

*Dr Grzegorz Kreiner*

*Zakład Biochemii Mózgu, Instytut Farmakologii PAN w Krakowie*

## **Czego nauczyliśmy się o chorobach neurodegeneracyjnych z mysich modeli transgenicznym w obecnym tysiącleciu?**

### **Czy naprawdę chcielibyśmy żyć sto lat i więcej?**

Wszyscy z nas chcieliby żyć długo, zdrowo i szczęśliwie. Niestety, nie zawsze jest to możliwe i – paradoksalnie – najpoważniejszym z zadań jakie stoją przed współczesną medycyną jest nie tyle samo przedłużenie życia ludzkiego (wg danych statystycznych GUS w Polsce wskaźnik średniej długości życia to obecnie 74 lata dla mężczyzn i 82 dla kobiet; w Japonii – odpowiednio 81 i 88 lat), ale zapewnienie by trwało ono we względnie dobrym zdrowiu do ostatnich dni. Jednym z największych zagrożeń dla dobrej kondycji umysłowej i fizycznej w podeszłym wieku są choroby neurodegeneracyjne, w znacznej większości przypadków o nieustalonej etiologii. Szacuje się, że np. zapadalność na chorobę Alzheimera obejmuje obecnie ok. 40 milionów ludzi na całym świecie a osiągnie 135 milionów do roku 2050.

Znaczna większość chorób neurodegeneracyjnych to choroby idiopatyczne, o nieznannej etiologii, a nawet w przypadku schorzeń wywoływanych przez mutacje genetyczne sekwencja procesów wewnątrzkomórkowych prowadzących do utraty neuronów pozostaje słabo poznana. Pomimo ogromnych wysiłków, gigantycznych funduszy i wielu lat badań, postęp w możliwościach leczenia chorób neurodegeneracyjnych nie wydaje się szczególnie spektakularny. Aktualnie dostępne farmakoterapie wciąż ograniczają się wyłącznie do leczenia objawowego i nie są w stanie zahamować progresji choroby związanej z nieodwracalną degeneracją komórek nerwowych.

### **Narzędzia badawcze jakimi dysponujemy**

Aby badać mechanizmy molekularne chorób neurodegeneracyjnych, a także testować substancje będące kandydatami na nowe leki, konieczne są dobre modele zwierzęce. Stanowią one wciąż niezastąpiony pomost pomiędzy badaniami *in-vitro* z wykorzystaniem linii komórkowych a próbami klinicznymi. Można przyjąć, że idealny model choroby neurodegeneracyjnej powinien charakteryzować się następującymi pięcioma paradygmatami:

1. Obraz neuropatologii widoczny dopiero u zwierząt dorosłych.

2. Upośledzenie kognitywne lub motoryczne typowe dla przebiegu schorzenia.
3. Występowanie charakterystycznych inkluzji białkowych dla danej choroby (ciała Lewy'ego, spletki, plaki itp.)
4. Progresja postępująca w czasie, odzwierciedlająca sekwencję zmian neurodegeneracyjnych.
5. Relatywnie krótki przebieg procesu neurodegeneracyjnego dla efektywnego badania i testowania potencjalnych terapii.

Niestety, taki idealny model nie istnieje. Klasyczne, farmakologiczne modele oparte o podanie rozmaitych neurotoksyn (np. 6-OHDA, MPTP stosowane do wywołania neurodegeneracji dopaminowej odzwierciedlającej fenotyp choroby Parkinsona, kwas kainowy – degeneracji neuronów prążkowiec w przebiegu choroby Huntingtona, podanie beta-amyloidu dla wywołania zmian kognitywnych przypominających fenotyp choroby Alzheimera) spełniają wprawdzie pierwsze dwa warunki (fenotyp widoczny u zwierząt dorosłych) ale działają na zasadzie systemu „zero-jedynkowego” (podanie toksyny wywołuje natychmiastowy efekt) i tym samym nie umożliwiają badania powolnego procesu utraty komórek nerwowych, tak charakterystycznego dla chorób neurodegeneracyjnych. Ponadto, modele te z definicji raczej nigdy nie będą miały wiele wspólnego z rzeczywistą etiopatologią schorzenia.

