

# O KIEM RYBY – NOWE SPOJRZENIE NA ROZWÓJ SIECI NEURONALNYCH I CHOROBY NEUROROZWOJOWE



Magdalena Kędra, Jacek Jaworski, Justyna Zmorzyńska\* (Warszawa)

## Streszczenie

Komórki nerwowe, będące podstawową jednostką funkcjonalną układu nerwowego, łączą się we współpracujące zespoły, zwane sieciami neuronalnymi. Ich powstawanie jest złożonym i ściśle kontrolowanym procesem, który dopiero od niedawna możemy badać równocześnie na wielu poziomach w żywych organizmach dzięki postępowi technicznemu i zastosowaniu nowych modeli badawczych. Dobrym przykładem takiego modelu jest rozwijająca się siatkówka oka *Danio pręgowanego*, małej słodkowodnej ryby powszechnie wykorzystywanej w badaniach biologii rozwoju. Zaburzenia rozwoju sieci neuronalnych stanowią ważną przyczynę chorób neurorozwojowych. Dlatego coraz częściej *Danio pręgowane* jest wykorzystywane do badań nad podłożem komórkowym tych chorób. Niniejszy artykuł omawia przykłady nowych informacji, jakie uzyskano na temat prawidłowego i patologicznego rozwoju sieci neuronalnych studiując siatkówkę oka *Danio pręgowanego*.

## Abstract

Neurons, which are the basic functional unit of the nervous system, form cell ensembles, called neural networks. Their formation is a complex and highly controlled process, which only recently we can study at multiple levels simultaneously in living organisms, thanks to technological advances and the application of new research models. A good example of such a model is developing retina of zebrafish, a small freshwater fish commonly used in studies of developmental biology. Developmental disturbances of neural networks formation are an important cause of neurodevelopmental disorders. Therefore, more and more zebrafish is used for research of these diseases. This article discusses examples of new information that was obtained on the normal and pathological development of neural networks studying the zebrafish retina.

## Podziękowania

Badania prowadzone przez autorów niniejszej pracy przeglądowej zostały sfinansowane w ramach projektów SONATA9 (2015/17/D/NZ3/03735) oraz “Fishmed” (FP7 grant nr 316125).

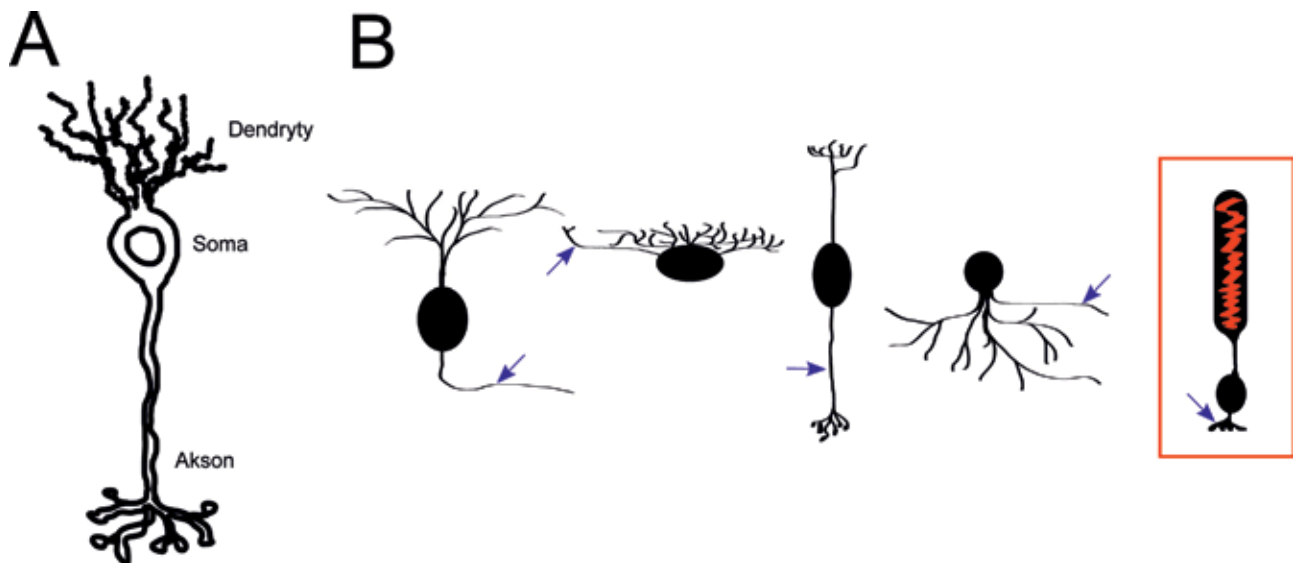
Neurony (komórki nerwowe) stanowią podstawową jednostkę funkcjonalną układu nerwowego. Poszczególne neurony mogą się wzajemnie komunikować, a grupy połączonych komórek nerwowych tworzą sieci neuronalne, odpowiedzialne za przetwarzanie konkretnych informacji i poszczególne działania układu nerwowego. Współdziałanie wielu sieci neuronalnych odpowiada za tak złożone procesy jak integracja bodźców docierających do organizmu ze środowiska zewnętrznego i wewnętrznego oraz reakcja na nie, czy też uczenie się i formowanie pamięci.

