

Mgr Dominika Dubicka-Boroch, prof. dr hab. Jacek Kuźnicki

Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie

Mechanizmy i modele chorób neurodegeneracyjnych

Badania polskich 100-latków przeprowadzone w ramach projektu pt. *Aspekty medyczne, psychologiczne, socjologiczne i ekonomiczne starzenia się ludzi w Polsce (PolSenior)* realizowanego w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie w latach 2007-2012 wykazały, że spośród grupy 300 osób prawie 1/3 była w dość dobrym stanie zdrowia. Mimo zaawansowanego wieku ci stulatkowie nie mieli poważnych chorób, byli samodzielni w codziennym życiu oraz wykazywali się dobrą pamięcią, zarówno wydarzeń z czasów I wojny światowej, jak z kilku ostatnich lat swojego życia, a zatem zachowali swoją sprawność intelektualną. Jest to tzw. zdrowe starzenie (*successful ageing*), możliwe nawet w wieku 100 lat. Jednak, aby je osiągnąć, kluczowym jest uniknięcie poważniejszych chorób w ciągu życia, przede wszystkim chorób mózgu. Istnieje odwrotna zależność między szansą na nowotwór a chorobą neurodegeneracyjną, bowiem największa śmiertelność w młodym wieku jest skutkiem wypadków i nowotworów, ale wraz z wiekiem te przyczyny zgonów maleją, a notuje się wzrost śmiertelności z powodu chorób neurodegeneracyjnych.

Główną grupę chorób mózgu stanowią choroby psychiczne. Na świecie choruje na nie co najmniej 450 mln osób. Kolejna grupa to choroby neurodegeneracyjne - choruje ok. 50 mln osób. Inne choroby mózgu to np. udar (15 mln), urazowe uszkodzenie mózgu (*traumatic brain injury, TBI*), a także nowotwory mózgu, na które choruje ok. 1,5 mln osób. Łącznie daje to ok. 0,5 miliarda osób dotkniętych chorobami mózgu. Problem więc polega na ogromnej skali tych chorób oraz na tym, iż niestety na wiele z nich nie mamy leków, w przeciwieństwie np. do chorób układu krążenia, które w wielu przypadkach mogą być kontrolowane i skutecznie leczone.

Naukowcy na całym świecie próbują wyjaśnić mechanizmy chorób neurodegeneracyjnych, ale do tego potrzebują dobrych modeli tych chorób. Od nich bowiem zależy rozwój w badaniach, który mamy nadzieję, doprowadzi do znalezienia odpowiednich leków i postępów w terapii. Badania w Laboratorium Neurodegeneracji Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej (MIBMiK) w Warszawie są prowadzone najczęściej na komórkach ssaków, w tym także na hodowanych *in vitro* komórkach ludzkich,

myszach czy też na rybie danio pręgowany (*Danio rerio*, ang. *zebrafish*). Do badań często wykorzystuje się również drożdże, nicienie lub owady, np. muszkę owocówkę (*Drosophila melanogaster*).

Wyróżnić można 5 głównych chorób psychicznych. Są to: depresja, która jest najczęściej występującą chorobą psychiczną, ale niestety często pozostaje niezdiagnozowana, następnie choroba dwubiegunowa, schizofrenia, zespół nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (ADHD) i autyzm. W przypadku chorób psychicznych nie znamy w pełni ich mechanizmów dziedziczenia, ale na podstawie badań bliźniąt wiemy na pewno, że istnieje silny aspekt dziedziczności. Na podstawie badań asocjacyjnych całego genomu (*Genome Wide Association Studies, GWAS*) i analizy powiązania (*Linkage Analysis*) sprawdzano, jakie zmiany w genotypie są odpowiedzialne za pojawienie się tych chorób. Badania asocjacyjne całego genomu polegają na porównaniu dwóch licznych grup osób - pacjentów i osób zdrowych, czyli grupy kontrolnej. Analizuje się sekwencję nukleotydów w celu identyfikacji ich polimorfizmów, tj. pojedynczych zmian w nukleotydach (*single nucleotide polymorphism, SNPs*), tzw. snipów i sprawdza z jakim prawdopodobieństwem te zmiany różnicują dwie badane grupy. Jeżeli prawdopodobieństwo jest duże możemy sądzić, że dana zmiana jest czynnikiem ryzyka pojawienia się danej choroby. Wyniki badań asocjacyjnych pokazywane są najczęściej w postaci tzw. wykresu Manhattanu, gdzie na osi Y jest ujemny logarytm prawdopodobieństwa pojawienia się danej zmiany w sekwencji nukleotydów w danej grupie, zaś na osi X sekwencja poszczególnych chromosomów lub ich fragmentów. Pik wykresu oznacza większe prawdopodobieństwo danej zmiany różnicującej, a więc, że poszczególne zmiany nukleotydów może być odpowiedzialna za daną jednostkę chorobową. Zidentyfikowano kilka takich snipów u osób z chorobami psychicznymi, m.in. w genie *ITIH3* oraz w dwóch genach kodujących kanały wapniowe - *CACNB2* i *CACNA1C*. Jeden z tych genów wyciszyliśmy, by stworzyć rybę jako model tej choroby z niektórymi jej cechami. Procedura ta polegała na tym, że do zapłodnionego jaja ryby wstrzyknięto odpowiedni konstrukt, który spowodował wygaszenie ekspresji tego kanału wapniowego. Liczyliśmy, że w ciągu kilku dni cyklu rozwojowego otrzymamy larwy pozbawione tego kanału, a następnie dorosłe osobniki zdolne do rozmnażania. Moglibyśmy wówczas obserwować zmiany fenotypowe w takiej rybie. Niestety okazało się, że ryba bez tego kanału wapniowego nie jest w stanie się prawidłowo rozwijać i nie otrzymaliśmy zdrowych osobników. Jest to przykład tego, że proste przenoszenie wyników badań genetycznych do badań laboratoryjnych często nie daje oczekiwanych rezultatów.

