

Received: 03.04.2018
Accepted: 29.10.2018
Published: 29.01.2019

Mysie modele choroby Parkinsona wywołane podwyższonym stężeniem α -synukleiny*

Murine models of Parkinson's disease caused by an increased concentration of α -synuclein

Adriana Wawer¹, Ilona Joniec-Maciejak¹, Anna Sznejder-Pachotek¹,
Dagmara Mirowska-Guzel^{1,2}

¹Katedra Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

²II Klinika Neurologii, Instytut Psychiatrii i Neurologii w Warszawie

Streszczenie

Choroba Parkinsona (chP) jest przewlekłą, postępującą chorobą neurodegeneracyjną ośrodkowego układu nerwowego. Przyczyny jej wystąpienia, mimo wielu lat badań, nadal nie są w pełni wyjaśnione. Głównym procesem patologicznym obserwowanym w chP jest degeneracja neuronów dopaminergicznych istoty czarnej i zmniejszenie stężenia dopaminy oraz jej metabolitów w prążkowie i zwojach podstawy. Obserwuje się zmniejszenie aktywności enzymów związanych z syntezą i metabolizmem dopaminy, m.in. hydroksylazy tyrozynowej. Procesowi neurodegeneracji towarzyszy rozwój reakcji zapalnej oraz powstawanie wtrętów wewnątrzneuronalnych, zwanych ciałami Lewy'ego, w skład których wchodzi przede wszystkim α -synukleina (ASN). Obecność ASN w ciałach Lewy'ego oraz powiązanie mutacji w genie kodującym ASN z rodzinną postacią choroby wskazuje na istotną rolę tego białka w patogenezie chP.

Alfa-synukleina jest małym białkiem obecnym w mózgu. W warunkach fizjologicznych jest zaangażowana m.in. w metabolizm dopaminy. Zmiany stężenia ASN spowodowane jej agregacją czy też związane z nadekspresją bądź obniżoną ekspresją mogą zaburzać funkcjonowanie układu dopaminergicznego powodując wystąpienie zmian neurodegeneracyjnych obserwowanych w przebiegu chP.

W pracy przedstawiono mysie modele chP wykorzystujące podwyższone stężenie ASN w mózgu. Opisano modele oparte na transgenicznym myszom, wektorach wirusowych zawierających gen ASN oraz takie, w których podwyższone stężenie ASN uzyskuje się przez domózgową podanie białka. Wymieniono zalety opracowanych modeli, ich liczne ograniczenia oraz podkreślono potrzebę dalszego poszukiwania idealnego modelu choroby.

Słowa kluczowe:

choroba Parkinsona • α -synukleina • neurodegeneracja • myszy transgeniczne

*Pracę wykonano w ramach Projektu Badawczego nr 1M9/PM2/16, finansowanego ze środków dotacji celowej MNiSW oraz grantu MNiSW, nr N N401 066638.

Temat badawczy realizowany z wykorzystaniem infrastruktury badawczej CePT, zakupionej ze środków Unii Europejskiej – Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, lata 2007-2013.

Summary

Parkinson's disease (PD) is a chronic, progressive neurodegenerative disease of central nervous system. Despite many years of research its pathogenesis remains elusive. The main pathological process observed in PD is the degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra and the reduction in the concentration of dopamine and its metabolites in the striatum and basal ganglia. In addition, a reduction in the activity of enzymes involved in the synthesis and metabolism of dopamine (e.g. tyrosine hydroxylase) is observed. The process of neurodegeneration is accompanied by the development of inflammatory reaction and the formation of intraneuronal inclusions - Lewy's bodies, which containing mainly of α -synuclein (ASN). The presence of ASN in Lewy bodies and the association of mutations in the gene encoding ASN with the familial form of the disease indicates the important role of this protein in the pathogenesis of PD.

ASN is a small protein widely distributed in the brain. Under physiological conditions it is involved, among others, in dopamine metabolism. Changes in ASN levels due to its aggregation, overexpression or decreased expression may disrupt dopaminergic system functions and contribute to the neurodegeneration process observed in PD.

Our paper is focused on murine ASN-based models of PD. In this review we describe models based on transgenic mice, viral vectors containing the ASN gene, and those in which elevated ASN levels are obtained by intracerebral protein administration. We briefly discuss the advantages of developed models and their numerous limitations. We also highlight the need for further search for the ideal disease model.

Keywords: Parkinson's disease • α -synuclein • neurodegeneration • transgenic mice

GICID: 01.3001.0012.9844
DOI: 10.5604/01.3001.0012.9844
Word count: 3005
Tables: 1
Figures: 1
References: 73

Adres autorki: dr n. med. Ilona Joniec-Maciejak, Katedra Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej, Centrum Badań Przedklinicznych i Technologii (CePT), Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1b, 02-097 Warszawa; e-mail: ilona.joniec@wum.edu.pl

Wykaz skrótów: **AAV** – wirusy związane z adenowirusami; **ASN** – α -synukleina; **chP** – choroba Parkinsona; **DA** – dopamina; **LB** – ciała Lewy'ego; **LN** – neuryty Lewy'ego; **LV** – lentiwirusy; **OUN** – ośrodkowy układ nerwowy; **PDGFB** – płytkopochodny czynnik wzrostu typu β (platelet-derived growth factor); **PrP** – białko prionowe; **SNCA** – gen kodujący α -synukleinę; **TH** – hydroksylaza tyrozynowa; **Thy-1** – czynnik różnicowania tymocytów (thymocyte differentiation antigen 1).

CHOROBA PARKINSONA

Choroba Parkinsona (chP) jest drugą, po chorobie Alzheimera, najczęściej występującą chorobą neurodegeneracyjną ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Szacuje się, że na świecie żyje około 10 milionów osób z chP [29].

W początkowym stadium choroby objawy występują w niewielkim nasileniu i są nieswoiste. Do klasycznych objawów klinicznych chP zalicza się m.in.: spowolnienie ruchowe, sztywność mięśniową, drżenie spoczynkowe. Charakterystyczne jest początkowo jednostronne

wystąpienie objawów, rozpoczynające się od drżenia jednej z kończyn górnych [32]. Objawom ruchowym mogą towarzyszyć objawy pozamotoryczne – depresja, otępienie czy nadmierna potliwość.

Chorobę rozpoznaje się na podstawie objawów klinicznych. Nie opracowano jeszcze testu diagnostycznego, który pozwoliłby jednoznacznie potwierdzić chP. Nie opracowano również leczenia przyczynowego, a stosowana farmakoterapia ma jedynie na celu spowolnić rozwój chP, złagodzić dolegliwości i poprawić jakość życia pacjentów.

