

GRAŻYNA NIEWIADOMSKA, MAGDALENA CHECHŁACZ

Zakład Neurofizjologii

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

Pasteura 3, 02-092 Warszawa

MANIPULACJE NA GENOMIE MYSI: ZASTOSOWANIE W NEUROBIOLOGII

Zwierzęta transgeniczne są organizmami zawierającymi w swoim genomie trwale wbudowany obcy gen, który może być przekazany następnemu pokoleniu zgodnie z prawami genetyki mendelowskiej. Po raz pierwszy obce DNA zostało wprowadzone do genomu w wyniku przeprowadzonej *in vitro* mikroiniekcji oczyszczonego materiału genetycznego wirusa SV40 do blastocelu zarodków myszy (JAENISCH i MINTZ 1974). Około 40% potomstwa otrzymanego z zarodków, które przeżyły nastrzyknięcie i reimplantację do macicy zastępczej matki, było chimerami genetycznymi — składało się z komórek różnych genetycznie. Stało się tak na skutek integracji DNA wirusa do chromosomów tylko części komórek somatycznych. Z kolei nastrzyknięcie zarodków myszy materiałem genetycznym wirusa MoMLV dowiodło, że obce DNA wprowadzone we wczesnym etapie rozwoju embrionalnego może zostać trwale wbudowane do genomu komórek nie tylko linii somatycznych, ale też i linii komórek płciowych, a zatem może zostać przekazane następnemu pokoleniu (JAENISCH 1988). Tym samym po raz pierwszy skon-

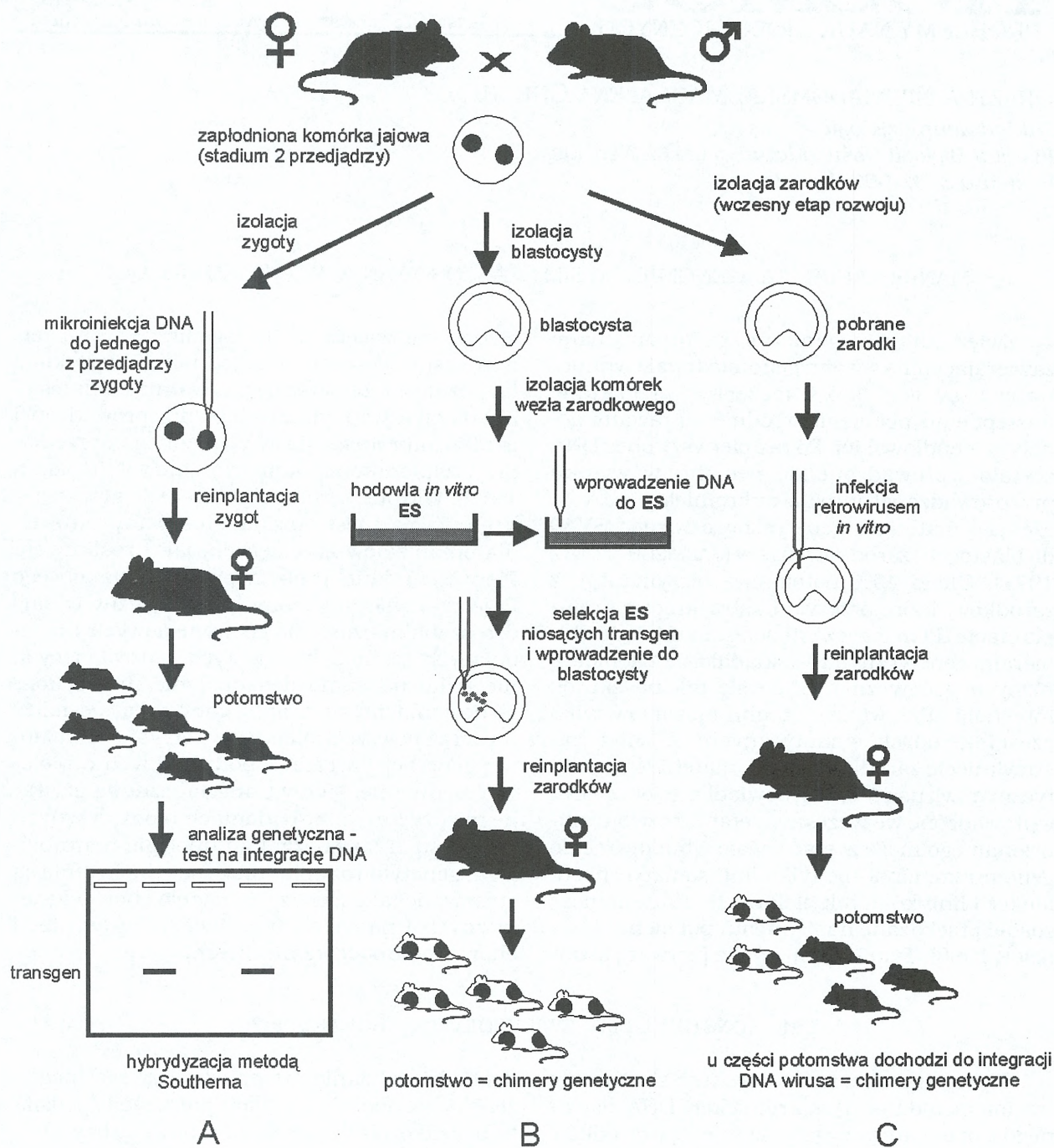
struowano zwierzęta transgeniczne. Sam termin został wprowadzony jednak dopiero kilka lat później i zastosowany pierwotnie w odniesieniu do myszy otrzymanych po przeprowadzonej *in vitro* mikroiniekcji DNA do jednego z przedjądrzy zapłodnionej komórki jajowej (GORDON 1989). Wkrótce termin ten wszedł do powszechnego użycia i jest obecnie stosowany zarówno dla organizmów zwierzęcych, jak i roślinnych. Pierwsze udane próby wprowadzenia obcego DNA do mysiego genomu doprowadziły w bardzo szybkim czasie do rozwoju nowych i obiecujących technik badawczych, pozwalających nie tylko na samo doskonalenie metod konstruowania myszy transgenicznych, ale także na coraz powszechniejsze wykorzystywanie nowej generacji zwierząt laboratoryjnych w biologii i medycynie. Myszy transgeniczne są używane między innymi w badaniach biomedycznych z zakresu onkogenezy, immunologii, neurobiologii, genetyki rozwoju oraz niejednokrotnie są stosowane jako zwierzęce modele chorób genetycznych i nabytych u człowieka, w tym też i chorób neurodegeneracyjnych.

JAK KONSTRUUJEMY ZWIERZĘTA TRANSGENICZNE?

Myszy transgeniczne uzyskuje się obecnie trzema metodami: 1) mikroiniekcja DNA do jednego z przedjądrzy zygoty, 2) infekcja zarodków zrekombinowanymi wektorami pochodzenia retrowirusowego, 3) modyfikacja genetyczna pierwotnych komórek zarodkowych tak zwanych ES (ang. embryonic stem cells; WATSON i współaut. 1992).

Najczęściej stosowana technika polega na przeprowadzaniu *in vitro* nastrzyknięciu sklonowanego DNA do jednego z przedjądrzy zapłodnionej komórki jajowej (rys. 1A). Podczas mikroiniekcji około 1–2 pl (pikolitrow) roztworu do dowolnego przedjądrza jednokomórkowej zygoty (u ssaków bezpośrednio po zapłodnieniu nie

dochodzi do zlania się przedjądrzy męskiego i żeńskiego, dopiero w trakcie pierwszego podziału bruzdkowania otoczki obu przedjądrzy zanikają a chromosomy układają się we wspólnym wrzecionie podziałowym) wprowadza się kilkadziesiąt kopii obcego DNA, tak zwanego transgenu. Nastrzyknięte (około 50–75% zygot przeżywa i rozpoczyna podziały bruzdkowania), dzielące się zarodki są umieszczane w jajowodzie zastępczej matki. Zaledwie 10% do 30% zarodków zagnieżdża się w macicy i prawidłowo przechodzi dalszy rozwój, a wśród urodzonego potomstwa liczba tych osobników, które mają wprowadzone do genomu obce DNA waha się od kilku procent do 40%. Integracja transgenu



Ryc. 1. Podstawowe techniki transgenizacji myszy.

A) Metoda mikroińiekcji DNA do przedjądrza zygoty. Zapłodnione komórki jajowe są pobierane z jajowodu samicy. W warunkach *in vitro* przeprowadza się mikroińiekcję obcego DNA do jednego z przedjądrzy zapłodnionej komórki jajowej. Nastrzyknięte zygoty są reimplantowane do jajowodu zastępczej matki. Po rozwinięciu ciąży, u kilkutygodniowego potomstwa przeprowadza się test na integrację transgeny. B) Metoda modyfikacji genetycznej pierwotnych komórek zarodkowych ES. Z węzła zarodkowego blastocysty pobranej z jajowodu ciężarnej samicy uzyskuje się hodowlę pierwotnych komórek zarodkowych ES (odpowiednie warunki hodowli pozwalają utrzymać ich wszechstronne możliwości rozwojowe). Do komórek ES wprowadza się obce DNA. Zmodyfikowane komórki ES, uzyskane po wstępnej selekcji na obecność transgeny, są wprowadzane do zarodka w stadium blastocysty. Po reimplantacji do jajowodu zastępczej matki z zarodków tych rozwijają się osobniki będące chimerami genetycznymi. C) Metoda infekcji zarodków zrekombinowanymi wektorami pochodzenia retrowirusowego. Pobrane zarodki są infekowane DNA pochodzenia wirusowego w warunkach *in vitro*, a następnie reimplantowane zastępczej matce. Z zarodków, u których doszło do integracji transgeny rozwijają się osobniki będące chimerami genetycznymi.

zachodzi na ogół w sposób przypadkowy, bez żadnych preferencji co do pozycji i liczby włączonych kopii. Obce DNA włącza się do genomu zarodka we wczesnym okresie jego rozwoju przed rozpoczęciem podziałów zygoty lub zaraz po pierwszych podziałach, ale zawsze przed wyodrębnieniem się linii komórek somatycznych i płciowych. Najczęściej do integracji dochodzi przed pierwszym podziałem bruzdkowania, co oznacza, że we wszystkich komórkach takiego osobnika transgen będzie włączony do genomu w tej samej pozycji i tej samej liczbie kopii.

Zastosowanie wektorów pochodzenia wirusowego pozwala na wprowadzanie obcego DNA również na późniejszych etapach rozwoju zarodkowego (rys. 1C). Dzielące się zarodki myszy są infekowane zrekombinowanymi wektorami pochodzenia retrowirusowego. Dzięki temu że istnieją precyzyjne mechanizmy regulujące integrację materiału genetycznego retrowirusa z genomem zainfekowanej komórki, technika ta pozwala przewidzieć miejsce integracji oraz umożliwia wprowadzenie do chromosomu pojedynczej kopii obcego DNA (JAE-NISCH 1988). Powyższa metoda była stosowana zarówno w przypadku dzielących się zarodków, nie zagnieżdżonych jeszcze w ścianie macicy, jak i u 8–12 dniowych zarodków, u których rozpoczęło się już formowanie ciała. Potomstwo otrzymywane w tego typu doświadczeniach stanowią osobniki będące chimerami genetycznymi, a myszy homozygotyczne pod względem analizowanego transgenu uzyskuje się w wyniku odpowiednich krzyżówek genetycznych.

Metoda bezpośredniej iniekcji DNA do przedjadrza zapłodnionej komórki jajowej jest najbardziej skutecznym i niemal rutynowym sposobem transgenizacji myszy. Niestety, technika ta może być zastosowana jedynie w najwcześniejszym etapie rozwoju zarodkowego — stadium zygoty. Brak możliwości regulacji procesu integracji transgenu jest jej dodatkowym ograniczeniem. Główną wadą systemu wprowadzania obcego DNA przy użyciu zrekombinowanych wektorów pochodzenia wirusowego jest natomiast to, że w przypadku zaawansowanych w rozwoju zarodków stosunkowo łatwo dochodzi do wbudowania DNA do genomu komórek linii somatycznych, natomiast prawdopodobieństwo wprowadzenia obcego DNA do linii komórek płciowych jest stosunkowo niewielkie. Drugi mankament tej metody ujawnia się, gdy do genomu chce się wprowadzić nie tylko materiał genetyczny retrowirusa, ale też i dołączony do niego, sklonowany gen. Dołączany do wektora wirusowego fragment DNA, który chcemy wprowadzić do genomu komórek zarodka, musi mieć stosunkowo niewielkie rozmiary, co

może w sposób zasadniczy ograniczać jego ekspresję.

