielkie rozprzestrzenienie się w tkance, długotrwała stabilna ekspresja transgenów, przy jednoczesnym braku odpowiedzi zapalnej organizmu zdecydowały o doborze drogi podania za pomocą lentiwirusowej transdukcji, a nie skorzystania z częściej używanych wektorów adenowirusowych (AAV). Osobnymi zaletami była dostępność gotowych do użycia plazmidów, z których wygenerowaliśmy docelowe wektory, zweryfikowane w poprzednich doświadczeniach współpracujących w projekcie naukowców z Uniwersytetu w Helsinkach (Chmielarz et al., 2020; Konovalova et al., 2022), a także poprzednie

doświadczenie autorki rozprawy doktorskiej w badaniach z użyciem lentiwirusów w edycji genów, dotyczących receptora glukokortykoidowego w astrocytach *in vitro* oraz *in vivo* (Skupio et al., 2019; Tertilt et al., 2018).

5.3.1. Zalety i trudności zastosowania Cre-zależnego CRISPR/Cas9 poprzez podania za pomocą lentiwirusowych wektorów celem edycji genów w komórkach nie posiadających jednoznacznie selektywnych promotorów

W przypadku przedstawionych w pracy doktorskiej badań, istotne było ograniczenie mutacji do konkretnej populacji neuronów noradrenergicznych. Wykorzystując wymienione zalety obu systemów rekombinacji genów: CRISPR/Cas9 i Cre/loxP mogliśmy wygenerować myszy z mutacją ograniczoną tylko do neuronów ekspresjonujących DBH. Wykazaliśmy także, że dzięki tej metodzie jesteśmy w stanie infekować komórki przy pomocy LV i wprowadzać mutację w mysich pierwotnych neuronach i astrocytach.

Zastosowanie LV-CRISPR-DiO ma wyraźną przewagę nad innymi metodami dążącymi do tego samego celu, czyli dostarczeniu systemu CRISPR z instrukcjami inaktywacji docelowego genu w wybranej populacji komórek. Ponieważ Cas9 i sgRNA są upakowane w jednym wektorze, ich dostarczanie nie jest obciążone problemami związanymi z użyciem wektorów wirusowych różnych serotypów, lub wytworzeniem dwóch niezależnych wektorów wirusowych tego samego serotypu, które mogą się różnić efektywnym mianem. Konwencjonalna inaktywacja genów, nawet z użyciem metody CRISPR (dostarczanego do komórek germinalnych) wymaga wygenerowania warunkowych alleli, krzyżowań wstecznych (ang. *backcrossing*) i długotrwałego krzyżowania zwierząt aż do osiągnięcia interesującej nas linii genetycznej, z wybranymi genami pod kontrolą rekombinazy Cre (lub rekombinazy innego typu). Wytworzenie takich funkcjonalnych linii, wraz ze wstępnymi testami określającymi efektywność mutacji może trwać nawet wiele lat. Warto również zaznaczyć, że w niektórych wypadkach wytworzenie linii zwierząt transgenicznych standardową metodą może nie być wykonalne, ze względu na letalność z powodu m.in. ważnych funkcji wyciszanych genów w rozwoju embrionalnym (choć niekiedy rozwiązaniem może być zastosowanie indukowalnej rekombinazy CreERT2) lub ektopowa ekspresja Cre na etapie embrionalnym, co poszerza pulę komórek ulegających rekombinacji.

Jednak pomimo niewątpliwie „szybkiej ścieżki” jaką w transgenice jest system edycji genów CRISPR/Cas9, w przypadku wygenerowania naszej linii TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} czas od ostatecznej koncepcji do pierwszego potwierdzenia mutacji również był wydłużony. Przygotowania i walidacja na różnych etapach Cre-zależnych plazmidów transferowych, selekcja odpowiednich sgRNA, potwierdzenie funkcjonalności – co ważne – na neuronach pierwotnych były procesem czasochłonnym i wymagającym rozwiązania wielu pomniejszych problemów metodycznych, nie opisanych w niniejszej pracy. Mimo to przygotowane konstrukty genetyczne i dopracowana metodyka stanowią obecnie cenne narzędzia pozwalające w przyszłości na relatywnie szybkie i specyficzne komórkowo wyciszanie dowolnych genów. W efekcie opracowanej już i wdrożonej technologii, co było wymiernym rezultatem niniejszej pracy, po zwalidowaniu nowego wektora i przetestowaniu go *in vitro* i *in vivo*, zastosowanie LV-CRISPR-DiO zamknie się w przedziale czasowym 1 – 3 miesięcy dla badań *in vitro* oraz relatywnie dłuższych dla badań *in vivo*. Ostateczny czas będzie zależał od wyboru docelowego genu do delekcji i potrzeby walidacji różnych wersji gRNA. To ostatnie było przedmiotem sporego wydłużenia całego procesu przygotowania konstruktów do podań. Wymagało przygotowania wielu gRNA (w ramach tej pracy przetestowano łącznie 17 różnych gRNA) i sprawdzenia ich efektywności *in vitro*. Dokonany wybór może być jednak zastosowany już w kolejnych projektach opartych o taką strategię.

Inni naukowcy również dostrzegli zalety tych metod i wykorzystali je w ostatnim czasie do swoich badań. Swiech ze współautorami (Swiech et al., 2015) utworzyli system podwójnych wektorów, w którym SpCas9 i sgRNA ulegały ekspresji z oddzielnych wektorów AAV. Wydajność ko-transdukcji dwóch wektorów wirusowych w pierwotnych neuronach korowych myszy osiągnęła wysoki poziom *in vitro*. Aby przetestować skuteczność tego układu dwóch wektorów *in vivo*, do zakrętu zębatego hipokampa myszy wstrzyknięto jednocześnie AAV-SpCas9 i AAV-SpMecp2-GFP-KASH (zawierające sgRNA ukierunkowane na wyciszenie genu *Mecp2*, który ulega obfitej ekspresji w całym mózgu, a jego delecja powoduje zmiany w morfologii neuronów). Sortowanie FACS komórek GFP+ z hipokampa ujawniło, że 68% docelowych komórek zawierało mutacje w *Mecp2*. Transdukowane oboma wektorami neurony *in vitro* wykazywały różnice w morfologii i kolcach drzew dendrytycznych u myszy z podanymi wektorami AAV wykazały zmieniony behavior. Badanie to jako jedne z pierwszych wykazało, że mutageneza CRISPR/Cas9 (w tym wypadku za pośrednictwem AAV) wywołuje zmiany w fizjologii neuronów i fenotyp behawioralny zwierząt. Platt ze współautorami (Platt et al., 2014), aby zademonstrować bezpośrednią edycję genomu *in vivo* w mózgu myszy z Cre-zależną ekspresją Cas9, zastosowali ekspresję Cre i sgRNA za pośrednictwem AAV. Skonstruowali wektor AAV-U6-sgRNA-Cre zawierający sgRNA ukierunkowane na wyciszenie specyficznego białka dla neuronów, NeuN. Wirus podano stereotaktycznie do kory przedczołowej myszy Cas9-Cre (modelu *mysim*, który posiada kasetę ekspresyjną Cas9 zależną od rekombinazy Cre). Analiza mRNA oraz immunofluorescencja wykazały selektywne wyciszenie *NeuN* w obszarze podania wirusa.

Jednak warto podkreślić, że w tych przytoczonych, przykładowych eksperymentach zastosowano podwójnie iniekcje różnych wirusów lub użyto linie myszy z Cre-zależną ekspresją SpCas9 (Gemberling et al., 2021; Gertsenstein & Nutter, 2021), do których podaje się w wektor ekspresjonujący tylko gRNA. Metoda z podaniami naszego autorskiego konstrukt LV-CRISPR-DiO ma istotną przewagę nad tego typu modelami, Niweluje potrzebę wyprowadzenia hodowli podwójnie transgenicznej linii, a także pozwala uniknąć potencjalnych czynników zakłócających ekspresję rekombinazy w okresie prenatalnym, czy teoretycznie toksycznych właściwości wprowadzonej konstytutywnej ekspresji Cas9. Dotychczas, jedynie Hunker ze współautorami (Hunker et al., 2020) wykazali, że pojedynczy wektor AAV zawierający SaCas9 i sgRNA może być stosowany w liniach mysich Cre-zależnych. Skuteczność tego podejścia wykazano w transmisjach GABAergicznych, glutaminergicznych i monoaminergicznych. Dzięki temu wskazano na rolę regulacyjną transmisji GABAergicznej w śródmózgowiu w aktywacji psychomotorycznej. W odróżnieniu od naszych badań, aby wektor AAV zmieścił całą maszynę CRISPR użyto innej wersji rekombinazy pochodzącej od *Staphylococcus aureus* Cas9 (SaCas9), która jest mniejsza (3.2 kbp) od kanonicznej spCas9 (4.2 kbp), pozwala więc na zapakowanie całej maszyny systemu CRISPR/Cas9 w pojedynczym wektorze AAV (Ran et al., 2015). Podejście takie ma jednak swoje potencjalne wady. Porównując częstotliwość cięcia między dwoma wersjami Cas9, wykazano, że SaCas9 wykazuje większą aktywność, co sugeruje, że dłuższa sekwencja w klasycznej SpCas9 może wykazywać większą specyficzność i wydajność (Xie et al., 2018). Hunker w swoich badaniach wykazał, że SaCas9 wykazuje wyjątkowo wysoką wydajność transdukcji (Hunker et al., 2020), gdzie w innych badaniach zanotowana wydajność była bardzo niska mimo różnych modyfikacji (Kumar et al., 2018). W praktyce, wybór między saCas9 a spCas9 zależy od konkretnego badania, kontekstu eksperymentalnego i preferencji badacza. Jednak należy zaznaczyć, że spCas9 jest szeroko stosowany i dobrze zbadany w różnych organizmach. saCas9 jest stosunkowo nowym narzędziem i może wymagać dodatkowych badań i optymalizacji dla konkretnych systemów. Modyfikacje narzędzia CRISPR/Cas9 są kierunkiem przyszłościowym, a naukowcy dążą do wytworzenia jak najefektywniejszego systemu, jednak wymaga to wielokrotnych powtórzeń i walidacji niespecyficznego działania, które nie miały miejsca w przytoczonej pracy.

Dodatkowo, bardzo przydatnym narzędziem, które zastosowaliśmy w naszym konstrukcie, jest znacznik fluorescencyjny mCherry, który pomaga precyzyjnie wskazać zainfekowane komórki i rozprzestrzenienie się wirusa. Dzięki temu mogliśmy zawsze określić precyzyjnie efektywność podania i odpowiednią objętość wirusa, tak aby pokryć całą objętość docelowej struktury. Ze względu na ograniczoną pojemność wektora AAV, Hunker ze współautorami (Hunker et al., 2020) nie zmieścili w wektorze AAV znacznika fluorescencyjnego, więc nie mogli oszacować rzeczywistego rozprzestrzeniania się wirusa w tkance. W takim układzie weryfikacja możliwa była tylko podczas badania funkcjonalnego efektu wyciszenia docelowych genów, co – w przeciwieństwie do rozwiązania zastosowanego w niniejszej pracy - jest znacznym ograniczeniem tej metodologii.

5.4. Wpływ czynników metodycznych na skuteczność wygenerowania nowego neurospecyficznego modelu TIF-IA-CRISPR^{DbhCre}

Metoda CRISPR/Cas9, tak jak i każda inna, posiada kilka potencjalnych ograniczeń i wad, które mogą utrudnić wytworzenie i analizę komórek *in vitro* z modyfikacjami, a także zwierząt transgenicznych. W tym rozdziale zostały przedyskutowane główne aspekty weryfikacji działania konstruktów wraz z problemami, które pojawiły się podczas badania funkcjonalnych rezultatów działania wektora LV.

5.4.1. Weryfikacja Cre-zależnego miejsca

Bardzo ważnym punktem kontrolnym była weryfikacja działania miejsca DIO, wprowadzonego do konstruktów CRISPR, czyli oflankowanego systemu Cas9 miejscami loxP., ponieważ używany przez nas system DIO tworzono od zera. W celu weryfikacji wektora LV-CRISPR-DIO wykorzystano sprawdzony już w poprzednich badaniach gRNA usuwający białko fluorescencyjne GFP. Stwierdzono, że konstrukt działa w komórkach z ekspresją Cre i poprawnie usuwa białko GFP (Ryc. 43). Aby potwierdzić, że nowy konstrukt jest faktycznie Cre-zależny i nie działa w innych komórkach zastosowano hodowle *in vitro* pierwotnych neuronów, które nie były transdukowane wektorem niosącym ekspresję Cre. Nie wykazano obecności markera fluorescencyjnego mCherry, czyli nie stwierdzono rekombinacji w komórkach nieposiadających Cre. Równocześnie, ten sam wektor podawano na tej samej płytce, z tą samą populacją komórek do innych dołków, do których podano wektor niosący ekspresję Cre. W tym wypadku odnotowano obecność transdukowanych komórek wektorem CRISPR-DIO-gEGFP, a więc równocześnie weryfikowano, czy brak ekspresji mCherry w neuronach Cre, nie jest tylko efektem niefunkcjonalnego wirusa. Obecności znacznika fluorescencyjnego również nie zanotowano w innych typach komórek niż specyficznych dla użytego promotora (hSyn, lub hGFAP). Podsumowując, przeprowadziliśmy szczegółową analizę Cre-specyficzności naszego konstruktów, zapewniając, że w naszych eksperymentach zachodzi selektywna transdukcja tylko w komórkach posiadających Cre. Nie odnotowano problemów w tym aspekcie.

5.4.2. Weryfikacja gRNA wyciszającego TIF-IA

W naszym eksperymencie przebadaliśmy działanie 17 zaprojektowanych gRNA. Walidacja działania gRNA jest kluczowa dla tego projektu, ze względu na to, że nikt wcześniej nie wykorzystał metody CRISPR do wyciszenia ekspresji *Rrn3* (ani *Polr1a*) i nie zbadał, która sekwencja gRNA wykaże się wysoką wydajnością w ablacji białka TIF-IA. Metodami, które umożliwiają bezpośrednie potwierdzenie wydajności tworzenia nacięć w DNA – i wynikających z nich insercji lub delecji, opierającymi się na amplifikacji sekwencji, w której znajduje się przewidziane miejsce cięcia dla enzymu Cas9 są IDAA (ang. *Indel Detection by Amplicon Analysis*) i TIDE (ang. *Tracking of Indels by Decomposition*) (Brinkman, Chen, Amendola, & Van Steensel, 2014; Brinkman et al., 2018; Z. Yang et al., 2015). IDAA wykorzystuje rozdział produktów PCR podczas elektroforezy kapilarnej i opiera się

na analizie długości produktu, a nie sekwencji. Przy pomocy tej metody szacuje się, czy doszło do delecji / insercji podczas naprawy DNA. Natomiast metoda TIDE umożliwia poznanie sekwencji DNA dzięki porównywaniu elektroforegramu z sekwencjonowania Sangera przed i po edycji genu docelowego, a algorytm określa efektywność edycji dla puli zdarzeń po cięciu. Aby skorzystać z tych metod należy wyizolować DNA z komórek po zajściu mutacji. Niestety w przypadku badań z użyciem delecji TIF-IA było to bardzo utrudnione, ponieważ sama mutacja indukowała śmierć komórek. Ze względu na złą jakość zbieranego materiału zaprzestano prób wykonania IDAA i TIDE. Wnioskujemy, że to efekt fenotypowy udanej edycji genów – czyli śmierć komórek spowodowana wyciszeniem TIF-IA - powodowało problemy z oznaczeniem wydajności generowania nacięć w DNA przez różne gRNA. Kolejnymi etapami oznaczenia wydajności wyciszenia genów może być oznaczenie poziomu mRNA oraz definitywnie – przez oznaczenie poziomów białka. Jednak również na poziomie mRNA ciężko o wyciągnięcie wniosków, ze względu, że stały poziom mRNA genu *Rrn3* w komórkach jest na bardzo niskim poziomie, który jest na granicy detekcji. Nawet jeżeli użyje się metody qPCR, to podczas zbierania komórek pobierze się komórki niezainfekowane wektorem, które przeżywają w hodowli raczej niż z komórek z obniżoną ekspresją *Rrn3*, gdyż większość tych komórek może być już martwa. Tym samym qPCR byłby przeprowadzony głównie na wyselekcjonowanej, nietransdukowanej populacji komórek – jest to podobny problem jak przy próbach użycie metod IDAA lub TIDE. Z kolei na poziomie białka oznaczenia nie były możliwe, gdyż – pomimo przetestowania wszystkich dostępnych przeciwciał przeciwko TIF-IA – żadne nie okazało się skuteczne. Z powodu braku możliwości weryfikacji wydajności edycji genomu i wyciszenia genu na poziomie DNA, mRNA czy białka – oraz ze względu na duże różnice między różnymi gRNA w efektach komórkowych (brak zmian lub degeneracja) przyjęliśmy, że efekty fenotypowe są wystarczające do potwierdzenia mutacji.

Aby ułatwić weryfikację wydajności gRNA, zaprojektowane gRNA nacelowane w różne egzony *Rrn3*, również przeklonowano do wektora CRISPR Cre-niezależnego z promotorem neuronalnym, jak i astrocytarnym. We wszystkich 3 wypadkach, mutacja w egzonie 12 genu TIF-IA powodowała degenerację (Ryc. 46, Ryc. 47, Ryc. 48). Jednak zanim wybrano ostateczne gRNA do badań *in vivo* przetestowano pozostałe zaprojektowane gRNA na hodowlach pierwotnych. Reszta przetestowanych gRNA (do egzonu 1, 2 i 13) wykazywała zróżnicowaną wydajność *in vitro*, ostatecznie około połowa zaprojektowanych gRNA powodowała średnią lub mocną indukcję degeneracji. gRNA, które okazało się skuteczne *in vitro* zostało przetestowane *in vivo*, gdzie jednak nie wykazało takiej samej wydajności. Przykładowo CRISPR-DIO z wyciszającym gRNA egzonem 2 wykazał efektywność w indukcji degeneracji na neuronach pierwotnych *in vitro*, jednak w podaniach domózgowych, mimo wykrywalnych komórek z białkiem fluorescencyjnym mCherry nie powodował ubytku komórek. Mimo przydatności użycia testów *in vitro* do walidacji wektorów, nie przekłada się to całkowicie na wydajność *in vivo*. Przyczynę tego można doszukiwać m.in. dostępności miejsca komplementarnego do gRNA co może być związane z różną organizacją chromatyny (Jensen et al., 2017; C. M. Lee, Davis, & Bao, 2018) w neuronach *in vitro*, w porównaniu do stanu chromatyny *in vivo*, która może wynikać z różnych warunków w jakie się neurony znajdują, różnego stadium rozwoju (hodowle *in vitro* składają się głównie z komórek relatywnie niedojrzałych lub na wczesnym etapie rozwoju), czy różnych rodzajów neuronów (*in vitro* nie testowaliśmy bezpośrednio neuronów noradrenergicznych a korowe i dopaminowe). Tak więc pomimo tego, że weryfikacja gRNA *in vitro* jest przydatnym narzędziem do preselekcji gRNA, ostatecznie tylko weryfikacja na docelowej populacji potwierdza ich skuteczność.

Co ciekawe, można zauważyć, że wydajność transdukcji zwiększa się przy użyciu podwójnych infekcji, różnymi gRNA zaprojektowanymi do tego samego egzonu. Infekcja pojedynczym gRNA (przykładowo egzon 12_v1 lub 12_v3) powodowała ubytek neuronów, jednak największa wydajność okazała się po połączeniu obu wektorów razem. W literaturze sugeruje się, że przyłączenie jednej cząsteczki sgRNA rozluźnia chromatynę, ułatwiając przyłączenie i zadziałanie kolejnego wektora

CRISPR w genomie. Dzięki temu nie tylko wprowadzone są dwa miejsca działania Cas9 i przecięcia DNA, ale również jest większe prawdopodobieństwo zadziałania takiej konstrukcji (Acosta, Fiore, Carota, & Oliver, 2018).

W literaturze zdolność do edycji genomu neuronów przez system CRISPR-Cas9 może osiągnąć nawet 80 - 90 % (Kramer et al., 2018). W przypadku przeprowadzonych przez nas eksperymentów z kontrolnym CRISPR-DIO wydajności były trochę niższe niż oczekiwane. W przypadku tych badań jako kontrolę specyficzności i wydajności wektora LV-CRISPR-DIO było użycie *in vitro* gRNA wyciszającego ekspresję białka fluorescencyjnego EGFP. Otrzymaliśmy wyciszenie EGFP na poziomie 57 % w badaniu mRNA, a także 29 % zainfekowanych komórek, oszacowanych w zliczeniach znacznika fluorescencyjnego mCherry (Ryc. 43). Jednym z powodów niższej transdukcji komórek wektorem CRISPR-DIO, w porównaniu do Cre-niezależnego wektora, może być konieczność używania podwójnej transdukcji neuronów w hodowlach *in vitro*. Czas potrzebny do zadziałania konstruktów Cre-zależnego może być dłuższy niż standardowa pojedyncza transdukcja. Natomiast podczas użycia wektora eksperymentalnego ze specyficznym gRNA wyciszającym ekspresję TIF-IA (w egzonie 12) osiągnięto bardzo wysoką efektywność – w tym wypadku oszacowaną na podstawie degeneracji komórek. Po 15 dniach hodowli, pozostało jedynie 6,5 % żywych neuronów (Ryc. 45, Ryc. 46). Ten wysoki efekt *in vitro* może być jednak związany ze specyficznością samej hodowli komórkowej. Jeżeli uruchomiono indukowaną degenerację w około 30 % neuronów podwójnie transdukowanych (wektorem Cre oraz wektorem CRISPR-DIO) mogło dojść do indukcji śmierci pozostałych komórek z powodu niekorzystnych czynników wydzielanych przez umierające neurony i zmiany warunków hodowli. Mechanizm śmierci komórkowej w tym procesie jest bardzo interesujący i jest obiektem naszych przyszłych badań *in vitro*, ponieważ może dostarczyć informacji na temat podatności neuronów dopaminowych na procesy neurodegeneracyjne w chorobie Parkinsona. Metoda ta może stać się zamiennikiem do modeli *in vitro* śmierci komórkowej indukowanej toksynami.

W wyniku działania gRNA komórka, pomimo zachowania swojej morfologii, wchodzi już w proces degeneracji i wykazuje cechy dysregulacji (TIF-IA również powoduje zahamowanie procesów translacji), co może mieć teoretyczny wpływ na to, że białko fluorescencyjne mCherry nie wytwarza się prawidłowo. Podobne efekty były obserwowane *in vivo*, po podaniach domózgowych wektorów. Ekspresja wektora CRISPR-Cre niezależnego była widoczna już po 2 tygodniach, gdzie ekspresję wektora Cre-zależnego udało się uchwycić dopiero w 1 miesiącu po podaniach. Warto tutaj zaznaczyć, że do pierwszych eksperymentów używano gRNA celującego w egzon 1 genu *Rrn3* (co jest standardowym podejściem w metodzie CRISPR/Cas9), który okazał się być niefunkcyjny *in vitro* i *in vivo*, czyli nie doprowadzał do śmierci komórek. W związku z tym spróbowano gRNA do innych egzonów i w rezultacie, w wyniku kolejnych eksperymentów wybrano egzony 12-14 jako najbardziej obiecujące. Co prawda nie udało się zwizualizować ekspresji mCherry wektora CRISPR-DIO usuwającego sekwencję gRNA w egzonie 12 genu *Rrn3*, pomimo sprawdzenia kilku punktów czasowych, ale wydajność wprowadzania mutacji przez ten wektor potwierdziły zliczenia komórek TH+ (Ryc. 54). Sugerujemy, jak to było również w przypadku eksperymentów *in vitro*, że transdukowane komórki nie były w stanie wytwarzać białka fluorescencyjnego w związku z zaburzeniem procesu translacji przez wyciszenie *Rrn3*. Alternatywnie ekspresja białka mCherry mogła zbiegać się w czasie z indukcją śmierci komórkowej związanej z delecją TIF-IA, co również uniemożliwiłoby by wizualizację komórek mCherry pozytywnych, jako że te by obumierały. Wydaje się to jednak mniej prawdopodobne od blokady ekspresji mCherry, gdyż badania na linii TIF-IA^{DbhCre} wskazywały raczej, że indukowany usunięciem TIF-IA proces neurodegeneracji jest rozciągnięty w czasie. Na zaawansowanym etapie projektu stwierdzono, że dobrym pomysłem byłaby jeszcze dodatkowa walidacja z użyciem CRISPR-DIO, ale usuwającego znany i dobrze wyodrębniający się

gen, którego wyciszenie nie spowoduje śmierci komórki, tak jak zrobił to Hunker ze współautorami (Hunker et al., 2020), usuwając TH w śródmózgowiu.

