CORE
Metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
Provided by Srinakharinwirot University: SWU e-Journals System

การใช้ *C. elegans* เป็นโมเดลเพื่อศึกษาโรคอัลไซเมอร์

Using *C. elegans* as A Model for the Study of Alzheimer's Disease

นิพนธ์ปริทัศน์ | Review Article

รุ่งเพชร แก้วเกษ*
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องครักษ์ จ.นครนายก
* **ติดต่อผู้นิพนธ์:** roongpet@swu.ac.th
วารสารไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ 2556;8(4):175-185

Roongpetch Keowkase*
Faculty of Pharmacy, Srinakharinwirot University, Ongkharak, Nakhonnayok, Thailand
* **Corresponding author:** roongpet@swu.ac.th
Thai Pharmaceutical and Health Science Journal 2013;8(4):175-185

บทคัดย่อ

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*) ซึ่งเป็นพยาธิตัวกลมได้ถูกนำมาใช้เป็นโมเดลในการศึกษาโรคที่เกี่ยวกับความเสื่อมของเซลล์ประสาท (neurodegenerative diseases) หลายชนิดรวมถึงโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) แม้ว่า *C. elegans* เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีวิวัฒนาการที่ห่างจากมนุษย์มาก แต่มีการค้นพบว่ายีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคต่าง ๆ ในมนุษย์สามารถพบได้ใน *C. elegans* เช่น พบยีนที่คล้ายคลึงกับยีนที่ทำให้เกิดโรคอัลไซเมอร์เช่น amyloid precursor protein (*APP*), presenilin 1 (*Psn-1*) และ presenilin 2 (*Psn-2*) นอกจากนี้ยังสามารถศึกษาพิษของ amyloid β (Aβ) จากการใช้โมเดล *C. elegans* ได้ นักวิจัยได้พยายามที่จะเลียนแบบการเกิดโรคอัลไซเมอร์โดยใช้โมเดล *C. elegans* เพื่อที่จะเข้าใจกลไกในระดับโมเลกุลของการเกิดโรคอัลไซเมอร์ ในบรรดาโมเดลการทดลองนอกกาย (*in vitro*) และในกาย (*in vivo*) ของโรคอัลไซเมอร์ โมเดล transgenic *C. elegans* ที่มีการดัดแปลงทางพันธุกรรมให้มีการแสดงออกของ Aβ มีข้อได้เปรียบหลายประการ เช่น มีอายุขัยสั้น มีกายวิภาคที่ไม่ซับซ้อน ราคาไม่แพง ง่ายต่อการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เป็นต้น ในบทความนี้จะได้อธิบายถึงการสร้างโมเดลโรคอัลไซเมอร์ใน *C. elegans* และความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับโรคอัลไซเมอร์ที่ได้จากการใช้โมเดล *C. elegans*

คำสำคัญ: โรคอัลไซเมอร์, อะไมลอยด์บีตา, *C. elegans*

Abstract

The nematode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) has been intensively employed as a model organism to study a number of neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease (AD). Although *C. elegans* is phylogenetically distant from human, a majority of genes linked to human diseases are conserved in this organism. *C. elegans* has homologues of AD-associated human genes such as amyloid precursor protein (*APP*) and both presenilins, *Psn-1* and *Psn-2*. In addition, neurotoxic properties linked with amyloid β (Aβ) can be studied in this organism. Using *C. elegans* model, researchers have attempted to imitate the pathological process of AD for better understanding of the molecular mechanisms of the disease. Among many *in vitro* and *in vivo* models used for studying AD, transgenic *C. elegans* expressing human Aβ has shown its own advantages, including its relatively short life span, simple anatomy, and low cost to maintain in culture in standard laboratory. This review provides an overview of modeling AD in *C. elegans* and highlights some recent advances that this "simple" animal has contributed to our understanding of AD in recent years.

Keywords: Alzheimer's disease, amyloid β (Aβ), *C. elegans*

บทนำ

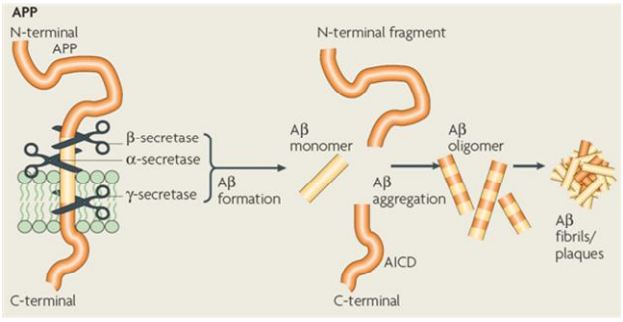
Caenorhabditis elegans (*C. elegans*) ได้ถูกนำมาใช้เป็นโมเดลสำหรับโรคที่เกี่ยวกับความเสื่อมของเซลล์ประสาท (neurodegenerative diseases) หลายโรค เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) โรคฮันติงตัน (Huntington's disease) เป็นต้น ความก้าวหน้าในการศึกษาวิจัยในโรคเหล่านี้ค่อนข้างช้ากว่าโรคอื่น ๆ การรักษาโรคอัลไซเมอร์ในปัจจุบันนี้ก็เป็นการรักษาแบบชะลอการดำเนินของโรคเท่านั้น สาเหตุที่เป็นเช่นนี้ส่วนหนึ่งอาจเนื่องมาจากความเข้าใจที่ไม่เพียงพอเกี่ยวกับโรคเหล่านี้ ซึ่งมีสาเหตุมาจากการที่โรคเหล่านี้เป็นโรคที่เกี่ยวกับสมองซึ่งมีความสลับซับซ้อนทำให้ยากต่อการศึกษา อีกทั้งยังขาดโมเดลของสัตว์ทดลองที่ดีพอ การค้นพบยีนและโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคและการพัฒนาของเทคโนโลยีพันธุวิศวกรรมในการสร้าง transgenic animal (สัตว์ดัดแปลงพันธุกรรม) ทำให้นักวิจัยสามารถเข้าใจเกี่ยวกับโรคเหล่านี้ได้มากขึ้น ในบทความนี้จะได้กล่าวถึงโรคอัลไซเมอร์ การสร้างโมเดล transgenic *C. elegans* เพื่อใช้ในการศึกษาโรคอัลไซเมอร์ในแง่ของหลักการและเหตุผลในการพัฒนาโมเดลชนิดนี้ สิ่งที่ควรพิจารณาในการสร้างโมเดลเพื่อให้ได้โมเดลที่ดีและเหมาะสมในการนำมาใช้ในงานวิจัยเกี่ยวกับโรคอัลไซเมอร์ และสิ่งสำคัญคือโมเดลที่พัฒนาขึ้นนี้ทำให้เรียนรู้อะไรบ้าง

โรคอัลไซเมอร์

โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease; AD) เป็นโรคที่พบบ่อยในบรรดาโรคสมองเสื่อม (dementia) โดยคิดเป็น 50 - 60% ของโรคสมองเสื่อมทั้งหมด ในปัจจุบันมีประชากรทั่วโลกป่วยเป็นโรคอัลไซเมอร์ประมาณ 35 ล้านคน[1] ปัจจัยเสี่ยงสำคัญที่ทำให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ คือ อายุ โดยอุบัติการณ์การเกิดโรคอัลไซเมอร์จะเพิ่มขึ้น 2 เท่าในทุก ๆ 5 ปีที่อายุเพิ่มขึ้นในผู้ที่มีอายุตั้งแต่ 65 ปีขึ้นไป และจากการที่ปัจจุบันนี้ผู้คนมีอายุที่ยืนยาวขึ้น มีการคาดการณ์ว่าจำนวนของคนที่ป่วยเป็นโรคอัลไซเมอร์จะเพิ่มขึ้นประมาณ 4 เท่า ในอีก 40 ปีข้างหน้า[2] อาการที่พบได้ในผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ในระยะแรกคือการสูญเสียความจำระยะสั้น เช่น จำข้อมูลที่เรียนรู้เมื่อไม่นานมานี้ไม่ได้ เมื่อโรคดำเนินไประยะหนึ่ง

ผู้ป่วยจะสูญเสียความจำระยะยาว มีความบกพร่องทางปัญญา (cognitive impairment) สูญเสียความสามารถทางภาษา มีพฤติกรรมที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น อารมณ์แปรปรวน หวาดระแวง หลงผิด เป็นต้น ต่อมาจะสูญเสียการทำงานต่าง ๆ ของร่างกาย และเสียชีวิตในที่สุด โดยมากผู้ป่วยจะเสียชีวิตภายใน 3 - 9 ปี หลังจากได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคอัลไซเมอร์ [1] แม้ว่าจะมียาที่ได้รับการพัฒนาเพื่อรักษาโรคอัลไซเมอร์ แต่ยาเหล่านี้เป็นเพียงแค่ช่วยชะลอการดำเนินของโรค ปัจจุบันยังไม่มียาที่สามารถรักษาโรคอัลไซเมอร์ได้

