

8. Brudzynski, S.M. Chiu, E.M. (1995). Behavioural responses of laboratory rats to playback of 22 kHz ultrasonic calls. *Physiology & Behavior*, 57: 1039–4104.
9. Brudzynski, S.M. Fletcher N.H. (2010). Rat ultrasonic vocalization: short-range communication. Chapter 3.3., In: *Handbook of Mammalian Vocalization. An Integrative Neuroscience Approach*. Brudzynski, S.M. (ed.) Elsevier/ Academic Press, Amsterdam, 2010, pp. 69–76.
10. Brudzynski, S.M. Holland, G. (2005). Acoustic characteristics of air puff-induced 22-kHz alarm calls in direct recordings. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29:1169–1180.
11. Brudzynski, S.M., Kehoe, P., Callahan, M. (1998). Sonographic structure of isolation-induced ultrasonic calls of rat pups. *Developmental Psychobiology*, 34: 195–204.
12. Brunelli, S.A., Shair, H.N., Hofer, M.A. (1994). Hypothermic vocalizations of rat pups (*Rattus norvegicus*) elicit and direct maternal search behavior. *Journal of Comparative Psychology*, 108: 298–303.
13. Burgdorf, J., Kroes, R.A., Moskal, J.R., Pfau, J.G., Brudzynski, S.M., Panksepp, J. (2008). Ultrasonic vocalizations of rats (*Rattus norvegicus*) during mating, play, and aggression: Behavioral concomitants, relationship to reward, and self-administration of playback. *Journal of Comparative Psychology*, 122: 357–367.
14. Burgdorf, J., Moskal, J. (2010). Frequency modulated 50 kHz ultrasonic vocalizations reflect a positive emotional state in the rat: neural substrates and therapeutic implications. In: *Handbook of Mammalian Vocalization. An Integrative Neuroscience Approach*. Brudzynski, S.M. (ed.) Elsevier/ Academic Press, Amsterdam, 2010, pp. 209–214.
15. Endres, T., Widmann, K., Fendt, M. (2007). Are rats predisposed to learn 22 kHz calls as danger-predicting signals? *Behavioural Brain Research*, 185(2):69–75.
16. Knutson, B., Burgdorf, J., Panksepp, J. (1998). Anticipation of play elicits high-frequency ultrasonic vocalizations in young rats. *Journal of Comparative Psychology*, 112: 65–73.
17. Litvin, Y., Blanchard, C.D., Blanchard, R.J. (2007). Rat 22 kHz ultrasonic vocalizations as alarm cries. *Behavioural Brain Research*, 182: 166–172.
18. Naito, H., Tonoue, T. (1987). Sex difference in ultrasound distress call by rat pups. *Behavioural Brain Research*, 25: 13–21.
19. Panksepp, J., Burgdorf, J. (2003). “Laughing” rats and the evolutionary antecedents of human joy? *Physiology & Behavior*, 79: 533–547.
20. Riede, T. (2011). Subglottal pressure, tracheal airflow, and intrinsic laryngeal muscle activity during rat ultrasound vocalization. *Journal of Neurophysiology*, 106(5):2580–92.
21. Seffer, D., Rippberger, H., Schwarting, R.K., Wöhr, M. (2015). Pro-social 50-kHz ultrasonic communication in rats: post-weaning but not post-adolescent social isolation leads to social impairments-phenotypic rescue by re-socialization. *Frontiers of Behavioral Neuroscience*, 9:102 (e-publication).
22. Wöhr, M., Houx, B., Schwarting, R.K., Spruijt, B. (2008). Effects of experience and context on 50-kHz vocalizations in rats. *Physiology & Behavior*, 93(4–5):766–776.

Prof. dr hab. Stefan M. Brudzynski, neurofizjolog, neurobiolog i biopsycholog, jest profesorem w Zakładzie Psychologii i w Zakładzie Nauk Biologicznych w Brock University, St. Catharines, Ontario, L2S 3A1 Canada, a także członkiem i byłym dyrektorem Instytutu Neuroscience w tym uniwersytecie. Email: sbrudzyn@brocku.ca

ZWIERZĘTA TRANSGENICZNE I ICH ZASTOSOWANIE W BADANIU CHOROBY PARKINSONA

Barbara Kosmowska (Kraków)

Streszczenie

Choroba Parkinsona (PD) to obecnie jedna z najczęściej występujących chorób neurodegeneracyjnych, dotykająca osoby starsze między 55 a 70 rokiem życia. Do wystąpienia objawów choroby dochodzi na skutek postępującej degeneracji neuronów dopaminergicznych części zbitej istoty czarnej, a co za tym idzie, silnego spadku poziomu dopaminy (DA) w prążkowie, gdzie dochodzą zakończenia szlaku czarno-prążkowiowego. Badania mające na celu poznanie patomechanizmu choroby i opracowanie skuteczniejszej terapii PD przeprowadza się przy użyciu modeli zwierzęcych. Do modelowania PD powszechnie wykorzystuje się neurotoksyny (np. 6-OHDA czy MPTP), zdolne do selektywnego uszkodzenia neuronów DA. Coraz częściej używa się również modeli genetycznych, czyli zwierząt transgenicznych, których materiał genetyczny został odpowiednio

zmodyfikowany. Zwierzęta te otrzymuje się przy pomocy różnych metod, takich jak: mikroiniekcja DNA do przedjądrza zygoty, modyfikacja pierwotnych komórek zarodkowych, klonowanie somatyczne czy infekcja wirusowa, a wybór techniki zależy przede wszystkim od oczekiwanego rodzaju modyfikacji. Transgeniczne modele PD odnoszą się przede wszystkim do genetycznych (rodzinnych) form choroby, które dotyczą ok. 10% przypadków, a podstawą do opracowania linii transgenicznych były zaobserwowane u pacjentów specyficzne mutacje w obrębie różnych genów, m.in. genu kodującego białko α -synukleinę oraz białko parkinę, genu LRKK2 czy PINK1. Mimo że do tej pory modele te nie przyczyniły się znacząco do opracowania skutecznej terapii PD, wydają się być niezwykle interesujące i obiecujące. Być może dzięki dalszej optymalizacji, pewnego dnia pozwolą odkryć lek, umożliwiającą zahamowanie lub chociażby spowolnienie rozwoju choroby.