Kształt (morfologia) neuronów decyduje, jakie połączenia neuronalne stworzy dana komórka. Istnieje

wiele typów neuronów, pełniących różne funkcje, które odzwierciedla ich zróżnicowana morfologia. W większości komórek nerwowych można wyróżnić trzy podstawowe elementy: ciało komórki (soma), dendryty oraz akson (Ryc. 1A). Dendryty tworzą drzewka dendrytyczne, od bardzo prostych (pojedynczy dendryt) do rozbudowanych (setki dendrytów) (Ryc. 1B). Pomimo odmiennych wielkości i kształtów, jakie mogą przybrać komórki nerwowe, wszystkie wykazują czynnościową polaryzację. Dendryty odbierają sygnały od innych komórek sieci i przesyłają je do ciała komórki. Z kolei akson przekazuje je od ciała komórki do kolejnych ogniw sieci. Umożliwia to integrację informacji pochodzącej z wielu źródeł, ocenę jej wagi oraz jej ukierunkowane przekazywanie z komórki do komórki. Aby mogło dojść do przepływu sygnału pomiędzy dwoma neuronami konieczne jest, aby aksony jednych komórek nerwowych skontaktowały się z dendrytami lub ciałami

innych komórek. Miejsca takiego kontaktu nazywane są synapsami. Ustanowienie prawidłowych połączeń synaptycznych, ich podtrzymanie lub zmiana pod wpływem aktywności neuronalnej są ściśle kontrolowane i stanowią podstawę między innymi zjawisk plastyczności i pamięci.

ryba słodkowodna, pochodząca oryginalnie z Gangesu, od lat wykorzystywana w badaniach nad biologią rozwoju. Niniejszy artykuł skupia się na wykorzystaniu tego modelu w badaniach rozwoju i funkcjonowania siatkówki oka i jego możliwego wykorzystania w badaniach nad chorobami neurorozwojowymi.

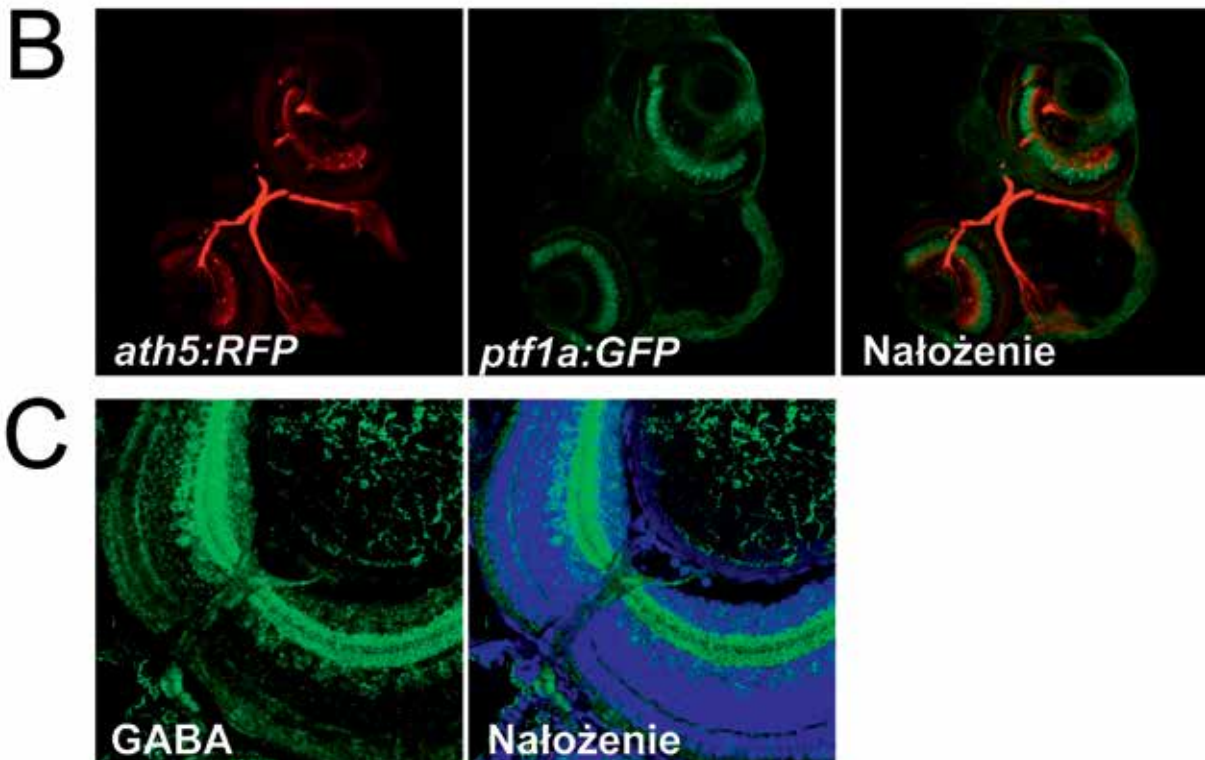
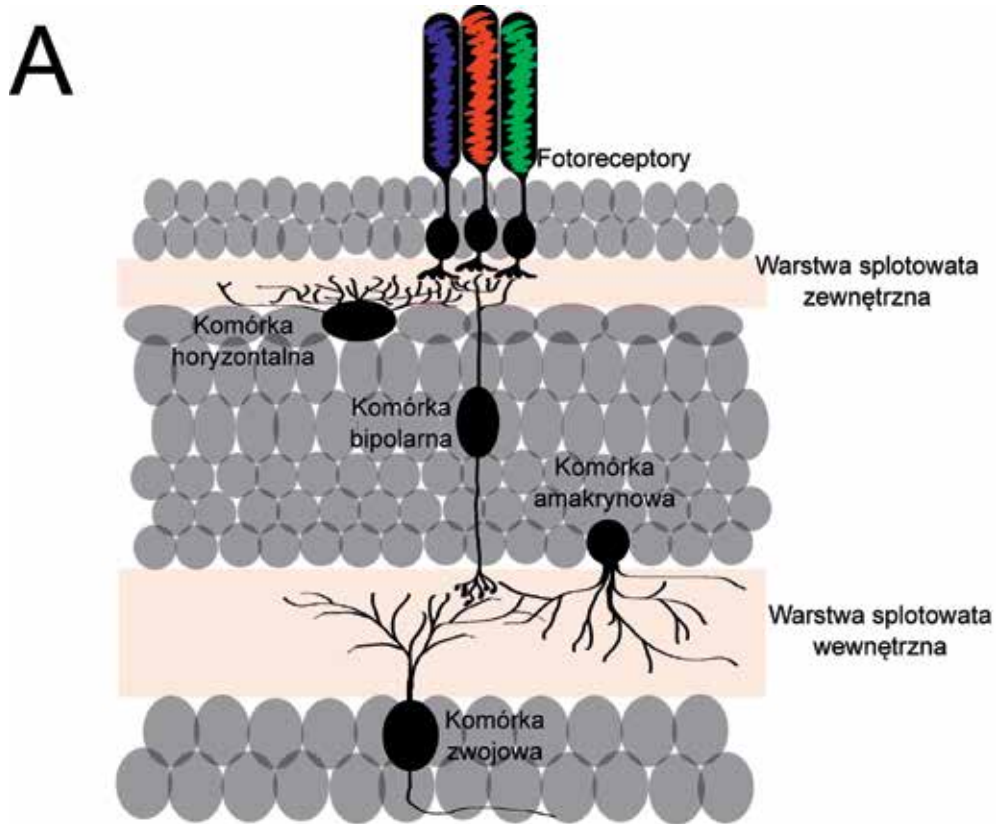