ในแง่ของลักษณะทางพยาธิวิทยา ในสมองของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์จะพบว่ามีลักษณะที่สำคัญทางพยาธิวิทยา 2 ประการคือ amyloid plaques และ neurofibrillary tangles (NFTs)[1,3] องค์ประกอบที่สำคัญของ amyloid plaques คือ amyloid β (Aβ) ซึ่งเป็นเปปไทด์ขนาดเล็กประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 40 หรือ 42 ตัว เปปไทด์เหล่านี้ได้มาจากการเมแทบอลิซึมของโปรตีน amyloid precursor protein (APP) ด้วยเอนไซม์ 2 ชนิดคือ β-secretase (β-site APP-cleaving enzyme 1 หรือ BACE-1) และ γ-secretase (เป็นโปรตีนเชิงซ้อนประกอบด้วยโปรตีน presenilin 1 และ presenilin 2 ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยา) (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 การเมแทบอลิซึมของโปรตีน APP สายโปรตีน APP ถูกตัดด้วยเอนไซม์ 2 ชนิดคือ β-secretase และ γ-secretase ได้เป็น Aβ การตัดด้วย β-secretase ทำให้ได้ปลายด้านที่มีหมู่อะมิโน (N-terminal) ส่วนการตัดด้วย γ-secretase จะเป็นตัวกำหนดความยาวของ Aβ (เช่น ได้เป็น $Aβ_{1-40}$ หรือ $Aβ_{1-42}$) หลังจากนั้น Aβ จะเกาะกลุ่มกันเป็น Aβ oligomer และหลายๆ Aβ oligomers เกาะกลุ่มกันกลายเป็น Aβ fibrils หรือ amyloid plaques ส่วน α-secretase จะตัดสายโปรตีน APP ภายใน Aβ domain จึงไม่ทำให้เกิดการสร้าง Aβ นอกจากนี้การเมแทบอลิซึมของโปรตีน APP ยังทำให้ได้สายเปปไทด์อื่น ๆ เช่น N-terminal fragment และ Aβ intracellular cytoplasmic domain (AICD)[4]

$Aβ_{1-40}$ เป็นเปปไทด์ที่พบมากกว่าแต่มีความเป็นพิษน้อยกว่า $Aβ_{1-42}$[1,4] นอกจากนี้โปรตีน APP ยังสามารถถูกเมแทบอลิซึมได้ด้วยเอนไซม์ α-secretase และ β-secretase ซึ่งในกรณีนี้จะไม่ทำให้เกิดการสร้างเปปไทด์ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ พบว่าการเมแทบอลิซึมของ APP ที่ไม่สมดุลย์ระหว่างการสร้างและการกำจัดออกของ Aβ เป็นสาเหตุที่ทำให้มีการสะสมของ Aβ และการที่มี Aβ ที่มากเกินไปนี้เป็นปัจจัยสำคัญในการทำให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ นำมาซึ่งการตั้งสมมติฐาน “amyloid hypothesis” [5-7] ที่กล่าวว่าการสะสมของ Aβ เป็นปัจจัยสำคัญในการขับเคลื่อนให้มีการดำเนินไปของโรค

“Amyloid hypothesis” เป็นสมมติฐานที่น่าสนใจเนื่องจากยีนที่สร้างโปรตีน APP อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 21 และผู้ป่วยที่มีโครโมโซมคู่ที่ 21 เกินมา 1 แท่ง (trisomy 21) ดังที่พบในผู้ป่วยที่เป็นกลุ่มอาการดาวน์ (Down syndrome) ทั้งหมดล้วนแสดงอาการของโรคอัลไซเมอร์เมื่ออายุประมาณ 40 ปี[8,9] และมีหลักฐานยืนยันจากงานวิจัยพบว่าการเกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ของยีน *Psn-1* (ยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีน presenilin 1), *Psn-2* (ยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีน presenilin 2), และ *APP* (ยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีน APP)[10-12] เป็นผลทำให้มีการกระตุ้นให้มีการสร้าง Aβ ที่มากเกินไปและมีผลทำให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ชนิดเกิดเร็ว (early-onset familial Alzheimer’s disease, FAD) หรือที่เรียกว่าอัลไซเมอร์ชนิด familial นอกจากนี้ ยังมียีนอื่นที่เป็นยีนที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคอัลไซเมอร์ชนิดเกิดช้า (late-onset Alzheimer’s disease) หรือที่เรียกว่าอัลไซเมอร์ชนิด sporadic เช่นยีน *APoE* โดยที่พบว่าคนที่มี *ApoE ε4* alleles จะมีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคอัลไซเมอร์มากกว่าคนที่มี *ApoE ε3* alleles ถึง 7 เท่า[13,14] กลไกที่ทำให้ยีน *ApoE ε4* alleles ส่งเสริมให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ยังไม่ทราบแน่ชัดแต่เชื่อว่ายีน *ApoE ε4* alleles มีผลทำให้การกำจัดออกของ Aβ ลดลง จากหลักฐานที่กล่าวมานี้ทำให้เชื่อว่าการสะสมของ Aβ เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ ตารางที่ 1 แสดงปัจจัยทางพันธุกรรมที่มีผลทำให้เกิดโรคอัลไซเมอร์

ตารางที่ 1 ปัจจัยทางพันธุกรรมที่มีผลทำให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ [5]

โครโมโซม (คู่ที่)	ยีนและความบกพร่อง	ลักษณะที่แสดงออก (Phenotype)
21	APP mutation	เพิ่มการสร้าง Aβ
19	ApoE4 polymorphism	ลดการกำจัดออกของ Aβ
14	Presenilin 1 mutation	เพิ่มการสร้าง Aβ
1	Presenilin 2 mutation	เพิ่มการสร้าง Aβ

นอกจาก amyloid plaques แล้ว เรายังพบ neurofibrillary tangles ในสมองของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ โดยที่ neurofibrillary tangles ประกอบด้วยโปรตีน tau ที่มีการเติมหมู่ฟอสเฟตที่มากผิดปกติ (hyperphosphorylated microtubule-associated tau)[15] ในสภาวะปกติ จะพบโปรตีน tau มากที่บริเวณ axon โดยโปรตีน tau เป็นโปรตีนที่มีหน้าที่ช่วยค้ำจุนและรักษาเสถียรภาพของ microtubule แต่ถ้าหากอยู่ในสภาวะที่มีความผิดปกติ จะมีการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ที่โปรตีน tau มากผิดปกติเรียกว่าเกิด hyperphosphorylation มีผลทำให้ความสามารถของโปรตีน tau ในการจับกับ microtubule ลดลง ทำให้โปรตีน tau แยกตัวออกมาจาก microtubule ส่งผลให้มีการสลายตัวของ microtubule มีผลทำให้ระบบการขนส่งในเซลล์ประสาทผิดปกติไป และทำให้เซลล์ประสาทตายในเวลาต่อมา ส่วนโปรตีน tau ที่ถูกเติมหมู่

ฟอสเฟตมากเกินไปและแยกตัวออกมาจาก microtubule จะมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำและจะเกิดการเกาะกลุ่มกัน (aggregation) กลายเป็น paired helical filament และในที่สุดจะรวมกลุ่มกันกลายเป็น neurofibrillary tangles ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทด้วย พบว่าการเกิด neurofibrillary tangles เกิดหลังจากที่มีการสะสมของ Aβ[16] กล่าวคือ เมื่อมีการสะสมของ Aβ ที่มากเกินไปจนเกิดความเป็นพิษจะมีผลกระตุ้นให้มีการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน tau จนกลายมาเป็น neurofibrillary tangles ซึ่งสอดคล้องตามสมมติฐาน “amyloid hypothesis” ที่กล่าวว่าการสะสมของ Aβ เป็นปัจจัยสำคัญในการผลักดันการดำเนินไปของโรค

ความสำคัญของสัตว์ทดลองในการศึกษาโรคอัลไซเมอร์

แม้ว่าการศึกษาในผู้ป่วยที่เป็นโรคอัลไซเมอร์ชนิดเกิดเร็ว (early-onset) จะมีส่วนสำคัญอย่างมากที่ทำให้เราเข้าใจพยาธิวิทยาของโรคอัลไซเมอร์ แต่โรคอัลไซเมอร์ชนิดเกิดเร็ว พบเพียง 5% เท่านั้น[3] โรคอัลไซเมอร์ที่พบโดยส่วนใหญ่แล้วจะเป็นชนิดเกิดช้า (late-onset) และมีรายงานว่าการกลายพันธุ์ของยีนอื่น ๆ เช่น *SORL1*[17] มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคอัลไซเมอร์ชนิดเกิดช้า อย่างไรก็ตาม การศึกษาเพื่อที่จะค้นหายีนเหล่านั้นในมนุษย์มีข้อจำกัด ทั้งในแง่ของวิธีการและจรรยาบรรณการวิจัยในมนุษย์ ดังนั้นสัตว์ทดลองจึงเป็นสิ่งที่มีความสำคัญที่จะช่วยให้เราสามารถค้นหายีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคอัลไซเมอร์และเข้าใจหน้าที่และบทบาทของยีนนั้น ๆ นอกจากนี้สัตว์ทดลองยังมีประโยชน์ในแง่ของการศึกษากลไกของการเกิดโรคอัลไซเมอร์ได้ตั้งแต่ในระยะแรกของการเป็นโรค ในขณะที่การศึกษาในมนุษย์ต้องศึกษาจากเนื้อเยื่อที่ได้จากผู้ป่วยที่เสียชีวิตแล้ว ซึ่งโดยส่วนใหญ่จะเป็นระยะสุดท้ายของการเป็นโรค หากเราสามารถที่จะศึกษาถึงกลไกการเกิดโรคได้ตั้งแต่ในระยะแรกของการเป็นโรคก็จะช่วยให้เราสามารถพัฒนายาหรือหาแนวทางในการรักษาเพื่อที่จะบรรเทาหรือป้องกันการเกิดโรคได้

โมเดล (model) สัตว์ทดลองที่นำมาใช้ในการศึกษาโรคอัลไซเมอร์มีหลายชนิด[18] ดังนี้

- **Spontaneous models** ได้แก่ สัตว์บางประเภท เช่น สุนัข แมว ลิง มีการสร้าง amyloid plaques ขึ้นได้เองตามธรรมชาติร่วมกับการมีความบกพร่องทางปัญญา (cognitive impairment)

