Zeszyt Studentów Biotechnologii

ACTA MYGENICA

numer 15

Kraków, czerwiec 2019

Zespół redakcyjny
Artur Blat
Dajana Dominiak
Daniel Zakaszewski
Katarzyna Mendroch

Okładka
Barwienie alfa-tubuliny komórek linii U251 traktowanych czynnikiem cytotoksycznym.
Autor zdjęcia: Katarzyna Sarad, wykonano w Zakładzie Biochemii Komórki na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego

Skład
Artur Blat

Korekta
Zespół redakcyjny

Wydawca
KNSB Mygen

Nakład: 500 szt.

Za nieocenione wsparcie merytoryczne dziękujemy serdecznie mgr. Edycie Żyle.

Kontakt
artur330@vp.pl

ISSN 1899-5535

Sfinansowane przez

RADA KÓŁ NAUKOWYCH
UNIWERSYTETU
JAGIELLOŃSKIEGO

Od redakcji

Drodzy czytelnicy!

Witamy Was na łamach piętnastego numeru Acta Mygenica. Zachęcamy Was do zapoznania się obecnymi w tym wydaniu artykułami, dzięki którym dowiecie się czym jest układ glimfatyczny, jak proteomika wykorzystywana jest w badaniach zaburzeń psychicznych, a także poznacie tajniki biotechnologicznej produkcji kannabinoidów.

Życzymy miłej lektury!

zespół redakcyjny

Z życia koła

Acta Mygenica wraca do Was na ostatniej prostej roku akademickiego 2018/2019. Odłóżcie na chwilę podręczniki, weźcie coś zimnego do picia i przeczytajcie, czym zajmowaliśmy się w minionym semestrze.

Koło nie zrezygnowało z organizacji seminariów czwartkowych, na których każdy zainteresowany tematem słuchacz mógł dowiedzieć się np. o bioinformatycznych narzędziach używanych w badaniach nad mikrobiomem, działaniach krakowskiego synchrotronu Solaris, ścieżkach kariery w biotechnologicznej firmie Selvita czy też o biotechnologii rozrodu badanej w Państwowym Instytucie Zootechniki w Balicach.

Ogromnym sukcesem okazała się V Ogólnopolska Konferencja Genetyczna „Genomica", na którą zapraszaliśmy Was w poprzednim numerze. Ponad 120 uczestników z całej Polski miało okazję podzielić się wynikami swoich badań, podyskutować o najnowszych doniesieniach ze świata nauki i wysłuchać znakomitych wystąpień naukowców z Polski, Niemiec i Wielkiej Brytanii. Zwieńczeniem Konferencji było zasadzenie za Wydziałem mygenowo-genomikowego klonu, który mamy nadzieję będzie dumnie rósł przypominając nam o tegorocznej edycji.

Przeprowadzone zostały też warsztaty „Lifescience dla licealistów", podczas których uczniowie liceów z różnych części Polski mieli okazję poznać lepiej pracę naukowca.

Żeby zachować dobry balans między życiem naukowym a towarzyskim Koło zorganizowało wiele spotkań integracyjnych z planszówkami i dobrym jedzeniem, a także dwa wyjazdy naukowo integracyjne – jesienny do Mszany Dolnej i letni nad Jezioro Rożnowskie. Chcąc poszerzyć ofertę rozrywkową Koła trwają prace nad Mygenową edycją kultowego „Monopoly".

Podczas czerwcowego Walnego Zebrania omówiono działania dotychczasowego Zarządu Koła, gratulując im sukcesów. Wybrano też nowy Zarząd, w skład którego weszli Emilia Urbanovič (Prezes), Małgorzata Honc, Sonia Baran i Jędrzej Pankowski. Trzymamy kciuki za ich owocną pracę w następnym roku.

Zespół Redakcyjny wraz z Zarządem i Komisją Rewizyjną życzą czytelnikom tego numeru powodzenia na letnich egzaminach i dużej ilości zasłużonego wypoczynku w wakacje.

Wszystkiego dobrego!

Małgorzata Honc

Podsumowanie V Ogólnopolskiej Konferencji Genetycznej “Genomica”

W pierwszy weekend kwietnia prawie 120 pasjonatów szeroko rozumianej genetyki wzięło udziału w organizowanej po raz piąty przez członków naszego Koła Konferencji Genetycznej „Genomica”, która odbyła się w Instytucie Zoologii i Badań Biomedycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Zagadnienia poruszane w trakcie Konferencji dotyczyły zarówno genetyki molekularnej jak i genetyki na poziomie pojedynczych osobników oraz całych populacji.

Nad wystąpieniami ustnymi oraz sesjami posterowymi czuwała zaproszona komisja naukowa, w skład której wchodzili naukowcy z Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz jeden z gości specjalnych. Sesje plenarne uświetniły wykłady wybitnych naukowców z całej Europy związanych z różnymi aspektami genetyki. Miło było nam gościć prof. Ewę Bartnik z Uniwersytetu Warszawskiego oraz prof. Mirosława Bik-Multanowskiego i prof. dr hab. Wiesława Babika z Uniwersytetu Jagiellońskiego. Nasze zaproszenie przyjęli również dr Krzysztof Kuś z Oxford University i prof. Jochen Hess z German Cancer Research Center, którzy swoją obecnością wzbogacili angielskojęzyczny dzień Konferencji – sobotę.

Wydarzenie zostało objęte honorowym patronatem dziekanów Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Wydziału Biologii, Dyrektora Instytutu Genetyki Człowieka PAN oraz rektora Uniwersytetu Jagiellońskiego. Dzięki wsparciu Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz licznych sponsorów Konferencja cieszyła się dużą popularnością, a uczestnicy chwalili zarówno organizację jak i poziom merytoryczny. Nie można zapomnieć też o pomocy prof. Joanny Berety, opiekunki naszego Koła.

Mamy nadzieję, że uczestnictwo w tegorocznej edycji było dla uczestników równie satysfakcjonujące, co dla nas, organizatorów, prace nad jej przygotowaniem.

Do zobaczenia za rok!

Małgorzata Honc

NANOROBOTY W WALCE Z RAKIEM PIERSI

Coraz częściej słyszy się o nanorobotach – syntetycznych molekularnych maszynach, będących dzieckiem biologii molekularnej i nanotechnologii, mających wiele potencjalnych zastosowań w medycynie. Szczególnie obiecujące są badania dotyczące wykorzystania nanorobotów w rozpoznawaniu i znakowaniu komórek nowotworowych. Dość łatwo tworzy się je na bazie DNA, a to za sprawą podatności tej biomolekuły na modyfikacje chemiczne.

Około 20% przypadków raka piersi wykazuje anomalną ekspresję receptora HER2, czyniąc go dobrym celem dla wszelkich terapii. Obniżenie poziomu HER2 spowalnia proliferację komórek nowotworowych i indukuje apoptozę. Obecnie w terapiach wykorzystuje się przeciwciała monoklonalne wiążące HER2
i kierujące go do lizosomów; przeciwciała te są jednak trudne i drogie w produkcji.

Autorzy pracy zidentyfikowali aptamer (oligonukleotyd wiążący się specyficznie z daną cząsteczką) wykazujący wysokie powinowactwo do HER2
i działający w podobny sposób jak przeciwciała. Ten okazał się jednak niestabilny *in vivo* – poszukiwano zatem sposobu, by ów problem obejść. Remedium okazał się tFNA (ang. *tetrahedral framework nucleic acid*) – cząsteczka DNA zsyntetyzowana na wzór szkieletu czworościanu foremnego. Skonstruowano zatem nanorobota mającego postać tFNA z przyłączonym aptamerem. W istocie, konstrukcja znacząco poprawiła biostabilność aptameru in vivo, co więcej – zwiększyła powinowactwo aptameru do HER2.

Choć podobne nanoroboty są tańsze i łatwiejsze do uzyskania niż przeciwciała monoklonalne, wymagane są dalsze badania i być może inne dodatkowe modyfikacje, które pozwolą zastosować je w terapii u ludzi.

Bibliografia

Wenjuan Ma, Yuxi Zhan, Yuxin Zhang, Xiaoru Shao, Xueping Xie, Chenchen Mao, Weitong Cui, Qian Li, Jiye Shi, Jiang Li, Chunhai Fan, and Yunfeng Lin; An Intelligent DNA Nanorobot with in Vitro Enhanced Protein Lysosomal Degradation of HER2; Nano Letters Article ASAP; DOI: 10.1021/acs.nanolett.9b01320

NOKTOWIZOR W OCZACH

Każdy choć raz zastanawiał się, jak by to było widzieć w całkowitej ciemności. Być może to wcale nie takie nieziszczalne marzenie.

Ciekawe, czy o zdolności widzenia w ciemnościach marzą również laboratoryjne myszy, które na około 10 tygodni zyskały podobną „supermoc”. A to wszystko dzięki jednemu zastrzykowi, praktycznie bez efektów ubocznych.

Myszy, podobnie jak ludzie, nie mają zdolności percepcji fal elektromagne-

tycznych poza tymi w spektrum światła widzialnego. A przecież nieco poza tym zakresem leży wszechobecne promieniowanie podczerwone, emitowane przez zwierzęta i obiekty oddające ciepło do otoczenia. Czy zatem nie dałoby się zwierzęczych czopków nieco "dostroić"?

Do akcji wkroczyły nanocząstki pbUCNP, zdolne do wiązania się z siatkówką i absorpcji promieniowania podczerwonego, które przetwarzają na promieniowanie o krótszej długości fali – takiej, która może zostać odebrana przez czopki, tj. 535 nm. Myszy będące obiektem badań postrzegały zatem promieniowanie podczerwone w zieleni.

Aby zweryfikować, czy eksperyment się powiódł, autorzy publikacji przeprowadzili szereg testów, obejmujących obserwację reakcji źrenicy na światło podczerwone czy badanie aktywności elektrycznej siatkówki i kory wzrokowej.

Współczesne urządzenia noktowizyjne często wymagają obecności zwalistych, nieporęcznych źródeł zasilania; problemem jest również interferencja ze światłem widzialnym. Autorzy wykazali jednak, że zastosowana technologia pozwala myszom wyraźnie widzieć promieniowanie podczerwone nawet za dnia.

Ile zatem dzieli nas od możliwości stania się jak superżołnież?

Daniel Zakaszewski

Bibliografia

[1] Ma, Yuqian et al., Mammalian Near-Infrared Image Vision through Injectable and Self-Powered Retinal Nanoantennae, Cell, Volume 177, Issue 2, 243 - 255.e15.

[2] https://www.newscientist.com/article/2195334-mice-given-night-vision-by-injecting-nanoparticles-into-their-eyes/ [dostęp: 07.06.2019].

Spis treści:

Zastosowania proteomiki w badaniach zaburzeń psychicznych

Marta Aleksejczuk 9

Rola układu glimfatycznego w ośrodkowym układzie nerwowym a hipoteza uprzywilejowania mózgu

Aleksandra Rzeszuto 18

Jak drożdże produkują kannabinoidy?