Charakterystyczną cechą chP jest postępujące zwyrodnienie komórek dopaminergicznych szlaku nigrostriatalnego. Procesowi temu towarzyszy zmniejszenie stężenia dopaminy (DA) oraz jej metabolitów w prążkowie. Wraz z postępującą degeneracją neuronów dopaminergicznych szlaku nigrostriatalnego w cytozolu tych komórek pojawiają się białkowe wtręty tzw. ciała Lewy'ego (LB), a w obrębie wypustek neuronalnych neuryty Lewy'ego (LN). LB są okrągłymi kwasochłonnymi wtrętami, w skład których wchodzi głównie agregaty nieprawidłowo sfałdowanego białka fibrylarnego – α -synukleiny (ASN). Innymi składnikami LB są ubikwityna, białka neurofilamentów oraz alfa-B krystalina. LN są wrzecionowatymi lub nitkowatymi ciałami wtrętowymi zawierającymi ASN. LB i LN stwierdza się nie tylko w obszarze istoty czarnej, ale również w korze mózgowej, ciele migdałowatym, jądrach miejsca sinawego, a także w obwodowym układzie nerwowym. Ich umiejscowienie zależy od stadium rozwoju choroby: w fazie bezobjawowej obecność LB stwierdza się w rdzeniu przedłużonym, moście oraz w jądrze sinawym, a także w obrębie struktur drogi węchowej. W stadium 3 i 4 rozwoju choroby wg Braaka pojawiają się w istocie czarnej oraz jądrach nerwów językowo-gardłowego i błędnego, a w ostatnich stadiach rozwoju choroby (5 i 6) także w obrębie kory mózgu [8, 26, 55].

Degeneracji neuronów towarzyszy rozwój reakcji zapalnej – obserwuje się pobudzenie mikrogleju, astroglejozę, zwiększoną ekspresję czynników zapalnych [56]. Procesy te nasilają destrukcyjne zmiany w obrębie neuronów [28, 37]. Sugeruje się, że do zainicjowania i rozwoju procesów neurodegeneracyjnych może również prowadzić stres oksydacyjny i nitracyny [16, 20, 30, 34].

Mimo licznych badań mających na celu poznanie etiopatogenezy chP nadal nie wiadomo, jakie czynniki odpowiadają za zapoczątkowanie kaskady procesów wiodących do rozwoju choroby. Wiadomo, że w niektórych przypadkach jej podłoże jest genetyczne i wiąże się z mutacjami m.in. w genach ASN (SNCA), parkiny (PRKN) czy C-końcowej hydrolazy ubikwityny L1 (UCHL1) [13]. W innych przypadkach jako czynniki mogące mieć wpływ na zainicjowanie procesu neurodegeneracji wskazuje się m.in. stres oksydacyjny [16, 20], toksyny środowiskowe [4] oraz czynniki zapalne [28].

ALFA-SYNUKLEINA I JEJ ZWIĄZEK Z PATOGENEZĄ CHOROBY PARKINSONA

α -synukleina to fibrylarne białko o masie 14 kDa występujące w zakończeniach presynaptycznych oraz w błonach jądrowych neuronów [48]. Poza mózgiem obecność ASN stwierdza się również we krwi, głównie w erytrocytach [5], osoczu, płynie mózgowo-rdzeniowym, a także w mięśni sercowym [64]. W ostatnich latach wykazano, że ASN jest umiejscowiona w strukturze zwanej MAM (mitochondria-associated membrane), która stanowi połączenie retikulum endoplazmatycznego oraz błony zewnętrznej mitochondrium [25].

ASN po raz pierwszy wyizolowano w 1988 r. z narządu elektrycznego ryby z gatunku *Torpedo californica* [48]. Jednak dopiero w 1997 r. Polymeropoulos i wsp. powiązali jedną z mutacji występujących w genie SNCA (kodującym ASN) z chP [57], co dało początek licznym badaniom dotyczącym roli ASN w patogenezie tej choroby i innych synukleinopatii. W innych badaniach wykazano, że również multiplikacje genu SNCA czy zmiany w obrębie regionu promotorowego tego genu są związane z występowaniem chP [10, 35, 47, 67]. Dane te wskazują, że nie tylko mutacje w genie SNCA, ale również podwyższone stężenie ASN odgrywa ważną rolę w rozwoju chP.

Funkcje, jakie w warunkach fizjologicznych pełni ASN, nadal nie zostały w pełni poznane. W związku z występowaniem wysokich stężeń ASN w części presynaptycznej zakończeń nerwowych sugeruje się, że ASN jest zaangażowana w proces tworzenia synaps, regulację neuroprzebieżności [66], czy w kształtowanie plastyczności synaptycznej [21]. Potwierdzają to wyniki badań z wykorzystaniem myszy transgenicznych pozbawionych genu SNCA (SNCA^{-/-}). Abeliovich i wsp. wykazali, że u zwierząt tych dochodzi do zaburzeń w prawidłowej aktywności synaptycznej oraz regulacji neurotransmisji zależnej od DA [1].

Opublikowane dotychczas prace wskazują na istotną rolę ASN w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych. W badaniach *post mortem* u pacjentów wykazano m.in., że w strukturach mózgu objętych procesem neurodegeneracji w chP, otępieniu z ciałami Lewy'ego oraz w chorobie Alzheimera z ciałami Lewy'ego dochodzi do wzrostu ekspresji ASN na poziomie mRNA [62]. Udowodniono także, że w patologii tych dochodzi do nadmiernego uwalniania ASN do przestrzeni zewnątrzkomórkowej [36].

Toksyczne działanie ASN na neurony jest w bezpośredni sposób związane z przyjmowaniem przez to białko nieprawidłowej konformacji. Prowadzi to do oligomeryzacji ASN, a następnie do jej agregacji i tworzenia złogów w postaci LB i LN. Uważa się, że proces agregacji to może być mechanizm obronny komórki przed szkodliwym działaniem oligomerów ASN. Jednocześnie jednak powoduje powstanie nierozpuszczalnych złogów, powodujących prawdopodobnie mechaniczne uszkodzenia komórki [33]. Zagregowana ASN, ze względu na zmniejszoną biodostępność, nie może pełnić swoich fizjologicznych funkcji, co zaburza homeostazę układu dopaminergicznego i zmienia czynność synaps.

Do niedawna sądzono, że ASN naturalnie występuje w postaci monomerów, które w pewnych warunkach mogą oligomeryzować i przez dalszą agregację tworzyć złogi w formie LB i LN. Jednak autorzy opublikowanej w 2011 r. pracy wykazali, że w warunkach fizjologicznych dominującą postacią występowania ASN jest postać tetramerów o masie około 58 kDa. Zaobserwowali również, że ta postać ASN jest bardzo oporna na agregację. Do agregacji ASN miałyby zatem prowadzić uprzedni rozpad tetramerów do formy monomerów, które łatwo tworzą agregaty [6, 14].