Ryc.1. A. Budowa neuronu. B. Różne typy neuronów, w których można wyróżnić podstawowe elementy budowy: somę, dendryty i aksony, mają łatwo rozróżnialne drzewka dendrytyczne o charakterystycznym dla danego typu kształcie. Wyjątkiem są fotoreceptory (w ramce), które w toku ewolucji wyspecjalizowały swoje „dendryty” do odbierania bodźców świetlnych. Strzałką zaznaczono aksony.

Sieci neuronalne mogą mieć bardzo różny stopień złożoności. Z jednej strony mogą to być proste obwody składające się z 2–3 komórek, odpowiadające za proste reakcje bezwarunkowe (np. cofnięcie ręki pod wpływem oparzenia). Po drugiej stronie spektrum są tak ogromne i skomplikowane sieci jak mózg. Pełne zrozumienie ich rozwoju i działania wymaga badań na wielu płaszczyznach: od roli poszczególnych białek (badania molekularne), poprzez procesy zachodzące wewnątrzkomórkowo (badania biologii komórki), do komunikowania się całej sieci lub różnych sieci między sobą (do niedawna głównie badania elektrofizjologiczne) i efektów tej komunikacji na poziomie zachowania organizmu (neurofizjologia i badania behawioralne). Przez wiele lat ze względów technologicznych istniał poważny problem w integracji badań na tych różnych poziomach. Ostatnio jednak, dzięki rozwojowi nowych znaczników molekularnych (np. białek fluorescencyjnych znakujących poszczególne typy komórek) oraz technik mikroskopowych otworzyło się nowe pole badań, pozwalające obrazować przyżyciowo sieci neuronalne na kilku poziomach na raz. Wciąż jednak taka analiza wymaga wykorzystania relatywnie prostych układów modelowych, kompatybilnych z możliwościami sprzętowymi i obliczeniowymi. W tym kontekście coraz większą popularność zyskuje *Danio přęgowany*, mała

### Zalety siatkówki oka *Danio přęgowanego* jako modelu badawczego

Jakie są zalety siatkówki *Danio přęgowanego* jako modelu do przyżyciowych badań rozwoju i funkcjonowania sieci neuronalnych? Po pierwsze, siatkówka oka – światłoczuła tkanka wyściełająca wewnętrzną powierzchnię gałki ocznej, jest przykładem sieci neuronalnej o ograniczonej złożoności. Wciąż jednak tworzą ją liczne elementy różnego typu, które muszą skoordynować swoje działanie, aby efektywnie odbierać i integrować bodźce świetlne docierające do oka i przekazywać je do mózgu. Po drugie siatkówka jest częścią ośrodkowego układu nerwowego (rozwija się jako „wypustka mózgu”) i stanowi twór konserwatywny ewolucyjnie pod względem rozwoju, zarówno na poziomie komórkowym, jak i molekularnym. To sprawia, iż liczne mechanizmy odpowiedzialne za rozwój mózgu są również zachowane w przypadku siatkówki. Dla eksperymentatorów siatkówka *Danio přęgowanego* ma liczne dodatkowe zalety. *Danio přęgowany* ma rozwój zewnętrzny, czyli poza organizmem matki. Dzięki temu przyżyciowe obserwowanie kolejnych stadiów rozwoju embrionalnego jest dużo prostsze niż u ssaków. Inną zaletą tego gatunku jest przezroczyste ciało w pierwszych etapach życia, co umożliwia śledzenie zmian zachodzących w głębi



Ryc.2. A. Schemat przedstawiający siatkówkę oka, którą budują różne typy komórek ułożone w warstwy (fotoreceptory, komórki horyzontalne, bipolarnie, amakrynowe oraz zwojowe). Można również wyróżnić podtypy tych komórek na podstawie specyficznych znaczników. Najprostszym przykładem są różne podtypy fotoreceptorów, które ulegają wzbudzeniu pod wpływem światła o różnej długości fal (np. niebieskiej, zielonej i czerwonej). B. Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego LSM5 (Zeiss) przedstawiające przekrój poprzeczny przez głowę linii transgenicicznej Danio pręgowanego SoFa [1]. Na czerwono świecą komórki zwojowe, a na zielono komórki amakrynowe i horyzontalne. Wyraźnie widać krzyżowanie się nerwów wzrokowych w środku głowy (kolor czerwony). C. Komórki amakrynowe wybarwione na GABA (kolor zielony). Wyraźnie widać ciała tych komórek oraz warstwę wewnętrzną splotowatą, w której znajdują się ich dendryty i aksony. Kolor niebieski – jądra komórkowe wszystkich komórek.

organizmu, np. w mózgu czy w oku. Dużym atutem sprzyjającym badaniom nad rozwojem sieci neuronalnych w tym modelu jest też fakt, że rozwija się on bardzo szybko i w ciągu trzech do pięciu dni siatkówka oka Danio jest w pełni funkcjonalna. W kolejnych podrozdziałach przedstawiamy podstawowe informacje na temat budowy siatkówki, które są konieczne dla zrozumienia, co nowego dowiedzieliśmy się o rozwoju sieci neuronalnych dzięki wykorzystaniu omawianego przez nas modelu badawczego.