W drugiej połowie XX wieku wielkie nadzieje pokładano w modelach transgenicznym, tworzonych głównie na myszach. Wybór tego gatunku podyktowany był nie tylko względami praktycznymi (relatywnie niskie koszty utrzymania zwierząt, dostępność miejsca w klatce itp.) ale przede wszystkim technicznymi ograniczeniami związanymi z koniecznością wykorzystania w procesie transgenezy na etapie homologicznej rekombinacji embrionalnych komórek macierzystych. Było to stosunkowo łatwe do przeprowadzenia u myszy, u szczurów stało się możliwe dopiero w roku 2008<sup>1</sup>. Pierwsze modele transgeniczne były oparte o strategię wiernego powielania mutacji odpowiedzialnych za ludzkie formy niektórych chorób neurodegeneracyjnych, zwykle poprzez tworzenie zwierząt z delecją konkretnego genu (tzw. knock-out, KO), jednak zbieżność tych modeli z oczekiwanym fenotypem często nie była zadowalająca. Należy tu podkreślić, że tzw. globalny knock-out niesie ze sobą sporo trudnych do przewidzenia problemów – z jednej strony niejednokrotnie letalność spowodowaną kontrolowaniem przez dany gen również innych, ważnych funkcji życiowych (zwłaszcza na etapie prenatalnym) z drugiej – wywołanie szeregu zmian kompensacyjnych, powodujących w efekcie brak pożądanej odpowiedzi fenotypowej. Są to często podnoszone argumenty przeciwko traktowaniu modeli genetycznych jako wartościowych dla badania złożonych procesów chorobowych.

Wprowadzenie w połowie lat 90. XX wieku technologii tworzenia modeli opartych o warunkową/indukowaną ekspresję genów z wykorzystaniem tzw. rekombinacji zlokalizowanej (np. system *Cre/loxP*) zrewolucjonizowało metodologię otrzymywania zwierząt transgeniczných, umożliwiając ukierunkowanie mutacji do określonych populacji komórkowych. Dodatkowo modele indukowane pozwoliły na przezwyciężenie wielu problemów związanych z efektami kompensacyjnymi i niespecyficnością, jakimi obciążone były często modele typu KO. Systemy warunkowej/indukowanej ekspresji genów umożliwiają włączanie mutacji już na etapie dorosłego życia zwierzęcia, co jest szczególnie pożądane w przypadku badań nad neurodegeneracją, a prawidłowy dobór odpowiedniego promotora rekombinazy Cre gwarantuje wycięcie badanego genu wyłącznie w wybranej populacji komórek.

Obecnie jesteśmy świadkami kolejnego przełomu w transgenice. Niedawne odkrycie potężnego i stosunkowo prostego metodycznie narzędzia do edycji genów, systemu CRISPR/Cas9 (metodologii uznanej w 2015 roku za przełom roku w naukach biologicznych, której odkrywcy stali się poważnymi kandydatami do nagrody Nobla) otworzyło nową erę transgeniki, która z pewnością zaowocuje wprowadzeniem na scenę wielu modeli zwierzęcych w niedalekiej przyszłości<sup>2</sup>.

### **Choroba Alzheimera – czy wiemy coś więcej?**

Choroba Alzheimera (AD) jest postępującą chorobą neurodegeneracyjną charakteryzującą się atrofią mózgu, będącą bezpośrednią przyczyną upośledzenia funkcji poznawczych i zaniku pamięci. W 90% przypadków AD pozostaje chorobą idiopatyczną, istnieją jednak dwa czynniki, powszechnie postrzegane jako patognomoniczne (potencjalnie sprawcze): płytki amyloidowe i splątki neurofibrylarne. Płytki amyloidowe zawierają białko beta-amyloidu ( $A\beta$ ) formujące się w wyniku rozpadu białka prekursorowego amyloidu (ang. *Amyloid Precursor Protein*, APP), którego jedna forma, beta-amyloid 42 ( $A\beta_{42}$ ), jest uważana za neurotoksyczną. Przyjmuje się – choć zdania na ten temat są podzielone – że podwyższone poziomy  $A\beta_{42}$ , wraz ze wzrostem stosunku  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ , stanowią istotny czynnik ryzyka zachorowania na AD<sup>3</sup>. Splątki neurofibrylarne (ang. *Neurofibrillary Tangles*, NFT) to nieprawidłowe nagromadzenia białka Tau, akumulujące wewnątrz neuronów. Chociaż ich powiązanie z objawami AD odkryto nieco później, obecnie są one również uważane za kluczowy czynnik patofizjologiczny<sup>4</sup>. Mimo to, w obu przypadkach pozostaje jednak kwestią dyskusyjną, czy występowanie złogów  $A\beta$  i NFT należy do rzeczywistego czynnika rozwoju patofizjologii AD, czy też jest po prostu zjawiskiem towarzyszącym procesowi

neurodegeneracyjnemu. Ponieważ alternatywne hipotezy wciąż nie znajdują uznania w szerokim gronie specjalistów, większość tworzonych mysich modeli transgenicznych AD opiera się o próbę wywołania wspomnianych wyżej efektów.