- **Chemical-induced rodent models** ได้แก่ การทำให้หนูเกิดภาวะสูญเสียความทรงจำ (amnesia) ด้วยสาร scopolamine โดยเรียกโมเดลนี้ว่า scopolamine-induced amnesia

- **Aβ infusion rodent models** ได้แก่ การฉีด Aβ เข้าไปในสมองของหนูเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดอาการของโรคอัลไซเมอร์เช่น การสูญเสียความทรงจำและมีพฤติกรรมที่เปลี่ยนแปลงไป

- **Transgenic models** ได้แก่การนำเทคโนโลยีพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) มาใช้ในการดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อให้โมเดลนั้นมีคุณสมบัติหรือคุณลักษณะเฉพาะตามที่ต้องการ เช่น ในกรณีของการสร้างโมเดลของโรคอัลไซเมอร์นี้มีการดัดแปลงพันธุกรรมในสัตว์ทดลอง เพื่อให้สัตว์ทดลองมีการสร้าง Aβ เพื่อที่จะใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษากลไกการเกิดโรคและหาแนวทางการรักษาใหม่ ๆ (transgenic หมายถึง สิ่งมีชีวิตที่ได้รับการถ่ายทอดลักษณะทางยีนมาหรือลักษณะพันธุกรรมได้เปลี่ยนแปลงไป)

Transgenic models ที่ใช้ในการศึกษาโรคอัลไซเมอร์

การค้นพบที่ถือว่ามีความสำคัญมากที่สุดในการศึกษาโรคอัลไซเมอร์ คือการค้นพบโปรตีนที่สำคัญ 2 ชนิดคือ 1) Aβ ที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของ amyloid plaques และ 2) microtubule-associated tau ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของ NFTs โดยที่ Aβ ได้มาจากการเมแทบอลิซึมของ APP และดังที่ได้กล่าวในข้างต้นว่าการกลายพันธ์ของยีน *Psn-1*, *Psn-2*, และ *APP* มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคอัลไซเมอร์ชนิดเกิดเร็วนั้นเป็นหลักฐานที่บ่งบอกว่า Aβ มีบทบาทสำคัญในการก่อให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ นำมาซึ่งการตั้งสมมติฐาน “amyloid hypothesis” นอกจากนี้ความสัมพันธ์ของการเกิดการกลายพันธุ์ของยีน tau กับการเกิด familial tauopathy ก็เป็นหลักฐานที่เป็นตัวชี้บทบาทของโปรตีน tau ต่อการเกิดโรคอัลไซเมอร์[19]

โมเดลหลายชนิดได้ถูกสร้างขึ้นเพื่อทดสอบสมมติฐาน “amyloid hypothesis” และใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาหน้าที่ของยีนที่สนใจ โดยได้มีการใช้เทคโนโลยีพันธุวิศวกรรมเพื่อสร้าง transgenic models ต่าง ๆ ดังนี้

1) เซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture) ในเซลล์เพาะเลี้ยงนั้นเราสามารถใส่ยีนที่เราสนใจที่จะศึกษาเข้าไปในเซลล์ แล้วศึกษาผลที่เกิดขึ้น โดยอาจจะมีการทดสอบฤทธิ์ของยาหรือสารที่เราสนใจ ซึ่งการทำการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงจะได้ผลการทดลองที่รวดเร็ว อย่างไรก็ตามการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงซึ่งมีลักษณะเป็น simple monolayer นั้นไม่สามารถที่จะสะท้อนภาพรวมทั้งหมดที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิตได้ นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการเกิดโรค ซึ่งไม่สามารถศึกษาได้ในเซลล์เพาะเลี้ยง ดังนั้นจึงได้มีการสร้างโมเดลอื่น เช่น โมเดลหนูเมาส์ (mouse models) และโมเดลสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (invertebrate models) ขึ้นมาเพื่อที่จะสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษากลไกการเกิดโรคอัลไซเมอร์ในแง่มุมต่าง ๆ ได้หลากหลายมากขึ้น

2) โมเดลหนูเมาส์ (mouse models) ได้มีการดัดแปลงพันธุกรรมในหนูเมาส์เพื่อใช้เป็นโมเดลของโรคอัลไซเมอร์ โดยในปัจจุบันนี้มีการดัดแปลงพันธุกรรมในหนูเมาส์แบ่งเป็น 3 ลักษณะ ดังนี้ 1) ดัดแปลงพันธุกรรมให้หนูเมาส์มีการแสดงออกเฉพาะยีน *APP* 2) ดัดแปลงพันธุกรรมให้หนูเมาส์มีการแสดงออกทั้งยีน *APP* และ *Psn* เรียกหนูสายพันธ์นี้ว่า double transgenic APP/Psn 3)

ดัดแปลงพันธุกรรมให้หนูเมาส์มีการแสดงออกทั้ง 3 ยีน คือ *APP*, *Psn*, และ *Tau* เรียกหนูสายพันธ์นี้ว่า triple transgenic (3xTg) ซึ่งหนูเมาส์ที่ได้มีการดัดแปลงพันธุกรรมเหล่านี้สามารถที่จะเลียนแบบลักษณะพยาธิสภาพบางอย่างของโรคอัลไซเมอร์ได้ เช่น พบ amyloid plaques และมีความคิดความจำที่ผิดปกติ เป็นต้น[20-22] นอกจากนี้ การพบว่ามีการกลายพันธุ์ของยีน *Tau* บนโครโมโซมคู่ที่ 17 (FTDP-17) ในผู้ป่วยความจำเสื่อมชนิด fronto-temporal และในผู้ป่วยโรคพาร์กินสัน ก็ช่วยให้มีการพัฒนาโมเดลของโรคที่เกิดจากความผิดปกติของโปรตีน tau ได้ [23] โดยสรุปแล้วโมเดลเหล่านี้แสดงลักษณะบางประการของโรคอัลไซเมอร์ได้ แต่อย่างไรก็ตามโมเดลเหล่านี้ก็ยังไม่สามารถที่จะแสดงอาการทุกอย่างที่พบในผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ได้ นอกจากนี้ การดัดแปลงพันธุกรรมในหนูทดลองต้องใช้เวลานานและมีค่าใช้จ่ายที่สูง ดังนั้นจึงอาจจะไม่เหมาะสำหรับการทำการตรวจคัด (screening) เพื่อหายาใหม่ที่น่าจะมีประสิทธิภาพในการรักษาโรคอัลไซเมอร์

3) โมเดลสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (invertebrate models) *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) และ *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) เป็นสิ่งมีชีวิตที่ไม่มีกระดูกสันหลัง (invertebrate organisms) ที่ได้มีการศึกษามาอย่างละเอียดแล้วทั้งในแง่กายวิภาคศาสตร์ พัฒนาการและพฤติกรรม ในปัจจุบันนี้ทั้ง *C. elegans* และ *D. melanogaster* จัดว่าเป็น invertebrate models ที่มีการนำมาใช้กันอย่างมากในการศึกษาเกี่ยวกับโรคที่เกี่ยวกับความเสื่อมของเซลล์ประสาท เนื่องจากทั้ง *C. elegans* และ *D. melanogaster* นั้นง่ายต่อการนำมาดัดแปลงทางพันธุกรรมเพื่อทำเป็น transgenic models และสามารถนำมาใช้ทำการคัดกรองเพื่อหายีนที่ผิดปกติในระดับสเกลขนาดใหญ่ได้ ได้มีการดัดแปลงพันธุกรรมทั้งใน *C. elegans* และ *D. melanogaster* เพื่อใช้เป็นโมเดลของโรคอัลไซเมอร์ โดยการดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อให้มีการแสดงออกของ Aβ ซึ่งในบทความนี้จะกล่าวถึงเฉพาะการดัดแปลงพันธุกรรมใน *C. elegans* เท่านั้น โดยจะได้กล่าวถึงรายละเอียดในลำดับต่อไป

การนำ *C. elegans* มาใช้เป็น “model organism”

การนำ *C. elegans* มาใช้เป็น “model organism” มีมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1960 โดยในช่วงแรกนั้นมีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะหาโมเดลสัตว์ทดลองที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นเครื่องมือทางพันธุศาสตร์เพื่อที่จะใช้ในการศึกษากลไกในระดับโมเลกุลในระบบประสาททั้งในแง่ของหน้าที่และการพัฒนาการ ทำให้พบว่า *C. elegans* มีข้อได้เปรียบอย่างมากสำหรับการศึกษาดังกล่าว ข้อได้เปรียบเหล่านั้นได้แก่ วงจรชีวิตสั้น (short life cycle) อายุขัยสั้น (short life span) ผลิตลูกหลานได้มาก ง่ายต่อการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ราคาไม่แพงในการทำการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ง่ายต่อการทำ forward genetic และ reverse genetic (forward and reverse genetic tractability) และมีกายวิภาคที่ไม่ซับซ้อน[24]