### Siatkówka oka – budowa

Siatkówkę oka kręgowców, w tym Danio pręgowanego, tworzą neurony 6 typów o różnym kształcie oraz lokalizacji, układających się w wyróżnialne i dobrze zdefiniowane warstwy (Ryc. 2). Możemy w niej wyróżnić warstwy: neuronów zwojowych (najbliżej soczewki), neuronów amakrynowych, dwubiegunowych i horyzontalnych (warstwa jądrowa wewnętrzna) oraz fotoreceptorów – czopków i pręcików (warstwa jądrowa zewnętrzna). Wyróżnia się też dwie warstwy spłotowate, charakteryzujące się tym, że nie ma w nich ciał komórek, a jedynie dendryty i aksony kontaktujących się ze sobą komórek.

Fotoreceptory są komórkami światłoczułymi. Czopki odpowiadają za widzenie barw, natomiast pręciki za widzenie w ciemności. Aksony czopków i pręcików kontaktują się z dendrytami komórek dwubiegunowych (bipolarnych), które w momencie pobudzenia fotoreceptorów przez światło docierające do oka odbierają od nich sygnał i przekazują go do komórek zwojowych. Aksony komórek zwojowych tworzą nerw wzrokowy, który przesyła sygnał bezpośrednio do mózgu [8]. Światło docierające do oka pobudza od 20 do 100 czopków lub od 50 do 450 pręcików. Sygnał ten przekazywany jest do od trzech do 15 komórek dwubiegunowych, które z kolei przesyłają go tylko jednej komórce zwojowej. Jest to bardzo dobry przykład sieci neuronalnej, w której dochodzi do integracji sygnału pochodzącego z wielu komórek nerwowych na wejściu do pojedynczej komórki na wyjściu. Proces takiej integracji angażuje również kilka komórek amakrynowych oraz kilka do kilkunastu komórek horyzontalnych. Komórki te stoją na straży poprawnego przekazywania sygnału, nie dopuszczając, aby sygnał z danego obwodu neuronalnego rozprzestrzenił się w sposób niekontrolowany na sąsiednie elementy sieci oraz aby został wygaszony w przypadku niewystarczającego pobudzenia całej sieci na wejściu. A zatem, podobnie jak w mózgu, sieci neuronalne siatkówki posiadają elementy pobudzające i hamujące, które odpowiadają za prawidłowe

kanałowanie przepływu informacji i jej integrację.

### Czego nowego dowiedzieliśmy się o rozwoju neuronów dzięki siatkówce Danio pręgowanego?

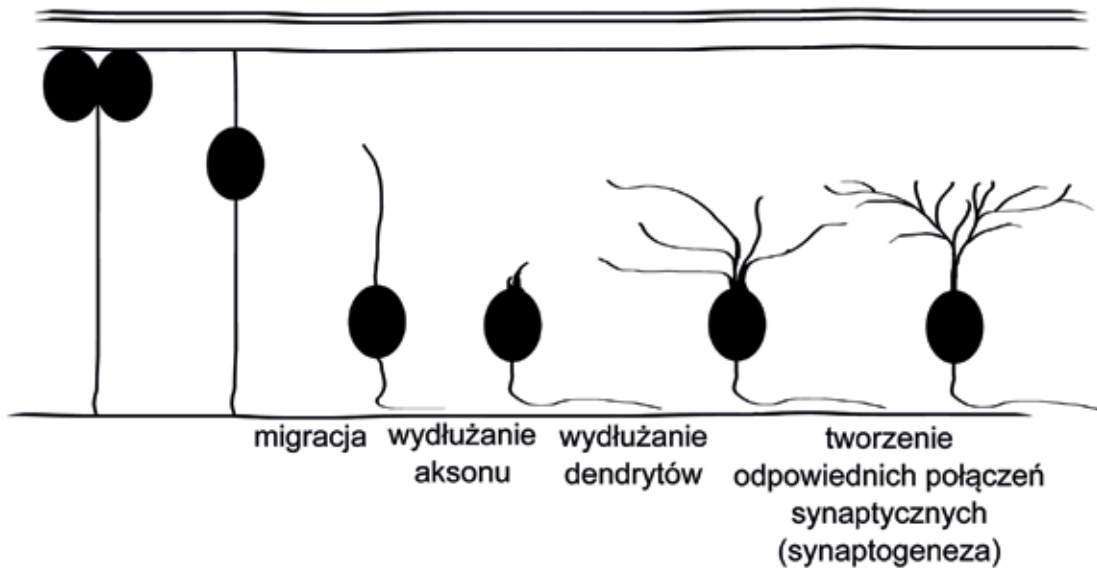
Tworzenie sieci neuronalnych podczas rozwoju zarodkowego jest procesem złożonym, wieloetapowym i ściśle regulowanym przez program genetyczny i sygnały zewnątrzkomórkowe. W pierwszej kolejności komórki progenitorowe, mające zdolność podziałów komórkowych, muszą „wyprodukować” odpowiednią liczbę komórek potomnych. Z nich w procesie różnicowania powstaną neurony spełniające określone funkcje. Jednak miejsce „narodzin” neuronu nie jest miejscem, gdzie będzie on pełnił swoje „dorosłe zadania”. Dlatego też przyszłe neurony muszą najpierw dotrzeć do właściwej lokalizacji. Po przybyciu na miejsce zaczynają tworzyć aksony i dendryty w stronę swoich partnerów komórkowych, z którymi muszą wytworzyć odpowiednią liczbę połączeń synaptycznych o właściwej sile (Ryc. 3A). Co ciekawe, pewne aspekty tego rozwoju wyglądają na z góry ustalone, inne zaś wykazują pewną zmienność (plastyczność). Na przykład w siatkówce zawsze powstaje taka sama struktura warstwowa sieci neuronalnych i komórki poszczególnych typów zawsze oddziałują ze sobą w ten sam sposób. Fotoreceptory będą się kontaktować z komórkami bipolarnymi, które z kolei stworzą synapsy z komórkami zwojowymi. Komórki horyzontalne będą wydłużać aksony i dendryty w stronę synaps tworzonych przez fotoreceptory, a komórki amakrynowe – w stronę synaps komórek zwojowych. Zatem rodzaje tworzonych połączeń międzykomórkowych w siatkówce kręgowców są z góry bardzo dobrze określone. Natomiast ostateczny kształt neuronów oraz liczba i siła tworzonych synaps jest cechą zmienną, często kształtowaną przez czynniki zewnątrzkomórkowe, takie jak dostępność czynników wzrostowych czy aktywność synaptyczna.