Abstract

Parkinson's disease (PD) is one of the most common neurodegenerative diseases which affects elderly people mainly between the ages of 55 and 70. The main cause of the disease's symptoms is a progressive degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra (pars compacta) and, in consequence, a strong decrease of dopamine level in the striatum where the terminals of the nigrostriatal fibers are located. Most studies aimed at understanding the pathomechanism of the disease and developing an effective therapy are carried out using different animal models. Neurotoxins (e.g. 6-OHDA and MPTP) which are widely used to model PD are capable of selective death of dopaminergic neurons. Nowadays, the genetic models are used more and more frequently as an alternative to classic neurotoxin models. Genetic models are transgenic animals whose genetic material has been modified. They are obtained using different methods, such as: microinjection of DNA into the pronucleus of the zygote, modification of embryonic stem cells, somatic cloning or viral infection. The choice of the technology primarily depends on a nature of the expected modification. The transgenic models of PD are mainly related to a genetic (familiar) form of the disease, which concerns approximately 10% of cases. The starting point to produce the transgenic lines are specific mutations (in various genes, such as: α -synuclein, parkin, LRKK2, PINK1) occurring in patients. The genetic models have not significantly contributed to the development of an effective therapy for PD so far. Even though, they seem to be very interesting and promising. Perhaps in the near future, through further optimization, they will allow scientists to discover a drug enabling suppression or at least slowing of the disease.

Choroba Parkinsona (ang. *Parkinson's Disease*, PD) to obecnie jedna z najczęściej występujących chorób neurodegeneracyjnych, czyli takich, w których przebiegu dochodzi do postępującego procesu zwyrodnienia komórek nerwowych. PD w 70% przypadków rozpoczyna się między 55. a 70. rokiem życia i występuje z podobną częstością u mężczyzn i kobiet. Im wyższa grupa wiekowa, tym objawy pojawiają się częściej. Z powodu ogólnego wydłużania się długości życia ludzi na całym świecie, przewiduje się, że liczba przypadków choroby będzie dalej rosła. PD może również wystąpić u osób młodszych – u 5–10% pacjentów pierwsze objawy obserwuje się jeszcze przed 40. rokiem życia. Przypuszcza się, że w Polsce ok. 80 tys. osób cierpi na PD, nie przeprowadzono jednak dokładnych analiz epidemiologicznych. Nazwa choroby pochodzi od nazwiska londyńskiego lekarza Jamesa Parkinsona, który w 1817 roku jako pierwszy rozpoznał i opisał objawy tego schorzenia. U osoby dotkniętej PD dochodzi do charakterystycznych zmian neurodegeneracyjnych, zwłaszcza w części zbitiej istoty czarnej (SNc). Neurony

SNc wytwarzają neuroprzekaźnik dopaminę (DA), która transportowana jest aksonami do prążkowie (tzw. szlak czarno-prążkowie) i tam uwalniana z zakończeń nerwowych, dlatego też konsekwencją zaniku tych neuronów jest silny spadek poziomu DA zarówno w SNc, jak i w prążkowie (nawet do 90%). Postępująca utrata unerwienia dopaminergicznego prowadzi do wystąpienia charakterystycznych objawów ruchowych choroby, takich jak spowolnienie ruchowe, drżenie spoczynkowe, sztywność mięśniowa czy zaburzenia postawy [8]. W obrazie histopatologicznym obserwuje się obecność cytoplazmatycznych wtrętów wewnątrzkomórkowych, tzw. ciał Lewy'ego (LBs), których głównym składnikiem jest białko α -synukleina [14–15]. Mimo że przyczyna rozwoju choroby do dziś nie została w pełni poznana, obecny stan wiedzy wskazuje, że rozwój PD warunkowany jest zarówno przez czynniki genetyczne, jak i środowiskowe.

Do tej pory nie opracowano skutecznej terapii farmakologicznej, która umożliwiłaby całkowite zahamowanie lub spowolnienie dalszego rozwoju choroby.

W związku z tym stosuje się leczenie objawowe, obejmujące podawanie leków (najczęściej L-DOPA lub związków o charakterze agonistów receptorów DA) rekompensujących deficyty DA w mózgu chorego. W sytuacji, kiedy leczenie farmakologiczne okazuje się niewystarczające, wykonuje się również zabiegi chirurgiczne, takie jak stereotaktyczne uszkodzenie określonych struktur jąder podkorowych lub głęboka stymulacja mózgu poprzez implantację urządzenia zwanego rozrusznikiem mózgu [8]. Zabiegi te niwelują większość objawów ruchowych choroby, choć po dłuższym stosowaniu pojawiają się objawy uboczne.

Warto zauważyć, że postęp w poszukiwaniu skutecznych metod leczenia PD jest w dużym stopniu ograniczony przez brak modelu badawczego, który dobrze odzwierciedlałby zarówno postępującą w mózgu neurodegenerację, jak i zaburzenia behawioralne charakterystyczne dla PD. Większość badań opiera się na modelach zwierzęcych, u których objawy chorobowe wywołuje się poprzez podanie wybranej neurotoksyny domózgowo (np. 6-OHDA u szczurów) do SNc lub innych struktur na przebiegu szlaku czarno-prążkowiowego lub obwodowo (np. MPTP u myszy oraz małp). Chociaż neurotoksyczne modele wydają się być najlepsze, jeśli chodzi o badanie degeneracji szlaku czarno-prążkowiowego, to zmiany obserwowane w obrębie mózgu częściowo różnią się od tych występujących u pacjentów. W wyniku podania neurotoksyny dochodzi do bardzo szybkich zmian neurodegeneracyjnych (kilka dni), podczas gdy u ludzi choroba rozwija się latami. Co więcej, uszkodzenie obejmuje przede wszystkim, jeśli nie wyłącznie, neurony DA. Natomiast u pacjentów, chociaż główną rolę w patogenezie PD rzeczywiście przypisuje się zaburzeniom w układzie dopaminergicznym, zwyrodnienia neuronalne obejmują również włókna cholinergiczne, noradrenergiczne oraz serotonergiczne. Ponadto u zwierząt traktowanych różnymi neurotoksynami w większości przypadków nie obserwuje się charakterystycznych LBs, a występujące u nich zaburzenia behawioralne nie zawsze są typowe. Mimo że modele neurotoksyczne niewątpliwie pozwoliły na uzyskanie szeregu cennych informacji na temat potencjalnych terapii PD, nie odzwierciedlają one pełnego spektrum zmian neuropatologicznych i behawioralnych towarzyszących tej chorobie [15].