Nie wszyscy się zgadzają z poglądami tych autorów [2, 9, 18], niemniej jednak w ostatnich latach potencjalna toksyczność monomerów ASN, w tym tych obecnych pozakomórkowo, jest poddawana intensywnym badaniom.

Wyniki Lee i wsp. uzyskane w badaniach prowadzonych na hodowlach komórkowych wskazują, że zewnątrzkomórkowe agregaty ASN mogą wnikać do komórek w procesie endocytozy, a tam podlegają szybkiej degradacji w lizosomach. Monomeryczne formy ASN mogą natomiast swobodnie przenikać przez błonę komórkową, ale nie są we wnętrzu komórki degradowane i mogą działać cytotoksycznie [40]. Pozakomórkowa ASN po wnikięciu do komórki może podlegać translokacji do mitochondriów, a jej postępująca akumulacja w tych organellach może zaburzać funkcjonowanie kompleksu I łańcucha oddechowego i zwiększać stres oksydacyjny w komórce [11, 15, 43]. Może to prowadzić do dysfunkcji mitochondriów, procesu, który ma ścisły związek z patogenezą chP [59].

Na nasilenie procesu agregacji ASN może mieć wpływ wiele czynników, w tym m.in. obecność modyfikacji potranslacyjnych w ASN czy mutacji w obrębie genu SNCA, stres oksydacyjny, inne białka neuronalne, katecholaminy (głównie DA). Podatność białka na agregację zwiększa się również ze wzrostem jego stężenia. Wykazano, że tworzenie agregatów *in vivo* jest związane z osiągnięciem przez ASN krytycznego stężenia w cytozolu [65]. Bartels i wsp. sugerują również, że za agregację ASN mogą być odpowiedzialne jeszcze dotychczas nieznane czynniki, które powodują destabilizację jej tetramerów [6].

MYSIE MODELE chP WYKORZYSTUJĄCE NADEKSPRESJĘ ASN

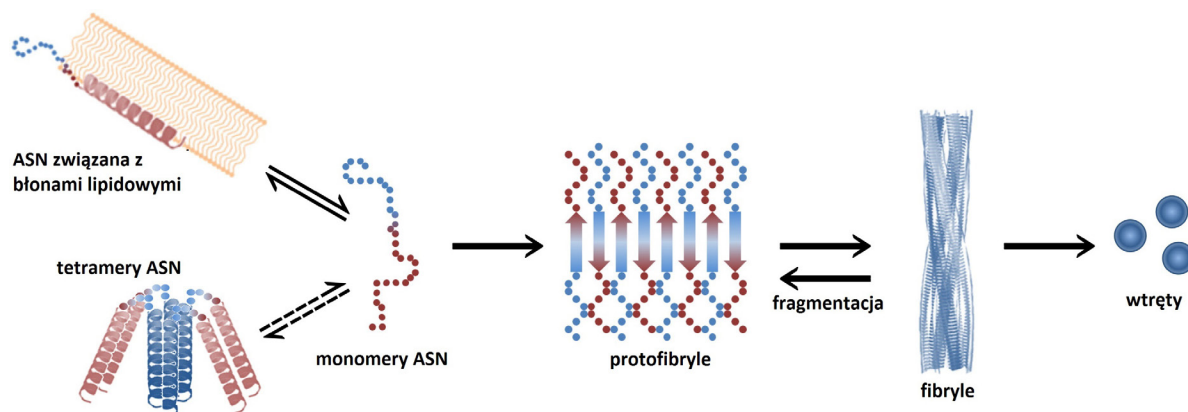
Do dokładnego poznania patogenezы wielu chorób bądź też do opracowywania nowych metod leczenia wykorzystywane są modele zwierzęce tych chorób. Powinny wykazywać podobieństwo pod względem zmian neurologicznych i behawioralnych do tych

obserwowanych u ludzi, a także podobnie odpowiadać na stosowaną farmakoterapię. W ostatnich latach prowadzonych jest bardzo wiele badań mających na celu stworzenie dobrego, zwierzęcego modelu, który najbardziej wiernie odzwierciedlałby patomechanizmy leżące u podłoża chP. Podejmowane są liczne próby wykorzystania w tym celu ASN (o budowie prawidłowej, z mutacjami takimi jak w rodzinnej postaci choroby bądź w postaci skróconej). Badania prowadzone są na różnorodnych organizmach, od *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* przez myszy, szczury aż do małp [71].

Idealny zwierzęcy model chP powinien charakteryzować się zależną od wieku postępującą neurodegeneracją oraz zaburzeniami ruchowymi. Procesowi neurodegeneracji powinna towarzyszyć utrata neuronów dopaminergicznych, zmniejszenie stężenia DA w prądkowiach oraz obecność agregatów ASN w neuronach i aksonach (LB i LN). Zaburzenia ruchowe powinny obejmować spowolnienie ruchowe odpowiadające na zastosowanie leków zwiększających stężenie DA. Jak dotąd, modele indukowane ASN nie dorównują modelom wywołanym toksynami pod względem fenotypowego podobieństwa do chP, ale stwarzają możliwość poszerzenia wiedzy na temat funkcjonowania mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój choroby.

Transgeniczne myszy z nadekspresją ASN

Nadekspresja ludzkiej ASN u myszy powoduje wystąpienie zróżnicowanych zaburzeń neuropatologicznych i behawioralnych. W mysich modelach możliwe jest uzyskanie ekspresji ASN do 30 razy wyższej od występującej fizjologicznie [19]. W tworzeniu linii myszy transgenicznych z nadekspresją ASN najważniejszy jest dobór odpowiedniego, charakterystycznego dla neuronów, promotora genu.



Ryc. 1. Proces agregacji ASN. W warunkach fizjologicznych ASN występuje w komórkach jako α -helikalne tetramery bądź w postaci związanej z fosfolipidami błonowymi. Pod wpływem nieznanych czynników dochodzi do rozpadu tetramerów do form monomerycznych. Monomery ASN mogą agregować tworząc początkowo rozpuszczalne protofibryle a następnie nierozpuszczalne fibryle, co prowadzi do powstawania w komórkach wtętwów – LB i LN (wg [12] zmodyfikowano)

W tworzeniu pierwszych linii transgenicznych myszy z nadekspresją ludzkiej ASN wykorzystano promotor genu płytkopochodnego czynnika wzrostu typu β (PDGF β , platelet-derived growth factor). Myszy te wykazywały zwiększoną ekspresję ASN w obrębie całego mózgu i w wieku 12 miesięcy miały obniżoną aktywność enzymu kluczowego w syntezie DA - hydroksylazy tyrozynowej (TH) i niższe w porównaniu do kontroli stężenia DA w prążkowie. Stwierdzono również obecność agregatów ASN w neuronach i komórkach gleju. Agregaty te zaobserwowano już u 2-miesięcznych myszy z tej linii, a z upływem czasu rosła ich średnica (0,1-0,25 μ m u 2-miesięcznych myszy do 2-5 μ m u 11-miesięcznych myszy). W modelu tym nie zaobserwowano jednak występowania procesu neurodegeneracji [49]. W porównaniu z promotorem PDGF β , w modelach wykorzystujących promotor czynnika różnicowania tymocytów (Thy-1, thymocyte differentiation antygen-1) stwierdzono bardziej nasiloną ekspresję białka w neuronach, bez akumulacji ASN w komórkach gleju [7, 63, 72]. Lam i wsp. wykazali również zmniejszenie stężenia DA i innych amin katecholowych oraz ekspresji TH u 14-miesięcznych myszy z nadekspresją ludzkiej ASN pod kontrolą promotora Thy-1 [38].