Na wiele pytań dotyczących rozwoju neuronów udało się uzyskać odpowiedzi studiując rozwój komórek hodowanych *in vitro*. Jednak znalezienie odpowiedzi na część fundamentalnych pytań wymagała przyżyciowej obserwacji całych zespołów komórek w tkance nerwowej którą, w przeciwieństwie do hodowli komórkowych, charakteryzuje struktura trójwymiarowa. Właśnie do odpowiedzi na tego typu pytania Danio pręgowany stanowi wymarzone narzędzie. Jednym z kluczowych zagadnień, które długo pozostawało bez odpowiedzi, było pytanie, w jaki sposób zachodzi regulacja dzielenia się i różnicowania komórek progenitorowych w dany typ komórek nerwowych tak, by mogły powstać sieci neuronalne

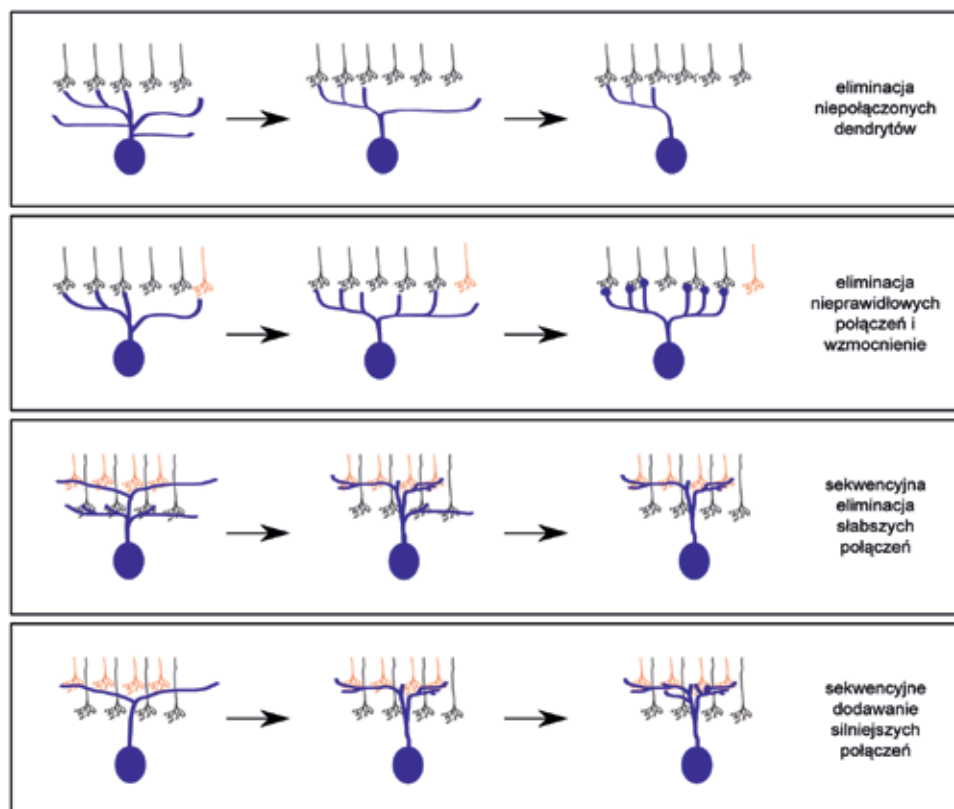


o ściśle zdefiniowanej strukturze. Poszukiwaniem rozwiązania tej zagadki zajmuje się grupa badawcza profesora Williama Harrisa z Cambridge, która jako jedna z pierwszych wdrożyła metody przyżyciowego