Aleksandra Buchaj, Jakub Knurek 27

Zastosowania proteomiki w badaniach zaburzeń psychicznych

Marta Aleksejczuk
Koło Matematyczno-Przyrodnicze Studentów UJ
Zakład Biochemii Fizycznej
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie
18martaal@gmail.com
Praca napisana pod opieką dr hab. Sylwii Kędrackiej-Krok, prof. UJ

Przez wiele lat jednym z głównych sposobów badania zaburzeń psychicznych były badania behawioralne na zwierzętach oraz obserwacje osób chorych. Jednak wraz z rozwojem nauki i technologii przed naukowcami, lekarzami oraz koncernami farmaceutycznymi otwierają się nowe drogi badań zaburzeń psychicznych. Jedną z coraz intensywniej eksplorowanych możliwości jest proteomika – dziedzina nauki zajmująca się globalną analizą wszystkich białek obecnych w danej próbce przy pomocy technik analitycznych takich jak spektrometria mas czy elektroforeza 2D. Obecnie techniki proteomiczne wykorzystywane są w szerokim spektrum badań na komórkach, tkankach zwierzęcych i ludzkich, prowadzone są również poszukiwania łatwo wykrywalnych markerów takich chorób jak schizofrenia czy depresja. Proteomicy spotykają się jednak z szeregiem ograniczeń – od trudności z dostępem do materiałów badawczych po małą powtarzalność niektórych z używanych procedur.

Historia badań nad zaburzeniami psychicznymi

Narodziny psychofarmakoterapii możemy datować na pierwszą połowę XIX wieku. Wyizolowanie morfiny w 1806 r. oraz litu w 1817 r. zapoczątkowały próby leczenia nerwoboli oraz wybuchów agresji u pacjentów szpitali psychiatrycznych. W następnych dekadach wprowadzono kilka innych leków, jak bromek potasu na epilepsję i niepokój czy wodzian chloralu na bezsenność [1]. Warto zauważyć, że te pierwsze próby farmakoterapii miały miejsce jeszcze przed odkryciem neuronalnej budowy mózgu (1873 r. – Camillio Golgi, 1887 r. – Ramón y Cajal), więc nie były one podparte żadną teorią na temat mechanizmów działania używanych leków. Nie oznacza to jednak, że ówcześni naukowcy nie podejmowali prób badania wpływu nowo zsyntetyzowanych związków na ludzki organizm. Opierały się one głównie na psychologicznych i fizjologicznych obserwacjach efektów podania różnych związków chemicznych, zarówno leków jak i rekreacyjnych używek osobom chorym oraz zdrowym. Warto wspomnieć tutaj prace Emile'a Kraeplin, który badał wpływ m. in. alkoho-

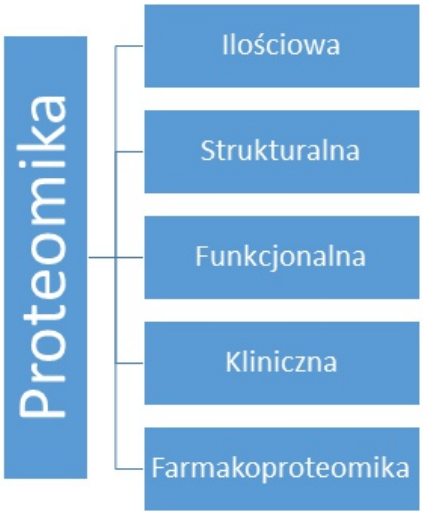
lu, kofeiny, chloroformu i morfiny na psychikę zdrowych osób. Wprowadził wiele ulepszeń w metodzie naukowej badań psychofarmakoterapeutyków, takich jak zastosowanie kontroli placebo, automatyzacji pomiarów czasu odpowiedzi, a także podawanie różnych dawek leków i używek [2]. Badania nad podstawami zaburzeń psychicznych weszły na poziom molekularny wraz z kilkoma przełomowymi odkryciami. Pierwszym z nich było odkrycie chemicznej natury sygnałów przekazywanych w mózgu oraz identyfikacja pierwszego neurotransmitera – acetylocholiny. W latach 50. dokonany został kolejny przełom w psychofarmakologii - zsyntetyzowano efektywne leki przeciwpsychotyczne (m.in. chloropromazyna) i przeciwdepresyjne (m.in. MAOI) [1]. Obydwa leki były początkowo testowane w innych celach – chloropromazyna jako anestetyk a MAOI jako lek na gruźlicę. Do lat 50. leki były badane głównie na pacjentach lub na behawioralnych modelach zwierzęcych. Miało się to jednak wkrótce zmienić wraz z opanowaniem skutecznych metod hodowli komórkowych i wprowadzeniem linii komórkowej HeLa [3], a także opracowaniem pierwszego spektrofotofluorymetru. Nowa technologia umożliwiła mierzenie ilości monoamin i ich metabolitów w synapsach.

Kolejną dramatyczną zmianą w metodach badania chorób psychicznych był rozwój technik genetyki molekularnej. Opracowanie metody klonowania molekularnego pozwoliło neuronaukowcom przenieść uwagę z neurotransmiterów na wiążące się z nimi białka – receptory. Rosnące zrozumienie ludzkiego genomu i relatywnie niskie koszty sekwencjonowania genomów rozpoczęło falę poszukiwań genetycznych markerów wielu chorób, w tym także psychicznych.

Wraz z tymi odkryciami dochodzimy do czasów współczesnych. Obecnie powszechna metoda ewaluacji zdrowia psychicznego pacjenta opiera się na protokołach opracowanych niemal pół wieku temu [4]. Jednym z największych problemów psychiatrii jest farmakologiczna heterogeniczność populacji czyli, innymi słowami, zjawisko różnej odpowiedzi/wrażliwości na te same leki u osób mających podobne objawy. Poszukiwane są różne ścieżki rozwiązania tego problemu, od zmiany sposobów diagnozy [5], przez próby zrozumienia mechanizmów stojących za zaburzeniami psychicznymi po poszukiwania ich biomarkerów. Jedną z coraz częściej implementowanych praktyk w tej sferze badań jest proteomika.

Wprowadzenie do proteomiki

Słowo proteom, od którego powstała następnia nazwa całej dziedziny badań, zostało wprowadzone w 1994 roku przez Marca Wilkinsa, twórcę pierwszego laboratorium proteomicznego. Proteom jest hybrydą dwóch słów: *protein* i *genome* (pol. białko i genom). Czym jest więc genom? Cytując T. A. Browna, autora „Genomów” - „Genom to całkowity DNA komórki, obejmujący zarówno wszystkie geny, jak i odcinki międzygenowe” [6]. Drogą dedukcji można wysnuć wniosek, że



Ryc.1.Działy proteomiki [7].

proteom to całkowity rezerwuar białkowy komórki, a proteomika to gałąź nauki zajmująca się badaniem proteomów.

Tym co odróżnia proteomikę od klasycznych badań nad białkami są skala i metody. Proteomika nie zajmuje się badaniem struktur czy właściwości konkretnych białek, lecz ich obecności, ilości oraz ich oddziaływań między sobą w całej próbce. Próbka taka może być lizatem komórek lub tkanki. Aby lepiej zrozumieć zastosowania proteomiki, możemy spojrzeć na jej działy, wyróżnione w „Proteomice" J. Silberinga i A. Kraj [7] - Ryc. 1.

Proteomika ilościowa zajmuje się badaniem dynamicznych zmian stężeń białek w komórce, zachodzących pod wpływem czynników zewnętrznych. Pozwala również na porównywanie stężeń różnych białek między sobą. Głównie wykorzystywaną w niej techniką jest spektrometria mas.

Proteomika strukturalna – jej celem jest ustalenie struktury przestrzennej wszystkich białek. Używa się w niej innych metod niż w pozostałych gałęziach proteomiki. Wykorzystuje się tu przede wszystkim techniki krystalograficzne oraz spektroskopię NMR.

Proteomika funkcjonalna – głównym polem zainteresowań proteomiki funkcjonalnej są układy reakcji biochemicznych. Do jej zadań należą m.in. identyfikacja i charakteryzacja białek uczestniczących w procesach biochemicznych, analiza oddziaływań białek z innymi biomolekułami oraz ze sobą nawzajem, a także badanie powiązań między szlakami reakcji metabolicznych. Proteomika funkcjonalna korzysta z m. in. mikromacierzy białkowych.

Proteomika kliniczna – w obrębie proteomiki klinicznej można wyróżnić trzy różne podejścia:

a) badanie ekspresji białek w danej tkance lub narządzie i określanie ich

modyfikacji potranslacyjnych,
b) porównywanie profili białkowych w stanie fizjologicznym organizmu i w czasie zmian patologicznych,
c) badanie oddziaływań białko-białko oraz białko-kwas nukleinowy.

Główny materiał badawczy w proteomice klinicznej stanowią płyny ustrojowe (np. krew, płyn mózgowo-rdzeniowy) oraz próbki tkanek z biopsji.

Farmakoproteomika jest dziedziną nauki, która powstała z połączenia proteomiki i farmacji. Skupia się na identyfikacji białek związanych z chorobami, poznawaniu ich funkcji oraz znaczenia w szlakach metabolicznych. Koncentruje się na znalezieniu białek mogących być celami dla leków oraz sprawdzanie wpływu już istniejących leków na proteomy komórek.

Najważniejsze metody badawcze

W zależności od specyfiki eksperymentu, wykorzystywane metody badawcze mogą się drastycznie różnić. Uwzględniając jednak podstawową definicję proteomiki, mówiącą, że jest to globalna analiza białek, w tym artykule uwaga skupiana będzie głównie na narzędziach pozwalających na identyfikację i analizę wielu białek w tym samym czasie. Najczęściej używanymi metodami tego typu są elektroforeza w żelu poliakrylamidowym oraz spektrometria mas.

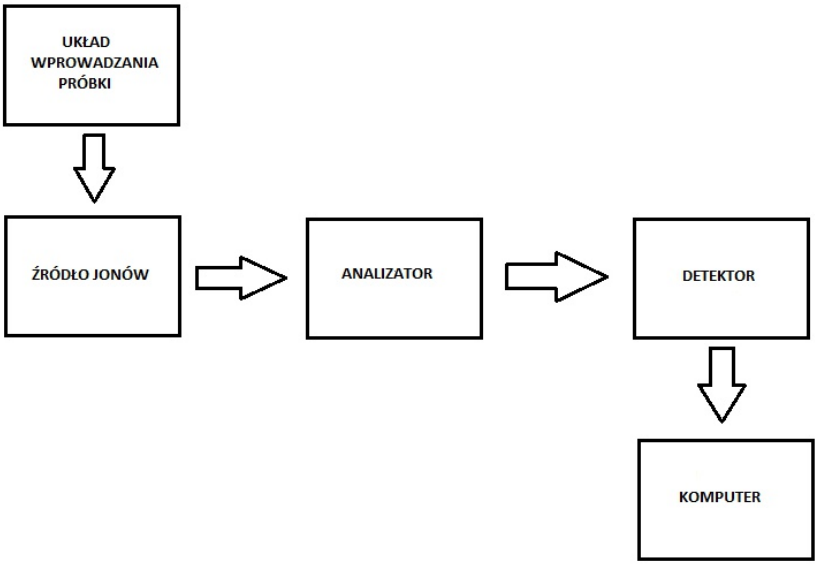
Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym

Elektroforeza to rozdział naładowanych cząsteczek (m.in. białek i peptydów) pod wpływem działania przyłożonego pola elektrycznego. Na szybkość migracji cząsteczek mają wpływ takie czynniki jak masa cząsteczkowa i ładunek elektryczny. Najczęściej wykorzystywanymi w proteomice matrycami do elektroforezy są żele poliakrylamidowe. Przewyższają one żele agarozowe pod względem wytrzymałości mechanicznej i stabilności w szerokim zakresie pH oraz temperatury [7].