W kilku badaniach wykorzystano też promotor TH, który wpływa na stałą ekspresję genu ASN w obrębie istoty czarnej. W nadekspresji ASN o prawidłowej budowie pod kontrolą tego promotora stwierdzono występowanie wtrętów neuronalnych, ale bez towarzyszącej śmierci neuronów. W badaniach nad zmutowanymi postaciami ASN – A30P, A53T – wykazano większe spadki stężenia DA w prążkowie (u myszy w wieku 13-23 miesięcy), występowanie zmian w motoryce zwierząt (u myszy 7-9-miesięcznych oraz 13-23 miesięcznych), ale nie stwierdzono akumulacji ASN w postaci złożeń [7].

Stworzono również linie transgenicznych myszy z nadekspresją ASN pod kontrolą mysiego promotora białka prionowego (PrP). U myszy tych obserwowano utratę neuronów (z wyjątkiem dopaminergicznych) oraz zaburzenia czynności mitochondriów. W niektórych modelach wykazano także występowanie wtrętów z ASN podobnych do LB. Nie obserwowano znaczącego zmniejszenia stężenia DA [22, 23, 41]. Testowano także możliwość wykorzystania chomiczego promotora PrP do uzyskania nadekspresji dzikiej postaci ASN bądź ekspresji zmutowanego białka (A53T i A30P). W przypadku tego promotora jedynie myszy z bardzo wysoką ekspresją zmutowanej postaci A30P (linia 5093) wykazywały szybko postępujące zaburzenia motoryczne w wieku 4-7 miesięcy (homozygoty) lub 8-16 miesięcy (heterozygoty), ale bez uszkodzeń neuronów szlaku nigrostriatalnego czy złożeń ASN [24].

Opisano również linię transgenicznych myszy z ekspresją mutacji E46K – myszy te od około 16 miesiąca życia wykazywały zależne od wieku upośledzenie sprawności ruchowej oraz wtręty w neuronach przypominające LB. Model ten cechuje również obecność wtrętów składających się z białka tau [17].

Stworzono także transgeniczne myszy, u których ekspresję pełnego ludzkiego locus genu SNCA osiągnięto dzięki zastosowaniu sztucznego chromosomu bakteryjnego (bacterial artificial chromosome). Myszy te w wieku 18 miesięcy tracą 30% neuronów dopaminergicznych oraz cechują się występowaniem zaburzeń lokomotorycznych, nie stwierdzono u nich jednak obecności wtrętów z ASN [31].

W celu indukcji i przyspieszenia procesu agregacji ASN zaczęto tworzyć linie transgenicznych myszy z ekspresją skróconej formy ASN (białko pozbawione frag-

Tabela 1. Najczęściej stosowane zwierzęce modele chP z wykorzystaniem transgenicznych myszy

Promotor genu	Transgen – rodzaj ASN	Zmiany morfologiczne	Zmiany biochemiczne i motoryczne	Piśmiennictwo
PDGF- β	WT	obecność ciał wtrętowych (Ub, ASN +)	↓ TH i gęstości zakończeń nerwowych w prążkowie ↓ aktywności lokomotorycznej	[39]
mThy-1	A30P	wtręty przypominające ciała Lewy'ego (fibryle)	zmiany prowadzące do paraliżu zwierząt (8-12 miesięcy)	[42]
mPrP	A53T	obecność ciał wtrętowych, utrata neuronów w pniu mózgu i rdzeniu kręgowym		[15, 16, 32]
Rat TH	A30P/A53T	postępująca utrata neuronów dopaminergicznych, ↑ presynaptycznego DAT	↓ aktywności lokomotorycznej (13-23 miesięcy), ↓ DA i jej metabolitów	[50]
CamKII-tTA (tet-off)	WT, A53T	kondensacja mitochondriów, degeneracja komórek w istocie czarnej i hipokampie (WT ASN)	↓ DA i serotoniny w opuszkach węchowych	[43]

mentu domeny C-końcowej). Ma to związek z tym, że C-końcowy fragment białka hamuje jego agregację [51], taka skrócona forma ASN była wykrywana w mózgach pacjentów z chP czy też demencją z ciałami Lewy'ego [3, 42, 58]. U transgenicznych myszy szczepu C57Bl/6 z ekspresją 1-120 ASN pod kontrolą promotora TH wykazano akumulację ASN w ciałach komórkowych i neurytach. Zaobserwowano także istotne statystycznie zmniejszenie stężenia DA i jej metabolitu - kwasu homowanilinoowego w prążkowie u myszy w wieku 3, 6, 9 i 12 miesięcy. Nie odnotowano jednak zmniejszenia liczby komórek TH-pozytywnych w obrębie istoty czarnej [70].

Wektory wirusowe zawierające gen ASN

Opracowanie wydajnych metod otrzymywania rekombinowanych wektorów wirusowych umożliwiło transfer *in vivo* konkretnych genów do odpowiednich typów komórek. Poszerzyło to możliwości badawcze, a stereotaktyczne podania wektora wirusowego zawierającego gen ASN stały się sposobem indukcji modelu chP. Do transferu genu można wykorzystać, w zależności od wielkości transgeny i celu eksperymentu, różne rodzaje wirusów. Najczęściej są to lentiwirusy (LV) oraz rekombinowane wirusy związane z adenowirusami (AAV). Wykorzystanie wektorów opartych na tych wirusach umożliwia efektywny transfer i długotrwałą ekspresję transgeny w mózgu. Jest to szybszy sposób wywołania nadekspresji ASN niż tworzenie linii transgenicznych zwierząt i umożliwia ocenę zmian wywołanych akumulacją białka w mózgu dorosłego osobnika, z pominięciem możliwych mechanizmów kompensacji rozwojowych. Niedogodnością jest konieczność wykonywania bardzo precyzyjnych podań stereotaktycznych.