Jak dotychczas najbardziej obiecującą, choć stosowaną z powodzeniem tylko w przypadku myszy, jest technika oparta na modyfikacji genetycznej totipotencjalnych, pierwotnych komórek zarodkowych ES, wprowadzanych następnie do rozwijającego się zarodka w stadium blastocysty (rys. 1B). Z jajowodu ciężarnej samicy pobiera się zarodki przedimplantacyjne (4 dzień rozwoju — stadium blastocysty). Po izolacji i trawieniu proteolitycznym węzła zarodkowego (blastocysta myszy jest pęcherzykiem zbudowanym z 2 grup komórek: grupy zewnętrznej, tak zwanego trofoblastu tworzącego ścianę blastocysty oraz grupy wewnętrznej, tak zwanego węzła zarodkowego — jedynie z jego komórek powstaje ciało zarodka) otrzymuje się hodowlę totipotencjalnych komórek zarodkowych. Dalszy etap procedury doświadczalnej wymaga utrzymania wielostronnych możliwości rozwojowych komórek ES, a tym samym powstrzymania procesów różnicowania. W tym celu hodowlę prowadzi się na pojedynczej warstwie fibroblastów albo też do medium dodawany jest czynnik troficzny LIF (ang. leukemia inhibitory factor). Dzięki temu komórki ES zachowują swój pierwotny charakter i po iniekcji do blastocysty mogą brać udział w tworzeniu tkanek przyszłego organizmu, jak również zostać włączone do linii komórek płciowych. Obce DNA jest wprowadzane do komórek zarodkowych metodą transfekcji, elektroporacji lub infekcji retrowirusem. Jednym z najważniejszych udogodnień tej metody jest możliwość wstępnej selekcji komórek ES na obecność w ich genomie transgenu. W przypadku, gdy wprowadzany materiał genetyczny zawierał gen markerowy (np. warunkujący oporność na jakiś antybiotyk), jego obecność stwierdza się przeprowadzając odpowiednie próby fenotypowe. Test na integrację obcego DNA można też przeprowadzać wykorzystując technikę PCR (reakcja łańcuchowa polimerazy, ang. polymerase chain reaction). Komórki niosące transgen są wprowadzane do blastocyst, z których po reinplantacji do zastępczej matki rozwijają się osobniki będące chimerami genetycznymi, u których pewne tkanki pochodzą od komórek blastocysty, inne natomiast od zmodyfikowanych komórek ES.

Poziom ekspresji obcego DNA wprowadzonego do genomu myszy zależy od bardzo wielu czynników. Są to między innymi region genomu, w którym doszło do integracji, trwałość mRNA powstającego na bazie wprowadzonego genu, typ sekwencji regulacyjnych tak zwanych elementów cis (promotor, enhancer) oraz rodzaj czynników *trans* regulujących transkrypcję i

translację. Elementy regulacyjne typu cis stanowią sekwencję DNA, która może być wykorzystana do wywołania tkankowo specyficznej ekspresji wprowadzanego do genomu obcego DNA. Tym sposobem można u myszy transgenicz-

nych uzyskać ekspresję genu w tkance, w której normalnie nie ulega on ekspresji lub wzmocnić ekspresję genu, który podlega jej tylko w ograniczonym zakresie. Przykład takiego doświadczenia przedstawia rysunek 2.

CELOWANE WYŁĄCZANIE GENU

Techniki konstruowania myszy transgenicznych dostarczyły badaczom nowego narzędzia służącego do analizy roli wybranych genów w funkcjonowaniu całego, wielokomórkowego organizmu. Wprowadzając obce DNA do komórki biorcy można oczekiwać, że w niewielkiej liczbie przypadków będzie dochodziło do jego integracji w miejscu, gdzie endogenna sekwencja jest zbliżona do sekwencji transgeny. Dzieje się tak wówczas, gdy do integracji dochodzi na drodze rekombinacji homologicznej. Tym sposobem można wstawić do genomu w miejsce endogennego genu jego zmutowany odpowiednik i w sposób celowy rozbić wybrany gen (ang. gene targeting). Ponieważ analiza efektu zastąpienia w organizmie genu dzikiego przez gen zmutowany jest podstawową metodą pozwalającą na poznanie funkcji określonego genu, stąd wykorzystanie procesu homologicznej wymiany genów w połączeniu z technikami transgenizacji myszy stało się powszechnie stosowanym sposobem badania roli wybranych genów w funkcjonowaniu wielokomórkowego organizmu. Procedurę doświadczalną używaną przy konstruowaniu tego typu myszy określa się jako rozbicie genu (ang. gene disruption) lub wyłączenie genu (ang. gene knockout; WATSON

i współaut. 1992). W celu otrzymania myszy z celowo uszkodzonym określonym genem, tak zwanych myszy znokautowanych, procedurę rozbicia genu stosuje się w połączeniu z metodą modyfikacji genetycznej pierwotnych komórek zarodkowych ES (rys. 3). DNA badanego genu po uprzednim wmontowaniu do niego fragmentu innej sekwencji jest wprowadzane do komórek ES. Wstawienie dodatkowego fragmentu służy przede wszystkim uszkodzeniu (rozbiciu) genu będącego przedmiotem zainteresowania, co prowadzi do pozbawienia go funkcji. Na ogół do badanego genu włączany jest inny gen, będący markerem selekcyjnym, umożliwiając dodatkowo prostą analizę fenotypową, mającą na celu wyodrębnienie tych komórek ES, które nie tylko pobrały DNA, ale w których zaszła też rekombinacja homologiczna. Komórki ES, w których doszło do integracji transgeny we właściwej pozycji genomowej, są wprowadzane do zarodków w stadium blastocysty, replantowanych zastępczej matce. Potomstwo otrzymane z tych zarodków to osobniki będące chimerami genetycznymi. Odpowiednie krzyżówki genetyczne pozwalają na uzyskanie hetero- i homozygotycznych osobników myszy z celowo wyłączonym genem.

ZASTOSOWANIE TECHNIK MODYFIKACJI GENOMU W BADANIACH BIOMEDYCZNYCH

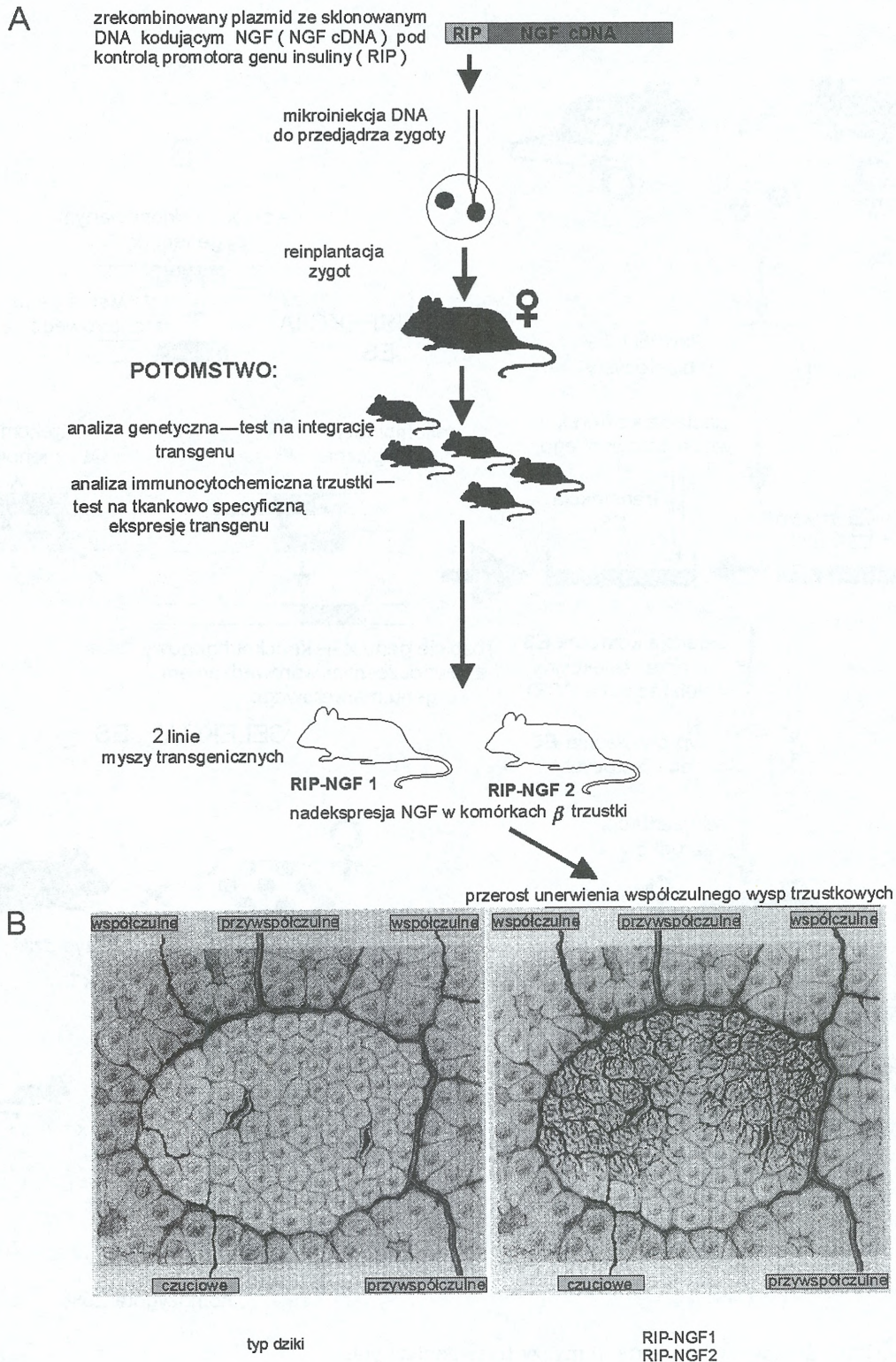
Opracowanie metod wprowadzania do mysiego genomu obcego DNA w celu transformowania całego wielokomórkowego organizmu stanowi niezwykle ważne osiągnięcie współczesnej biologii molekularnej. Osiągnięcie istotne ze względów zarówno poznawczych, jak i praktycznych. Te same szczepy transgenicznych myszy, które stanowią nieocenione źródło

informacji na temat molekularnych mechanizmów regulacji ustrojowej, udziału genów w procesie powstawania nowotworów, czy też defektów genetycznych leżących u podstaw określonych chorób, są wykorzystywane w badaniach nad potencjalnymi możliwościami terapeutycznymi, w tym nad terapią genową.

WYKORZYSTANIE MYSZY TRANSGENICZNYCH W NEUROBIOLOGII

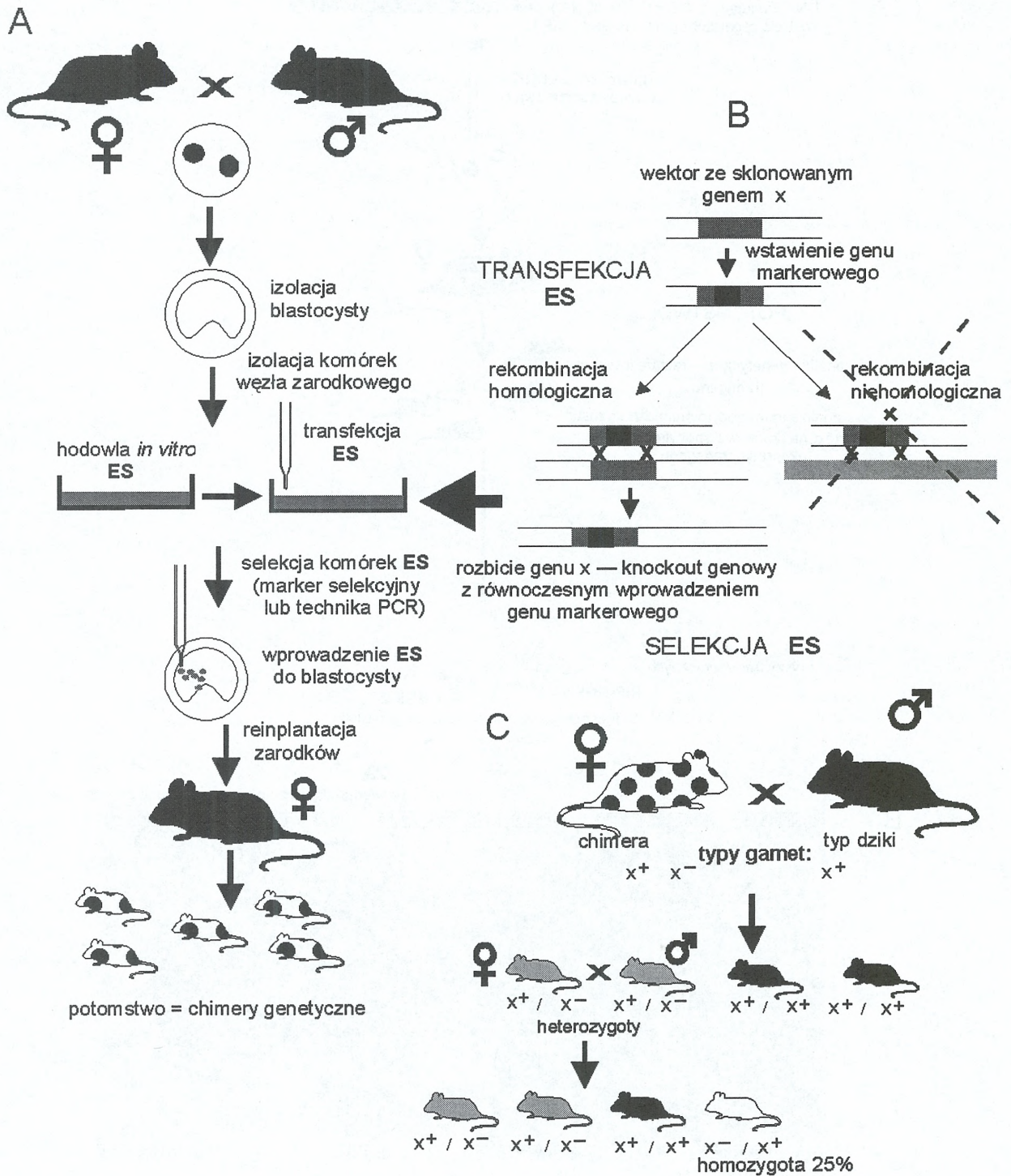
Myszy transgeniczne przejawiające nadekspresję określonego genu lub też myszy z celowo wyłączonym jednym genem są obecnie bardzo często używane w badaniach mających na celu wyjaśnienie właściwości i funkcji układu nerwowego. Są to przede wszystkim badania nad molekularnymi mechanizmami zmian pla-