Podsumowując, ze względu na nakładanie się progresywnej śmierci komórkowej na ekspresję markera podwójnej transdukcji i rekombinacji (mCherry), w połączeniu z rozciągniętą w czasie kinetyką ekspresji Cre, a następnie samej rekombinacji i ekspresji mCherry, ostateczna właściwa ilość podwójnie stransdukowanych neuronów, pokazanych po 4 dniach transdukcji może być znacząco niedoszacowana. Ponadto, na dużą wydajność transdukcji wskazuje prawie całkowita śmierć komórek po 15 dniach hodowli, pomimo wydawałoby się niskiej wydajności transdukcji po 4 dniach (oszacowanej ekspresją mCherry). Sugerujemy, że ten rezultat wynika z tego, że uszkodzenie TIF-IA może prowadzić do zaburzeń translacji, w efekcie problemów z ekspresją wskaźnika fluorescencyjnego. A z drugiej strony, rezultatem śmierci w transdukowanych komórkach może być doprowadzenie do kaskadowej śmierci całej hodowli przez zmiany warunków hodowli.

5.4.3. Weryfikacja „*off targets*”

Jednym z potencjalnych problemów w zastosowaniach systemu CRISPR/Cas9 są tzw. „*off targets*”, czyli niespecyficzne miejsca cięcia w genomie, a w rezultacie pojawianie się nieoczekiwanych i niepożądanych zmian, które mogą okazać się niekorzystnymi dla komórki. Do chwili obecnej opracowano wiele metod wykrywania miejsc docelowych CRISPR/Cas9, co doprowadziło do stworzenia ulepszonych wersji systemu CRISPR/Cas9 który z każdymi kolejnymi modyfikacjami działa z jeszcze większą precyzją (Moon, Kim, Ko, Kim, & Kim, 2019). Aby zminimalizować ryzyko wystąpienia niespecyficznych cięć (które mogą być problematyczne w transdukcji lentiwirusowej), a także wykonać funkcjonalną analizę efektywności cięcia dla zaprojektowanych gRNA, wykorzystuje się analizę bioinformatyczną. Specjalne programy przewidują potencjalne miejsca cięcia na podstawie komplementarności cząsteczki gRNA do innych miejsc w całym genomie referencyjnym. Przykładem takich programów są Cas-OFFinder i CRISPOR (Bae, Park, & Kim, 2014; Concordet & Haussler, 2018). Na ich podstawie bez wykonywania dodatkowych eksperymentów można wyszukać potencjalne sekwencje typu *off-target* z 0 do 4 niedopasowaniami, a także określić ich lokalizację w genomie. W przedstawionej rozprawie doktorskiej wykorzystano program CRISPOR, w którym zaprojektowano komplementarne cząsteczki gRNA z miejscem PAM. Dla każdego wybranego egzonu białka TIF-IA (oraz RPA194) z wygenerowanej puli potencjalnych gRNA wybrano tylko takie, w których potencjalnych niespecyficznych miejsc cięcia będzie jak najmniej. Są również metody, które pozwalają na detekcję „*off-targets*” w populacji transfekowanych komórek. Takim przykładem jest, m.in. GUIDE-seq, który polega na dostarczeniu dwuniciowych oligonukleotydów o znanej sekwencji, które integrują do genomu podczas rekombinacji niehomologicznej, NHEJ. Zintegrowane oligonukleotydy zapewniają matrycę dla kierunkowej amplifikacji PCR, a następnie sekwencjonowania fragmentów DNA (Tsai et al., 2015). W naszym projekcie nie podjęliśmy się detekcji niespecyficznych miejsc cięcia, ponieważ te modyfikacje nie wpłynęłyby na efekt końcowy, który chcieliśmy uzyskać, a mianowicie na spodziewaną apoptozę transdukowanej komórki, wywołaną delecją TIF-IA. Ten mechanizm był zakładany od samego początku, ze względu na dobrze opisaną we wcześniejszych pracach sekwencję efektów na poziomie molekularnym po usunięciu czynnika transkrypcyjnego TIF-IA (Barut et al., 2022; Kreiner et al., 2013a, 2013b; Kreiner, Sönmez, Liss, & Parlato, 2019; Parlato et al., 2008).

5.4.4. Problemy z transdukcją LV

Jedną z przyczyn mniejszej niż oczekiwana wydajności naszego systemu w badaniach *in vivo* tj. stosunkowo niewielkiej ilości utraty neuronów w LC (pomimo nawet 6 miesięcy od indukcji mutacji), mogła być stosunkowo niska wydajność transdukcji. Może mieć ona przyczynę w sposobie dostarczenia konstruktów genetycznych – w naszym przypadku przez transdukcję z użyciem wektora

lentiwirusowego. Wykonane testy ELISA-p24, przeciwko glikoproteinie otoczki wirusa wykazały, że produkcja wirusa była na oczekiwanym poziomie. Jednak test ten ma ograniczenia: może wykrywać również niefunkcjonalne cząsteczki wirusa, które nie uległy pełnemu zapakowaniu podczas produkcji, albo uległy zniszczeniu podczas procedury izolacji. Kluczowym dla wydajności pakowania lentiwirusa jest właśnie wielkość genomu (Sweeney & Vink, 2021). Stosowany konstrukt CRISPR-DIO o wielkości 12 kbp będzie mieć stosunkowo niską wydajność, a nawet niewielkie zmniejszenie wielkości genomu o 1-2 kb może zwiększyć wydajność pakowania o rząd wielkości. Wcześniejsze prace nad wektorami lentiwirusowymi wykazały około 3-krotne zmniejszanie się miana funkcjonalnego wirusa na każdy 1 kb wzrostu wielkości genomu. Nie określono jednak bezwzględnego limitu wielkości genomu zdolnego do zapakowania w cząsteczkę wirusa, ale wykazano, że zmniejszona inkorporacja genomu do wirionów odpowiada za spadek miana. Dane te kontrastują z pracami pokazującymi, że zwiększenie rozmiaru genomu wektora miało wpływ zarówno na miano fizyczne (czyli liczbę cząstek fizycznych wirusa), jak i wydajność transdukcji (czyli odsetek transdukowanych komórek) (Sweeney & Vink, 2021). Można spekulować, że użycie innego rodzaju Cas9, a mianowicie mniejszej SaCas9 (Hunker et al., 2020; Kumar et al., 2018; Ran et al., 2015), lub CjCas9, pochodzącej od *Campylobacter jejuni*, która ma tylko 2,95 kbp (Yoo, Hennighausen, & Shin, 2018), może mieć pozytywny wpływ na zdolność zapakowania cząsteczek wirusa, a w efekcie otrzymania wyższego funkcjonalnego miana. Również wpływ na liczbę zdolnych do transdukcji cząsteczek ma jakość i czas przechowywania zamrożonego lentiwirusa, dlatego ważnym etapem było weryfikowanie partii wirusa na hodowli *in vitro*. Mimo to, brak 100% efektywności transdukcji LV nie stanowi w naszej ocenie dużego problemu, ze względu na występowanie mimo to wyraźnych efektów na poziomie fenotypu zwierząt a także z uwagi na dążenie do opracowania modelu maksymalnie translacyjnego – w PD również nie obserwuje się całkowitej degeneracji komórek w LC.

Warto również podkreślić, że wszystkie modyfikacje wielkości pakowanego genomu do wektora LV mają duże znaczenie w badaniach *in vivo*. Wydajność pakowania ma mniejsze znaczenie w przypadku kultur *in vitro*, gdzie można dodać większą ilość jednostek wirusa w większej objętości. W przypadku zastosowania metody *in vivo*, maksymalna objętość jednorazowego podania w strzykawkę jest czynnikiem ograniczającym, dlatego wydajność pakowania i ilość jednostek transdukujących w danej objętości ma dużo większe znaczenie. Zwiększenie objętości podawanego wirusa do mózgu nie spowoduje większej wydajności transdukcji w danym miejscu iniekcji, ale spowoduje rozprzestrzenienie się podanego płynu na większy obszar. Może to w efekcie spowodować przerwanie ciągłości tkanki i dostanie się płynu do komory mózgu, a w rezultacie odpłynięcie zawiesiny wirusa z miejsca podania.

Sama transdukcja poprzez lentiwirusa ma swoje wady i zalety. Podczas zastosowania lentiwirusów istnieje ryzyko mutagenyzy insercyjnej, czyli integracji genomu wirusa z genomem gospodarza co może skutkować przypadkowym wstawieniem jednej lub więcej dodatkowych par zasad nukleinowych i w efekcie odmiennym efektem mutacji od zaprojektowanego. Aby zmniejszyć ryzyko integracji, badacze zaprojektowali niedawno nieintegrujące wektory lentiwirusowe (NILV, ang. *Non-Integrating Lentiviral Vector*) do dostarczania składników CRISPR poprzez mutację genu integrazy wirusowej lub modyfikację sekwencji LTR (ang. *Long Terminal Repeats*) (Gurumoorthy, Nordin, Tye, Wan Kamarul Zaman, & Ng, 2022). NILV są najbardziej obiecującymi kandydatami jako wektory dostarczające materiał do mózgu, ponieważ mają wysoką wydajność transferu, doskonałą zdolność pakowania (w porównaniu z innymi wektorami), ulegają ekspresji przejściowej i wykazują tylko słabą zdolność integracji oraz nie powodują mutagenyzy insercyjnej (Ortinski, O'Donovan, Dong, & Kantor, 2017). Jednak w przypadku naszych badań, gdzie i tak dążyliśmy do indukcji apoptotycznej śmierci komórki, przypadkowa mutagenyza insercyjna nie stanowi problemu i nie była przedmiotem dodatkowej weryfikacji.

5.4.5. Problemy z weryfikacją skuteczności podań stereotaktycznych

Podania wirusów lub innych związków do LC są popularną metodyką używaną w badaniach układu noradrenergicznego. Takim sposobem wykazano np. że indukowana nadekspresja zmutowanej formy α -Syn w LC doprowadza do rozprzestrzenienia się α -Syn w topograficznie połączone z nim struktury, a także powoduje wzmożoną aktywność gleju w LC i częściową degenerację (Henrich et al., 2018). Również nadekspresja białka Tau, zaindukowana przez podania wirusa Cre-zależnego do LC myszy ThCre powodowała degenerację aksonów noradrenergicznych, a także transfer białka Tau do jąder szwu (Ghosh et al., 2019). Miejsce sinawe jest również częstym celem optogenetycznych regulacji (Harley & Yuan, 2021). Niestety, w wielu pracach nie raportuje się statystyki, ile z podań domózgowych do miejsca sinawego zakończyło się sukcesem. To niestety duży problem w wielu pracach metodycznych, kiedy autorzy za wszelką cenę starają się udowodnić zalety opracowanej przez nich metody. Podczas zliczeń ubytku neuronów noradrenergicznych w naszych eksperymentach zauważono pewne rozrzuty wyników w grupie zwierząt zmutowanych, co oznacza, że mutacja nie jest obecna w każdym zwierzęciu, dając uśredniony spadek komórek TH+ rzędu 16,7 % u wszystkich badanych myszy TIF-IA-CRISPR^{D^{hh}Cre}. Te spostrzeżenia, jak i poprzednie doświadczenie autorki w operacjach stereotaktycznych, potwierdzają fakt, że mniejsza struktura, jaką jest LC (~ 0,3 mm średnicy) oraz obecność komory mózgu utrudniają prawidłowe podania wektora, zmniejszając skuteczność do operacji 66,6% (oszacowane na podstawie zliczeń zwierząt z degeneracją LC). W przypadku naszych eksperymentów nie było dobrego znacznika sukcesu podania do LC, tj. innego niż zliczenia *post mortem* komórek TH+ w LC oraz analiza fenotypowa. W tym wypadku nie mogliśmy podzielić grupy operowanej na te zakończone sukcesem oraz na „nietrafione” w podaniach stereotaktycznych, ze względu na niewielkie różnice między grupami, a także brak jednoznacznego indykatora mutacji (komórki po transdukcji były usuwane). Dopiero ostatni wykonany eksperyment w Instytucie Zoologii i Badań Biomedycznych, Zakładzie Neurofizjologii i Chronobiologii na Uniwersytecie Jagiellońskim przyniósł rozwiązanie problemu. Przed pomiarami elektrofizjologicznymi została zarejestrowana przyżyciowo kurczliwość źrenicy oka każdego zwierzęcia w interwałach 10-minutowych, a przeanalizowane wyniki pozwoliły na jednoznaczne różnicowanie zwierząt zmutowanych od kontroli. Dane innych autorów pokazują, że zmiany źrenicy bezpośrednio korelują z aktywnością noradrenergiczną (Lu, van der Linden, & Bakker, 2023). Uważamy, że dodatkowa weryfikacja mutacji poprzez nagrania źrenicy jest stosunkowo łatwą i bardzo dobrą metodą do bezinwazyjnego sprawdzenia sukcesu wykonanych operacji w tym modelu, pozwalającą na jednoznacznie rozgraniczenie grup eksperymentalnych już na etapie planowania doświadczeń.

5.5. Przyszły kierunek badań z użyciem LV-CRISPR-DIO

Prowadzone przez nas badania mogą ułatwić prowadzenie edycji dowolnych genów trudnych do genetycznej izolacji populacjach komórek. Dzięki zaletom systemu CRISPR, wykorzystanemu przez nas miejsca cięcia restrykcyjnego enzymem AarI oraz sprawdzonymi metodami klonowania, możemy w szybki sposób wygenerować plazmidy z różnymi gRNA, wyciszającymi ekspresję pożądanego genów. Stworzone i zwalidowane przez nas plazmidy, umożliwiają stosunkowo łatwe i precyzyjne modyfikacje *in vitro* i *in vivo*.

Trzeba jeszcze raz pokreślić, że nie wszystkie geny są możliwe dla celowania z mutacją poprzez komórkowo-specyficznego promotora, a w przypadku, jeżeli są dostępne zwierzęta z promotorami regulujące ekspresję rekombinazy Cre, w szerszej populacji komórkowej niż docelowa, to użycie uzyskanego w tej pracy wektora LV-CRISPR-DiO daje możliwość ograniczenia transdukcji do populacji komórek z ekspresją Cre jedynie w miejscu podania LVV. Ze względu na szeroką ofertę dostępnych zwierząt ekspresjonujących Cre w różnych komórkach, także komercyjnie, wdrożone w ramach niniejszej pracy podejście metodologiczne gwarantuje szybkie osiągnięcie efektu jakim jest

uzyskane miejscowo-specyficznej mutacji w stosunkowo krótkim czasie. Dostępne są zwierzęta, gdzie Cre jest promotorem niewielkich populacji neuronalnych, jak POMC (neurony pro-opiomelanokortynynowe), Pvalb (neurony parwalbuminowe), Pcp2 (komórki Purkinjego), Drd2 (neurony ekspresjonujące receptor D2), Th (neurony ekspresjonujące hydroksylazę tyrozyny), Slc6a3 (neurony ekspresjonujące transporter dopaminy) (Shcholak & Eftekharpour, 2023). Przykładowo, jeżeli chcielibyśmy zbadać wpływ nowo odkrytego białka, które pełni rolę w PD w regulacji transmisji dopaminowej, można zastosować myszy Slc6a3-Cre i podać stereotaktycznie wektor LV-CRISPR-DiO do interesującego obszaru mózgu. Otrzymalibyśmy mutanty z wyciszeniem interesującego nas genu, z ograniczeniem do miejsca podania i populacji neuronów ekspresjonujących *Slc6a3*, w szybszy sposób niż konwencjonalne krzyżowanie zwierząt. Można również ograniczyć mutację do wąskiego obszaru mózgu albo struktury, czy w populacji neuronów, które szeroko występują w mózgu, jak np. neurony parwalbuminowe. Poprzez podania stereotaktyczne do wybranej części kory mózgowej, np. w korze prefrontalnej ograniczymy pożądaną przez nas mutację tylko do neuronów Pvalb, które ulegną transdukcji. Wyciszenie ekspresji wybranego genu w neuronach Pvalb, ograniczonej do jednej struktury pozwoli np. zbadać jak te interneurony regulują aktywność komórek piramidowych w korze przedczołowej, w efekcie badając aktywność tej struktury, która ma duży udział regulacji zdolności poznawczych (Fogaça & Duman, 2019).

Można również zasugerować zastosowanie Cre-zależnego wektora CRISPR w generowaniu mutacji w hodowlach pierwotnych neuronów z myszy transgenicznych z ekspresją Cre w subpopulacji hodowanych komórek. Zastosowanie przez nas dodatkowego markera rekombinacji – w postaci dowolnego białka fluorescencyjnego, jak choćby użyte w badaniach GFP – pozwoliłoby łatwo zidentyfikować interesujące komórki i ograniczyć analizę jedynie do neuronów, gdzie zaszła rekombinacja (tj. wykazujące ekspresję mCherry). Ponadto wprowadzony przez nas znacznik fluorescencyjny można zastosować np. do sortowania wyedytowanej populacji komórek.

Dodatkowo można zmodyfikować zaproponowany przez nas wektor. Mimo dużej wielkości plazmidu (12 kbp), można wprowadzić miejsce zawierające dodatkowy gRNA (lub więcej), co pozwoli na równoczesne usunięcie kilku różnych genów, bądź w przypadku problematycznych do wyciszenia ekspresji genów, kilku różnych miejsc w genie kodującym, co spowoduje powiększenie szansy na całkowitą delecję genu. Koncepcja taka jest już badana przez współpracującą z nami grupę na Uniwersytecie w Helsinkach, jednak w tym wypadku naukowcy próbują osiągnąć ten cel w wektorze Cre-niezależnym. Inną modyfikacją jest zamiana promotora neuronalnego hSYN na promotor astrocytarny hGFAP, tak jak to miało miejsce w opisanym przeze mnie rozdziale o weryfikacji gRNA przeciwko białku TIF-IA. Warto jednak mieć na uwadze, że każde zwiększenie wielkości DNA może mieć negatywny wpływ na jego efektywność pakowania do cząsteczki lentiwirusa (Sweeney & Vink, 2021).

Zastosowanie gRNA, które wycisza ekspresję TIF-IA daje możliwość uzyskania różnych modeli neurodegeneracji. W tym celu można wykorzystać wektor Cre-zależny, Cre-niezależny, jak i wektor z promotorem astrocytarnym. Można też zastosować celowaną ablację TIF-IA przy pomocy wektora lentiwirusowego i CRISPR/Cas9 dla wywołania degeneracji specyficznych populacji komórek w różnych obszarach mózgu celem modelowania rozwoju innych chorób neurodegeneracyjnych. Można spekulować, że tak zaindukowana degeneracja przez usunięcie czynnika TIF-IA w strukturach mózgu odpowiedzialnych za rozwijanie symptomów pozamotorycznych, mogłaby być przydatna do modelowania dodatkowych cech PD, umożliwiając badanie farmakoterapii objawów niemotorocznych, niejednokrotnie bardziej uciążliwych dla pacjentów niż np. samo drżenie spoczynkowe.

Warto podkreślić, jak już zaznaczono we wstępie tej pracy, że modele opierające się na ekspresji α -Syn nie pozwalają na modelowanie śmierci komórkowej w wielu obszarach mózgu na tyle, aby móc obserwować istotne efekty wynikające z ubytku neuronów. Połączenie modelu CRISPR-DIO wywołującego degenerację w LC z modelem agregacji α -Syn mogłoby pozwolić zbadać to, czego nie da się w modelu synukleinowym, a mianowicie jak patologia w LC uwrażliwia neurony dopaminowe w SN/VTA na czynnik patologiczny jakim jest agregacja α -Syn. Właśnie takie podejście zastosowaliśmy w eksperymentach rozszerzających opisane w tej rozprawie eksperymenty. Mysiom DbhCre podano wektor LV-CRISPR-DIO do LC, wywołując opisaną w wynikach częściową degenerację tej struktury, równocześnie do prądkowia podając PFF i indukując synukleinopatię. Na wyniki tych eksperymentów trzeba jednak jeszcze zaczekać.

Oprócz tego, realizując projekt Preludium 18, również w modelu synukleinopatii, za pomocą astrocytarnego LV-CRISPR indukując degenerację astrocytów poprzez ablację TIF-IA w regionie SN/VTA, badany jest wpływ ubytku astrocytów na szybkość pojawienia się LB w neuronach dopaminowych. Te dodatkowe aspekty w modelach synukleinopatii dają możliwość zbadania złożonych mechanizmów patofizjologicznych PD, co jest przedmiotem innych projektów komplementarnych lub zapoczątkowanych na bazie opisanego w niniejszej pracy.

5.6. Znaczenie uszkodzenia systemu noradrenergicznego we wczesnej fazie choroby Parkinsona

5.6.1. Analiza dotychczasowych badań z degeneracją LC w PD

W przedstawionej rozprawie doktorskiej zbadaliśmy, wykorzystując model progresywnego parkinsonizmu TIF-IA^{DATCreERT2} będący przedmiotem prac w innym projekcie, czy powolna śmierć neuronów dopaminowych (odtworząca progresywną patologię u ludzi) będzie miała wpływ na neurony noradrenergiczne. W tym celu w 13 tygodniu po indukcji mutacji, kiedy degeneracja SN/VTA jest już na zaawansowanym poziomie (ponad 80% spadek neuronów TH+) i myszy prezentują pełnoobjawowy fenotyp PD (spadek masy ciała, tremor, brak koordynacji ruchowej itp.) zliczono liczbę neuronów noradrenergicznych w miejscu sinawym. Nie zanotowano zmian – liczba neuronów w LC u myszy TIF-IA^{DATCreERT2} pozostawała na takim samym poziomie jak u myszy kontrolnych. Badania te potwierdziły, że degeneracja LC, która często obserwowana jest u pacjentów z PD (Halliday et al., 1990; McMillan et al., 2011; Zarow et al., 2003) nie jest efektem wtórnym progresywnej degeneracji neuronów dopaminowych w SN/VTA. Towarzystwającą degenerację LC obserwowano wprawdzie w modelach z podaniami neurotoksyn, co do końca nie jest wiarygodnym źródłem wniosków, ponieważ neurotoksyny nie ograniczają swojego działania tylko do jednego typu komórek, ale rozregulowują działanie całych układów, również poprzez wzmożoną indukcję neurozapalenia (Campos et al., 2013). W modelach genetycznych usuwających DJ-1 oraz parkinę zaobserwowano, że degeneracji SN/VTA towarzyszy również neurodegeneracja LC, jednak dotychczas nie wskazano mechanizmów, które by wyjaśniały podatność neuronów noradrenergicznych na degenerację tylko w tych konkretnych modelach genetycznych (Rousseaux et al., 2012; Von Coelln et al., 2004). Natomiast wskazano, że w modelach z indukowaną synukleinopatią, u myszy z nadekspresją α -Syn, podane PFF obwodowo wywołują również gromadzenie się α -Syn w neuronach noradrenergicznych miejsca sinawego (Van Den Berge et al., 2019). Jednak w tym modelu nie zliczano ilości komórek w celu stwierdzenia, czy występuje neurodegeneracja.

