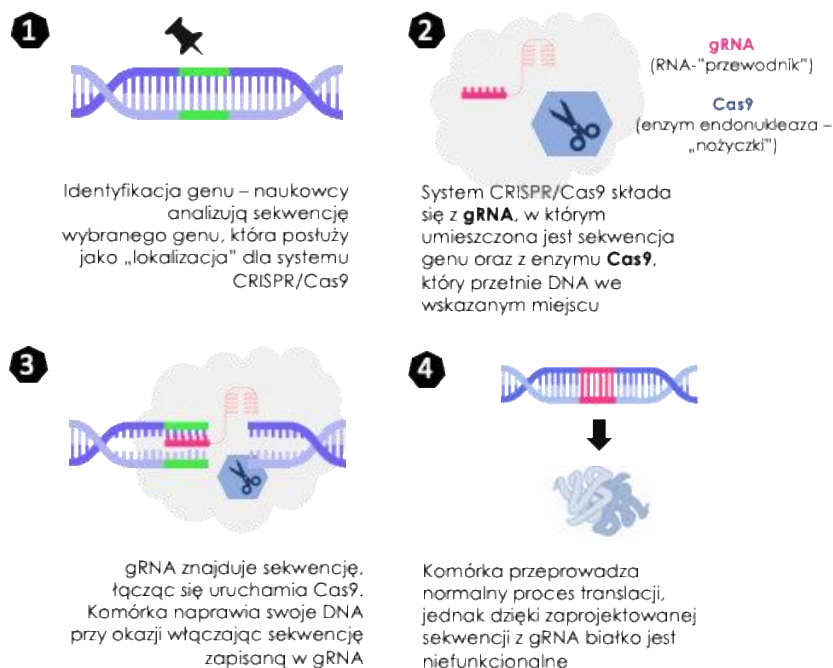


## „Wytnij i wklej” – czyli jak „białkowe nożyczki” pomagają naukowcom modelować choroby neurodegeneracyjne.

Wobec prognoz zwiększającej się w naszym społeczeństwie populacji osób starszych, szczególne zainteresowanie poświęca się chorobom neurodegeneracyjnym. Poszukiwanie markerów wczesnej fazy tych chorób, jak i efektywnych terapii spowalaniających rozwój degeneracji jest celem wielu naukowców. Dużą rolę w tym temacie odgrywają badania na modelach transgenicznym, które dzięki postępowi techniki są coraz bardziej wydajne i ograniczające liczbę zwierząt. Przełomowymi w tej dziedzinie badań są narzędzia opierające się na edycji genomu, jak np. metoda CRISPR-cas9, nazywana potocznie „molekularnymi nożycami” (1). Inspiracją do rozwoju tej techniki była natura, CRISPR/Cas jest to mechanizm immunologiczny bakterii, który rozpoznaje sekwencje obcego kwasu nukleinowego i degraduje go podczas kolejnej infekcji.

### Mechanizm działania CRISPR/Cas9

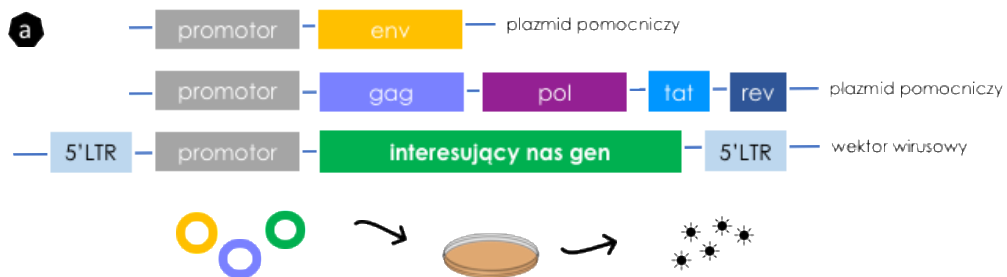
CRISPR składa się z fragmentu kwasu nukleinowego - **gRNA** (ang. guide RNA) oraz białka, endonukleazy DNA, nazywanej **Cas9** (rys.1). gRNA, które można zaprojektować samemu nakierowuje system CRISPR do miejsca, w którym DNA zostanie przecięte, a enzym Cas rozkłada DNA we wskazanym miejscu. Następnie mechanizmy naprawcze DNA w miejsce cięcia wklejają fragment zapisany w sekwencji gRNA. Mechanizm ten daje nam możliwość usunięcia białek, których brak doprowadzi do śmierci komórki (jak to ma miejsce w chorobach neurodegeneracyjnych). Uruchomienie mutacji *in vivo*, czyli bezpośrednio w interesującej nas strukturze mózgu zwierzęcia daje możliwość zbadania behawioru i testowania ukierunkowanej terapii. Aby to uzyskać, nasz konstrukt genetyczny musimy zamknąć w odpowiednim wektorze, który dostarczy oraz uruchomi swój mechanizm w docelowych komórkach.