Jak dotąd zidentyfikowano trzy mutacje wywołujące tzw. rodzinne formy AD (FAD) w trzech genach kodujących APP, presenilinę-1 (PS1) i presenilinę-2 (PS2)<sup>5-7</sup>. Mutacje te zostały odtworzone u myszy w pierwszych modelach zwierzęcych z nadekspresją APP<sup>8</sup>. Ponieważ nie spełniły one oczekiwań co do przebiegu patologii AD, kolejnym krokiem było połączenie mutacji APP z PS1 lub PS2 w jednym modelu, w celu zaostrenia fenotypu<sup>9,10</sup>. Podobną strategię wykorzystano w odniesieniu do modeli opartych o manipulacje związane z NFT. Modele stworzone przez mutację genu kodującego białko Tau związane z mikrotubulami (MAPT) szybko połączono z mutacją w obrębie genu kodującego APP<sup>11,12</sup>. Należy jednak podkreślić, że w żadnej formie FAD nie występuje mutacja genu kodującego MAPT – białko to jest raczej kojarzone z demencją. Teoretycznie najlepszym fenotypowo okazał się potrójny model transgeniczny (3xTg-AD) obejmujący mutacje w obrębie PS1, APP i Tau<sup>13</sup>, niemniej jednak taka mutacja jest już bardzo daleka od mutacji obserwowanych w ludzkich, genetycznych formach AD.

Powyższe modele znacząco przyczyniły się do pomysłu na opracowanie tak zwanej immunoterapii beta-amyloidowej, mającej na celu zapobieżenie akumulacji A $\beta$  w tkance mózgowej. Niestety, pomimo obiecujących wyników uzyskanych w modelach zwierzęcych, jak dotychczas żadna z prób klinicznych nie przyniosła efektu, choć może to być związane ze zbyt późnym wprowadzeniem szczepionki, która – jak można się spodziewać – będzie miała raczej działanie prewencyjne niż lecznicze. Być może ostateczną odpowiedź na pytanie co do sensu takiego podejścia przyniosą rezultaty eksperymentu prowadzonego od 2016 roku, w największej znanej rodzinie z FAD mieszkającej w pobliżu Medellin w Kolumbii, z zastosowaniem crenezumabu (pasywna immunoterapia szczepionki anty-A $\beta$ ). Badania te są prowadzone po raz pierwszy na tak dużej grupie (około 300 osób) i po raz pierwszy w formie terapii prewencyjnej u osób zagrożonych rodzinną formą AD, ale przed wystąpieniem jakichkolwiek objawów<sup>14</sup>.

Pojawia się w tym miejscu problem przełożenia potencjalnych pomysłów na terapię AD – z powodzeniem ewaluowanych w modelach zwierzęcych – na ich zastosowanie kliniczne. Niektórzy badacze postulują, że być może powinniśmy pójść o krok dalej niż tylko sprawdzać kolejne sposoby na "leczenie myszy" poprzez proste zmniejszenie agregacji amyloidu lub białka Tau<sup>15</sup>. W istocie, badania związane z AD są zdominowane przez dwie frakcje, "baptystów" i "tauistów", którzy zwierają swe szeregi w krytyce nie dopuszczając do głosu

innych hipotez. Musimy mieć też świadomość, że aktualnie wszystkie uznane transgeniczne modele AD opierają się na manipulacjach związanych z wywołaniem FAD, podczas gdy 90% AD pozostaje formą idiopatyczną.

Być może jednym z ciekawszych, nowych narzędzi do modelowania AD (choć nadal opartych o hipotezę beta-amyloidową) są myszy transgeniczne, które charakteryzują się wytwarzaniem A $\beta$  przy braku nadekspresji APP. Aby stworzyć te modele (APPNL-F i APPNL-GF) zastosowano inną strategię wykorzystując specyficzne mutacje u osób z wczesną historią FAD, które nie mają wpływu na ogólną ekspresję APP, co w opinii twórców często powoduje wiele niezależnych od A $\beta$  artefaktów<sup>16</sup>.

Warto w tym miejscu jeszcze raz podkreślić, że pomimo braku wiedzy o przyczynie innych niż genetyczne form AD, praktycznie wszystkie modele AD są konstruowane w oparciu o założenie, że akumulacja A $\beta$  jest przyczyną AD. Tymczasem na dzień dzisiejszy, pomimo stworzenia wielu wariantów modeli opartych o różnych mutacje APP, nie ma istotnego przełomu w naszym rozumieniu etiopatologii AD. Ponieważ ryzyko późnego wystąpienia AD wiąże się z występowaniem genu kodującego jeden z wariantów apolipoproteiny E (APOE4), stąd alternatywnym podejściem w modelowaniu AD było m.in. stworzenie myszy APOE4 knock-in, które – co warto podkreślić – nie wykazują akumulacji A $\beta$  związanej z utratą neuronów i postępem fenotypu behawioralnego, co sugeruje niezależną od A $\beta$  rolę APOE4 w AD<sup>17</sup>. Interesującą alternatywą w badaniach związanych z AD jest również ewaluacja roli jonów Ca<sup>2+</sup><sup>18</sup>, co wskazuje na możliwość zastosowania antagonistów receptora kanału wapniowego NMDA (memantyna) do leczenia AD. Zostało to potwierdzone w ostatnich metaanalizach badań, w których antagonistą ten był stosowany samodzielnie lub w połączeniu z inhibitorami cholinesterazy<sup>19</sup>. Inne, postulowane przyczyny AD obejmują przewlekłe stany zapalne, problemy naczyniowe, stres oksydacyjny, wzrost poziomu cholesterolu, zaburzenia w metabolizmie glukozy.