Główną różnicą, jaką obserwuje się między wektorami LV i AAV jest mniejszy tropizm wektorów LV do komórek dopaminergicznych. Przekłada się to na maksymalną wydajność transdukcji, która dla wektorów LV wynosi prawie 50%, a dla wektorów AAV 80-90%. Stwierdzano większy stopień neurodegeneracji w modelach wykorzystujących wektory AAV (zmniejszenie liczby komórek rdzędu 50-80%) niż wektory LV (około 30%) [44].

Transfer genu ASN za pomocą wektorów wirusowych jest wykorzystywany głównie do tworzenia szczurzych i małych modeli chP, co jest najpewniej związane z tym, że łatwiej jest u tych zwierząt wykonać precyzyjne podania stereotaktyczne. Zaledwie w kilku pracach wykorzystano tę metodę u myszy. Po domózgowym podaniu wektora wirusowego z genem ASN, u myszy obserwuje się wolniejszy rozwój zmian neurodegeneracyjnych i mniejszy ubytek neuronów dopaminergicznych w porównaniu do modeli szczurzych [39, 68].

W badaniach z wykorzystaniem wektora LV do transferu genu ludzkiej ASN z mutacją A30P do istoty czarnej myszy po 10-12 miesiącach od podania wektora stwierdzono 10-25% spadek liczby neuronów dopaminergicznych. W istocie czarnej wykazano obecność wtrętów

o strukturze granularnej składających się z ASN. Zaobserwowany proces neurodegeneracji nie dotyczył tylko istoty czarnej, ale obejmował również prążkowie i jądro migdałowe [39].

Martin i wsp. w badaniach z wykorzystaniem wektora AAV z genem kodującym ASN, u 3-4-miesięcznych myszach szczepu C57Bl, zaobserwowali po 24 tygodniach od podania wektora spadek liczby neuronów dopaminergicznych prawie o 25% [68]. Przeprowadzono również badania mające na celu analizę skutków stereotaktycznego podania do istoty czarnej wektora AAV kodującego ludzką ASN z wektorem AAV kodującym ASN z mutacją A53T. W obu przypadkach stwierdzono występowanie agregatów ASN oraz nasilający się wraz z upływem czasu proces neurodegeneracji, wyrażający się zmniejszeniem liczby neuronów dopaminergicznych [54].

Domózgowe podania ASN

Podjęto również kilka prób stworzenia modelu chP wywołanego domózgowym podaniem białka ASN. Służą one głównie do badań nad prionopodobnym szerzeniem się patologicznych form ASN w OUN. Od kilku lat prace badawcze nad tym prowadzi m.in. Luk i wsp. Wykorzystują myszy transgeniczne linii TgM83 z nadekspresją ludzkiej ASN z mutacją A53T. Linia ta charakteryzuje się występowaniem u starych myszy (8-12-miesięcznych) objawów neuropatologicznych charakterystycznych dla chP, połączonych z obecnością nierozpuszczalnych złożeń, w skład których wchodzi zagregowana ASN. Zespół podawał młodym myszom linii TgM83 (osobniki 2-5-miesięczne) homogenaty sporządzone z mózgow starych myszy (12-miesięcznych) bądź roztwór ASN, inkubowany wcześniej w 37°C przez 5 dni w celu agregacji ASN do fibryli [46]. W obu przypadkach wykazano rozprzestrzenianie się w OUN patologicznych form ASN i skrócenie czasu przeżycia myszy otrzymujących ASN w stosunku do grup kontrolnych. Zespół wykonał również badania, w których roztwór zawierający fibryle ASN był podawany do prążkowie myszom szczepu C57Bl. Wykazano, że po jednorazowym podaniu fibryli ASN pojawia się postępująca w czasie agregacja ASN w obrębie całego mózgu. Procesowi temu towarzyszyło wystąpienie zmian neurodegeneracyjnych w obrębie układu dopaminergicznego. Stwierdzono istotny statystycznie spadek liczby komórek TH-pozytywnych w istocie czarnej oraz zmniejszenie ekspresji białka TH po 180 dniach od podania fibryli ASN, a także spadek stężenia DA w prążkowie po 90 i 180 dniach od podania. Odnotowano również obniżenie sprawności motorycznej myszy badanej za pomocą testu Rotarod po 180 dniach od podania fibryli ASN. W innym badaniu ci sami autorzy wykorzystali monomeryczną formę ASN podając ją do prążkowie. Nie odnotowali jednak występowania żadnych zmian patologicznych. Warto jednak zaznaczyć, że w tym doświadczeniu liczebność grup była bardzo ograniczona (1 do 3 myszy w jednym punkcie czasowym) [45].

Masuda-Suzukake i wsp. w badaniach na myszach szczepu C57Bl podawali fibryle ASN do 3 obszarów mózgu: istoty czarnej, prążkowiec oraz kory śródwłochowej. Wykazano, że obszary objęte występowaniem zmian patologicznych różnią się w zależności od miejsca podania i często są umiejscowione w odległych od podania miejscach. Wykazano istotne statystycznie obniżenie sprawności motorycznej myszy po 3 miesiącach od podania fibryli ASN do prążkowiec bądź istoty czarnej. Zespół podawał również roztwór zawierający fibryle ASN doustnie oraz dootrzewnowo, ale ani po 6, ani po 14 miesiącach od podania nie zaobserwował występowania zmian patologicznych w OUN [50].

Wyniki tych badań sugerują, że patologiczne formy ASN mogą się rozprzestrzeniać w mózgu podobnie do prionów. Można wnioskować, że zagregowana ASN może być transportowana z komórki do komórki i inicjować postępującą agregację prowadzącą do powstania LB i LN [27, 60].

W ostatnich latach w Katedrze Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego są prowadzone prace nad nowym mysim modelem chP, wykorzystującym podwyższone stężenie ASN w obrębie struktur układu nigrostriatalnego u myszy szczepu C57Bl/10 Tar. Zwiększone stężenie tego białka uzyskiwane jest w wyniku stereotaktycznych podań ASN do różnych struktur OUN. Badania mają na celu określenie wpływu zwiększonego stężenia monomerów ludzkiego białka ASN na stopień pobudzenia komórek gleju (mikrogleju i astrocytów) oraz zainicjowania i rozwoju procesu neurodegeneracji neuronów dopaminergicznych w obrębie układu nigrostriatalnego. Otrzymane do tej pory wyniki potwierdzają toksyczny

wpływ monomerów ASN na komórki dopaminergiczne (zmniejszenie gęstości komórek TH-pozytywnych w istocie czarnej) oraz wykazują istnienie zmian w stężeniach metabolitów DA w prążkowiec, bez istotnych różnic w stężeniu DA czy na ekspresji genu TH [73]. Wykazano, że zachwianie równowagi między stężeniami neuroprzekazników w OUN wywołane podaniem ASN zaburza motorykę zwierząt, ocenianą za pomocą testu Rotarod - zaobserwowano skrócenie czasu przebywania myszy na obracającym się walcu po 4 tygodniach od podania ASN do istoty czarnej oraz po 12 tygodniach od podania ASN do prążkowiec. Pod wpływem zwiększonego stężenia monomerów ASN zaobserwowano także zainicjowanie reakcji zapalnej (zaobserwowano zwiększony naciek limfocytów CD4⁺, CD8⁺ CD3⁺ w obrębie badanych struktur), jak również pobudzenie komórek mikro- i astrogleju. Podobnych zmian nie zaobserwowano w grupie kontrolnej (stereotaktyczna iniekcja NaCl do wybranych obszarów śródmózgowia) [69]. Wydaje się, że stwierdzone w prowadzonych badaniach zmiany mogą odzwierciedlać procesy, które przebiegają na bardzo wczesnym etapie rozwoju chP i prowadzą do postępującej neurodegeneracji szlaku nigrostriatalnego.

