

Sintezna patobiologija: raziskave mehanizmov neurodegeneracije

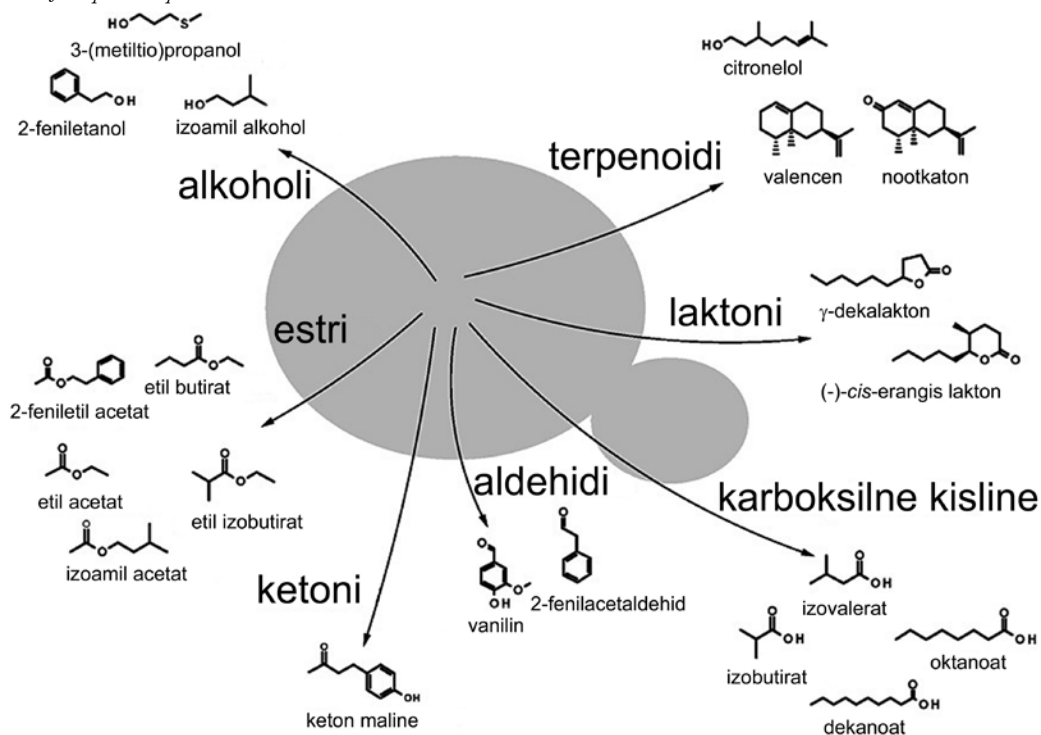
Matjaž Stenovec, Robert Zorec

Sintezna biologija je veda, ki omogoča načrtovanje in izdelavo novih bioloških entitet (encimov, metabolnih poti, celic ...) ter preoblikovanje obstoječih bioloških sistemov za koristne namene. Temelji na napredku molekulske, celične in sistemske biologije ter obeta, da bo v prihodnosti preoblikovala biologijo na način, kot je sintezna kemija preoblikovala kemijo. Deloma se je že uveljavila v kozmetični, farmacevtski in prehranski industriji, kjer jo uporabljajo za proizvodnjo vonjav – kot so vanilin (aroma vanilje), valencen (aroma pomaranče) in no-

otkaton (aroma grenivke) – iz sladkorjev v glivah kvasovkah (slika 1), čeprav je njen uporabi potencial širši in ni omejen zgolj na proizvodnjo snovi v celicah, ki jih te ne sintetizirajo v naravi.

Da bi poenostavili dolgotrajne in drage postopke razvoja novih zdravil, bi sintezno biologijo lahko uporabili tudi za proizvodnjo inženirsko spremenjenih celic človeškega izvora, ki bi posnemale delovanje celic v bolezensko spremenjenih organih. Na ta način bi pridobili alternativni modelni celični sis-

Slika 1: Vonjave, ki jih proizvajajo kvasovke de novo iz sladkorjev ali z biološko transformacijo iz prekursorjev. Prirejeno po: Carlquist in sod., 2015, Yeast.



tem, ki bo primeren za raziskovanje patofizioloških procesov v bolezensko spremenjenih celicah, in delno nadomestili testiranje zdravil na živalskih modelih bolezni. Z uporabo celic človeškega izvora, vključno tistih, ki izvirajo iz bolnikov, pri katerih je okvara genetsko definirana, bi lahko izboljšali usmerjenost predkliničnih raziskav ter zagotovili boljše razumevanje bolezenskih celičnih procesov pri človeku. Cilj prispevka, je vprašati se, ali lahko sintezno biologijo uporabimo za raziskovanje mehanizmov nevrodegeneracije in za določanje novih terapevtskih tarč, primernih za zdravljenje nevrodegenerativnih bolezni pri človeku – sintezna patobiologija.