Można także próbować stworzyć model wychodząc od funkcjonalnych wyników badań podstawowych. Przykładem są badania rozpoczęte kilka lat temu w Laboratorium Neurodegeneracji MIBMiK, prowadzone wówczas głównie przez Martę Wiśniewską, a obecnie kierownik jednej z grup badawczych w Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego, gdzie obecnie są kontynuowane. Działając w europejskim konsorcjum NeuConnect w ramach programu ramowego ERA-NET NEURON badaliśmy neuronalne białko adhezji komórkowej (*Neuronal Cell Adhesion Molecule, NCAM*), które bierze udział w oddziaływaniach między neuronami oraz między tymi komórkami a macierzą międzykomórkową. Wewnątrzplazmatyczna domena tego białka wiąże się z kinazami GSK3 i beta-kateniną. Wybarwiając skrawki mózgow myszy specyficznym przeciwciałem przeciwko beta-kateninie stwierdziliśmy, że w prawie wszystkich neuronach beta-katenina jest widoczna w rejonach podbłonowych, czyli tam, gdzie tworzy kompleks z białkiem NCAM. Zauważyliśmy jednak, że większość neuronów we wzgórzu ma wysoki poziom beta-kateniny również w cytozolu i jądrach komórkowych. Wykazaliśmy, iż beta-katenina wraz z czynnikami transkrypcyjnymi LEF/TCF akumuluje się w neuronach wzgórzowych i reguluje transkrypcję genu *Cacna1g* kodującego kanały wapniowe bramkowane napięciem Cav3.1, przyczyniając się do rozprzestrzeniania się impulsu elektrycznego w neuronach grzbietowych (Wiśniewska i wsp., 2010). Idąc dalej tym tropem próbowaliśmy odpowiedzieć na pytanie, co powoduje bardzo wysoki poziom beta-kateniny w niektórych neuronach. Wykazaliśmy, że odpowiada za to zmieniony poziom białek, w tym kinaz GSK3, które fosforylują beta-kateninę, co powoduje zmniejszoną jej ubikwitynację i degradację w proteasomie. Jeśli bowiem mamy zahamowaną aktywność kinaz GSK3, wówczas beta-katenina nie jest fosforylowana i nie może być wtedy ubikwitylowana. Bez tego procesu nie jest rozpoznawana przez proteasom i nie może być degradowana, a więc jej poziom wzrasta. Wysoki poziom beta-kateniny w cytozolu prowadzi do jej przejścia do jądra i do aktywacji genów docelowych dla szlaku Wnt. W jądrze komórkowym beta-katenina wiąże się z czynnikami transkrypcyjnymi takimi, jak LEF1 czy TCF7L2, które mają bardzo wysoki poziom we wzgórzu i w ten sposób aktywuje ekspresję genów odpowiedzialnych za różne zjawiska (Misztal i wsp., 2011).

Wyniki tych badań i obserwacje wskazujące na wpływ jonów litu na poziom beta-kateniny skłoniły nas do podjęcia próby opracowania modelu choroby afektywnej dwubiegunowej. Lit jest skutecznym stabilizatorem nastroju w chorobie dwubiegunowej, ale wykazuje silne działanie toksyczne nawet przy nieznacznym przedawkowaniu. Mechanizm terapeutycznego i toksycznego działania litu jest jednak niejasny. Klasyczna ścieżka sygnałowa Wnt, zależna od beta-kateniny, reguluje działanie czynnika transkrypcyjnego TCF7L2.

Dysfunkcja szlaku Wnt prowadzi do wielu zaburzeń, w tym neurodegeneracyjnych. Lit jest inhibitorem kinazy GSK3, która, jak wspomniano powyżej fosforyluje beta-keninę. Postanowiliśmy najpierw określić rolę jonów litu w stabilizacji poziomu beta-keniny w neuronach wzgórzowych. Iniekcje litu u myszy nie przynosiły dobrego efektu, ponieważ po kilku dniach można było uzyskać maksymalne jego stężenie ok. 1-2 mikrogramy/ml, znacznie niższe niż stężenie terapeutyczne. Okazało się jednak, że podawanie wody z chlorkiem litu dawało lepszy i stabilniejszy wynik u tych myszy. Zarówno w surowicy, jak i w mózgu poziom jonów litu był zbliżony do tego, jaki obserwuje się u ludzi, którym podawany jest ten lek. Następnie, badaliśmy wpływ litu na poziom beta-keniny w różnych neuronach. Okazało się, że odpowiednie dawki litu selektywnie aktywują ścieżkę Wnt zależną od beta-keniny w neuronach wzgórzowych, a mechanizm tej selektywności zależy od czynnika transkrypcyjnego TCF7L2. Białko to ulega ekspresji w neuronach wzgórzowych i ułatwia przejście beta-keniny do jądra komórkowego. Nasze badania wskazują zatem na możliwą rolę węgla i TCF7L2 w patofizjologii choroby dwubiegunowej (Misztal i wsp. 2017). Następnie podjęto próbę stworzenia myszy pozbawionej czynnika TCF7L2 w celu sprawdzenia, jaki jest mechanizm jego działania i jakie objawy choroby dwubiegunowej u takiej myszy wystąpią. Są to wyniki Marty Wiśniewskiej i jej zespołu, która przedstawi je m.in. na wykładzie na Kongresie FEBS w lipcu 2019 r. w Krakowie. Pojawiła się już praca, w której koreańscy uczeni opisali niektóre cechy mózgu myszy pozbawionej tego czynnika (Lee i wsp., 2017).

Wyniki naszej wspólnej pracy z Shernaz X. Bamji z Brain Research Center na Uniwersytecie Kolumbii Brytyjskiej z siedzibą w Vancouver wykazały, że stabilizacja beta-keniny w hipokampie mózgu dorosłej myszy powoduje znaczne zaburzenie plastyczności synaptycznej i zdolności poznawczych. Myszy z nadekspresją beta-keniny miały problem z zapamiętywaniem i uczeniem się w eksperymentach z lokalizacją platformy w tzw. teście wodnym Morrisa (Mills i wsp., 2014). Podsumowując, analiza ścieżki degradacji beta-keniny pozwala lepiej zrozumieć mechanizm działania litu jako leku w chorobie dwubiegunowej. Co więcej, daje to szansę na stworzenie nowego mysiego modelu tej choroby i może doprowadzić do identyfikacji miejsc uchwytu dla nowych leków.

Innym literaturowym przykładem tworzenia modelu choroby psychicznej jest wykorzystanie związku chemicznego do indukowania określonych zmian fenotypowych. Lundegaard i wsp. stworzyli np. model badania zaburzeń lękowych. Obecnie dostępne terapie farmakologiczne działają poprzez osłabienie pobudliwości neuronów, natomiast tu skupiono się na szlakach sygnałowych, w których pośredniczy fosfodiesteraza (PDE) cyklicznego AMP (cAMP). W tym celu wykorzystano larwy ryby danio pręgowany, które traktowano rolipramem

- inhibitorem PDE-cAMP. Spowodowało to nietypowe zachowanie larw - wszystkie chowały się głowami na krawędzi szalki, ponieważ tam było mniejsze oświetlenie. Larwy wykazywały więc typowe reakcje lękowe i uciekały tam, gdzie czuły się bezpiecznie. Podczas tych badań wykazano, że zastosowanie inhibitorów kinaz MEK stosowanych w terapii antynowotworowej może zmienić ten fenotyp i larwy, mimo potraktowania rolipramem, nie czują lęku. Innymi słowy, przy użyciu jednej substancji chemicznej (rolipram) wywołano u larw reakcje lękowe, a następnie zidentyfikowano związki chemiczne (inhibitory kinaz MEK), które ten lęk cofały. Terapeutyczne działanie dotyczy nie tylko larw, ale również osobników dorosłych danio przęgowanego, które pod wpływem rolipramu doświadczają stanów lękowych i spędzają czas głównie na dnie akwarium, co jest typowym objawem lęku u ryby, natomiast pod wpływem inhibitorów kinaz MEK te zachowania znikają. Pozwala to upatrywać w tych inhibitorach potencjalnych leków przeciwlękowych (Lundegaard i wsp., 2015).