### **Choroba Parkinsona – czy wiemy coś więcej?**

Choroba Parkinsona (PD) charakteryzuje się postępującą utratą neuronów dopaminowych istoty czarnej (ang. *substantia nigra*, SN) i brzusznej części nakrywki (ang. *ventral tegmental area*, VTA), co jest bezpośrednią przyczyną drżenia spoczynkowego, stanowiącego najbardziej widoczny objaw chorobowy. Pozostałe objawy to sztywność mięśniowa, problemy motoryczne, zaburzenie postawy i dysfunkcje układu autonomicznego o charakterze neurodegeneracyjnym współwystępujące z pojawianiem się inkluzji białkowych, tzw. ciał Lewy'ego (ang. *Lewy bodies*, LB) w obrębie neuronów. Podobnie jak w przypadku

AD, PD w ok. 90% jest forma idiopatyczną. Spośród pozostałych 10% genetycznych form PD zidentyfikowano jak dotychczas 26 genów, w których mutacje odpowiadają za rodzinną formę PD. Mutacje te odtworzono w wielu mysich modelach transgenicznym, stanowiących alternatywę dla klasycznego podejścia farmakologicznego, opartego o wywołanie PD podaniem neurotoksyn (6-OHDA, MPTP, rotenon, parakwat). Jednakże okazało się, że wiele z tych genetycznych modeli charakteryzuje się jedynie łagodnymi zmianami fenotypowymi, często bez wyraźnej utraty komórek dopaminowych<sup>20</sup>. Może to sugerować istnienie nieznanymi mechanizmów kompensacyjnych, których zbadanie mogłoby się przyczynić nie tylko do lepszego zrozumienia dlaczego choroby neurodegeneracyjne są zaburzeniami o powolnym rozwoju patologii, ale także dostarczyć potencjalnych celów dla nowych strategii leczenia zapobiegawczego opartych na neuroprotekcji<sup>21</sup>.

Wśród zidentyfikowanych genów odpowiadających za PD, mutacje punktowe w genie kodującym  $\alpha$ -synukleinę (SNCA), głównie A30P i A53T, były pierwszymi i najszerzej przebadanymi zmianami modelowanymi w myszach transgenicznym. Sukces w odwzorowaniu fenotypu PD był w tych modelach raczej umiarkowany, natomiast modele oparte na nadekspresji SNCA wykazały już wyraźną neurodegenerację neuronów dopaminowych<sup>20,22</sup>. Co ciekawe, fenotyp parkinsonizmu u tych myszy wydawał się być niezależny od występującej agregacji białek, co wydaje się umniejszać patologiczne znaczenie tego zjawiska. Udanym podejściem transgenicznym replikacji fenotypu PD była strategia tworzenia modeli  $\alpha$ -synukleinowych za pośrednictwem wektorów wirusowych, w szczególności poprzez podanie przy pomocy rekombinowanego AAV zmutowanej  $\alpha$ -synukleiny A53T bezpośrednio do neuronów rejonu SN/VTA<sup>23</sup>.

Modele transgeniczne myszy tworzone w oparciu o mutacje w innych genach (m.in. *DJ-1*, *LRRK2*, *PINK1*, *PRKN*), nie przyniosły oczekiwanych rezultatów. Podobnie jak w przypadku AD, przeprowadzono kilka prób tworzenia modeli łączących różne mutacje odpowiadające za rodzinne formy PD w celu nasilenia fenotypu, ale to podejście – w przeciwieństwie do modelowania AD - nie zaowocowało sukcesem<sup>24,25</sup>. Niedawno odkryto kolejny nowy gen, kodujący transbłonowe białko TMEM230 (zaangażowane w przechowywanie i uwalnianie dopaminy) o potencjalnie dużej roli w patofizjologii PD<sup>26</sup>. Myszy TMEM KO są już dostępne, jednak model nie został jeszcze w pełni scharakteryzowany.

Być może największym rozczarowaniem w kwestii tworzenia modeli PD opartych o mutacje występujące w rodzinnych formach PD, były modele z mutacjami w genie kodującym białko DJ-1, zaangażowane w regulację funkcji mitochondriów i odpowiedź na stres oksydacyjny<sup>27</sup>. Ten typ mutacji punktowej wydaje się być szczególnie interesujący, ponieważ

ulega on ekspresji nie tylko w rodzinnej odmianie PD, ale także w innych  $\alpha$ -synukleopatiach i tauopatiach<sup>28</sup>, co sugeruje, że odległe choroby neurodegeneracyjne mogą mieć podobne mechanizmy.