Usunięcie LC może odzwierciedlać odwrotne skutki – symptomy dysfunkcji w śródmózgowiu oraz nasilenie objawów w modelu PD. Ciekawym przykładem indukcji zmian patologicznych w LC było podanie wirusa AVV powodującego nadekspresję zmutowanej formy ludzkiej α -synukleiny

A53T. Wykazano formowanie się agregatów α -Syn, a także jej fosforylację, indukcję neurozapalenia oraz degenerację neuronów noradrenergicznych w ciągu 9 tygodni. Również wykazano transport aksonalny A53T- α -synukleiny (Henrich et al., 2018). Jednak próby odtworzenia patologii LC występującej w PD są nieliczne. Najczęściej używanym modelem indukującym śmierć neuronów noradrenergicznych jest używanie selektywnej neurotoksyny. Neurotoksyna DSP-4 (N-(2-chlorethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamina) to związek trwale zaburzający procesy magazynowania noradrenaliny w ośrodkowym układzie noradrenergicznym ssaków. Jednorazowe podanie skutkuje zniszczeniem aksonów neuronów noradrenergicznych, z często towarzyszącą degeneracją ciała komórki. Wiele grup badawczych korzystając z tej metody badało wpływ częściowej degeneracji układu noradrenergicznego na funkcjonowanie różnych układów w mózgu, jak hipokamp (Bharani, Derex, Granholm, & Ledreux, 2017; Yu, Davis, Fang, & Boulton, 1994), czy interesującą nas substancję czarną (af Bjerkén et al., 2019). Ważne jest, aby podkreślić pewne ograniczenia tej metody indukcji neurodegeneracji neuronów noradrenergicznych. Neurotoksyna ta działa preferencyjnie na jedną grupę neuronów umiejscowionych w LC, ale znaleziono dowody, że powoduje śmierć również innych neuronów NA w mózgu, jak i również udowodniono jej wpływ na obwodowe ośrodki noradrenergiczne, m.in. przejściowo obniżając wydzielanie NA w nadnerczach (Hale, Murray, Cosgrove, Bach, & Hartfield, 2000). Stosowane są różne dawki i schematy podawania tej toksyny, ograniczając jednoznaczność interpretację wywoływanych efektów (Iannitelli et al., 2023). Badacze interpretują jednoznacznie działanie DSP-4 jako degenerację układu noradrenergicznego, nie biorąc pod uwagę innych zmian, jakie ta toksyna wywołuje w układzie nerwowym. DSP-4 jest inhibitorem wychwytu zwrotnego NA, poprzez blokowanie transportera noradrenaliny (NET). Toksyna ta hamuje również inne transportery, takie jak transporter dopaminy i serotoniny (SERT). Inaktywowane jest około 80 % aktywności transportowej DAT i 60 % SERT. Neurotoksyczny efekt DSP-4 jest całkowicie nieodwracalny w NET, a tylko częściowo nieodwracalny w DAT i SERT (Bortel, 2014). Znaleziono również dowody, że powoduje wzmoczoną aktywację mikrogleju, który przez wydzielanie cytokin wpływa na wszystkie komórki w pobliżu. Mimo, że neurozapalenie towarzyszy procesom patologicznym w chorobach neurodegeneracyjnych, to stan aktywacji gleju wywołany przez podanie toksyn jest rozległy, nagły i wyciszający się w czasie (Bharani et al., 2017; Giorgi et al., 2020), w porównaniu do chronicznego stanu obecnego w patologjach PD i AD. Również samo zahamowanie wydzielania noradrenaliny jest bardzo szybkie. Obserwuje się, że pojedyncza iniekcja znacząco redukuje poziom noradrenaliny w tkankach unerwianych przez neurony noradrenergiczne już dzień po podaniu. Ubytek neuronów dopaminowych obserwowany jest po pewnym czasie od iniekcji DSP-4, jednak równocześnie znaleziono, że toksyna ta redukuje poziom glukozy w wielu strukturach mózgu, co czyni tę interakcję trudną do interpretacji, czy niekorzystny efekt wywołany jest przez redukcję poziomu noradrenaliny, czy samo działanie toksyny (Qingshan Wang, Song, Jiang, & Hong, 2021). Jednak jednymi z ważnych wniosków jest taki, że ubytek neuronów wywołanych podaniami neurotoksyny uwrażliwia neurony substancji czarnej na degenerację (Bing, Zhang, Watanabe, McEwen, & Stone, 1994; Fornai et al., 1996).

Dlatego uważamy, że nasz model indukcji degeneracji w neuronach noradrenergicznych z wykorzystaniem mechanizmów opartych o ablację TIF-IA, mimo swojej niedoskonałości, daje bardziej wiarygodne wyniki, niż podania neurotoksyny DSP-4. Nawet w obciążonym wieloma problemami modelu TIF-IA^{DbhCre} otrzymaliśmy całkiem przekonujące wyniki sugerujące zaangażowanie układu noradrenergicznego w funkcjonowanie układu dopaminowego (Barut et al., 2022). Brak neuronów noradrenergicznych wpłynął na indukcję neurozapalenia w substancji czarnej, aktywację gleju oraz podniesienie ekspresji cytokin prozapalnych tak jak w przypadku wymienionych badań z podaniami toksyny DSP-4 (Ryc. 31, Ryc. 32). Mimo braku spadku ilości neuronów dopaminowych w substancji czarnej wnioski z tych badań są zgodne z wymienionymi doniesieniami z użyciem neurotoksyn,

podnosząc wiarygodność badań ze względu genetyczny, progresywny charakter naszego modelu badawczego.

5.6.2. Potwierdzenie skuteczności LV-CRISPR-DIO w modelu TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} – analiza fenotypowa zwierząt

Wyniki uzyskane z modelu TIF-IA^{DbhCre} zachęciły nas do zgłębiania zagadnienia w oparciu o nowy model z selektywną degenacją LC. Ograniczona mutacja do ośrodkowego układu nerwowego, którą zastosowaliśmy przez bezpośrednią iniekcję wektora do LC pozwoliła uzyskać wiarygodne wyniki, które nie są maskowane potencjalnymi, obwodowymi efektami. W samym LC iniekcja wirusa skutkowałą spadkiem ilości neuronów noradrenergicznych w 6 miesiącu po indukcji mutacji o 16,7 % (Ryc. 54). Jednak średnia ta pochodzi z badań wykonywanych przed obrazowaniem źrenicy i możliwością odrzucenia „nietrafionych” mutantów (Ryc. 78, Ryc. 79). W przyszłości rutynowe mierzenie źrenic pozwoliłoby na selekcjonowanie przyżyciowo kohorty o znacznie większych spadkach TH w LC. Mutacja ta również nie powodowała aktywacji neurozapalenia, co jest dużym zarzutem w przypadku podań neurotoksyn (Ryc. 55). Analiza ekspresji mRNA w miejscu sinawym pokazała, że obniżony jest poziom ekspresji genów charakterystycznych dla neuronów noradrenergicznych – *Slc6a2*, czyli NET oraz *DBH*, czyli β -hydroksylaza dopaminy (Ryc. 58). NET rozmieszczony jest na całej powierzchni neuronu, ciele komórki, aksonach i dendrytach i bierze udział w regulacji stężenia noradrenaliny i dopaminy w przestrzeni międzysynaptycznej (Miner, Schroeter, Blakely, & Sesack, 2003). DBH jest enzymem przeprowadzającym konwersję dopaminy w noradrenalinę, utrzymując homeostazę tych dwóch monoamin. Oba te białka, kodowane przez zmierzone geny są ważnymi markerami funkcjonowania neuronów noradrenergicznych. Ich obniżenie może wpływać na zachwianie równowagi noradrenalina/dopamina, świadcząc o dysfunkcji neuronów noradrenergicznych. Równocześnie poziom mRNA *TH* oraz *Map1b*, markera neuronalnego pozostawały bez zmian. Również nie zanotowano zmian na poziomie mRNA kilku markerów funkcji komórkowych (apoptozy, stresu mitochondrialnego, stresu oksydacyjnego). Trzeba jednak zauważyć, że jeżeli nawet takie procesy z dużym prawdopodobieństwem zaszły w degenerujących komórkach w miejscu sinawym, to 6 miesięcy po iniekcji wektora nie są już obecne w badanej tkance lub są na niskim, nie ujawniających zmian poziomie. Analizy tych genów w tkance hipokampa nie ujawniły różnic między grupami, sugerując zlokalizowanie dysfunkcji w obrębie miejsca sinawego (Ryc. 59).

Uważa się, że układ noradrenergiczny, w szczególności LC jest głównym regulatorem wielkości źrenicy oka, a zmiany w jej średnicy korespondują z uwalnianiem noradrenaliny (Joshi, Li, Kalwani, & Gold, 2016; Viglione, Mazziotti, & Pizzorusso, 2023). Zmiany w opisywanych parametrach źrenicy okazały się dobrym wyznacznikiem skuteczności mutacji, co pokazaliśmy zestawiając zliczenia komórek LC oraz zapisami pomiaru źrenic. Obserwowane, bardzo duże efekty mutacji na średnią wartość minimalną i maksymalną szybkości zmiany średnicy źrenicy świadczą, że pomimo relatywnie niewielkiej utraty neuronów noradrenergicznych, mają one istotne znaczenie fizjologiczne. Możliwym jest też, że aktywność pozostałych przy życiu neuronów noradrenergicznych jest zaburzona, na co mogłyby też wskazywać zmiany w ekspresji adrenergicznego autoreceptora noradrenaliny α -2a wykryte na poziomie mRNA (Ryc. 73). Jest to interesujący wynik, gdyż tym samym stworzony model może odzwierciedlać bardzo wczesne, presymptomatyczne fazy PD, na wiele lat przed diagnozą, a obserwowane zmiany fizjologiczne w naszym modelu, mogłyby wskazywać na potencjalne markery dysfunkcji neuronów dopaminowych, lub nawet wczesnej formy PD.

Odpowiednikami ludzkich symptomów chorobowych są u myszy zaburzenia behawioralne, do pomiaru których zastosowane zostały odpowiednie testy pozwalające na ilościową analizę m.in. zaburzeń koordynacji, aktywności ruchowej myszy czy lękowości. Zwierzęta były systematycznie ważone w celu detekcji ewentualnych zaburzeń w utrzymywaniu prawidłowej masy ciała, jednak nie

stwierdzono różnicę między myszami zmutowanymi a kontrolnymi. W fenotypowaniu behawioralnym uwagę zwraca duża rozbieżność efektów upośledzenia funkcji układu noradrenergicznego w zależności od płci.

W celu oszacowania zaburzeń motorycznych u myszy wykorzystano trzy testy, jak test rotarod, test prętów statycznych oraz test otwartego pola (z dodatkową analizą zachowań lękowych). Wyniki testu rotarod pokazały, że samce myszy o genotypie mutantu utrzymywały się na pręcie krócej niż zwierzęta kontrolne, sugerując zaburzenia motoryczne w 4 i 6 miesiącu po indukcji mutacji (Ryc. 62). U samic takich zmian nie odnotowano. Również w teście statycznych prętów odnotowano różnice w szybkości pokonywania prętów o różnej średnicy u samców, ale nie u samic (Ryc. 63). Mutanty istotnie wolniej obracały się na pręcie i przechodziły jego długość. Pręt o średnicy 11 i 8 mm sprawiły kłopot zwierzętom 4 miesiące po mutacji, a zmiany nasiliły się z czasem. W 6 miesiącu po indukcji mutacji samce miały problem z przejściem pręta o jeszcze mniejszej średnicy, 15 mm. Zaburzenia motoryczne były odnotowywane już w lezjach układu noradrenergicznego wywołanego podaniem DSP-4, gdzie nie tylko sugerowano ten efekt usunięciem unerwienia noradrenergicznego, ale zmienionym oddziaływaniem na neurony dopaminowe (af Bjerkén et al., 2019). Jednak nie wszystkie zwierzęce modele choroby Parkinsona odzwierciedlają typowy motoryczny behawior. Niekiedy, nawet przy jednoznacznej degeneracji neuronów dopaminowych nie zanotowano zmian behawioralnych. Takie efekty zauważono w modelach PD z podaniami toksyn, szczególnie MPTP (Archer & Fredriksson, 2006; Marien, Colpaert, & Rosenquist, 2004). Z kolei w mysim modelu charakteryzującym się brakiem noradrenaliny, mutantach z usuniętym DBH, wykazano zaburzenia behawioru, w tym koordynacji ruchowej. Co ciekawe zaburzenia te były odwracalne podaniami noradrenaliny, lub agonistami dopaminy (K. S. Rommelfanger et al., 2007). Myszy TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} z częściową degeneracją LC nie wykazały zmian w tym teście podczas swobodnej eksploracji nowej klatki. Genotyp myszy nie wpłynął na pokonany dystans ani na czas przebywania w oświetlonym centrum klatki. Brak różnic w tych parametrach motorycznych zanotowano również w modelach PD, gdzie nie ulegały degeneracji neurony dopaminowe, jak w badaniach na mysim genetycznym modelu *Pink1* (Matheoud et al., 2019). Campos wraz ze współautorami (Campos et al., 2013) pokazali różnice między badanymi szczurzymi modelami PD, wykazując obniżenie aktywności lokomotorycznej w grupie zwierząt z nadekspresją α -synukleiny i w grupie z podaną wysoką dawką 6-OHDA. Przy podaniach mniejszej dawki 6-OHDA oraz w modelu z podaniem parakwatu nie wykazano zmian w tym teście. Jednak we wszystkich modelach zaobserwowano pogorszenie parametrów motorycznych w teście rotarod. Może to sugerować, że behawior lokomotoryczny w teście otwartego pola jest dużo czulszym testem, który nie w każdym upośledzeniu ruchowym daje istotne rezultaty. Obserwacje tych i innych grup badawczych świadczą o tym, że obniżenie aktywności lokomotorycznej nie zawsze jest wymogiem w zwierzęcych modelach PD, pomimo upośledzenia motorycznego stwierdzonego w teście rotarod i statycznych prętów.

W badaniach oceniających zachowanie zwierząt TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} wykorzystaliśmy ustalone narzędzia do oceny zachowań lękowych w mysich modelach PD, jak test jasnego/ciemnego pudełka (LDB) i podniesiony labirynt krzyżowy (EPM). Wykazaliśmy, że zwierzęta nie wykazały istotnych zmian behawioralnych w teście LDB (Ryc. 68). Jedynie grupa samców o genotypie mutantu wykazywała tendencję do zmniejszonej lękowości w 4 miesiącu po indukcji mutacji. Natomiast w teście EPM samice spędziły mniej czasu w otwartym ramieniu aparatu, a także wykonały mniej wejść do tej części aparatu, świadcząc o zwiększonej lękowości (Ryc. 69). Badane zwierzęta nie wykazywały zmian w preferencji do sacharyny w teście, który pozwala zbadać anhedonię, czyli niezdolność do odczuwania przyjemności (Ryc. 70). Samce w teście otwartego pola wykazywały tendencję (jednak brak istotnych różnic) do wydłużenia czasu spędzanego w oświetlonej części klatki, a w badaniu

przeprowadzonym 4 miesiące po indukcji mutacji, dystans eksploracji wzrastał wraz z długością przebywania w klatce (Ryc. 65, Ryc. 66).

Co ciekawe, u ludzi kobiety doświadczają większej częstości występowania zarówno zaburzeń afektywnych, jak i lękowych niż mężczyźni (Kessler et al., 2012), co może być efektem odwzorowanym w naszych wynikach behawioralnych. Natomiast ogólne wzorce behawioralne samców, otrzymane z naszych badań, są porównywalne z wcześniejszymi doniesieniami o zmniejszonym zachowaniu lękowym w teście otwartego pola u myszy (samce) z optogenetycznie zahamowanym LC (McCall et al., 2015). I również odwrotnie, optogenetyczne wzbudzenie LC indukowało lękowość u zwierząt. W badaniu analizującym funkcję różnych projekcji LC jako źródło tego efektu lękowego, sugeruje się projekcje LC do kory przedczołowej (Hirschberg, Li, Randall, Kremer, & Pickering, 2017). Również w lezji LC wywołanej DSP-4 obserwuje się ogólną tendencję do mniejszej lękowości myszy (Markussen et al., 2023).

Objawy depresyjne obserwowane w zwierzęcych modelach PD mogą obejmować zmniejszoną motywację, zmiany w interakcjach społecznych, zmiany w pamięci i nauce, a także zmiany w reakcjach na stres (ChikatiMalla et al., 2022). Uważa się, że sama degeneracja układu dopaminowego już może mieć wpływ na wystąpienie tych symptomów. Z drugiej strony, terapie przywracające dopaminę (np. L-DOPA) są zupełnie nieskuteczne w kontekście zaburzeń niemotorycznych u chorych na chorobę Parkinsona. Jednak nie wszystkie te objawy występują równocześnie, ponieważ wiele zależy od specyfiki danego modelu. Branchi i współautorzy (Branchi et al., 2008) wykazali, że w modelu redukcji dopaminy w prądkowiu, uzyskanym poprzez podania 6-OHDA bezpośrednio do prądkowia, uzyskali „łagodną” formę choroby Parkinsona (43 % spadku dopaminy). Wykazali, że takie łagodne obniżenie poziomu dopaminy wiązało się ze spadkiem zachowań lękowych, wzrostem zachowań depresyjnych i wyraźną zmianą zachowań społecznych. W innym modelu podań 6-OHDA do prądkowia uzyskano wyraźniejszy spadek dopaminy w prądkowiu (70 %), który skutkowało zachowaniami lękowymi oraz wzrostem zachowań przypominających depresję w teście TST i FST (ang. *Forced Swim Test*; test wymuszonego pływania) (Bonito-Oliva, Masini, & Fisone, 2014). Badanie to, jak znaczna większość doniesień, dotyczyło tylko samców. Również w naszych badaniach, w teście mierzącym tzw. bezradność behawioralną, która jest również miarą zachowań przypominających depresję, TST (test zawieszenia za ogon), wykazano, że samce i samice o genotypie mutantu, 6 miesięcy po iniekcji wektora wywołującego mutację mają zwiększony czas bezruchu, świadczący o obniżonej motywacji do uwolnienia się (Ryc. 67). Również obniżenie poziomu serotoniny (Ryc. 57) może być spójne z tym wynikiem, ponieważ jej deficyty wpływają na zachowania behawioralne, takie jak objawy przypominające depresję i lękowość. Przytoczone badania mogą sugerować, że otrzymany przez nas fenotyp samców jest bardziej charakterystyczny dla łagodnych/wczesnych form choroby Parkinsona. Również dane te sugerują, że sama neurodegeneracja LC odgrywa podwójną rolę, po pierwsze będąc odpowiedzialną za kilka objawów niemotorycznych, a po drugie za przyspieszenie progresji PD na poziomie substancji czarnej (Gesi et al., 2000).

Podsumowując, poprzez podania domózgowe, do LC, Cre-zależnego wektora CRISPR usuwającego białko TIF-1A w egzonie 12 otrzymaliśmy zwierzęcy model częściowej degeneracji tej struktury, potwierdzony zliczeniami komórek TH⁺ i pojawieniem się zmian motorycznych. Podanie wirusa nie powodowało wzmożonej reakcji zapalnej w miejscu podania lub czas od zmierzenia tego efektu był zbyt odległy. Ponadto, obniżeniu w rejonie LC ulega ekspresja mRNA *Net* i *Dbh*, co jest kolejnym dowodem na uszkodzenie przekąźnictwa noradrenergicznego. Zaraportowaliśmy również różnice w odpowiedzi na wywołaną mutację w zależności od płci. Wydaje się, że samice były bardziej odporne na mutację, nie wykazały zaburzeń motorycznego behawioru, które były obecne u samców. Samice wykazywały z kolei większą lękowość i objawy przypominające zachowania depresyjne.

Samce znów wykazywały zaburzenia motoryczne, wraz z zachowaniami depresyjnymi, lecz nie wykazywały większej lękowości, a wręcz przeciwnie, wykazywały nawet tendencję odwrotną. Literatura uwzględniająca samice w badaniach zaburzeń układu noradrenergicznego i jego wpływu na układ dopaminowy jest bardzo nieliczna. Brak jest odpowiednich publikacji, aby odnieść się do otrzymanych wyników. Pomimo, iż procesy neurodegeneracji LC dotyczą w podobnym stopniu samic co samców, nasze badania pokazują, że kierunek badania obu płci jest jak najbardziej uzasadniony, skoro efekty nawet tak niewielkiej mutacji, mogą być odmienne.

5.6.3. Wpływ łagodnej neurodegeneracji LC na funkcjonowanie układu dopaminowego w modelu TIF-IA-CRISPR^{DbhCre}

Charakterystyczną cechą w PD jest ubytek neuronów dopaminowych. Jednak nie wszystkie modele zwierzęce PD raportują zmniejszenie się ilości neuronów dopaminowych w SN/VTA. Niektóre modele przejawiają objawy ruchowe, zaburzenia szlaku czarno-prążkowiowego i obniżony poziom dopaminy, lecz nie stwierdzają ubytku samych neuronów dopaminowych (Giasson et al., 2006; M. S. Goldberg et al., 2003; J. Q. Li, Tan, & Yu, 2014; Pickrell et al., 2013). Sugeruje się, że taka dysregulacja działania neuronów dopaminowych może być oznaką wczesnej fazy PD. W naszych badaniach, przy częściowym uszkodzeniu LC, nie obserwujemy zaniku ciał komórkowych neuronów dopaminowych w SN/VTA (Ryc. 72). Jednak, podczas zliczeń komórek poczyniono pewne spostrzeżenia na temat gęstości włókien TH, a kolejne eksperymenty ze zliczeniem stereologicznym pomogą zweryfikować, czy istnieje wpływ uszkodzenia LC na degenerację drogi czarno-prążkowiowej. Zmniejszenie gęstości włókien TH, a w rezultacie mniej zakończeń neuronalnych w prążkowie, zostało pokazane także w modelach lezji LC z wykorzystaniem DSP4 (Iannitelli et al., 2023).

Podczas analizy mRNA stwierdzono w SN/VTA obniżony poziom transportera noradrenergicznego (NET), co może sugerować, że dociera do tej struktury mniej zakończeń z uszkodzonego LC. O pewnych cechach dysregulacji może świadczyć również podniesiony poziom miR223 (Ryc. 73). Poziom tego mikro RNA jest wskazywany jako potencjalny biomarker PD ze śliny i surowicy krwi pacjentów, choć raczej w kontekście obniżenia ekspresji miR223 (Cressatti et al., 2020; Wu et al., 2022). Natomiast badania molekularne wskazują, że miR223 jest ważnym regulatorem autofagii oraz jego deficyt związany jest z neurozapaleniem (Y. Li et al., 2019), co z kolei wydaje się zbieżne z obserwacjami dokonanymi na innych modelach opartych o ablację TIF-IA, w których obserwowano przejściowo wzrost autofagocytozy jako mechanizmu obronnego (Kreiner et al., 2013)

Dodatkowym narzędziem użytym do zbadania ilościowych zmian w poziomach monoamin, zarówno w hipokampie jak i prążkowie, była analiza homogenatów przy wykorzystaniu techniki HPLC. Częściowa degeneracja miejsca sinawego spowodowała zmiany w wydzielaniu neuroprzekazników oraz ich metabolitów. Po 4 miesiącach w hipokampie zanotowano podwyższenie średniego poziomu metabolitu dopaminy, DOPAC, w grupie samic (Ryc. 56), co mogło sugerować obecność wczesnych zmian w przetwarzaniu dopaminy. Zwiększona degradacja dopaminy doprowadza do wzrostu stężenia toksycznych metabolitów, 3,4-dihydroksyfenylacetaldehydu (DOPAL) i nadtlenku wodoru. DOPAL w następnej konwersji ulega przekształceniu w DOPAC, którego poziom został również oznaczony. W hipokampie nie udało się oznaczyć poziomu dopaminy, prawdopodobnie ze względu na jej niską wartość bazalną. W prążkowie, po 6 miesiącach od indukcji mutacji w grupie samców zaobserwowano obniżony poziom noradrenaliny i serotoniny (Ryc. 57). Zmniejszenie wydzielania noradrenaliny może być bezpośrednim symptomem dysfunkcji układu noradrenergicznego. Podobne efekty uzyskane były w modelach podań DSP-4, gdzie Yao i wsp. (Yao et al., 2015) jak i Iannitelli i wsp. (Iannitelli et al., 2023) wykazali skutki iniekcji neurotoksyny w obniżonym poziomie noradrenaliny, jednak bez redukcji liczby neuronów noradrenergicznych w LC. Serotonina natomiast powiązana jest również z dysregulacją układu dopaminowego. Oba te neurotransmitery pełnią dużą rolę

w regulacji emocjonalnych zachowań. Powiązanie serotoniny z PD odzwierciedlono w niektórych modelach choroby Parkinsona. U myszy, u których wywołano leżę dopaminergiczną poprzez podania MPTP, oprócz obniżonego poziomu dopaminy zanotowano również mniejszą ilość serotoniny (5-HT, 5-hydroksytryptamina) w prążkowie (Vučković et al., 2008; R. Yang et al., 2023). Obniżenie poziomu 5-HT związane jest z depresją, lękowością i zaburzeniami pamięci. Interakcja serotoniny z neuronami dopaminowymi ma kluczowe znaczenie przy badaniu mechanizmów działania różnych leków neuroaktywnych, w tym leków przeciwpsychotycznych (De Deurwaerdère & Di Giovanni, 2020). Badania wykazały, że układ serotoninowy jest zaangażowany w objawy lękowe u pacjentów z chorobą Parkinsona (Huot & Fox, 2013; McCance-Katz, Marek, & Price, 1992), ale mechanizmy specyficznych zmian 5-HT w patogenezie lęku związanego z PD nie zostały wcześniej zinterpretowane. Również obniżenie zdolności neuronów serotoninowych do uwalniania neuroprzekaźnika było badane u pacjentów z PD z użyciem neuroobrazowania PET. Wykazano znaczną utratę receptora serotoninowego 5-HT_{1B}, skorelowaną z nasileniem objawów motorycznych (Jørgensen et al., 2021). W tkance prążkowie nie wykazaliśmy zmian w ilości wydzielanej dopaminy, jednak wykazaliśmy podwyższenie jednego z metabolitów dopaminy, 3-metoksytyraminy (3-MT) (Ryc. 57). Poprzednie badania biochemiczne w strukturach mózgu szczurów wykazały, że 3-MT zachowuje się jak antagonistą układu noradrenergicznego, tj. przyspiesza metabolizm noradrenaliny i przeciwdziała hamującemu wpływowi amfetaminy na tempo metabolizmu noradrenaliny. Sugeruje się, że pozaneuronalny metabolit dopaminy, 3-MT odgrywa ważną rolę fizjologiczną jako ujemny regulator przeciwdziałający nadmiernej stymulacji neuronów katecholaminergicznych w prążkowie (Antkiewicz-Michaluk, Ossowska, Romańska, Michaluk, & Vetulani, 2008). Podwyższenie poziomu 3-MT może świadczyć o alternatywnie zwiększonej konwersji dopaminy, która nie jest przekształcana do noradrenaliny.