Trzema głównymi chorobami neurodegeneracyjnymi są: choroba Parkinsona (PD), Alzheimer (AD) i Huntingtona (HD). Dla każdej z tych chorób można stworzyć jej model, jednak wymaga to poznania lub zaproponowania mechanizmu wystąpienia tej choroby. Najprostszym przykładem jest choroba Huntingtona (HD), w przypadku której znany jest jej molekularny mechanizm. Polega on na tym, że w genie kodującym huntingtynę (*HTT*) znajduje się nadmiar tripletów CAG, które na końcu białka huntingtyny (*HTT*) ulegają przekształceniu do reszt poliglutaminowych (poliQ), zmieniając właściwości tego białka. Gdy liczba powtórzeń CAG przekracza 40, huntingtyna tworzy agregaty w jądrach neuronów, hamując w ten sposób działanie różnych białek, w tym kluczowych czynników transkrypcyjnych. Są to zmiany patologiczne, prowadzące do zaburzenia transkrypcji i degeneracji neuronów. Im więcej tych zmian, tym bardziej zaawansowany fenotyp choroby. Naukowcy z Laboratorium Neurodegeneracji MIBMiK prowadzą badania na myszy transgenicznej YAC128 (*CAG*₁₂₈), będącej modelem HD ze 128 resztami glutaminy w białku huntingtyny. Porównywaliśmy m.in. ekspresję genów odpowiedzialnych za homeostazę wapniową. Okazało się, że kilka genów ma radykalnie zmienioną ekspresję, w tym białko HAP1 (*Huntingtin Associated Protein 1*), współpracujące z receptorem IP3R, przez który uwalniane są jony wapnia z endoplazmatycznego retikulum (ER) po aktywacji komórki. W naszych badaniach wykazaliśmy, że nadekspresja izoformy A białka HAP1 (HAP1A) powoduje zwiększenie aktywności receptora IP3R i procesu pojemnościowego napływu jonów wapnia (*store-operated calcium entry, SOCE*) (Czeredys i wsp., 2013). Największe zmiany zachodzą w średnich neuronach kolczastych (MSN) prążkowie, które odpowiada za funkcje motoryczne. Można również hodować *in vitro* neurony z tej części mózgu, które w hodowli będą wykazywać pewne zmiany,

w tym zaburzoną homeostazę wapniową, jak sądzimy, z powodu nadmiaru zmutowanej huntingtyny. Przeszukując biblioteki chemiczne znaleźliśmy grupę związków - tetrahydrokarbazoli, które przywracają zaburzoną homeostazę wapniową i stabilizują SOCE w hodowlach neuronów MSN z myszy YAC128. Zatem związek chlorowodoru 6-bromo-*N*-(2-fenyletyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-karbazol-1-aminy może stanowić kierunek leczenia HD, biorąc pod uwagę, że rozregulowanie homeostazy wapniowej jest jedną z charakterystycznych cech patologicznych tej choroby (Czeredys i wsp., 2017). A zatem pracując ze zwierzęciem z mutacją chorobotwórczą można analizować jego fenotyp i określić niektóre elementy związane z tą patologią. Część badań można także prowadzić na komórkach hodowanych *in vitro*, otrzymanych z takiego zwierzęcia, uzyskując wyniki przydatne do wyjaśnienia mechanizmów choroby.

Większy problem stanowi stworzenie modelu choroby Parkinsona (PD), ponieważ wyróżnia się przynajmniej 3 główne jej typy. Pierwszy typ - sporadyczny, w którym przyczyna choroby nie jest znana, możemy jedynie zakładać zmianę nukleotydów w niektórych genach, ale ich bezpośredni efekt nie jest określony. Drugi typ - środowiskowy to znany od lat efekt chemicznych trucizn, które specyficznie niszczą neurony dopaminergiczne. Trzeci typ - rodzinna choroba Parkinsona, za którą odpowiada konkretna mutacja w jednym z genów: alfa-synukleiny, parkiny, hydrolazie L1 ubikwityny, kinazie PINK1. Kinaza białkowa PINK1 jest zaangażowana w kontrolę stanu mitochondriów. W Laboratorium Neurodegeneracji MIBMiK we współpracy z Oliverem Bandmannem z Uniwersytetu w Sheffield prowadzone są badania ryby z mutacją w kinazie Pink1 (pozbawionej części karboksylowej). Flinn i wsp. pokazali, że już w 5-dniowej larwie ryby *pink1*^{-/-} (homozygotie, w której oba allele są zmutowane) ma miejsce utrata około 20% neuronów dopaminergicznych w porównaniu do ryby dzikiej (WT) (Flinn i wsp., 2013). Wspólnie z Oliverem Bandmannem postawiliśmy hipotezę, że utrata funkcji kinazy Pink1 powoduje zaburzenia homeostazy wapniowej w mitochondriach, prowadząc do ich dysfunkcji, a w konsekwencji do śmierci neuronów dopaminergicznych. Zastosowaliśmy antysensowne oligonukleotydy (*morpholino*) w celu inaktywacji mitochondrialnego uniportera wapniowego (*mitochondrial calcium uniporter, Mcu*) zlokalizowanego w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Białko to odpowiada za transport jonów wapnia z retikulum endoplazmatycznego bezpośrednio do mitochondriów. Stwierdziliśmy, że brak Mcu zapobiega utracie neuronów dopaminergicznych w danio pręgowanym z mutacją *pink1*^{-/-}. W przypadku ryby dzikiej brak Mcu nie miał wpływu na te komórki. Nasze badania wskazują zatem, że modulacja homeostazy wapniowej za pośrednictwem Mcu jest możliwym sposobem neuroprotekcji w mutantach *pink1*^{-/-} będących