PODSUMOWANIE

Opracowano już bardzo wiele zwierzęcych modeli chP, niestety są one dalekie od modelu idealnego, a w związku z tym ich zastosowanie w badaniach nad etiopatogenezą choroby czy opracowywaniem nowych terapii jest mocno ograniczone. Żaden z nich nie odzwierciedla w pełni wszystkich cech charakterystycznych dla tego schorzenia. W związku z tym istnieje potrzeba poszukiwania nowego, doskonalszego modelu choroby.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Abeliovich A., Schmitz Y., Farinas I., Choi-Lundberg D., Ho W.H., Castillo P.E., Shinsky N., Verdugo J.M., Armanini M., Ryan A., Hynes M., Phillips H., Sulzer D., Rosenthal A.: Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron*, 2000; 25: 239-252
- [2] Alderson T.R., Markley J.L.: Biophysical characterization of alpha-synuclein and its controversial structure. *Intrinsically Disord. Proteins*, 2013; 1: 18-39
- [3] Baba M., Nakajo S., Tu P.H., Tomita T., Nakaya K., Lee V.M., Trojanowski J.Q., Iwatsubo T.: Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am. J. Pathol.*, 1998; 152: 879-884
- [4] Baltazar M.T., Dinis-Oliveira R.J., de Lourdes Bastos M., Tsatsakis A.M., Duarte J.A., Carvalho F.: Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases - a mechanistic approach. *Toxicol. Lett.*, 2014; 230: 85-103
- [5] Barbour R., Kling K., Anderson J.P., Banducci K., Cole T., Diep L., Fox M., Goldstein J.M., Soriano F., Seubert P., Chilcote T.J.: Red blood cells are the major source of alpha-synuclein in blood. *Neurodegener. Dis.*, 2008; 5: 55-59
- [6] Bartels T., Choi J.G., Selkoe D.J.: alpha-Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature*, 2011; 477: 107-110
- [7] Bezard E., Yue Z., Kirik D., Spillantini M.G.: Animal models of Parkinson's disease: limits and relevance to neuroprotection studies. *Mov. Disord.*, 2013; 28: 61-70
- [8] Braak H., Del Tredici K., Rub U., de Vos R.A., Jansen Steur E.N., Braak E.: Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging*, 2003; 24: 197-211
- [9] Burre J., Vivona S., Diao J., Sharma M., Brunger A.T., Sudhof T.C.: Properties of native brain alpha-synuclein. *Nature*, 2013; 498: E4-E6
- [10] Chiba-Falek O., Touchman J.W., Nussbaum R.L.: Functional analysis of intra-allelic variation at NACP-Rep1 in the alpha-synuclein gene. *Hum. Genet.*, 2003; 113: 426-431
- [11] Cole N.B., Dieuliis D., Leo P., Mitchell D.C., Nussbaum R.L.: Mitochondrial translocation of alpha-synuclein is promoted by intracellular acidification. *Exp. Cell Res.*, 2008; 314: 2076-2089
- [12] Cox D., Carver J.A., Ecroyd H.: Preventing alpha-synuclein aggregation: The role of the small heat-shock molecular chaperone proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 2014; 1842: 1830-1843
- [13] Dauer W., Przedborski S.: Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, 2003; 39: 889-909
- [14] Dettmer U., Newman A.J., Luth E.S., Bartels T., Selkoe D.: In vivo cross-linking reveals principally oligomeric forms of alpha-

-synuclein and beta-synuclein in neurons and non-neural cells. *J. Biol. Chem.*, 2013; 288: 6371-6385

[15] Devi L., Raghavendran V., Prabhu B.M., Avadhani N.G., Anandatheerthavarada H.K.: Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 9089-9100

[16] Dias V., Junn E., Mouradian M.M.: The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *J. Parkinsons Dis.*, 2013; 3: 461-491

[17] Emmer K.L., Waxman E.A., Covy J.P., Giasson B.I.: E46K human alpha-synuclein transgenic mice develop Lewy-like and tau pathology associated with age-dependent, detrimental motor impairment. *J. Biol. Chem.*, 2011; 286: 35104-35118

[18] Fauvet B., Mbefo M.K., Fares M.B., Desobry C., Michael S., Ardah M.T., Tsika E., Coune P., Prudent M., Lion N., Eliezer D., Moore D.J., Schneider B., Aebischer P., El-Agnaf O.M., Masliah E., Lashuel H.A.: alpha-Synuclein in central nervous system and from erythrocytes, mammalian cells, and *Escherichia coli* exists predominantly as disordered monomer. *J. Biol. Chem.*, 2012; 287: 15345-15364

[19] Fleming S.M., Fernagut P.O., Chesselet M.F.: Genetic mouse models of parkinsonism: Strengths and limitations. *NeuroRx*, 2005; 2: 495-503

[20] Gaki G.S., Papavassiliou A.G.: Oxidative stress-induced signaling pathways implicated in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neuromolecular Med.*, 2014; 16: 217-230

[21] George J.M., Jin H., Woods W.S., Clayton D.F.: Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch. *Neuron*, 1995; 15: 361-372

[22] Giasson B.I., Duda J.E., Quinn S.M., Zhang B., Trojanowski J.Q., Lee V.M.: Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein. *Neuron*, 2002; 34: 521-533

[23] Gispert S., Del Turco D., Garrett L., Chen A., Bernard D.J., Hamm-Clement J., Korf H.W., Deller T., Braak H., Auburger G., Nussbaum R.L.: Transgenic mice expressing mutant A53T human alpha-synuclein show neuronal dysfunction in the absence of aggregate formation. *Mol. Cell. Neurosci.*, 2003; 24: 419-429

[24] Gomez-Isla T., Irizarry M.C., Mariash A., Cheung B., Soto O., Schrupp S., Söndel J., Kotilinek L., Day J., Schwarzschild M.A., Cha J.H., Newell K., Miller D.W., Ueda K., Young A.B., Hyman B.T., Ashe K.H.: Motor dysfunction and gliosis with preserved dopaminergic markers in human alpha-synuclein A30P transgenic mice. *Neurobiol. Aging*, 2003; 24: 245-258