Brak oczekiwanych rezultatów w sensie wiernego odzwierciedlenia fenotypu PD przy próbach odtworzenia ludzkich mutacji odpowiedzialnych za to schorzenie był sygnałem, że warto rozszerzyć poszukiwania w innych kierunkach. Przykładami transgenicznego modelu parkinsonizmu, nie związanego bezpośrednio z żadną ze znanych rodzinnych form PD, są myszy pozbawione czynnika transkrypcyjny TIF-IA (regulującego aktywność polimerazy I i proces biosyntezy białka) selektywnie w neuronach dopaminowych (myszy TIF-IADATCreERT2)<sup>29</sup>. Model ten wykazuje nie tylko daleko idącą, selektywną degenerację neuronów nigrostriatalnych, bezpośrednio związaną z licznymi cechami PD na poziomie molekularnym, ale także pożądaną progresję utraty komórek ze zróżnicowaną kinetyką tego procesu w obrębie SN i VTA, podobnie jak to ma miejsce u ludzi. Neurodegeneracyjny fenotyp myszy TIF-IADATCreERT2 jest związany z upośledzeniem aktywności jąderka komórkowego, którego rola – w świetle ostatnich doniesień – wykracza daleko poza regulowanie procesu syntezy rRNA i może mieć znaczenie w patologii nie tylko PD, ale także innych chorób neurodegeneracyjnych<sup>30</sup>. Bardzo podobne fenotypy do myszy z delecją TIF-IA, opisano u myszy pozbawionych genu kodującego białko Dicer (myszy DicerDATCre i DicerDATCreERT2)<sup>31,32</sup> oraz myszy z ablacją mitochondrialnego czynnika transkrypcyjnego TFAM w komórkach dopaminowych (myszy TfamDATCre = myszy MitoPark)<sup>33</sup>.

Chociaż objawy PD są związane bezpośrednio z utratą neuronów dopaminowych SN/VTA, wiadomo iż w przebiegu choroby dochodzi do degeneracji także innych układów neuroprzebieżnictwa, w szczególności układu noradrenergicznego<sup>34,35</sup>. Noradrenalina jest jednym z najważniejszych neuroprzebieżników w mózgu, a projekcje neuronów noradrenergicznych wychodzących z miejsca sinawego (ang. *Locus Coeruleus*, LC) dochodzą praktycznie do wszystkich struktur mózgu. Degeneracja neuronów noradrenergicznych w LC jest obserwowana u pacjentów z PD nawet w wyższym stopniu niż neuronów dopaminowych w rejonie SN/VTA i wydaje się poprzedzać tą drugą<sup>36</sup>. Dane eksperymentalne z modeli zwierzęcych opartych o podania neurotoksyn potwierdzają udział układu noradrenergicznego w regulacji efektów MPTP na układ dopaminowy<sup>37,38</sup>.

Interesującą teorią, która ostatnio przeżywa renesans, jest pomysł zaklasyfikowania choroby Parkinsona jako choroby prionowej<sup>39</sup> w oparciu o wyniki wcześniejszych badań w modelach transgenicznym, w tym eksperyment wykazujący możliwość przenoszenia synukleinopatii *in vivo* u myszy transgenicznym ze zmutowaną, ludzką formą A53T SNCA<sup>40</sup>.

### **Choroba Huntingtona – czy wiemy coś więcej?**

W przeciwieństwie do wspomnianych poprzednio dwóch najbardziej rozpowszechnionych chorób neurodegeneracyjnych, choroba Huntingtona (HD) jest wyłącznie genetyczna, dziedziczona w sposób autosomalny, wywołana przez mutację w genie kodującym białko huntingtynę (HTT) co w efekcie prowadzi do nadmiernego powielenia sekwencji CAG odpowiedzialnej za degenerację neuronów prążkowiec. HD charakteryzuje się postępującą dysfunkcją ruchową, zaburzeniami emocjonalnymi, demencją, utratą masy ciała. Pomimo iż przyczyna HD jest znana, bezpośredni związek pomiędzy samą mutacją a finalną utratą neuronów nie jest w pełni zrozumiały.