stycznych w okresie rozwoju układu nerwowego, zmian w fizjologii synaps zależnych od stanu ich aktywności oraz zmian zachodzących w procesach pamięci i uczenia się. Kilka przedstawionych poniżej przykładów posłuży do zilustrowania charakteru tych badań i roli, jaką odgrywają w nich zwierzęta transgeniczne.



Rys. 2. Przykład zastosowania metody konstrukcji myszy transgeniczných z tkankowo specyficzną ekspresją transgenu.

A) Promotor szczurzego genu insuliny (RIP) wykorzystano do wywołania ekspresji genu kodującego NGF w komórkach β trzustki myszy. Zrekombinowanym plazmidem zawierającym NGFcDNA i RIP nastrzykiwano jedno z przedjądrzy zapłodnionych komórek jajowych, które następnie reimplantowano do jajowodu zastępczej matki. U czwórki tak otrzymanego potomstwa stwierdzono integrację transgenu. Osobniki te posłużyły do wyprowadzenia 4 linii myszy transgeniczných. Analiza immunocytochemiczna trzustki wykazała, że u osobników dwóch linii, tak zwane myszy RIP-NGF1 i RIP-NGF2, uzyskano tkankowo specyficzną ekspresję wprowadzonego DNA. Myszy tych linii wykorzystano następnie jako model doświadczalny w badaniach nad rolą NGF w procesach plastyczności rozwojowej w obwodowym układzie nerwowym. B) Przerost unerwienia współczulnego, ale nie unerwienia czuciowego i przywspółczulnego, wysp trzustkowych wywołany nadmiarem NGF wskutek ekspresji NGFcDNA wprowadzonego do komórek β trzustki (na podstawie EDWARDS i współaut. 1989).



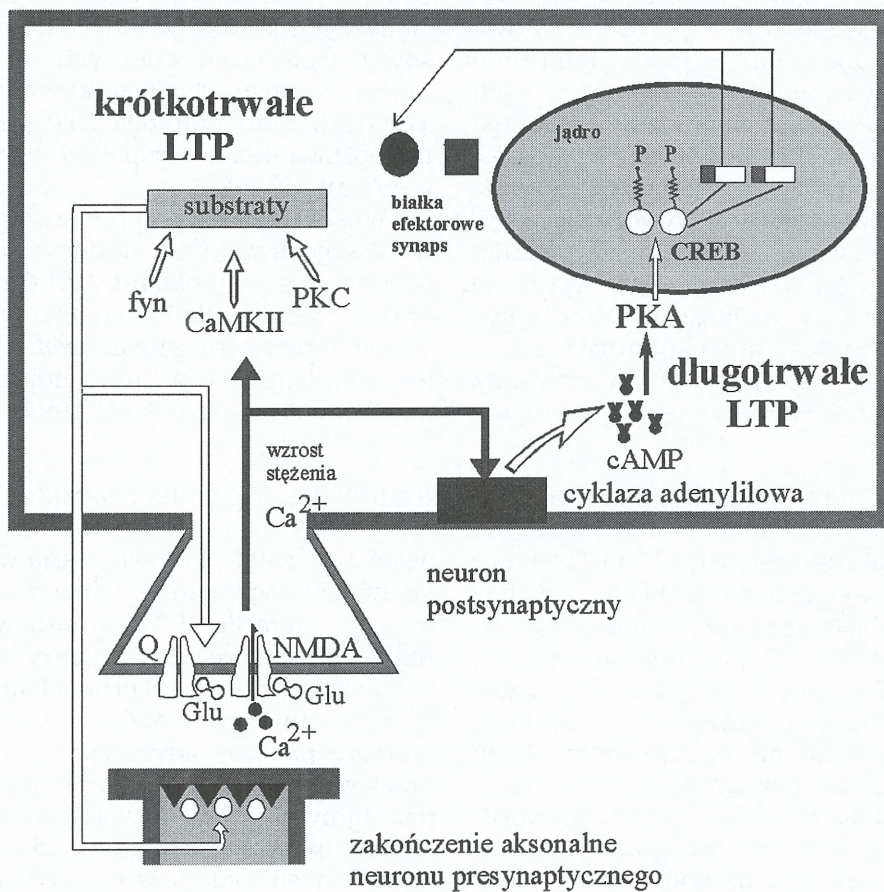
Rys. 3. Knockout genowy w konstrukcji myszy transgenicznych.

Technikę tę stosuje się w badaniach, których celem jest wyłączenie funkcji endogennego genu. Procedurę rozbicia genu (ang. gene disruption), inaczej knockout genowy (część B rysunku), stosuje się w połączeniu z metodą modyfikacji genetycznej komórek ES (część A rysunku). DNA badanego genu po wstawieniu do niego fragmentu obcej sekwencji jest wprowadzane do komórek ES. Odpowiednio dobrane metody selekcji pozwalają na wprowadzenie do blastocysty tylko tych komórek ES, w których doszło do zastąpienia endogennego genu przez zmutowany transgen na drodze homologicznej rekombinacji. Komórki, w których miała miejsce niehomologiczna rekombinacja nie są użyteczne w dalszej procedurze (część B rysunku na prawo). Osobniki otrzymane tą techniką są chimerami genetycznymi. Znokautowane myszy homozygotyczne uzyskuje się w wyniku odpowiednio dobranych krzyżówek genetycznych (część C rysunku).

ANALIZA MOLEKULARNYCH MECHANIZMÓW PLASTYCZNOŚCI SYNAPTYCZNEJ

W układzie nerwowym opisano dwa zjawiska, będące bardzo charakterystycznymi przejawami plastyczności synaptycznej. Pierwsze, to długotrwałe wzmocnienie przekazywania synaptycznego — LTP (ang. long-term potentiation) w hipokampie i jego przeciwieństwo, czyli długotrwałe osłabienie przekazywania synaptycznego — LTD (ang. long-term depression) w mózdzku. LTP polega na wzroście efektywności przewodzenia synaptycznego po tężcowej stymulacji włókien aferentnych. Stan ten może utrzymywać się przez wiele dni. Do wywołania

LTP konieczne jest pobudzenie wejścia presynaptycznego z równoczesną depolaryzacją błony postsynaptycznej. Istnieją dwie formy LTP, jedna zależna od receptorów kwasu glutaminowego typu NMDA, obserwowana w zakręcie zębatym i polu CA1 hipokampa, oraz druga niezależna od receptorów NMDA, obserwowana w polu CA3 hipokampa. Indukcji LTP towarzyszy napływ jonów wapnia oraz aktywacja układu wtórnych przekazywników i kinaz białkowych. Zdarzenia molekularne w czasie indukcji LTP przedstawia schematycznie rysunek 4.



Rys. 4. Schematyczne przedstawienie mechanizmów molekularnych zaangażowanych w indukcję i utrzymanie długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (LTP) w polu CA1 hipokampa.

Aktywacja neuronu postsynaptycznego przez kwas glutaminowy (Glu) prowadzi do masowego napływu jonów wapnia Ca^{2+} do komórki. Wzrost stężenia Ca^{2+} aktywuje dwa procesy: krótkotrwałe LTP i długotrwałe LTP. Krótkotrwałe LTP utrzymuje się przez około godzinę i wymaga aktywności zależnej od wapnia i kalmoduliny kinazy białkowej CaMKII, kinazy białkowej PKC oraz kinazy tyrozyny Fyn. Dzięki substratom powstałym w tym procesie dochodzi przypuszczalnie do indukcji wstecznego sygnału, który działając zwrotnie na część presynaptyczną wzmacnia wydzielanie neurotransmitera. Ta forma LTP jest niezależna od transkrypcji i syntezy białek. Długotrwałe LTP indukowane jest przez aktywację cyklazy adenylilowej i wzrost syntezy cAMP. Cykliczny AMP aktywuje kinazę białkową PKA, która poprzez czynnik transkrypcyjny CREB uruchamia ekspresję genów kodujących białka efektorowe synapsy. Ta forma LTP jest zależna od transkrypcji i syntezy białek. P — miejsca fosforylacji, Q — receptor kwiskwalinowy kwasu glutaminowego.

Natomiast w mózdku równoczesna aktywacja dwu oddzielnych wejść pobudzających komórki Purkiniego prowadzi do osłabienia transmisji synaptycznej. Mechanizm molekularny LTD różni się od mechanizmu LTP, jednak wspólną cechą obu zjawisk jest początkowa mobilizacja jonów wapnia. LTD wymaga aktywacji receptorów metabotropowych dla glutaminianu — mGluR oraz modulacji aktywności receptorów AMPA w błonie postsynaptycznej komórki Purkiniego. Stwierdzono, że zarówno LTP jak i LTD mogą powstawać na tej samej synapsie. Czy będzie to LTP czy LTD, zależy od współwystępowania aktywności presynaptycznej z odpowiednim stanem błony postsynaptycznej.

U myszy z wyłączonym genem kodującym α CaMKII, jednej z izoform, zależnej od wapnia i kalmoduliny kinazy II, indukcja LTP i LTD była zaburzona w porównaniu ze zwierzętami typu dzikiego. Tężcowa stymulacja dróg aferentnych komórek piramidalnych pola CA1 hipokampa nie powodowała wzrostu przewodności synaps, nie prowadziła więc do LTP. Stymulacja bodźcami o niskiej częstotliwości wywoływała jedynie bardzo nieznaczne osłabienie przewodnictwa synaptycznego, a zatem słabo wyrażone LTD. U zwierząt typu dzikiego LTD może być zniesione przez zastosowanie stymulacji tężcowej. Ta procedura jest nieskuteczna u myszy z deficytem α CaMKII. Gdy myszom znokautowa-

nym wprowadzono ponownie do neuronów hipokampa gen α CaMKII typu dzikiego, przejawiały one zdolność do indukcji LTP i LTD porównywalną ze zwierzętami kontrolnymi.

Posługując się metodami farmakologicznymi w badaniach na skrawkach hipokampa wykazano, że mimo braku aktywnego genu α CaMKII można wywołać LTP stosując blokery fosfataz. Kinaza α CaMKII normalnie fosforyluje receptory AMPA i tą drogą wpływa na aktywację wtórnych przekazników. Ponieważ jednak LTP w skrawkach hipokampa można wywołać pod nieobecność kinazy α CaMKII, uważa się, że jej funkcję fosforylacji receptorów AMPA może przejąć inna z izoform, na przykład kinaza β CaMKII. Warunkiem koniecznym jest jednak blokada fosfataz. Brak α CaMKII u myszy transgenicznym powoduje *in vivo* dominację procesów defosforylacji zależnych od fosfataz nad procesami fosforylacji, w których pośredniczy α CaMKII. Stąd indukcja LTP jest trudna lub niemożliwa (SILVA i współaut. 1992, STEVENS i współaut. 1994).