Rys. 1. Schemat działania systemu CRISPR-Cas9

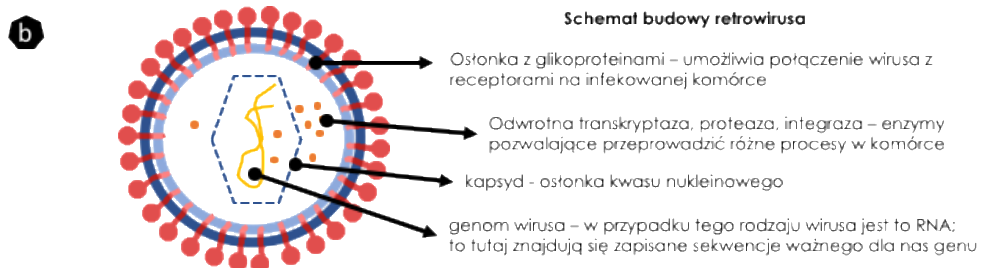
## Wektory wirusowe

Zaprojektowane wektory wykorzystują właściwości wirusów- infekują komórki i dostarczają obcy materiał genetyczny w procesie nazywanym **transdukcją**. Wektory celowo pozbawione są infekcyjności i aby stworzyć funkcjonalną cząsteczkę wirusa używa się nośników cząsteczek DNA, czyli plazmidów, z których każdy zawiera inną sekwencję (rys.2a). Obecnie używane jest pięć typów wirusów różniących się właściwościami, a w naszym laboratorium stosujemy lentiwirusy, czyli retrowirusy, z przedstawicielem HIV-1 (rys.2b). Wektor dostarczany jest do mózgu podczas operacji stereotaktycznej przy użyciu mikrostrzykawki. W miejscu podania wirusy infekują wszystkie komórki, natomiast ekspresja wprowadzonego genu ujawnia się tylko w populacji komórek, w których znajduje się identyczna sekwencja jaka jest zapisana w konstrukcie (sekwencja „promotora”).



Koliste cząsteczki DNA zaprojektowane przez naukowców, czyli **plazmidy**, które potrzebne są do produkcji kompletnego wektora wirusowego. Różne komponenty plazmidu **env**, **gag**, **pol**, **tat**, **rev** kodują różne części wirusa, tworząc jego osłonkę, kapsyd i enzymy dzięki którym przedostanie się do infekowanej komórki. **Interesujący nas gen** zawarty jest w osobnym plazmidzie. Każdy konstrukt genetyczny zawiera promotor, dzięki któremu możemy wybrać populację komórek, w których ma zająć ekspresja interesującego nas genu.

Wszystkie plazmidy umieszcza się w pożywce komórek „pakujących”. Komórki te pobierają DNA, wbudowują do swojego, a następnie produkują białka, które tworzą całość cząsteczki wirusa.

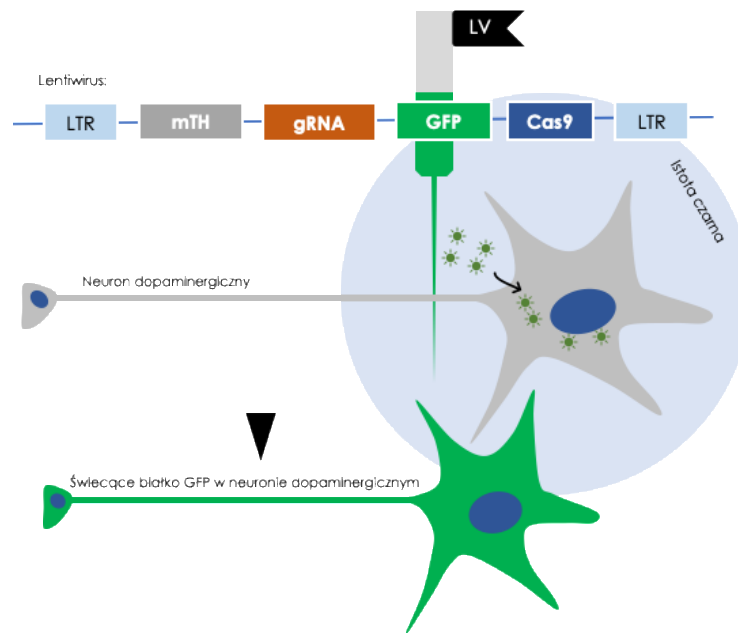


Rys. 2. Schemat produkcji wektorów lentiwirusowych oraz budowy cząsteczki retrowirusa