V preteklem stoletju je medicina opravila izjemen napredek, ki je omogočil zdravljenje številnih somatskih bolezni. Z antibiotiki lahko danes pozdravimo večino bakterijskih bolezni, napredek v imunologiji in kirurgiji je omogočil presaditve različnih organov. V izrazitem nasprotju s temi dosežki pa je današnja učinkovitost zdravljenja nevrodegenerativnih bolezni, dednih ali sporadičnih bolezni, ki vodijo do napredujoče in nepovratne odpovedi živčnega sistema zaradi izgube strukture in funkcije možganskih celic ter njihovega propada. Razumevanje kompleksnega niza dogodkov, ki pripeljejo do nevrodegeneracije, je ključnega pomena, saj pomenijo nevrodegenerativne bolezni, kot sta Alzheimerjeva in Parkinsonova bolezen, veliko družbeno in gospodarsko breme za družbo, ki se vsaj v Sloveniji zelo hitro stara. Starost je glavni dejavnik tveganja za pojav demenc in kognitivni upad. Po oceni Alzheimerjevega združenja (<https://www.alz.org/>) bo zaradi staranja prebivalstva v razvitem delu sveta za obema boleznima obbolelo 7,1 milijona ljudi do leta 2025, na svetovni ravni pa kar 81 milijonov do leta 2040. Kljub številnim raziskavam nevrodegeneracije je mehanizem propada možganskih celic še vedno neznanka. To je deloma posledica necelovitega razumevanja patobioloških celičnih procesov, ki vodijo do na-

stanka nevrodegenerativnih bolezni, in tudi posledica eksperimentalne nedostopnosti človeških možganskih celic za izvajanje temeljnih raziskav.

Današnje razumevanje nevrodegenerativnih bolezni temelji na predpostavki, po kateri so nevroni ključne celice v zdravju in bolezni ter sinapse in živčni prenašalci ključni elementi, ki uravnavajo delovanje živčnih omrežij. Nevrocentrična dogma, ki znanstveno nikoli ni bila potrjena, je umeščena v samo jedro eksperimentalne in klinične nevrologije, čeprav je predpostavka o dominantni vlogi nevronov in živčnih omrežij v neskladju s splošno logiko narave bolezni. Vsako bolezen lahko opredelimo kot odpoved homeostaze (ravnovesnega stabilnega stanja), pri kateri zunanji ali notranji dejavniki (fizikalni, kemijski ali genetski) ovirajo delovanje živega tkiva in motijo njegovo zmožnost za zagotavljanje homeostaze. Bolezen torej lahko razumemo kot homeostatsko odpoved, katere globina opredeljuje njeno združljivost z življenjem. Po tej razlagi lahko vzroke za nastanek nevrodegenerativnih bolezni iščemo tudi v odpovedi homeostatskega sistema v osrednjem živčnem sistemu, ki ga zagotavljajo celice nevroglije (živčnega opornega tkiva): mikro- in makroglije (oligodendrociti in astrociti), dolgotrajni »izobčenci« v nevrobiologiji.

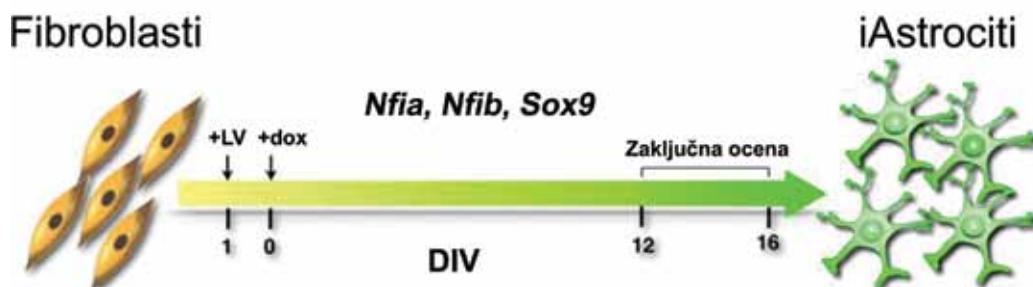
Številne raziskave minulih desetletij so postopoma razkrile ključno vlogo astrocitov (morfološko in funkcijsko heterogene populacije nevroglije) v prometu in recikliranju živčnih prenašalcev, metabolizmu ionov in hranil, uravnavanju krvnega pretoka v možganih, sproščanju prenašalcev in rastnih dejavnikov ter zaščiti celic pred oksidativnim stresom. Nova spoznanja o astrocitih, ki omogočajo preživetje in pravilno delovanje nevronov, so pripeljala do zamisli, po kateri lahko disfunkcija astrocitov vodi do razvoja nevroloških in nevrodegenerativnih bolezni, kot so epilepsija, amiotrofična lateralna skleroza, Alzheimerjeva bolezen, lizosomske bolezni in Rettov sindrom.