# A



# B

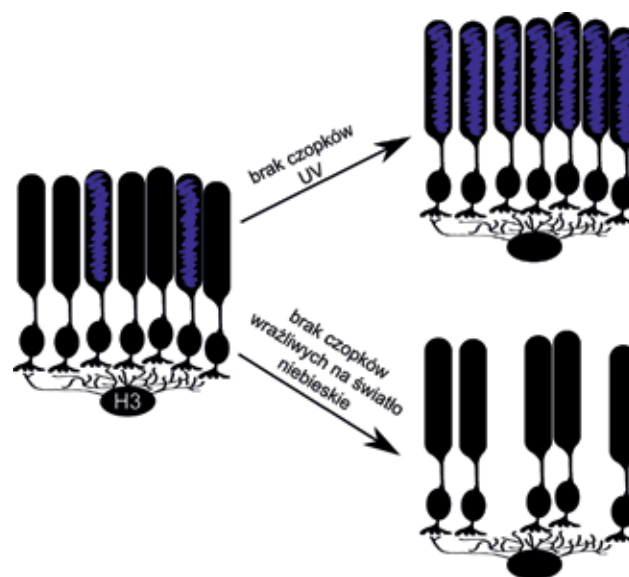


Ryc. 3. **A.** Schemat przedstawiający procesy komórkowe zachodzące podczas rozwoju neuronów. **B.** Mechanizmy komórkowe determinujące kształt neuronów i powstawanie sieci neuronalnych. Eliminacja niepołączonych dendrytów (panel 1): dendryty, które nie znalazły swojego partnera komórkowego ulegają obkurczeniu. Eliminacja nieprawidłowych połączeń i wzmocnienie prawidłowych (panel 2): istnieją różne podtypy neuronów i możliwości połączeń komórkowych; niektóre komórki nerwowe początkowo kontaktują się z losowymi partnerami, a potem, w miarę rozwoju (swojego, jak i swojego partnera), eliminują połączenia z np. jednym typem partnerów neuronalnych (różne podtypy neuronów zaznaczono na różne kolory). Sekwencyjna eliminacja słabszych połączeń (panel 3): rozwijające się komórki nerwowe mogą też eliminować słabsze połączenia (ten mechanizm jest zależny od aktywności synaptycznej); zwykle jeden podtyp partnerów komórkowych (komórki czerwone na schemacie) silniej oddziałuje z daną komórką nerwową, więc inne połączenia są eliminowane. Sekwencyjne dodawanie silniejszych połączeń (panel 4): silne oddziaływanie danej komórki nerwowej z partnerami neuronalnymi mogą być sygnałem do rozgałęziania jej dendrytów i dodawania nowych połączeń (ten mechanizm również jest zależny od aktywności synaptycznej).

mikroskopowego badania losów komórek siatkówki *Danio* pręgowanego. Większość neuronów powstaje podczas rozwoju zarodkowego i od tej pory pełni swoją funkcję. Już na przełomie lat 80. i 90. XX w. wiadano, że komórki progenitorowe siatkówki oka mogą dać początek wszystkim typom neuronów siatkówki. Jednak liczba i rodzaj neuronów, jakie powstaną z pojedynczej komórki progenitorowej siatkówki, są bardzo zmienne [3]. Ostateczna liczba komórek danego typu, rodzaje połączeń oraz warstwowość siatkówki, pomimo przypadkowości w generowaniu neuronów przez komórki prekursorowe, pozostają niezmiennie. Poszukując wyjaśnienia tej zagadki badacze z Cambridge sprawdzali wpływ czynników transkrypcyjnych na determinację losu komórek progenitorowych siatkówki [3, 2]. Używając nowoczesnych technologii znakowania pojedynczych komórek progenitorowych obserwowali ich podziały, jak i różnicowanie, zadając pytanie, czy te procesy są przypadkowe, czy zaplanowane. Z ich badań wynika, że początkowo w rozwoju różnicowanie zdarza się przypadkowo i zależy od losowej aktywności zespołów czynników transkrypcyjnych. Komórki występujące rzadziej, wymagają niezależnej aktywacji większej liczby czynników transkrypcyjnych, co obniża prawdopodobieństwo ich powstania. W ten sposób, pomimo początkowej przypadkowości procesu różnicowania, wytwarzane są odpowiednie proporcje poszczególnych klas komórek. Badacze ci zauważyli także, że wielkość siatkówki jest determinowana niezależnie od „składu” komórkowego [2, 7].

Innym pytaniem nurtującym badaczy było, jakie mechanizmy determinują ostateczny kształt komórek nerwowych i topografię tworzonych przez nie połączeń. Mechanizmem, który został najwcześniej poznany i uznany za powszechny, jest przypadkowe tworzenie, a następnie usuwanie nieprawidłowych lub zbędnych połączeń synaptycznych, a nawet całych rozgałęzień dendrytów czy aksonu (Ryc. 3B). Rzeczywiście, jeden z podtypów komórek zwojowych wysuwa dendryty w sposób przypadkowy, a następnie usuwa nieprawidłowe lub zbędne dendryty. Komórki zwojowe mogą eliminować w ten sposób np. połączenia z niektórymi neuronami, tak by ostatecznie łączyć się z tylko jednym podtypem komórek bipolarnych. Niemniej badania przeprowadzone w modelach *Danio* pręgowanego wykazały, że nie jest to mechanizm jedyny. Wykazano istnienie podtypów komórek zwojowych stopniowo i w sposób zdeterminowany wysuwających dendryty w stronę partnera komórkowego [5]. Istnienie takiej strategii potwierdzono później również u myszy.

Powstawanie synaps o odpowiedniej sile jest regulowane podczas funkcjonowania sieci neuronalnych, dlatego też powstałe w rozwoju zarodkowym oddziaływania są udoskonalane, np. w momencie, gdy otwieramy oczy po raz pierwszy. Ogólnie przyjętym mechanizmem leżącym u podstaw wpływu aktywności synaptycznej na ustalanie połączeń między neuronami jest „zasada współzawodnictwa”, która opiera się na założeniu, że silniejsza synapsa jest utrwalana, a słabsza jest eliminowana. Badając siatkówkę *Danio* pręgowanego udowodniono, że nie jest to zawsze obowiązująca reguła. Badacze z Uniwersytetu Stanu Waszyngton analizowali powstawanie synaps między komórkami horyzontalnymi a czopkami w rozwoju zarodkowym i ustalili, że komórki horyzontalne H3 preferują połączenia z czopkami wrażliwymi na światło ultrafioletowe (UV) lub niebieskie, z tym że większość synaps komórek horyzontalnych H3 jest tworzonych z czopkami UV. Kiedy zablokowano aktywność czopków UV, to w rozwoju zarodkowym powstawało więcej połączeń komórek horyzontalnych H3 z czopkami wrażliwymi na światło niebieskie, co jest zgodne z ogólnie przyjętą „zasadą współzawodnictwa”. Natomiast blokowanie aktywności czopków wrażliwych na światło niebieskie nie miało takiego efektu na czopki UV [10]. Wynika z tego, że aktywność synaptyczna czopków UV reguluje powstawanie połączeń między komórkami horyzontalnymi H3