Wysoki poziom ekspresji receptora metabotropowego kwasu glutaminowego — mGluR1 obserwuje się w polach CA2 i CA3 hipokampa oraz w komórkach Purkiniego w mózdku. U myszy z rozbitym genem *mGluR1* niemożliwa jest indukcja LTP w hipokampie oraz LTD w mózdku (AIBA i współaut. 1994).

ANALIZA MOLEKULARNYCH MECHANIZMÓW UCZENIA SIĘ I PAMIĘCI

Od czasu opisanego zjawisk LTP i LTD, które są szczególnym wyrazem zmian plastycznych w neuronach, próbuje się łączyć je z mechanizmami uczenia się i pamięci. Badania na myszach transgenicznym dostarczyły poważnych argumentów zwolennikom poglądu, że charakter obu zjawisk wskazuje na to, iż mogą one leżeć u podłoża procesów poznawczych. U myszy z rozbitym genem dla receptora NMDA, α CaMKII, kinazy tyrozyny Fyn czy też syntazy tlenu azotu NOS występują zarówno zaburzenia w indukcji LTP, jak i poważne pogorszenie procesu uczenia się w testach na pamięć przestrzenną oraz nieco mniejsze pogorszenie uczenia się w testach niezależnych od wskazówek przestrzennych.

Uważa się, że LTD w mózdku jest związane z uczeniem się niektórych zadań ruchowych, na przykład w teście klasycznego warunkowania zamykania migotki u królika. Anatomiczne podłoża tej formy uczenia się stanowią między innymi kora mózdku oraz jądra głębokie mózdku. Podobny test z pewnymi koniecznymi modyfikacjami zastosowano u myszy (AIBA i

współaut. 1994). Porównywano w nim uczenie się zwierząt typu dzikiego oraz myszy z wyłączonym genem *mGluR1*. W początkowej fazie uczenia się nie było różnic pomiędzy obiema grupami. Jednak po około 30 próbach krzywa uczenia u znokautowanych myszy *mGluR1* osiągnęła plateau, podczas gdy myszy kontrolne nadal przejawiały poprawę wykonania zadania. Przypomnijmy, że brak aktywnego genu *mGluR1* blokuje indukcję LTD w mózdku. Z przytoczonych danych wynika zatem, że ta forma plastyczności synaptycznej nie jest konieczna w początkowej fazie uczenia się. Natomiast *mGluR1* oraz LTD są związane z modulacją późnych stadiów procesu uczenia się w teście typu warunkowania klasycznego.

W zależności od czasu w jakim pamięć powstaje i utrzymuje się w układzie nerwowym możemy wyróżnić jej dwie podstawowe formy: pamięć długoterminową, której tworzenie jest blokowane przez inhibitory syntezy RNA i białek oraz pamięć krótkoterminową, która jest niezależna od tych procesów. Na tej podstawie wysuwa się przypuszczenie, że przejście informacji z

fazy krótkotrwałej w postać długotrwałą zależy od aktywacji ekspresji specyficznych genów. Badania z wykorzystaniem techniki transgenizacji nie tylko u myszy, ale także u muszki owocowej *Drosophila* i ślimaka morskiego *Aplysia* wykazały, że w stabilizacji długotrwałej formy pamięci ważną rolę odgrywa cAMP oraz odpowiadający na jego aktywację białkowy czynnik transkrypcyjny CREB. Neuroprzekazniki takie jak serotonina, dopamina i noradrenalina powodują aktywację cykazy adenylilowej i tym samym zwiększenie poziomu cAMP. Cykliczny AMP jako wtórny przekaznik sygnałów w komórce aktywuje kinazę białkową A — PKA. Aktywna PKA powoduje fosforylację rozmaitych białek cytozolowych. PKA może także wędrować do jądra komórkowego, gdzie fosforyluje czynnik transkrypcyjny CREB. W wyniku fosforylacji aktywna forma CREB rozpoznaje i wiąże się ze specyficzną sekwencją w obszarze regulacyjnym genomu — *cre* (ang. cyclic AMP-responsive element). W ten sposób czynnik CREB może zwiększać ekspresję bardzo wielu genów (rys. 4). Myszy z rozbitym genem *creb* poddawano treningowi w teście warunkowania strachu, w którym zwierzęta muszą zapamiętać, że pojawienie się w środowisku bodźca warunkowego (np. tonu o określonej częstotliwości) zapowiada podanie szoku elektrycznego (BOURTCHOULADZE i współaut. 1994). Zwierzęta kontrolne otrzy-

mawszy szok, pamiętają to zdarzenie dłużej niż 24 godziny po jednokrotnej próbie, co mierzono przejawianą przez nie reakcją strachu po prezentacji samego bodźca dźwiękowego. Myszy CREB przejawiają reakcję porównywalną z grupą kontrolną jedynie przez około 30 minut po otrzymaniu szoku. W ciągu następnej godziny obserwowano u nich narastające pogorszenie pamięci. Okres pamiętania przez mutanty CREB można wydłużyć przez wielokrotne powtarzanie prób testowych (BOURTCHOULADZE i współaut. 1994).

Było to jedno z pierwszych doświadczeń pokazujących, że wyłączenie genu *creb* prowadzi do selektywnego uszkodzenia bardziej długotrwałych stadiów pamięci, nie zaburza natomiast wczesnego etapu nabywania informacji. Wykazano też, że u myszy CREB można wywołać jedynie krótkotrwałe zanikające LTP (ang. decremental LTP). Natomiast nie rozwija się u nich długotrwała forma LTP (ang. long-lasting LTP). Badania myszy oraz bezkręgowców wskazują na konserwatywny filogenetycznie mechanizm, w którym cAMP, działając przez czynniki transkrypcyjne z rodziny CREB wywołuje zmiany w ekspresji genów konieczne do utrzymania długotrwałego wzrostu przewodnictwa synaptycznego. Mechanizm ten może stanowić podłoże formowania się pamięci długoterminowej.

ANALIZA ROLI NEUROTROFIN W UKŁADZIE NERWOWYM

Pogląd, że przeżywalność neuronów w czasie rozwoju zależy od sygnału przekazywanego z miejsc docelowych ich projekcji znany jest od czasu klasycznych badań VICTORA HAMBURGERA 1934. Przełom w tych badaniach dokonał się wraz z odkryciem białkowego czynnika stymulującego rozrost neuronalny, i nazwanego czynnikiem wzrostu nerwów (NGF, ang. nerve growth factor) (LEVI-MONTALCINI i HAMBURGER 1953). Zaobserwowano, że NGF działa specyficznie na niektóre tylko populacje neuronów, przede wszystkim na neurony czuciowe i współczulne w obwodowym układzie nerwowym oraz neurony cholinergiczne w ośrodkowym układzie nerwowym. Neurony parasympatyczne zwojów rzęskowych, neurony ruchowe rogów brzusznych rdzenia kręgowego, neurony czuciowe rozwijające się z plakody ektodermalnej, a także część neuronów czuciowych pochodzących z grzebienia nerwowego nie są uzależnione od dostępności NGF. Przypuszczenie, że neurony te mogą być zależne od innych czynników troficznych doprowadziło do odkrycia czynnika neurotroficznego pochodzącego z

mózgu (BDNF, ang. brain-derived neurotrophic factor). Badania wykazały, że wiele populacji neuronów w ośrodkowym układzie nerwowym jest wrażliwych na BDNF, włączając w to neurony leżące w strukturach związanych z chorobami neurodegeneracyjnymi, na przykład neurony cholinergiczne przegrody, neurony dopaminergiczne istoty czarnej oraz neurony ruchowe rdzenia kręgowego. Sekwencjonowanie białka BDNF doprowadziło do jego sklonowania oraz do stwierdzenia, że geny kodujące BDNF i NGF są ze sobą blisko spokrewnione. Molekularne klonowanie BDNF w celu zwiększenia ilości tego białka, które w mózgu występuje w bardzo małych stężeniach, spowodowało odkrycie trzeciego członka rodziny neurotrofin, neurotrofiny 3 (NT-3, ang. neurotrophin-3). Do grupy NGF-podobnych neurotrofin, charakteryzujących się bardzo ścisłym strukturalnym podobieństwem, należą jeszcze neurotrofina 4/5 (NT-4/5) oraz znaleziona u ryb kostnoszkieletowych neurotrofina 6 (NT-6), której odpowiednika u ssaków dotąd nie zidentyfikowano. Neurotrofiny wywołują cały szereg różnorodnych

reakcji w układzie nerwowym, takich jak namnażanie się, różnicowanie i przeżywanie neuroblastów w czasie rozwoju, jak również przeżywanie i odpowiedź adaptacyjna dojrzałych neuronów w dorosłym organizmie. Do odpowiedzi neuronalnych stymulowanych przez neurotrofiny i związanych z różnicowaniem należą: wzmacnianie rozrastania się neurytów, zmiany właściwości elektrofizjologicznych neuronów oraz określenie fenotypu przekaźnikowego dojrzewających neuronów.

Neurotrofiny wywierają swoje działanie poprzez mechanizmy związane z wstecznym transportem internalizowanych kompleksów neurotrofina-białko receptorowe. Wykazano, że poprzez wiązanie neurotrofin do specyficznych dla nich receptorów, NGF oraz inne znane czynniki troficzne aktywują kaskadę zdarzeń molekularnych, związanych z mechanizmami przekazywania sygnałów w komórce. Neurotrofiny wiążą się i aktywują specyficzne receptory, będące kinazami tyrozyny, kodowanymi przez protoonkogeny z rodziny *trk*. Receptory Trk charakteryzuje wysokie powinowactwo wiązania neurotrofin, jednak fizjologiczny efekt ich działania zależy przypuszczalnie także od współdziałania receptora o niskim powinowactwie, tak zwanego receptora p75.

Badania z wykorzystaniem myszy transgenicznych, którym uszkodzono geny kodujące neurotrofiny bądź ich białka receptorowe są jednym z najbardziej spektakularnych przykładów wykorzystania techniki rozbicia genu. Posłużyły one do wyjaśnienia rodzaju funkcji regulacyjnych, jakie pełnią poszczególne substancje z rodziny neurotrofin oraz do precyzyjnego określenia zależnych od nich populacji neuronów. Okazało się, że niezależnie od rodzaju badanego czynnika neurotroficznego zarówno mutanty z rozbitym genem dla neurotrofiny, jak i mutanty z uszkodzonym jej receptorem, wykazują bardzo duże podobieństwa fenotypowe (SINDER 1994).

Myszy niezdolne do syntezy NGF lub receptora TrkA przeżywają około 3 tygodni po urodzeniu i behawioralnie charakteryzują się mocno obniżoną wrażliwością na ból. W obwodowym układzie nerwowym odnotowano u nich zanik 90% neuronów w górnych zwojach szyjnych oraz utratę 80% neuronów w zwojach korzeni grzbietowych i zwojach nerwu trójdzielnego. Natomiast w ośrodkowym układzie nerwowym stwierdzono atrofię neuronów cholinergicznym okolicy podstawnej, zredukowaną liczbę rozgałęzień aksonalnych tych neuronów w hipokampie i korze oraz obniżony poziom syntezy acetylotransferazy choline. Stwierdzono, że neurony obwodowe, których przeżywalność za-

leży od NGF stanowią strukturalne podłoże mechanizmów percepcji bólu. Sam NGF może powodować nadwrażliwość na ból. Myszy transgeniczne z nadekspresją NGF przejawiają hiperalgeję na bólowe bodźce mechaniczne. Wykorzystanie techniki modyfikacji genetycznej pozwoliło odkryć jeszcze jedną funkcję, jaką NGF pełni w układzie nerwowym, czyli jego udział w mechanizmach przewodzenia czucia bólu.