Ali lahko s pomočjo sintezne biologije raziskujemo tudi molekulske mehanizme nevrodegeneracije in prepoznamo nove terapevtske tarče, primerne za zdravljenje nevrodegenerativnih bolezni pri človeku - sintezna patobiologija? V kolikor želimo dokazati, da sta razvoj in napredovanje nevrodegenerativnih bolezni pri človeku posledica spremenjenega delovanja astrocitov, se je treba soočiti z dvema ključnima izzivoma. Najprej je treba pridobiti zadostno količino celic (iz obolelih in zdravih članov družin z zgodovino nevrodegenerativne bolezni) na način, s katerim povzročimo minimalno škodo in nevšečnosti darovalcem. V nadaljevanju je treba zagotoviti robusten testni sistem, s katerim izmerimo disfunkcijo astrocitov, ki je lahko posledica izražanja mutiranega gena in vodi v oslajeno homeostatsko zmogljivost astrocitov *in vivo*. Rešitev prvega problema so nedavno priskrbeli Caiazzo in sodelavci (2015), ki so s tehnologije neposrednega celičnega reprogramiranja identificirali tri transkripcijske dejavnike, jedrni dejavnik I/A (NFIA), jedrni dejavnik I/B (NFIB) in dejavnik SOX9 (od skupno 14 testiranih), zadostne za pretvorbo zarodnih in postnatalnih celic vezivnega tkiva (fibroblastov) miši v inducibilne astrocite (iAstrocite). Za podobno tehnologijo oziroma »za odkritje, da zrele celice lahko reprogramiramo v pluripotentne celice«, sta leta 2012

prejela Nobelovo nagrado za fiziologijo ali medicino John B. Gurdon in Šinja Jamanaka (https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2012/). Caiazzo in sodelavci so proizvedli inducibilne astrocite, tako da so fibroblaste miši v kulturi okužili z lentivirusnimi vektorji, v katere so vključili transkripcijske dejavnike NFIA, NFIB, in SOX9 (slika 2).

Dvanajst dni po okužbi so z imunocitometričnim označevanjem potrdili izražanje tipičnih astrocitnih markerjev v celicah. Pridobljeni inducibilni astrociti so izražali podobne gene kot nativni astrociti in kazali podobne funkcijske lastnosti ter se razlikovali od izvornih, primarnih fibroblastov. Podoben pristop bi lahko uporabili tudi za proizvodnjo človeških inducibilnih astrocitov, ki bi jih pridobili s pretvorbo fibroblastov kože darovalcev iz družin z zgodovino nevrodegenerativnih bolezni, kot so avtosomna dominantna Huntingtonova bolezen, familiarna amiotrofična lateralna skleroza in familiarna Alzheimerjeva bolezen. Človeške inducibilne astrocite bi lahko nadalje vzdrževali v celični kulturi brez patološko spremenjenega možganskega tkiva in uporabili kot alternativni modelni celični sistem, primeren za raziskave in identifikacijo za astrocite specifičnih celičnih procesov, povezanih z razvojem nevrodegenerativnih bolezni. Pomembna prednost predlaganega