Białka są cząsteczkami amfoterycznymi, dlatego ich ładunek zależy od pH środowiska w jakim się znajdują. Jeśli pH buforu jest wyższe od punktu izoelektrycznego, pI danego białka będzie posiadało ładunek ujemny i migrowało w kierunku anody. Dystans jaki przebędzie dane białko zależy przede wszystkim od jego masy oraz rozmiaru porów.

Elektroforeza dwuwymiarowa w żelu poliakrylamidowym

Jest to odmiana elektroforezy białek składająca się z dwóch etapów. Pierwszym jest ogniskowanie izoelektryczne. Białka umieszczane są w żelu w gradiencie pH, gdzie pod wpływem przyłożonego napięcia elektrycznego, następuje ich migracja do miejsca, w którym ich pI zbliżone jest do pH. Kolejnym etapem jest elektroforeza zapewniająca rozdział ze względu na masę białek. W wyniku połączenia tych dwóch technik, uzyskuje się żel o większej rozdzielczości (zachodzi rozdział cząsteczek o nawet małej różnicy mas).



Ryc.2. Schemat działania spektroskopu mas.

Spektrometria mas

Istnieje wiele rodzajów spektrometrów mas, różniących się zarówno budową jak i przeznaczeniem, wszystkie jednak są urządzeniami służącymi do pomiaru m/z, czyli stosunku masy cząsteczki do jej ładunku. Pierwszym etapem pomiarów jest jonizacja cząsteczek. Jony, w przeciwieństwie do cząsteczek obojętnych, mogą poruszać się pod wpływem pola elektrycznego w próżni. Wiązka jonów jest następnie rozdzielana w analizatorze ze względu na wartość m/z. Jony są wprowadzone do detektora, w którym dochodzi do ich konwersji na prąd eklektyczny rejestrowany przez komputer, gdzie następuje. Tam odpowiednie oprogramowanie zapisuje intensywność sygnałów elektrycznych i przedstawia wynik w postaci widma masowego [8].

Schemat działania spektroskopu mas przedstawiono na Ryc. 2.

Spektrometria mas umożliwia uzyskanie informacji na temat składu aminokwasowego peptydów, modyfikacji potranslacyjnych cząsteczek oraz stężenia składników mieszaniny.

W następnej części artykułu zostaną omówione wady, zalety oraz możliwości różnych podejść badawczych i zastosowań proteomiki na przykładzie kilku eksperymentów.

Czy można badać mózg bez mózgu?

Opracowanie metod hodowania linii komórkowych, prace nad komórkami macierzystymi oraz odkrycie metody indukcji komórek zróżnicowanych z powrotem do stanu pluripotencjalnego umożliwiło prowadzenie badań nad liniami komórkowymi na niespotykaną

wcześniej skalę [3,9]. Gdy mówimy o badaniach nad zaburzeniami psychicznymi, badania nad liniami komórkowymi posiadają wiele wad w porównaniu z innymi metodami; przede wszystkim nie istnieją one w otoczeniu organizmu, dlatego nie dają pełnego poglądu na zachowanie komórek np. pod wpływem leków. Nie oznacza to jednak, że badania nad komórkami nie mogą stanowić cennego źródła wiedzy.

Przykładem zastosowania proteomiki w badaniach nad komórkami jest praca z zeszłego roku wydana w *International Journal of Molecular Sciences* pt. *„Proteomic Studies Reveal Disrupted in Schizophrenia 1 as a Player in Both Neurodevelopment and Synaptic Function”* [10].

W 1970 r., w Szkocji, grupa naukowców odkryła translokację w obrębie chromosomu 1, która prowadziła do zaburzenia funkcjonowania genu, nazwanego następnie *DISC1* [11]. Mutację tę powiązano wkrótce z szeroką paletą chorób psychicznych, od schizofreni, przez depresję, po zaburzenia zachowania [12]. Gen nazwano *DISC1* (disrupted in schizophrenia 1, zaburzony w schizofrenii 1), a produkowane przez nie białko DISC1. Nie znano jednak molekularnych efektów uszkodzenia genu stojących za zaburzeniami psychicznymi.

W wyżej wspomnianym badaniu zdecydowano się zbadać proteomy neuronów ze znokautowanym genem *DISC1* i porównać je z proteomami neuronów z funkcjonującym genem. W tym celu wykonano po 4 elektroforezy 2D w żelach dla każdego rodzaju komórek. Odkryto różnice ekspresji 78 białek, z których 68 udało się zidentyfikować przy pomocy spektrometrii mas. Większość z nich okazała się związana z rozwojem neuronów oraz funkcją synaps. Stwierdzono udział tych białek w szlakach sygnałowych mających wpływ na różnicowanie się neuronów i wzrost aksonów [10].

Badania tego typu mogą pozwolić nie tylko na lepsze szacowanie ryzyka zapadnięcia na poważne choroby psychiczne, ale również wykrywanie nowych potencjalnych celów terapeutycznych. Proteomika pozwala spojrzeć na funkcjonowanie komórki w szerszym horyzoncie niż większość innych metod, co jest szczególnie ważne przy tak skomplikowanych chorobach jak np. schizofrenia.

Badania *post mortem*

Badania *post mortem* przedstawiają pewne zalety, niemożliwe do osiągnięcia przy zastosowaniu innych metod. Są one przeprowadzane na tkankach ludzkich, poddanych wszystkich czynnikom mogącym mieć wpływ na proteom komórek. Największymi ograniczeniami tego typu badań są mała dostępność materiału badawczego oraz zmiany zachodzące w czasie i po śmierci organizmu mogące zaburzać wyniki.

W pracy *“Comparative proteomic analysis with postmortem prefrontal cortex tissues of suicide victims versus controls”* [13] opisano wyniki analizy proteomicznej kory przedczołowej mózgu oraz płynu rdzeniowo-mózgowego osób zmarłych w wyniku samobójstwa,

z udekomentowaną historią różnych chorób psychicznych, w porównaniu do osób zmarłych z innych przyczyn. Ogółem pobrano próbki od 26 osób. Następnie wykonano elektroforezę 2D oraz spektrometrię mas.

W wynikach uzyskano trzy białka występujące jedynie w tkankach osób, które zmarły w wyniku samobójstwa, a trzy kolejne wykazywały znaczące różnice w ekspresji pomiędzy grupami. Wśród nich znaleziono m.in. białka regulujące ścieżki serotonergiczne w mózgu oraz chroniące przed uszkodzeniami oksydacyjnymi. Zaobserwowano zmiany w białku wchodzącym w interakcje z komórkami glejowymi, co może sugerować, że nie tylko komórki nerwowe zostają zmienione w toku chorób psychicznych.

Chociaż każdy uważny czytelnik poda w wątpliwość eksperyment uwzględniający próbki od jedynie 26 osób, badania jak to opisane wyżej przyczyniają się do rozwoju wiedzy na temat zaburzeń, z jednego ważnego powodu – badania *post mortem* są jedyną możliwością zbadania biochemicznego składu mózgów osób o których wiemy, że cierpieli na zaburzenia psychiczne. Ich wyniki mogą stanowić wskazówkę na co warto zwrócić uwagę w przyszłych badaniach.

Czy proteomika zmieni oblicze diagnostyki?

Poszukiwania obiektywnego sposobu diagnozy chorób psychicznych jest od dawna jednym ze złotych graali psychiatrii. Prowadzone są badania biorące pod uwagę techniki obrazowania mózgu [14], identyfikację cząsteczek mikroRNA we krwi [15] oraz oczywiście białek. Podstawowymi zasadami, które muszą zostać spełnione przez potencjalny test na jakąkolwiek chorobę są: badany materiał powinien być łatwy do pobrania, test powinien być jednoznaczy, a jego wykonanie możliwe w rozsądnym oknie czasowym.

W artykule *„Development of a blood-based molecular biomarker test for identification of schizophrenia before disease onset”* opisano przeprowadzone na szeroką skalę poszukiwanie biomarkerów schizofrenii obecnych w krwi. Stworzony test oparto na zidentyfikowanych we wcześniejszym badaniu białkach, których poziom ekspresji był zmieniony u osób cierpiących na schizofrenię [16]. Przygotowano multipleksowy test immunologiczny pozwalający na zmierzenie stężenia 225 analitów związanych z procesami zapalnymi, immunologicznymi, hormonalnymi, metabolicznymi oraz neurotroficznymi.

W badaniu wzięto pod uwagę próbki krwi od 957 osób. W pierwszej części eksperymentu zidentyfikowano 29 analitów, które były znacząco różne pomiędzy grupą osób doświadczających pierwszego epizodu schizofrenii, w porównaniu z kontrolą osób chorych. Dokonano porównania wyników z dwiema grupami pacjentów z Europy, a następnie z grupą osób chorych na chorobę dwubiegunową.

Wykazano, że test z dużą celnością rozpoznaje osoby chore na schizofrenię, a także przewiduje, u których osób wykazujących wczesne objawy rozwi-

nie się choroba. Rozróżniał on także osoby z chorobą dwubiegunową od osób ze schizofrenią.
Poszukiwania białkowych biomarkerów chorób psychicznych zwiastują nową erę diagnostyki tych chorób. Podobne badania mogą również nauczyć nas wiele o efektach chorób psychicznych na cały organizm.

Podsumowanie

W powyższym artykule omówiono historię badań nad zaburzeniami psychicznymi i nakreślono jak metody proteomiczne przyczyniają się do dalszego rozwoju wiedzy na ten temat. Proteomika umożliwia uzyskanie bardziej globalnej wiedzy na temat procesów komórkowych zachodzących na poziomie molekularnym, co jest wyjątkowo przydatne w tak skomplikowanych schorzeniach jak choroby psychiczne. Modyfikacje potranslacyjne białek sprawiają, że liczba tych molekuł w komórce jest znacznie większa niż wynikałoby to z liczby genów kodujących białka. W związku z tym posługiwanie się wyłącznie metodami genetycznymi nie przyniesie pełnego zrozumienia fizjologicznych i patologicznych procesów zachodzących w ludzkim organizmie. Jeśli przyszłe badania nad chorobami uwarunkowanymi środowiskowo, a nie wyłącznie dziedziczonymi mają być pełne, wykorzystanie metod proteomicznych będzie niezbędnym uzupełnieniem badań genetycznych.