Większość przypadków PD to tzw. forma samostanna (idiopatyczna), a ok. 10% stanowią formy rodzinne, uwarunkowane genetycznie, wśród których wyróżnia się:

- młodzieńczą PD – dotyka osoby poniżej 20. roku życia,

- PD o wczesnym początku – dotyczy osób poniżej 40. roku życia,
- PD o późnym początku – pojawiająca się u osób powyżej 70. roku życia.

Na podstawie badań bliźniąt oraz rodzin, w których na PD cierpiało kilka osób, zidentyfikowano wiele genów związanych z występowaniem choroby, ale wykazano, że tylko mutacje 5 głównych genów stanowią czynnik sprawczy rodzinnych postaci PD. Są to mutacje dziedziczone w sposób autosomalny recesywny bądź dominujący. Do tych pierwszych należą mutacje w genie kodującym parkinę, białko DJ-1 oraz PINK1, zaś do tych drugich – mutacje w genie kodującym α -synukleinę czy LRKK2. Identyfikacja związanych z rozwojem PD genów oraz zachodzących w nich mutacji pozwoliła na opracowanie modeli genetycznych (czyli **zwierząt transgenicznych**), jako alternatywy dla klasycznych modeli neurotoksycznych [3].

Co to są zwierzęta transgeniczne?

Zwierzęta transgeniczne to takie, których materiał genetyczny został odpowiednio zmodyfikowany przy użyciu technik inżynierii genetycznej w celu uzyskania odpowiedniego efektu fenotypowego. Zwierzęta te wykorzystuje się m.in. do modelowania wielu ludzkich chorób, takich jak cukrzyca, choroby serca, choroba Alzheimera czy Parkinsona, a także do badania otyłości, zaburzeń lękowych czy nadużywania substancji psychoaktywnych. Dzięki, temu, że modele te pozwalają na badanie procesów chorobowych *in vivo*, odgrywają niezwykle ważną rolę w poszukiwaniu i opracowywaniu nowych leków.

Modyfikacje prowadzące do uzyskania zwierząt transgenicznych mogą polegać zarówno na integracji obcego fragmentu DNA do genomu zwierzęcia, jak i na manipulacjach w obrębie endogennego materiału genetycznego [13]. Wyróżnia się trzy podstawowe strategie otrzymywania zwierząt transgenicznych:

(1) wprowadzenie do genomu zwierzęcia obcego DNA i przypadkowa integracja tego transgenu w genomie,

(2) inaktywacja na poziomie DNA określonego genu, co prowadzi do uzyskania zwierząt typu „knock-out”, oraz

(3) celowe wprowadzenie transgenu w wybrany *locus*, prowadzące do otrzymania zwierząt typu „knock-in” [1]. Oprócz wymienionych, istnieją również inne, nieco bardziej wyrafinowane metody, m.in. takie jak produkcja zwierząt typu „knock-down” charakteryzujących się obniżoną ekspresją danego genu.

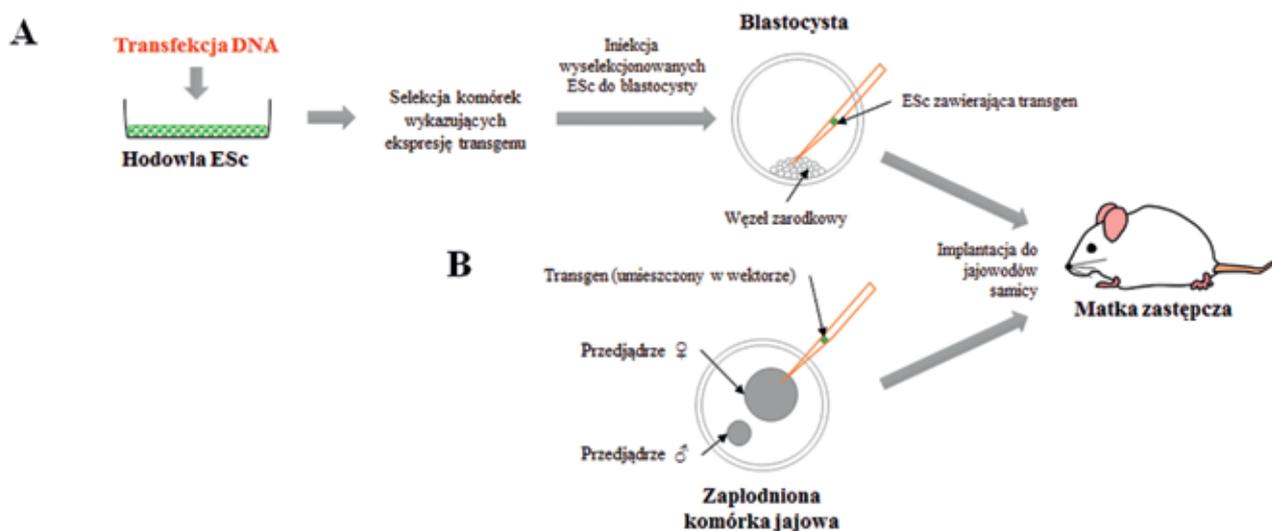
Klasykne metody otrzymywania zwierząt transgenicznych

Istnieją cztery główne metody otrzymywania zwierząt transgenicznych. Jedną z najczęściej stosowanych, głównie ze względu na swoją niezawodność, jest **metoda mikroiniekcji DNA** do przedjądrza zapłodnionej komórki jajowej (Ryc. 1B), wykorzystywana przede wszystkim wtedy, gdy celem jest uzyskanie ekspresji nowo wprowadzonej do genomu informacji genetycznej [12]. W metodzie tej odpowiednio przygotowany konstrukt DNA, składający się z transgenu wraz z sekwencjami pomocniczymi, wprowadzony zostaje do przedjądrza męskiego. Nastrzyknięte zygoty są następnie hodowane w warunkach *in vitro* aż do momentu osiągnięcia stadium dwukomórkowego, a otrzymane w ten sposób zarodki wszczepia się do jajowodów matek zastępczych. Po okresie ciąży rodzą się młode oseski, które testuje się na obecność transgenu.