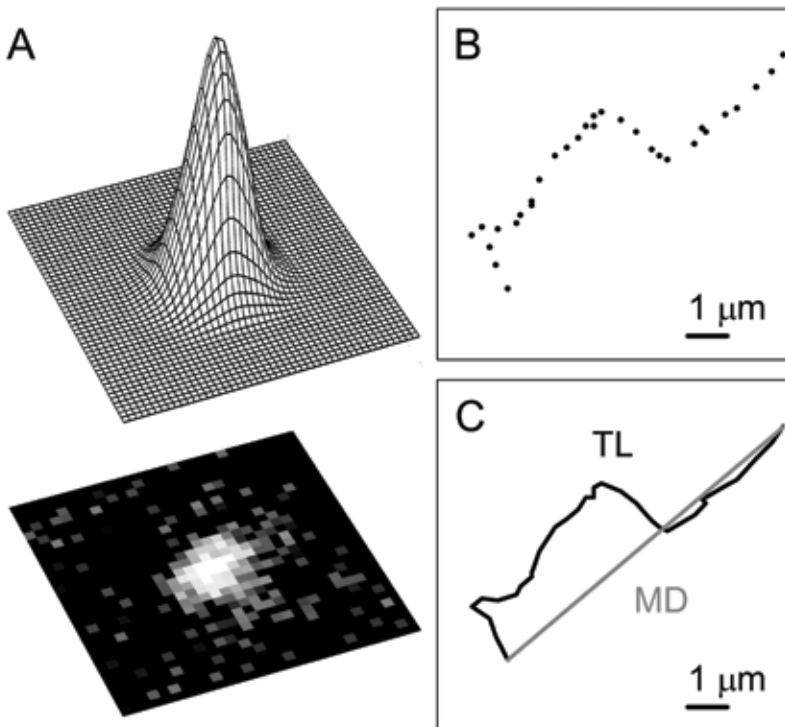
Slika 2: Protokol gojenja celic, med katerim z izražanjem transkripcijskih dejavnikov NFIA, NFIB in SOX9 reprogramirajo fibroblaste miši v inducibilne astrocite (iAstrocite). Dodatek lentivirusnih vektorjev (+LV), dodatek doksiciklina (+dox), dnevi in vitro (DIV). Prirejeno po: Caiazzo in sod., 2015, Stem Cell Reports.



pristopa je tudi ta, da preprečuje zmotno razlago disfunkcije astrocitov kot sekundarne posledice (adaptivni ali kompenzacijski odziv) zaradi primarne okvare nevronov.

Da bi preverili, ali je patologija familiarne oblike Alzheimerjeve bolezni lahko povezana z motenim delovanjem astroglije, smo v našem laboratoriju raziskali znotrajcelični transport mešičkov. Transport je povezan s sposobnostjo teh celic, da kemično komunicirajo s sosednjimi celicami, tako da iz mešičkov izločajo prenašalce glije, s katerimi lahko vplivajo na sinaptični prenos med nevroni. Iz možganske skorje novorojenih zdravih miši in mišjega modela Alzheimerjeve bolezni (tako imenovana trojno transgena miš; 3xTg-AD) smo izolirali astroците v predsimptomatski fazi bolezni, v kateri so predhodno opazili morfološko atrofijo (zmanjšano velikost teles celic in zmanjšano število izrastkov) astrocitov (Olabarria in sod., 2010), ki je lahko posledica spremenjenega transporta mešičkov. Atrofični fenotip

astrocitov nakazuje na zmanjšano pokritost sinaps in nezmožnost za zagotavljanje ustrezne podpore sinapsam, ki lahko vodi do motenj v sinaptičnem prenosu, neravnovesja v homeostazi živčnih prenašalcev in končno do propada nevronov. Alzheimerjeva bolezen je napredujoča, nepovratna in usodna bolezen, ki izrazito prizadene spoznavne zmogljivosti človeka. Ključni histopatološki znaki bolezni so fokalni zunajcelični depoziti β -amiloida (A β) v možganovini, imenovani amiloidni plaki ali senilne lehe, in kopičenje nevrofibrilarnih pentelj iz hiperfosforiliranega proteina Tau v nevronih. Alzheimerjeva bolezen je večinoma sporadična in se pojavi v pozni starosti (po 65. letu), v maloštevilnih primerih pa nastopi zgodaj in je gensko podedovana (tako imenovana familiarna Alzheimerjeva bolezen). V 40 odstotkih znanih primerov familiarne bolezni so našli mutirana gena za presenilin 1 in 2. Presenilini so proteini, vsajeni v membrane endoplazemskega retikuluma



Slika 3: Analiza mobilnosti mešičkov. (A) Na fluorescentno podobo mešička v mikrofotografiji (spodaj) prilagodimo tridimenzionalno Gaussovo krivuljo (zgoraj) in določimo koordinate (x,y) vrha krivulje (lego mešička) v izbranem času. (B) Prikaz koordinat gibljivega mešička v 15-sekundnem obdobju. (C) Po rekonstrukciji poti mešička lahko izmerimo dolžino poti (TL; črna črta) in največji odmik na poti (MD; siva daljica).