Bibliografia

[1] Ban TA. PHARMACOTHERAPY OF MENTAL ILLNESS - A HISTORICAL ANALYSIS. :19.

[2] Müller U, Fletcher PC, Steinberg H. The origin of pharmacopsychology: Emil Kraepelin's experiments in Leipzig, Dorpat and Heidelberg (1882–1892). Psychopharmacology (Berl). 2006;184(2):131-138. doi:10.1007/s00213-005-0239-5

[3] Masters JR. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. Nat Rev Cancer. 2002;2(4): 315-319. doi:10.1038/nrc775

[4] Rubin EH, Zorumski CF. Perspective: Upcoming Paradigm Shifts for Psychiatry in Clinical Care, Research, and Education. Acad Med. 2012;87(3):261. doi:10.1097/ACM.0b013e3182441697

[5] Ban TA. Towards a clinical methodology for neuropsychopharmacological research. Neuropsychopharmacol Hung Magy Pszichofarmakologiai Egyesulet Lapja Off J Hung Assoc Psychopharmacol. 2007;9(2):81-90.

[6] Brown T. Genomy.

[7] Silberring J, Kraj A. Proteomika. Wydział Chemii UJ; 2004.

[8] Silberring J, Suder P, Bodzoń A. Spektrometria Mas. Kraków: Wydawnictwo AGH; 2016.

[9] Zuccoli GS, Martins-de-Souza D, Guest PC, Rehen SK, Nascimento JM. Combining Patient-Reprogrammed Neural Cells and Proteomics as a Model to Study Psychiatric Disorders. In: Guest PC, ed. Proteomic Methods in Neuropsychiatric Research. Vol 974. Cham: Springer International Publishing; 2017:279-287. doi: 10.1007/978-3-319-52479-5_26

[10] Ramos A, Rodríguez-Seoane C, Rosa I, et al. Proteomic Studies Reveal Disrupted in Schizophrenia 1 as a Player in Both Neurodevelopment and Synaptic Function. Int J Mol Sci. 2018;20(1): 119. doi:10.3390/ijms20010119

[11] Reference GH. DISC1 gene. Genetics Home Reference. https://ghr.nlm.nih.gov/gene/DISC1.

Accessed April 14, 2019.
[12] Blackwood DHR, Fordyce A, Walker MT, St. Clair DM, Porteous DJ, Muir WJ. Schizophrenia and Affective Disorders—Cosegregation with a Translocation at Chromosome 1q42 That Directly Disrupts Brain-Expressed Genes: Clinical and P300 Findings in a Family. Am J Hum Genet. 2001;69(2):428-433.
[13] Schlicht K, Büttner A, Siedler F, et al. Comparative proteomic analysis with postmortem prefrontal cortex tissues of suicide victims versus controls. J Psychiatr Res. 2007;41(6):493-501. doi:10.1016/j.jpsychires.2006.04.006
[14] Zarogianni E, Moorhead TWJ, Lawrie SM. Towards the identification of imaging biomarkers in schizophrenia, using multivariate pattern classification at a single-subject level. NeuroImage Clin. 2013;3:279-289. doi:10.1016/j.nicl.2013.09.003
[15] Shi W, Du J, Qi Y, et al. Aberrant expression of serum miRNAs in schizophrenia. J Psychiatr Res. 2012;46(2):198-204. doi:10.1016/j.jpsychires.2011.09.010
[16] Schwarz E, Guest PC, Rahmoune H, et al. Identification of a biological signature for schizophrenia in serum. Mol Psychiatry. 2012;17(5):494-502. doi:10.1038/mp.2011.42

Rola układu glimfatycznego w ośrodkowym układzie nerwowym a hipoteza uprzywilejowania mózgu

Aleksandra Rzeszuto
Koło Naukowe Studentów Biotechnologii „Mygen”
Zakład Biochemii Fizycznej
Wydział Biochemii, Biotechnologii i Biofizyki
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie
aleksandra.rzeszuto@student.uj.edu.pl
Praca napisana pod opieką dr hab. Sylwii Kędrackiej-Krok, prof. UJ

Najmniej poznanym organem w ludzkim ciele jest mózg. Jego anatomia, fizjologia i współoddziaływanie z innymi organami oraz układami nie zostały w pełni opisane. W szczególności, zakres i sposób komunikacji pomiędzy mózgiem a układem immunologicznym są wciąż słabo zbadane i pozostają niejasne. Mózg jest organem o najwyższym zapotrzebowaniu na energię, co skutkuje wysokim poziomem szkodliwych produktów przemiany materii. Jednak mózg nie posiada połączenia z układem limfatycznym odpowiedzialnym za oczyszczanie płynu międzytkankowego. Sformułowana w połowie ubiegłego wieku hipoteza „uprzywilejowania mózgu” została podana w ostatnich latach rewizji m.in. z powodu odkrycia układu glimfatycznego. Utworzona przez komórki gleju przestrzeń okołonaczyniowa stanowi kanał umożliwiający oczyszczanie płynu mózgowo-rdzeniowego oraz płynu międzytkankowego mózgu z produktów przemiany materii i rozpuszczalnych białek, a także pozwalający na redystrybucję czynników odżywczych, wzrostowych i neuromodulatorów. Co ciekawe, eliminacja toksycznych produktów zachodzi szczególnie intensywnie podczas snu. Niniejsza praca przedstawia aktualny stan wiedzy na temat immunologicznego uprzywilejowania mózgu oraz układu glimfatycznego.

Wstęp

Każda żywa komórka, w wyniku prowadzonego przez nią metabolizmu, wytwarza produkty uboczne przemiany materii. Metabolity te są usuwane z wnętrza komórki do przestrzeni pozakomórkowej, gdzie wraz z limfą trafiają do węzłów chłonnych. Limfa jest płynem tkankowym (ang. *interstitial fluid*, ISF) przepływającym przez naczynia limfatyczne i zawierającym komórki układu odpornościowego. Układ limfatyczny stanowi ważną część układu odpornościowego. Chroni on organizm przed zakażeniami, między innymi bakteryjnymi oraz wirusowymi, oraz umożliwia cyrkulację i filtrację

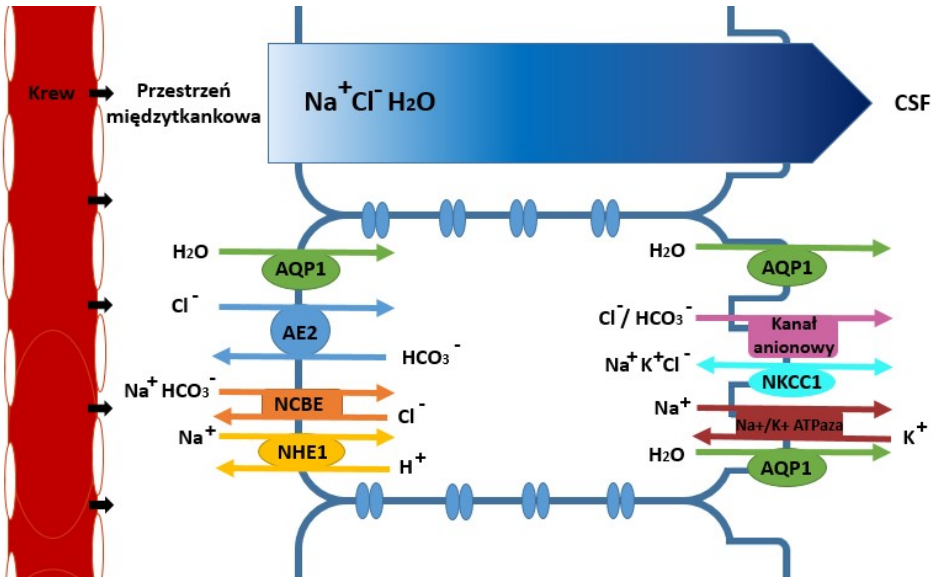
płynów ustrojowych. Zapotrzebowanie energetyczne mózgu jest 10 razy większe niż wskazywałaby na to jego masa i stanowi ono 30% - 70% całkowitej energii dostarczanej organizmowi [1]. Pomimo tak intensywnego metabolizmu, w badaniach histologicznych mózgu *post mortem* nie odkryto jego połączenia z naczyniami limfatycznymi oraz systemem drenującym limfę. Postulowano, że właśnie z powodu braku tego typu połączeń, centralny układ nerwowy nie wykazuje typowej dla innych tkanek odpowiedzi prozapalnej. Naukowcy zaobserwowali, że allobądź ksenoprzeszczepy wykazują przedłużony czas przeżycia, gdy zostaną transplantowane do wnętrza mózgu w porównaniu do czasu ich przeżycia w innych tkankach [2]. Na tej podstawie sformułowano hipotezę o „uprzywilejowaniu mózgu" (ang. *brain privilige*) lub „uprzywilejowaniu immunologicznym" (ang. *immune privilige*), która stanowiła przełom w dotychczasowym postrzeganiu układu nerwowego.

Bariery ochronne mózgu

Mózg, jako centralny narząd układu nerwowego, jest chroniony na wielu poziomach przed czynnikami szkodliwymi pochodzenia wewnętrznego i zewnętrznego. Ochronę przed urazami mechanicznymi stanowią opony mózgowo-rdzeniowe, zaś znajdujący się pomiędzy nimi płyn mózgowo-rdzeniowy (ang. *cerebrospinal fluid*, CSF) służy jako amortyzator. Fizyczną barierą przed szkodliwymi czynnikami jest bariera krew-mózg (ang. *blood-brain barrier*, BBB) selektywnie przepuszczająca substancje oraz kontrolująca migrację komórek układu odpornościowego pomiędzy mózgiem a jego obwodem [3]. Oddziela ona układ krwionośny od tkanki nerwowej. BBB zbudowana jest z wysoce wyspecjalizowanych komórek endotelialnych naczyń włosowatych mózgu, stopek końcowych astrocytów oraz perycytów [3]. Komórkami chroniącymi mózg przed patogenami jest mikroglej. Jego funkcja jest podobna do roli obwodowych makrofagów, między innymi reguluje on mikrośrodowisko w mózgu oraz usuwa zbędne synapsy. Ponadto mikroglej monitoruje i reguluje aktywność neuronów [4,5]. Ważne funkcje protekcyjne wewnątrz mózgu pełnią również astrocyty. Są one zdolne do usuwania wolnych rodników oraz do produkcji neuroprotekcyjnych cytokin i chemokin [6]. Mikroglej stanowi mniej niż 10% populacji komórek nieneuronalnych w mózgu, zaś astrocyty 19-40%. Pozostałe 45-75% to oligodendrocyty [7]. Pomimo uprzywilejowania immunologicznego, mózg jest również narażony na stany zapalne oraz uszkodzenia mechaniczne. Stan zapalny działa jako tak zwany „miecz obosieczny", czyli może zarówno indukować śmierć komórki jak i sprzyjać jej regeneracji [8]. Mimo to większość chorób neurodegeneracyjnych wykazuje znamiona stanu zapalnego, co świadczy o występowaniu nieprawidłowych (opóźnionych bądź nasilonych) mechanizmów obronnych układu odpornościowego w mózgu w warunkach patologicznych.