## Zastosowanie w badaniach nad chorobą Parkinsona

Choroba Parkinsona (PD) jest powoli postępującą chorobą neurodegeneracyjną, w której za bezpośrednie objawy (sztywność mięśniowa, drżenie kończyn) odpowiada utrata neuronów dopaminowych występujących w specyficznych strukturach mózgu: istocie czarnej i polu brzusznej nakrywki. Neuron dopaminowy produkuje neurotransmitter dopaminę, która jest odpowiedzialna między innymi za koordynację ruchową. Redukcja poziomu dopaminy wywołuje charakterystyczne, motoryczne objawy PD. Są one widoczne dopiero gdy degeneracja neuronów dopaminowych osiągnie ok. 80%, co daje już niewielkie pole manewru dla wprowadzenia ewentualnej terapii. Do tej pory, aby otrzymać model choroby Parkinsona zwierzętom podawana jest specyficzna toksyna, która w bardzo szybkim czasie powoduje utratę neuronów dopaminowych. W naszym laboratorium, dzięki precyzyjnej technice

CRISPR/Cas9 i odpowiedniemu doborowi gRNA możemy zaindukować i dobrze odzwierciedlić proces powolnej degeneracji neuronów (Rys.3). Daje to możliwość dokładnego zbadania jak choroba się rozwija na wczesnych etapach i jak ją rozpoznać zanim będzie zbyt późno na reakcję.



**Rys. 3. Przykładowe zastosowanie CRISPR/Cas9 w modelowaniu choroby Parkinsona**

Wirus podczas operacji stereotaktycznej wstrzykiwany jest do miejsca występowania neuronów dopaminowych – Istoty czarnej. Wirusy infekują komórki i dzięki promotorowi hydroksylazie tyrozyny (mTH) uruchamiają mechanizm tylko w neuronach produkujących dopaminę, zostawiając nienaruszone inne komórki. Konstrukt wirusa zawiera również białko GFP, którego ekspresja daje charakterystyczny zielony kolor. Dzięki takiemu znacznikowi można określić precyzyjnie miejsce działania wirusa. gRNA powoduje produkcję niefunkcyjnego białka, bez którego komórka powoli degeneruje.

W ostatnich latach zwrócono uwagę na postępującą degenerację również innych struktur mózgowych, powiązanych z układem dopaminowym w PD, w szczególności komórek produkujących noradrenalinę w obrębie miejsca sinawego (2). Wydaje się, że degeneracja układu noradrenergicznego może poprzedzać utratę komórek dopaminowych, a sam układ noradrenergiczny może stać się ważnym celem dla farmakoterapii. W naszych badaniach podjęliśmy próbę stworzenia modelu wczesnej fazy PD z wykorzystaniem systemu CRISPR/Cas9, dzięki któremu być może będzie możliwe poszukiwanie markerów rozwijającej się choroby na jej wczesnym, przed-objawowym stadium. Skonstruowany przez nas wektor uaktywnia swój mechanizm tylko w populacji neuronów, które produkują noradrenalinę. W efekcie komórki nie są zdolne do wytworzenia czynnika transkrypcyjnego TIF-1A, bez którego ulegają powolnej degeneracji, co wydaje się mieć późne, negatywne skutki na funkcjonowanie układu dopaminowego (3).

1. Doudna & Charpentier: The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science, 2014
2. Braak et al.: Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. Cell Tissue Research, 2004
3. Kreiner G., & Rafa-Zablocka K., et al.: Stimulation of noradrenergic transmission by reboxetine is beneficial for a mouse model of progressive parkinsonism. Scientific Report, 2019

Tekst pod obrazkami:

### Rys. 1. Schemat działania systemu CRISPR-Cas9

### Rys. 2. Schemat produkcji wektorów lentiwirusowych oraz budowy cząsteczki retrowirusa

Koliste cząsteczki DNA zaprojektowane przez naukowców, czyli **plazmidy**, które potrzebne są do produkcji kompletnego wektora wirusowego. Różne komponenty plazmidu **env**, **gag**, **pol**, **tat**, **rev** kodują różne części wirusa, tworząc jego osłonkę, kapsyd i enzymy dzięki którym przedostanie się do infekowanej komórki. **Interesujący nas gen** zawarty jest w osobnym plazmidzie. Każdy konstrukt genetyczny zawiera **promotor**, dzięki któremu możemy wybrać populację komórek, w których ma zajść ekspresja interesującego nas genu. Wszystkie plazmidy umieszcza się w pożywce komórek „pakujących”. Komórki te pobierają DNA, wbudowują do swojego, a następnie produkują białka, które tworzą całość cząsteczki wirusa.

### Rys. 3. Przykładowe zastosowanie CRISPR/Cas9 w modelowaniu choroby Parkinsona

Wirus podczas operacji stereotaktycznej wstrzykiwany jest do miejsca występowania neuronów dopaminowych – Istoty czarnej. Wirusy infekują komórki i dzięki promotorowi **hydryksylazie tyrozyny (mTH)** uruchamiają mechanizm tylko w neuronach produkujących dopaminę, zostawiając nienaruszone inne komórki. Konstrukt wirusa zawiera również **białko GFP**, którego ekspresja daje charakterystyczny zielony kolor. Dzięki takiemu znacznikowi można określić precyzyjnie miejsce działania wirusa. **gRNA** powoduje produkcje niefunkcjonalnego białka, bez którego komórka powoli degeneruje.