modelem rodzinnej postaci PD (Soman i wsp., 2017). Pojawiły się jednak pewne zastrzeżenia do wyników tych badań, mówiące, że antysensowne oligonukleotydy (*morpholino*) powodują skutki uboczne, tzn. mogą wywoływać zmiany w ekspresji innych genów, niż gen docelowy. W celu wykluczenia tego efektu przygotowaliśmy rybę pozbawioną genu *mcu*, którą następnie skrzyżowaliśmy z rybą *pink1*^{-/-}. Wyniki tego eksperymentu ukażą się w aktualnie przygotowywanej publikacji i już wiemy, że w podwójnym mutancie ryby, tj. u osobników z mutacją w *pink1* i mutacją w *mcu* nie ma utraty neuronów dopaminergicznych (Soman, Bazała i wsp., 2018). A zatem, potwierdza się wcześniejsza konkluzja, iż brak białka odpowiedzialnego za napływ jonów wapnia do mitochondriów działa ochronnie na neurony mimo braku aktywnego białka Pink1. Kolejnym pytaniem było, czy faktycznie brak białka Mcu w rybie *pink1*^{-/-} powoduje przywrócenie homeostazy wapniowej. W tym badaniu wykorzystaliśmy kolejną linię ryby danio pręgowanego, która wykazuje ekspresję sztucznego białka GCaMP w neuronach. Ten sensor wapnia reaguje zwiększeniem fluorescencji po związaniu tych jonów. W mózgu żywej ryby obserwowanym pod specjalnym mikroskopem fluorescencyjnym (*Light Sheet Fluorescence Microscopy*) mogliśmy zobaczyć fluktuacje poziomu jonów wapnia jako zmiany fluorescencji w neuronach. Porównaliśmy następnie, jak zachowują się neurony z sondą wapniową GCaMP w neuronach danio, np. ile jest spontanicznych reakcji w neuronach ryby dzikiej, ryby z mutacją *pink1*^{-/-}, mutacją w *mcu* i w rybie z podwójną mutacją (Soman i wsp., w przygotowaniu). Ponadto, sprawdzaliśmy zachowanie tej ryby, stosując test „nowego akwarium”. Z obserwacji wynika, że ryba z mutacją *pink1*^{-/-} spędza więcej czasu na dnie akwarium, co wskazuje na zwiększony stres i zachowania lękowe. W sytuacji, gdy wyłączamy *mcu* widzimy znaczącą poprawę jej zachowania. Natomiast ryba dzika bez strachu eksploruje nowe akwarium w całości.

Jeśli chodzi o kolejną chorobę – Alzheimera, można wyróżnić przynajmniej dwa jej typy. Pierwszy to postać rodzinna (*familial Alzheimer's Disease, fAD*; < 5% przypadków), która ma podłoże genetyczne związane z mutacjami w genach kodujących białka presenilin (PSEN1, PSEN2) i białko prekursorowe beta-amyloidu (APP). Preseniliny są składnikiem tzw. kompleksu gamma-sekretazy czyli enzymu, który uczestniczy w wycinaniu beta-amyloidu z białka prekursorowego APP. Na skutek mutacji w presenilinach lub APP dochodzi do zmiany proteolizy APP, co wywołuje powstawanie większych ilości toksycznych form beta-amyloidu. Druga postać choroby - sporadyczna (*sporadic Alzheimer's Disease, sAD*; >95%), w przypadku której nie znamy przyczyn, ale wiemy, że głównym czynnikiem ryzyka jest wiek, charakteryzuje się objawami pojawiającymi się po 65 roku życia. Im osoba starsza, tym większa szansa wystąpienia choroby, np. u 90-latków prawdopodobieństwo wynosi aż 50%. Jeśli

chodzi o czynniki genetyczne w przypadku sAD to obecność u danej osoby dwóch alleli genu *APOE4* zwiększa szansę na pojawienie się tej choroby we wcześniejszym wieku. Główną i nadal obowiązującą hipotezą dotyczącą przyczyny choroby Alzheimera jest teoria beta-amyloidu. Według niej oligomery tego peptydu wywołują zmiany w neuronach i zaburzenia przewodnictwa synaptycznego, prowadząc do otępienia alzheimerowskiego. Są również coraz bardziej interesujące wskazówki mówiące, iż przyczyną AD nie jest beta-amyloid, lecz nadmiernie ufosforylowane białko tau (*phospho-tau*), znajdujące się wewnątrz neuronu, wpływające na stabilizację mikrotubul i odległości między nimi. Nadmierna fosforylacja tego białka prowadzi do powstawania wewnątrzkomórkowych splotów neurofibrylarnych (zwyrodnień nerwowo-włókienkowych), które utrudniają przewodzenie impulsów i są odpowiedzialne za patologiczne zmiany, prowadzące do śmierci neuronów. Niestety, rozwijając te hipotezy w wielu laboratoriach na świecie nadal nie opracowano skutecznej terapii AD, która przywracałaby pacjentom zdrowie i sprawność, a przynajmniej powstrzymywałaby rozwój tej choroby. Jedną z dotychczas nieskutecznych terapii są np. wyniki dotyczące przeciwciał anty A-beta. Inną, jest jeden z leków stosowanych w leczeniu cukrzycy, który dawał obiecujące dane we wcześniejszych fazach badań klinicznych, niestety wszystkie następne, na większej liczbie osób dały wyniki negatywne. Hipoteza amyloidowa zatem, na podstawie której zrealizowano tysiące badań klinicznych, nie przyniosła przełomu w leczeniu AD. Nawet Karl Herrup – wcześniejszy zwolennik hipotezy kaskady beta-amyloidu przyznał, iż jest ona jednak niewystarczająca, aby skutecznie zrozumieć mechanizm powstawania AD i należy ją odrzucić, a szukać innych mechanizmów odpowiedzialnych za zmiany patologiczne wywołujące tę chorobę (Herrup, 2015). Oczywiście nie kwestionuje się zmienionego poziomu beta-amyloidu w AD, ale prawdopodobnie nie jest to pierwotna przyczyna tej choroby.

Wracając do wyników badań asocjacyjnych całego genomu (GWAS), wiemy, że jedna z form białka APOE zwiększa ryzyko zachorowania na chorobę Alzheimera i faktycznie na chromosomie 19, na którym ten gen jest zlokalizowany zidentyfikowano SNPs (Kamboh i wsp., 2012). W przypadku innych genów, w których zidentyfikowano SNPs różnicujące osoby z chorobą Alzheimera od osób zdrowych wskazano na zupełnie inne geny, niż te, których się spodziewano, czyli presenilin i *APP*, gdyby hipoteza beta-amyloidowa była prawdziwa. Do zidentyfikowanych przez GWAS genów w bazie AlzGenes i ich funkcji należą: *APOE* - transport lipidów i układ immunologiczny; *BIN1* - endocytoza; *CLU* - układ immunologiczny; *ABCA7* - mitochondria i metabolizm jonów żelaza; *CRI* - stan zapalny; *PICALM* - endocytoza, utrzymanie synaps; *MS4A6A* - transdukcja sygnału; *CD33* - układ immunologiczny; *MS4A4E* - transdukcja sygnału; *CD2AP* - układ immunologiczny. Są to więc różne białka związane z tak

odmiennymi procesami, jak cykl endocytozy, odpowiedź immunologiczna organizmu oraz szlaki przekazywania sygnałów. Jedną z hipotez, mało badaną, zakłada, że zmiany wywołujące chorobę Alzheimera rozpoczynają się od stanu zapalnego, co oznacza, że być może przyczyną AD należy jednak szukać gdzieś indziej niż w proteolizie APP i fosforylacji białka tau.