Homozygotyczne mutanty myszy BDNF(-/-) przeżywają około 2 tygodni, natomiast myszy TrkB(-/-) żyją zaledwie 48 godzin po urodzeniu. Przejawiają one zaburzenia ruchowe oraz poważne zaburzenia w pobieraniu pokarmu. Powód, dla którego myszy TrkB nie pobierają w ogóle pokarmu nie jest znany. Stwierdzono u nich zanik 30–60% neuronów w zwojach nerwu trójdzielnego, zwojach dolnych nerwu błędnego oraz zwojach korzeni grzbietowych rdzenia. Myszy BDNF nie przejawiają tak ostrych zaburzeń behawioralnych, a ich upośledzenia ruchowe są związane z uszkodzeniem układu przedsionkowego, gdzie stwierdzono niemal 90% ubytek neuronów. Natomiast nie zmniejszyła się znacząco liczba neuronów ruchowych u tych myszy. Jest to interesujące z uwagi na fakt, iż badania farmakologiczne wykazały, że przeżywalność neuronów ruchowych w czasie rozwoju zależy od BDNF i NT-4/5. Zaburzenia w ośrodkowym układzie nerwowym u myszy BDNF i TrkB nie mają charakteru strukturalnego, a dotyczą raczej zaburzeń funkcjonalnych. We wszystkich warstwach kory oraz w hipokampie tych zwierząt subpopulacje interneuronów gabaergicznym nie przejawiają syntezy neuropeptydu Y, bądź też białek wiążących wapń, takich jak parvalbumina i kalbindyna. Te neuromodulatory są związane z regulacją aktywności bioelektrycznej mózgu. Ekspresja neurotrofin w niektórych okolicach mózgu zależy także od aktywności elektrycznej neuronów tych struktur. Wydaje się, że między ekspresją neurotrofin i syntezą neuromodulatorów wiążących wapń istnieje dodatnie sprzężenie zwrotne. Wskazuje to na bardziej dynamiczną funkcję neurotrofin w układzie nerwowym niż dotąd sądzono. Wyniki uzyskane w badaniach myszy BDNF i TrkB mogą potwierdzić interesujące przypuszczenie, że selektywny rozwój i organizacja strukturalna rozmaitych okolic mózgu zależą od regulowanej aktywności elektryczną ekspresji neurotrofin.

Homozygotyczne mutanty myszy NT-3(-/-) oraz TrkC(-/-) przeżywają do 30 dni po urodzeniu. Najbardziej wyraźnym fenotypowym przejawem modyfikacji ich genomu są bardzo poważne zaburzenia posturalne i ruchowe. W obwodowym układzie nerwowym obniżoną liczbę neuronów

obserwowano u tych myszy w górnych zwojach szyjnych (55%), w zwojach rogów grzbietowych (20–55%) oraz w zwojach nerwu trójdzielnego (65%). Uważa się, że u podłoża zaburzeń ruchowych i posturalnych leżą, wywołane brakiem NT-3 lub jej receptora, zmiany neurodegeneracyjne w zwojach rogów grzbietowych rdzenia. Duże neurony tych zwojów, które bezpośrednio unerwiają wrzeciona mięśniowe, odprowadzają także kolaterale aksonów do pól ruchowych rdzenia kręgowego, skąd poprzez jądra kolumn grzbietowych są przekazywane informacje proprioceptywne. Wykazano za pomocą specjalnych technik znakowania, że u myszy NT-3 i TrkC przeżywające duże neurony zwojowe są całkowicie pozbawione odgałęzień aksonalnych związanych z przewodzeniem bodźców proprioceptywnych. U mutantów tych nie wykształcają się też receptory proprioceptywne na obwodzie.

Wynika stąd, że w zwojach rogów grzbietowych istnieje subpopulacja neuronów, których przeżywalność zależy od NT-3. Pozostałe neurony tych zwojów, które nie są uzależnione od troficznego działania NT-3, stanowią oddzielną klasę komórek, zależną od innych substancji troficznych i pełniącą inne funkcje w układzie czuciowym.

Receptory TrkC są dość powszechnie rozmieszczone w całym ośrodkowym układzie nerwowym. Dokładna analiza histologiczna większości okolic przodo- i międzymózgowia, a także pnia mózgu, rdzenia kręgowego i mózdzku wykazała, że struktury te u myszy NT-3 i TrkC rozwijają się normalnie. NT-3 nie wpływa zatem bezpośrednio na rozwój CNS, może być jednak związana z bardziej złożonym mechanizmem regulacji procesów rozwojowych.

ANALIZA PROCESÓW ROZWOJOWYCH W UKŁADZIE NERWOWYM

Zwierzęta transgeniczne są niezwykle użyteczne w badaniach dotyczących embriogenezy, w tym także rozwoju układu nerwowego. Tę bardzo liczną grupę doświadczeń reprezentują dwa poniżej przedstawione przykłady, w których analizowano rolę podjednostki 1 receptora NMDA (NMDAR-1) oraz genu *bc1-2* hamującego programowaną śmierć komórek (apoptozę) podczas tworzenia się map somatosensorycznych w korze mózgu.

U gryzoni bodźce dotykowe odbierane przez wibrysy na pyszczku zwierzęcia są przekazywane nerwem trójdzielnym do jądra nerwu trójdzielnego w pniu mózgu, stąd do wzgórza i wreszcie do kory somatosensorycznej. Na każdym z tych pięterek przekazywania informacji przestrzennej wzór rozmieszczenia wibrys na pyszczku jest ściśle odwzorowany w cytoarchitektonice poszczególnych struktur mózgu, do których dociera informacja czuciowa. Ten charakterystyczny wzór, który tworzą aksony połączeń aferentnych oraz neurony wstawkowe na poziomie kory nazywany jest polem baryłkowym (ang. barrel field). Jego odpowiednikiem we wzgórzu są tak zwane barreloidy (ang. barreloids), a w pniu mózgu barreletty (ang. barrelettes). Wykazano, że tworzenie się wzoru baryłkowego w okresie rozwojowym jest zależne od docierającego z wibrys pobudzenia, którego mediatorem jest kwas glutaminowy.

Myszy z rozbitym genem dla receptora NMDAR-1 wykorzystano w celu zbadania roli aktywności tego receptora w tworzeniu się wzoru baryłkowego. Okazało się, że u myszy NMDAR-1 wzór baryłkowy w ogóle się nie wy-

kształca. Wynik ten był zaskakujący wobec wcześniejszych doniesień, że podawanie w okresie postnatalnym TTX (bloker aktywności elektrycznej) lub APV (antagonisty receptora NMDA) nie przeszkadzało tworzeniu się wzoru baryłkowego (O'LEARY i współaut. 1994).

Jednym z mechanizmów, od którego może zależeć tworzenie się wzoru baryłek jest eliminacja nadmiaru neuronów dzięki procesowi programowanej śmierci komórek. Wykazano, że czynnik wzrostu nerwów NGF, który przez troficzne oddziaływanie chroni neurony przed wymieraniem, podany embrionom szczurzym między 15 a 18 dniem rozwoju embrionalnego powoduje silne zaburzenia wzoru baryłkowego w jądrze nerwu trójdzielnego (HENDERSON i współaut. 1994). W czasie normalnego rozwoju ograniczona dostępność do NGF reguluje liczbę neuronów czuciowych, które przeżyją do dorosłości. Neurony, których aksony nie wytworzyły prawidłowych połączeń z torebką wibrysy są pozbawione troficznej osłony NGF i degenerują w procesie apoptozy. Proces usuwania szczątków aksonów niepotrzebnych neuronów czuciowych może ułatwić tworzenie się wzoru baryłkowego.

Aby sprawdzić tę hipotezę przeprowadzono histologiczną analizę procesu apoptozy u znokautowanych myszy NMDAR-1. U nowo narodzonych myszek NMDAR-1 stwierdzono znaczne obniżenie liczby komórek apoptycznych w porównaniu z myszkami typu dzikiego. Podobną analizę przeprowadzono u myszy transgeniczných, które przejawiały nadmierną ekspresję protoonkogenu *bc1-2*. Okazało się, że mimo zablokowania procesu apoptozy wzór baryłkowy u tych myszy rozwi-

jał się normalnie, zarówno w korze somatosensorycznej, jak i w pniu mózgu. Z opisanych doświadczeń wynika, że prawidłowe tworzenie się wzoru baryłkowego zależy od receptorów

NMDA i wymaga ich aktywności. Natomiast proces ten nie zależy od blokady naturalnie rozwijającego się procesu apoptozy.

WYKORZYSTANIE MYSZY TRANSGENICZNYCH JAKO ZWIERZĘCYCH MODELI CHORÓB UKŁADU NERWOWEGO

Próby stworzenia zwierzęcych modeli chorób ośrodkowego układu nerwowego spotykanych u ludzi obejmują trzy główne kierunki poszukiwań. Są to prace nad modelami chorób rozwijających się na skutek zakażeń wiruso-

wych, modelami chorób o podłożu genetycznym i chorób o złożonej, często nie do końca wyjaśnionej etiologii (LEE i współaut. 1996), w tym także chorób neurodegeneracyjnych.

CHOROBY WIRUSOWE

Niejednokrotnie zdarza się, że dany wirus ma ściśle określonego gospodarza, a tym samym zdolny jest do infekowania tylko pewnych komórek u jednego, jedynego gatunku. W przypadku, gdy wirus atakujący człowieka nie zakaża komórek żadnego z powszechnie używanych zwierząt laboratoryjnych, prace nad patogenizacją i terapią wywołwanego przez niego schorzenia napotyka na poważną przeszkodę. Techniki transgenizacji, umożliwiające wprowadzanie sekwencji genomowej wirusa bezpośrednio do przedjądrza zapłodnionej komórki jajowej, dostarczyły współczesnej medycynie sposobu ominięcia tego problemu. Metodą tą posłużono się między innymi w celu wprowadzenia do mysiego genomu sekwencji regulatorowej i kodującej wirusa papowa JC (SMALL i współaut. 1986). Wirus ten u ludzi z zaburzeniami funkcji układu immunologicznego wywołuje postępującą leukoencefalopatię wieloogniskową, chorobę charakteryzującą się niszczeniem oligodendrocytów, prowadzącym do demielinizacji w obrębie ośrodkowego układu nerwowego. Small i jego współpracownicy otrzymali

dwie linie transgeniczných myszy (JC48 i JC91), które okazały się dobrym zwierzęcym modelem postępującej encefalopatii wieloogniskowej. Myszy te wykazywały, począwszy od 2–4 tygodnia życia, objawy charakterystyczne dla pacjentów dotkniętych leukoencefalopatią, w tym drgawki, których intensywność wzmagala się wraz z wiekiem. Badania histologiczne tkanek nerwowej ujawniły ekspresję wprowadzonego transgenu, obniżoną mielinizację w obrębie ośrodkowego układu nerwowego (zmian tego typu nie stwierdzono w obwodowym układzie nerwowym) oraz nieprawidłowości w budowie osłonki mielinowej. Dokładna analiza molekularna wykazała, że obserwowane zmiany fenotypowe wystąpiły w następstwie ekspresji materiału genetycznego wirusa JC, a nie przypadkowego uszkodzenia jakiegoś endogennego genu (inne miejsca integracji DNA wirusa JC w genom myszy linii JC48 i JC91 DNA, a także wyższy poziom ekspresji transgenu oraz poważniejsze zaburzenia neurologiczne u osobników homozygotycznych).

CHOROBY NEURODEGENERACYJNE

Szybkiemu rozwojowi technik biologii molekularnej zawdzięczamy pogłębiającą się z roku na rok wiedzę na temat genetycznych podstaw chorób neurodegeneracyjnych. Znajomość defektów genetycznych odpowiedzialnych za choroby dziedziczne w połączeniu z techniką rekombinacji homologicznej pozwala na stworzenie linii myszy, u których geny sprzężone z danymi typami schorzeń są zastępowane przez swoje zmutowane w specyficzny sposób odpowiedniki lub też całkowicie inaktywowane. Inne podejście badawcze polega na wprowadzaniu do mysiego genomu (drogą mikroiniekcji do przedjądrza zygoty) zmutowanych ludzkich ge-

nów. Wszystkie te metody służą opracowywaniu niemal wiernych modeli ludzkich chorób neurodegeneracyjnych o podłożu genetycznym, wówczas gdy naturalnie pojawiające się mutacje nie są znane u zwierząt laboratoryjnych (tabela 1).