Badania proteomiczne są przydatne do zrozumienia złożonych mechanizmów biologicznych, identyfikacji białek, analizy ich struktury, funkcji oraz ilościowej i jakościowej oceny ich ekspresji w różnych warunkach. Narzędzia przesiewowe, takie jak ontologia genomiczno-proteomiczna, pokazują powiązania różnych zidentyfikowanych białek i ich genów, wytyczając kierunek, w którym może pójść dalsza, już pogłębiona analiza. W tych badaniach również wykazano dużą różnicę w zależności od płci w ilości i typie zidentyfikowanych białek. U samców myszy TIF-IA-CRISPR^{D^{hh}Cre} w SN/VTA zidentyfikowano zmiany ekspresji białek, które angażują się w procesy endocytozy komórkowej, mitochondrialnej fuzji białek, a także procesów glikolizy (Ryc. 75). Neurony, podobnie jak i wszystkie komórki, wykorzystują procesy autofagii i endocytozy do komunikacji z otoczeniem oraz utrzymania homeostazy białek i organelli. Dodatkowo, silnie spolaryzowana, postmitotyczna natura neuronów sprawiła, że zaadaptowały one te ścieżki dla swoich specyficznych funkcji komórkowych, takich jak utrzymanie puli pęcherzyków synaptycznych w presynaptycznych zakończeniach, transport aksonalny cząsteczek sygnalizacyjnych, czy internalizacja receptorów (Roney, Cheng, & Sheng, 2022). Aktualnie uznaje się, że ścieżka autofagosomalna, lizosomalna i endocytarna są ze sobą ściśle związane i współtworzą je te same cząsteczki zaangażowane w te procesy. Zaburzenie tych szlaków molekularnych w PD jest dobrze potwierdzone (Zou, Tian, & Zhang, 2021). Jednym z głównych powodów są akumulacje α -Syn oraz mutacje genów (*LLR2*, *PINK1/Parkin*, *GBA*, *ATP13A2*, *VPS35*), które związane są z tym układem (Vidyadhara, Lee, & Chandra, 2019). Jednak do tej pory nie prowadzono badań, w których bezpośrednio zbadano wpływ noradrenaliny na procesy endocytozy w neuronach dopaminowych. Nasze badania sugerują, że neurony noradrenergiczne mogą brać udział w regulacji tych procesów, a zaburzenia w ich działaniu mogą wpływać na podatność neuronów dopaminowych do dysfunkcji ścieżek endolizosomalnych. Daje to interesujący punkt wyjścia do badań nad ochronną rolą noradrenaliny w PD, np. w kontekście akumulacji α -Syn. Jednak podczas interpretacji tych wyników trzeba uwzględnić, że struktura SN/VTA jest heterogenna, złożona z różnych typów komórek (Gantz, Ford, Morikawa, & Williams, 2018), w tym również z zakończeń

neuronów noradrenergicznych, których zmiany patologiczne wywołane mutacją mogą się ujawnić podczas badań.

Ciekawą wartością dodaną do niniejszej pracy były przeprowadzone na koniec, już na osobnej kohorcie badania elektrofizjologiczne. Zaobserwowane u myszy TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} zmniejszenie spontanicznej aktywności neuronów dopaminowych było raportowane w wielu modelach PD – zarówno neurotoksycznych, genetycznych, jak i opartych na agregacji α -Syn (X. Y. Chen, Liu, Xue, & Chen, 2023). Istnieją jednak dane o nasileniu spontanicznej aktywności w późnych fazach choroby (X. Y. Chen et al., 2023). Co interesujące, w progresywnym genetycznym modelu degeneracji neuronów dopaminowych – tzw. myszach MitoPark – wykryto że spadek spontanicznej aktywności poprzedza o wiele tygodni neurodegenerację (Good et al., 2011). Jednak, z drugiej strony, w modelach farmakologicznych PD obserwowano zwiększoną aktywność erupcyjną (X. Y. Chen et al., 2023). W badanym modelu TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} obserwujemy raczej tendencję odwrotną, połączoną ze skróceniem czasu trwania erupcji oraz ze skróconymi interwałami między poszczególnymi AP w erupcji (Ryc. 82).

Istnieją doniesienia, że aktywność erupcyjna w neuronach dopaminowych może prowadzić do wzrostu wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia. Właśnie takie wysokie poziomy wewnątrzkomórkowego wapnia są postulowane jako jeden z kluczowych czynników wrażliwości neuronów dopaminowych w SN (Surmeier et al., 2017). Zaburzenia równowagi wapniowej, mogą wpływać na rozregulowanie energetyki komórkowej prowadząc do nasilenia stresu oksydacyjnego oraz do stresu siateczki śródplazmatycznej. Sprawdzenie, jak obserwowane zmiany wzorca aktywności erupcyjnej – skrócenie erupcji, ale również skrócenie interwałów pomiędzy kolejnymi wyładowaniami - wpływają na wewnątrzkomórkowe poziomy wapnia oraz czy może to mieć bezpośrednie efekty na stres oksydacyjny i stres siateczkowy, a tym samym na przeżywalność neuronów dopaminowych, byłoby niezwykle interesującym, dalszym kierunkiem badań.

Pewnym ograniczeniem przeprowadzonych przez nas pomiarów jest fakt, że większość zarejestrowanych neuronów dopaminowych znajdowała się w VTA. Dane literaturowe wskazują na odmienne mechanizmy generowania spontanicznej aktywności w obszarach SN oraz VTA, w szczególności na różne możliwości tych komórek do buforowania poziomów wapnia, co koreluje z ich różną podatnością na procesy neurodegeneracyjne (Surmeier et al., 2017). Przyjmuje się, że podział topograficzny tej struktury odpowiada za nieco inne funkcje. Charakterystyczne objawy ruchowe w PD wynikają z większej degeneracji neuronów z obszaru SN (Vaillancourt & Mitchell, 2020). Natomiast neurony dopaminowe w obszarze VTA zostały powiązane z szlakami neuronalnymi, które są dotknięte w uzależnieniu, schizofrenii, ADHD (ang. *Attention Deficit Hyperactivity Disorder*) oraz innych schorzeniach neuropsychiatrycznych (Björklund and Dunnett, 2007; Garritsen et al., 2023; Poulin et al., 2020). Dlatego wykonana przez nas rejestracja elektrofizjologicznych właściwości neuronów, głównie w części VTA jest trudna w jednoznacznej interpretacji.

Istnieje wiele hipotez, jak zmiany degeneracyjne w LC mogłyby wpłynąć na aktywność neuronów dopaminowych. Dane literaturowe wskazują, że noradrenalina może bezpośrednio aktywować receptory dopaminowe D2 i w ten sposób regulować aktywność neuronów dopaminowych (Mejias-Aponte, 2016). W rejonie SN/VTA wykazano także obecność receptorów adrenergicznych, zarówno na samych neuronach dopaminowych, interneuronach gabaergicznych, zakończeniach glutamatergicznych, jak i komórkach glejowych (Mejias-Aponte, 2016). W naszych badaniach oznaczyliśmy ekspresję mRNA receptorów adrenergicznych w obszarze SN/VTA wykazując zwiększenie ekspresji mRNA receptora α 2a-adrenergicznego (Ryc. 73). Jednak w interpretacji badań należy wziąć pod uwagę, że receptory adrenergiczne ulegają silnej regulacji na poziomie zarówno

mRNA jak i ilości i lokalizacji receptora, dlatego zmiany na poziomie mRNA można traktować jako poszlakę wskazującą na możliwość zmiany składu receptorowego.

Nie można również wykluczyć, że obserwowane zmiany aktywności neuronów dopaminowych były związane ze zmianami ilości kanałów jonowych w samych neuronach dopaminowych – tak jak to obserwowano w innych modelach PD. Z pewnością dalsze badania dotyczące zarówno mechanizmów zaburzeń aktywności elektrofizjologicznej jak i ich wewnątrzkomórkowych efektów w naszym modelu progresywnej degeneracji LC byłyby niezwykle interesujące i mogłyby rzucić nowe światło ten aspekt choroby Parkinsona, w szczególności, że przywrócenie poprawnej aktywności elektrofizjologicznej neuronów dopaminowych jest proponowane i testowane, jako możliwe podejście terapeutyczne.

W celu określenia czy obserwowane zmiany elektrofizjologiczne, opisane powyżej, korespondują ze zmianami morfologicznymi neuronów SN/VTA, w zakresie ilości synaps, oszacowano gęstość kolców dendrytycznych. Kolce dendrytyczne to struktury komórkowe zaangażowane m.in. w kompartmentalizację sygnału elektrycznego oraz biochemicznego, które są głównym miejscem tworzenia się synaps pobudzających (Righes Marafiga & Calcagnotto, 2023; Runge, Cardoso, & de Chevigny, 2020). Analiza uzyskanych wyników wskazuje na brak obserwowanych zmian w gęstości kolców dendrytycznych neuronów SN/VTA (Ryc. 83). Brak obserwowanych zmian w gęstości kolców dendrytycznych, przy jednoczesnym stwierdzeniu zmian w określonych parametrach elektrofizjologicznych neuronów dopaminowych, stanowił pewien dysonans poznawczy w gromadzonym materiale wynikowym, jednak może sugerować biochemiczną, a nie strukturalną przyczynę tych zmian. Strukturalne zmiany synaps neuronów SN/VTA nie mogą jednak zostać całkowicie wykluczone, ponieważ w powyższych badaniach nie określono wybranych parametrów morfologii kolców dendrytycznych, korelujących z siłą lokalnej pobudliwości, takich jak np. szerokość głowy kolca, bądź długość jego szyjki (Pchitskaya & Bezprozvanny, 2020). Co więcej, w związku z wykorzystaniem metody Golgiego, do wizualizacji kolców dendrytycznych komórek nerwowych, znajdujących się w rejonie SN/VTA, nie było możliwości selektywnego, ograniczonego do neuronów dopaminowych oszacowania gęstości kolców dendrytycznych. Tym samym, istnieje możliwość, że część analizowanych komórek nerwowych, to np. komórki glutaminianergiczne, których obecność potwierdzono w obszarze SN/VTA (Dobi, Margolis, Wang, Harvey, & Morales, 2010). Biorąc pod uwagę powyższe, należy z ostrożnością podchodzić do przedstawionych wyników, a dalsze badania powinny uwzględnić inną metodę wizualizacji kolców, np. barwienia DIOlistyczne (czyli wprowadzanie barwnika fluorescencyjnego bezpośrednio do pojedynczych komórek) (Staffend & Meisel, 2011), które umożliwiłyby oszacowanie wybranych parametrów morfologii kolców, w wybranej populacji neuronów. Kierunek ten jest rozwijany w naszym laboratorium we współpracy z grupą badawczą z Katedry Biocybernetyki AGH w Krakowie.

5.7. Różnice płciowe w PD

Wraz ze starzeniem się, genetyką, czynnikami środowiskowymi i stanem odporności, rola płci biologicznej jako ważnego czynnika w rozwoju PD jest szeroko dyskutowana w ostatniej dekadzie [Meara hobson]. Dane epidemiologiczne i kliniczne sugerują, że istnieją wyraźne różnice związane z płcią - PD dotyka mężczyzn dwukrotnie częściej niż kobiety (Baldereschi et al., 2000; Hirsch, Jette, Frolkis, Steeves, & Pringsheim, 2016), ale kobiety mają wyższy wskaźnik śmiertelności, szybszą progresję choroby i związane z tym wcześniejszą hospitalizację (Dahodwala, Pei, & Schmidt, 2016). Ponadto kobiety wykazują charakterystyczne objawy, a także różnice w odpowiedzi na terapie farmakologiczne i procedurę głębokiej stymulacji mózgu. Co istotne, kobiety również inaczej oceniają jakość życia z chorobą w porównaniu z mężczyznami (Georgiev, Hamberg, Hariz, Forsgren, & Hariz, 2017). Kobiety wykazują również zmieniony wzór klinicznych objawów, m.in. o około 2 lata później zapadają na tę chorobę i częściej doświadczają drżenia (Haaxma et al., 2007), Wykazano również, że objawy jak zmęczenie, depresja, zespół niespokojnych nóg, zaparcia, ból, utrata smaku lub zapachu,

zmiana masy ciała i nadmierne pocenie się są bardziej nasilone i powszechne u kobiet z PD, niż u mężczyzn (Martinez-Martin et al., 2012).

Coraz więcej grup badawczych poświęca uwagę na rozróżnienie interpretacji badań nad PD ze względu na płeć. Szczególnie dużo informacji dostarczają dane kliniczne potwierdzające konieczność osobnej interpretacji wyników. Niestety nie ma wiele takich doniesień z modeli zwierzęcych, ponieważ wiele grup badawczych nie uwzględnia płci jako czynnika rozróżniającego, a znaczna większość badań przeprowadzona jest na samcach i nie jest możliwe wykonanie analiz porównawczych. Modele farmakologiczne sugerują, że samce są bardziej podatne na neurotoksyny niż samice. Wykazano, że poziom dopaminy u samców ulega szybszej redukcji, a jako potencjalny mechanizm sugeruje się ochronne działanie estrogenów (De Miranda, Fazzari, Rocha, Castro, & Greenamyre, 2019; Dluzen, McDermott, & Liu, 1996). W modelach chronicznego podawania rezerpiny u szczurów, samice z usuniętymi jajnikami prezentowały niższą wrażliwość na efekt rezerpiny niż samice kontrolne. Również samice wykazały w tym modelu mniej nasilone motoryczne dysfunkcje oraz całkowity brak dysfunkcji kognitywnych, które były obecne u samców. Co ciekawe, u samic również nie zanotowano zmniejszenia immunoreaktywności TH w SN (Lima et al., 2021). Badania nad różnicami płciowymi wykonano również na myszach MitoPark i potwierdzono wyniki uzyskane w innych modelach. Samce myszy MitoPark wykazały bardziej dotkliwe objawy niż samice, a usunięcie jajników u samic dodatkowo wykazywało podobny przebieg czasowy jak u samców (Y. H. Chen et al., 2019).

W naszych badaniach liczebność grup pozwoliła na osobną interpretację behawioru oraz poziomu monoamin, niestety nie dysponowaliśmy już oddzielną kohortą samic i samców do badań elektrofizjologicznych i proteomiki. Istotne różnice w zależności od płci w naszym modelu zaobserwowaliśmy podczas badania motorycznego behawioru. Samce mutanty TIF-IA-CRISPR^{DbhCre} wykazały zaburzenia w koordynacji ruchowej w teście statycznych prętów w 4 miesiącu po indukcji mutacji, która nasiliła się w 6 miesiącu. Samice natomiast wykazały również różnice w motorycznych umiejętnościach w 4 miesiącu po indukcji mutacji (mniej istotną niż samce), natomiast zmiany wraz z czasem nie pogłębiły się, a wręcz przeciwnie, w 6 miesiącu nie były już istotnie zmienione między mutantami, a kontrolami (Ryc. 63). Również test rotarod wykazał brak dysfunkcji ruchowych w 6 miesiącu po indukcji mutacji u samic mutantów (Ryc. 62). Grupa samców mutantów wykazała tendencję do zmniejszonej lękowości w 4 miesiącu po indukcji mutacji, a u samic nie zatowano różnic (Ryc. 65). Natomiast w teście EPM samice wykazały cechy zwiększonej lękowości (Ryc. 69). Ostatnie doniesienia o różnicach płciowych u myszy wykazało, że samice częściej wykazują lękowy behawior, oraz co ciekawe w kontekście naszych badań, samice mają mniej neuronów noradrenergicznych w LC, ale objętość dendrytyczna jest dużo większa niż u samców (Mariscal et al., 2023). Samice nie wykazały zmian w poziomie noradrenaliny, ani serotoniny, kiedy w tym samym czasie po indukcji mutacji samce wykazywały obniżenie tych monoamin (Ryc. 57). W 4 miesiącu po indukcji mutacji samice natomiast wykazały podwyższenie metabolitu dopaminy w hipokampie (Ryc. 56).

Podsumowując to zagadnienie, wydaje się, że w naszych badaniach samice były bardziej odporne na częściową degenerację LC, nie wykazując pewnych oznak dysfunkcji, które były obecne u samców TIF-IA-CRISPR^{DbhCre}. Nasze badania potwierdzają, że płeć może mieć wpływ na przebieg chorób neurodegeneracyjnych i potwierdzają konieczność uwzględniania płci jako czynnika różnicującego grupy.

6. Podsumowanie i wnioski

1. Wykazano, że degeneracja układu noradrenergicznego u myszy TIF-IA^{DbhCre} powoduje dysfunkcje w rejonie SN/VTA, powodując wzrost markerów stanu zapalnego, stresu jąderkowego oraz – być może - wczesne oznaki procesów neurodegeneracyjnych.
2. Wykazano, wykorzystując model mysiego parkinsonizmu TIF-IA^{DATCreERT2} w zaawansowanym stadium, że degeneracja LC nie jest wtórnym efektem wynikającym z ubytku neuronów dopaminowych w SN/VTA.
3. Zaprojektowano i zwalidowano nowy wektor LV-CRISPR-DIO, który pozwala na modyfikacje neuronów, które nie posiadają specyficznego promotora komórkowego i są trudne do innego typu separacji genetycznej.
4. Pokazano, że wektor LV-CRISPR-DIO transdukuje komórki *in vitro* i *in vivo*, a usunięcie czynnika transkrypcyjnego TIF-IA powoduje śmierć zainfekowanych komórek.
5. Wykazano, że nawet niewielka, selektywna degeneracja neuronów w rejonie LC powoduje wyraźne zmiany behawioralne u zwierząt, obserwowane po dłuższym okresie od wywołania neurodegeneracji.
6. Wykazano istotne znaczenie płci w badaniach nad neurodegeneracją.
7. Uzyskano nowe dowody, że degeneracja LC ma negatywne oddziaływanie na funkcjonowanie neuronów dopaminowych, raportując zmiany na poziomie parametrów biochemicznych, molekularnych i elektrofizjologicznych.
8. Podtrzymano zasadność hipotezy, że neurodegeneracja układu noradrenergicznego może przyczynić się do zmian w funkcjonowaniu neuronów dopaminowych, które mogą być charakterystyczne w początkowej fazie PD.
9. Opisany nowy model może posłużyć badaniom innych efektów dysfunkcji układu noradrenergicznego, związanymi z zaburzeniami pamięci, snu i czuwania, co otwiera nowe możliwości dla realizacji kolejnych projektów.

Bibliografia

- Acosta, S., Fiore, L., Carota, I. A., & Oliver, G. (2018). Use of two gRNAs for CRISPR/Cas9 improves bi-allelic homologous recombination efficiency in mouse embryonic stem cells. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, 56(5), e23212. <https://doi.org/10.1002/DVG.23212>
- af Bjerken, S., Stenmark Persson, R., Barkander, A., Karalija, N., Pelegrina-Hidalgo, N., Gerhardt, G. A., ... Strömberg, I. (2019). Noradrenaline is crucial for the substantia nigra dopaminergic cell maintenance. *Neurochemistry International*, 131, 104551. <https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2019.104551>
- Ahfeldt, T., Ordureau, A., Bell, C., Sarrafha, L., Sun, C., Piccinotti, S., ... Rubin, L. L. (2020). Pathogenic Pathways in Early-Onset Autosomal Recessive Parkinson's Disease Discovered Using Isogenic Human Dopaminergic Neurons. *Stem Cell Reports*, 14(1), 75–90. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.12.005>
- Ahnaou, A., & Drinkenburg, W. H. I. M. (2022). REM sleep behavior and olfactory dysfunction: Enhancing the utility and translation of animal models in the search for precision medicines for Parkinson's disease. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 143, 104897. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2022.104897>
- Airavaara, M., Parkkinen, I., Konovalova, J., Albert, K., Chmielarz, P., & Domanskyi, A. (2020). Back and to the Future: From Neurotoxin-Induced to Human Parkinson's Disease Models. *Current Protocols in Neuroscience*, 91(1). <https://doi.org/10.1002/cpns.88>
- Alegre-Abarrategui, J., & Wade-Martins, R. (2009). Parkinson disease, LRRK2 and the endocytic-autophagic pathway. *Autophagy*, 5(8), 1208–1210. <https://doi.org/10.4161/AUTO.5.8.9894>
- Alvarez-Castelao, B., Goethals, M., Vandekerckhove, J., & Castaño, J. G. (2014). Mechanism of cleavage of alpha-synuclein by the 20S proteasome and modulation of its degradation by the RedOx state of the N-terminal methionines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1843(2), 352–365. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2013.11.018>
- Alwani, A., Maziarz, K., Burda, G., Jankowska-Kieltyka, M., Roman, A., Łyszczarz, G., ... Chmielarz, P. (2023). Investigating the potential effects of α -synuclein aggregation on susceptibility to chronic stress in a mouse Parkinson's disease model. *Pharmacological Reports*, 1, 1–14. <https://doi.org/10.1007/S43440-023-00530-Z/FIGURES/5>
- Antkiewicz-Michaluk, L., Ossowska, K., Romańska, I., Michaluk, J., & Vetulani, J. (2008). 3-Methoxytyramine, an extraneuronal dopamine metabolite plays a physiological role in the brain as an inhibitory regulator of catecholaminergic activity. *European Journal of Pharmacology*, 599(1–3), 32–35. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2008.09.033>
- Appel-Cresswell, S., Vilarino-Guell, C., Encarnacion, M., Sherman, H., Yu, I., Shah, B., ... Farrer, M. J. (2013). Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society*, 28(6), 811–813. <https://doi.org/10.1002/MDS.25421>
- Aravantinou-Fatorou, K., & Thomaidou, D. (2020). In Vitro Direct Reprogramming of Mouse and Human Astrocytes to Induced Neurons. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2155, 41–61. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0655-1_4
- Archer, T., & Fredriksson, A. (2006). Influence of noradrenaline denervation on MPTP-induced deficits in mice. *Journal of Neural Transmission*, 113(9), 1119–1129. <https://doi.org/10.1007/S00702-005-0402-5/METRICS>
- Aston-Jones, G., & Waterhouse, B. (2016). Locus Coeruleus: From Global Projection System to Adaptive Regulation of Behavior. *Brain Research*, 1645, 75. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2016.03.001>
- Bäck, S., Necarsulmer, J., Whitaker, L. R., Coke, L. M., Koivula, P., Heathward, E. J., ... Harvey, B. K. (2019). Neuron-Specific Genome Modification in the Adult Rat Brain Using CRISPR-Cas9 Transgenic Rats. *Neuron*, 102(1), 105–119.e8. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.01.035>
- Bae, S., Park, J., & Kim, J. S. (2014). Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(10), 1473–1475. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTU048>
- Baldereschi, M., Di Carlo, A., Rocca, W. A., Vanni, P., Maggi, S., Perissinotto, E., ... Inzitari, D. (2000). Parkinson's disease and parkinsonism in a longitudinal study: Two-fold higher incidence in men. *Neurology*, 55(9), 1358–1363. <https://doi.org/10.1212/WNL.55.9.1358>
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., ... Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5819), 1709–1712. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1138140>
- Barut, J., Rafa-Zabłocka, K., Jurga, A. M., Bagińska, M., Nalepa, I., Parlato, R., & Kreiner, G. (2022). Genetic lesions of the noradrenergic system trigger induction of oxidative stress and inflammation in the ventral midbrain. *Neurochemistry International*, 155. <https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2022.105302>
- Beal, M. F. (2010). Parkinson's disease: a model dilemma. *Nature 2010 466:7310*, 466(7310), S8–S10.