W rodzinnej postaci AD (fAD) badania są prowadzone na różnych modelach doświadczalnych takich, jak myszy transgeniczne, komórki od pacjentów czy hodowle komórkowe, w których tak, jak w myszach wywołuje się nadekspresję białek ludzkich z mutacjami ludzkimi wywołującymi fAD. Niestety, do tej pory badania na tych modelach nie doprowadziły do opracowania leku dającego nadzieję chorym i ich bliskim. Co więcej, brakuje dobrych modeli doświadczalnych do zbadania mechanizmów sporadycznej postaci AD (sAD), np. posiadających jej cechy, gdzie głównym czynnikiem ryzyka jest wiek. Coraz więcej badań prowadzi się na ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórkach macierzystych (*human induced pluripotent stem cells, iPSCs*), które mają zdolność różnicowania się m.in. w neurony. Najpierw uzyskuje się komórki z małego fragmentu skóry dorosłego człowieka i hoduje *in vitro*. Następnie, przy pomocy odpowiednich procedur prowadzi się modyfikację wyhodowanych fibroblastów tak, by je przekształcić w neurony. Zaletą tego typu hodowli komórkowych jest to, że zawierają one określony genotyp poszczególnych pacjentów z AD lub osób zdrowych, których komórki są punktem odniesienia dla komórek od osób chorych. Być może to jest droga, która doprowadzi nas do konkretnego rozwiązania problemu sAD. Już kilka lat temu z Ursulą Wojdą, która obecnie jest kierownikiem zakładu w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN stwierdziliśmy, że zbyt dużo badań i środków zostało poświęconych hipotezom dotyczącym beta-amyloidu i białka tau, zamiast skierowania uwagi na badania innych procesów, m.in. cyklu komórkowego, stresu oksydacyjnego, insuliny, czy też homeostazy wapniowej. W kilku naszych artykułach przeglądowych wskazujemy, co inni badacze też postulują, że być może to właśnie zaburzenia homeostazy wapniowej są odpowiedzialne za pierwotne zmiany prowadzące do AD (Bojarski i wsp., 2008; Wojda i wsp., 2008; Wojda i Kuźnicki, 2013; Majewski i Kuźnicki, 2015). Już w latach 90-tych Khachaturian jako pierwszy zaproponował hipotezę wapniową, według której długotrwałe zaburzenia homeostazy wapniowej w starzejących się neuronach są bezpośrednią przyczyną chorób neurodegeneracyjnych, w tym AD (Khachaturian, 1994). Sugeruje się, że w zdrowym neuronie jest niski poziom spoczynkowy Ca^{2+} , ale na skutek różnych zmian związanych z wiekiem poziom ten zwiększa się. Przez pewien czas neurony dają sobie radę z taką zmianą, ale w pewnym momencie zaczynają gorzej funkcjonować, degenerują i tym samym dochodzi do zaniku połączeń między nimi. Starzenie mózgu jest zatem efektem zmian, m.in. w neuronach

mózgu, będących wynikiem powolnego zwiększania się poziomu Ca^{2+} i właśnie te zmiany mogą prowadzić do sAD. Badania wskazują, że zaburzenie homeostazy wapniowej występuje również w fAD, np. zmutowane białko APP daje zwiększony sygnał wapniowy pod wpływem glutaminianu (Supnet i wsp., 2006). W naszych badaniach pokazaliśmy ostatnio, że komórki HeLa z pozbawionym przy pomocy siRNA genem *APP*, wykazują podwyższony spoczynkowy poziom Ca^{2+} w ER oraz przedłużone uwalnianie jego zapasów z retikulum endoplazmatycznego; zatem nasze dane sugerują fizjologiczną funkcję APP w regulacji poziomu wapnia w ER (Gazda i wsp., 2017).

W naszych wcześniejszych badaniach zidentyfikowaliśmy nowe mutacje w presenilinach u polskich pacjentów z rodzinną postacią AD, niektóre wywołujące chorobę już w wieku 33 lat (Peplowska i wsp., 2003; Żekanowski i wsp., 2003, 2004, 2005, 2006). A zatem, zaburzenia homeostazy wapniowej w tej chorobie dotyczą nie tylko komórek nerwowych, ale także komórek obwodowych takich, jak limfocyty. Z badań prowadzonych na tych komórkach od pacjentów z łagodnymi zaburzeniami poznawczymi (*mild cognitive impairment, MCI*) oraz pacjentów, którzy w pełni rozwinęli sporadyczną AD wynika, że limfocyty tych osób wykazują zwiększony poziom spoczynkowego Ca^{2+} i SOCE w stosunku do grupy kontrolnej, jak również wskazują na zwiększone uwalnianie Ca^{2+} przez receptor IP3R zależny od działania trójfosforanu inozytolu IP3 (Jaworska i wsp., 2013). Z kolei oznaczając poziom wapnia w unieśmiertnionych limfocytach od pacjentów z fAD zanotowaliśmy obniżony pojemnościowy napływ wapnia do siateczki śródplazmatycznej oraz 2-krotnie niższy poziom STIM2 - jednego z białek sensorowych, reagujących na zmiany poziomu jonów wapnia w ER. Poziom białka STIM1 natomiast nie zmieniał się (Bojarski i wsp., 2009). Takie zmiany, tj. obniżony poziom STIM2, ale nie STIM1 obserwowaliśmy również w skrawkach hipokampa myszy fAD z mutacją w preseniline (PS1 A246E).

Po kilku latach grupa pod kierunkiem Bezprozvanego opublikowała wyniki badań, w których potwierdziła i rozwinęła nasze obserwacje, wykorzystując genetycznie modyfikowane myszy i materiał pobrany od pacjentów z sAD (Sun i wsp., 2014). M.in. wykazali oni, że białko STIM2 i neuronalny pojemnościowy napływ wapnia (*neuronal store-operated calcium influx, nSOCE*) odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu kolców dendrytycznych. Są to struktury neuronów, które mają znaczący wpływ na procesy pamięciowe. Ciągły napływ jonów wapnia za pośrednictwem szlaku nSOCE prowadzi do trwałej aktywacji zależnej od wapnia i kalmoduliny kinazy CaMKII w tych kolcach, co z kolei jest konieczne do ich prawidłowego funkcjonowania. Ta grupa badaczy wykazała również, że szlak STIM2-nSOCE-CaMKII jest zakłócony w starzejących się neuronach w hodowli oraz w skrawkach mózgu pacjentów ze

sporadyczną AD. Ich zdaniem jest to spowodowane obniżonym poziomem ekspresji białka STIM2. Co za tym idzie, nieprawidłowe funkcjonowanie szlaku STIM2-nSOCE-CaMKII przyczynia się do utraty połączeń synaptycznych oraz spadku zdolności poznawczych w starzeniu i AD. Te badania sugerują więc, że zwiększenie ekspresji STIM2 lub aktywności nSOCE może stanowić potencjalny cel terapeutyczny w leczeniu AD i innych zaburzeń pamięci związanych z wiekiem (Sun i wsp., 2014). Są to zatem bardzo ciekawe wyniki badań, jednak dotychczas nie zostały powtórzone przez inne grupy badaczy.