C. elegans เป็นพยาธิตัวกลม (nematode) และเป็นสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่อย่างอิสระ (free-living organism) อาศัยอยู่ในดิน *C. elegans* มีขนาดเล็ก โดยขนาดของตัวโตเต็มวัยมีความยาวเพียง 1 มิลลิเมตร มีวงจรชีวิต (life cycle) 3 วัน มีอายุขัย (life span) 3 สัปดาห์ภายใต้การเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ *C. elegans* ส่วนใหญ่ (> 99%) มีสองเพศในตัวเดียวกัน (hermaphrodite) มีการผสมของเซลล์สืบพันธุ์ได้ในตัวเดียวกัน (self-fertilizing) และสามารถที่จะออกไข่ได้ประมาณ 300 ฟอง ภายในสัปดาห์แรกของการโตเป็นตัวเต็มวัย *C. elegans* ประกอบด้วย somatic cell จำนวน 959 เซลล์ และมีเซลล์ประสาท (neuron) จำนวน 302 เซลล์ [25] *C. elegans* ประกอบด้วย 18,000 ยีน และได้มีการทำการหาลำดับของยีน (genome sequencing) อย่างสมบูรณ์ พบว่ามี genetic conservation ระหว่าง *C. elegans* กับมนุษย์ ประมาณ 60%[26,27] นอกจากนี้ *C. elegans* เป็นสิ่งมีชีวิตที่โปร่งใส (transparent) ทำให้สามารถศึกษาพัฒนาการของตัวอ่อน (embryo) และสามารถศึกษาการแสดงออกของยีน (gene expression) ในขณะที่ยังมีชีวิตได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ในตอนเริ่มแรกที่ได้มีการนำ *C. elegans* มาเป็น model organism เมื่อกว่า 40 ปีมาแล้ว มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อเป็นโมเดลสำหรับการศึกษากลไกในระดับโมเลกุลในระบบประสาท นับตั้งแต่นั้นมา *C. elegans* ได้กลายเป็น model organism ที่ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางและการค้นพบที่เกิดขึ้นใน *C. elegans* ทำให้ได้รับรางวัล Nobel Prizes หลายครั้งด้วยกัน เช่นในปี ค.ศ. 2002 สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับ genetic และ programmed cell death ในปี ค.ศ. 2006 สำหรับการค้นพบกลไกการเกิด gene silencing โดยวิธี RNA interference และในปี ค.ศ. 2008 สำหรับการค้นพบเกี่ยวกับ green fluorescence protein (GFP)

ต่อมา *C. elegans* ได้ถูกนำมาใช้เป็น “model organism” ที่มีความสำคัญในการศึกษากลไกในระดับโมเลกุลของโรคที่เกิดในมนุษย์ ได้มีการนำ *C. elegans* มาเป็นโมเดลสำหรับการศึกษาโรคที่เกี่ยวกับความเสื่อมของเซลล์ประสาทที่มีความสัมพันธ์กับอายุ (age-associated neurodegenerative disease) เช่น โรคอัลไซเมอร์ [28,29] โรคพาร์กินสัน[30,31] โรคฮันติงตัน[32] นอกจากนี้ *C. elegans* ยังถูกนำมาใช้เป็นโมเดลในการศึกษาโรคอื่น ๆ เช่น โรคเบาหวาน[33] โรคอ้วน[34] โรคมะเร็ง[35] โดยทั่วไปวิธีการในการสร้าง transgenic *C. elegans* เพื่อเป็นโมเดลสำหรับการศึกษาโรคที่เกิดในมนุษย์จะทำได้ด้วยวิธีการดังนี้

1) Knocking out (mutant) หรือ knocking down (RNAi) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค แล้วศึกษาลักษณะที่แสดงออกหรือลักษณะที่ปรากฏให้เห็น (phenotype)

2) Expressing ยีนของมนุษย์เข้าไปใน *C. elegans* เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดลักษณะที่แสดงออกที่มีความสัมพันธ์กับโรคนั้น ๆ (disease-related phenotype) ยกตัวอย่างเช่น ในโมเดลของโรคพาร์กินสัน ได้มีการใส่ยีนของ human α-synuclein เข้าไปใน *C. elegans* แล้วพบว่าทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทที่สร้างสาร

สื่อประสาท dopamine และการสูญเสียการทำงานของเซลล์ประสาทสั่งการ (motor neuron) ซึ่งเป็นลักษณะเช่นเดียวกับที่พบในผู้ป่วยพาร์กินสัน[30] หรือในกรณีของโรคฮันติงตัน การใส่ Huntington fragment ของมนุษย์ที่ประกอบด้วย polyglutamine (polyQ) เข้าไปใน *C. elegans* ทำให้เกิดการทำงานของเซลล์ประสาทบกพร่องไปและมีการเกาะกลุ่มกัน (aggregation) ของโปรตีนที่ผิดปกติ เช่นเดียวกับที่พบในผู้ป่วยโรคฮันติงตัน[32]

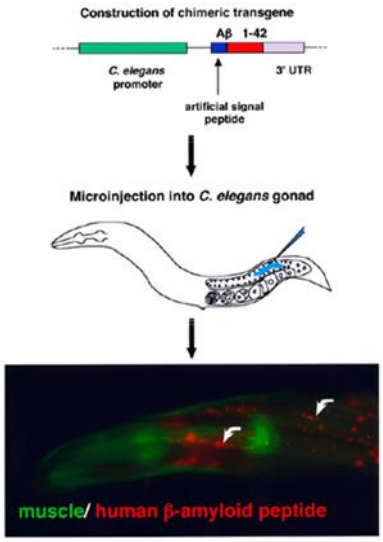
การสร้างโมเดลโรคอัลไซเมอร์ ใน *C. elegans*

การสร้างโมเดล *C. elegans* ตั้งอยู่บนพื้นฐานของสมมติฐาน "amyloid hypothesis" ซึ่งกล่าวว่าการสร้าง Aβ ที่มากเกินไปเป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคอัลไซเมอร์ และถึงแม้ว่าจะมีหลักฐานสนับสนุนทฤษฎีนี้มากมาย แต่ก็ยังมีข้อโต้แย้งเกี่ยวกับกลไกในการเกิดพิษจาก Aβ ในระดับเซลล์และระดับโมเลกุล นำมาซึ่งความต้องการและความจำเป็นของโมเดลที่จะมาช่วยไขปัญหาเหล่านี้ สิ่งสำคัญที่ควรจะพิจารณาเมื่อมีการสร้างโมเดลของโรคใดโรคหนึ่งคือการแสดงออกของยีนที่นำมาใส่ในสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ ควรให้โมเดลที่มีลักษณะที่แสดงออกหรือปรากฏให้เห็น (phenotype) ตามที่ต้องการโดยที่สิ่งมีชีวิตนั้น ๆ ยังคงสามารถที่จะมีชีวิตอยู่และเจริญเติบโตได้ ดังนั้นจึงได้สร้างโมเดลของโรคอัลไซเมอร์ใน *C. elegans* โดยให้มีการแสดงออกของยีนที่เฉพาะเจาะจงต่อเนื้อเยื่อบางชนิด (tissue-specific) เท่านั้น[36]

ข้อควรพิจารณาอีกอย่างหนึ่งโดยเฉพาะในกรณีของการสร้างโมเดลสำหรับโรคอัลไซเมอร์คือจะให้มีการแสดงออกทั้งสายโปรตีน APP หรือจะให้มีการแสดงออกของ Aβ โดยตรง ซึ่งเกือบจะทุกโมเดลของโรคอัลไซเมอร์ในหนูทดลองจะให้มีการแสดงออกของสายโปรตีน APP ซึ่งจะทำให้โมเดลในลักษณะนี้เป็นเครื่องมือที่มีประโยชน์สำหรับการศึกษาเมแทบอลิซึมของโปรตีน APP นอกเหนือจากการศึกษาพิษที่เกิดจากการสะสมของ Aβ ในกรณีของการสร้างโมเดลโรคอัลไซเมอร์ใน *C. elegans* นั้น เนื่องจากพบว่าใน *C. elegans* มียีน *apl-1* ซึ่งสร้างโปรตีนที่คล้ายคลึง (homologous) กับโปรตีน APP ในมนุษย์[37] แต่ยีน *apl-1* นี้ขาดส่วน (region) ที่จะต้องถอดรหัส (encode) ในส่วนของสายเปปไทด์ $A\beta_{1-42}$ นอกจากนี้ยังพบว่าแม้ว่าใน *C. elegans* จะมียีน *sel-1* และ *hop-1* ซึ่งถอดรหัสเป็นเอนไซม์ γ-secretase[38] แต่ไม่มียีนที่สร้างเอนไซม์ β-secretase ดังนั้นการสร้างโมเดลของโรคอัลไซเมอร์ใน *C. elegans* จะสร้างโดยการใส่ยีน Aβ ของมนุษย์เข้าไปใน *C. elegans* และให้มีการแสดงออกของ Aβ นั้นโดยตรง

การสร้าง (construction) และการกำหนดลักษณะ (characterization) ของ transgenic *C. elegans*

การสร้างโมเดล transgenic *C. elegans* ทำได้โดยการฉีดยีนที่มีลักษณะที่ต้องการ (transgene) ซึ่งมีชุดของยีน (gene construct) คือ *unc-54*/Aβ1-42 โดยมี *unc-54* ทำหน้าที่เป็น promoter ทำการฉีด transgene นี้เข้าไปที่ต่อมเพศ (gonad) ของ *C. elegans* เพื่อที่จะให้มีการแสดงออกแบบตลอดเวลา (constitutive expression) ของ Aβ ที่บริเวณเซลล์กล้ามเนื้อ[36] (*unc-54* เป็น promoter ที่ทำให้มีการแสดงออกของยีนเฉพาะที่เซลล์กล้ามเนื้อ) นอกจากนี้ ยังมีการฉีดยีน *rol-6* ซึ่งเป็นยีนเครื่องหมาย (marker gene) ร่วมด้วย ซึ่งมีผลทำให้ transgenic *C. elegans* นี้มีลักษณะการเคลื่อนที่แบบ C-shape ซึ่งต่างจาก *C. elegans* ชนิด wild-type (ที่ไม่ได้มีการฉีด transgene และมีชื่อสายพันธุ์คือ N2) ที่มีลักษณะการเคลื่อนที่แบบ S-shape ซึ่งเป็นวิธีที่ช่วยให้เราสามารถแยกความแตกต่างระหว่าง transgenic *C. elegans* กับ *C. elegans* ที่ไม่ได้รับการฉีด transgene หลังจากนั้นได้มีการทำการตรวจสอบตำแหน่งที่มีการสะสมของ Aβ ด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้ human Aβ-specific antibody ซึ่งจำเพาะเจาะจงกับ Aβ พบว่ามีการสะสม (deposit) ของ Aβ ภายในเซลล์ที่บริเวณกล้ามเนื้อ (body wall muscle) (รูปที่ 2)