Po odkryciu w latach 90. mutacji będącej bezpośrednią przyczyną HD stworzono kilka modeli transgenicznych opartych o jej wierną replikację u myszy (mutacje typu knock-in z powielonym trypletem CAG). Jednakże okazało się, że pomimo wielokrotnie większej liczby powtórzeń CAG niż wystarczającej dla wywołania HD u ludzi, myszy te nie przejawiają wyraźnego fenotypu co po raz kolejny wskazuje, że poza samą mutacją również inne czynniki wewnątrzkomórkowe lub/i środowiskowe mogą przyczyniać się do przebiegu procesu neurodegeneracyjnego<sup>41</sup>. Najbardziej powszechnie stosowanym modelem transgenicznym w badaniach nad HD jest mysz R6/2, stworzona przez nadekspresję regionu końca aminowego HTT (a więc nie mająca wiele wspólnego z ludzką mutacją) charakteryzująca się głębokim deficytem motorycznym, chociaż bez wyraźnej apoptotycznej śmierci komórek<sup>42</sup>. Zwiększone podobieństwo do ludzkiego fenotypu HD zostało wykazane w modelach transgenicznych myszy ekspresjonujących pełnej długości zmutowany gen *Htt* ze zwielokrotnionymi powtórzeniami CAG (myszy BACHD i YAC128), które wykazywały wyraźną atrofię prążkowiec powiązaną z deficytem motorycznym<sup>43,44</sup>. Ciekawym podejściem było również wywołanie ekspresji zmutowanej HTT w komórkach glejowych pod kontrolą promotora GFAP (myszy GFAP-Htt), co ujawniło potencjalnie istotną rolę gleju w HD<sup>45</sup>. Inny, niedawno stworzony transgeniczny model HD został opracowany poprzez wywołanie selektywnej ekspresji zmutowanej HTT w presynaptycznych zakończeniach nerwowych (myszy SNAP25-150Q), co spowodowało liczne objawy podobne do przebiegu HD i letalność związaną prawdopodobnie z upośledzeniem uwalniania neurotransmiterów<sup>46</sup>.

### **Różne fenotypy - wspólne szlaki**

Wśród niektórych badaczy istnieje pogląd, że różne choroby neurodegeneracyjne mogą posiadać wspólne szlaki prowadzące do ostatecznej śmierci komórki. Postuluje się, że takie holistyczne podejście może przyczynić się do lepszego zrozumienia patofizjologii



neurodegeneracji<sup>47</sup>. Upośledzenie mitochondriów, procesy zapalne, zaburzenia degradacji białek, funkcji jąderka komórkowego, stres oksydacyjny, apoptoza i autofagia - wszystkie te procesy postulowane jako zaangażowane w procesach neurodegeneracyjnych nie są przecież unikatowe dla jakiejś jednej, szczególnej choroby neurodegeneracyjnej. Współcześnie nowym celem w badaniach nad chorobami neurodegeneracyjnymi staje się mikro RNA (miRNA) – małe niekodujące fragmenty RNA regulujące ekspresję genów na poziomie posttranskrypcyjnym. Nieprawidłowa ekspresja różnych miRNA została udokumentowana w wielu transgenicznym modelach AD, PD i HD<sup>48-50</sup>.

Na koniec warto dodać, że charakterystyka fenotypu w modelach neurodegeneracyjnych powinna również uwzględniać czynnik płci. Świadomość różnic fenotypowych zależnych od płci w zwierzęcych modelach zaburzeń afektywnych jest ostatnio szeroko dyskutowana<sup>51</sup>, ale w kontekście neurodegeneracji wydaje się wciąż niedoceniana. Różnice płciowe w podatności i przebiegu neurodegeneracji są jednak klinicznie udokumentowane – przede wszystkim w AD (gdzie częstość występowania choroby jest zdecydowanie częstsza u kobiet niż u mężczyzn), ale również w PD i HD. Ostatnie badania eksperymentalne opisują również znaczny efekt płci wpływający na rozwój fenotypu w potrójnym transgenicznym modelu AD u myszy<sup>52</sup>.

### **Podsumowanie**

Pomimo pewnych rozczarowań, związanych z jednej strony z brakiem oczekiwanego fenotypu, a z drugiej – z trudnościami w bezpośredniej translacji wyników uzyskanych w badaniach na zwierzętach do kliniki, transgeniczne modele myszy niewątpliwie poszerzyły naszą wiedzę na temat neurodegeneracji w ciągu ostatnich lat. Oczywiście, trudno przewidzieć, co może stać się potencjalnym przełomem w przyszłych badaniach nad chorobami neurodegeneracyjnymi. Wydaje się jednak, że rozwijanie modeli w innym kierunku niż tylko replikowanie dysfunkcji genetycznych zaobserwowanych w ludzkich formach chorób i „celowanie” raczej w różne szlaki neuroprzekaźnictwa zapewni większe szanse na nowe odkrycia w tej dziedzinie. Ponadto, ponieważ większość myszy transgenicznym jest zaskakująco oporna fenotypowo na mutacje, które powodują rodzinne formy ludzkich chorób neurodegeneracyjnych, interesującym wydaje się zweryfikowanie istnienia w tych modelach potencjalnych mechanizmów kompensacyjnych, które mogłyby stać się celem dla leczenia prewencyjnego. W tym kontekście szczególnie ważne są badania nad modelami odzwierciedlającymi progresywną naturę neurodegeneracji i wyjaśnienie mechanizmów

poprzedzających utratę komórek nerwowych, które mogą mieć potencjał w zakresie wczesnej diagnostyki i wprowadzania leczenia zanim neurony zostaną nieodwracalnie zdegenerowane.