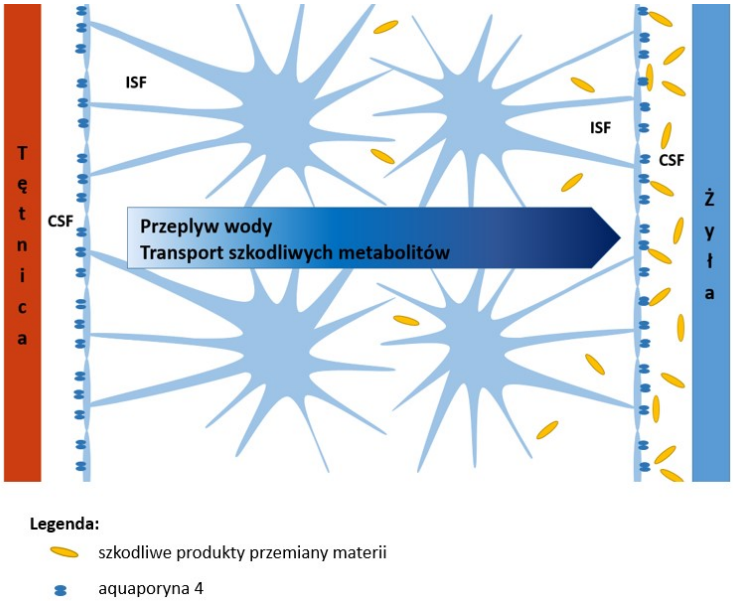
Układ glimfatyczny

Badania opublikowane w 1968 roku wykazały przedłużony czas od przeszczepu do jego odrzucenia po usunięciu najbliższych węzłów chłonnych w pobliżu miejsca przeszczepu [9]. Wydłużony czas przeżycia tkanek poddanych allotransplantacji do wnętrza mózgu można zatem wytłumaczyć brakiem obecności węzłów chłonnych oraz naczyń limfatycznych w okolicy czaszki [2]. W mózgu mechaniczną i immunologiczną rolę ochronną pełni płyn mózgowo-rdzeniowy (ang. *cerebrospinal fluid*, CSF) i płyn międzytkankowy – glimfa. Skład glimfy różni się od od limfy na obwodzie i charakteryzuje się m.in. zmniejszą zawartością białka [10]. Produkcja CSF przez komórki epitelialne splotu naczynówkowego (Ryc. 1) jest regulowana przez wymianę i transport jonów (Cl^-, Na^+, HCO_3^-). Różnice w ich stężeniach generują gradient osmotyczny, który wymusza przepływ wody zawartej w krwi do mózgu [11]. CSF krąży od komory bocznej mózgu do jego komory czwartej [12]. Już w latach 80 stwierdzono doświadczalnie, że istnieje połączenie



Ryc. 1. Produkcja CSF przez komórki epitelialne splotu naczyniowego [15]. Pompa sodowo-potasowa (Na^+/K^+ ATPaza) wytwarza gradient elektrochemiczny jonów Na^+. Ich transport z przestrzeni międzykomórkowej jest możliwy dzięki obecności kotransporterów NCBE (ang. *sodium-driven chloride bicarbonate exchanger*) oraz NHE1 (ang. *sodium/hydrogen exchanger 1*). Zwiększone stężenie jonów wodorowęglanowych we wnętrzu komórek epitelialnych jest regulowane przez białko AE2 (ang. *anion exchange protein 2*), które wypompowując jony HCO_3^- transportuje jony chlorkowe. Ich nadmiar kontrolowany jest przez NKCC1 (ang. *solute carrier family 12 member 2*). Sumaryczny gradient jonów HCO_3^-, Cl^- oraz Na^+ wywołuje gradient osmotyczny wewnątrz komórki i powoduje przepływ wody przez akwaporynę 1 (AQP1) - kanał wodny umożliwiający pasywny transport wody przez błony od przestrzeni międzytkankowej do CSF.

między przestrzenią okołonaczyniową wypełnioną przez CSF, systemem naczyń krwionośnych oplatających mózg i astrocytami [13]. Jednak dopiero w 2012 roku odkryto system nazwany układem glimfatycznym (ang. *glymphatic system*), przedstawiony na Ryc 2., który umożliwia odfiltrowanie rozpuszczalnych białek i metabolitów z ośrodkowego układu nerwowego. Odbywa się to poprzez przepływ CSF przez kanały utworzone pomiędzy ścianami naczyń krwionośnych i wypustkami astrocytalnymi [12]. Następnie CSF przepływa przez miąższ mózgu, gdzie występuje już jako ISF. Produkty uboczne metabolizmu są usuwane z parenchymy poprzez przestrzeń okołożylną do oponowych naczyń limfatycznych lub przez przestrzeń okołoneuronalną wzdłuż nerwu węchowego do szyjnych naczyń limfatycznych [14]. Nieustanny przepływ CSF i ISF jest napędzany przez ciągłą produkcję CSF, co wytwarza różnice ciśnień i wyznacza kierunek przepływu cieczy [15]. Nieprawidłowe usuwanie makroskopowych zanieczyszczeń z CSF i ISF może przyczyniać się do powstawania chorób neurodegeneracyjnych, takich jak na przykład choroba Alzheimera [16]. Co więcej, BBB nie jest przepuszczalna dla większych cząsteczek, np. lipidów. Ludzki mózg stanowi 2% masy ciała dorosłego człowieka, ale zawiera w sobie aż 25% cał-



Ryc. 2. Transport wody przez układ glimfatyczny [15].
CSF przenika przez BBB. AQP4 znajdująca się wypustkach astrocytalnych transportuje wodę do miąższu mózgu. ISF przepływając między komórkami wymywa produkty uboczne przemiany materii. Następnie jest transportowany przez AQP4 w błonach wypustek astrocytalnych do przestrzeni między wypustkami astrocytalnymi a ścianami naczyń krwionośnych. ISF wpływa do układu limfatycznego poprzez szyjne naczynia limfatyczne i łączy się z limfą. Dokładny mechanizm przenikania szkodliwych produktów przemiany materii przez wypustki astrocytarne pozostaje dalej nieznany.

kowitego cholesterolu [15]. Układ glimfatyczny wraz z astrocytami pełni kluczową rolę w transporcie lipidów i substancji w nich rozpuszczonych do mózgu [15]. Ponadto jest on również związany z dystrybucją glukozy, aminokwasów, czynników wzrostu i neuromodulatorów [15]. Zwiększona aktywność układu glimfatycznego występuje podczas snu, a w okresie czuwania jest ona zahamowana [15]. Sugeruje to, iż sen sprzyja oczyszczaniu CFS i ISF z szkodliwych produktów ubocznych metabolizmu i neurotoksyn produkowanych w okresie czuwania i zwiększonej aktywności mózgu. W okresie spoczynku zmniejsza się ciało komórkowe astrocytów i neuronów, zwiększając objętość przestrzeni międzykomórkowej, co umożliwia łatwiejszy przepływ cieczy przez tkankę [17]. Sprawność układu glimfatycznego spada wraz z wiekiem na skutek między innymi zwiększonej apoptozy astrocytów, zmniejszonej produkcji i obniżonego ciśnienia CSF [15].

Rola akwaporyny 4 w gospodarce wodnej

Przepływ CSF do ISF w przestrzeni międzykomórkowej wewnątrz mózgu oraz usuwanie rozpuszczonych w ISF białek są uwarunkowane przez integralne błonowe białko – akwaporynę 4 (ang. *aquaporin 4*, AQP4), która tworzy pory selektywnie przepuszczalne dla wody [15,16]. Białko to jest obficie ekspresjonowane na wypustkach astrocytarnych tworzących BBB. Kanały AQP4 występują gęsto na stopkach astrocytów otaczających zarówno tętnice jak i żyły. Zasadniczą rolą AQP4 jest zmniejszanie oporów w przepływie CSF z przestrzeni okołotętniczej do ISF oraz z ISF do przestrzeni okołożylnej. Monomer AQP4 zbudowany jest z sześciu domen transbłonowych stworzonych przez α-helisę. Funkcjonalne tetrameryczne białko AQP4 jest dwustronnym kanałem wodnym o średnicy wynoszącej 2,8 Å, wykluczającym przejście cząsteczek większych niż woda [18]. We wnętrzu kanału znajduje się arginina, która uniemożliwia przedostanie się jonu hydroniowego i innych kationów do wnętrza astrocytów. W mózgu białko to jest ekspresjonowane w astrocytach i stanowi ich specyficzny marker. AQP4 znajduje się w wypustkach astrocytów, gdzie łączy się z kompleksem białkowym związanym z dystrofiną [18]. Dzięki tym właściwościom jako białko kanałowe oraz cząsteczka adhezyjna, białko to jest nazywane „adhnnel" od połączania angielskich słów *„adhesion"* i *„channel"* [18]. AQP4 tworzy specyficzne kwadratowe lub ortogonalne skupiska (ang. *orthogonal arrays of particles*, OAP) uwidocznione w zdjęciach metodą głębokiego zamrażania-rytowania (*freeze-fracture*) w mikroskopii elektronowej [19]. Białko wykazuje specyficzną lokalizację dzięki spolaryzowanej błonie astrocytów. Zagęszczenie AQP4 w wypustkach tworzących BBB jest 10-krotnie większe niż w innych obszarach błony komórkowej [18]. AQP4 występuje w postaci wielu funkcjonalnych izoform. Najczęściej występujące, M1 i M23, różnią się między sobą zdolnością do adhezji

[20] oraz tworzenia skupisk [18]. Komórki glejowe ekspresjonujące w większości AQP4M1 produkują mniejsze OAP o słabszej sile adhezji między błonami, natomiast przewaga izoformy AQP4M23 zapewnia większe i silniej adhezyjne skupiska, co zapewnia wytrzymałość na wypadek zwiększonego przepływu wody wywołanego większą różnicą w osmotyczności [20]. OAP są bardzo mocno upakowane, AQP4 występuje w nich w gęstości 500-600 cząsteczek/um^3 [18]. Fakty te świadczą o dużym wpływie AQP4 na tworzenie BBB oraz układu glimfatycznego, który jest zależny od napływu wody do mózgu. Zwiększona ekspresja białka i mRNA dla AQP4 została zaobserwowana w wielu chorobach takich jak: bakteryjne zapalenie opon mózgowych, krwotok podpajęczynówkowy, krwotok śródmózgowy, wodogłowie czy guzy mózgu [18]. U myszy pozbawionych kopii genu kodującego AQP4 efektywność usuwania z CFS podanych dokomorowo znakowanych zanieczyszczeń, takich jak np. amyloid beta, była o połowę niższa [15]. Głównie na tej podstawie uważa się, że AQP4 jest zaangażowana w oczyszczanie płynu międzytkankowego z produktów przemiany materii i rozpuszczalnych białek. Dokładny mechanizm tego procesu nie jest jednak poznany. Dalsze badania nad powiązaniem AQP4 z chorobą Alzheimera są konieczne w celu ustalenia, czy nieprawidłowa lokalizacja białka AQP4 jest skutkiem, czy przyczyną zwiększonego gromadzenia amyloidu beta przez układ glimfatyczny [21]. Zaburzoną efektywność układu glimfatycznego, powiązaną ze zmienną ekspresją AQP4, zaobserwowano również w przypadku demencji, procesu starzenia się, udaru oraz urazowego uszkodzenia mózgu [21]. Rola AQP4 i układu glimfatycznego w zachowaniu homeostazy mózgu nie została powszechnie zaakceptowana. Obecnie trwa debata, w której autorzy doniesień kwestionują wplyw AQP4 na transport ISF oraz metabolitów wtórnych [22], jednakże wyniki większości badań potwierdzają istotną rolę AQP4 w oczyszczaniu ISF w mózgu [23].