[25] Guardia-Laguarta C., Area-Gomez E., Rub C., Liu Y., Magrane J., Becker D., Voos W., Schon E.A., Przedborski S.: alpha-Synuclein is localized to mitochondria-associated ER membranes. *J. Neurosci.*, 2014; 34: 249-259

[26] Halliday G.M., Del Tredici K., Braak H.: Critical appraisal of brain pathology staging related to presymptomatic and symptomatic cases of sporadic Parkinson's disease. *J. Neural Transm. Suppl.*, 2006; 70: 99-103

[27] Herva M.E., Spillantini M.G.: Parkinson's disease as a member of prion-like disorders. *Virus Res.*, 2015; 207: 38-46

[28] Hirsch E.C., Hunot S., Damier P., Faucheux B.: Glial cells and inflammation in Parkinson's disease: a role in neurodegeneration? *Ann. Neurol.*, 1998; 44: S115-S120

[29] Hirtz D., Thurman D.J., Gwinn-Hardy K., Mohamed M., Chaudhuri A.R., Zaslutsky R.: How common are the "common" neurologic disorders? *Neurology*, 2007; 68: 326-337

[30] Hunot S., Boissiere F., Faucheux B., Brugg B., Mouatt-Prigent A., Agid Y., Hirsch E.C.: Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Neuroscience*, 1996; 72: 355-363

[31] Janezic S., Threlfell S., Dodson P.D., Dowie M.J., Taylor T.N., Potgieter D., Parkkinen L., Senior S.L., Anwar S., Ryan B., Deltheil T., Kosillo P., Cioroch M., Wagner K., Ansorge O., Bannerman D.M., Bolam J.P., Magill P.J., Cragg S.J., Wade-Martins R.: Deficits in dopaminergic transmission precede neuron loss and dysfunction in a new Parkinson model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013; 110: E4016-E4025

[32] Jankovic J.: Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 2008; 79: 368-376

[33] Jellinger K.A.: Recent developments in the pathology of Parkinson's disease. *J. Neural Transm. Suppl.*, 2002; 62: 347-376

[34] Jenner P.: Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. *Mov. Disord.*, 1998; 13, Suppl. 1: 24-34

[35] Kay D.M., Factor S.A., Samii A., Higgins D.S., Griffith A., Roberts J.W., Leis B.C., Nutt J.G., Montimurro J.S., Keefe R.G., Atkins A.J., Yearout D., Zabetian C.P., Payami H.: Genetic association between alpha-synuclein and idiopathic Parkinson's disease. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.*, 2008; 147b: 1222-1230

[36] Kazmierczak A., Adamczyk A., Benigna-Strosznajder J.: Znaczenie zewnątrzkomórkowej α -synukleiny w molekularnych mechanizmach śmierci komórek. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2013; 67: 1047-1057

[37] Kreutzberg G.W.: Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.*, 1996; 19: 312-318

[38] Lam H.A., Wu N., Cely I., Kelly R.L., Hean S., Richter F., Magen I., Cepeda C., Ackerson L.C., Walwyn W., Masliah E., Chesselet M.F., Levine M.S., Maidment N.T.: Elevated tonic extracellular dopamine concentration and altered dopamine modulation of synaptic activity precede dopamine loss in the striatum of mice overexpressing human alpha-synuclein. *J. Neurosci. Res.*, 2011; 89: 1091-1102

[39] Lauwers E., Debyser Z., Van Dorpe J., De Strooper B., Nuttin B., Baekelandt V.: Neuropathology and neurodegeneration in rodent brain induced by lentiviral vector-mediated overexpression of alpha-synuclein. *Brain Pathol.*, 2003; 13: 364-372

[40] Lee H.J., Suk J.E., Bae E.J., Lee J.H., Paik S.R., Lee S.J.: Assembly-dependent endocytosis and clearance of extracellular alpha-synuclein. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2008; 40: 1835-1849

[41] Lee M.K., Stirling W., Xu Y., Xu X., Qui D., Mandir A.S., Dawson T.M., Copeland N.G., Jenkins N.A., Price D.L.: Human alpha-synuclein-harboring familial Parkinson's disease-linked Ala-53 --> Thr mutation causes neurodegenerative disease with alpha-synuclein aggregation in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 8968-8973

[42] Li W., West N., Colla E., Pletnikova O., Troncoso J.C., Marsh L., Dawson T.M., Jakala P., Hartmann T., Price D.L., Lee M.K.: Aggregation promoting C-terminal truncation of alpha-synuclein is a normal cellular process and is enhanced by the familial Parkinson's disease-linked mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005; 102: 2162-2167

[43] Liu G., Zhang C., Yin J., Li X., Cheng F., Li Y., Yang H., Ueda K., Chan P., Yu S.: alpha-Synuclein is differentially expressed in mitochondria from different rat brain regions and dose-dependently down-regulates complex I activity. *Neurosci. Lett.*, 2009; 454: 187-192

[44] Low K., Aebischer P.: Use of viral vectors to create animal models for Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.*, 2012; 48: 189-201

[45] Luk K.C., Kehm V., Carroll J., Zhang B., O'Brien P., Trojanowski J.Q., Lee V.M.: Pathological alpha-synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science*, 2012; 338: 949-953

[46] Luk K.C., Kehm V.M., Zhang B., O'Brien P., Trojanowski J.Q., Lee V.M.: Intracerebral inoculation of pathological alpha-synuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative alpha-synucleinopathy in mice. *J. Exp. Med.*, 2012; 209: 975-986