*Zainteresowanych bardziej obszernym ujęciem tematu Autor odsyła do publikacji:*

Kreiner G: What have we learned recently from transgenic mouse models about neurodegeneration? The most promising discoveries of this millennium. *Pharmacol Rep* 2018, 16;70(6):1105-1115.

### **Piśmiennictwo:**

- 1 Li, P. *et al.* Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell* **135**, 1299-1310 (2008).
- 2 Sander, J. D. & Joung, J. K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol* **32**, 347-355 (2014).
- 3 Selkoe, D. J. & Hardy, J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* **8**, 595-608 (2016).
- 4 Ballatore, C., Lee, V. M. & Trojanowski, J. Q. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci* **8**, 663-672 (2007).
- 5 Chartier-Harlin, M. C. *et al.* Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature* **353**, 844-846 (1991).
- 6 Goate, A. *et al.* Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* **349**, 704-706 (1991).
- 7 Wild-Bode, C. *et al.* Intracellular generation and accumulation of amyloid beta-peptide terminating at amino acid 42. *J Biol Chem* **272**, 16085-16088 (1997).
- 8 Ameen-Ali, K. E. *et al.* Review: Neuropathology and behavioural features of transgenic murine models of Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* **43**, 553-570 (2017).
- 9 Borchelt, D. R. *et al.* Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* **17**, 1005-1013 (1996).
- 10 Holcomb, L. *et al.* Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat Med* **4**, 97-100 (1998).
- 11 Eriksen, J. L. & Janus, C. G. Plaques, tangles, and memory loss in mouse models of neurodegeneration. *Behav Genet* **37**, 79-100 (2007).

- 12 Lewis, J. *et al.* Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* **293**, 1487-1491 (2001).
- 13 Oddo, S. *et al.* Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A $\beta$  and synaptic dysfunction. *Neuron* **39**, 409-421 (2003).
- 14 Barrera-Ocampo, A. & Lopera, F. Amyloid-beta immunotherapy: the hope for Alzheimer disease? *Colomb Med (Cali)* **47**, 203-212 (2016).
- 15 Franco, R. & Cedazo-Minguez, A. Successful therapies for Alzheimer's disease: why so many in animal models and none in humans? *Front Pharmacol* **5**, 146 (2014).
- 16 Nilsson, P., Saito, T. & Saido, T. C. New mouse model of Alzheimer's. *ACS Chem Neurosci* **5**, 499-502 (2014).
- 17 Huang, Y. & Mahley, R. W. Apolipoprotein E: structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases. *Neurobiol Dis* **72 Pt A**, 3-12 (2014).
- 18 Bojarski, L., Herms, J. & Kuznicki, J. Calcium dysregulation in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* **52**, 621-633 (2008).
- 19 Kishi, T. *et al.* Memantine for Alzheimer's Disease: An Updated Systematic Review and Meta-analysis. *J Alzheimers Dis* **60**, 401-425, doi:10.3233/JAD-170424 JAD170424 [pii] (2017).
- 20 Blesa, J. & Przedborski, S. Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. *Front Neuroanat* **8**, 155, doi:10.3389/fnana.2014.00155 (2014).
- 21 Kreiner, G. Compensatory mechanisms in genetic models of neurodegeneration: are the mice better than humans? *Front Cell Neurosci* **9**, 56, doi:10.3389/fncel.2015.00056 (2015).
- 22 Janezic, S. *et al.* Deficits in dopaminergic transmission precede neuron loss and dysfunction in a new Parkinson model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, E4016-4025 (2013).
- 23 Oliveras-Salva, M. *et al.* rAAV2/7 vector-mediated overexpression of alpha-synuclein in mouse substantia nigra induces protein aggregation and progressive dose-dependent neurodegeneration. *Mol Neurodegener* **8**, 44 (2013).
- 24 Hennis, M. R., Marvin, M. A., Taylor, C. M., 2nd & Goldberg, M. S. Surprising behavioral and neurochemical enhancements in mice with combined mutations linked to Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* **62**, 113-123 (2014).