<https://doi.org/10.1038/466s8a>

- Beucke, J. C., Uhl, I., Plotkin, M., Winter, C., Assion, H. J., Endrass, T., ... Juckel, G. (2010). Serotonergic neurotransmission in early Parkinson's disease: A pilot study to assess implications for depression in this disorder. *World Journal of Biological Psychiatry*, *11*(6), 781–787. <https://doi.org/10.3109/15622975.2010.491127>
- Bharani, K. L., Derex, R., Granholm, A. C., & Ledreux, A. (2017). A noradrenergic lesion aggravates the effects of systemic inflammation on the hippocampus of aged rats. *PLOS ONE*, *12*(12), e0189821. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0189821>
- Bing, G., Zhang, Y., Watanabe, Y., McEwen, B. S., & Stone, E. A. (1994). Locus coeruleus lesions potentiate neurotoxic effects of MPTP in dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Brain Research*, *668*(1–2), 261–265. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)90534-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)90534-7)
- Black, J. B., Adler, A. F., Wang, H. G., D'Ippolito, A. M., Hutchinson, H. A., Reddy, T. E., ... Gersbach, C. A. (2016). Targeted Epigenetic Remodeling of Endogenous Loci by CRISPR/Cas9-Based Transcriptional Activators Directly Converts Fibroblasts to Neuronal Cells. *Cell Stem Cell*, *19*(3), 406–414. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2016.07.001>
- Blauwendraat, C., Nalls, M. A., & Singleton, A. B. (2020). The genetic architecture of Parkinson's disease. *The Lancet. Neurology*, *19*(2), 170–178. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30287-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30287-X)
- Bohnen, N. I., Studenski, S. A., Constantine, G. M., & Moore, R. Y. (2008). Diagnostic performance of clinical motor and non-motor tests of Parkinson disease: a matched case-control study. *European Journal of Neurology*, *15*(7), 685–691. <https://doi.org/10.1111/J.1468-1331.2008.02148.X>
- Bohnen, Nicolaas I., & Albin, R. L. (2011). The cholinergic system and Parkinson disease. *Behavioural Brain Research*, *221*(2), 564–573. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2009.12.048>
- Bonito-Oliva, A., Masini, D., & Fisone, G. (2014). A mouse model of non-motor symptoms in Parkinson's disease: Focus on pharmacological interventions targeting affective dysfunctions. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *8*(AUG), 104829. <https://doi.org/10.3389/FNBEH.2014.00290/BIBTEX>
- Bortel, A. (2014). Nature of DSP-4-induced neurotoxicity. *Handbook of Neurotoxicity*, *1*, 219–236. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5836-4_75/TABLES/1
- Bossy-Wetze, E., Schwarzenbacher, R., & Lipton, S. A. (2004). Molecular pathways to neurodegeneration. *Nature Medicine*, *10 Suppl*(7), S2. <https://doi.org/10.1038/NM1067>
- Braak, H., Rüb, U., Gai, W. P., & Del Tredici, K. (2003). Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria : 1996)*, *110*(5), 517–536. <https://doi.org/10.1007/S00702-002-0808-2>
- Braak, Heiko, De Vos, R. A. I., Bohl, J., & Del Tredici, K. (2006). Gastric α -synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neuroscience Letters*, *396*(1), 67–72. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2005.11.012>
- Braak, Heiko, Del Tredici, K., Rüb, U., De Vos, R. A. I., Jansen Steur, E. N. H., & Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, *24*(2), 197–211. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(02\)00065-9](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00065-9)
- Braak, Heiko, Ghebremedhin, E., Rüb, U., Bratzke, H., & Del Tredici, K. (2004). Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell and Tissue Research*. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-0956-9>
- Branchi, I., D'Andrea, I., Armida, M., Cassano, T., Pèzzola, A., Potenza, R. L., ... Alleva, E. (2008). Nonmotor symptoms in Parkinson's disease: Investigating early-phase onset of behavioral dysfunction in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat model. *Journal of Neuroscience Research*, *86*(9), 2050–2061. <https://doi.org/10.1002/JNR.21642>
- Brinkman, E. K., Chen, T., Amendola, M., & Van Steensel, B. (2014). Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic Acids Research*, *42*(22). <https://doi.org/10.1093/NAR/GKU936>
- Brinkman, E. K., Kousholt, A. N., Harmsen, T., Leemans, C., Chen, T., Jonkers, J., & Van Steensel, B. (2018). Easy quantification of template-directed CRISPR/Cas9 editing. *Nucleic Acids Research*, *46*(10), E58. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKY164>
- Brudek, T. (2019). Inflammatory Bowel Diseases and Parkinson's Disease. *Journal of Parkinson's Disease*, *9*(s2), S331–S344. <https://doi.org/10.3233/JPD-191729>
- Burré, J. (2015). The Synaptic Function of α -Synuclein. *Journal of Parkinson's Disease*, *5*(4), 699–713. <https://doi.org/10.3233/JPD-150642>
- Burré, J., Sharma, M., Tsetsenis, T., Buchman, V., Etherton, M. R., & Südhof, T. C. (2010). Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science (New York, N.Y.)*, *329*(5999), 1663–1667. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1195227>
- Cabin, D. E., Shimazu, K., Murphy, D., Cole, N. B., Gottschalk, W., McIlwain, K. L., ... Nussbaum, R. L. (2002). Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *22*(20), 8797–8807. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-20-08797.2002>

- Campos, F. L., Carvalho, M. M., Cristovão, A. C., Je, G., Baltazar, G., Salgado, A. J., ... Sousa, N. (2013). Rodent models of Parkinson's disease: Beyond the motor symptomatology. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7(NOV), 65447. <https://doi.org/10.3389/FNBEH.2013.00175/BIBTEX>
- Castro, N. G., Bjelic, J., Malhotra, G., Huang, C., & Alsaffar, S. H. (2021). Comparison of the Feasibility, Efficiency, and Safety of Genome Editing Technologies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10355–10355. <https://doi.org/10.3390/IJMS221910355>
- Ceccaldi, R., Rondinelli, B., & D'Andrea, A. D. (2016). Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends in Cell Biology*, 26(1), 52–64. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2015.07.009>
- Chandler, D. J., Gao, W. J., & Waterhouse, B. D. (2014). Heterogeneous organization of the locus coeruleus projections to prefrontal and motor cortices. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(18), 6816–6821. https://doi.org/10.1073/PNAS.1320827111/SUPPL_FILE/PNAS.201320827SI.PDF
- Chang, K. H., Huang, C. Y., Ou-Yang, C. H., Ho, C. H., Lin, H. Y., Hsu, C. L., ... Lin, C. H. (2021). In vitro genome editing rescues parkinsonism phenotypes in induced pluripotent stem cells-derived dopaminergic neurons carrying LRRK2 p.G2019S mutation. *Stem Cell Research & Therapy*, 12(1), 508. <https://doi.org/10.1186/S13287-021-02585-2>
- Chartier-Harlin, M. C., Kachergus, J., Roumier, C., Mouroux, V., Douay, X., Lincoln, S., ... Destée, A. (2004). Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet (London, England)*, 364(9440), 1167–1169. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17103-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17103-1)
- Chaudhuri, K. R., Healy, D. G., & Schapira, A. H. V. (2006). Non-motor symptoms of Parkinson's disease: Diagnosis and management. *Lancet Neurology*. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70373-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70373-8)
- Chaudhuri, K. R., & Schapira, A. H. (2009). Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *The Lancet Neurology*. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70068-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70068-7)
- Chen, M., Mao, A., Xu, M., Weng, Q., Mao, J., & Ji, J. (2019). CRISPR-Cas9 for cancer therapy: Opportunities and challenges. *Cancer Letters*, 447, 48–55. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2019.01.017>
- Chen, X. Y., Liu, C., Xue, Y., & Chen, L. (2023). Changed firing activity of nigra dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Neurochemistry International*, 162, 105465. <https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2022.105465>
- Chen, Y., Dolt, K. S., Kriek, M., Baker, T., Downey, P., Drummond, N. J., ... Kunath, T. (2019). Engineering synucleinopathy-resistant human dopaminergic neurons by CRISPR-mediated deletion of the SNCA gene. *European Journal of Neuroscience*, 49(4), 510–524. <https://doi.org/10.1111/ejn.14286>
- Chen, Y. H., Wang, V., Huang, E. Y. K., Chou, Y. C., Kuo, T. T., Olson, L., & Hoffer, B. J. (2019). Delayed dopamine dysfunction and motor deficits in female Parkinson model mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24). <https://doi.org/10.3390/IJMS20246251>
- Cheng, H. C., Ulane, C. M., & Burke, R. E. (2010). Clinical progression in Parkinson disease and the neurobiology of axons. *Annals of Neurology*, 67(6), 715–725. <https://doi.org/10.1002/ANA.21995>
- Chikatimalla, R., Dasaradhan, T., Koneti, J., Cherukuri, S. P., Kalluru, R., & Gadde, S. (2022). Depression in Parkinson's Disease: A Narrative Review. *Cureus*, 14(8). <https://doi.org/10.7759/CUREUS.27750>
- Chinta, S. J., Mallajosyula, J. K., Rane, A., & Andersen, J. K. (2010). Mitochondrial α -synuclein accumulation impairs complex I function in dopaminergic neurons and results in increased mitophagy in vivo. *Neuroscience Letters*, 486(3), 235–239. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2010.09.061>
- Chmielarz, P., & Domanskyi, A. (2021). Alpha-synuclein preformed fibrils: a tool to understand Parkinson's disease and develop disease modifying therapy. *Neural Regeneration Research*, 16(11), 2219–2221. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.310686>
- Chmielarz, P., Er, Ş., Konovalova, J., Bandres, L., Hlushchuk, I., Albert, K., ... Domanskyi, A. (2020). GDNF/RET Signaling Pathway Activation Eliminates Lewy Body Pathology in Midbrain Dopamine Neurons. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 35(12), 2279–2289. <https://doi.org/10.1002/MDS.28258>
- Chmielarz, P., & Saarma, M. (2020). Neurotrophic factors for disease-modifying treatments of Parkinson's disease: gaps between basic science and clinical studies. *Pharmacological Reports*, 72(5), 1195–1217. <https://doi.org/10.1007/S43440-020-00120-3>
- Cockey, S. G., McFarland, K. N., Koller, E. J., Brooks, M. M. T., Gonzalez De La Cruz, E., Cruz, P. E., ... Chakrabarty, P. (2021). Il-10 signaling reduces survival in mouse models of synucleinopathy. *Npj Parkinson's Disease* 2021 7:1, 7(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41531-021-00169-8>
- Concordet, J. P., & Haeussler, M. (2018). CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W242–W245. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKY354>
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., ... Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121), 819–823. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1231143/SUPPL_FILE/PAPV2.PDF
- Copped, F. (2012). Genetics and epigenetics of Parkinson's disease. *TheScientificWorldJournal*, 2012. <https://doi.org/10.1100/2012/489830>

- Corbillé, A. G., Neunlist, M., & Derkinderen, P. (2016). Cross-linking for the analysis of α -synuclein in the enteric nervous system. *Journal of Neurochemistry*, *139*(5), 839–847. <https://doi.org/10.1111/JNC.13845>
- Costa, H. N., Esteves, A. R., Empadinhas, N., & Cardoso, S. M. (2022). Parkinson's Disease: A Multisystem Disorder. *Neuroscience Bulletin* *2022 39:1*, *39*(1), 113–124. <https://doi.org/10.1007/S12264-022-00934-6>
- Costessi, L., Devescovi, G., Baralle, F. E., & Muro, A. F. (2006). Brain-specific promoter and polyadenylation sites of the β -adducin pre-mRNA generate an unusually long 3'-UTR. *Nucleic Acids Research*, *34*(1), 243–253. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKJ425>
- Cressatti, M., Juwara, L., Galindez, J. M., Velly, A. M., Nkurunziza, E. S., Marier, S., ... Schipper, H. M. (2020). Salivary microR-153 and microR-223 levels as potential diagnostic biomarkers of idiopathic Parkinson's disease. *Wiley Online LibraryM Cressatti, L Juwara, JM Galindez, AM Velly, ES Nkurunziza, S Marier, O CanieMovement Disorders, 2020•Wiley Online Library*, *35*(3), 468–477. <https://doi.org/10.1002/mds.27935>
- Dahodwala, N., Pei, Q., & Schmidt, P. (2016). Sex Differences in the Clinical Progression of Parkinson's Disease. *JOGNN - Journal of Obstetric, Gynecologic, and Neonatal Nursing*, *45*(5), 749–756. <https://doi.org/10.1016/j.jogn.2016.05.002>
- De Deurwaerdère, P., & Di Giovanni, G. (2020). Serotonin in Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(10). <https://doi.org/10.3390/IJMS21103500>
- de Lau, L. M., & Breteler, M. M. (2006). Epidemiology of Parkinson's disease. *The Lancet. Neurology*, *5*(6), 525–535. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70471-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70471-9)
- De Miranda, B. R., Fazzari, M., Rocha, E. M., Castro, S., & Greenamyre, J. T. (2019). Sex Differences in Rotenone Sensitivity Reflect the Male-to-Female Ratio in Human Parkinson's Disease Incidence. *Toxicological Sciences*, *170*(1), 133. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFZ082>
- Deveau, H., Barrangou, R., Garneau, J. E., Labonté, J., Fremaux, C., Boyaval, P., ... Moineau, S. (2008). Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bacteriology*, *190*(4), 1390–1400. <https://doi.org/10.1128/JB.01412-07>
- Dimsdale, J. E., O'Connor, D. T., Ziegler, M., & Mills, P. (1992). Chromogranin A correlates with norepinephrine release rate. *Life Sciences*, *51*(7), 519–525. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(92\)90029-0](https://doi.org/10.1016/0024-3205(92)90029-0)
- Dluzen, D. E., McDermott, J. L., & Liu, B. (1996). Estrogen as a neuroprotectant against MPTP-induced neurotoxicity in C57/B1 mice. *Neurotoxicology and Teratology*, *18*(5), 603–606. [https://doi.org/10.1016/0892-0362\(96\)00086-4](https://doi.org/10.1016/0892-0362(96)00086-4)
- Dobi, A., Margolis, E. B., Wang, H. L., Harvey, B. K., & Morales, M. (2010). Glutamatergic and Nonglutamatergic Neurons of the Ventral Tegmental Area Establish Local Synaptic Contacts with Dopaminergic and Nondopaminergic Neurons. *The Journal of Neuroscience*, *30*(1), 218. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3884-09.2010>
- Donocoff, R. S., Teteloshvili, N., Chung, H., Shoulson, R., & Creusot, R. J. (2020). Optimization of tamoxifen-induced Cre activity and its effect on immune cell populations. *Scientific Reports* *2020 10:1*, *10*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72179-0>
- Dorsey, E. R., Sherer, T., Okun, M. S., & Bloem, B. R. (2018). The Emerging Evidence of the Parkinson Pandemic. *Journal of Parkinson's Disease*, *8*(s1), S3–S8. <https://doi.org/10.3233/JPD-181474>
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014a). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science (New York, N.Y.)*, *346*(6213). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1258096>
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014b, November 28). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, Vol. 346. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- Duffy, M. F., Collier, T. J., Patterson, J. R., Kemp, C. J., Fischer, D. L., Stoll, A. C., & Sortwell, C. E. (2018). Quality over quantity: Advantages of using alpha-synuclein preformed fibril triggered synucleinopathy to model idiopathic Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroscience*, *12*(SEP). <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00621>
- Edson, A. J., Hushagen, H. A., Frøyset, A. K., Elda, I., Khan, E. A., Di Stefano, A., & Fladmark, K. E. (2019). Dysregulation in the Brain Protein Profile of Zebrafish Lacking the Parkinson's Disease-Related Protein DJ-1. *Molecular Neurobiology*, *56*(12), 8306–8322. <https://doi.org/10.1007/S12035-019-01667-W>
- Eisensehr, I., Linke, R., Noachtar, S., Schwarz, J., Gildehaus, F. J., & Tatsch, K. (2000). Reduced striatal dopamine transporters in idiopathic rapid eye movement sleep behaviour disorder. Comparison with Parkinson's disease and controls. *Brain: A Journal of Neurology*, *123* (Pt 6)(6), 1155–1160. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/123.6.1155>
- Ekstrand, M. I., Terzioglu, M., Galter, D., Zhu, S., Hofstetter, C., Lindqvist, E., ... Larsson, N. G. (2007). Progressive parkinsonism in mice with respiratory-chain-deficient dopamine neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(4), 1325–1330. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0605208103>
- Er, S., & Airavaara, M. (2023). Protective mechanisms by glial cell line-derived neurotrophic factor and cerebral dopamine neurotrophic factor against the α -synuclein accumulation in Parkinson's disease. *Biochemical Society Transactions*, *51*(1), 245–257. <https://doi.org/10.1042/BST20220770>
- Er, S., Hlushchuk, I., Airavaara, M., Chmielarz, P., & Domanskyi, A. (2020). Studying Pre-formed Fibril Induced α -Synuclein Accumulation in Primary Embryonic Mouse Midbrain Dopamine Neurons. *Journal of*

- Visualized Experiments : JoVE*, 2020(162), 1–20. <https://doi.org/10.3791/61118>
- Erwin, S. R., Sun, W., Copeland, M., Lindo, S., Spruston, N., & Cembrowski, M. S. (2020). A Sparse, Spatially Biased Subtype of Mature Granule Cell Dominates Recruitment in Hippocampal-Associated Behaviors. *Cell Reports*, 31(4). <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2020.107551>
- Feigin, V. L., Nichols, E., Alam, T., Bannick, M. S., Beghi, E., Blake, N., ... Vos, T. (2019). Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet. Neurology*, 18(5), 459–480. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30499-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30499-X)
- Fogaça, M. V., & Duman, R. S. (2019). Cortical GABAergic Dysfunction in Stress and Depression: New Insights for Therapeutic Interventions. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2019.00087>
- Fornai, F., Torracca, M. T., Bassi, L., D’Errigo, D. A., Scalori, V., & Corsini, G. U. (1996). Norepinephrine loss selectively enhances chronic nigrostriatal dopamine depletion in mice and rats. *Brain Research*, 735(2), 349–353. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(96\)00891-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00891-8)
- Gan-Or, Z., Dion, P. A., & Rouleau, G. A. (2015). Genetic perspective on the role of the autophagy-lysosome pathway in Parkinson disease. *Autophagy*, 11(9), 1443–1457. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1067364>
- Gantz, S. C., Ford, C. P., Morikawa, H., & Williams, J. T. (2018). The Evolving Understanding of Dopamine Neurons in the Substantia Nigra and Ventral Tegmental Area. <https://doi.org/10.1146/Annurev-Physiol-021317-121615>, 80, 219–241. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHYSIOL-021317-121615>
- Garcia-Leon, J. A., Vitorica, J., & Gutierrez, A. (2019). Use of human pluripotent stem cell-derived cells for neurodegenerative disease modeling and drug screening platform. *Future Medicinal Chemistry*, 11(11), 1305–1322. <https://doi.org/10.4155/FMC-2018-0520/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE2.JPEG>
- Garneau, J. E., Dupuis, M. È., Villion, M., Romero, D. A., Barrangou, R., Boyaval, P., ... Moineau, S. (2010). The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* 2010 468:7320, 468(7320), 67–71. <https://doi.org/10.1038/nature09523>
- Ge, P., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2020). PINK1 and Parkin mitochondrial quality control: a source of regional vulnerability in Parkinson’s disease. *Molecular Neurodegeneration*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/S13024-020-00367-7>
- Gemberling, M. P., Siklenka, K., Rodriguez, E., Tonn-Eisinger, K. R., Barrera, A., Liu, F., ... Gersbach, C. A. (2021). Transgenic mice for in vivo epigenome editing with CRISPR-based systems. *Nature Methods* 2021 18:8, 18(8), 965–974. <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01207-2>
- Georgiadis, J. R., Farrell, M. J., Boessen, R., Denton, D. A., Gavrilesco, M., Kortekaas, R., ... Egan, G. F. (2010). Dynamic subcortical blood flow during male sexual activity with ecological validity: A perfusion fMRI study. *NeuroImage*, 50(1), 208–216. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROIMAGE.2009.12.034>
- Georgiev, D., Hamberg, | K, Hariz, | M, Forsgren, | L, & Hariz, G.-M. (2017). Gender differences in Parkinson’s disease: a clinical perspective. *Wiley Online LibraryD Georgiev, K Hamberg, M Hariz, L Forsgren, GM HarizActa Neurologica Scandinavica*, 2017•Wiley Online Library, 136(6), 570–584. <https://doi.org/10.1111/ane.12796>
- Gernoux, G., Wilson, J. M., & Mueller, C. (2017). Regulatory and Exhausted T Cell Responses to AAV Capsid. <https://Home.Liebertpub.Com/Hum>, 28(4), 338–349. <https://doi.org/10.1089/HUM.2017.022>
- Gertsenstein, M., & Nutter, L. M. J. (2021). Production of knockout mouse lines with Cas9. *Methods (San Diego, Calif.)*, 191, 32–43. <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2021.01.005>
- Gesi, M., Soldani, P., Giorgi, F. S., Santinami, A., Bonaccorsi, I., & Fornai, F. (2000). The role of the locus coeruleus in the development of Parkinson’s disease. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 24(6), 655–668. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(00\)00028-2](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(00)00028-2)
- Ghosh, A., Torralville, S. E., Mukherjee, B., Walling, S. G., Martin, G. M., Harley, C. W., & Yuan, Q. (2019). An experimental model of Braak’s pretangle proposal for the origin of Alzheimer’s disease: the role of locus coeruleus in early symptom development. *Alzheimer’s Research & Therapy*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/S13195-019-0511-2>
- Giasson, B. I., Covy, J. P., Bonini, N. M., Hurtig, H. I., Farrer, M. J., Trojanowski, J. Q., & Van Deerlin, V. M. (2006). Biochemical and pathological characterization of Lrrk2. *Annals of Neurology*, 59(2), 315–322. <https://doi.org/10.1002/ANA.20791>
- Gibb, B., Gupta, K., Ghosh, K., Sharp, R., Chen, J., & van Duyn, G. D. (2010). Requirements for catalysis in the Cre recombinase active site. *Nucleic Acids Research*, 38(17), 5817–5832. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKQ384>
- Gibb, W. R. G., & Lees, A. J. (1988). The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson’s disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 51(6), 745–752. <https://doi.org/10.1136/JNRP.51.6.745>
- Giehl-Schwab, J., Giesert, F., Rauser, B., Lao, C. L., Hembach, S., Lefort, S., ... Wurst, W. (2022). Parkinson’s disease motor symptoms rescue by CRISPRa-reprogramming astrocytes into GABAergic neurons. *EMBO Molecular Medicine*, 14(5), e14797. <https://doi.org/10.15252/EMMM.202114797>