Choroby neurodegeneracyjne, takie jak stwardnienie zanikowe boczne, ataksja mózdkowo-rdzeniowa, choroby prionowe oraz choroba Alzheimera są schorzeniami o charakterze dominującym i autosomalnym, zależnymi od wieku oraz różnorodnych czynników ryzyka, do których należą między innymi mutacje w sprzężonych z nimi genach. W przypadku wszystkich

Tabela 1. Przykłady zwierzęcych modeli występujących u ludzi chorób neurodegeneracyjnych otrzymanych metodami transgenizacji myszy

Choroba	Przyczyna choroby/zmutowany gen	Transgeniczny model	Bibliografia
Postępująca encefalopatia wieloogniskowa	infekcja wirusem Papowa JC u osób z zaburzeniem funkcji układu immunologicznego	2 linie myszy: JC48 i JC91 z wbudowaną do genomu sekwencją regulatorową oraz kodującą wirusa JC	SMALL i współaut.
Stwardnienie rozsiane	choroba demielinizacyjna o nie wyjaśnionym podłożu	myszy linii ND4: do genomu wprowadzona w 70 powtórzeniach sekwencja kodująca DM20 (białko, które powstaje w wyniku alternatywnego składania transkryptu genu PLP)	MASTRONARDI i współaut. (1993)
Choroba Gauchera	mutacja w genie kodującym β -galaktozydazę (enzym rozkładający glukozylo-ceramid)	knockout genowy myszy z wyłączonym genem β -galaktozydazy	TYBULEWICZ i współaut. (1992)
Stwardnienie zanikowe boczne FALS (postać rodzinna)	choroba o nie wyjaśnionej etiologii; postać rodzinna choroby sprzężona z mutacjami w genie dysmutazy nadtlenkowej 1 (SOD 1): [G93A] Gly93→Ala, [G37R]Gly37→Arg, [G85R]Gly85→Arg	szczepy transgenicznych myszy dotkniętych tzw. chorobą neuronu ruchowego na skutek ekspresji zmutowanego jak w FALS (ludzkiego lub mysiego) genu SOD 1	WONG i współaut. (1995) LEE i współaut.(1996)
Choroba Alzheimer*	choroba wieloczynnikowa, jej etiologia nie została wyjaśniona; znanych jest kilka mutacji sprzężonych z jej różnymi postaciami	myszy linii APP-V717F z nadekspresją zmutowanego produktu ludzkiego genu APP, myszy linii ALZ7 z wprowadzoną sekwencją kodującą dla najdłuższej izoformy ludzkiego białka tau	CROWTHER (1995) Lee i współaut. (1996)
Choroby prionowe: Kuru, ch. Creutzfeldta-Jakoba, syndrom GSS**, śmiertelna rodzinna bezsenność	formowanie się i akumulacja zmienionej formy białka Prp; przyczyny: nieznane w sporadycznych postaciach, zakażenia np. na skutek interwencji medycznej lub kanibalizmu, w postaciach rodzinnych mutacje w genie PrP np. syndrom GSS mutacja punktowa (PrP 102) Pro 102 → Leu	myszy z wprowadzonym do genomu transgenem <i>MoGSSPrP₁₀₁^{Leu}</i> (mysi gen <i>PrP</i> z punktową mutacją w kodonie 101 odpowiadającą mutacji spotykanej w GSS	LEE i współaut. (1996) TELLING i współaut. (1995)
Ataksja mózdkowo-rzeniowa	amplifikacja trypletu CAG w obrębie genu SCA 1 ***	myszy z wprowadzonym do genomu zmutowanym ludzkim genem SCA 1 (82 razy powtórzona, nie rozdzielona sekwencja CAG) tzw. myszy PS82	BURRIGHT i współaut. (1995)

*Tabela 2

** syndrom Gerstmann-Strausslera-Scheinkera

*** u osób zdrowych w genie SCA 1 sekwencja CAG powtarza się od 6 do 40 razy, z co najmniej jednym trypletem CAT w środku (98% przypadków) lub do 21 razy przy braku trypletu CAT (2%); u osób chorych brak trypletu CAT, a liczba powtórzeń CAG wynosi od 40 do 83 razy.

tych chorób mutacja lub mutacje w określonych genach powodują powstawanie nieprawidłowych białek, wywołujących zaburzenia funkcji, a nawet śmierć neuronów ulegających patologicznym zmianom. Do tej pory nie zostały jeszcze w pełni poznane mechanizmy prowadzące do rozwoju tych chorób. Nie są też znane ich skuteczne i specyficzne sposoby leczenia. Opracowane do tej pory transgeniczne modele służą przede wszystkim badaniom nad mechanizmami, w oparciu o które mutacja w danym genie prowadzi do rozwoju choroby lub zwię-

ksza ryzyko jej wystąpienia. U myszy, które zostały zmienione genetycznie tak, by stanowiły zwierzęcy odpowiednik zaburzeń patologicznych u ludzi ze stwardnieniem zanikowym bocznym, chorobą Alzheimer czy też jedną z chorób prionowych doprowadzono do nadekspresji zmutowanych genów i rozwinięcia się objawów typowych dla spotykanej u ludzi przebiegu danej choroby. Tym sposobem otworzyły się przed naukowcami nowe możliwości badania mechanizmów degeneracji komórek nerwowych w obecności zmutowanego białka

oraz przyczyn selektywnej wrażliwości pewnych populacji komórek nerwowych. Być może eksperymenty na myszach transgenicznych pozwolą w najbliższej przyszłości na wyjaśnienie zjawiska tak zwanej bariery międzygatunkowej chorób prionowych (istnieją dane wskazujące, że priony pochodzące od jednego gatunku z

trudem wywołują objawy chorobowe u innego gatunku). Tym samym będzie można odpowiedzieć na pytanie, czy taka bariera istnieje i czy jest wystarczająco silna, by zapobiegać przenoszeniu się bydłowej gąbczastej encefalopatii (BSE ang. bovine spongiform encephalopathy) z bydła na ludzi.

CHOROBA ALZHEIMERA

Wraz z postępem nauk biomedycznych w krajach rozwiniętych zaczął gwałtownie wzrastać odsetek ludzi w podeszłym wieku. Okazało się wówczas, że częstą przyczyną ciężkiego otępienia starczego jest choroba Alzheimer. Znanych jest kilka różnych postaci choroby Alzheimer, dla niektórych z nich udało się określić sprzężone z ich etiologią tak zwane genetyczne czynniki ryzyka (tabela 2). Najbardziej charakterystyczne zmiany patologiczne towarzyszące tej chorobie to złoże amyloidowe, zmiany neurofibrylarne oraz utrata komórek nerwowych.

Wielu badaczy uważa, że złoże amyloidowe są najbardziej typowe dla obrazu zmian patologicznych w mózgu pacjentów dotkniętych chorobą Alzheimer. Głównym składnikiem tak zwanych płytek starczych (płytek amyloidowych; ang. senile plaques, amyloid plaques) jest peptyd AβP składający się z 40–42 aminokwasów. Białkiem prekursorowym dla AβP jest APP — prekursorowe białko amyloidowe (błonowa

Tabela 2. Klasyfikacja podstawowych postaci choroby Alzheimer w oparciu o genetyczne czynniki ryzyka (wg ROSES1996)

Postać choroby Alzheimer	Sprzężony gen	Lokalizacja na chromosomie
AD 1: rodzinna, autosomalna, dominująca	APP (mutacja w genie kodującym prekursorowe białko amyloidowe)	21
AD 2: późna (pierwsze objawy między 55–80 rokiem życia) rodzinna, autosomalna dominująca	APOE (apolipoproteina E) allel <i>apoE4</i> (arginina w pozycji 112 i 158)	19
AD 3: wczesna (pierwsze objawy przed 65 rokiem życia, rodzinna, autosomalna, dominująca)	PS I (mutacja w genie kodującym presenilinę I)	14
AD 4: rodzinna, autosomalna, dominująca	PS II (mutacja w genie kodującym presenilinę II)	1

glikoproteina o nieznanej funkcji), którego gen jest zlokalizowany na chromosomie 21. Odkryto, że u pacjentów z rodzinną postacią choroby Alzheimer (AD1) odkładanie białka amyloidowego AβP jest związane z mutacją w obrębie końca węglowego APP w kodonie 717 (Val Phe, zastąpienie waliny przez fenyloalaninę). Informacja ta została wykorzystana przez GAMES i jej współpracowników (1995) do otrzymania transgenicznych myszy linii APP-V717F, u których rozwinęły się patologiczne zmiany analogiczne do obserwowanych u pacjentów z chorobą Alzheimer (pierwsza i jak dotąd jedyna udana próba stworzenia zwierzęcego modelu choroby Alzheimer). Stosując metodę mikroiniekcji do przedjadrza zygoty wprowadzono do mysiego genomu transgen zawierający sekwencję zmutowanego (Val717Phe) ludzkiego genu APP pod kontrolą promotora *PDGFβ* (promotor odpowiedzialny za docelową ekspresję w obrębie struktur dotkniętych zmianami patologicznymi w chorobie Alzheimer, takich jak hipokamp i kora nowa). Doprowadziło to do otrzymania transgenicznych myszy wykazujących charakterystyczne zmiany amyloidowe, które rozwijały się począwszy od 6–9 miesiąca życia i których intensywność wzrastała z wiekiem zwierząt. Analiza histopatologiczna mózgu ujawniła typowe dla choroby Alzheimer płytki amyloidowe otoczone przez astrocyty oraz głoje w obrębie hipokampa, ciała modzelowatego i kory nowej. Innym typem zmian, jakie obserwowano u myszy linii APP-V717F, było zmniejszenie gęstości synaps i drzewek dendrytycznych w obrębie warstwy drobinowej zakrętu zębatego. Nie stwierdzono natomiast drugiego, charakterystycznego dla obrazu neuronów w chorobie Alzheimer typu zmian patologicznych, a mianowicie zwyrodnień neurofibrilarnych w obrębie ciał komórek (kłębki neurofibrilarne) i dendrytów. Zmiany te występują na skutek hiperfosforylacji białek tau (normalnie białka te w postaci ufosforylowanej biorą udział w tworzeniu występujących w obrębie aksonów mikrotubul), która prowadzi do tworzenia sparowanych helikalnych filamentów (PHFs, ang.

paired helical filaments), głównego składnika kłębków i nici neurofibrilarnych. Nie są znane mechanizmy enzymatyczne leżące u podstaw hiperfosforylacji białek tau. Według jednej z hipotez, tak zwanej hipotezy kaskady amyloidowej, zwyrodnienia neurofibrilarne mają charakter wtórny i są indukowane poprzez pośrednie lub bezpośrednie neurotoksyczne działanie A β P (HARDY i współaut. 1992). Jakkolwiek u myszy APP-V717F nie stwierdzono obecności kłębków neurofibrilarnych oraz dystroficznych neuronów, zwierzęta te stanowią przełom w badaniach nad patogenezą choroby Alzheimera. Transgenizacja myszy przy użyciu cDNA, kodującego najdłuższą izoformę ludzkiego białka tau pod kontrolą promotora Thy-1 doprowadziła do otrzymania zwierząt (tzw. linia ALZ7), u których ludzkie białko tau wykryto nie tylko w obrębie aksonów, ale również na terenie ciał komórkowych i dendrytów. Analiza zawartości ludzkiego białka tau wykazała zaledwie 10% poziom syntezy w stosunku do mysiego białka (pomimo, że

poziom mRNA dla ludzkiego białka tau był pięciokrotnie wyższy niż dla mysiego). Metodami immunohistochemicznymi wykazano u tych myszy obecność białka tau w niemal wszystkich obszarach mózgu, jednak w znacznie mniejszym odsetku neuronów niż ma to miejsce u ludzi z chorobą Alzheimera. W neuronach, w których miała miejsce ekspresja ludzkiego białka tau, zachodziła ona na wysokim poziomie. Stwierdzono obecność białka tau w obrębie zarówno aksonów, jak i dendrytów oraz ciał komórkowych neuronów piramidalnych hipokampa i kory nowej. Nie wykryto formowania się sparowanych helikalnych filamentów, natomiast zaobserwowano fosforylację ludzkiego białka tau w obszarach typowych dla hiperfosforylacji. Może to oznaczać, że u myszy ALZ7 uzyskano obraz zmian poprzedzających powstanie patologicznych zwyrodnień neurofibrilarnych typowych dla choroby Alzheimera (CROWTHER 1995).

KRYTYCZNA OCENA TECHNIKI MODYFIKACJI MYSIEGO GENOMU

Obok tak zachęcających rezultatów są też wyniki, które wskazują na ograniczenia tych metod i przestrzegają przed zbytnim upraszczaniem mechanizmów leżących u podłoża zmian plastycznych w synapsach oraz innych zmian zachodzących podczas procesów pamięci i uczenia się oraz patologii chorób neurodegeneracyjnych. W każdej komórce organizmu eukariotycznego istnieje złożony system wzajemnych zależności pomiędzy różnorodnymi procesami biochemicznymi znajdującymi się pod precyzyjną kontrolą genetyczną. Procesy integracji obcego DNA przebiegają w sposób przypadkowy, co oznacza między innymi możliwość niezamierzonego uszkodzenia podczas manipulacji genetycznych jakichś endogennych genów. Zdarza się, że zmiany wywołane wprowadzeniem egzogenego DNA przy równoczesnym uszkodzeniu endogenego materiału genetycznego wielokomórkowego organizmu indukują kaskadę wydarzeń, której następstwa są trudne do przewidzenia oraz analizy. Przystępując do planowania i przeprowadzania eksperymentów zmierzających do stworzenia transgenicznego modelu jakiegoś schorzenia należy więc liczyć się z możliwością porażki, wynikającej co najmniej z dwóch powodów: po pierwsze mysz nie zawsze „chce być całkiem taka jak człowiek”, a po drugie rezultaty manipulacji genetycznych czasem wymykają się spod kontroli.