in Golgijevega aparata, in tvorijo katalitično podenoto γ -sekretaze, ki cepi amiloidni prekursorski protein v amiloid β . Mutacije presenilinov spremenijo procesiranje amiloidnega prekursorskega proteina na eni in kalcijevo signalizacijo celic na drugi strani, saj so presenilini tudi pasivni kalcijevi kanali v membranah endoplazemskega retikula. Astroцити iz mišjega modela bolezni so izražali mutirani presenilin 1 (PS1^{M146V}), medtem ko so kontrolni (zdravi) astroцити izražali presenilin 1 divjega tipa. Da bi dokazali avtonomno (za astroцитe specifično) disfunkcijo, smo astroцитe vzdrževali v obogateni celični kulturi in preprečili njihovo izpostavitve patološko spremenjenemu možganskemu tkivu, ki je posledica dolgotrajnega kopičenja amiloida β , vnetnega odziva ali spremenjene prepustnosti krvno možganske pregrade.

S kvantitativno konfokalno mikroskopijo smo raziskali transport mešičkov (slika 3), ki skladiščijo sekrecijske peptide, in mobilnost zakisanih endosomov (endolizosomov), ki skladiščijo hidrolitične encime ter prenašalec glijе ATP (slika 4A), ter ugotovili, da je bila mobilnost mešičkov splošno zmanjša-

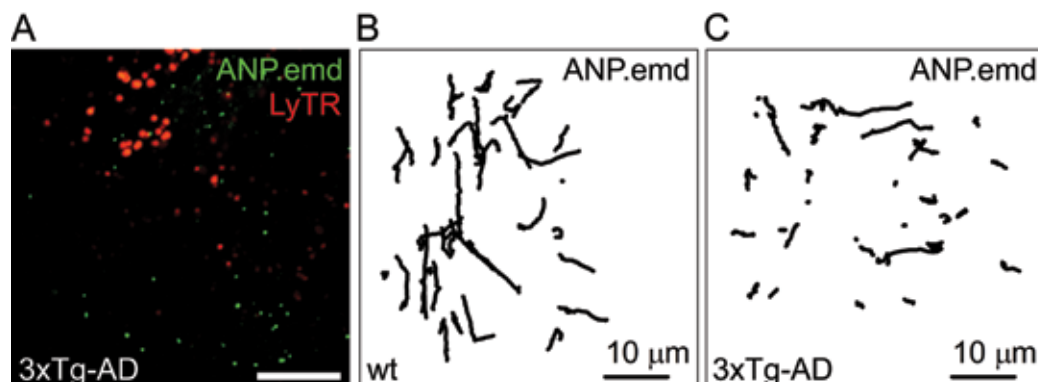
na v astroцитih iz modela Alzheimerjev bolezni (sliki 4B, C).

Spremenjeni transport sekrecijskih mešičkov na eni (sliki 4B, C) in zakisanih endolizosomov na drugi strani je nakazal na neravnovesje v znotrajcelični dinamiki mešičkov, ki lahko na kratki rok spremeni signalno pokrajino celice, na dolgi rok pa tudi njeno obliko ter pravilno porazdelitev proteinov, vključno z amiloidnim prekursorskim proteinom in amiloidom β . Astroцити lahko privzamejo in razgradijo amiloid β ; zmanjšana mobilnost endolizosomov, ključnih organolov razgradnje, v katere se dostavi amiloid β po privzemu v celice, lahko nezadostno podpira učinkovito odstranjevanje odpadnih snovi iz možganovine in dolgoročno prispeva k razvoju patogeneze amiloidnih plakov. Spremenjeni znotrajcelični transport astroцитnih mešičkov je lahko povezan z razvojem Alzheimerjeve bolezni in potencialna terapevtska tarča za zdravljenje bolezni.

Opisani eksperimentalni pristop je neizvedljiv pri človeku, pri katerem je pridobivanje inducibilnih astroцитov po pretvorbi iz fibroblastov kože obolenih (in zdravih) posameznikov edina etično sprejemljiva alternativa

Slika 4: Mobilnost sekrecijskih mešičkov (ANP.emd) in endolizosomov (LyTr) je zmanjšana v astroцитih iz mišjega modela Alzheimerjeve bolezni (3xTg-AD).