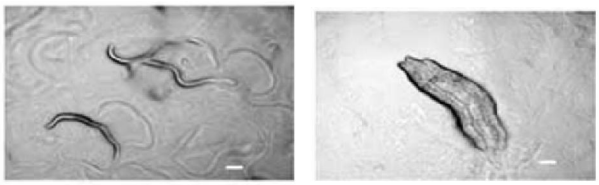
รูปที่ 2 รูปแบบ (schematic) สำหรับการสร้าง transgenic *C. elegans* เพื่อเป็นโมเดลสำหรับโรคอัลไซเมอร์ การสร้าง transgene ทำได้โดยการเชื่อม signal peptide::Aβ1-42 เข้ากับ promoter ของ *C. elegans* แล้วฉีดเข้าที่ gonad หลังจากนั้นสามารถดูการสะสมของ Aβ ด้วยวิธี immunohistochemistry โดยการใช้ human Aβ-specific antibody (monoclonal antibody 4G8) ซึ่งแสดงการสะสมของ Aβ (สีแดง, บริเวณที่ลูกศรชี้) ที่บริเวณเซลล์กล้ามเนื้อ (สีเขียว) ของ transgenic *C. elegans*[36]

transgenic *C. elegans* นี้จะมีลักษณะที่แสดงออก (phenotype) ที่ชัดเจน คือ progressive paralysis ซึ่งการ paralysis ที่เกิดขึ้นใน transgenic *C. elegans* นี้เกิดจากมีการสะสมของ Aβ ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ในเซลล์กล้ามเนื้อทำให้ *C. elegans* สูญเสียความสามารถในการเคลื่อนไหว ได้มีการตั้งชื่อสายพันธุ์ (strain) ของ transgenic *C. elegans* ชนิดนี้ว่า CL2006 (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดงลักษณะเฉพาะของ transgenic *C. elegans*

Strain	Transgene	Expression	Phenotype
N2		Wild type	Wild type movement
CL2006	*unc-54*/Aβ 1-42	Constitutive muscle	Progressive paralysis
CL4176	*myo-3*/Aβ 1-42	Inducible muscle	Rapid paralysis
CL1175	*myo-3*	Control for CL4176	Wild type movement
CL2355	*snb-1*/ Aβ 1-42	Inducible neuronal Aβ 1-42	Reduced chemotaxis, Hypersensitivity to serotonin

นอกจากนี้ยังมีการสร้างโมเดล transgenic *C. elegans* สายพันธุ์ที่ชื่อว่า CL4176 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สร้างขึ้นเพื่อให้การแสดงออกของ Aβ เป็นแบบเหนี่ยวนำ (inducible expression) โดยหมายความว่า transgenic *C. elegans* จะมีการแสดงออกของ Aβ ก็ต่อเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยง transgenic *C. elegans* จาก 16 °C เป็น 23 °C การสร้าง transgenic *C. elegans* สายพันธุ์นี้ทำได้โดยมี *myo-3* เป็น promoter (ทำให้มีการแสดงออกของยีนเฉพาะที่ที่ myosin ของเซลล์กล้ามเนื้อ) และมี 3' untranslated region (3'UTR) ที่ยาวมากผิดปกติ ซึ่งมีผลทำให้การแสดงออกของยีนขึ้นอยู่กับการทำงานของ *smg-1* (เป็น mRNA surveillance system) ซึ่ง *smg-1* จะไม่ทำงาน (inactive) ที่อุณหภูมิ 23 °C มีผลทำให้มีการแสดงออกของ Aβ ซึ่งการแสดงออกของ Aβ นี้จะเกิดขึ้นหลังจากการเปลี่ยนอุณหภูมิจาก 16 °C เป็น 23 °C ภายใน 24 ชั่วโมง[39] มีผลทำให้มีการสะสมของ Aβ ที่เซลล์กล้ามเนื้อและทำให้ *C. elegans* เกิด paralysis ไม่สามารถเคลื่อนไหวได้ รูปที่ 3 (ซ้ายมือ) แสดง transgenic *C. elegans* สายพันธุ์ CL4176 ที่ยังไม่มีการแสดงออกของยีน (non paralysis phenotype) และ รูปที่ 3 (ขวามือ) แสดง transgenic *C. elegans* สายพันธุ์ CL4176 ที่มีการแสดงออกของยีน (paralysis phenotype) หลังจากเปลี่ยนอุณหภูมิจาก 16 °C เป็น 23 °C[40]



รูปที่ 3 ลักษณะจำเพาะของโมเดล transgenic *C. elegans* ของโรคอัลไซเมอร์ การแสดงออกของ Aβ ที่เซลล์กล้ามเนื้อนำไปสู่การเกิด progressive paralysis ของ transgenic *C. elegans* สายพันธุ์ CL4176 โดยรูปซ้ายแสดง transgenic *C. elegans* ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 16 °C สามารถสังเกตรอย (track) ของการเคลื่อนที่ของ transgenic *C. elegans* อย่างชัดเจน ส่วนรูปขวาแสดง transgenic *C. elegans* ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 23 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อให้มีการแสดงออกของ Aβ สังเกตว่าไม่มีรอยของการเคลื่อนที่ของ transgenic *C. elegans* เนื่องจากเกิด paralysis (Scale bar 50 μm)[40]

Transgenic *C. elegans* อีกสายพันธุ์หนึ่งที่สร้างขึ้นโดย Link และคณะ[36] คือสายพันธุ์ CL2355 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่เหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของ Aβ ที่เซลล์ประสาท (inducible, neuronal expression) โมเดลนี้สร้างขึ้นโดยการทำให้มีการแสดงออกของ Aβ ด้วยการใช้ promoter คือ synaptobrevin (*snb-1*) อย่างไรก็ตาม ลักษณะที่แสดงออกของ transgenic *C. elegans* สายพันธุ์นี้จะไม่ค่อยเด่นชัดเท่าไร โดยลักษณะที่แสดงออกได้แก่ การมี chemotaxis ที่น้อยลงต่อ benzaldehyde (reduced chemotaxis) และมีความไวต่อการตอบสนองต่อสารสื่อประสาท serotonin มากขึ้น (hypersensitivity to serotonin)[39] ตารางที่ 2 แสดงลักษณะเฉพาะ (characterization) ของ transgenic *C. elegans* ที่ได้มีการนำมาใช้ในงานวิจัยเกี่ยวกับโรคอัลไซเมอร์

การเกิด paralysis ที่สามารถสังเกตเห็นได้ง่ายจาก transgenic *C. elegans* สายพันธุ์ CL2006 และ CL4176 จัดเป็น phenotype ที่เป็นเครื่องมือในการอ่านผล (readout) ที่สะดวกสำหรับการประเมินพิษที่เกิดจาก Aβ นอกจากนี้ยังมี phenotype อื่นที่เป็นประโยชน์ในโมเดลของ transgenic *C. elegans* เช่นการประเมินการเกิด chemosensation ที่ผิดปกติไปใน transgenic *C. elegans* สายพันธุ์ CL2355 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่เหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของ Aβ ที่เซลล์ประสาท เป็นต้น และจากการที่ *C. elegans* เป็นสิ่งมีชีวิตที่โปร่งใส (transparent) ทำให้สามารถศึกษาการแสดงออกของยีนในขณะที่ยังมีชีวิตได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากคุณสมบัตินี้ของ *C. elegans* ทำให้เราสามารถใช้การมองเห็นการแสดงออกของสารเรืองแสง green fluorescent protein (GFP) ใน *C. elegans* ขณะที่ยังมีชีวิต มาเป็นอีกหนึ่งวิธีการที่ทำให้เราสามารถประเมินผลของการแสดงออกของ Aβ ได้ ยกตัวอย่างเช่น การแสดงออกของ Aβ มีผลทำให้มีการเหนี่ยวนำให้เกิดการถอดรหัส (transcription) ของยีน *hsp-16* (*heat shock protein-16*) จึงได้มีการตัดต่อ transgene ซึ่งประกอบด้วย *hsp-16*/GFP transcriptional reporter เข้าไปใน transgenic *C. elegans* สายพันธุ์ CL4176 และทำการสังเกตการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของ GFP ในเซลล์กล้ามเนื้อพร้อม ๆ ไปกับการเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของ Aβ แม้ว่าวิธีการนี้จะเป็นวิธีทางอ้อมของการวัดการเกิดพิษจาก Aβ แต่วิธีการนี้ซึ่งใช้วิธีวัดการเรืองแสงของสารเรืองแสง GFP (GFP-based readout) จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการตรวจคัดกรองยาด้วยวิธี high throughput screening[41]

ความใกล้เคียงของโมเดล transgenic *C. elegans* กับลักษณะทางพยาธิวิทยาที่เกิดในโรคอัลไซเมอร์

จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าการสร้างโมเดล transgenic *C. elegans* สำหรับโรคอัลไซเมอร์นั้นมีทั้งแบบที่ให้มีการแสดงออกของ Aβ แบบจำเพาะ (specific) ที่เซลล์กล้ามเนื้อและที่เซลล์ประสาท ถึงแม้ว่าโมเดลที่ให้มีการแสดงออกของ Aβ ที่เซลล์ประสาทจะเป็นโมเดลที่ใกล้เคียงกับลักษณะของพยาธิวิทยาที่พบในผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ แต่โมเดลนี้ไม่มี phenotype ที่ชัดเจน อย่างไรก็ตาม โมเดล transgenic *C. elegans* ที่ให้มีการแสดงออก