- 25 Kitada, T., Tong, Y., Gautier, C. A. & Shen, J. Absence of nigral degeneration in aged parkin/DJ-1/PINK1 triple knockout mice. *J Neurochem* **111**, 696-702 (2009).
- 26 Deng, H. X. *et al.* Identification of TMEM230 mutations in familial Parkinson's disease. *Nat Genet* **48**, 733-739 (2016).
- 27 Biosa, A. *et al.* Recent findings on the physiological function of DJ-1: Beyond Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* **108**, 65-72 (2017).
- 28 Lev, N., Roncevic, D., Ickowicz, D., Melamed, E. & Offen, D. Role of DJ-1 in Parkinson's disease. *J Mol Neurosci* **29**, 215-225 (2006).
- 29 Rieker, C. *et al.* Nucleolar disruption in dopaminergic neurons leads to oxidative damage and parkinsonism through repression of mammalian target of rapamycin signaling. *J Neurosci* **31**, 453-460 (2011).
- 30 Parlato, R. & Kreiner, G. Nucleolar activity in neurodegenerative diseases: a missing piece of the puzzle? *J Mol Med (Berl)* **91**, 541-547 (2013).
- 31 Chmielarz, P. *et al.* Dicer and microRNAs protect adult dopamine neurons. *Cell Death Dis* **8**, e2813 (2017).
- 32 Kim, J. *et al.* A MicroRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. *Science* **317**, 1220-1224 (2007).
- 33 Ekstrand, M. I. *et al.* Progressive parkinsonism in mice with respiratory-chain-deficient dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 1325-1330 (2007).
- 34 Braak, H., Ghebremedhin, E., Rub, U., Bratzke, H. & Del Tredici, K. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res* **318**, 121-134 (2004).
- 35 Rommelfanger, K. S. & Weinshenker, D. Norepinephrine: The redheaded stepchild of Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol* **74**, 177-190 (2007).
- 36 Zarow, C., Lyness, S. A., Mortimer, J. A. & Chui, H. C. Neuronal loss is greater in the locus coeruleus than nucleus basalis and substantia nigra in Alzheimer and Parkinson diseases. *Arch Neurol* **60**, 337-341 (2003).
- 37 Rommelfanger, K. S., Weinshenker, D. & Miller, G. W. Reduced MPTP toxicity in noradrenaline transporter knockout mice. *J Neurochem* **91**, 1116-1124 (2004).

- 38 Srinivasan, J. & Schmidt, W. J. Potentiation of parkinsonian symptoms by depletion of locus coeruleus noradrenaline in 6-hydroxydopamine-induced partial degeneration of substantia nigra in rats. *Eur J Neurosci* **17**, 2586-2592 (2003).
- 39 Brundin, P. & Melki, R. Prying into the Prion Hypothesis for Parkinson's Disease. *J Neurosci* **37**, 9808-9818 (2017).
- 40 Mougnot, A. L. *et al.* Prion-like acceleration of a synucleinopathy in a transgenic mouse model. *Neurobiol Aging* **33**, 2225-2228 (2012).
- 41 Chang, R., Liu, X., Li, S. & Li, X. J. Transgenic animal models for study of the pathogenesis of Huntington's disease and therapy. *Drug Des Devel Ther* **9**, 2179-2188 (2015).
- 42 Li, J. Y., Popovic, N. & Brundin, P. The use of the R6 transgenic mouse models of Huntington's disease in attempts to develop novel therapeutic strategies. *NeuroRx* **2**, 447-464 (2005).
- 43 Gray, M. *et al.* Full-length human mutant huntingtin with a stable polyglutamine repeat can elicit progressive and selective neuropathogenesis in BACHD mice. *J Neurosci* **28**, 6182-6195 (2008).
- 44 Slow, E. J. *et al.* Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington disease. *Hum Mol Genet* **12**, 1555-1567 (2003).
- 45 Bradford, J. *et al.* Expression of mutant huntingtin in mouse brain astrocytes causes age-dependent neurological symptoms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 22480-22485 (2009).
- 46 Xu, Q. *et al.* Synaptic mutant huntingtin inhibits synapsin-1 phosphorylation and causes neurological symptoms. *J Cell Biol* **202**, 1123-1138 (2013).
- 47 Ahmed, R. M. *et al.* Neuronal network disintegration: common pathways linking neurodegenerative diseases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **87**, 1234-1241 (2016).
- 48 Lee, S. T. *et al.* Altered microRNA regulation in Huntington's disease models. *Exp Neurol* **227**, 172-179 (2011).
- 49 Ma, L. *et al.* Advances with microRNAs in Parkinson's disease research. *Drug Des Devel Ther* **7**, 1103-1113 (2013).
- 50 Maes, O. C., Chertkow, H. M., Wang, E. & Schipper, H. M. MicroRNA: Implications for Alzheimer Disease and other Human CNS Disorders. *Curr Genomics* **10**, 154-168 (2009).

- 51 Palanza, P. & Parmigiani, S. How does sex matter? Behavior, stress and animal models of neurobehavioral disorders. *Neurosci Biobehav Rev* **76**, 134-143 (2017).
- 52 Yang, J. T. *et al.* Sex Differences in Neuropathology and Cognitive Behavior in APP/PS1/tau Triple-Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Neurosci Bull*, doi:10.1007/s12264-018-0268-9 (2018).