Rewizja hipotezy „uprzywilejowania mózgu”

Brak penetracji BBB przez komórki reprezentujące antygen oraz występowanie fizycznej bariery BBB związane z teorią „uprzywilejowania immunologicznego” nie jest odosobnione ani takie wyjątkowe, jak się wcześniej wydawało. Tego rodzaju uprzywilejowanie dotyczy również oka, jąder, mieszków włosowych, czy też płodu [24]. Rodzą się też wątpliwości co do słuszności hipotezy uprzywilejowania w kontekście najnowszych badań dowodzących, że limfocyty T są w stanie przekroczyć BBB podczas braku stanu zapalnego [25]. Ponadto, zaktywowane limfocyty T w stanach zapalnych rozpoznają antygeny w obrębie ośrodkowego układu nerwowego z taką samą szybkością jak w innych nieuprzywilejowanych immunologicznie miejscach [8]. Zaproponowano również hipotezę „mimikry molekularnej” tłumaczącą występowanie chorób autoimmunologicznych w mózgu. Według niej wzmo-

żona odpowiedź immunologiczna wobec patogenów o podobnej strukturze molekularnej, jak endogenne cząsteczki występujące w ośrodkowym układzie nerwowym, powoduje atak na komórki rodzime organizmu, co zaobserwowano m.in. w stwardnieniu rozsianym [8]. Co więcej, ksenotransplantowane do komory mózgowej tkanki są odrzucane, w przeciwieństwie do przeszczepu tkanek wgłąb mózgu[25]. Co istotne, wykazano też, że CFS wpływa do szyjnych węzłów chłonnych łącząc się z układem limfatycznym [25]. Wszystkie te doniesienia poddają hipotezę „uprzywilejowania immunologicznego" w wątpliwość. Aktualnie wydaje się, że fenomen „uprzywilejowania mózgu" polega głównie na zahamowaniu nabytej odpowiedzi immunologicznej opartej na limfocytach odpowiadających na obecność antygenu [8]. W przypadku odporności swoistej limfocyty T są aktywowane lokalnie poprzez obecność antygenu wywołując tym samym reakcję zapalną. Zróżnicowane limfocyty T będące w stanie rozpoznać antygen nie migrują do mózgu, ale w odpowiedzi na jego obecność wzmagają produkcję interleukiny 10 oraz transformującego czynnika wzrostu beta (TGF-β). W mózgu funkcjonuje nieswoisty mechanizm obronny układu odpornościowego, czyli rekrutacja i aktywacja lokalnie obecnych makrofagów [8]. Nie ma wątpliwości, że mózg charakteryzuje się nietypową odpowiedzią immunologiczną, ale nie jest on zupełnie odseparowany od układu immunologicznego, jak wcześniej sądzono. Postuluje się, że bariera epitelialna i endotelialna BBB posiada przedziały zróżnicowane pod względem przepuszczalności dla komórek układu immunologicznego [25]. Obwodowe komórki tego układu penetrujące mózg, makrofagi i leukocyty, regulują działanie komórek mikogleju i *vice versa* [4]. Limfocyty T na stałe zasiedlają spot naczyniówkowy i przestrzeń oponową dorosłego mózgu. Wpływają one na procesy myślenia i zapamiętywania oraz regulują proces neurogenezy. Podobnie jak mikroglej, astrocyty mogą funkcjonować jako komórki reprezentujące antygen. Reasumując, mózg i układ immunologiczny komunikują się na wiele sposobów i wzajemnie na siebie wpływają.

Podsumowanie

Mózg jest kluczowym organem dla funkcjonowania organizmów złożonych, który ewolucyjnie został odseparowany od układu krwionośnego i limfatycznego przez fizyczną barierę – BBB, w celu zapewnienia homeostazy tego organu. Ze względu na wysoką aktywność metaboliczną mózgu występuje tu zwiększona produkcja produktów ubocznych metabolizmu oraz produktów szkodliwych i neurotoksyn. Ich usunięcie z CSF na drodze prostej dyfuzji jest niemożliwe ze względu na selektywną przepuszczalność błon tworzących BBB. Niedawno odkryty układ glimfatyczny napędzany przez przepływ płynu zapewniony przez skupiska AQP4 astrocytów jest systemem odpowiedzialnym za szlaki oczyszczające CFS i IF z zanieczyszczeń [15]. Dokładniejsze poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za funkcjonowanie

tego układu pozwoliło na wyłonienie nowych hipotez dotyczących patogenezy chorób ośrodkowego układu nerwowego i zmieniło punkt widzenia na znaczenie snu w chorobach neurodegeneracyjnych. Nie wszyscy naukowcy zgadzają się z teorią „uprzywilejowania mózgu", jednakże dzięki niej możliwe było odkrycie układu glimfatycznego i lepsze poznanie funkcjonowania mózgu.

Bibliografia

[1] Tomasi D, Wang G-J, Volkow ND. Energetic cost of brain functional connectivity. Proc Natl Acad Sci. 2013;110: 13642–13647. doi:10.1073/pnas.1303346110

[2] Widner H, Möller E, Brundin P, Björklund A. Immunological aspects of neural grafting in the mammalian central nervous system. Prog Brain Res. 1988;78: 303–307. doi:10.1016/S0079-6123(08)60297-6

[3] Gürsoy-özdemir Y, Tas YC. Anatomy and Physiology of the Blood-Brain Barrier. Nanotechnol Methods Neurol Dis Brain Tumors Drug Deliv across Blood-Brain Barrier. Elsevier Ltd; 2017; 1–13. doi:10.1016/B978-0-12-803796-6.00001-0

[4] Carson MJ. Microglia as liaisons between the immune and central nervous systems: Functional implications for multiple sclerosis. Glia. 2002;40: 218–231. doi:10.1002/glia.10145

[5] Colonna M, Butovsky O. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. Annu Rev Immunol. 2017;35: 441–468. doi:10.1146/annurev-immunol-051116-052358

[6] Choi SS, Lee HJ, Lim I, Satoh JI, Kim SU. Human astrocytes: Secretome profiles of cytokines and chemokines. PLoS One. 2014;9. doi:10.1371/journal.pone.0092325

[7] von Bartheld CS, Bahney J, Herculano-Houzel S. The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. J Comp Neurol. 2016;524: 3865–3895. doi:10.1002/cne.24040

[8] Carson MJ, Doose JM, Melchior B, Schmid CD, Ploix CC. CNS immune privilege: Hiding in plain sight. Immunol Rev. 2006;213: 48–65. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00441.x

[9] Response POF, Wilson BYDB. The role of afferent lymphatics in the rejection of skin homografts. J Exp Med. 1968;128: 197–221.

[10] Benveniste H, Heerdt PM, Fontes M, Rothman DL, Volkow ND. Glymphatic System Function in Relation to Anesthesia and Sleep States. Anesth Analg. 2019;128: 747–758. doi:10.1213/ANE.0000000000004069

[11] Damkier HH, Brown PD, Praetorius J. Cerebrospinal Fluid Secretion by the Choroid Plexus. Physiol Rev. 2013;93: 1847–1892. doi:10.1152/physrev.00004.2013

[12] Louveau A, Harris TH, Kipnis J. Revisiting the Mechanisms of CNS Immune Privilege. Trends Immunol. Elsevier Ltd; 2015;36: 569–577. doi:10.1016/j.it.2015.08.006

[13] Rennels ML, Gregory TF, Blaumanis OR. Evidence for a ' Paravascular ' Fluid Circulation in the Mammalian Central Nervous System, Provided by the Rapid Distribution of Tracer Protein Throughout the Brain from the Subarachnoid Space. Brain Reserch. 1985;326: 47–63.

[14] Johnston M, Zakharov A, Papaiconomou C, Salmasi G, Armstrong D. Evidence of connections between cerebrospinal fluid and nasal lymphatic vessels in humans, non-human primates and other mammalian species. Cerebrospinal Fluid Res. 2004;1: 1–13. doi:10.1186/1743-8454-1-2

[15] Jessen NA, Munk ASF, Lundgaard I, Nedergaard M. The Glymphatic System: A Beginner's Guide. Neurochem Res. Springer US; 2015;40: 2583–99. doi:10.1007/s11064-015-1581-6

[16] Goldman SA, Benveniste H, Deane R, Wang M, Iliff JJ, Nagelhus EA, i in. A Paravascular Pa-

thway Facilitates CSF Flow Through the Brain Parenchyma and the Clearance of Interstitial Solutes, Including Amyloid Beta. Sci Transl Med. 2012;4: 147ra111-147ra111. doi:10.1126/scitranslmed.3003748

[17] Cedernaes J, Osorio RS, Varga AW, Kam K, Schiöth HB, Benedict C. Candidate mechanisms underlying the association between sleep-wake disruptions and Alzheimer's disease. Sleep Med Rev. 2017;31: 102–111. doi:10.1016/j.smrv.2016.02.002

[18] Nagelhus EA, Ottersen OP. Physiological Roles of Aquaporin-4 in Brain. Physiol Rev. 2013;93: 1543–1562. doi:10.1152/physrev.00011.2013

[19] Rash JE, Yasumura T, Hudson CS, Agre P, Nielsen S. Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. Proc Natl Acad Sci. 2002;95: 11981–11986. doi:10.1073/pnas.95.20.11981

[20] Walz T, Fujiyoshi Y, Engel A. The AQP structure and functional implications. Handb Exp Pharmacol. 2009; 31–56. doi:10.1007/978-3-540-79885-9_2

[21] Rasmussen MK, Mestre H, Nedergaard M. The glymphatic pathway in neurological disorders. Lancet Neurol. Elsevier Ltd; 2018;17: 1016–1024. doi:10.1016/S1474-4422(18)30318-1

[22] Smith AJ, Yao X, Dix JA, Jin B-J, Verkman AS. Test of the „glymphatic" hypothesis demonstrates diffusive and aquaporin-4-independent solute transport in rodent brain parenchyma. Elife. 2017;6: 1–16. doi:10.7554/elife.27679

[23] Mestre H, Hablitz LM, Xavier ALB, Feng W, Zou W. Aquaporin-4-dependent glymphatic solute transport in the rodent brain. : 1–42.