Zastanawialiśmy się także nad możliwością wykorzystania modeli AD w celu poszukiwania związków, które mają zdolność przywracania prawidłowej homeostazy wapniowej. Kilka lat temu, wspólnie z Jochenem Hermsem w ramach grantu polsko-niemieckiego stworzyliśmy linię embrionalnych ludzkich komórek nerek HEK293 z mutacją w preseniline 1, która jest powodem rodzinnej postaci AD. Do tych komórek wprowadzaliśmy gen kodujący sztuczne białko YC3.6 (*Yellow Camelion*). Jest to sonda do pomiaru zmian homeostazy wapniowej w komórkach. W zależności od tego, czy w komórkach HEK293 była zmutowana presenilina, czy forma dzika tego białka, zarejestrowaliśmy różny poziom jonów wapnia uwalnianego pod wpływem karbacholu. W komórkach ze zmutowanym białkiem obserwowano 2-krotny wzrost poziomu wapnia w porównaniu z komórkami z dziką preseniliną. Podczas tych doświadczeń korzystaliśmy ze specjalnego, zautomatyzowanego mikroskopu OPERA umożliwiającego owe badanie wpływu tysięcy niskocząsteczkowych związków chemicznych na poziom jonów wapnia w badanych komórkach. Przebadaliśmy w ten sposób 20 000 różnych związków, z których większość nie miała wpływu na przeżywalność komórek i na zmiany poziomu wapnia. Były jednak i takie związki, które przywracały homeostazę wapniową w komórkach ze zmutowaną preseniliną do poziomu charakterystycznego dla komórek z dziką preseniliną (patent: WO/2013/139929) (Honarnejad i wsp., 2013, 2013). Jednym z takich związków był Bepidil - znany antagonistą kanału wapniowego. Wskazaliśmy zatem, iż w ten sposób w ramach badań wielkoskalowych można oznaczać zmiany homeostazy jonów wapnia w celu poszukiwania związków chemicznych, które mogą regulować jego poziom w komórkach.

Obecnie próbujemy stworzyć model o cechach sporadycznej AD w oparciu o hipotezę wapniową. Na podstawie naszych wcześniejszych obserwacji wskazujących, iż nadekspresja białek STIM2 i ORAI1 powoduje znaczące podwyższenie poziomu jonów wapnia w neuronach hodowanych *in vitro* postanowiliśmy stworzyć odpowiednie linie myszy transgenicznych (Gruszczynska-Biegała i wsp., 2011). Założyliśmy, że neurony w mózgu myszy podwójnie transgenicznej (2xtg STIM2-ORAI1) będą miały również zwiększony poziom spoczynkowego

Ca²⁺. Grupę kontrolną stanowią będą neurony w mózgu myszy 2xtg STIM1-ORAI1, które powinny mieć normalny poziom jonów wapnia. Dysponujemy już transgenicznymi myszami, które w neuronach mają nadekspresję STIM1, STIM2 lub ORAI1. Obecnie, krzyżujemy je ze sobą, a następnie będziemy mierzyć poziom wapnia przy pomocy metod elektrofizjologicznych oraz oznaczać zachowanie tych myszy przy pomocy różnych testów. Oczekujemy, że myszy 2xtg STIM2-ORAI1 będą wykazywały zmiany patologiczne charakterystyczne dla AD w przeciwieństwie do myszy 2xtg STIM1-ORAI1.

AD rozwija się bezobjawowo przez wiele lat. Dodatkowym problemem związanym z tą chorobą jest brak dobrych testów diagnostycznych, które wskazują na zachodzące już patologiczne zmiany w mózgu mimo, iż jeszcze nie ma ich objawów. Poszukuje się zatem sposobu na identyfikację takich osób, które mają już zmiany charakterystyczne dla AD, ale nie mają symptomów, m.in. zaburzeń pamięci. Oprócz tego, że nie ma leku na AD jest to kolejny duży problem, ponieważ badania kliniczne najczęściej prowadzone są na osobach z zaawansowaną chorobą i wg „wyznawców” hipotezy amyloidowej potencjalne leki nie działały właśnie z uwagi na zaawansowanie tej choroby u badanych osób. Poszukiwanie biomarkerów AD to obecnie bardzo szeroki front badań, w które my również włączyliśmy się. Część zespołów na świecie poszukuje markerów, stosując metody obrazowania mózgu, a część tak, jak my, szuka ich we krwi. Wspólnie z Urszulą Wojdą i jej zespołem zidentyfikowaliśmy i zweryfikowaliśmy 15 miRNA (9 nowych i 6 opisanych) jako kandydatów na wczesne biomarkery AD we krwi (aplikacja patentowa: PCT/IB2016/052440) (Nagaraj i wsp., 2017). Zbadaliśmy także, iż zidentyfikowane miRNA wpływają na ekspresję genów kodujących białka związane z AD (APP, BACE, MAPT, PSEN) oraz różnicują pacjentów z wczesną postacią AD od postaci zaawansowanej. Opracowany panel biomarkerów miRNA obecnych we krwi może być zastosowany do wykrywania wczesnego stadium AD u osób z łagodnymi zaburzeniami poznawczymi.

Ostatnią ciekawostką są informacje, które ukazały się niedawno w pracy pt. *Closing in on a blood test for Alzheimer's?* (Alzforum, 2018)¹. Otóż, opracowano czuły i powtarzalny test z krwi, który z 90% dokładnością szacuje poziom beta-amyloidu w mózgu. Stosuje się w nim immunoprecypitację peptydów beta-amyloidu, a następnie spektrometrię masową. Test ten działa tak samo, jak badanie istniejących biomarkerów w płynie mózgowo-rdzeniowym (*cerebrospinal fluid, CSF*), ale jest to zdecydowanie prostsze, szybsze i tańsze niż nakłucia lędźwiowe czy obrazowanie przy pomocy pozytonowej tomografii emisyjnej

¹ <https://www.alzforum.org/news/research-news/closing-blood-test-alzheimers>

(*positron emission tomography, PET*). Jest to zatem bardzo obiecująca metoda badań, identyfikująca osoby do badania nowych leków anty AD.