- [47] Maraganore D.M., de Andrade M., Elbaz A., Farrer M.J., Ioannidis J.P., Kruger R., Rocca W.A., Schneider N.K., Lesnick T.G., Lincoln S.J., Hulihan M.M., Aasly J.O., Ashizawa T., Chartier-Harlin M.C., Checkoway H. i wsp.: Collaborative analysis of alpha-synuclein gene promoter variability and Parkinson disease. *JAMA*, 2006; 296: 661-670
- [48] Maroteaux L., Campanelli J.T., Scheller R.H.: Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J. Neurosci.*, 1988; 8: 2804-2815
- [49] Masliah E., Rockenstein E., Veinbergs I., Mallory M., Hashimoto M., Takeda A., Sagara Y., Sisk A., Mucke L.: Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science*, 2000; 287: 1265-1269
- [50] Masuda-Suzukake M., Nonaka T., Hosokawa M., Kubo M., Shimozawa A., Akiyama H., Hasegawa M.: Pathological alpha-synuclein propagates through neural networks. *Acta Neuropathol. Commun.*, 2014; 2: 88
- [51] Murray I.V., Giasson B.I., Quinn S.M., Koppaka V., Axelsen P.H., Ischiropoulos H., Trojanowski J.Q., Lee V.M.: Role of alpha-synuclein carboxy-terminus on fibril formation in vitro. *Biochemistry*, 2003; 42: 8530-8540
- [52] Neumann M., Kahle P.J., Giasson B.I., Ozmen L., Borroni E., Sporens W., Muller V., Odoj S., Fujiwara H., Hasegawa M., Iwatsubo T., Trojanowski J.Q., Kretschmar H.A., Haass C.: Misfolded proteinase K-resistant hyperphosphorylated alpha-synuclein in aged transgenic mice with locomotor deterioration and in human alpha-synucleinopathies. *J. Clin. Invest.*, 2002; 110: 1429-1439
- [53] Nuber S., Petrasch-Parwez E., Winner B., Winkler J., von Horsten S., Schmidt T., Boy J., Kuhn M., Nguyen H.P., Teismann P., Schulz J.B., Neumann M., Pichler B.J., Reischl G., Holzmann C. i wsp.: Neurodegeneration and motor dysfunction in a conditional model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.*, 2008; 28: 2471-2484
- [54] Oliveras-Salva M., Van der Perren A., Casadei N., Stroobants S., Nuber S., D'Hooge R., Van den Haute C., Baekelandt V.: rAAV2/7 vector-mediated overexpression of alpha-synuclein in mouse substantia nigra induces protein aggregation and progressive dose-dependent neurodegeneration. *Mol. Neurodegener.*, 2013; 8: 44
- [55] Ozansoy M., Basak A.N.: The central theme of Parkinson's disease: alpha-synuclein. *Mol. Neurobiol.*, 2013; 47: 460-465
- [56] Perry V.H., Andersson P.B.: The inflammatory response in the CNS. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 1992; 18: 454-459
- [57] Polymeropoulos M.H., Lavedan C., Leroy E., Ide S.E., Dehejia A., Dutra A., Pike B., Root H., Rubenstein J., Boyer R., Stenroos E.S., Chandrasekharappa S., Athanassiadou A., Papapetropoulos T., Johnson W.G. i wsp.: Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 1997; 276: 2045-2047
- [58] Prasad K., Beach T.G., Hedreen J., Richfield E.K.: Critical role of truncated alpha-synuclein and aggregates in Parkinson's disease and incidental Lewy body disease. *Brain Pathol.*, 2012; 22: 811-825
- [59] Ramsey C.P., Giasson B.I.: Role of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: Implications for treatment. *Drugs Aging*, 2007; 24: 95-105
- [60] Recasens A., Dehay B.: Alpha-synuclein spreading in Parkinson's disease. *Front. Neuroanat.*, 2014; 8: 159
- [61] Richfield E.K., Thiruchelvan M.J., Cory-Slechta D.A., Wuertzer C., Gainetdinov R.R., Caron M.G., Di Monte D.A., Federoff H.J.: Behavioral and neurochemical effects of wild-type and mutated human alpha-synuclein in transgenic mice. *Exp. Neurol.*, 2002; 175: 35-48
- [62] Rockenstein E., Hansen L.A., Mallory M., Trojanowski J.Q., Galasko D., Masliah E.: Altered expression of the synuclein family mRNA in Lewy body and Alzheimer's disease. *Brain Res.*, 2001; 914: 48-56
- [63] Rockenstein E., Mallory M., Hashimoto M., Song D., Shults C.W., Lang I., Masliah E.: Differential neuropathological alterations in transgenic mice expressing alpha-synuclein from the platelet-derived growth factor and Thy-1 promoters. *J. Neurosci. Res.*, 2002; 68: 568-578
- [64] Shin E.C., Cho S.E., Lee D.K., Hur M.W., Paik S.R., Park J.H., Kim J.: Expression patterns of alpha-synuclein in human hematopoietic cells and in *Drosophila* at different developmental stages. *Mol. Cells*, 2000; 10: 65-70
- [65] Shtilerman M.D., Ding T.T., Lansbury P.T.Jr.: Molecular crowding accelerates fibrillization of alpha-synuclein: could an increase in the cytoplasmic protein concentration induce Parkinson's disease? *Biochemistry*, 2002; 41: 3855-3860
- [66] Sidhu A., Wersinger C., Vernier P.: Does alpha-synuclein modulate dopaminergic synaptic content and tone at the synapse? *FASEB J.*, 2004; 18: 637-647
- [67] Singleton A.B., Farrer M., Johnson J., Singleton A., Hague S., Kachergus J., Hulihan M., Peuralinna T., Dutra A., Nussbaum R., Lincoln S., Crawley A., Hanson M., Maraganore D., Adler C. i wsp.: Alpha-synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science*, 2003; 302: 841
- [68] St Martin J.L., Klucken J., Outeiro T.F., Nguyen P., Keller-McGandy C., Cantuti-Castelvetri I., Grammatopoulos T.N., Standaert D.G., Hyman B.T., McLean P.J.: Dopaminergic neuron loss and up-regulation of chaperone protein mRNA induced by targeted over-expression of alpha-synuclein in mouse substantia nigra. *J. Neurochem.*, 2007; 100: 1449-1457
- [69] Szejder-Pacholek A., Joniec-Maciejak I., Wawer A., Ciesielska A., Mirowska-Guzel D.: The effect of alpha-synuclein on gliosis and IL-1alpha, TNFalpha, IFNgamma, TGFbeta expression in murine brain. *Pharmacol. Rep.*, 2017; 69: 242-251
- [70] Tofaris G.K., Garcia Reitböck P., Humby T., Lambourne S.L., O'Connell M., Ghetti B., Gossage H., Emson P.C., Wilkinson L.S., Goedert M., Spillantini M.G.: Pathological changes in dopaminergic nerve cells of the substantia nigra and olfactory bulb in mice transgenic for truncated human alpha-synuclein(1-120): implications for Lewy body disorders. *J. Neurosci.*, 2006; 26: 3942-3950
- [71] Ulusoy A., Di Monte D.A.: alpha-Synuclein elevation in human neurodegenerative diseases: experimental, pathogenetic, and therapeutic implications. *Mol. Neurobiol.*, 2013; 47: 484-494
- [72] van der Putten H., Wiederhold K.H., Probst A., Barbieri S., Mistl C., Danner S., Kauffmann S., Hofele K., Spooren W.P., Ruegg M.A., Lin S., Caroni P., Sommer B., Tolnay M., Bilbe G.: Neuropathology in mice expressing human alpha-synuclein. *J. Neurosci.*, 2000; 20: 6021-6029
- [73] Wawer A., Joniec-Maciejak I., Szejder-Pacholek A., Schwenkgrub J., Ciesielska A., Mirowska-Guzel D.: Exogenous alpha-synuclein monomers alter dopamine metabolism in murine brain. *Neurochem. Res.*, 2016; 41: 2102-2109

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.