- Gilman, S., Koeppe, R. A., Chervin, R. D., Consens, F. B., Little, R., An, H., ... Heumann, M. (2003). REM sleep behavior disorder is related to striatal monoaminergic deficit in MSA. *Neurology*, *61*(1), 29–34. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000073745.68744.94>
- Giorgi, F. S., Biagioni, F., Galgani, A., Pavese, N., Lazzeri, G., & Fornai, F. (2020). Locus Coeruleus Modulates Neuroinflammation in Parkinsonism and Dementia. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol. 21, Page 8630, *21*(22), 8630. <https://doi.org/10.3390/IJMS21228630>
- Gjerløff, T., Fedorova, T., Knudsen, K., Munk, O. L., Nahimi, A., Jacobsen, S., ... Borghammer, P. (2015). Imaging acetylcholinesterase density in peripheral organs in Parkinson's disease with 11 C-donepezil PET. *Brain*, *138*(3), 653–663. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWU369>
- Gmitterová, K., Gawinecka, J., Heinemann, U., Valkovič, P., & Zerr, I. (2018). DNA versus RNA oxidation in Parkinson's disease: Which is more important? *Neuroscience Letters*, *662*, 22–28. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2017.09.048>
- Goldberg, J. A., Guzman, J. N., Estep, C. M., Ilijic, E., Kondapalli, J., Sanchez-Padilla, J., & Surmeier, D. J. (2012). Calcium entry induces mitochondrial oxidant stress in vagal neurons at risk in Parkinson's disease. *Nature Neuroscience*, *15*(10), 1414–1421. <https://doi.org/10.1038/NN.3209>
- Goldberg, M. S., Fleming, S. M., Palacino, J. J., Cepeda, C., Lam, H. A., Bhatnagar, A., ... Shen, J. (2003). Parkin-deficient Mice Exhibit Nigrostriatal Deficits but not Loss of Dopaminergic Neurons. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(44), 43628–43635. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308947200>
- Goldberg, M. S., Pisani, A., Haburcak, M., Vortherms, T. A., Kitada, T., Costa, C., ... Shen, J. (2005). Nigrostriatal dopaminergic deficits and hypokinesia caused by inactivation of the familial Parkinsonism-linked gene DJ-1. *Neuron*, *45*(4), 489–496. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2005.01.041>
- Gong, S., Doughty, M., Harbaugh, C. R., Cummins, A., Hatten, M. E., Heintz, N., & Gerfen, C. R. (2007). Targeting Cre recombinase to specific neuron populations with bacterial artificial chromosome constructs. *Soc NeuroscienceS Gong, M Doughty, CR Harbaugh, A Cummins, ME Hatten, N Heintz, CR GerfenJournal of Neuroscience, 2007•Soc Neuroscience*, *27*(37), 9817–9823. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2707-07.2007>
- González-Rodríguez, P., Zampese, E., Stout, K. A., Guzman, J. N., Ilijic, E., Yang, B., ... Surmeier, D. J. (2021). Disruption of mitochondrial complex I induces progressive parkinsonism. *Nature* 2021 599:7886, *599*(7886), 650–656. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04059-0>
- Good, C. H., Hoffman, A. F., Hoffer, B. J., Chefer, V. I., Shippenberg, T. S., Bäckman, C. M., ... Lupica, C. R. (2011). Impaired nigrostriatal function precedes behavioral deficits in a genetic mitochondrial model of Parkinson's disease. *The FASEB Journal*, *25*(4), 1333–1344. <https://doi.org/10.1096/FJ.10-173625>
- Grinevich, V., Knobloch-Bollmann, H. S., Roth, L. C., Althammer, F., Domanskyi, A., Vinnikov, I. A., ... Boulant, S. (2016). Somatic Transgenesis (Viral Vectors). *Molecular Neuroendocrinology: From Genome to Physiology*, 243–274. <https://doi.org/10.1002/9781118760369.CH12>
- Guo, Y., Chen, J., Ji, W., Xu, L., Xie, Y., He, S., ... Wu, Z. (2023). High-titer AAV disrupts cerebrovascular integrity and induces lymphocyte infiltration in adult mouse brain. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development*, *31*, 101102. <https://doi.org/10.1016/J.OMTM.2023.08.021>
- Gurumoorthy, N., Nordin, F., Tye, G. J., Wan Kamarul Zaman, W. S., & Ng, M. H. (2022). Non-Integrating Lentiviral Vectors in Clinical Applications: A Glance Through. *Biomedicines*, *10*(1). <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES10010107>
- Haaxma, C. A., Bloem, B. R., Borm, G. F., Oyen, W. J. G., Leenders, K. L., Eshuis, S., ... Horstink, M. W. I. M. (2007). Gender differences in Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, *78*(8), 819–824. <https://doi.org/10.1136/JNNP.2006.103788>
- Haery, L., Deverman, B. E., Matho, K. S., Cetin, A., Woodard, K., Cepko, C., ... Fan, M. (2019). Adeno-Associated Virus Technologies and Methods for Targeted Neuronal Manipulation. *Frontiers in Neuroanatomy*, *13*, 493120. <https://doi.org/10.3389/FNANA.2019.00093/BIBTEX>
- Hale, K., Murray, A. W., Cosgrove, L. J., Bach, L. A., & Hartfield, P. J. (2000). Differential effects of DSP-4 on noradrenaline level in the parietal cortex, spleen, and adrenal medulla. *Neuroscience Research Communications*, *27*(1), 67–74. [https://doi.org/10.1002/1520-6769\(200007/08\)27:1<67::AID-NRC7>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1520-6769(200007/08)27:1<67::AID-NRC7>3.0.CO;2-0)
- Halliday, G. M., Li, Y. W., Blumbergs, P. C., Joh, T. H., Cotton, R. G. H., Howe, P. R. C., ... Geffen, L. B. (1990). Neuropathology of immunohistochemically identified brainstem neurons in Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, *27*(4), 373–385. <https://doi.org/10.1002/ANA.410270405>
- Ham, S. J., Lee, D., Xu, W. J., Cho, E., Choi, S., Min, S., ... Chung, J. (2021). Loss of UCHL1 rescues the defects related to Parkinson's disease by suppressing glycolysis. *Science Advances*, *7*(28). https://doi.org/10.1126/SCIADV.ABG4574/SUPPL_FILE/ABG4574_SM.PDF
- Happe, S., Baier, P. C., Helmschmied, K., Meller, J., Tatsch, K., & Paulus, W. (2007). Association of daytime sleepiness with nigrostriatal dopaminergic degeneration in early Parkinson's disease. *Journal of Neurology*, *254*(8), 1037–1043. <https://doi.org/10.1007/S00415-006-0483-6>
- Harley, C. W., & Yuan, Q. (2021). Locus Coeruleus Optogenetic Modulation: Lessons Learned from Temporal Patterns. *Brain Sciences*, *11*(12). <https://doi.org/10.3390/BRAINSKI11121624>

- Hartmann, K., Sepulveda-Falla, D., Rose, I. V. L., Madore, C., Muth, C., Matschke, J., ... Krasemann, S. (2019). Complement 3+ astrocytes are highly abundant in prion diseases, but their abolishment led to an accelerated disease course and early dysregulation of microglia. *Acta Neuropathologica Communications*, 7(1), 83. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0735-1>
- Henchcliffe, C., & Beal, F. M. (2008). Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. *Nature Clinical Practice. Neurology*, 4(11), 600–609. <https://doi.org/10.1038/NCPNEURO0924>
- Henrich, M. T., Geibl, F. F., Lee, B., Chiu, W. H., Koprach, J. B., Brotchie, J. M., ... Oertel, W. H. (2018). A53T- α -synuclein overexpression in murine locus coeruleus induces Parkinson's disease-like pathology in neurons and glia. *Acta Neuropathologica Communications*, 6(1), 39. <https://doi.org/10.1186/S40478-018-0541-1/METRICS>
- Hickman, S., Izzy, S., Sen, P., Morsett, L., & El Khoury, J. (2018). Microglia in neurodegeneration. *Nature Neuroscience*, 21(10), 1359–1369. <https://doi.org/10.1038/S41593-018-0242-X>
- Hirsch, L., Jette, N., Frolkis, A., Steeves, T., & Pringsheim, T. (2016). The Incidence of Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neuroepidemiology*, Vol. 46, pp. 292–300. <https://doi.org/10.1159/000445751>
- Hirschberg, S., Li, Y., Randall, A., Kremer, E. J., & Pickering, A. E. (2017). Functional dichotomy in spinal- vs prefrontal-projecting locus coeruleus modules splits descending noradrenergic analgesia from ascending aversion and anxiety in rats. *ELife*, 6. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.29808>
- Hoffman-Zacharska, D., Kozirowski, D., Ross, O. A., Milewski, M., Poznański, J., Jurek, M., ... Friedman, A. (2013). Novel A18T and pA29S substitutions in α -synuclein may be associated with sporadic Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 19(11), 1057–1060. <https://doi.org/10.1016/J.PARKRELDIS.2013.07.011>
- Hoffman, R. E., Fernandez, T., Pittman, B., & Hampson, M. (2011). Elevated functional connectivity along a corticostriatal loop and the mechanism of auditory/verbal hallucinations in patients with schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 69(5), 407–414. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCH.2010.09.050>
- Hong, Y., Lu, G., Duan, J., Liu, W., & Zhang, Y. (2018). Comparison and optimization of CRISPR/dCas9/gRNA genome-labeling systems for live cell imaging. *Genome Biology*, 19(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S13059-018-1413-5/FIGURES/6>
- Hou, Y., Dan, X., Babbar, M., Wei, Y., Hasselbalch, S. G., Croteau, D. L., & Bohr, V. A. (2019). Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nature Reviews. Neurology*, 15(10), 565–581. <https://doi.org/10.1038/S41582-019-0244-7>
- Hughes, G. L., Lones, M. A., Bedder, M., Currie, P. D., Smith, S. L., & Pownall, M. E. (2020). Machine learning discriminates a movement disorder in a zebrafish model of Parkinson's disease. *Disease Models & Mechanisms*, 13(10). <https://doi.org/10.1242/DMM.045815>
- Hunker, A. C., Soden, M. E., Krayushkina, D., Heymann, G., Awatramani, R., & Zweifel, L. S. (2020). Conditional Single Vector CRISPR/SaCas9 Viruses for Efficient Mutagenesis in the Adult Mouse Nervous System HHS Public Access. *Cell Rep*, 30(12), 4303–4316. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.092>
- Huntington, T. E., & Srinivasan, R. (2021). Adeno-Associated Virus Expression of α -Synuclein as a Tool to Model Parkinson's Disease: Current Understanding and Knowledge Gaps. *Aging and Disease*, 12(4), 1120. <https://doi.org/10.14336/AD.2021.0517>
- Huot, P., & Fox, S. H. (2013). The serotonergic system in motor and non-motor manifestations of Parkinson's disease. *Experimental Brain Research*, 230(4), 463–476. <https://doi.org/10.1007/S00221-013-3621-2>
- Hussain, L. S., Reddy, V., & Maani, C. V. (2023). Physiology, Noradrenergic Synapse. *StatPearls*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK540977/>
- Iannitelli, A. F., Kelberman, M. A., Lustberg, D. J., Korukonda, A., McCann, K. E., Mulvey, B., ... Weinshenker, D. (2023). The Neurotoxin DSP-4 Dysregulates the Locus Coeruleus-Norepinephrine System and Recapitulates Molecular and Behavioral Aspects of Prodromal Neurodegenerative Disease. *ENeuro*, 10(1). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0483-22.2022>
- Ikeda, M., Kawarabayashi, T., Harigaya, Y., Sasaki, A., Yamada, S., Matsubara, E., ... Shoji, M. (2009). Motor impairment and aberrant production of neurochemicals in human alpha-synuclein A30P+A53T transgenic mice with alpha-synuclein pathology. *Brain Research*, 1250, 232–241. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2008.10.011>
- Itier, J. M., Ibáñez, P., Mena, M. A., Abbas, N., Cohen-Salmon, C., Bohme, G. A., ... García de Yébenes, J. (2003). Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse. *Human Molecular Genetics*, 12(18), 2277–2291. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDG239>
- Iyer, S. S., & Cheng, G. (2012). Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Critical Reviews in Immunology*, 32(1), 23–63. <https://doi.org/10.1615/CRITREVIMMUNOL.V32.I1.30>
- Jang, M., Bum Um, K., Jang, J., Jin Kim, H., Cho, H., Chung, S., & Park, M. K. (2015). Coexistence of glutamatergic spine synapses and shaft synapses in substantia nigra dopamine neurons. *Scientific Reports 2015 5:1*, 5(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/srep14773>

- Jensen, K. T., Fløe, L., Petersen, T. S., Huang, J., Xu, F., Bolund, L., ... Lin, L. (2017). Chromatin accessibility and guide sequence secondary structure affect CRISPR-Cas9 gene editing efficiency. *FEBS Letters*, *591*(13), 1892–1901. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12707>
- Jiang, F., & Doudna, J. A. (2017). CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annual Review of Biophysics*, *46*, 505–529. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOPHYS-062215-010822>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, *337*(6096), 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Jo, J., Yang, L., Tran, H. D., Yu, W., Sun, A. X., Chang, Y. Y., ... Je, H. S. (2021). Lewy Body-like Inclusions in Human Midbrain Organoids Carrying Glucocerebrosidase and α -Synuclein Mutations. *Annals of Neurology*, *90*(3), 490–505. <https://doi.org/10.1002/ANA.26166>
- Jørgensen, L. M., Henriksen, T., Mardosiene, S., Keller, S. H., Stenbæk, D. S., Hansen, H. D., ... Knudsen, G. M. (2021). Parkinson patients have a presynaptic serotonergic deficit: A dynamic deep brain stimulation PET study. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, *41*(8), 1954. <https://doi.org/10.1177/0271678X20982389>
- Joshi, S., Li, Y., Kalwani, R. M., & Gold, J. I. (2016). Relationships between pupil diameter and neuronal activity in the locus coeruleus, colliculi, and cingulate cortex. *Neuron*, *89*(1), 221. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2015.11.028>
- Kaasinen, V., Nurmi, E., Bergman, J., Eskola, O., Solin, O., Sonninen, P., & Rinne, J. O. (2001). Personality traits and brain dopaminergic function in Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(23), 13272–13277. <https://doi.org/10.1073/PNAS.231313198>
- Kadoguchi, N., Okabe, S., Yamamura, Y., Shono, M., Fukano, T., Tanabe, A., ... Kasahara, J. (2014). Mirtazapine has a therapeutic potency in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced mice model of Parkinson's disease. *BMC Neuroscience*, *15*(1), 79. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-15-79>
- Kang, Y., & Kitai, S. T. (1990). Electrophysiological properties of pedunclopontine neurons and their postsynaptic responses following stimulation of substantia nigra reticulata. *Brain Research*, *535*(1), 79–95. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)91826-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91826-3)
- Kantor, B., Tagliafierro, L., Gu, J., Zamora, M. E., Ilich, E., Grenier, C., ... Chiba-Falek, O. (2018). Downregulation of SNCA Expression by Targeted Editing of DNA Methylation: A Potential Strategy for Precision Therapy in PD. *Molecular Therapy*, *26*(11), 2638–2649. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.08.019>
- Kessler, R. C., Petukhova, M., Sampson, N. A., Zaslavsky, A. M., Wittchen, H., Ronald Kessler, C. C., & Wiley Online Library, in. (2012). Twelve-month and lifetime prevalence and lifetime morbid risk of anxiety and mood disorders in the United States. *Wiley Online Library* RC Kessler, M Petukhova, NA Sampson, AM Zaslavsky, HU Wittchen *International Journal of Methods in Psychiatric Research*, 2012 • Wiley Online Library, *21*(3), 169–184. <https://doi.org/10.1002/mpr.1359>
- Khatibi, S., Sahebkar, A., & Aghaee-Bakhtiari, S. H. (2021). CRISPR Genome Editing Technology and its Application in Genetic Diseases: A Review. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *22*(4), 468–479. <https://doi.org/10.2174/1389201021666200621161610>
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., ... Shimizu, N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, *392*(6676), 605–608. <https://doi.org/10.1038/33416>
- Kitada, T., Pisani, A., Porter, D. R., Yamaguchi, H., Tschertter, A., Martella, G., ... Shen, J. (2007). Impaired dopamine release and synaptic plasticity in the striatum of PINK1-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(27), 11441–11446. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0702717104>
- Knott, G. J., & Doudna, J. A. (2018, August 31). CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering. *Science*, Vol. 361, pp. 866–869. <https://doi.org/10.1126/science.aat5011>
- Koerts, J., Leenders, K. L., Koning, M., Portman, A. T., & Van Beilen, M. (2007). Striatal dopaminergic activity (FDOPA-PET) associated with cognitive items of a depression scale (MADRS) in Parkinson's disease. *The European Journal of Neuroscience*, *25*(10), 3132–3136. <https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2007.05580.X>
- Koller, E. J., Brooks, M. M. T., Golde, T. E., Giasson, B. I., & Chakrabarty, P. (2017). Inflammatory pre-conditioning restricts the seeded induction of α -synuclein pathology in wild type mice. *Molecular Neurodegeneration*, *12*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S13024-016-0142-Z/FIGURES/6>
- Konvalova, J., Er, S., Barut, J., Rafa-Zabłocka, K., Luk, K. C., Figiel, M., ... Chmielarz, P. (2022). PKB/AKT attenuates Lewy Body-like pathology in primary neurons via Cathepsins B and D. *BioRxiv*, 2022.09.23.508066. <https://doi.org/10.1101/2022.09.23.508066>
- Koonin, E. V., Makarova, K. S., & Zhang, F. (2017). Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Current Opinion in Microbiology*, *37*, 67–78. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2017.05.008>
- Kouroupi, G., Antoniou, N., Prodromidou, K., Taoufik, E., & Matsas, R. (2020). Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cell-Based Models in Parkinson's Disease for Drug Identification. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol. 21, Page 7113, *21*(19), 7113. <https://doi.org/10.3390/IJMS21197113>

- Kramer, N. J., Haney, M. S., Morgens, D. W., Jovičić, A., Couthouis, J., Li, A., ... Gitler, A. D. (2018). CRISPR-Cas9 screens in human cells and primary neurons identify modifiers of C9ORF72 dipeptide-repeat-protein toxicity. *Nature Genetics*, *50*(4), 603–612. <https://doi.org/10.1038/S41588-018-0070-7>
- Kreiner. (2015). Compensatory mechanisms in genetic models of neurodegeneration: Are the mice better than humans? *Frontiers in Cellular Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00056>
- Kreiner, G., Bierhoff, H., Armentano, M., Rodriguez-Parkitna, J., Sowodniok, K., Naranjo, J. R., ... Parlato, R. (2013a). A neuroprotective phase precedes striatal degeneration upon nucleolar stress. *Cell Death and Differentiation*. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.66>
- Kreiner, G., Bierhoff, H., Armentano, M., Rodriguez-Parkitna, J., Sowodniok, K., Naranjo, J. R., ... Parlato, R. (2013b). A neuroprotective phase precedes striatal degeneration upon nucleolar stress. *Cell Death and Differentiation*, *20*(11), 1455–1464. <https://doi.org/10.1038/CDD.2013.66>
- Kreiner, G., Rafa-Zablocka, K., Barut, J., Chmielarz, P., Kot, M., Bagińska, M., ... Nalepa, I. (2019). Stimulation of noradrenergic transmission by reboxetine is beneficial for a mouse model of progressive parkinsonism. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41756-3>
- Kreiner, G., Sönmez, A., Liss, B., & Parlato, R. (2019). Integration of the deacetylase SIRT1 in the response to nucleolar stress: Metabolic implications for neurodegenerative diseases. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *12*, 450858. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00106>
- Kristianto, J., Johnson, M. G., Zastrow, R. K., Radcliff, A. B., & Blank, R. D. (2017). Spontaneous recombinase activity of Cre-ERT2 in vivo. *Transgenic Research*, *26*(3), 411–417. <https://doi.org/10.1007/S11248-017-0018-1>
- Kumar, N., Stanford, W., de Solis, C., Aradhana, Abraham, N. D., Dao, T. M. J., ... Ploski, J. E. (2018). The Development of an AAV-Based CRISPR SaCas9 Genome Editing System That Can Be Delivered to Neurons in vivo and Regulated via Doxycycline and Cre-Recombinase. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *11*. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2018.00413>
- Kurihara, K., Nakagawa, R., Ishido, M., Yoshinaga, Y., Watanabe, J., Hayashi, Y., ... Tsuboi, Y. (2020). Impact of motor and nonmotor symptoms in Parkinson disease for the quality of life: The Japanese Quality-of-Life Survey of Parkinson Disease (JAQPAD) study. *Journal of the Neurological Sciences*, *419*. <https://doi.org/10.1016/J.JNS.2020.117172>
- Kuzumaki, N., Suda, Y., Iwasawa, C., Narita, M., Sone, T., Watanabe, M., ... Narita, M. (2019). Cell-specific overexpression of COMT in dopaminergic neurons of Parkinson's disease. *Brain*, *142*(6), 1675–1689. <https://doi.org/10.1093/brain/awz084>
- Langley, M. R., Ghaisas, S., Ay, M., Luo, J., Palanisamy, B. N., Jin, H., ... Kanthasamy, A. G. (2018). Manganese exposure exacerbates progressive motor deficits and neurodegeneration in the MitoPark mouse model of Parkinson's disease: Relevance to gene and environment interactions in metal neurotoxicity. *NeuroToxicology*, *64*, 240–255. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2017.06.002>
- Langston, J. W. (2017). The MPTP Story. *Journal of Parkinson's Disease*, *7*(Suppl 1), S11. <https://doi.org/10.3233/JPD-179006>
- Lavin, T. K., Jin, L., Lea, N. E., & Wickersham, I. R. (2020). Monosynaptic Tracing Success Depends Critically on Helper Virus Concentrations. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, *12*, 492637. <https://doi.org/10.3389/FNSYN.2020.00006/BIBTEX>
- Lee, C. M., Davis, T. H., & Bao, G. (2018). Examination of CRISPR/Cas9 design tools and the effect of target site accessibility on Cas9 activity. *Experimental Physiology*, *103*(4), 456–460. <https://doi.org/10.1113/EP086043>
- Lee, S., Sterky, F. H., Mourier, A., Terzioglu, M., Cullheim, S., Olson, L., & Larsson, N. G. (2012). Mitofusin 2 is necessary for striatal axonal projections of midbrain dopamine neurons. *Human Molecular Genetics*, *21*(22), 4827–4835. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDS352>
- Lesage, S., Anheim, M., Letournel, F., Bousset, L., Honoré, A., Rozas, N., ... Brice, A. (2013). G51D α -synuclein mutation causes a novel Parkinsonian–pyramidal syndrome. *Annals of Neurology*, *73*(4), 459–471. <https://doi.org/10.1002/ANA.23894>
- Lesage, S., Dürr, A., Tazir, M., Lohmann, E., Leutenegger, A.-L., Janin, S., ... Brice, A. (2006). LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in North African Arabs. *The New England Journal of Medicine*, *354*(4), 422–423. <https://doi.org/10.1056/NEJMC055540>
- Li, H., Wu, S., Ma, X., Li, X., Cheng, T., Chen, Z., ... Hu, X. (2021). Co-editing PINK1 and DJ-1 Genes Via Adeno-Associated Virus-Delivered CRISPR/Cas9 System in Adult Monkey Brain Elicits Classical Parkinsonian Phenotype. *Neuroscience Bulletin*, *37*(9), 1271–1288. <https://doi.org/10.1007/S12264-021-00732-6/FIGURES/5>
- Li, J. Q., Tan, L., & Yu, J. T. (2014). The role of the LRRK2 gene in Parkinsonism. *Molecular Neurodegeneration*, *9*, 47. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-9-47>
- Li, Q., & Barres, B. A. (2018, April 1). Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nature Reviews Immunology*, Vol. 18, pp. 225–242. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.125>
- Li, Y., Zhou, D., Ren, Y., Zhang, Z., Guo, X., Ma, M. K., ... Zhang, R. (2019). Mir223 restrains autophagy and promotes CNS inflammation by targeting ATG16L1. *Autophagy*, *15*(3), 478–492.