Co możemy zatem zrobić na obecnym etapie wiedzy dotyczącej choroby Alzheimera? Możemy próbować zmniejszać swoje szanse na rozwój tej choroby, prowadząc tzw. zdrowy tryb życia. Wiele ostatnich badań podkreśla kluczową rolę snu, co wiąże się m.in. ze stężeniem beta-amyloidu w płynie mózgowo-rdzeniowym. Wg najnowszych prac jest ono aż o 30% większe u osób, które nie przesypiają nocy w stosunku do osób, które śpią regularnie (Alzforum, 2018)². Możemy więc minimalizować ryzyko zachorowania na AD, dbając o regularność naszego snu. Są także badania wskazujące, iż właściwe odżywianie mające wpływ na stan naszych naczyń krwionośnych jest czynnikiem zmniejszającym szanse na rozwój AD.

Modelami chorób ludzkich mogą być również ryby, np. danio pręgowany, który dysponuje wieloma zaletami jako model badawczy chorób człowieka. Wykazuje bowiem wysoką zgodność z genomem ludzkim (ok. 80%), jest przezroczysty przez pierwsze 5-6 dni życia, można więc obserwować *in vivo* to, co dzieje się w komórkach. Inne atuty to mały rozmiar organizmu, łatwość utrzymania i niskie koszty hodowli, duża liczba nowych osobników do uzyskania w krótkim czasie (300 larw na tydzień z 1 pary) i to, że praca z larwami do 5 dni nie wymaga zgody komisji etycznej. Ponadto, istnieje możliwość wielkoskalowych badań przyżyciowych oraz toksykologicznych i behawioralnych (*high-throughput screening, HTS*), analizy uczenia się i pamięci, co umożliwi identyfikację miejsc uchwytu potencjalnych leków. Danio pręgowany poddaje się także łatwym manipulacjom genetycznym, przez co można uzyskać osobniki z różnymi mutacjami, np. poprzez wprowadzenie stabilnej ekspresji dowolnego genu przy pomocy systemu Tol2 transpozazy (Kawakami, 2007), uzyskanie przejściowej nadekspresji genów w wybranych komórkach, obrazując je przyżyciowo (Bazała i wsp., 2016), poprzez zahamowanie ekspresji białka przy użyciu antysensownych oligonukleotydów lub unieczynnienie (nokaut) danego genu metodą CRISPR/Cas9.

Mimo wielu zalet danio pręgowanego nie jest to idealny model do badania procesów chorobotwórczych związanych ze starzeniem. Ryba ta żyje bowiem około 5 lat. Natomiast od kilku lat prowadzone są badania ryby killifish (*Nothobranchius furzeri*) jako nowego modelu starzenia i chorób związanych z wiekiem. Jest to jeden z najkrócej żyjących kręgowców, który ma wiele tych samych zalet co danio pręgowany, jednak do badania chorób neurodegeneracyjnych czy problemów starzenia nadaje się dużo lepiej, ponieważ ma bardzo krótki, 3-miesięczny cykl życiowy. Obserwowanie zatem zmian patologicznych związanych z

² <https://www.alzforum.org/news/research-news/skimping-sleep-makes-more-av-brain>

procesami neurodegeneracyjnymi w przypadku danio pręgowanego nie jest laboratoryjnie możliwe, zaś w przypadku killifish - tak. Innymi ciekawymi cechami tej ryby jest jej dojrzewanie płciowe, które trwa 3-4 tygodnie (jaja są trwałe bez wody), jest to mały drapieżnik, który zjada larwy komarów i wpływa przez to na częstość malarii, telomery nie ulegają skróceniu, telomeraza nie zmniejsza aktywności, lipofuscyna akumuluje się w mózgu i wątrobie, pojawiają się nowotwory, ograniczenia kaloryczne redukują różne objawy starzenia, zaś genom killifish jest już zsekwencjonowany. W niedalekiej przyszłości Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie uruchomi hodowlę tej ryby.

Bibliografia

1. Bazała M, Jędrychowska J, Kuźnicki J (2016) Przyżyciowe badania nad funkcjonowaniem mózgu przy użyciu mikroskopii SPIM. *Wszechświat* 117(10-12):263-269.
2. Bojarski Ł, Herms J, Kuźnicki J (2008) Calcium dysregulation in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 52(4-5):621-33. Review.
3. Bojarski Ł, Pomorski P, Szybińska A, Drab M, Skibińska-Kijek A, Gruszczyńska-Biegała J, Kuźnicki J (2009) Presenilin-dependent expression of STIM proteins and dysregulation of capacitative Ca^{2+} entry in familial Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1793(6):1050-7.
4. Czeredys M, Gruszczyńska-Biegała J, Schacht T, Methner A, Kuźnicki J (2013) Expression of genes encoding the calcium signalosome in cellular and transgenic models of Huntington's disease. *Front Mol Neurosci* 6:42.
5. Czeredys M, Maciąg F, Methner A, Kuźnicki J (2017) Tetrahydrocarbazoles decrease elevated SOCE in medium spiny neurons from transgenic YAC128 mice, a model of Huntington's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 483(4):1194-1205.
6. Flinn LJ, Keatinge M, Breaud S, Mortiboys H, Matsui H, De Felice E, Woodroof HI, Brown L, McTighe A, Soellner R, Allen CE, Heath PR, Milo M, Muqit MM, Reichert

- AS, Köster RW, Ingham PW, Bandmann O (2013) TigarB causes mitochondrial dysfunction and neuronal loss in PINK1 deficiency. *Ann Neurol* 74(6):837-47.
7. Gazda K, Kuźnicki J, Węgiński T (2017) Knockdown of amyloid precursor protein increases calcium levels in the endoplasmic reticulum. *Sci Rep* 7(1):14512.
 8. Gruszczyńska-Biegała J, Pomorski P, Wiśniewska MB, Kuźnicki J (2011) Differential roles for STIM1 and STIM2 in store-operated calcium entry in rat neurons. *PLoS One* 6(4):e19285.
 9. Herrup K (2015) The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nat Neurosci* 18(6):794-9. Review.
 10. Honarnejad K, Daschner A, Giese A, Zall A, Schmidt B, Szybińska A, Kuźnicki J, Herms J (2013) Development and implementation of a high-throughput compound screening assay for targeting disrupted ER calcium homeostasis in Alzheimer's disease. *PLoS One* 8(11):e80645.
 11. Honarnejad K, Kirsch AK, Daschner A, Szybińska A, Kuźnicki J, Herms J (2013) FRET-based calcium imaging: a tool for high-throughput/content phenotypic drug screening in Alzheimer disease. *J Biomol Screen* 18(10):1309-20.
 12. Jaworska A, Dzbek J, Styczyńska M, Kuźnicki J (2013) Analysis of calcium homeostasis in fresh lymphocytes from patients with sporadic Alzheimer's disease or mild cognitive impairment. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1833(7):1692-9.
 13. Kamboh MI, Demirci FY, Wang X, Minster RL, Carrasquillo MM, Pankratz VS, Younkin SG, Saykin AJ; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, Jun G, Baldwin C, Logue MW, Buross J, Farrer L, Pericak-Vance MA, Haines JL, Sweet RA, Ganguli M, Feingold E, Dekosky ST, Lopez OL, Barmada MM (2012) Genome-wide association study of Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry* 15;2:e117.
 14. Kawakami K (2007) Tol2: a versatile gene transfer vector in vertebrates. *Genome Biol* 8 Suppl 1:S7. Review.