Kolejną metodą otrzymywania organizmów transgenicznych jest **modyfikacja pierwotnych komórek zarodkowych** (ang. *embryo stem cells*, ESc), która pozwala na wprowadzenie precyzyjnych zmian w ściśle określonych pozycjach nici DNA (Ryc. 1A). ESc pobiera się z zarodka w stadium blastocysty, dzięki czemu otrzymuje się komórki niezróżnicowane i totipotencjalne, czyli takie, które są zdolne do odróżnicowania w dowolny typ komórek soma-

biochemicznych (np. z wykorzystaniem liposomów). Komórki wybrane na drodze selekcji namnaża się w warunkach *in vitro*, a uzyskaną w ten sposób linię komórkową wprowadza się ponownie do blastocysty, w której zmodyfikowane ESc łączą się z niemodyfikowanymi komórkami zarodka tworząc jeden organizm. Otrzymane embriony transferuje się do jajowodów samic, a po okresie ciąży oseski testuje się na obecność transgenu. Aby uzyskać pożądaną integrację, wprowadzany fragment DNA zawiera sekwencje homologiczne do modyfikowanego genu, co pozwala na wystąpienie zjawiska rekombinacji homologicznej, a w efekcie na dużo bardziej precyzyjną modyfikację docelowego genu niż ma to miejsce w przypadku mikroiniekcji DNA.

Komórki o podobnych do ESc właściwościach uzyskać można również w warunkach *in vitro* z komórek somatycznych dorosłego osobnika poprzez wymuszenie ekspresji odpowiednich genów. W ten sposób otrzymuje się **indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste**, które zdolne są do różnicowania w dowolny typ komórek, z wyjątkiem komórek rozrodczych. Komórki te można poddawać analogicznym do ESc modyfikacjom genetycznym, a następnie wprowadzać do blastocysty i wszczepiać do jajowodu matki zastępczej. Metoda ta pozwala wyeliminować konieczność „produkowania” zarodków *in vivo*, a w związku z tym uniknąć wielu problemów natury etycznej.



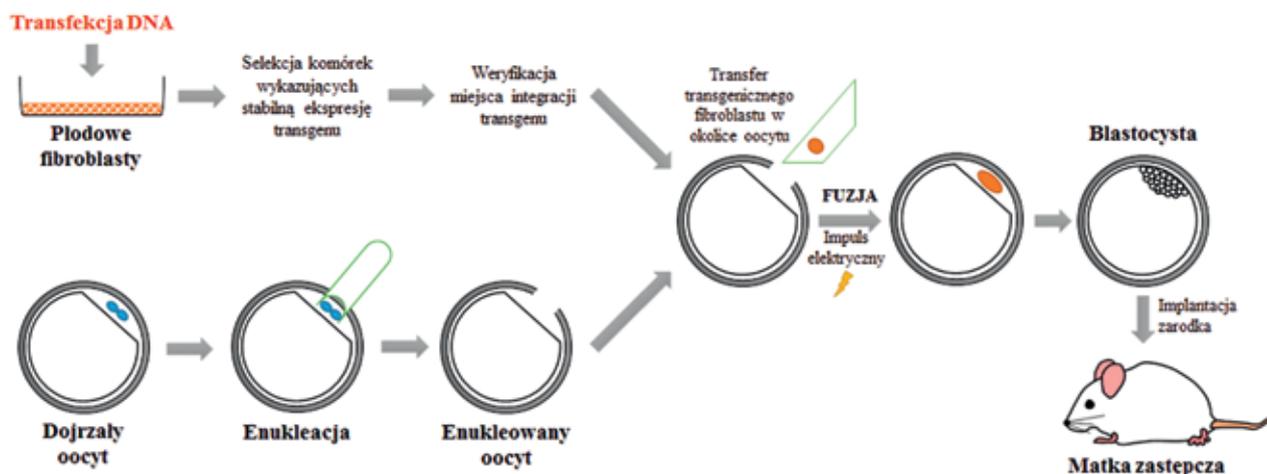
Ryc. 1. Otrzymywanie linii zwierząt transgenicznych metodami: (A) modyfikacji pierwotnych komórek zarodkowych lub (B) mikroiniekcji DNA do przedjądrza zygoty. Źródło: opracowanie własne.

tycznych [7]. ESc hodowane w warunkach *in vitro* poddaje się transfekcji, która polega na wprowadzeniu do komórek odpowiednio przygotowanego konstrukt DNA (zawierającego transgen) przy pomocy metod fizycznych (głównie elektroporacja) bądź

Metodę modyfikacji ESc stosuje się obecnie tylko w przypadku myszy, natomiast dla pozostałych gatunków istnieje również inna droga transgenizacji. Wykorzystuje ona technikę **klonowania somatycznego**, zwanego również somatycznym transferem

jądrowym (Ryc. 2). Pierwszym zwierzęciem, które otrzymano metodą klonowania somatycznego, była owca Dolly. W pierwszej kolejności pobierane są ko-

retowirusów), a także adenowirusy oraz wirusy towarzyszące adenowirusom (ang. *adeno-associated viruses*, AAV) [2].