- <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1522467>
- LiddeLow, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., ... Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, *541*(7638), 481–487. <https://doi.org/10.1038/nature21029>
- Lill, C. M. (2016). Genetics of Parkinson's disease. *Molecular and Cellular Probes*, *30*(6), 386–396. <https://doi.org/10.1016/J.MCP.2016.11.001>
- Lima, A. C., Meurer, Y. S. R., Bioni, V. S., Cunha, D. M. G., Gonçalves, N., Lopes-Silva, L. B., ... Silva, R. H. (2021). Female Rats Are Resistant to Cognitive, Motor and Dopaminergic Deficits in the Reserpine-Induced Progressive Model of Parkinson's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *13*. <https://doi.org/10.3389/FNAGI.2021.757714>
- Lu, H., van der Linden, D., & Bakker, A. B. (2023). Changes in pupil dilation and P300 amplitude indicate the possible involvement of the locus coeruleus-norepinephrine (LC-NE) system in psychological flow. *Scientific Reports 2023 13:1*, *13*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-28781-z>
- Luk, K. C., Kehm, V., Carroll, J., Zhang, B., O'Brien, P., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. Y. (2012). Pathological α -Synuclein Transmission Initiates Parkinson-like Neurodegeneration in Non-transgenic Mice. *Science (New York, N.Y.)*, *338*(6109), 949. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1227157>
- Luk, K. C., Song, C., O'Brien, P., Stieber, A., Branch, J. R., Brunden, K. R., ... Lee, V. M. Y. (2009). Exogenous alpha-synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(47), 20051–20056. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0908005106>
- Ma, H., Tu, L. C., Naseri, A., Huisman, M., Zhang, S., Grunwald, D., & Pederson, T. (2016). Multiplexed labeling of genomic loci with dCas9 and engineered sgRNAs using CRISPRainbow. *Nature Biotechnology* *2016 34:5*, *34*(5), 528–530. <https://doi.org/10.1038/nbt.3526>
- Madisen, L., Mao, T., Koch, H., Zhuo, J. M., Berenyi, A., Fujisawa, S., ... Zeng, H. (2012). A toolbox of Cre-dependent optogenetic transgenic mice for light-induced activation and silencing. *Nature Neuroscience*, *15*(5), 793–802. <https://doi.org/10.1038/NN.3078>
- Mahato, A. K., Kopra, J., Renko, J. M., Visnapuu, T., Korhonen, I., Pulkkinen, N., ... Saarma, M. (2020). Glial cell line-derived neurotrophic factor receptor Rearranged during transfection agonist supports dopamine neurons in Vitro and enhances dopamine release In Vivo. *Movement Disorders*, *35*(2), 245–255. <https://doi.org/10.1002/mds.27943>
- Maletic, V., Eramo, A., Gwin, K., Offord, S. J., & Duffy, R. A. (2017). The role of norepinephrine and its α -adrenergic receptors in the pathophysiology and treatment of major depressive disorder and schizophrenia: A systematic Review. *Frontiers in Psychiatry*, *8*(MAR), 249925. <https://doi.org/10.3389/FPSYT.2017.00042/BIBTEX>
- Marié, R. M., Barré, L., Viader, F., Defer, G., Dupuy, B., & Baron, J. C. (1998). Relationships between striatal dopamine (DA) denervation and executive dysfunction in Parkinson's disease (PD). *NeuroImage*, *7*(4 PART II). [https://doi.org/10.1016/s1053-8119\(18\)31118-2](https://doi.org/10.1016/s1053-8119(18)31118-2)
- Marien, M. R., Colpaert, F. C., & Rosenquist, A. C. (2004). Noradrenergic mechanisms in neurodegenerative diseases: a theory. *Brain Research Reviews*, *45*(1), 38–78. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESREV.2004.02.002>
- Mariscal, P., Bravo, L., Llorca-Torralla, M., Razquin, J., Miguelez, C., Suárez-Pereira, I., & Berrocoso, E. (2023). Sexual differences in locus coeruleus neurons and related behavior in C57BL/6J mice. *Biology of Sex Differences*, *14*(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/S13293-023-00550-7/TABLES/4>
- Markussen, N. B., Knopper, R. W., Hasselholt, S., Skoven, C. S., Nyengaard, J. R., Østergaard, L., & Hansen, B. (2023). Locus coeruleus ablation in mice: protocol optimization, stereology and behavioral impact. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *17*, 1138624. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2023.1138624/FULL>
- Martinez-Martin, P., Pecurariu, C. F., Odin, P., Van Hilten, J. J., Antonini, A., Rojo-Abuin, J. M., ... Chaudhuri, K. R. (2012). Gender-related differences in the burden of non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Journal of Neurology*, *259*(8), 1639–1647. <https://doi.org/10.1007/S00415-011-6392-3>
- Masilamoni, G. J., Groover, O., & Smith, Y. (2017). Reduced noradrenergic innervation of ventral midbrain dopaminergic cell groups and the subthalamic nucleus in MPTP-treated parkinsonian monkeys. *Neurobiology of Disease*, *100*, 9. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2016.12.025>
- Maslah, E., Rockenstein, E., Veinbergs, I., Mallory, M., Hashimoto, M., Takeda, A., ... Mucke, L. (2000). Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science (New York, N.Y.)*, *287*(5456), 1265–1269. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.287.5456.1265>
- Matheoud, D., Cannon, T., Voisin, A., Penttinen, A. M., Ramet, L., Fahmy, A. M., ... Desjardins, M. (2019). Intestinal infection triggers Parkinson's disease-like symptoms in Pink1^{-/-} mice. *Nature*, *571*(7766), 565–569. <https://doi.org/10.1038/S41586-019-1405-Y>
- McCall, J. G., Al-Hasani, R., Siuda, E. R., Hong, D. Y., Norris, A. J., Ford, C. P., & Bruchas, M. R. (2015). CRH Engagement of the Locus Coeruleus Noradrenergic System Mediates Stress-Induced Anxiety. *Neuron*, *87*(3), 605–620. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2015.07.002>

- McCance-Katz, E. F., Marek, K. L., & Price, L. H. (1992). Serotonergic dysfunction in depression associated with Parkinson's disease. *Neurology*, *42*(9), 1813–1814. <https://doi.org/10.1212/WNL.42.9.1813>
- McKinney, A., Hu, M., Hoskins, A., Mohammadyar, A., Naeem, N., Jing, J., ... Jiang, X. (2023). Cellular composition and circuit organization of the locus coeruleus of adult mice. *ELife*, *12*. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.80100>
- McMillan, P. J., White, S. S., Franklin, A., Greenup, J. L., Leverenz, J. B., Raskind, M. A., & Szot, P. (2011). Differential response of the central noradrenergic nervous system to the loss of locus coeruleus neurons in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *Brain Research*, *1373*, 240–252. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2010.12.015>
- Mejias-Aponte, C. A. (2016). Specificity and impact of adrenergic projections to the midbrain dopamine system. *Brain Research*, *1641*, 258–273. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2016.01.036>
- Meredith, G. E., & Rademacher, D. J. (2011). MPTP Mouse Models of Parkinson's Disease: An Update. *Journal of Parkinson's Disease*, *1*(1), 19. <https://doi.org/10.3233/JPD-2011-11023>
- Miner, L. H., Schroeter, S., Blakely, R. D., & Sesack, S. R. (2003). Ultrastructural Localization of the Norepinephrine Transporter in Superficial and Deep Layers of the Rat Prelimbic Prefrontal Cortex and Its Spatial Relationship to Probable Dopamine Terminals. *Journal of Comparative Neurology*, *466*(4), 478–494. <https://doi.org/10.1002/CNE.10898>
- Mizutani, Y., Ito, S., Murate, K., Hirota, S., Fukui, T., Hikichi, C., ... Mutoh, T. (2015). Retrospective analysis of parkinsonian patients exhibiting normal 123I-MIBG cardiac uptake. *Journal of the Neurological Sciences*, *359*(1–2), 236–240. <https://doi.org/10.1016/J.JNS.2015.10.059>
- Mogi, M., Harada, M., Narabayashi, H., Inagaki, H., Minami, M., & Nagatsu, T. (1996). Interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor- α levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, *211*(1), 13–16. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(96\)12706-3](https://doi.org/10.1016/0304-3940(96)12706-3)
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Almendros, C. (2009). Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology (Reading, England)*, *155*(Pt 3), 733–740. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.023960-0>
- Moon, S. Bin, Kim, D. Y., Ko, J. H., Kim, J. S., & Kim, Y. S. (2019). Improving CRISPR Genome Editing by Engineering Guide RNAs. *Trends in Biotechnology*, *37*(8), 870–881. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2019.01.009>
- Moustafa, A. A., Chakravarthy, S., Phillips, J. R., Gupta, A., Keri, S., Polner, B., ... Jahanshahi, M. (2016). Motor symptoms in Parkinson's disease: A unified framework. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *68*, 727–740. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2016.07.010>
- Movement, M. E.-M. disorders: official journal of the, & 2003, undefined. (2003). What causes mental dysfunction in Parkinson's disease? *Wiley Online Library/M Emre Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society, 2003•Wiley Online Library*, *18*(SUPPL. 6). <https://doi.org/10.1002/mds.10565>
- Murai, T., Müller, U., Werheid, K., Sorger, D., Reuter, M., Becker, T., ... Barthel, H. (2001). In vivo evidence for differential association of striatal dopamine and midbrain serotonin systems with neuropsychiatric symptoms in Parkinson's disease. *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, *13*(2), 222–228. <https://doi.org/10.1176/JNP.13.2.222>
- Neal, M., Luo, J., Harischandra, D. S., Gordon, R., Sarkar, S., Jin, H., ... Kanthasamy, A. (2018). Prokineticin-2 promotes chemotaxis and alternative A2 reactivity of astrocytes. *GLIA*, *66*(10), 2137–2157. <https://doi.org/10.1002/glia.23467>
- Nestler, Hyman, Holtzman, & Malenka. (2020). *Nestler, Hyman & Malenka's Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience, 4e | AccessNeurology | McGraw Hill Medical*. Retrieved from <https://neurology.mhmedical.com/book.aspx?bookID=2963>
- Oaks, A. W., Frankfurt, M., Finkelstein, D. I., & Sidhu, A. (2013). Age-dependent effects of A53T alpha-synuclein on behavior and dopaminergic function. *PloS One*, *8*(4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0060378>
- Obara, Y., Imai, T., Sato, H., Takeda, Y., Kato, T., & Ishii, K. (2017). Midnolin is a novel regulator of parkin expression and is associated with Parkinson's Disease. *Scientific Reports*, *7*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05456-0>
- Ortinski, P. I., O'Donovan, B., Dong, X., & Kantor, B. (2017). Integrase-Deficient Lentiviral Vector as an All-in-One Platform for Highly Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Gene Editing. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development*, *5*, 153–164. <https://doi.org/10.1016/J.OMTM.2017.04.002>
- Ossowska, K., Wardas, J., Śmiałowska, M., Kuter, K., Lenda, T., Wierońska, J. M., ... Wolfarth, S. (2005). A slowly developing dysfunction of dopaminergic nigrostriatal neurons induced by long-term paraquat administration in rats: An animal model of preclinical stages of Parkinson's disease? *European Journal of Neuroscience*, *22*(6), 1294–1304. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04301.x>
- Papadimitriou, E., Koutsoudaki, P. N., Thanou, I., Karagkouni, D., Karamitros, T., Chroni-Tzartou, D., ... Thomaidou, D. (2023). A miR-124-mediated post-transcriptional mechanism controlling the cell fate switch

- of astrocytes to induced neurons. *Stem Cell Reports*, 18(4), 915–935. <https://doi.org/10.1016/J.STEMCR.2023.02.009>
- Papathanou, M., Dumas, S., Pettersson, H., Olson, L., & Wallén-Mackenzie, Å. (2019). Off-Target Effects in Transgenic Mice: Characterization of Dopamine Transporter (DAT)-Cre Transgenic Mouse Lines Exposes Multiple Non-Dopaminergic Neuronal Clusters Available for Selective Targeting within Limbic Neurocircuitry. *ENeuro*, 6(5). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0198-19.2019>
- Parkinson's disease — Level 3 cause | The Institute for Health Metrics and Evaluation, 2020.* (n.d.). Retrieved from https://www.healthdata.org/results/gbd_summaries/2019/parkinsons-disease-level-3-cause
- Parkinson, J. (2002). NEUROPSYCHIATRY CLASSICS An Essay on the Shaking Palsy Member of the Royal College of Surgeons PREFACE. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 14(2).
- Parlato, R., & Kreiner, G. (2013). Nucleolar activity in neurodegenerative diseases: a missing piece of the puzzle? *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 91(5), 541. <https://doi.org/10.1007/S00109-012-0981-1>
- Parlato, R., Kreiner, G., Erdmann, G., Rieker, C., Stotz, S., Savenkova, E., ... Schütz, G. (2008). Activation of an endogenous suicide response after perturbation of rRNA synthesis leads to neurodegeneration in mice. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2439-08.2008>
- Pavese, N., Metta, V., Simpson, B. S., Marphy, T. A., Ramlackhansingh, A., Chaudhuri, K. R., & Brooks, D. J. (2012). 1.060 SLEEP REGULATORY CENTRES DYSFUNCTION IN PARKINSON'S DISEASE PATIENTS WITH EXCESSIVE DAYTIME SLEEPINESS. AN IN VIVO PET STUDY. *Parkinsonism & Related Disorders*, 18, S24–S25. [https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(11\)70174-2](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(11)70174-2)
- Pchitskaya, E., & Bezprozvanny, I. (2020). Dendritic Spines Shape Analysis—Classification or Clusterization? Perspective. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 12, 556375. <https://doi.org/10.3389/FNSYN.2020.00031/BIBTEX>
- Pickrell, A. M., Pinto, M., & Moraes, C. T. (2013). Mouse models of Parkinson's disease associated with mitochondrial dysfunction. *Molecular and Cellular Neuroscience*, Vol. 55, pp. 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2012.08.002>
- Pinto, M., Nissanka, N., Peralta, S., Brambilla, R., Diaz, F., & Moraes, C. T. (2016). Pioglitazone ameliorates the phenotype of a novel Parkinson's disease mouse model by reducing neuroinflammation. *Molecular Neurodegeneration*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/S13024-016-0090-7>
- Platt, R. J., Chen, S., Zhou, Y., Yim, M. J., Swiech, L., Kempton, H. R., ... Zhang, F. (2014). CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell*, 159(2), 440–455. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.014>
- Poe, G. R., Foote, S., Eschenko, O., Johansen, J. P., Bouret, S., Aston-Jones, G., ... Sara, S. J. (2020). Locus coeruleus: a new look at the blue spot. *Nature Reviews. Neuroscience*, 21(11), 644. <https://doi.org/10.1038/S41583-020-0360-9>
- Polymeropoulos, M. H., Higgins, J. J., Golbe, L. I., Johnson, W. G., Ide, S. E., Di Iorio, G., ... Duvoisin, R. C. (1996). Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5290), 1197–1199. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.274.5290.1197>
- Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., ... Nussbaum, R. L. (1997). Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 276(5321), 2045–2047. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.276.5321.2045/ASSET/B8D7EAD8-394A-404C-83B7-CADE1B02415A/ASSETS/GRAPHIC/SE2775400004.JPEG>
- Potting, C., Crochemore, C., Moretti, F., Nigsch, F., Schmidt, I., Manneville, C., ... Helliwell, S. B. (2017). Genome-wide CRISPR screen for PARKIN regulators reveals transcriptional repression as a determinant of mitophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(2), E180–E189. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711023115>
- Proukakis, C., Dudzik, C. G., Brier, T., MacKay, D. S., Cooper, J. M., Millhauser, G. L., ... Schapira, A. H. (2013). A novel α -synuclein missense mutation in Parkinson disease. *Neurology*, 80(11), 1062–1064. <https://doi.org/10.1212/WNL.0B013E31828727BA>
- Pu, J., Gao, T., Zheng, R., Fang, Y., Ruan, Y., Jin, C., ... Zhang, B. (2020). Parkin mutation decreases neurite complexity and maturation in neurons derived from human fibroblasts. *Brain Research Bulletin*, 159, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2020.03.006>
- Qamar, M. A., Sauerbier, A., Politis, M., Carr, H., Loehrer, P., & Chaudhuri, K. R. (2017). Presynaptic dopaminergic terminal imaging and non-motor symptoms assessment of Parkinson's disease: evidence for dopaminergic basis? *Npj Parkinson's Disease* 2017 3:1, 3(1), 1–20. <https://doi.org/10.1038/s41531-016-0006-9>
- Qu, L., Lin, B., Zeng, W., Fan, C., Wu, H., Ge, Y., ... Cang, C. (2022). Lysosomal K⁺ channel TMEM175 promotes apoptosis and aggravates symptoms of Parkinson's disease. *EMBO Reports*, 23(9), e53234. <https://doi.org/10.15252/EMBR.202153234>
- Quintino, L., Avallone, M., Brännstrom, E., Kavanagh, P., Lockowandt, M., Garcia Jareño, P., ... Lundberg, C. (2018). GDNF-mediated rescue of the nigrostriatal system depends on the degree of degeneration. *Gene Therapy* 2018 26:1, 26(1), 57–64. <https://doi.org/10.1038/s41434-018-0049-0>
- Ramonet, D., Daher, J. P. L., Lin, B. M., Stafa, K., Kim, J., Banerjee, R., ... Moore, D. J. (2011). Dopaminergic

- neuronal loss, reduced neurite complexity and autophagic abnormalities in transgenic mice expressing G2019S mutant LRRK2. *PLoS One*, 6(4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0018568>
- Ran, F. A., Cong, L., Yan, W. X., Scott, D. A., Gootenberg, J. S., Kriz, A. J., ... Zhang, F. (2015). In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*, 520(7546), 186–191. <https://doi.org/10.1038/nature14299>
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols* 2013 8:11, 8(11), 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
- Rektor, I., Bohnen, N. I., Korczyn, A. D., Gryb, V., Kumar, H., Kramberger, M. G., ... Veselý, B. (2018). An updated diagnostic approach to subtype definition of vascular parkinsonism – Recommendations from an expert working group. *Parkinsonism and Related Disorders*, 49, 9–16. <https://doi.org/10.1016/J.PARKRELDIS.2017.12.030>
- Remy, P., Doder, M., Lees, A., Turjanski, N., & Brooks, D. (2005). Depression in Parkinson's disease: Loss of dopamine and noradrenaline innervation in the limbic system. *Brain*, 128(6), 1314–1322. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWH445>
- Richard Karpowicz, X. J., Haney, C. M., Mihaila, T. S., Sandler, R. M., James Petersson, E., & M-Y Lee, V. (2017). Selective imaging of internalized proteopathic I±-synuclein seeds in primary neurons reveals mechanistic insight into transmission of synucleinopathies. *Journal Biological Chemistry*, 292, 13482–13497. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.780296>
- Richfield, E. K., Thiruchelvam, M. J., Cory-Slechta, D. A., Wuertzer, C., Gainetdinov, R. R., Caron, M. G., ... Federoff, H. J. (2002). Behavioral and neurochemical effects of wild-type and mutated human α -synuclein in transgenic mice. *Experimental Neurology*, 175(1), 35–48. <https://doi.org/10.1006/exnr.2002.7882>
- Rieker, C., Engblom, D., Kreiner, G., Domanskyi, A., Schober, A., Stotz, S., ... Parlato, R. (2011). Nucleolar disruption in dopaminergic neurons leads to oxidative damage and parkinsonism through repression of mammalian target of rapamycin signaling. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0590-10.2011>
- Righes Marafija, J., & Calcagnotto, M. E. (2023). Electrophysiology of Dendritic Spines: Information Processing, Dynamic Compartmentalization, and Synaptic Plasticity. *Advances in Neurobiology*, 34, 103–141. https://doi.org/10.1007/978-3-031-36159-3_3
- Rinne, J. O., Portin, R., Ruottinen, H., Nurmi, E., Bergman, J., Haaparanta, M., & Solin, O. (2000). Cognitive impairment and the brain dopaminergic system in Parkinson disease: [18F]fluorodopa positron emission tomographic study. *Archives of Neurology*, 57(4), 470–475. <https://doi.org/10.1001/ARCHNEUR.57.4.470>
- Rommelfanger, K. S., Edwards, G. L., Freeman, K. G., Liles, L. C., Miller, G. W., & Weinshenker, D. (2007). Norepinephrine loss produces more profound motor deficits than MPTP treatment in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702753104>
- Rommelfanger, K. S., & Weinshenker, D. (2007). Norepinephrine: The redheaded stepchild of Parkinson's disease. *Biochemical Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.01.036>
- Rommelfanger, Karen S., Weinshenker, D., & Miller, G. W. (2004). Reduced MPTP toxicity in noradrenaline transporter knockout mice. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02785.x>
- Roney, J. C., Cheng, X. T., & Sheng, Z. H. (2022). Neuronal endolysosomal transport and lysosomal functionality in maintaining axonostasis. *The Journal of Cell Biology*, 221(3). <https://doi.org/10.1083/JCB.202111077>
- Rousseaux, M. W. C., Marcogliese, P. C., Qu, D., Hewitt, S. J., Seang, S., Kim, R. H., ... Park, D. S. (2012). Progressive dopaminergic cell loss with unilateral-to-bilateral progression in a genetic model of Parkinson disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(39), 15918–15923. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1205102109>
- Runge, K., Cardoso, C., & de Chevigny, A. (2020). Dendritic Spine Plasticity: Function and Mechanisms. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 12, 566347. <https://doi.org/10.3389/FNSYN.2020.00036/BIBTEX>
- Sakakibara, R., Shinotoh, H., Uchiyama, T., Yoshiyama, M., Hattori, T., & Yamanishi, T. (2001). SPECT imaging of the dopamine transporter with [123I]- β -CIT reveals marked decline of nigrostriatal dopaminergic function in Parkinson's disease with urinary dysfunction. *Journal of the Neurological Sciences*, 187(1–2), 55–59. [https://doi.org/10.1016/S0022-510X\(01\)00521-4](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(01)00521-4)
- Sampson, T. R., Debelius, J. W., Thron, T., Janssen, S., Shastri, G. G., Ilhan, Z. E., ... Mazmanian, S. K. (2016). Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. *Cell*, 167(6), 1469–1480.e12. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.11.018>
- Samuels, E. R., & Szabadi, E. (2008). Functional Neuroanatomy of the Noradrenergic Locus Coeruleus: Its Roles in the Regulation of Arousal and Autonomic Function Part I: Principles of Functional Organisation. *Current Neuropharmacology*, 6(3), 235. <https://doi.org/10.2174/157015908785777229>
- Sanchez-Padilla, J., Guzman, J. N., Ilijic, E., Kondapalli, J., Galtieri, D. J., Yang, B., ... Surmeier, D. J. (2014). Mitochondrial oxidant stress in locus coeruleus is regulated by activity and nitric oxide synthase. *Nature Neuroscience*, 17(6), 832–840. <https://doi.org/10.1038/NN.3717>
- Sanchez-Ramos, J. R., Ortoll, R., & Paulson, G. W. (1996). Visual hallucinations associated with Parkinson disease. *Archives of Neurology*, 53(12), 1265–1268.