[24] Routy JP, Routy B, Graziani GM, Mehraj V. The kynurenine pathway is a double-edged sword in immune-privileged sites and in cancer: Implications for immunotherapy. Int J Tryptophan Res. 2016;9: 67–77. doi:10.4137/IJTR.S38355

[25] Engelhardt B, Vajkoczy P, Weller RO. The movers and shapers in immune privilege of the CNS. Nat Immunol. 2017;18: 123–131. doi:10.1038/ni.3666

Jak drożdże produkują kannabinoidy?

Aleksandra Buchaj[1], Jakub Knurek[2]
[1]Studenckie Koło Naukowe Biologów
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
[2]Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Biochemii i Biotechnologii
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
aleksandra.buchaj@gmail.com
Praca przygotowana pod opieką mgr. Jakuba Knurka

Unikalna interakcja kannabinoidów z ludzkim układem endokannabinoidowym umożliwia stosowanie tych związków jako środków terapeutycznych. W ciągu ostatniej dekady prawodawstwo w wielu krajach stało się bardziej liberalne, co znacznie ułatwia badania nad kannabinoidami. Nadal istnieją jednak liczne ograniczenia dotyczące produkcji kannabinoidów jako leków. Odpowiedzią na ten problem może być rozwój biotechnologii. Naukowcy z Uniwersytetu w Berkeley wyprodukowali drożdże zmodyfikowane genetycznie, które syntetyzują czyste kannabinoidy. Substratem w tej reakcji był cukier prosty, galaktoza. W swoim badaniu wykazali także, że wprowadzenie kwasów tłuszczowych o zmiennej długości do środowiska zmodyfikowanych komórek drożdży umożliwiło syntezę analogów kannabinoidów niewystępujących w przyrodzie. Poniższy artykuł ma na celu przedstawienie procesu opracowania tego eksperymentu oraz stanu wiedzy na temat metod modyfikacji *Saccharomyces cerevisiae* i biosyntezy kannabinoidów w tym modelu.

Wstęp

Inżynieria genetyczna polega na wprowadzaniu zmian do genomów organizmów w celu nadania im nowych, pożądanych cech. Modyfikacja organizmów i komórek zachodzi poprzez wprowadzenie określonego fragmentu kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA) pobranego z organizmu zwanego dawcą do komórek innego organizmu, czyli biorcy, przy pomocy dostępnych narzędzi badawczych. Geny, które są korzystne z punktu widzenia człowieka, mogą być dodawane do genomu i poddawane ekspresji. Przykładem takiego podejścia jest stworzenie zmodyfikowanych genetycznie drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*) syntetyzujących kannabinoidy (THC, CBD oraz ich analogi niewystępujące naturalnie) z galaktozy [1]. Rozwój alternatywnej techniki produkcji może umożliwić rozszerzenie badań nad tymi substancjami i wykorzystanie ich do celów leczniczych.

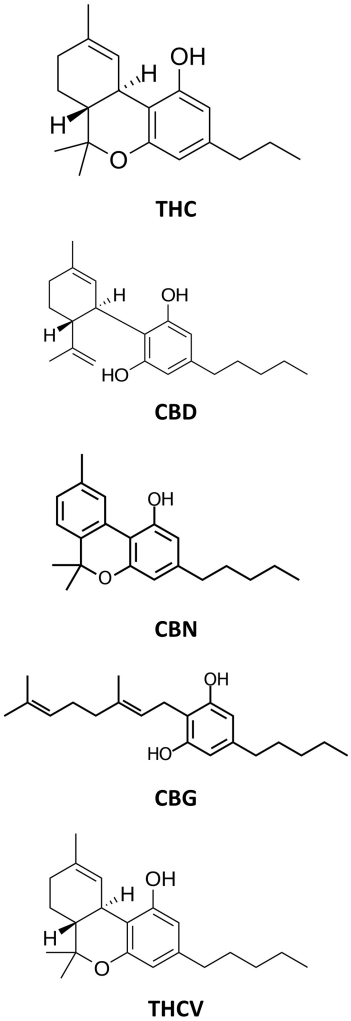
„Medyczna marihuana” stała się w ostatnim czasie tematem licznych

sporów w domenie publicznej. Nawet pomimo jej legalizacji (w Polsce w 2017 roku), wprowadzający ją do obiegu kierownicy aptek często spotykają się z ostracyzmem społecznym. Taka sytuacja tworzy zapotrzebowanie na merytoryczne uzasadnienie zalet płynących z korzystania z medycznej marihuany, czego dowodem są liczne artykuły naukowe i popularnonaukowe. Artykuł ten ma na celu podniesienie świadomości społecznej w zakresie terapeutycznych zastosowań tego surowca farmaceutycznego.

„Medyczna marihuana”

Na wstępie warto zaznaczyć, że „medyczna marihuana” to produkt pochodzący z części roślin *Cannabis sativa* uprawianych według ściśle ustalonych norm jakościowych. Produkowana jest ona w postaci suszu, aerozolu, tabletek lub wyciągu olejowego [2]. Aktywnymi składnikami tego produktu jest grupa kannabinoidów, do których zaliczamy m. in. kannabidiol (ang. *cannabidiol*, CBD) i tetrahydrokannabinol (ang. *tetrahydrocannabinol*, THC) - Ryc. 1. Właśnie te dwie substancje wykazują największy potencjał terapeutyczny [3]. Do innych kannabinoidów zaliczamy m.in. kannabinol (ang. *cannabinol*, CBN), kannabigerol (ang. *cannabigerol*, CBG) czy tetrahydrokannabiwarin (ang. *tetrahydrocannabivarin*, THCV).

W świetle współczesnych badań perspektywy nowych zastosowań związków aktywnych konopi jawią się jako remedium na schorzenia, które przysparzają wiele cierpień. Preparaty zawierające kannabinoidy, które można używać do celów medycznych są popularne w Europie Zachodniej oraz Stanach Zjednoczonych. Główne zagrożenia należy rozpatrywać w kontekście skuteczności tych środków oraz bezpieczeństwa ich stosowania [4]. Społecznie podawana w wątpliwość jest także kwestia uzależnienia od tych preparatów i możliwości wprowadzenia chorych w odmienne stany świadomości.



Ryc. 1. Kannabinoidy występujące w marihuanie [opracowanie własne].

Receptory kannabinoidowe (głównie CB1R i CB2R) wchodzące w skład układu endokannabinoidowego są odpowiedzialne za pamięć, odczuwanie bólu, zdolności psychomotoryczne i funkcje poznawcze. Należą one do rodziny receptorów sprzężonych z białkiem G. Receptory CB1R rozmieszczone są głównie w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym, a w mniejszym stopniu w mięśniach szkieletowych, tkance tłuszczowej, wątrobie i innych narządach. Receptory CB2R zlokalizowane są głównie w błonach komórek układu immunologicznego. Aktywacja tych receptorów wywołuje inhibicję cyklazy adenylanowej, co prowadzi do obniżenia poziomu cAMP w środowisku, powoduje zamknięcie kanałów jonowych dla wapnia, a także reguluje szlaki metaboliczne związane z kinazami MAPK, JNK i PI3K, które biorą udział w regulacji proliferacji komórek, kontroli cyklu komórkowego i śmierci komórki [5].

Związki kannabinoidowe wpływają na reakcje psychiczne i samopoczucie: łagodzą napięcie wywołane przez sytuacje stresowe, zmniejszają wrażliwość na ból, potęgują głód i pobudzają apetyt, działają przeciwwymiotnie oraz regulują motorykę przewodu pokarmowego. Są szeroko wykorzystywane w medycynie m. in. w terapiach schorzeń neurologicznych [6-9], leczeniu nowotworów [10], schorzeń sercowonaczyniowych [11] oraz w dermatologii [12]. Obserwowani pacjenci objęci opieką medyczną, stosujący środki, w których skład wchodzą kannabinoidy, wykazują większą poprawę zdrowia w porównaniu do grupy kontrolnej. Obecnie w Stanach Zjednoczonych wprowadzono na rynek preparaty, które zawierają kannabinoidy w uregulowanym stężeniu (np. Sativex, Epidolex, Marinol, Canemes, olejki konopne CBD i inne) [14]. Prowadzone są także badania kliniczne, mające na celu wprowadzenie nowych produktów, zawierających syntetycznie wytworzone kannabinoidy. W zależności od struktury badanego związku odkrywane są nowe właściwości neuromodulujące i immunomodulujące [15].

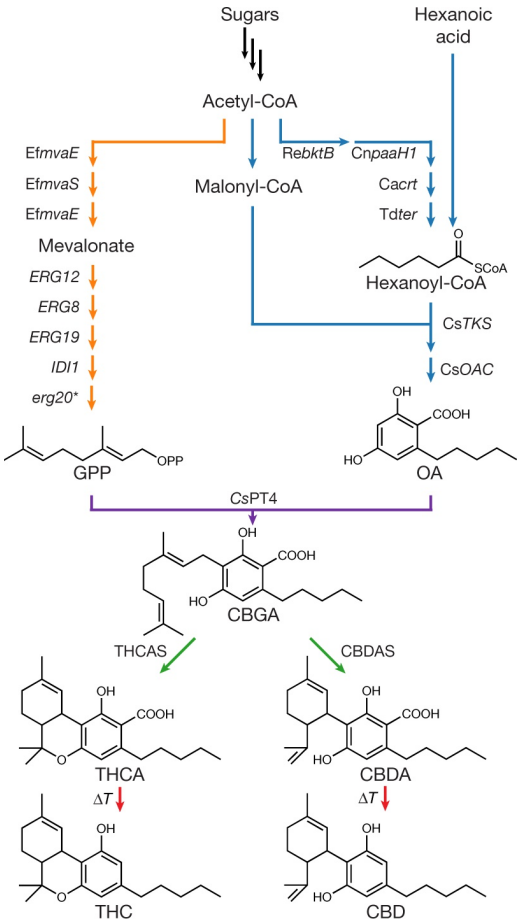
Sposób na rekombinację drożdży

Jako organizmy modelowe badacze z Berkeley wybrali drożdże, ponieważ są one organizmami eukariotycznymi, a ich genom jest zdefiniowany i skatalogowany w postaci bazy SGD [1]. Funkcjonalność genomiki drożdży oraz znajomość ich podatności na transfer i ekspresję genów heterogenicznych umożliwiła stworzenie tzw. drożdżowej platformy ekspresyjnej, która została wykorzystana do syntezy kannabinoidów [17]. Platformy tego typu posiadają wiele „gorących punktów” mutacji (ang. *hotspots*), w których (preferencyjnie) może zachodzić rekombinacja genetyczna. W 2008 roku powstała mapa „gorących punktów” rekombinacji w drożdżach piekarniczych (*Saccharomyces cerevisiae*) [18]. Analiza porównawcza między drożdżami piekarniczymi i gatunkiem dziko żyjącym wykazała zależność liczby i zmienności/konserwacji „gorących punktów” od dynamiki krzy-

żowania między organizmami [19]. Jest to istotne z punktu widzenia miejsc, do których można przyłączyć geny kodujące białka heterologiczne umożliwiające ekspresję genów kodujących syntezę kannabinoidów.