Ryc. 2. Transgenizacja metodą klonowania somatycznego. Źródło: opracowanie własne.

mórki somatyczne (np. fibroblasty płodowe), które poddaje się transfekcji w warunkach *in vitro* przy pomocy odpowiedniego wektora (np. wirusowego) niosącego transgen. Przetrasfektowane komórki poddaje się selekcji na obecność i stabilność wbudowania transgenu, a wyselekcjonowane komórki umieszcza się w pobliżu oocytu pozbawionego jądra komórkowego. Obie komórki ulegają połączeniu w procesie elektrofuzji. W ten sposób otrzymuje się zygotę, której rozwój kierowany jest na początku przez składniki zawarte w cytoplazmie oocytu, a następnie funkcję rozwoju przejmuje jądro komórki somatycznej [11]. Zarodek w stadium blastocysty implantuje się do jajowodu matki zastępczej. Jeżeli zygota została z powodzeniem zmodyfikowana, zmiana ta obecna będzie w każdej komórce powstałego organizmu.

Nieco odmienną w stosunku do wymienionych wyżej metod jest transfer DNA na drodze **infekcji wirusowej**. W tym celu wykorzystuje się wektory wirusowe, które charakteryzują się naturalną zdolnością do wprowadzania swojego materiału genetycznego, DNA lub RNA, do jądra komórki gospodarza. Przed zastosowaniem wirusa jako wektora należy go najpierw pozbawić infekcyjności poprzez usunięcie genów biorących udział w cyklu replikacyjnym. Na ich miejsce wprowadza się transgen. Wirusy mogą być używane do transgenizacji *in vitro* (głównie komórek ESc) lub też wprowadzane *in vivo* bezpośrednio do wybranej struktury mózgu. W kontekście PD największe znaczenie mają te wirusy, którą są w stanie transdukować komórki nie ulegające podziałom, jakimi są neurony. Wśród tego typu wektorów wyróżnić można lentiwirusy (należące do rodziny

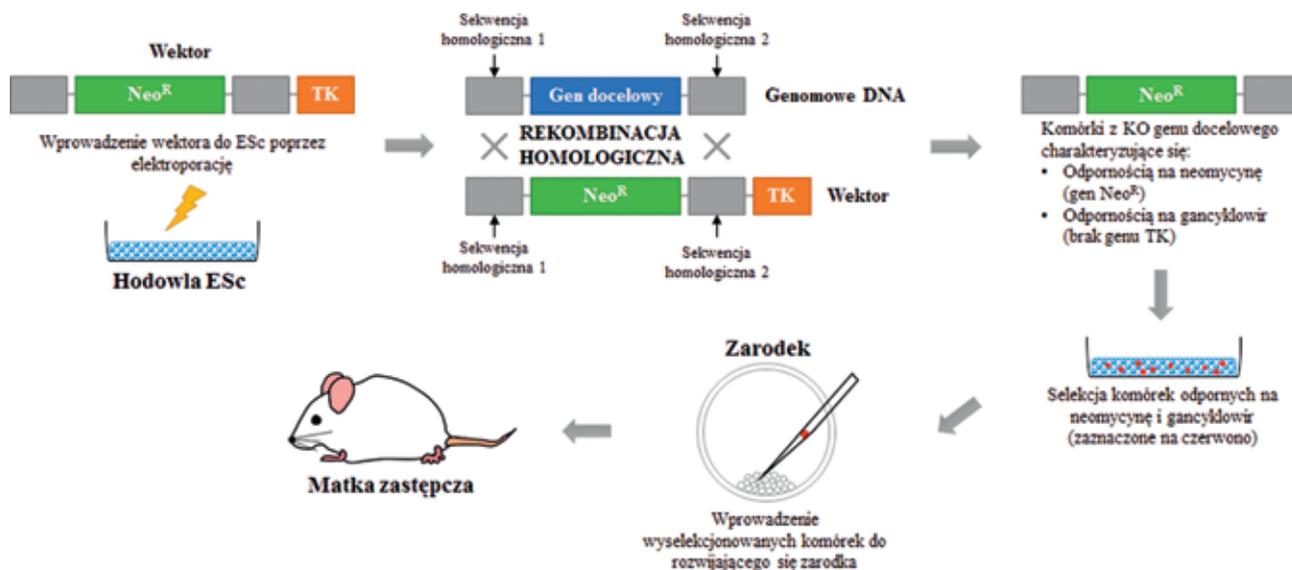
Specjalistyczne techniki transgenizacji zwierząt

Zwierzęta transgeniczne, które obecnie najczęściej wykorzystuje się jako modele różnych chorób układu nerwowego, w tym również PD, to zwierzęta z mutacją typu „knock-out” (KO). Technika „knock-outu” genowego (Ryc. 3) wykorzystuje zjawisko rekombinacji homologicznej, czyli reakcji wymiany fragmentów DNA pomiędzy wektorem (obcym fragmentem DNA) a odpowiadającą mu sekwencją DNA w genomie gospodarza. Warunkiem koniecznym do wystąpienia tego zjawiska jest istnienie wysokiej homologii pomiędzy obiema sekwencjami. Wektor składa się z sekwencji homologicznej do docelowej (obecnej w genomie gospodarza), w obrębie której wstawiona została sekwencja markera (np. NeoR – genu odporności na antybiotyk neomycynę). Dodatkowo wektor zawiera drugi marker selekcyjny (np. TK – gen kodujący enzym kinazę tymidynową), pozwalający na eliminację komórek, w których proces rekombinacji zaszedł w sposób nieprawidłowy. Po wprowadzeniu wektora do komórek dochodzi do homologicznej rekombinacji prowadzącej do wbudowania sekwencji markera (NeoR) w obrębie genu docelowego, a w efekcie do jego inaktywacji. Otrzymane komórki poddaje się dwuetapowej selekcji:

1. Odporność na antybiotyk neomycynę – jeśli komórki są odporne, oznacza to, że posiadają sekwencję markera NeoR wbudowaną w obrębie sekwencji genu docelowego powodując jego „knock-out”;
2. Odporność na gancyklowir – TK przekształca gancyklowir w toksynę powodującą śmierć

komórki, w związku z czym odporne są tylko komórki, które nie posiadają genu TK, a więc takie, u których rekombinacja zaszła w sposób prawidłowy i nieprzypadkowy.