ของ Aβ ที่เซลล์กล้ามเนื้อก็มีความสัมพันธ์กับโรคที่เกิดในมนุษย์ เช่นโรค Inclusion Body Myositis (IBM) ซึ่งเป็นโรคที่มีความผิดปกติของกล้ามเนื้ออย่างรุนแรง (severe myopathy) ที่เกิดในมนุษย์ โดยเกิดจากการสะสมของ Aβ ในเซลล์กล้ามเนื้อ[42] นอกจากนี้ ยังพบว่าเซลล์หลายชนิดมีความไวต่อการเกิดพิษจากการสัมผัส (exposure) กับ Aβ ซึ่งน่าจะเกี่ยวกับการที่ Aβ มีกลไกการเกิดพิษต่อเซลล์ที่เหมือนกันไม่ว่าจะเป็นเซลล์ใดก็ตาม ดังนั้นในการสร้างโมเดล transgenic *C. elegans* เพื่อใช้ในการศึกษาโรคอัลไซเมอร์จึงมุ่งเน้นไปที่โมเดลที่ให้มีการแสดงออกของ Aβ ที่เซลล์กล้ามเนื้อ ซึ่งมีข้อได้เปรียบทางเทคนิคอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับโมเดลที่ให้มีการแสดงออกของ Aβ ที่เซลล์ประสาท ซึ่งข้อได้เปรียบที่เห็นได้ชัดคือ ง่ายต่อการประเมินลักษณะของ phenotype และถึงแม้ว่าการแสดงออกของ Aβ จะจำกัดอยู่เฉพาะที่เซลล์กล้ามเนื้อ แต่โมเดลนี้ก็ทำให้เราสามารถที่จะศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ Aβ กับการเกิดพิษจาก Aβ ได้

ความเข้าใจเกี่ยวกับโรคอัลไซเมอร์ที่ได้จากการใช้โมเดล transgenic *C. elegans*

จากการศึกษาเท่าที่ผ่านมา สิ่งที่พบเกี่ยวกับโรคอัลไซเมอร์จากการใช้โมเดล transgenic *C. elegans* มีดังต่อไปนี้

1. Aβ เหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีนบางชนิดมากขึ้น

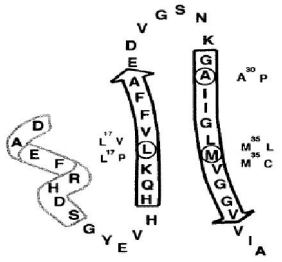
จากการใช้เทคนิค microarray ศึกษาการแสดงออกของยีนต่าง ๆ ใน transgenic *C. elegans* สายพันธุ์ CL4176[43] ในบรรดายีนที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกมากที่สุด พบว่าหนึ่งในนั้นคือยีน *hsp-16* (*heat shock protein-16*) (ตารางที่ 3) นอกจากนี้ยังมียีนอื่นที่มีความเกี่ยวข้องกับการตายแบบ apoptosis ถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกมากขึ้นด้วย ได้แก่ F37C12.2 และยังมีอีก 2 ยีนที่เป็นยีนที่มีความคล้ายคลึงกันถึง 82% คือ F22E5.6 และ ZC239.12 ซึ่งทั้งสองยีนนี้มีความคล้ายคลึงกับยีนในตระกูล TNFAIP1 ซึ่งถูกจัดเป็น tumor necrosis factor α-induced protein และจากงานวิจัยพบว่า tumor necrosis factor α สามารถป้องกันการเกิดพิษที่เซลล์ประสาทบริเวณ hippocampus จากการได้รับ Aβ[44] เพื่อเป็นการศึกษาว่ายีนเหล่านี้ที่มีการเปลี่ยนแปลงใน transgenic *C. elegans* มีการเปลี่ยนแปลงในผู้ป่วยที่เป็นโรคอัลไซเมอร์หรือไม่ Link และคณะ[43] ได้วัดการแสดงออกของ αB-crystallin (CRYAB) (ซึ่ง homologous กับ HSP-16) และ tumor necrosis factor α-induced protein ในสมองของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ที่เสียชีวิตแล้วพบว่าการแสดงออกของยีนทั้งสองเพิ่มขึ้นอย่างมากในสมองของผู้ป่วยอัลไซเมอร์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เป็นการยืนยันว่าผลการทดลองใน transgenic *C. elegans* กับในมนุษย์มีความสอดคล้องกัน ดังนั้นการใช้โมเดล transgenic *C. elegans* เป็นเครื่องมือทำให้เราสามารถที่จะตรวจสอบได้ว่ามียีนใดบ้างที่มีการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปจากการมีการสะสมของ Aβ

ตารางที่ 3 ตัวอย่างของยีนที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกมากขึ้นใน transgenic *C. elegans* สายพันธุ์ CL4176

Gene	Description	Fold increase (induced / control)	Human homolog
F22E5.6	TNF-induced protein 1 homolog	6.41	MSTP028
ZC239.12	TNF-induced protein 1 homolog	2.42	MSTP028
Y46H3A.D	Small heat shock protein HSP-16-2	3.47	CRYAB
Y46H3A.E	Small heat shock protein HSP-16-41	5.41	CRYAB
F37C12.2	Apoptosis inducing gene	1.89	PIG8

2. การเกิด oxidative stress เมื่อมีการแสดงออกของ Aβ ใน transgenic *C. elegans*

การเกิด oxidative stress ที่เกิดจากการได้รับ Aβ เป็นหนึ่งในสาเหตุสำคัญที่ทำให้เซลล์ถูกทำลาย โดย Aβ เป็นสาเหตุที่ทำให้มีการสร้าง reactive oxygen species (ROS)[5,45] พบว่ามีการเกิดปฏิกิริยา oxidation ของโปรตีน (protein oxidation) และปฏิกิริยา peroxidation ของไขมัน (lipid peroxidation) ในสมองของผู้ป่วยที่เป็นโรคอัลไซเมอร์[46,47] เพื่อเป็นการยืนยันทฤษฎีที่ว่าการเกิดปฏิกิริยา oxidation ของโปรตีนที่เซลล์ประสาทเป็นผลมาจากอนุมูลอิสระ (free radical) ที่เกิดมาจาก Aβ ได้มีการทำการวัดหมู่ carbonyl ซึ่งเป็นตัวชี้วัด (marker) ของการเกิดปฏิกิริยา oxidation ของโปรตีน โดย Yatin และคณะ[48] ทำการศึกษาในโมเดล transgenic *C. elegans* และในเซลล์เพาะเลี้ยงของเซลล์ประสาท hippocampus ซึ่งได้รับ Aβ ผลการศึกษาได้แสดงให้เห็นว่ามีการสร้างอนุมูลอิสระขึ้นในกลุ่มที่ได้รับ $A\beta_{1-42}$ ส่วนในกลุ่มที่ได้รับ $A\beta_{42-1}$ ซึ่งเป็น Aβ ที่เรียงลำดับกรดอะมิโนแบบย้อนกลับและกลุ่มที่ได้รับ $A\beta_{1-42}$ ที่มีการแทนที่กรดอะมิโน methionine ที่ตำแหน่ง 35 ด้วยกรดอะมิโน norleucine ($Met^{35}Nle$) ไม่มีการสร้างอนุมูลอิสระ ซึ่งผลการศึกษานี้สรุปได้ว่าลำดับของกรดอะมิโนใน Aβ และกรดอะมิโน methionine มีความจำเป็นต่อการสร้างอนุมูลอิสระ และนอกจากนี้จากการใช้โมเดล transgenic *C. elegans* ทำให้ได้มีการค้นพบว่ากรดอะมิโน methionine ที่ตำแหน่ง 35 (Met^{35}) และ leucine ที่ตำแหน่ง 17 (Leu^{17}) มีความสำคัญต่อการสร้างโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) ชนิด beta sheet ของสายโปรตีน Aβ[49] (รูปที่ 4) ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าโครงสร้างทุติยภูมิชนิด beta sheet อาจมีส่วนสำคัญต่อการสร้างอนุมูลอิสระ



รูปที่ 4 โครงสร้างทุติยภูมิของ Aβ แสดงลำดับกรดอะมิโนของสายเปปไทด์ $A\beta_{1-42}$ และการเกิดโครงสร้างทุติยภูมิโดยอยู่ในรูปแบบสาย alpha helix 1 สายซึ่งมีลักษณะเป็นเกลียวขดคล้ายสปริง และ beta sheet 2 สาย โดยกรดอะมิโนที่ถูกวงกลมแสดงถึงการถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโนตัวอื่น[49]

หนึ่งในคำถามจากสมมติฐาน “amyloid hypothesis” คือ amyloid plaques มีความจำเป็นต่อการเกิดพิษจาก Aβ หรือไม่ Drake และคณะ[50] จึงได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง Aβ, การเกิด oxidative stress, และ amyloid plaques โดยใช้โมเดล transgenic *C. elegans* สายพันธุ์ CL4176 ซึ่งผลการศึกษาสนับสนุนสมมติฐานที่ว่าอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์กับการเกิดพิษจาก Aβ และพบว่ามีการเกิด oxidative stress แม้ว่ายังไม่มีการเกาะกลุ่มกันของ Aβ เพื่อฟอร์มตัวเป็น amyloid plaques ซึ่งผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า Aβ สปีชีส์ที่อยู่ในรูปแบบก่อนเกาะกลุ่มกันเป็น amyloid plaques เป็นสปีชีส์ที่มีความเป็นพิษ (toxic species) ซึ่งผลการศึกษานี้สอดคล้องกับข้อสังเกตที่ว่า amyloid plaques ไม่จำเป็นต่อการเกิดพิษจาก Aβ[51] และจากการศึกษาของ Link และคณะ[50] พบว่าการเกิด oxidative stress จาก Aβ เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิด paralysis ใน transgenic *C. elegans* และยังพบว่า Aβ oligomers (oligomer เกิดจากการเกาะกลุ่มกันของ 2-14 monomers) มีความสัมพันธ์กับการเกิดพิษจาก Aβ นอกจากนี้ ยังมีหลักฐานที่สนับสนุนสมมติฐานที่ว่าไม่ใช่ plaques แต่เป็น oligomers ที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษในทั้งในโรคอัลไซเมอร์และ neurodegenerative disease อื่นเช่นโรคพาร์กินสัน[52]