Ryc. 4. Przedstawienie wpływu aktywności synaptycznej na tworzenie się połączeń międzykomórkowych na przykładzie komórek horyzontalnych H3 i ich oddziaływań z czopkami wrażliwymi na światło niebieskie (schematyczne fotoreceptory z kolorem niebieskim) i UV (schematyczne fotoreceptory z kolorem czarnym) w rozwoju siatkówki *Danio* pręgowanego. Rozwój czopków wrażliwych na światło niebieskie jest zależny od czopków wrażliwych na światło UV, a brak czopków UV powoduje, że czopki wrażliwe na światło niebieskie tworzą więcej połączeń synaptycznych z komórkami horyzontalnymi H3. Natomiast rozwój czopków UV nie jest zależny od czopków wrażliwych na światło niebieskie.

a czopkami wrażliwymi na światło niebieskie, natomiast nie na odwrót (Ryc. 4). Jak widać z powyższych przykładów, przyżyciowe obrazowanie neuronów *in vivo*, możliwe dzięki postępowi mikroskopii i wykorzystaniu Danio pręgowanego, pozwala nam lepiej poznać repertuar strategii rozwojowych neuronów w trakcie formowania prawidłowych sieci.

### **Czy siatkówka Danio pręgowanego może stanowić dobry model dysfunkcji sieci neuronalnych w chorobach neurorozwojowych?**

Powstawanie prawidłowo funkcjonujących sieci neuronalnych nie zawsze kończy się sukcesem, co prowadzi do chorób neurorozwojowych. Ich najczęstszymi symptomami są ograniczenie zdolności motorycznych, intelektualnych i socjalnych. Do tej grupy chorób zaliczamy m.in. autyzm, niepełnosprawność intelektualną, padaczkę oraz schizofrenię. Coraz częściej, dzięki łatwości manipulacji genetycznych, Danio pręgowany jest wykorzystywany jako model do badania tych chorób. Dotychczas stworzono rybnie modele: mikro- i makrocefalii, zespołu łamliwego chromosomu X, stwardnienia guzowatego oraz innych chorób spektrum autyzmu (np. związanych z mutacjami w genach *SHANK*, *SYNGAP1*, *KCTD13*, *AUTS2*) [4, 9]. Większość tych ryb wykazuje poważne zaburzenia rozwoju układu nerwowego i, o ile przeżyją, również zaburzenia zachowania. Jednak dotychczas w bardzo nielicznych przypadkach starano się prowadzić badania wielopoziomowe z wykorzystaniem tych modeli. Nie zwracano też specjalnie uwagi na zaburzenia rozwoju siatkówki. Niemniej istnieją przykłady badań nad siatkówką Danio pręgowanego mające na celu odkrycie mechanizmów komórkowych chorób neurorozwojowych.

Jeden z pierwszych przykładów modelowania zaburzeń neurorozwojowych z wykorzystaniem siatkówki Danio pręgowanego stanowią badania nad mikrocefalią (małogłowie) przeprowadzone przez wspomnianą już wcześniej grupę prof. Harrisa [6]. Mikrocefalia jest objawem klinicznym o bardzo zróżnicowanej etiologii, który jest definiowany jako zmniejszenie rozmiarów głowy, i często występuje z upośledzeniem rozwojowym. Zespół prof. Harrisa zajął się badaniem mechanizmów komórkowych odpowiadających za znaczne zmniejszenie rozmiarów mózgu w małogłowie pierwotnym, uwarunkowanym autosomalnie recesywnie (MCPH, ang. *autosomal recessive primary microcephaly*), powodowanym przez mutacje w takich genach jak *STIL*, *ASPM* czy *WDR62*. Badacze wytworzyli modelowe ryby pozbawione tych genów lub o ich obniżonej

ekspresji. Ryby te miały wyraźnie mniejsze mózgi oraz oczy. W dalszych badaniach skupiono się na przyżyciowej obserwacji progenitorów neuronalnych w siatkówce rozwijającego się Danio pręgowanego, co pozwoliło wykazać, iż prawdopodobną przyczyną MCPH jest bardzo znaczące wydłużenie lub wręcz zablokowanie na bardzo wczesnym etapie podziałów komórek progenitorowych. W połączeniu z ich zwiększoną śmiercią skutkowało to obniżoną liczbą komórek siatkówki (i prawdopodobnie również mózgu). Jest to bardzo ciekawa konkluzja, wskazująca, iż w przypadku MCPH pierwotna przyczyna choroby może mieć charakter mieszany, tzn. niewystarczające wytwarzanie neuronów i zwiększoną śmierć komórek prekursorowych.

Podczas gdy prace zespołu prof. Harrisa koncentrowały się na badaniu problemów towarzyszących chorobom neurorozwojowym na najwcześniejszych etapach formowania układu nerwowego, w naszej pracowni staramy się wykorzystać siatkówkę ryby do badania zaburzeń rozwoju sieci neuronalnej na późniejszych etapach (powstawanie aksonów, dendrytów i synaps). Jako modelu używamy Danio pręgowanego pozbawionego genu *Tsc2*. Mutacje w tym genie są przyczyną stwardnienia guzowatego. Jest to choroba wielonarządowa, dotykająca także mózgu. Do objawów neurologicznych tej choroby należą epilepsja, upośledzenie umysłowe oraz zachowania ze spektrum autyzmu. Coraz częściej uważa się, iż jedną z przyczyn tych zjawisk, obok formowania licznych guzów mózgu, jest nieprawidłowe formowanie sieci neuronalnych i równowagi pomiędzy pobudzaniem i hamowaniem aktywności neuronów w tych sieciach. Istotnie nasze wstępne badania wskazują, iż ryby pozbawione *Tsc2* mają problemy z prawidłowym rozwojem warstw siatkówki oraz wykazują zaburzenia morfologii nerwu wzrokowego (jego zmniejszoną średnicę). Co ciekawe, zmniejszoną średnicę nerwu wzrokowego wykryto również u pacjentów ze stwardnieniem guzowatym. Pokazuje to, że w przypadku tej choroby, część ludzkich symptomów może być odtworzona rzeczywiście w modelu siatkówki Danio pręgowanego.