– gen rekombinazy ulega ekspresji tylko w odpowiedniej tkance lub tylko wtedy, gdy zadziałamy odpowiednim induktorem. Gdy dojdzie do ekspresji i powstania białka rekombinazy Cre, indukuje ona



Ryc. 3. Etapy tworzenia zwierząt z mutacją typu „knock-out” (KO). Objasnienia: TK – enzym kinaza tymidynowa (TK przekształca gancyclovir w toksynę powodującą śmierć komórki). Źródło: opracowanie własne na podstawie [15].

Tak wyselekcjonowane komórki, odporne zarówno na naomycynę, jak i na gancyclovir, wprowadza się do rozwijającego się zarodka, który następnie wszczepia się do jajowodu matki zastępczej.

Otrzymywanie zwierząt KO jest jednak niezwykle trudne, ponieważ w przypadku, gdy usuniemy sekwencję kodującą gen istotny dla funkcjonowania całego organizmu, może okazać się, że modyfikacja taka będzie letalna. Metoda ta nie nadaje się również do studiowania genów ulegających ekspresji tylko w określonych tkankach. Między innymi z tego powodu naukowcy coraz częściej posługują się **systemami warunkowej/indukowalnej ekspresji genów**, które pozwalają na kontrolę miejsca i/lub czasu ekspresji. Przykładem tego typu systemu jest **system Cre/loxP**. W metodzie tej wyprowadza się dwie transgeniczne linie mysie:

1. Linię osobników posiadających gen kodujący enzym (rekombinazę Cre), który ulega ekspresji pod kontrolą promotora indukowanego (do działania potrzebuje cząsteczki zwanej induktorem) lub tkankowo specyficznego (ulegającego ekspresji w konkretnych tkankach organizmu);
2. Linię zwierząt, u których sekwencję wybranego genu zastąpiono taką samą sekwencją otoczoną miejscami loxP, czyli krótkimi sekwencjami rozpoznawanymi przez enzym rekombinazę Cre.

Osobniki obu linii kojarzą się ze sobą, a w uzyskanym potomstwie – w zależności od użytego promotora

różne zdarzenia rekombinacyjne, takie jak: usunięcie oryginalnego genu, wprowadzenie genu egzogenne-go czy wymiana genu endogenne-go na egzogenne, w zależności od orientacji i ułożenia miejsc loxP.

Inżynieria genetyczna to w ostatnich latach jedna z najszybciej rozwijających się dziedzin nauki. Powstają coraz to nowsze i wydajniejsze techniki, dzięki którym dotychczasowe metody transgenizacji zwierząt ulegają ciągłym udoskonale-niom. Jednymi z najnowszych są techniki **ZNFs** (ang. *zinc-finger nucleases*) czy **TALENS** (ang. *transcription activator-like effector nuclease*). Obie metody wykorzystują sztuczne enzymy restrykcyjne (tnące nić DNA), które otrzymuje się w warunkach laboratoryjnych poprzez połączenie dwóch domen białkowych: domeny wiążącej DNA, która ma za zadanie rozpoznać specyficzną sekwencję i przyłączyć kompleks białkowy w odpowiednim miejscu genomu, oraz domeny nukleazowej, która przecina nić DNA w miejscu związania kompleksu. Pod koniec ubiegłego roku opracowano również technikę zwaną **CRISPR/Cas9**, która wywołała swego rodzaju rewolucję, głównie ze względu na to, że jest znacznie szybsza, dokładniejsza, i przede wszystkim tańsza niż poprzednie metody. Do komórki docelowej (np. ESc) wprowadza się konstrukt DNA zawierający sekwencję kodującą enzym Cas9 oraz sekwencję komplementarną do wybranego miejsca w genomie. W wyniku działania systemu CRISPR/Cas9 dochodzi do naprowadzenia

enzymu w wybrane na podstawie komplementarności sekwencji miejsce genomu i do kontrolowanego przecięcia nici DNA. Dzięki technikom ZNFs, TALENs czy CRISPR/Cas9 można wycinać, a przy dostarczeniu dodatkowego DNA, również podmienić lub wstawić geny w konkretnych miejscach genomu [6].

Transgeniczne modele zwierzęce w badaniu PD

Transgeniczne modele zwierzęce dużo lepiej oddają mechanizm leżący u podstaw rodzinnych form PD aniżeli modele neurotoksyczne. Dowiedziono, że wiele istotnych zaburzeń towarzyszących PD i zachodzących na poziomie komórkowym czy molekularnym, takich jak fragmentacja i dysfunkcja mitochondriów, zaburzenia procesu mitofagii, funkcjonowania systemu ubikwityna-proteasom czy zmiany w obrębie procesu produkcji reaktywnych form tlenu, spowodowana jest mutacjami w obrębie specyficznych genów [4]. Do tej pory zidentyfikowano ponad 18 różnych *loci* (PARK1-18) związanych z rozwojem PD, spośród których najważniejsze wydają się być geny kodujące α -synukleinę, parkinę, białko DJ-1, PINK1 oraz LRRK2. Dokładna analiza tych genów oraz zachodzących w nich mutacji były pierwszym krokiem do opracowania linii transgenicznych zwierząt modelujących PD, które otrzymuje się poprzez wprowadzenie zmutowanych ludzkich genów do genomu organizmu docelowego – najczęściej myszy lub szczura.

α -synukleina

Gen kodujący α -synukleinę był pierwszym, którego zaburzenia powiązano z występowaniem rodzinnej formy PD. W obrębie sekwencji tego genu dochodzi do mutacji niesynonimicznych, takich jak A30P, A53T czy E46K, które prowadzą do wymiany aminokwasów w sekwencji powstającego białka. Ponadto zaobserwowano, że mutacja powodująca powielenie genu, a więc zwiększająca poziom białka α -synukleiny, może być wystarczająca do wywołania PD, co z kolei sugeruje, że poziom ekspresji tego genu może być kluczowy dla rozwoju i postępu choroby [14].