นอกจากนี้ Smith และคณะ[53] ทำการศึกษาว่า Aβ มีผลเพิ่มระดับของ hydrogen peroxide (H_2O_2) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระหรือไม่ โดยศึกษาใน transgenic *C. elegans* สายพันธุ์ CL2006 และ CL4176 จากการศึกษาพบว่าระดับของ hydrogen peroxide เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญใน *C. elegans* ทั้งสองสายพันธุ์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

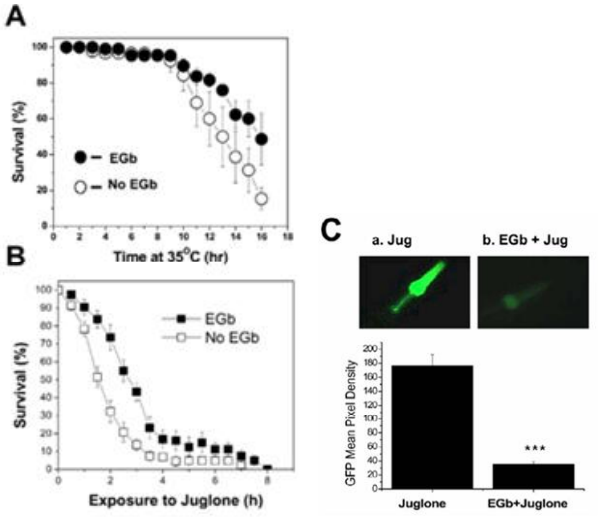
3. การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ *Ginkgo biloba* extract ในโมเดล transgenic *C. elegans*

โมเดล transgenic *C. elegans* ของโรคอัลไซเมอร์ช่วยให้นักวิจัยสามารถศึกษากลไกพื้นฐานของการเกิดโรคอัลไซเมอร์จากการทดลองในกาย (*in vivo*) ได้ โดยเฉพาะการศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุลจากหลังจากที่เซลล์ได้รับการสัมผัสกับ Aβ นอกจากนี้ยังเป็นเครื่องมือที่ให้เราสามารถประเมินประสิทธิภาพของยาที่มีศักยภาพ (potential drug) ที่จะใช้ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ ในการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดมาตรฐานของใบแปะก๊วย (standardized *Ginkgo biloba* extract) ที่มีชื่อเรียกว่า EGb 761 ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มากด้วยสรรพคุณทางยาและเชื่อว่าช่วยเพิ่มความจำ แต่ยังไม่ทราบกลไกการออกฤทธิ์ที่แน่ชัด ได้มีการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ทั้งในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง (neuronal cell culture) ในหนูทดลอง และในโมเดล transgenic *C. elegans* พบว่าสารสกัด EGb 761 มีกลไกในการปกป้องเซลล์ประสาท (neuroprotective effect) หลายอย่าง เช่น ยับยั้งการเกิด program cell death[54], ยับยั้งการเกาะกลุ่ม (aggregation) ของ Aβ[55], และเพิ่ม stress response[56]

Smith และคณะ[53] ได้ทำการศึกษาในโมเดล transgenic *C. elegans* สายพันธุ์ CL2006 พบว่า ระดับของ hydrogen peroxide ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระใน transgenic *C. elegans* ที่ได้รับสารสกัด EGb 761 มีระดับต่ำกว่าใน transgenic *C. elegans* ที่ไม่ได้รับสารสกัด EGb 761 และยังพบว่า kaempferol หรือ quercetin (ซึ่งเป็นสาร flavonoids ที่เป็นส่วนประกอบในสารสกัด EGb 761) และวิตามินซี (L-ascorbate) สามารถลดระดับของอนุมูลอิสระเมื่อเปรียบเทียบกับ transgenic *C. elegans* ที่ไม่ได้รับสารต่าง ๆ เหล่านี้ นอกจากนี้ Wu และคณะ[56] รายงานว่าสารสกัด EGb 761 เพิ่มอายุขัย (life span) ใน *C. elegans* (ชนิด wild type) ทั้งในภาวะปกติและในภาวะที่มี oxidative stress ผลการศึกษาเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าสารสกัด EGb 761 มีผลเพิ่ม anti-stress system ดังนั้นจึงเพิ่มความต้านทานต่อความเครียด (stress resistance) และเพิ่มอายุขัย

Strayer และคณะ[57] ยังได้ทำการศึกษากลไกในระดับโมเลกุลของสารสกัด EGb 761 ต่อการลดการเกิด oxidative stress โดยใช้โมเดล transgenic *C. elegans* สายพันธุ์ CL2070 (GFP-tagged inducible gene *hsp-16-2*) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีการติด (tagged) สารฟลูออเรสเซนท์ (fluorescent) ซึ่งได้แก่ green fluorescent protein (GFP) กับ promoter ของยีน *hsp-16-2* ซึ่งจะทำให้มีการเรืองแสงขึ้นหากมีการแสดงออกของยีน *hsp-16-2* ทำให้เราสามารถดูการแสดงออกของยีนในสิ่งมีชีวิตแบบ real time ได้ โดยทั่วไปสิ่งมีชีวิตจะมีการตอบสนองต่อ oxidative stress ด้วยการสร้างโปรตีนที่ตอบสนองต่อความเครียด (stress response protein) เช่น heat shock proteins (HSPs) ซึ่งหนึ่งในนั้นคือ hsp-16-2 จากการศึกษาของ Strayer และคณะ[57] พบว่าการแสดงออกของยีน *hsp-16-2* ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย juglone ซึ่งเป็นสารออกซิไดส์ (oxidizing agent) และ heat shock ถูกยับยั้งด้วยสารสกัด EGb 761 ประมาณ 86% และ 33% ตามลำดับ[57] ซึ่งกลไกนี้ของสารสกัด EGb 761 มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการเพิ่มอัตราการมีชีวิต (survival rate) ของ *C. elegans* ต่อการได้รับ oxidative stress และ thermal stress (รูปที่ 5A และ 5B) รวมถึงการลดระดับของ hydrogen peroxide ดังนั้นจากผลการศึกษานี้จึงสรุปได้ว่าการยับยั้งการแสดงออกของ hsp-16-

2/GFP เป็นตัวบ่งชี้ว่าสารสกัด EGb 761 ลดการเกิดความเครียดของเซลล์ (cellular stress) อันเป็นผลมาจากการได้รับสารออกซิไดส์และ heat shock จึงนำไปสู่การลดการเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของ reporter transgene (รูปที่ 5C) ผลการทดลองนี้จึงสรุปได้ว่าสารสกัด EGb 761 เพิ่ม anti-stress system ใน *C. elegans* ดังนั้นจึงเพิ่ม stress resistance และ life span และเนื่องจาก heat shock protein ถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกอย่างมากใน Aβ-expressing *C. elegans* (สายพันธุ์ CL4176)[43] ผลการศึกษานี้จึงแสดงให้เห็นว่าสารสกัด EGb 761 มีผลต่อการทำหน้าที่ของยีนที่ตอบสนองต่อความเครียด (stess-response gene) นอกเหนือจากการมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)[58]



รูปที่ 5 ผลของสารสกัด EGb 761 ต่อการเพิ่ม life span และการแสดงออกของยีน *hsp-16-2* ใน transgenic *C. elegans* สายพันธุ์ CL2070 **(A)** ผลของสารสกัด EGb 761 ต่อ life span ของ transgenic *C. elegans* ที่ได้รับ heat shock (อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง) **(B)** ผลของสารสกัด EGb 761 ต่อ life span ของสารสกัด EGb 761 ที่ได้รับสาร juglone (ขนาด 160 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง) กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต (%survival) ของ transgenic *C. elegans* ที่ได้รับสารสกัด EGb 761 ขนาด 100 μg/ml (วงกลมและสี่เหลี่ยมสีดำ) หรือไม่ได้รับสารสกัด EGb 761 (วงกลมและสี่เหลี่ยมสีขาว) **(C)** แสดงภาพถ่ายฟลูออเรสเซนซ์ของ transgenic *C. elegans* ที่ได้รับหรือไม่ได้รับสารสกัด EGb 761 เป็นเวลา 48 ชั่วโมงก่อนการได้รับสาร juglone (ขนาด 160 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง) ภาพแสดงส่วนหน้า (anterior) ของคอหอย (pharynx) ที่แสดงให้เห็น nerve ring (ปมประสาทใหญ่ มีลักษณะเป็นวงแหวน) ทำการวัดความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ด้วยซอฟแวร์ ImageProPlus ***แสดงนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.0001$)[57]