Nie sposób przewidzieć wszystkich różnic występujących pomiędzy szlakami biochemicz-

nymi u ludzi i myszy, co powoduje, że nie każda mutacja identyczna u obu gatunków będzie dawała w konsekwencji taki sam efekt fenotypowy. A zatem dosyć naiwnym byłoby stwierdzenie, że znajomość mutacji sprzężonej z określoną chorobą jest wystarczająca do stworzenia „doskonałego”, zwierzęcego modelu doświadczalnego dzięki technikom transgenizacji. Przykładem na to, że identyczna (u myszy i człowieka) mutacja nie zawsze prowadzi do tego samego efektu fenotypowego, jest historia eksperymentów, których celem było opracowanie zwierzęcego modelu zespołu Lescha-Nyhana. Jest to sprzężone z chromosomem X dziedziczne schorzenie charakteryzujące się między innymi uszkodzeniem ośrodkowego układu nerwowego, zwiększonym napięciem mięśniowym, opóźnieniem rozwoju umysłowego oraz samookaleczaniem się dotkniętych nim dzieci. Przyczyną zespołu Lescha-Nyhana jest mutacja pojedynczego genu powodująca brak aktywnej HGPRT-azy (fosforybozylotransferazy hipoksantynowo-guaninowej), enzymu tak zwanego rezerwowego szlaku syntezy puryn. Stworzono szczep transgenicznego myszy całkowicie pozbawionych tego enzymu. Okazało się jednak, że otrzymane myszy, które miały być odpowiednikami chorych, dotkniętych zespołem Lescha-Nyhana, nie wykazywały żadnych symptomów choroby. Stało się tak, ponieważ u myszy funkcję fosforybozylotransferazy hipoksantynowo-guaninowej może przejąć oksydaza moczanowa. Oznacza to,

że otrzymanie mysiego odpowiednika zespołu Lescha-Nyhana potencjalnie wymagałoby zmutowania genów kodujących oba enzymy, niestety nie wiemy, jakie inne następstwa mogłaby wywołać taka modyfikacja genetyczna.

Podobnie, w badaniach nad molekularnymi mechanizmami plastyczności w układzie nerwowym wskazuje się na szereg ograniczeń metody modyfikacji genomu myszy (GERLAI 1996 a, b). Jednym z ograniczeń jest to, że wyłączenie genu powoduje zwykle efekt plejotropowy, to znaczy wywołuje u zmutowanych myszy więcej niż jedną zmianę fenotypową. Wykazano u myszy transgeniczných, że CaMKII i kinaza tyrozyny Fyn są konieczne do indukcji LTP w hipokampie i uczenia przestrzennego u dorosłych osobników. Jednak nie wynika z tego wprost, że istnieje bezpośrednia zależność między LTP i uczeniem się. Być może ani CaMKII, ani Fyn nie są kluczowymi substancjami w mechanizmie indukcji LTP. Wiadomo, że brak ekspresji tych genów w okresie krytycznym rozwoju hipokampa może prowadzić do uszkodzeń strukturalnych. Mutanty *fyn* charakteryzują się na przykład znacznymi zaburzeniami w cytoarchitektonice hipokampa. Wobec tego ich niezdolność do indukcji LTP może być tylko efektem wtórnym, którego podłożem są zmiany w budowie hipokampa. Jeżeli uszkodzenie genu wpływa na bardzo złożone funkcje fizjologiczne lub behawioralne, to trudno określić, czy mutacja wywiera skutek w czasie rozwoju układu nerwowego, czy też dopiero w dojrzałym układzie nerwowym.

Genom charakteryzuje redundancja informacji genetycznej. Oznacza to, że po uszkodze-

niu właściwego genu inny gen lub geny mogą przejąć jego funkcję i w ten sposób kompensować brak ekspresji właściwego genu. Jednym z przykładów są badania nad rolą izoformy kinazy białkowej C (PKC γ) w indukcji LTD w mózdzku. Okazało się, że zarówno myszy PKC γ (-/-) jak i myszy typu dzikiego przejawiają podobną, normalną zdolność do indukcji LTD. Jednak ku zaskoczeniu eksperymentatorów, podawanie specyficznego blokera PKC γ , [PKC(19-36)] powodowało blokadę indukcji LTD u myszy typu dzikiego, podczas gdy u myszy PKC γ LTD nadal rozwijało się normalnie. Zatem u znokautowanych myszy zjawisko LTD może być indukowane w sposób niezależny od PKC γ .

Interpretacja zmian w zachowaniu, czy też różnic w uczeniu się myszy transgeniczných jest przypuszczalnie jeszcze bardziej skomplikowana niż analiza zmian plastycznych w synapsach. Ograniczeniem jest tu fakt, że skutek rozbicia genu przejawia się nie tylko w układzie nerwowym, ale także w całym organizmie. Obserwowane zaburzenia fenotypowe trudno ograniczyć tylko do funkcji tego genu w układzie nerwowym lub wręcz w danym typie neuronów. CaMKII i kinaza Fyn oprócz hipokampa są obecne także w wielu innych okolicach mózgu. Zatem deficyt uczenia obserwowany u myszy *CaMKII* lub *fyn* może być skutkiem braku ekspresji tych genów na przykład w korze mózgu. Przełamanie tych ograniczeń byłoby możliwe, gdyby modyfikacje genomu dotyczyły określonych, wybranych okolic mózgu oraz przejawiały się w określonych wybranych okresach ontogenezy.

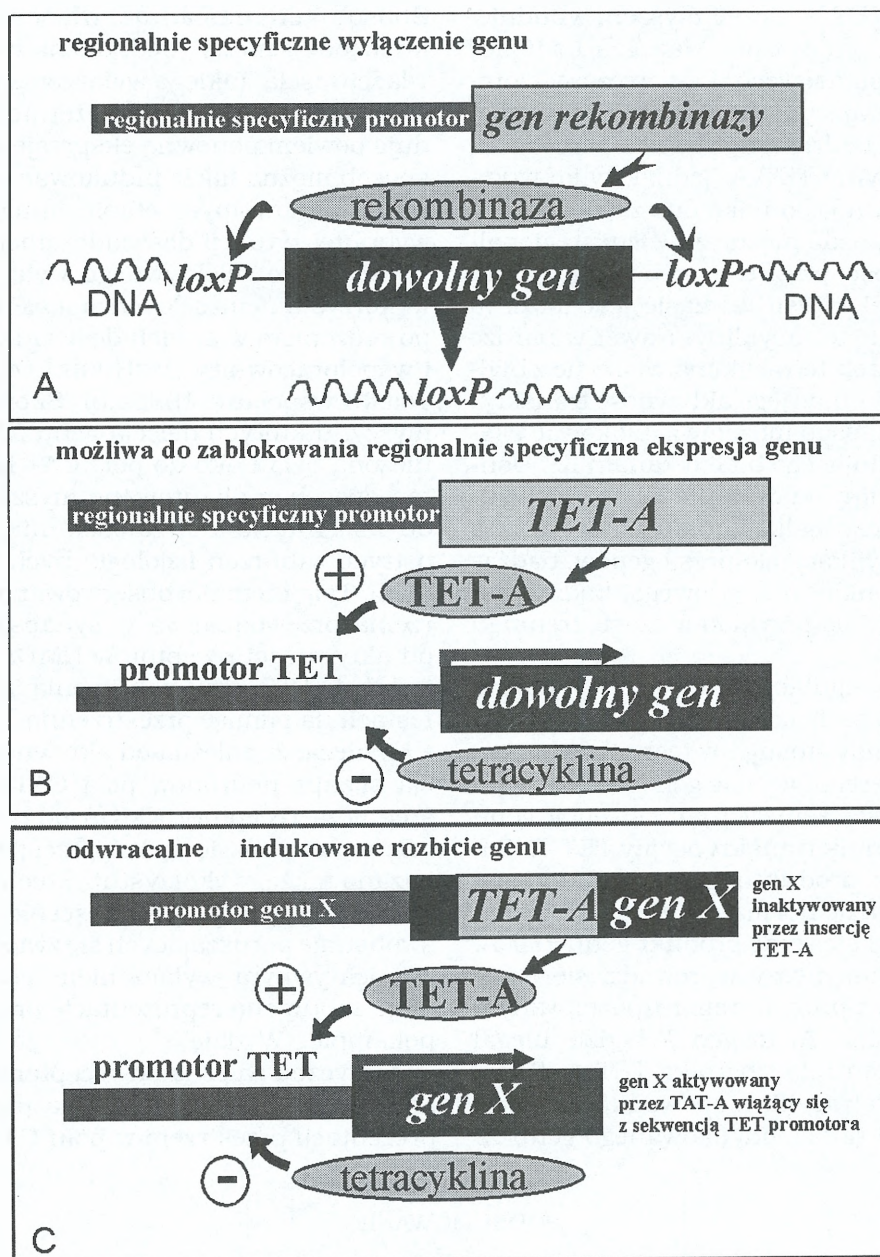
PERSPEKTYWY NA PRZYSZŁOŚĆ

Wszystkie geny składają się z dwu segmentów: odcinka kodującego (kodonu), który jest matrycą do syntezy białkowego produktu danego genu oraz z odcinka regulatorowego (zawierającego promotor), który determinuje kiedy i w jakich komórkach dany gen może ulegać ekspresji. Dotyczy to także komórek nerwowych, na przykład jonotropowy receptor kwasu glutaminowego KA-1 jest syntetyzowany głównie w neuronach pola CA3 hipokampa, podczas gdy receptor serotoniny 5-HT_{5B} podlega ekspresji tylko w neuronach pola CA1 oraz w strukturze zwanej strzemiączkiem (WISDEN i współaut. 1993).

Fakt istnienia regionalnie specyficznych promotorów genów wykorzystano do selektywnej transgenizacji myszy. Dzięki temu transkrypcja wybranego endogennego genu u domi-

nujących mutantów tych myszy może być zahamowana lub podwyższona tylko w wybranej populacji komórek, które zawierają podlegający ekspresji transgen. Trzy różne możliwe sposoby modyfikacji genomu myszy z wykorzystaniem tej techniki przedstawia rysunek 5 (MAYFORD i współaut. 1995).

W pierwszym przypadku (rys. 5A) jest konieczne wprowadzenie dwu mutacji do genomu myszy. Aby tego dokonać, w jednym szczepie myszy regionalnie specyficzny promotor (np. promotor genu *KA-1* w komórkach pola CA3) łączy się z genem kodującym rekombinazę DNA. Ten enzym może spowodować delecję wybranego genu struktury, jeżeli na każdym końcu sekwencji kodującej jest on ograniczony przez specyficzną sekwencję nukleotydów *loxP* rozpoznawaną przez rekombinazę. W drugim szcze-



Rys. 5. Sposoby modyfikacji genomu myszy, specyficzne tkankowo i kontrolowane w czasie.

A) Regionalnie specyficzne wyłączenie genu jest możliwe dzięki ekspresji genu rekombinazy DNA, która selektywnie rozpoznaje miejsca *loxP*. Rekombinaza powoduje delecję genu zlokalizowanego pomiędzy dwoma miejscami *loxP*. B) Regionalnie specyficzne zablokowanie ekspresji genu można osiągnąć wykorzystując wrażliwość czynnika transkrypcyjnego TET-A na tetracyklinę. C) Indukowane rozbitcie genu (gen X) przez wbudowanie w jego sekwencję genu TET-A. Czynniki transkrypcyjne TET-A, podlegający ekspresji pod kontrolą promotora genu X może stymulować ekspresję dodatkowej kopii genu X sprzężonej z promotorem zawierającym sekwencję TET. W tak zmodyfikowanym genomie ekspresja genu X może być zablokowana przez tetracyklinę.

pie myszy należy zatem na każdym końcu interesującego nas genu (np. *CaMKII*) wbudować sekwencję *loxP*. Krzyżowanie tych dwu szczepów pozwoli wyselekcjonować taką linię myszy, u których gen *CaMKII* będzie podlegał delecji tylko w tych komórkach, w których dochodzi do ekspresji rekombinazy, to znaczy w neuronach CA3 hipokampa.