- <https://doi.org/10.1001/ARCHNEUR.1996.00550120077019>
- Savić, N., & Schwank, G. (2016). Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing. *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 168, 15–21. <https://doi.org/10.1016/J.TRSL.2015.09.008>
- Schapira, A. H. V., Chaudhuri, K. R., & Jenner, P. (2017). Non-motor features of Parkinson disease. *Nature Reviews Neuroscience* 2017 18:7, 18(7), 435–450. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.62>
- Schapira, A. H. V., & Tolosa, E. (2010). Molecular and clinical prodrome of Parkinson disease: implications for treatment. *Nature Reviews. Neurology*, 6(6), 309–317. <https://doi.org/10.1038/NRNEUROL.2010.52>
- Scherman, D., Desnos, C., Darchen, F., Pollak, P., Javoy-Agid, F., & Agid, Y. (1989). Striatal dopamine deficiency in Parkinson's disease: role of aging. *Annals of Neurology*, 26(4), 551–557. <https://doi.org/10.1002/ANA.410260409>
- Schifitto, G., Friedman, J. H., Oakes, D., Shulman, L., Comella, C. L., Marek, K., & Fahn, S. (2008). Fatigue in levodopa-naïve subjects with Parkinson disease. *Neurology*, 71(7), 481–485. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000324862.29733.69>
- Schnütgen, F., Doerflinger, N., Calléja, C., Wendling, O., Chambon, P., & Ghyselinck, N. B. (2003). A directional strategy for monitoring Cre-mediated recombination at the cellular level in the mouse. *Nature Biotechnology* 2003 21:5, 21(5), 562–565. <https://doi.org/10.1038/nbt811>
- Schober, A. (2004). Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell and Tissue Research*. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-0938-y>
- Schultheis, P. J., Fleming, S. M., Clippinger, A. K., Lewis, J., Tsunemi, T., Giasson, B., ... Shull, G. E. (2013). Atp13a2-deficient mice exhibit neuronal ceroid lipofuscinosis, limited α -synuclein accumulation and age-dependent sensorimotor deficits. *Human Molecular Genetics*, 22(10), 2067–2082. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDT057>
- Schwarz, L. A., Miyamichi, K., Gao, X. J., Beier, K. T., Weissbourd, B., Deloach, K. E., ... Luo, L. (2015). Viral-genetic tracing of the input–output organization of a central noradrenaline circuit. *Nature* 2015 524:7563, 524(7563), 88–92. <https://doi.org/10.1038/nature14600>
- Seki, K., Yoshida, S., & Jaiswal, M. (2018). Molecular mechanism of noradrenaline during the stress-induced major depressive disorder. *Neural Regeneration Research*, 13(7), 1159. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.235019>
- Shcholok, T., & Eftekharpour, E. (2023). Cre-recombinase systems for induction of neuron-specific knockout models: a guide for biomedical researchers. *Neural Regeneration Research*, 18(2), 273. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.346541>
- Shi, Y., Inoue, H., Wu, J. C., & Yamanaka, S. (2016). Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nature Reviews Drug Discovery* 2016 16:2, 16(2), 115–130. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.245>
- Simola, N., Morelli, M., & Carta, A. R. (2007). The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research*, 11(3–4), 151–167. <https://doi.org/10.1007/BF03033565>
- Skupio, U., Tertilt, M., Bilecki, W., Barut, J., Korostynski, M., Golda, S., ... Przewlocki, R. (2019). Astrocytes determine conditioned response to morphine via glucocorticoid receptor-dependent regulation of lactate release. *Neuropsychopharmacology*. <https://doi.org/10.1038/s41386-019-0450-4>
- Soldner, F., Stelzer, Y., Shivalila, C. S., Abraham, B. J., Latourelle, J. C., Barrasa, M. I., ... Jaenisch, R. (2016). Parkinson-associated risk variant in distal enhancer of α -synuclein modulates target gene expression. *Nature*, 533(7601), 95–99. <https://doi.org/10.1038/nature17939>
- Sönmez, A., Mustafa, R., Ryll, S. T., Tuorto, F., Wacheul, L., Ponti, D., ... Parlato, R. (2021). Nucleolar stress controls mutant Huntington toxicity and monitors Huntington's disease progression. *Cell Death & Disease* 2021 12:12, 12(12), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04432-x>
- Sorek, R., Kunin, V., & Hugenholz, P. (2008). CRISPR--a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nature Reviews. Microbiology*, 6(3), 181–186. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO1793>
- Soutar, M. P. M., Melandri, D., O'Callaghan, B., Annuario, E., Monaghan, A. E., Welsh, N. J., ... Plun-Favreau, H. (2022). Regulation of mitophagy by the NSL complex underlies genetic risk for Parkinson's disease at 16q11.2 and MAPT H1 loci. *Brain*, 145(12), 4349–4367. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWAC325>
- Spiegel, J., Hellwig, D., Farmakis, G., Jost, W. H., Samnick, S., Fassbender, K., ... Dillmann, U. (2007). Myocardial sympathetic degeneration correlates with clinical phenotype of Parkinson's disease. *Wiley Online LibraryJ Spiegel, D Hellwig, G Farmakis, WH Jost, S Samnick, K Fassbender, CM KirschMovement Disorders*, 2007•Wiley Online Library, 22(7), 1004–1008. <https://doi.org/10.1002/mds.21499>
- Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M. Y., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., & Goedert, M. (1997). α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature* 1997 388:6645, 388(6645), 839–840. <https://doi.org/10.1038/42166>
- Srinivasan, J., & Schmidt, W. J. (2003). Potentiation of parkinsonian symptoms by depletion of locus coeruleus noradrenaline in 6-hydroxydopamine-induced partial degeneration of substantia nigra in rats. *European Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02684.x>
- Srinivasan, J., & Schmidt, W. J. (2004). Functional recovery of locus coeruleus noradrenergic neurons after DSP-4 lesion: effects on dopamine levels and neuroleptic induced-parkinsonian symptoms in rats. *Journal of*

- Neural Transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 111(1), 13–26. <https://doi.org/10.1007/S00702-003-0062-2>
- Staffend, N. A., & Meisel, R. L. (2011). DiOlistic labeling of neurons in tissue slices: A qualitative and quantitative analysis of methodological variations. *Frontiers in Neuroanatomy*, 5(MARCH), 10. <https://doi.org/10.3389/FNANA.2011.00014/BIBTEX>
- Stoléru, S., Grégoire, M. C., Gérard, D., Decety, J., Lafarge, E., Cinotti, L., ... Comar, D. (1999). Neuroanatomical correlates of visually evoked sexual arousal in human males. *Archives of Sexual Behavior*, 28(1), 1–21. <https://doi.org/10.1023/A:1018733420467>
- Suda, Y., Kuzumaki, N., Sone, T., Narita, M., Tanaka, K., Hamada, Y., ... Narita, M. (2018). Down-regulation of ghrelin receptors on dopaminergic neurons in the substantia nigra contributes to Parkinson's disease-like motor dysfunction. *Molecular Brain*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13041-018-0349-8>
- Sun, W. Y., Tyurin, V. A., Mikulska-Ruminska, K., Shrivastava, I. H., Anthonymuthu, T. S., Zhai, Y. J., ... Kagan, V. E. (2021). Phospholipase iPLA2 β averts ferroptosis by eliminating a redox lipid death signal. *Nature Chemical Biology* 2021 17:4, 17(4), 465–476. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-00734-x>
- Surmeier, D. J., Obeso, J. A., & Halliday, G. M. (2017). Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease. *Nature Reviews. Neuroscience*, 18(2), 101–113. <https://doi.org/10.1038/NRN.2016.178>
- Sweeney, N. P., & Vink, C. A. (2021). The impact of lentiviral vector genome size and producer cell genomic to gag-pol mRNA ratios on packaging efficiency and titre. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development*, 21, 574–584. <https://doi.org/10.1016/J.OMTM.2021.04.007>
- Swiech, L., Heidenreich, M., Banerjee, A., Habib, N., Li, Y., Trombetta, J., ... Zhang, F. (2015). In vivo interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9. *Nature Biotechnology*, 33(1), 102. <https://doi.org/10.1038/NBT.3055>
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131(5), 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- Tanaka, M., Yoshida, M., Emoto, H., & Ishii, H. (2000). Noradrenaline systems in the hypothalamus, amygdala and locus coeruleus are involved in the provocation of anxiety: Basic studies. *European Journal of Pharmacology*, 405(1–3), 397–406. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(00\)00569-0](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(00)00569-0)
- Tansey, M. G., & Goldberg, M. S. (2010). Neuroinflammation in Parkinson's disease: Its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiology of Disease*, 37(3), 510–518. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2009.11.004>
- Tanya Daigle, A. L., Madisen, L., Hage, T. A., Li, L., Tasic, B., Zeng Correspondence, H., ... Zeng, H. (2018). A suite of transgenic driver and reporter mouse lines with enhanced brain-cell-type targeting and functionality. *Cell.ComTL Daigle, L Madisen, TA Hage, MT Valley, U Knoblich, RS Larsen, MM Takeno, L HuangCell, 2018*cell.Com, 174(2)*, 465–480. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.035>
- Tertil, M., Skupio, U., Barut, J., Dubovyk, V., Wawrzczak-Bargiela, A., Soltys, Z., ... Slezak, M. (2018). Glucocorticoid receptor signaling in astrocytes is required for aversive memory formation. *Translational Psychiatry*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0300-x>
- Tian, R., Gachechiladze, M. A., Ludwig, C. H., Laurie, M. T., Hong, J. Y., Nathaniel, D., ... Kampmann, M. (2019). CRISPR Interference-Based Platform for Multimodal Genetic Screens in Human iPSC-Derived Neurons. *Neuron*, 104(2), 239-255.e12. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2019.07.014>
- Tieu, K. (2011). A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A009316>
- Tofaris, G. K., Razaq, A., Ghetti, B., Lilley, K. S., & Spillantini, M. G. (2003). Ubiquitination of alpha-synuclein in Lewy bodies is a pathological event not associated with impairment of proteasome function. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(45), 44405–44411. <https://doi.org/10.1074/JBC.M308041200>
- Tsai, S. Q., Zheng, Z., Nguyen, N. T., Liebers, M., Topkar, V. V., Thapar, V., ... Joung, J. K. (2015). GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nature Biotechnology*, 33(2), 187–198. <https://doi.org/10.1038/NBT.3117>
- Uemura, N., Marotta, N. P., Ara, J., Meymand, E. S., Zhang, B., Kameda, H., ... Lee, V. M. Y. (2023). α -Synuclein aggregates amplified from patient-derived Lewy bodies recapitulate Lewy body diseases in mice. *Nature Communications*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-023-42705-5>
- Ungerstedt, U. (1968). 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *European Journal of Pharmacology*, 5(1), 107–110. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(68\)90164-7](https://doi.org/10.1016/0014-2999(68)90164-7)
- Ungless, M. A., & Grace, A. A. (2012). Are you or aren't you? Challenges associated with physiologically identifying dopamine neurons. *Trends in Neurosciences*, 35(7), 422–430. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2012.02.003>
- Vaillancourt, D. E., & Mitchell, T. (2020). Parkinson's disease progression in the substantia nigra: location, location, location. *Brain*, 143(9), 2628. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWAA252>
- Valente, E. M., Abou-Sleiman, P. M., Caputo, V., Muqit, M. M. K., Harvey, K., Gispert, S., ... Wood, N. W. (2004). Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5674), 1158–1160. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1096284>
- Van Den Berge, N., Ferreira, N., Gram, H., Mikkelsen, T. W., Alstrup, A. K. O., Casadei, N., ... Borghammer, P.

- (2019). Evidence for bidirectional and trans-synaptic parasympathetic and sympathetic propagation of alpha-synuclein in rats. *Acta Neuropathologica*, 138(4), 535–550. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02040-w>
- Vermilyea, S. C., Babinski, A., Tran, N., To, S., Guthrie, S., Kluss, J. H., ... Golos, T. G. (2020). In Vitro CRISPR/Cas9-Directed Gene Editing to Model LRRK2 G2019S Parkinson's Disease in Common Marmosets. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60273-2>
- Vetchinova, A. S., Simonova, V. V., Novosadova, E. V., Manuilova, E. S., Nenasheva, V. V., Tarantul, V. Z., ... Illarioshkin, S. N. (2018). Cytogenetic Analysis of the Results of Genome Editing on the Cell Model of Parkinson's Disease. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 165(3), 378–381. <https://doi.org/10.1007/s10517-018-4174-y>
- Vidyardhara, D. J., Lee, J. E., & Chandra, S. S. (2019). Role of the Endolysosomal System in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 150(5), 487. <https://doi.org/10.1111/JNC.14820>
- Viglione, A., Mazziotti, R., & Pizzorusso, T. (2023). From pupil to the brain: New insights for studying cortical plasticity through pupillometry. *Frontiers in Neural Circuits*, 17. <https://doi.org/10.3389/FNCIR.2023.1151847>
- Volpicelli-Daley, L. A., Luk, K. C., & Lee, V. M. Y. (2014). Addition of exogenous α -synuclein preformed fibrils to primary neuronal cultures to seed recruitment of endogenous α -synuclein to Lewy body and Lewy neurite-like aggregates. *Nature Protocols* 2014 9:9, 9(9), 2135–2146. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.143>
- Volta, M., Milnerwood, A. J., & Farrer, M. J. (2015). Insights from late-onset familial parkinsonism on the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *The Lancet. Neurology*, 14(10), 1054–1064. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00186-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00186-6)
- Von Coelln, R., Thomas, B., Savitt, J. M., Lim, K. L., Sasaki, M., Hess, E. J., ... Dawson, T. M. (2004). Loss of locus coeruleus neurons and reduced startle in parkin null mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(29), 10744–10749. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0401297101>
- Vučković, M. G., Wood, R. I., Holschneider, D. P., Abernathy, A., Togasaki, D. M., Smith, A., ... Jakowec, M. W. (2008). Memory, Mood, Dopamine, and Serotonin in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-Lesioned Mouse Model of Basal Ganglia Injury. *Neurobiology of Disease*, 32(2), 319. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2008.07.015>
- Walczak, M., & Błasiak, T. (2017). Midbrain dopaminergic neuron activity across alternating brain states of urethane anaesthetized rat. *European Journal of Neuroscience*, 45(8), 1068–1077. <https://doi.org/10.1111/EJN.13533>
- Wang, Qingshan, Song, S., Jiang, L., & Hong, J.-S. (2021). Interplay among norepinephrine, NOX2, and neuroinflammation: key players in Parkinson's disease and prime targets for therapies. *Ageing and Neurodegenerative Diseases*, 1(1), null-null. <https://doi.org/10.20517/AND.2021.06>
- Wang, Qinqin, Liu, Y., & Zhou, J. (2015, October 12). Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target. *Translational Neurodegeneration*, Vol. 4. <https://doi.org/10.1186/s40035-015-0042-0>
- Wang, X., Cao, C., Huang, J., Yao, J., Hai, T., Zheng, Q., ... Zhao, J. (2016). One-step generation of triple gene-targeted pigs using CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep20620>
- Weintraub, D., Newberg, A. B., Cary, M. S., Siderow, A. D., Moberg, P. J., & Kleiner-Fisman, G. (2005). Striatal dopamine transporter imaging correlates with anxiety and depression symptoms in Parkinson's disease. *Focus on Parkinson's Disease*, 17(1), 12–14. Retrieved from <https://jnm.snmjournals.org/content/46/2/227.short>
- Westermann, L., Neubauer, B., & Köttgen, M. (2021). Nobel Prize 2020 in Chemistry honors CRISPR: a tool for rewriting the code of life. *Pflügers Archiv*, 473(1), 1. <https://doi.org/10.1007/S00424-020-02497-9>
- Westra, E. R., Semenova, E., Datsenko, K. A., Jackson, R. N., Wiedenheft, B., Severinov, K., & Brouns, S. J. J. (2013). Type I-E CRISPR-cas systems discriminate target from non-target DNA through base pairing-independent PAM recognition. *PLoS Genetics*, 9(9). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1003742>
- Wood, R. A., Hopkins, S. A., Moodley, K. K., & Chan, D. (2015). Fifty percent prevalence of extracampine hallucinations in Parkinson's disease patients. *Frontiers in Neurology*, 6(DEC). <https://doi.org/10.3389/FNEUR.2015.00263/FULL>
- Wray, S. (2021). Modelling neurodegenerative disease using brain organoids. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 111, 60–66. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2020.05.012>
- Wu, L., Xu, Q., Zhou, M., Chen, Y., Jiang, C., Jiang, Y., ... Chen, W. (2022). Plasma miR-153 and miR-223 Levels as Potential Biomarkers in Parkinson's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, 16. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2022.865139/FULL>
- Wulansari, N., Darsono, W. H. W., Woo, H. J., Chang, M. Y., Kim, J., Bae, E. J., ... Lee, S. H. (2021). Neurodevelopmental defects and neurodegenerative phenotypes in human brain organoids carrying Parkinson's disease-linked DNAJC6 mutations. *Science Advances*, 7(8). <https://doi.org/10.1126/SCIADV.ABB1540>
- Xia, R., & Mao, Z. H. (2012). Progression of motor symptoms in Parkinson's disease. *Neuroscience Bulletin*,

- 28(1), 39–48. <https://doi.org/10.1007/S12264-012-1050-Z/METRICS>
- Xicoy, H., Wieringa, B., & Martens, G. J. M. (2017). The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Molecular Neurodegeneration*, *12*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S13024-017-0149-0>
- Xie, H., Tang, L., He, X., Liu, X., Zhou, C., Liu, J., ... Gu, F. (2018). SaCas9 Requires 5'-NNGRRT-3' PAM for Sufficient Cleavage and Possesses Higher Cleavage Activity than SpCas9 or FnCpf1 in Human Cells. *Biotechnology Journal*, *13*(4). <https://doi.org/10.1002/BIOT.201700561>
- Xue, J., Zhu, Y., Wei, L., Huang, H., Li, G., Huang, W., ... Duan, R. (2022). Loss of Drosophila NUS1 results in cholesterol accumulation and Parkinson's disease-related neurodegeneration. *The FASEB Journal*, *36*(7), e22411. <https://doi.org/10.1096/FJ.202200212R>
- Yamada, K., & Iwatsubo, T. (2018). Extracellular α -synuclein levels are regulated by neuronal activity. *Molecular Neurodegeneration*, *13*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/S13024-018-0241-0/FIGURES/3>
- Yang, R., Ye, S., Zhang, S., Huang, H., Zhang, Y., Yang, Y., ... Shi, J. (2023). Serotonin and dopamine depletion in distinct brain regions may cause anxiety in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice as a model of early Parkinson's disease. *Neuroreport*, *34*(11), 551. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001922>
- Yang, Weili, Chen, X., Li, S., & Li, X. J. (2021). Genetically modified large animal models for investigating neurodegenerative diseases. *Cell and Bioscience*, *11*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S13578-021-00729-8/TABLES/2>
- Yang, Weili, Li, S., & Li, X. J. (2019, May 2). A CRISPR monkey model unravels a unique function of PINK1 in primate brains. *Molecular Neurodegeneration*, Vol. 14. <https://doi.org/10.1186/s13024-019-0321-9>
- Yang, Wenya, Hamilton, J. L., Kopil, C., Beck, J. C., Tanner, C. M., Albin, R. L., ... Thompson, T. (2020). Current and projected future economic burden of Parkinson's disease in the U.S. *Npj Parkinson's Disease*, *6*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41531-020-0117-1>
- Yang, Z., Steentoft, C., Hauge, C., Hansen, L., Thomsen, A. L., Niola, F., ... Bennett, E. P. (2015). Fast and sensitive detection of indels induced by precise gene targeting. *Nucleic Acids Research*, *43*(9). <https://doi.org/10.1093/NAR/GKV126>
- Yao, N., Wu, Y., Zhou, Y., Ju, L., Liu, Y., Ju, R., ... Xu, Q. (2015). Lesion of the locus coeruleus aggravates dopaminergic neuron degeneration by modulating microglial function in mouse models of Parkinson's disease. *Brain Research*, *1625*, 255–274. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.08.032>
- Yoo, K. H., Hennighausen, L., & Shin, H. Y. (2018). Dissecting Tissue-Specific Super-Enhancers by Integrating Genome-Wide Analyses and CRISPR/Cas9 Genome Editing. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* *24:1*, *24*(1), 47–59. <https://doi.org/10.1007/S10911-018-9417-Z>
- Yoshimi, K., Oka, Y., Miyasaka, Y., Kotani, Y., Yasumura, M., Uno, Y., ... Mashimo, T. (2021). Combi-CRISPR: combination of NHEJ and HDR provides efficient and precise plasmid-based knock-ins in mice and rats. *Human Genetics*, *140*(2), 277. <https://doi.org/10.1007/S00439-020-02198-4>
- Yu, P. H., Davis, B. A., Fang, J., & Boulton, A. A. (1994). Neuroprotective Effects of Some Monoamine Oxidase-B Inhibitors Against DSP-4-Induced Noradrenaline Depletion in the Mouse Hippocampus. *Journal of Neurochemistry*, *63*(5), 1820–1828. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1994.63051820.x>
- Yuan, X., Zhou, Y., Casanova, E., Chai, M., Kiss, E., Gröne, H. J., ... Grummt, I. (2005). Genetic Inactivation of the Transcription Factor TIF-IA Leads to Nucleolar Disruption, Cell Cycle Arrest, and p53-Mediated Apoptosis. *Molecular Cell*, *19*(1), 77–87. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2005.05.023>
- Yun, S. P., Kam, T. I., Panicker, N., Kim, S., Oh, Y., Park, J. S., ... Ko, H. S. (2018). Block of A1 astrocyte conversion by microglia is neuroprotective in models of Parkinson's disease. *Nature Medicine*, *24*(7), 931–938. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0051-5>
- Zagare, A., Barmpha, K., Smajic, S., Smits, L. M., Grzyb, K., Grünewald, A., ... Schwamborn, J. C. (2022). Midbrain organoids mimic early embryonic neurodevelopment and recapitulate LRRK2-p.Gly2019Ser-associated gene expression. *American Journal of Human Genetics*, *109*(2), 311–327. <https://doi.org/10.1016/J.AJHG.2021.12.009>
- Zarow, C., Lyness, S. A., Mortimer, J. A., & Chui, H. C. (2003). Neuronal loss is greater in the locus coeruleus than nucleus basalis and substantia nigra in Alzheimer and Parkinson diseases. *Archives of Neurology*, *60*(3), 337–341. <https://doi.org/10.1001/ARCHNEUR.60.3.337>
- Zhang, J. P., Li, X. L., Li, G. H., Chen, W., Arakaki, C., Botimer, G. D., ... Zhang, X. B. (2017). Efficient precise knockin with a double cut HDR donor after CRISPR/Cas9-mediated double-stranded DNA cleavage. *Genome Biology*, *18*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/S13059-017-1164-8/FIGURES/6>
- Zhang, S. S., Ou, R. W., Chen, X. P., Yang, J., Zhao, B., Yuan, X. Q., ... Shang, H. F. (2016). Correlative factors of cognitive dysfunction in PD patients: a cross-sectional study from Southwest China. *Neurological Research*, *38*(5), 434–440. <https://doi.org/10.1080/01616412.2016.1139320>
- Zhang, Y., Chen, K., Sloan, S. A., Bennett, M. L., Scholze, A. R., O'Keefe, S., ... Wu, J. Q. (2014). An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *Journal of Neuroscience*, *34*(36), 11929–11947. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1860-14.2014>
- Zhou, C., Guo, T., Bai, X., Wu, J. J., Gao, T., Guan, X., ... Zhang, M. (2021). Locus coeruleus degeneration is associated with disorganized functional topology in Parkinson's disease. *NeuroImage: Clinical*, *32*, 102873.

<https://doi.org/10.1016/J.NICL.2021.102873>

- Zhou, Haibo, Su, J., Hu, X., Zhou, C., Li, H., Chen, Z., ... Yang, H. (2020). Glia-to-Neuron Conversion by CRISPR-CasRx Alleviates Symptoms of Neurological Disease in Mice. *Cell*, *181*(3), 590-603.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.024>
- Zhou, Hu, Zhang, J., Shi, H., Li, P., Sui, X., Wang, Y., & Wang, L. (2022). Downregulation of CDK5 signaling in the dorsal striatum alters striatal microcircuits implicating the association of pathologies with circadian behavior in mice. *Molecular Brain*, *15*(1). <https://doi.org/10.1186/S13041-022-00939-2>
- Zhou, W., Ma, D., Sun, A. X., Tran, H. D., Ma, D. L., Singh, B. K., ... Tan, E. K. (2019). PD-linked CHCHD2 mutations impair CHCHD10 and MICOS complex leading to mitochondria dysfunction. *Human Molecular Genetics*, *28*(7), 1100–1116. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy413>
- Zhou, X., Xin, J., Fan, N., Zou, Q., Huang, J., Ouyang, Z., ... Lai, L. (2015). Generation of CRISPR/Cas9-mediated gene-targeted pigs via somatic cell nuclear transfer. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *72*(6), 1175–1184. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1744-7>
- Zhu, X.-X., Zhong, Y.-Z., Ge, Y.-W., Lu, K.-H., & Lu, S.-S. (2018). CRISPR/Cas9-Mediated Generation of Guangxi Bama Minipigs Harboring Three Mutations in α -Synuclein Causing Parkinson's Disease. *Scientific Reports*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-018-30436-3>
- Zou, L., Tian, Y., & Zhang, Z. (2021). Dysfunction of Synaptic Vesicle Endocytosis in Parkinson's Disease. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, *15*. <https://doi.org/10.3389/FNINT.2021.619160>