15. Khachaturian ZS (1994) Calcium hypothesis of Alzheimer's disease and brain aging. *Ann N Y Acad Sci* 747:1-11. Review.
16. Lee M, Yoon J, Song H, Lee B, Lam DT, Yoon J, Baek K, Clevers H, Jeong Y (2017) Tcf7l2 plays crucial roles in forebrain development through regulation of thalamic and habenular neuron identity and connectivity. *Dev Biol* 424(1):62-76.
17. Lundegaard PR, Anastasaki C, Grant NJ, Sillito RR, Zich J, Zeng Z, Paranthaman K, Larsen AP, Armstrong JD, Porteous DJ, Patton EE (2015) MEK Inhibitors Reverse cAMP-Mediated Anxiety in Zebrafish. *Chem Biol* 22(10):1335-46.
18. Majewski Ł, Kuźnicki J (2015) SOCE in neurons: Signaling or just refilling? *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1853(9):1940-52. Review.
19. Mills F, Bartlett TE, Dissing-Olesen L, Wiśniewska MB, Kuźnicki J, Macvicar BA, Wang YT, Bamji SX (2014) Cognitive flexibility and long-term depression (LTD) are impaired following β -catenin stabilization in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(23):8631-6.
20. Misztal K, Brożko N, Nagalski A, Szewczyk LM, Krolak M, Brzozowska K, Kuźnicki J, Wiśniewska MB (2017) TCF7L2 mediates the cellular and behavioral response to chronic lithium treatment in animal models. *Neuropharmacology* 113(PtA):490-501.
21. Misztal K, Wiśniewska MB, Ambrożkiewicz M, Nagalski A, Kuźnicki J (2011) WNT protein-independent constitutive nuclear localization of beta-catenin protein and its low degradation rate in thalamic neurons. *J Biol Chem* 286(36):31781-8.
22. Nagaraj S, Laskowska-Kaszub K, Dębski KJ, Wojsiat J, Dąbrowski M, Gabryelewicz T, Kuźnicki J, Wojda U (2017) Profile of 6 microRNA in blood plasma distinguish early stage Alzheimer's disease patients from non-demented subjects. *Oncotarget* 8(10):16122-16143.

23. Peplowska B, Żekanowski C, Religa D, Czyżewski K, Styczyńska M, Pfeffer A, Gabryelewicz T, Gołębiowski M, Łuczywek E, Wasiak B, Barczak A, Chodakowska M, Barcikowska M, Kuźnicki J (2003) Strong association between Saitohin gene polymorphism and tau haplotype in the Polish population. *Neurosci Lett* 348(3):163-6.
24. Soman S, Keatinge M, Moein M, Da Costa M, Mortiboys H, Skupin A, Sugunan S, Bazała M, Kuźnicki J, Bandmann O (2017) Inhibition of the mitochondrial calcium uniporter rescues dopaminergic neurons in pink1(-/-) zebrafish. *Eur J Neurosci* 45(4):528-535.
25. Sun S, Zhang H, Liu J, Popugaeva E, Xu NJ, Feske S, White CL 3rd, Bezprozvanny I (2014) Reduced synaptic STIM2 expression and impaired store-operated calcium entry cause destabilization of mature spines in mutant presenilin mice. *Neuron* 82(1):79-93.
26. Supnet C, Grant J, Kong H, Westaway D, Mayne M (2006) Amyloid-beta-(1-42) increases ryanodine receptor-3 expression and function in neurons of TgCRND8 mice. *J Biol Chem* 281(50):38440-7.
27. Wiśniewska MB, Misztal K, Michowski W, Szczot M, Purta E, Leśniak W, Klejman ME, Dąbrowski M, Filipkowski RK, Nagalski A, Mozrzymas JW, Kuźnicki J (2010) LEF1/beta-catenin complex regulates transcription of the Cav3.1 calcium channel gene (*Cacna1g*) in thalamic neurons of the adult brain. *J Neurosci* 30(14):4957-69.
28. Wojda U, Kuźnicki J (2013) Alzheimer's disease modeling: ups, downs, and perspectives for human induced pluripotent stem cells. *J Alzheimers Dis* 34(3):563-88. Review.
29. Wojda U, Salińska E, Kuźnicki J (2008) Calcium ions in neuronal degeneration. *IUBMB Life* 60(9):575-90. Review.
30. Żekanowski C, Golan MP, Krzyśko KA, Lipczyńska-Łojkowska W, Filipek S, Kowalska A, Rossa G, Peplowska B, Styczyńska M, Maruszak A, Religa D, Wender M, Kulczycki J, Barcikowska M, Kuźnicki J (2006) Two novel presenilin 1 gene mutations

connected with frontotemporal dementia-like clinical phenotype: genetic and bioinformatic assessment. *Exp Neurol* 200(1):82-8.

31. Żekanowski C, Peplowska B, Styczyńska M, Religa D, Pfeffer A, Czyzewski K, Gabryelewicz T, Szybińska A, Kijanowska-Haładyna B, Kotapka-Minc S, Łuczywek E, Barczak A, Wasiak B, Chodakowska-Zebrowska M, Przekop I, Kuźnicki J, Barcikowska M (2004) The E318G substitution in PSEN1 gene is not connected with Alzheimer's disease in a large Polish cohort. *Neurosci Lett* 357(3):167-70.
32. Żekanowski C, Religa D, Safranow K, Maruszak A, Dziedziejko V, Styczyńska M, Gacia M, Golan M, Peplowska B, Chlubek D, Kuźnicki J, Barcikowska M (2005) The -22c/t polymorphism in presenilin 1 gene is not connected with late-onset and early-onset familial Alzheimer's disease in Poland. *J Neural Transm (Vienna)* 112(6):839-45.
33. Żekanowski C, Styczyńska M, Peplowska B, Gabryelewicz T, Religa D, Ilkowski J, Kijanowska-Haładyna B, Kotapka-Minc S, Mikkelsen S, Pfeffer A, Barczak A, Łuczywek E, Wasiak B, Chodakowska-Zebrowska M, Gustaw K, Łaczkowski J, Sobów T, Kuźnicki J, Barcikowska M (2003) Mutations in presenilin 1, presenilin 2 and amyloid precursor protein genes in patients with early-onset Alzheimer's disease in Poland. *Exp Neurol* 184(2):991-6.