### **Podsumowanie, czyli po co nam kolejne nowe modele ludzkich chorób?**

Danio pręgowany stanowi atrakcyjny model do badań nad rozwojem ośrodkowego układu nerwowego u kręgowców, gdyż posiada dużą homologię genetyczną oraz fizjologiczną w stosunku do człowieka. Prekursory układu nerwowego pojawiają się u Danio już 6–7 h po zapłodnieniu, natomiast pierwsze

neurony po 24 h, co znacznie przyspiesza badania. Natomiast przezroczystość zarodka bardzo ułatwia obserwację losów komórek nerwowych – ich podziały, migrację oraz różnicowanie. Ponadto geny, które odpowiadają za powstawanie neuronów i kierowanie aksonów w miejsca docelowe, są analogiczne do tych odpowiadających za podobne procesy w organizmach ssaków. W związku z tym coraz częściej siatkówka

Danio pręgowanego jest brana pod uwagę jako model do badania zaburzeń formowania sieci neuronalnych w chorobach neurorozwojowych. Ponadto, ze względu na podobieństwa zmian neuropatologicznych, coraz dynamiczniej rozwija się wykorzystanie Danio pręgowanego do poszukiwania nowych strategii terapeutycznych.

## Bibliografia

1. Almeida AD, Boije H, Chow RW, He J, Tham J, Suzuki SC, et al. (2014). Spectrum of Fates: a new approach to the study of the developing zebrafish retina. *Dev. Camb. Engl.* 141:1971–80.
2. Boije H, Rulands S, Dudczig S, Simons BD, Harris WA. (2015). The Independent Probabilistic Firing of Transcription Factors: A Paradigm for Clonal Variability in the Zebrafish Retina. *Dev. Cell.* 34:532–43.
3. He J, Zhang G, Almeida AD, Cayouette M, Simons BD, Harris WA. (2012). How variable clones build an invariant retina. *Neuron.* 75:786–98.
4. Kozol RA, Abrams AJ, James DM, Buglo E, Yan Q, Dallman JE. (2016). Function Over Form: Modeling Groups of Inherited Neurological Conditions in Zebrafish. *Front. Mol. Neurosci.* 9:55.
5. Mumm JS, Williams PR, Godinho L, Koerber A, Pittman AJ, Roeser T, et al. (2006) In vivo imaging reveals dendritic targeting of laminated afferents by zebrafish retinal ganglion cells. *Neuron.* 52:609–21.
6. Novorol C, Burkhardt J, Wood KJ, Iqbal A, Roque C, Coutts N, et al. (2013). Microcephaly models in the developing zebrafish retinal neuroepithelium point to an underlying defect in metaphase progression. *Open Biol.* 3:130065.
7. Randlett O, MacDonald RB, Yoshimatsu T, Almeida AD, Suzuki SC, Wong RO, et al. (2013). Cellular requirements for building a retinal neuropil. *Cell Rep.* 3:282–90.
8. Randlett O, Norden C, Harris WA. (2011). The vertebrate retina: a model for neuronal polarization in vivo. *Dev. Neurobiol.* 71:567–83.
9. Stewart AM, Nguyen M, Wong K, Poudel MK, Kalueff AV. Developing zebrafish models of autism spectrum disorder (ASD). *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 50:27–36.
10. Yoshimatsu T, Williams PR, D’Orazi FD, Suzuki SC, Fadool JM, Allison WT, et al. (2014). Transmission from the dominant input shapes the stereotypic ratio of photoreceptor inputs onto horizontal cells. *Nat. Commun.* 5:3699.
11. Kuno S., Sakurai F., Shimizu K., Matsumura N., Kim S., Watanabe H., Tashiro K., Tachibana M., Mizuguchi H. Development of mice exhibiting hepatic microsomal activity of human CYP3A4 comparable to that in human liver microsomes by intravenous administration of adenovirus vector expressing human CYP3A4. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2014, 29(4), 296–304.
12. Palut D., Kostka G., Struciński P. Rola receptorów jądrowych w indukcji form molekularnych cytochromu P450 pod wpływem substancji obcych. *Roczn. PZH.* 2002, 53(4), 321–332.
13. Pelkonen O., Maenpaa J., Taavitsainen P., Rautio A., Raunio H. Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes. *Xenobiotica.* 1998, 28, 1203–1253.
14. Peltz G. Can ‘humanized’ mice improve drug development in the 21st century? *Trends Pharmacol Sci.* 2013, 34( 5), 255–260.
15. Rodrigues A.D., Rushmore T.H. Cytochrome P450 pharmacogenetics in drug development: in vitro studies and clinical consequences. *Curr Drug Metab.* 2002, 3, 289–309.
16. Tateno Ch. Yoshizane Y., Saito N., Kataoka M., Utoh R., Yamasaki Ch., Tachibana A., Soeno Y., Asahina K., Hino H., Asahara T., Yokoi T., Furukawa T., Yoshizato K. Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am J Pathol.* 2004, 165(3), 901–912.
17. Wójcikowski J., Basińska A., Daniel W.A. The cytochrome P450-catalyzed metabolism of levomepromazine: a phenothiazine neuroleptic with a wide spectrum of clinical application. *Biochem Pharmacol.* 2014, 90, 188–195.

**Mgr Magdalena Kędra** – doktorantka w Pracowni Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej. E-mail: mkedra@iimcb.gov.pl

**Prof. dr hab. Jacek Jaworski** – profesor Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej i kierownik Pracowni Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej MIBMiK. E-mail: jaworski@iimcb.gov.pl

**dr Justyna Zmorzyńska** – pracownik naukowy w Pracowni Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej. E-mail: jzmorzyńska@iimcb.gov.pl, \* autor korespondencyjny (jjeziarska@iimcb.gov.pl)