(A) Konfokalna mikrofografija prikazuje posamezne sekrecijske mešičke (ANP.emd, manjši zeleni delci) in zakisane endolizosome (LyTR, večji rdeči delci). Merilo = 10 μ m. (B) Prikaz rekonstruiranih poti sekrecijskih mešičkov v 15-sekundnem obdobju v kontrolnem (wt) astroцитu in v 3xTg-AD astroцитu kaže, da so mešički v astroцитu iz modela Alzheimerjeve bolezni potovali manj usmerjeno in prepotovali krajše poti. Prirejeno po: Stenovec in Zorec, 2015, Neural Regeneration Research.



za eksperimentalno ugotavljanje potencialne disfunkcije astrocitov v nevrodegeneraciji. Pridobljene človeške inducibilne astrocite bi lahko nadalje uporabili za razvoj novih diagnostičnih testov, s katerimi bi napovedali klinično manifestacijo bolezni že v zgodnjem, to je predsimptomatskem stadiju bolezni. Sintezna patobiologija, pri kateri pretvorimo postnatalne ali odrasle fibroblaste človeka v inducibilne astrocite, se zdi obetavna strategija za identifikacijo novih molekularskih mehanizmov in terapevtskih tarč, primernih za zdravljenje nevrodegenerativnih bolezni pri človeku.

Literatura:

- Caiazzo, M., Giannelli, S., Valente, P., Lignani, G., Carissimo, A., Sessa, A., Colasante, G., Bartolomeo, R., Massimino, L., Ferroni, S., Settembre, C., Benfenati, F., Broccoli, V., 2015: *Direct conversion of fibroblasts into functional astrocytes by defined transcription factors*. *Stem Cell Reports*, 4: 25-36.
- Carlquist, M., Gibson, B., Karagul Yuceer, Y., Paraskevopoulou, A., Sandell, M., Angelov, A. I., Gotcheva, V., Angelov, A. D., Etschmann, M., de Billerbeck, G. M., Liden, G., 2015: *Process engineering for bioflavour production with metabolically active yeasts – a mini-review*. *Yeast*, 32: 123-143.
- Olabarria, M., Noristani, H. N., Verkhratsky, A., Rodríguez, J. J., 2010: *Concomitant astroglial atrophy and astrogliosis in a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease*. *Glia*, 58: 831-838.
- Stenovec, M., Zorec, R., 2015: *Synthetic cell pathobiology to study neurodegeneration: defining new therapeutic targets in astroglia*. *Neural Regeneration Research*, 11: 234-235.

Razvojne motnje ter kronična obolenja živčevja v povezavi z užjitimi in zdravilnimi rastlinami • Medicina in botanika

Razvojne motnje ter kronična obolenja živčevja v povezavi z užjitimi in zdravilnimi rastlinami

Luka Kristanc

Škodljive posledice strupenih snovi so pogosto odvisne ne le od lastnosti strupa in vrste organizma, temveč tudi od razvojnega obdobja, v katerem je organizem v času izpostavljenosti.

Strupene snovi lahko največ škode povzročijo, če jih v telo vnesemo v kritičnih razvojnih obdobjih, kot so nosečnost, še zlasti obdobje organogeneze (pri človeku nekje od 14. do 60. dne nosečnosti), čas dojenja ter celotno obdobje otroštva in mladosti do konca pubertete.

Snovi, ki delujejo kvarno na razvijajoči se plod oziroma zarodek, imenujemo teratogeni. Rastlinske teratogene snovi lahko poskodujejo dednino (to so mutageni), zavirajo

delitev celic (to so citostatiki), motijo razvoj živčevja (na primer zaviranci folatov, tirostatiki in tiaminaze) ali sprožijo tvorbo reaktivnih kisikovih snovi in celično smrt (mnogi akutno strupeni alkaloidi). Vse našteje skupine snovi imajo lahko zelo moteč vpliv tudi še dolgo po rojstvu. Mnoge med njimi učinkujejo zelo prikrito, podobno kot hormonski motilci. Takšni so na primer lahko učinki rastlinskih tiaminaz v zgodnjem otroštvu ali kanabinoidov pri mladostnikih. V članku bo veliko govora zlasti o škodljivih vplivih rastlinskih pripravkov na razvoj živčevja, ob koncu pa se bomo na kratko pomudili še pri dveh kroničnih obolenjih živčevja, ki ju danes srečamo zgolj še v najrevnejših predelih sveta in sta posledici