Do tej pory opracowano wiele transgenicznych modeli z mutacją genu kodującego α -synukleinę. Wektorami dla zmutowanego ludzkiego genu α -synukleiny najczęściej są lentiwirusy (np. HIV-1) lub wektory AAV. W związku z tym, że wprowadza się je się do SNc lub innych struktur szlaku czarno-prążkowiowego poprzez bezpośrednią stereotaktyczną iniekcję *in vivo*, częściej zabiegi takie przeprowadza się na szczurach, ze względu na większe rozmiary struktury [4].

U większości otrzymanych zwierząt transgenicznych ze zmutowanym genem α -synukleiny stwierdza się obecność agregatów białkowych przypominających LBs oraz obserwuje neurodegenerację szlaku czarno-prążkowiowego. Z drugiej jednak strony, w niektórych modelach nie obserwuje się utraty neuronów DA, dochodzi jednak do pewnych nieprawidłowości funkcjonalnych szlaku czarno-prążkowiowego i neurodegeneracji w innych pętłach neuronalnych. Mutacje w genie dla α -synukleiny mogą wywoływać apoptozę (czyli programowaną śmierć komórki) niektórych neuronów. Mimo że nie obejmuje ona neuronów DA, wydaje się, że indukowane przez α -synukleinę zamiany degeneracyjne w innych układach mogą być istotne dla dalszego, wtórnego uszkodzenia szlaku czarno-prążkowiowego [9]. W związku z tym wydaje się, że modele wykorzystujące mutacje genu dla α -synukleiny stanowią dość obiecujące narzędzie, zarówno do badania molekularnych mechanizmów prowadzących do formowania się LBs, jak i rozwoju charakterystycznej dla przebiegu PD neurodegeneracji w obrębie układu dopaminergicznego.

LRRK2

Jedną z najczęstszych przyczyn zarówno rodzinnej formy PD o późnym początku, jak i formy idiopatycznej, są mutacje dominujące w genie kodującym kinazę 2 zawierającą powtórzenia bogate w leucynę (LRRK2). Strukturalnie LRRK2 składa się z domeny kinazowej i GTPazowej, które wraz z tzw. domeną bogatą w leucynę formują jeden duży kompleks białkowy. Uważa się, że nieprawidłowa aktywność LRRK2, spowodowana mutacjami w obrębie domeny kinazowej (mutacja niesynonimiczna G2012S) oraz GTPazowej (mutacje R1441C i R1441G), prowadzi do degeneracji neuronów DA w przebiegu PD. W związku z tym zaczęto opracowywać mysie modele PD z ekspresją zmutowanego ludzkiego genu dla LRRK2, aby w warunkach laboratoryjnych zasymulować nieprawidłową funkcję tego białka [5]. Mimo że u większości uzyskanych zwierząt transgenicznych stwierdzano osłabienie transmisji dopaminergicznej i związane z tym zmiany behawioralne, tylko w modelu z mutacją G2019S zaobserwowano degenerację neuronów DA szlaku czarno-prążkowiowego zależną od wieku. Okazało się również, że przy zastosowaniu inhibitora aktywności kinazowej, w modelu wykorzystującym tę samą mutację domeny kinazowej, dochodzi do zahamowania toksycznego wpływu zmutowanego białka LRRK2 na neurony DA. W związku z tym wydaje się, że aktywność kinazowa tego białka jest szczególnie istotna, a dalsze

badania w kierunku identyfikacji ewentualnych nieprawidłowych substratów dla enzymu LRRK2 mogą przyczynić się do poznania patomechanizmu PD [9].

PINK1

Hipotetyczna indukowana PTEN kinaza 1 (PINK1) to białko, które chroni komórki przed wywołanymi stresem zaburzeniami czynności mitochondriów. Mutacja w genie PINK1 wywołuje PD o wczesnym początku. Do tej pory opracowano dwa typy modeli z wykorzystaniem mutacji w genie PINK1. Pierwszy z nich to myszy KO, drugi zaś to zwierzęta z obniżoną ekspresją tego genu (myszy KD). Żaden z tych modeli nie wykazał specyficznej dla PD redukcji liczby neuronów DA. Niemniej jednak u myszy KO zaobserwowano niewielki, zależny od wieku, spadek poziomu DA w prążkowie, obniżenie aktywności lokomotorycznej oraz umiarkowane zaburzenia funkcji mitochondriów. Wydaje się, że brak degeneracji neuronów DA w SNc u zwierząt z KO genu PINK1 teoretycznie dyskwalifikuje tego typu modele w kontekście badania PD. Z drugiej jednak strony u myszy KO obserwuje się nieprawidłowości w funkcjonowaniu mitochondriów, w związku z czym mogą one posłużyć jako narzędzie do badania mechanizmów odpowiedzialnych za te zaburzenia [9].

Parkina

Białko parkina wchodzi w skład kompleksu ligazy ubikwityny E3, która stanowi część systemu ubikwityna-proteasom zajmującego się degradacją białek. Mutacje genu kodującego parkinę stanowią jedną z głównych przyczyn kolejnej z postaci PD zwanej młodzieńczą. Do tej pory wygenerowano kilka mysich linii z KO parkiny, jednak nie charakteryzowały się one żadnymi zależnymi od przekaźnictwa dopaminergicznego zmianami zachowania. Niektóre wykazywały nieznaczne zaburzenia uwalniania DA oraz obniżenie poziomu noradrenaliny w opuszce węchowej i rdzeniu kręgowym, bez zmian w ilości neuronów DA w SNc. Natomiast u szczurów z nadekspresją genu z mutacją zmiany sensu T240R lub dzikiego ludzkiego genu dla białka parkiny zaobserwowano postępującą utratę unerwienia dopaminergicznego szlaku czarno-prążkowiowego [4].

Również u dorosłych myszy KO, które otrzymano przy wykorzystaniu wektora lentiwirusowego i systemu warunkowanej ekspresji (Cre/loxP), rozwinęła się neurodegeneracja szlaków dopaminergicznym, a dodatkowo stwierdzono dysfunkcję mitochondriów. Model ten wydaje się być szczególnie obiecujący do poszukiwania nowych strategii leczenia PD, ponieważ otrzymuje się go na zwierzętach już dorosłych (a PD dotyczy głównie osób starszych) i charakteryzuje się typowymi dla PD zmianami unerwienia dopaminergicznego, a dodatkowo zaburzeniami funkcji mitochondriów [9].