Drugi sposób modyfikacji genomu polega na kontroli ekspresji wybranego genu w czasie

(rys. 5B). Gen *TET-A* koduje czynnik transkrypcyjny, który stymuluje ekspresję genów struktury zawierających w obszarze swojego promotora miejsce TET. Jeżeli gen *TET-A* połączymy z regionalnie specyficznym promotorem, na przykład KA-1 to *TET-A* będzie podlegał ekspresji tylko w komórkach pola CA3 hipokampa. Ekspresja genu *TET-A* w komórkach pola CA3 nie wywiera żadnego efektu, gdyż nie zawierają one odcinka promotorowego, rozpoznawanego

przez czynnik TET-A. Jeżeli myszom wbudujemy drugi transgen, na przykład gen kodujący białko kanału potasowego K^+ , sprzężony z promotorem zawierającym sekwencję TET, to ekspresja genu K^+ będzie aktywowana przez czynnik transkrypcyjny TET-A, jednak tylko w komórkach pola CA3, bo tylko one zawierają gen TET-A. W ten sposób można zapewnić regionalną specyficzność ekspresji wybranego genu. Kontrola jego ekspresji w czasie jest możliwa przez podawanie tetracykliny. Nawet w bardzo niskich stężeniach tetracyklina wiąże się z białkiem TET-A, hamując jego aktywność transkrypcyjną. W ten sposób możemy zablokować ekspresję genu kodującego białko kanału K^+ . Usunięcie tetracykliny spowoduje ponowne uruchomienie syntezy białka kanału K^+ . Stwarza to możliwość modyfikacji ekspresji genów, bądź w czasie rozwoju układu nerwowego, bądź u dorosłych zwierząt, na przykład w czasie treningu behawioralnego.

Właściwości regulacyjne tetracykliny można wykorzystać także do odwracalnego wyłączenia genu wówczas, gdy stosujemy technikę knockout (ryc. 5C). Interesujący nas gen (gen X) można rozbić poprzez włączenie w jego sekwencję genu kodującego czynnik transkrypcyjny TET-A. Powoduje to brak produktu genu X, natomiast wszędzie tam, gdzie normalnie ekspresji podlegał gen X pojawi się teraz produkt genu TET-A. Jeżeli do genomu myszy wprowadzi się nowy gen X sprzężony z promotorem rozpoznawanym przez czynnik TET-A, to gen X będzie ulegał ekspresji pod kontrolą czynnika TET-A. Podawanie myszom tetracykliny spowoduje zablokowanie ekspresji tak zmodyfikowanego genu X.

Sposób ten naśladuje właściwie klasyczny knockout genowy. Jednak niezmiernie cenną właściwością takiego wyłączenia genu jest jego odwracalność. Wycofanie tetracykliny spowoduje bowiem ponowną ekspresję genu X. W ten sposób można także indukować wyłączenie genu X w dowolnym etapie ontogenezy lub w wybranej sytuacji doświadczalnej.

Technikę selektywnego wyłączania genu z wykorzystaniem sekwencji *loxP* zastosowali z powodzeniem w swoich doświadczeniach TSIEN i współpracownicy (MCHUGH i współaut. 1996, TSIEN i współaut. 1996a,b). Skonstruowali oni myszy, u których delecja genu *NMDAR-1* ograniczona była tylko do pola CA1 hipokampa. W ten sposób znokautowane myszy dorastały aż do osiągnięcia dojrzałości, nie przejawiając ostrych zaburzeń fizjologicznych i behawioralnych. Tym niemniej obserwowano u nich zaburzenia przewodnictwa w synapsach zależnego od aktywności receptorów NMDA, niemożność indukcji LTP oraz zaburzenia uczenia się w testach na pamięć przestrzenną. Jest to zgodne z hipotezą, że zależna od aktywności modyfikacja synaps neuronów pola CA1, w której pośredniczą receptory NMDA odgrywa kluczową rolę w uczeniu się zadań przestrzennych. Wykazano także, wykorzystując technikę wielokanalowej rejestracji aktywności bioelektrycznej u swobodnie poruszających się zwierząt, że myszy z selektywnym wyłączeniem genu *NMDAR-1* mają zaburzoną reprezentację przestrzeni w hipokampie. Wydaje się więc, że plastyczność synaptyczna zależna od receptorów NMDA jest konieczna także do tworzenia prawidłowej reprezentacji przestrzeni w polu CA1.

PODSUMOWANIE

Doświadczenia na zwierzętach transgenicznym dostarczają cennych informacji, dzięki którym zrozumienie molekularnych mechanizmów leżących u podłoża procesów poznawczych staje się łatwiejsze. Zaletą badań genetycznych jest możliwość poddania drobiazgowej analizie kolejnych etapów danego procesu fizjologicznego, na przykład wyłączanie funkcji neuronów na różnych poziomach ich organizacji. Jednak wykorzystanie metod genetycznych w analizie procesów poznawczych znajduje się dopiero w początkowej fazie ich zastosowania w neurobiologii. Wiąże się to z ograniczeniami wynikającymi z fenotypowo nieswoistych skut-

ków wyłączenia danego genu lub też wysokiej letalności zwierząt tuż po urodzeniu. Z najnowszych badań wynika jednak, że ograniczenia metod modyfikacji genomu mogą być przełamane, a celowane wyłączenie swoistego genu jest możliwe w określonej populacji komórek organizmu oraz w wybranym okresie rozwoju ontogenetycznego. Rozwinięcie tych technologii pozwoli wnikać nie tylko w mechanizmy genetycznej kontroli funkcji neuronów, ale także w mechanizmy neuronalnej kontroli zachowania i procesów poznawczych. Stwarza to także szansę skonstruowania zwierzęcych modeli chorób neurologicznych występujących u ludzi.

MANIPULATIONS UPON THE MOUSE GENOME AND THEIR IMPLICATIONS FOR NEUROBIOLOGY

Summary

Technical developments in recent years have provided geneticists with a new set of tools, so that experiments previously restricted to lower organisms can now be performed on mice. At present it is possible to manipulate the genes of a developing mouse embryo and introduce foreign genes. Once these genes have integrated into the genome of the recipient embryo, the developmental results can be analyzed in the adult to determine the pattern of expression and the phenotypic effect of the introduced genes. The reverse technique of gene targeting to create null mutations in mice is also a powerful tool in biology. Transgenic mice overexpressing a specific gene and mice with a particular gene inactivated (knockout) are now being used to determine the molecular basis of embryogenesis and development. They can also provide model systems helping to understand human diseases, including developmental defects and neurodegenerative disorders. Application of these

techniques to neurobiology is beginning to provide a bridge between genes and cognition. In particular, we use them to examine molecular mechanisms involved in learning and memory, and in activity-dependent modulation of synaptic physiology. However, the value of genetic analysis for the study of learning and memory, specifically the value of mouse null mutants, has recently been questioned. The objection was raised that, in mice with null mutations, product(s) of other gene(s) may compensate for the missing gene product. As a consequence, data generated in the analysis of null mutants may be uninterpretable, presumably because of the complex interactions among the many genes involved in learning and memory. Substantial improvements will come if a given gene can be knocked out in a certain restricted region of the nervous system and during an ontogenically restricted period. The technology to achieve this is currently being developed in several laboratories.

LITERATURA

- AIBA A., KANO M., CHEN C., STANTON M., FOX G., HERRUP K., ZWINGMAN T., TONEGAWA S., 1994. Deficient cerebellar long-term depression and impaired motor learning in mGluR1 mutant mice. *Cell* 79, 377-388.
- BOURTCHOUADZE R., FRENGUELLI B., BLENDY J., CIOFFI D., SCHUTZ G., SILVA A.J., 1994. Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element binding protein. *Cell* 79, 59-68.
- BURRIGHT E. N., CLARK H. B., SERVADIO A., MATILLA T., FEDDERSEN R. M., YUNIS W. S., DUVICK L. A., ZOGHBI H. Y., ORR H. T., 1995. SCA1 transgenic mice: a model for neurodegeneration caused by an expanded CAG trinucleotide repeat. *Cell* 82, 937-948.
- CROWTHER R. A., 1995. Steps towards a mouse model of Alzheimer's disease. *BioEssays* 17, 593-595.
- EDWARDS R. H., RUTTER W. J., HANAHAN D., 1989. Directed expression of NGF to pancreatic cells in transgenic mice leads to selective hyperinnervation of the islets. *Cell* 58, 161-170.
- GAMES D., ADAMS D., ALESSANDRINI R., 1995. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F α -amyloid precursor protein. *Nature* 373, 523-527.
- GERLAI R., 1996a. Gene-targeting studies of mammalian behavior: is it the mutation or the background genotype? *TINS* 19(5), 177-181.
- GERLAI R., 1996b. Gene targeting in neuroscience: the systemic approach. *TINS* 19(5), 188-189.
- GORDON J. W., 1989. Transgenic animals. *Intl. Rev. Cytol.* 115, 171-229.
- HAMBURGER V., 1934. The effects of wing bud extirpation on the central nervous system in chick embryos. *J. Exp. Zool.* 68, 449-494.
- HARDY L., 1992. Alzheimer's disease. *Clinical molecular genetics*. Clin. Geriatr. Med. 10, 239-247.
- HENDERSON T. A., JOHNSON E. M., OSBORNE P. A., JACQUIN M. F., 1994. Fetal NGF augmentation preserves excess trigeminal ganglion cells and interrupts whisker-related pattern formation. *J. Neurosci.* 14, 3389-3403.
- JAENISCH R., 1988. Transgenic animals. *Science* 240, 1468-1474.
- JAENISCH R., MINTZ B., 1974. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 1250-1254.
- LEE M. K., BORCHELT D. R., WONG P. C., SISODIA S. S., PRICE D. L., 1996. Transgenic models of neurodegenerative diseases. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6, 651-660.
- LEVI-MONTALCINI R., HAMBURGER V., 1953. A diffusible agent of mouse sarcoma, producing hyperplasia of sympathetic ganglia and hyperneurotization of viscera in the chick embryo. *J. Exp. Zool.* 123, 233-287.
- MASTRONARDI F. G., ACKERLEY C. A., ARSENAULT L., ROOTS B. I., MOSCARELLO M. A., 1993. Demyelination in a transgenic mouse: a model for multiple sclerosis. *J. Neurosci. Res.* 36, 315-324.
- MAYFORD M., ABEL T., KANDEL E. R., 1995. Transgenic approaches to cognition. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5, 141-148.
- MCHUGH T. J., BLUM K. I., TSJEN J. Z., TONEGAWA S., WILSON A., 1996. Impaired hippocampal representation of space in CA1-specific NMDAR1 knockout mice. *Cell* 87, 1339-1349.
- O'LEARY D. D., RUFF N., DYCK R. H., 1994. Development, critical period plasticity, and adult reorganizations of mammalian somatosensory systems. *Curr. Opin. Neurobiol.* 4, 535-544.
- ROSES A.D., 1996. The Alzheimers disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6, 644-650.
- SILVA A., STEVENS C., TONEGAWA S., WANG Y., 1992. Deficient hippocampal long-term synaptic depression in the cerebellum. *Nature* 349, 326-328.
- SINDER W. D., 1994. Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell* 77, 627-638.
- SMALL J. A., SCANGOS G. A., CORK L., JAY G., KHOURY G., 1986. The early region of human papovavirus JC induces dysmyelination in transgenic mice. *Cell* 46, 13-18.
- STEVENS C. F., TONEGAWA S., WANG Y., 1994. The role of calcium-calmodulin kinase II in three forms of synaptic plasticity. *Curr. Biol.* 5, 687-693.
- TELLING G. C., SCOTT M., MASTRIANNI J., GABIZON R., TORCHIA M., COHEN F. E., DEARMOND S. J., PRUSINER S. B., 1995. Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* 83, 79-90.

- TSIEN J. Z., CHEN D. F., GERBER D., TOM C., MERCER E.H., ANDERSON D.J., MAYFORD M., KANDEL E. R., TONEGAWA S., 1996. *Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain*. Cell 87, 1317-1326.
- TSIEN J. Z., HUERTA P. T., TONEGAWA S., 1996a, b. *The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory*. Cell 87, 1327-1338.
- TYBULEWICZ V. L. J., TREMBLAY M. L., LAMARCA M. E., WILLEMSEN R., STUBLEFIELD B. K., WINFIELD S., ZABLOCKA B., SIDRANSKY E., MARTIN B. M., HUANG S. P., MINTZER K. A., WESTPHAL H., MULLIGAN R. C., GINNS E. I., 1992. *Animal model of Gaucher's disease from targeted disruption of the mouse glucocerebrosidase gene*. Nature 357, 407-410.
- WATSON J. D., GILMAN M., WITKOWSKI J., ZOLLER M., 1992. *Recombinant DNA*. Scientific American Books, New York.
- WISDEN P., PARKER E. M., MAHLE C. D., GRISEL D. A., NOWAK H. P., Yocca F. D., FELDER C. C., SEEBURG P., VOIGT M. M., 1993. *Cloning and characterization of the rat 5-HT_{5B} receptor: evidence that the 5-HT_{5B} receptor couples to a G protein in mammalian cell membranes*. FEBS Lett. 333, 25-31.
- WONG P. C., PARDO C. A., BORCHELT D. R., LEE M. L., COPELAND N. G., JENKINS N. A., SISODIA S. S., CLEVELAND D. W., PRICE D. L., 1995. *An adverse property of familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria*. Neuron 14, 1105-1116.