Opracowany szlak biosyntezy do syntezy kannabinoidów w *S. cerevisiae* rozpoczął się od wprowadzenia do drożdży konopnych kaset ekspresyjnych *CsTKS* i *CsOAC*, które umożliwiły syntezę kwasu oliwetolowego, który jest związkiem pośrednim do produkcji kannabinoidów. Aby zwiększyć ilość tego produktu w komórkach, dążono do zwiększenia ilości heksanoilo-CoA. Wytwarzano go drogą heterologicznego szlaku biosyntetycznego, stosując geny z *Ralstonia eutropha* (Re*bktB*), *Cupriavidus necator* (Cn*paaH1*), *Clostridium acetobutylicum* (Ca*crt*) i *Treponema denticola* (Td*ter*) lub przez podawanie kwasu heksanowego jako substratu dla enzymu aktywującego grupę acylową (AAE; kodowanego przez Cs*AAE1* z *Cannabis*) [20]. Powstały kwas oliwetolowy był pierwszym z produktów niezbędnych do syntezy kwasu kanabigerolowego (ang. *cannabigerolic acid*, CBGA). Drugim składnikiem koniecznym do syntezy kannabinoidów był pirofosforan geranylu (ang. *geranyl pyrophosphate*, GPP). Aby go zsyntetyzować naukowcy wprowadzili do komórek drożdży geny z *Enterococcus faecalis* - Ef*mvaE* i Ef*mvaS* oraz wywołali nadekspresję genów szlaku mewalonianu (*ERG12*, *ERG8*, *ERG19* i *IDI1*) i zmutowanego genu *ERG20*. Powstały mewalonian był pośrednim produktem szlaku syntezy GPP. Dalsza synteza CBGA zachodziła dzięki obecności genu Cs*PT4* [21]. Kwas kanabigerolowy przekształcono w kwasy kannabinoidowe (THCA i CBDA) przy użyciu syntaz kannabinoidowych THCAS i CBDAS, które także zostały przetransferowane do drożdży. W wyniku ekspozycji na ciepło, THCA i CBDA ulegały dekarboksylacji odpowiednio do THC i CBD (Ryc. 2).

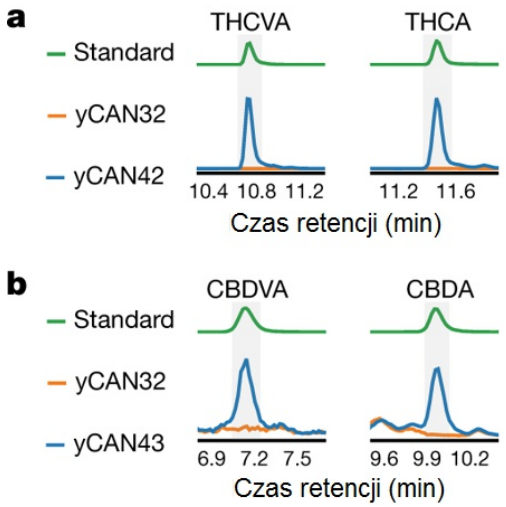
Pierwszym szczepem, który wytworzył CBGA z galaktozy był szczep yCAN32. Stanowił on kontrolę odniesieniową dla dalszych modyfikacji szczepów,



Ryc. 2. Biosynteza kannabidiolu i tetrahydrokannabinolu w modelu drożdżowym [1].

mających na celu syntezę czystych kannabinoidów. Cel ten został zrealizowany przez szczepy yCAN42 (produkujące THCA) oraz yCAN43 (produkujące CBDA). Kluczowym punktem było zastąpienie fragmentu N-terminalnego peptydów sygnałowych syntaz (THCAS i CBDAS) informacją o kierowaniu enzymów do wakuoli tak, aby umożliwić ich funkcjonalność i integrację z substratami. W celu detekcji produkowanych związków wykorzystano metodę chromatografii cieczowej ze spektrometrem masowym (LC-MS), która wykazała odpowiednią czułość do analizy porównawczej (Ryc. 3). Wprowadzenie dodatkowych kopii enzymów szlaku zwiększyło ogólną produkcję kannabinoidów [17].

Warto zauważyć, że do modelu drożdżowego z sukcesem udało się wprowadzić geny kodujące biotransformację i bioaktywację szlaków enzymatycznych. Potwierdza to elastyczność genetyczną drożdży *Saccharomyces cerevisiae* jako organizmu modelowego. Maksymalizacja produkcji kannabinoidów w tych warunkach jest ściśle określona farmakokinetyką tych substancji [24]. W dalszych badaniach naukowcy potwierdzili, że wprowadzenie kwasów tłuszczowych o zmiennej długości łańcucha do środowiska umożliwiło syntezę analogów kannabinoidów, które nie występują w przyrodzie [1]. Obecnie prowadzone są badania dotyczące możliwości wykorzystania tych substancji w terapiach oraz ich właściwości epigenetycznych [22, 23].



Ryc. 3. Chromatogramy LC-MS potwierdzające produkcję THCVA, THCA, CBDVA and CBDA in vitro [1, zmodyfikowane].

Podsumowanie

Biosynteza kannabinoidów w komórkach drożdży jest kolejnym kamieniem milowym do ich wykorzystania w produkcji środków medycznych. Wytworzone w ten sposób substancje są tańsze w produkcji niż w przypadku tradycyjnego sposobu pozyskiwania. Optymalizacja metodyki umożliwia izolację określonych ilości substancji, które następnie mogą zostać połączone z innymi związkami, które umożliwią najkorzystniejsze wykorzystanie ich właściwości terapeutycznej. Co więcej, jest to bezpieczniejszy i bardziej przyjazny dla środowiska sposób produkcji kannabinoidów.

„Medyczna marihuana", a nawet syntetyczne kannabinoidy nadal mają liczne grono przeciwników. Jednak substancje te przy odpowiednim dawkowaniu mogą pomóc w leczeniu niektórych chorób lub uśmierzyć związany z nimi ból, którego nie zwal-

czają tradycyjne terapie. Zezwolenie na stosowanie tych środków w uzasadniony medycznie sposób jest kolejną drogą niesienia pomocy pacjentom.

Bibliografia

[1] Luo X, Reiter MA, D'espaux L, et al. Complete biosynthesis of cannabinoids and their unnatural analogues in yeast. Nature. 2019.

[2] United Patients Group, Ways of Consuming Medical Marijuana, https://unitedpatientsgroup.com/resources/methods-of-consumption

[3] Cascio MG, Pertwee RG, Marini P (2017) The Pharmacology and Therapeutic Potential of Plant Cannabinoids. in: Chandra ., Lata H, El Sohly M (eds) Cannabis sativa L. - Botany and Biotechnology. Springer, Cham.

[4] Mordor Intelligence, Cannabis Market Size , segmented by Usage (Medical, Recreational), By Crop Variety (Cannabis Indica, Cannabis Sativa), By Geography , Growth, Trends, and forecast to (2019-2024).

[5] Zou S, Kumar U. Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. Int J Mol Sci. 2018;19(3).

[6] Giacoppo S, Mandolino G, Galuppo M, Bramanti P, Mazzon E. Cannabinoids: new promising agents in the treatment of neurological diseases. Molecules. 2014;19(11):18781-816.

[7] Rosenberg EC, Tsien RW, Whalley BJ, Devinsky O. Cannabinoids and Epilepsy. Neurotherapeutics. 2015;12(4):747-68.

[8] Russo EB. Cannabis Therapeutics and the Future of Neurology. Front Integr Neurosci. 2018;12:51.

[9] Hill KP, Palastro MD, Johnson B, Ditre JW. Cannabis and Pain: A Clinical Review. Cannabis Cannabinoid Res. 2017;2(1):96-104.

[10] Chakravarti B, Ravi J, Ganju RK. Cannabinoids as therapeutic agents in cancer: current status and future implications. Oncotarget. 2014;5(15):5852-72.

[11] Mendizábal VE, Adler-Graschinsky E. Cannabinoids as therapeutic agents in cardiovascular disease: a tale of passions and illusions. Br J Pharmacol. 2007;151(4):427-40.

[12] Mounessa JS, Siegel JA, Dunnick CA, Dellavalle RP. The role of cannabinoids in dermatology. J Am Acad Dermatol. 2017;77(1):188-190.

[13] Kogan NM, Mechoulam R. Cannabinoids in health and disease. Dialogues Clin Neurosci. 2007;9(4):413-30.

[14] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (2018), Medical use of cannabis and cannabinoids: questions and answers for policymaking, Publications Office of the European Union, Luxembourg.

[15] Tanasescu R, Gran B, Constantinescu CS. The endocannabinoid system: a revolving plate in neuro-immune interaction in health and disease. Amino Acids. 2013;45(1):95-112.

[16] Rine J. A future of the model organism model. Mol Biol Cell. 2014;25(5):549-53.

[17] Zirpel B, Degenhardt F, Martin C, Kayser O, Stehle F. Engineering yeasts as platform organisms for cannabinoid biosynthesis. J Biotechnol. 2017;259:204-212.

[18] Mancera E, Bourgon R, Brozzi A, Huber W, Steinmetz LM. High-resolution mapping of meiotic crossovers and non-crossovers in yeast. Nature. 2008;454(7203):479-85.

[19] Tsai IJ, Burt A, Koufopanou V. Conservation of recombination hotspots in yeast. Proc Natl Acad Sci USA. 2010;107(17):7847-52.

[20] Carvalho Â, Hansen EH, Kayser O, Carlsen S, Stehle F. Designing microorganisms for heterologous biosynthesis of cannabinoids. FEMS Yeast Res. 2017;17(4).

[21] Valliere MA, Korman TP, Woodall NB, et al. A cell-free platform for the prenylation of natural products and application to cannabinoid production. Nat Commun. 2019;10(1):565.

[22] Kumar A, Premoli M, Aria F, et al. Cannabi-

mimetic plants: are they new cannabinoidergic modulators?. Planta. 2019.
[23] Heinbockel T, Csoka AB. Epigenetic Effects of Drugs of Abuse. Int J Environ Res Public Health. 2018;15(10).
[24] Hryhorowicz S, Walczak M, Zakerska-Canaszak O, Słomski R, Skrzypczak-Zielińska M. Pharmacogenetics of Cannabinoids. Eur J Drug Metab Pharmacokinet. 2018;43(1):1-12.

Publikacja w Acta Mygenica XVI

Zachęcamy do publikacji w kolejnym numerze Zeszytów Naukowych "Acta Mygenica" Koła Naukowego Studentów Biotechnologii "Mygen". Akceptujemy artykuły przeglądowe i badawcze o tematyce z zakresu lifescience. Najlepsze z nadesłanych artykułów zostaną opublikowane w **XVI wydaniu** "Acta Mygenica" w październiku 2019.
Termin nadsyłania abstraktów mija 4 października, natomiast artykułów oraz zgód opiekuna naukowego - 11 października.

W razie pytań prosimy o kontakt z Arturem Blatem.
(artur330@vp.pl).

Poprzednie edycje zeszytów naukowych „Acta Mygenica” oraz szczegółowe informacje są dostępne pod adresem:
www.mygen.wbbib.uj.edu.pl/dzialalnosc/actamygenica