Podsumowanie

Opracowane przez naukowców modele genetyczne PD, w postaci zmodyfikowanych genetycznie myszy i szczurów, mogą stanowić przydatne narzędzie badawcze do poszukiwania mechanizmów łączących zidentyfikowane u pacjentów mutacje z zaburzeniami występującymi we wczesnym etapie choroby. Podczas gdy modele neurotoksyczne odnoszą się głównie do zaawansowanych stadiów PD, modele genetyczne modelują fazę początkowego rozwoju choroby, a więc mogą być szczególnie użyteczne w poszukiwaniu wczesnych markerów PD. Mimo że do tej pory modele genetyczne nie przyczyniły się znacząco do opracowania skutecznej terapii, bardzo prawdopodobne jest, że dzięki dalszej optymalizacji pozwolą odkryć lek, umożliwiający zahamowanie lub chociażby spowolnienie rozwoju choroby. Konieczne są jednak dalsze badania i poszukiwanie takiego modelu, który charakteryzowałby się zarówno zaburzeniami na poziomie komórkowym czy molekularnym (m.in. zaburzenia funkcji mitochondriów), jak i postępującą wraz z wiekiem neurodegeneracją i co za tym idzie – występowaniem zaburzeń ruchowych, a więc zmianami, które obserwuje się u pacjentów w kolejnych etapach choroby. W związku z tym wydaje się, że wiarygodny zwierzęcy model PD uzyskać można poprzez kombinację modelu neurotoksycznego z genetycznym. Jedno jest pewne, zwierzęta transgeniczne są i z całą pewnością nadal będą niezastąpionym narzędziem do modelowania i badania patomechanizmu nie tylko PD, ale i wielu innych chorób człowieka.

Bibliografia

1. Bishop J. (1999). *Transgenic Mammals*. Longman: Harlow.
 2. Björklund A, Kirik D, Rosenblad C, Georgievska B, Lundberg C, Mandel RJ. (2000). Towards a neuroprotective gene therapy for Parkinson's disease: use of adenovirus, AAV and lentivirus vectors for gene transfer of GDNF to the nigrostriatal system in the rat Parkinson model. *Brain Res* 886: 82–98.
-

3. Blandini F, Armentero M-T. (2012). Animal models of Parkinson's disease. FEBS J 279: 1156–1166.
4. Blesa J, Przedborski S. (2014). Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. Front Neuroanat 8: 155.
5. Dawson TM, Ko HS, Dawson VL. (2010). Genetic animal models of Parkinson's disease. Neuron 66: 646–61.
6. Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF. (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. Trends Biotechnol 31: 397–405.
7. Konopka W. (2004). Zwierzęta transgeniczne w neurobiologii. Konf „Nowe Metody w Neurobiologii” 21–26.
8. Kozubski W, Liberski P. (2006). Neurologia: podręcznik dla studentów medycyny. Wydawnictwo Lekarskie PZWL: Warszawa.
9. Lee Y, Dawson VL, Dawson TM. (2012). Animal models of Parkinson's disease: vertebrate genetics. Cold Spring Harb Perspect Med 2: a009324.
10. Miko I, LeJeune L (red). (2009). Essentials of Genetics. NPG Education: Cambridge, MA.
11. Modliński JA, Karasiewicz J. (2001). Klonowanie somatyczne ssaków. Med Wieku Rozwoj nr 1: 9–25.
12. Overbeek PA. (2014). Factors Affecting Transgenic Animal Production. In: Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook, Pinkert, CA (red), Elsevier, ss 71–107.
13. Pinkert, C.A., Irwin, M.H., Moffatt RJ. (1995). Transgenic animal modeling. In: Molecular Biology and Biotechnology, Meyers, RA (red), VCH Publishing: New York, ss 901–907.
14. Vekrellis K, Xilouri M, Emmanouilidou E, Rideout HJ, Stefanis L. (2011). Pathological roles of α -synuclein in neurological disorders. Lancet Neurol 10: 1015–1025.
15. Welchko RM, Lévêque XT, Dunbar GL. (2012). Genetic rat models of Parkinson's disease. Parkinsons Dis 2012: 128356.

Barbara Kosmowska. E-mail: mroz@if-pan.krakow.pl

PRZECIWCIAŁA – NARZĘDZIE PRZYRODY I CZŁOWIEKA

Alicja Görlich (Kraków)

Streszczenie

Poznanie molekularnego mechanizmu i specyfiki wzajemnego oddziaływania antygeny i przeciwciała leży u podstawy rozwoju nowych technik badawczych, tzw. immunotechnik. Wykorzystują one interakcję pomiędzy antygenem i przeciwciałem jako narzędzie do wykrywania i izolowania innych cząsteczek biologicznie czynnych. Kluczową rolę w tej metodzie odgrywają przeciwciała, które wykorzystywane są jako markery badanych molekuł. Niepodważalną wartość zastosowania przeciwciał do celów badawczych opisuje metaforyczne stwierdzenie, że przeciwciała są koniem pociągowym nauk biologicznych i medycznych. Jednak pomimo powszechności i doniosłości ich stosowania, efektywność metod immunologicznych zależy od wielu czynników, które determinują precyzję i specyficzność przeciwciał użytych w danej technice. Artykuł zwraca uwagę na konieczność tzw. walidacji przeciwciał, podczas której należy wykazać, że zastosowane przeciwciała są nie tylko specyficzne i selektywne, ale też zapewniają wysoką powtarzalność w kolejnych eksperymentach.

Abstract

The understanding of the molecular mechanism and the specificity of interactions between antigen and antibody underlies the development of the new techniques, the so called immunotechniques. Immunotechniques use these interactions as a tool to identify and isolate other biomolecules. The key role in this method play antibodies, which are used as the markers of investigated molecules. Antibodies are real workhorses for life science research. The efficiency of immunotechniques, however, depends on many factors, which determine the specificity of antibodies used in the assay. This article points to the necessity of the standardisation of antibodies, named antibody validation. During validation it must be shown that not only are the antibodies specific and selective but they can also provide reproducible results.