บทสรุป

แม้ว่า *C. elegans* จะเป็น “model organism” ที่จัดว่าค่อนข้างใหม่ต่อการเป็นโมเดลของโรคอัลไซเมอร์ *C. elegans* ได้มีบทบาทสำคัญที่ช่วยให้เรามีความเข้าใจเกี่ยวกับโรคอัลไซเมอร์มากขึ้นในระยะเวลาไม่นาน ความคล้ายคลึงกันระหว่างยีนของมนุษย์กับยีนของ *C. elegans* เป็นพื้นฐานสำคัญที่นำมาสู่การใช้เทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรมในการสร้างโมเดล transgenic *C. elegans* การศึกษาโดยใช้โมเดล transgenic *C. elegans* นี้ทำให้เราสามารถเข้าใจกลไกพื้นฐานในการเกิดโรคอัลไซเมอร์ซึ่งถือว่าเป็นโรคที่มีความสลับซับซ้อน ต่อคำถามที่ว่าการนำสิ่งมีชีวิตที่ไม่มีกระดูกสันหลัง (invertebrate) อย่างเช่น *C. elegans* มาเป็นโมเดลของโรคที่เกิดในมนุษย์นั้นจะสามารถเลียนแบบโรคที่เกิดในมนุษย์ได้ใกล้เคียงแค่ไหน คำตอบนั้นขึ้นอยู่กับว่าแง่มุมไหนของโรคที่เรากำลังศึกษา อย่างไรก็ตามโมเดลที่ดีควรที่จะเลียนแบบบางสิ่งที่พบในโรคที่เกิดขึ้นในมนุษย์ได้ อย่างเช่นในโมเดล transgenic *C. elegans* นี้พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของโปรตีน HSP-16 ซึ่งเป็นโปรตีนที่คล้ายคลึง (homologue) กับโปรตีน αB-crystalline ที่พบว่ามีการเพิ่มขึ้นในสมองของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์เช่นกัน ดังนั้นโมเดล *C. elegans* ที่ได้อธิบายถึงในที่นี้น่าจะเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับโรคอัลไซเมอร์ และด้วยการผสมผสานความรู้ที่ได้รับจากการศึกษาในโมเดล *C. elegans* กับความรู้ที่ได้รับจากการศึกษาในโมเดลสัตว์ทดลองอื่น ๆ น่าจะเป็นตัวช่วยเร่งให้เรามีความเข้าใจเกี่ยวกับโรคอัลไซเมอร์ได้มากยิ่งขึ้นและสามารถคิดค้นแนวทางใหม่ ๆ สำหรับการรักษาโรค นอกจากนี้ด้วยข้อได้เปรียบของโมเดล *C. elegans* ในการที่สามารถใช้เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจคัด (screening) ยีนได้ในสเกลใหญ่ จะทำให้เราค้นพบยีนที่มีศักยภาพที่จะเป็นเป้าหมาย (potential targets) ที่สามารถนำไปศึกษาวิจัยต่อไปได้เร็วขึ้น อีกทั้งในอนาคต *C. elegans* น่าจะเป็นเครื่องมือที่มีประโยชน์อย่างมากสำหรับใช้ในการตรวจคัดกรองยาด้วยวิธี high throughput screening เพื่อหายาใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการรักษาโรค

เอกสารอ้างอิง

1. Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer’s disease. *N Engl J Med* 2010; 362(4):329-344.
2. Ferri CP, Prince M, Brayne C, et al. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 2005;366(9503):2112-2117.
3. Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. Alzheimer’s disease. *Lancet* 2011;377(9770):1019-1031.
4. Gotz J, Ittner LM. Animal models of Alzheimer’s disease and frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurosci* 2008;9(7):532-544.
5. Selkoe DJ. Alzheimer’s disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 2001;81(2):741-766.
6. Tanzi RE, Bertram L. Twenty years of the Alzheimer’s disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell* 2005;120(4):545-555.
7. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer’s disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002; 297(5580):353-356.
8. Lott IT, Head E. Alzheimer disease and Down syndrome: factors in pathogenesis. *Neurobiol Aging* 2005;26(3):383-389.

9. Nistor M, Don M, Parekh M, et al. Alpha- and beta-secretase activity as a function of age and beta-amyloid in Down syndrome and normal brain. *Neurobiol Aging* 2007;28(10):1493-1506.
10. Haass C, De Strooper B. The presenilins in Alzheimer's disease—proteolysis holds the key. *Science* 1999;286(5441):916-919.
11. Murrel J, Farlow M, Ghetti B, Benson MD. A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science* 1991;254(5028):97-99.
12. Chartier-Harlin MC, Crawford F, Houlden H, et al. Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature* 1991;353(6347):844-846.
13. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 1993;261(5123):921-923.
14. Poirier J, Davignon J, Bouthillier D, Kogan S, Bertrand P, Gauthier S. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* 1993;342(8873):697-699.
15. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83(13):4913-4917.
16. Small SA, Duff K. Linking Abeta and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis. *Neuron* 2008;60(4):534-542.
17. Rogaeva E, Meng Y, Lee JH, et al. The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet* 2007;39(2):168-177.
18. Van Dam D, De Deyn PP. Animal models in the drug discovery pipeline for Alzheimer's disease. *Br J Pharmacol* 2011;164(4):1285-1300.
19. Spillantini MG, Murrell JR, Goedert M, Farlow MR, Klug A, Ghetti B. Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(13):7737-7741.
20. Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, et al. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 2003;39(3):409-421.
21. Calhoun ME, Burgermeister P, Phinney AL, et al. Neuronal overexpression of mutant amyloid precursor protein results in prominent deposition of cerebrovascular amyloid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(24):14088-14093.
22. St George-Hyslop P, Haines J, Rogaev E, et al. Genetic evidence for a novel familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Nat Genet* 1992;2(4):330-334.
23. Higuchi M, Ishihara T, Zhang B, et al. Transgenic mouse model of tauopathies with glial pathology and nervous system degeneration. *Neuron* 2002;35(3):433-446.
24. Strange K. An overview of *C. elegans* biology. *Methods Mol Biol* 2006;351:1-11.
25. Kaletta T, Hengarter MO. Finding function I novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nat Rev Drug Discove* 2006;5(5):387-398.
26. Lai CH, Chou CY, Chang LY, Liu CS, Lin W. Identification of novel human genes evolutionarily conserved in *Caenorhabditis elegans* by comparative proteomics. *Genome Res* 2000;10(5):703-713.
27. Sonnhammer EL, Durbin R. Analysis of protein domain families in *Caenorhabditis elegans*. *Genomics* 1997;46(2):200-216.
28. Link CD. Transgenic invertebrate models of age-associated neurodegenerative diseases. *Mech Ageing Dev* 2001;122(14):1639-1649.
29. Link CD. Expression of human beta-amyloid peptide in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(20):9368-9372.
30. Lakso M, Vartiainem S, moilanen AM, et al. Dopaminergic neuronal loss and motor deficits in *Caenorhabditis elegans* overexpressing human alpha-synuclein. *J Neurochem* 2003;86(1):165-172.
31. Nass R, Hall DH, Miller DM, Blakely RD. Neurotoxin-induced degeneration of dopamine neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(5):3264-3269.
32. Faber PW, Alter JR, MacDonald ME, Hart AC. Polyglutamine-mediated dysfunction and apoptotic death of a *Caenorhabditis elegans* sensory neuron. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(1):179-184.
33. Pierce SB, Costa M, Wisotzkey R, et al. Regulation of DAF-2 receptor signaling by human insulin and ins-1, a member of the unusually large and diverse *C. elegans* insulin gene family. *Genes Dev* 2001;15(6):672-686.
34. Ashrafi K, Chang FY, Watts JL, et al. Genome-eide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes. *Nature* 2003;421 (6920): 268-272.
35. Bergamaschi D, Samuels Y, O'Neil NJ, et al. iASPP oncoprotein is a key inhibitor of p53 conserved from worm to human. *Nat Genet* 2003; 33(2):162-167.
36. Link CD. *C. elegans* models of age-associated neurodegenerative diseases: lessons from transgenic worm models of Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* 2006;41(10):1007-1013.
37. Daigle I, Li C. apl-1, a *Caenorhabditis elegans* gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(24):12045-12049.
38. Levitan D, Greenwald I. Facilitation of lin-12-mediated signaling by sel-12, a *Caenorhabditis elegans* S182 Alzheimer's disease gene. *Nature* 1995;377(6547):351-354.
39. Wu Y, Wu Z, Butko P, et al. Amyloid-beta-induced pathological behaviors are suppressed by *Ginkgo biloba* extract EGb 761 and ginkgolides in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 2006; 26(50):13102-13113.
40. Wu Y, Luo Y. Transgenic *C. elegans* as a model in Alzheimer's research. *Curr Alzhimer Res* 2005;2:37-45.
41. Giacomotto J, Segalat L. High-throughput screening and small animal models, where are we? *Br J Pharmacol* 2010;160(2):204-216.
42. Vattemi G, Nogalska A, King Engel W, D'Agostino C, Checler E, Askanos V. Amyloid-beta42 is preferentially accumulated in muscle fibers of patients with sporadic inclusion-body myositis. *Acta Neuropathol* 2009;117(5):569-574.
43. Link CD, Taft A, Kapulkin V, et al. Gene expression analysis in a transgenic *Caenorhabditis elegans* Alzheimer's disease model. *Neurobiol Aging* 2003;24(3):397-413.
44. Barger SW, Horster D, Furukawa K, Goodman Y, Krieglstein J, Mattson MP. Tumor necrosis factors alpha and beta protect neurons against amyloid beta-peptide toxicity: evidence for involvement of a kappa B-binding factor and attenuation of peroxide and Ca2+ accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(20):9328-9332.

45. Butterfield DA, Howard B, Yatin S, et al. Elevated oxidative stress in models of normal brain aging and Alzheimer's disease. *Life Sci* 1999; 65(18-19):1883-1892.
46. Butterfield DA. Beta-amyloid-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease. *Chem Res Toxicol* 1997;10(5):495-506.
47. Markesbery WR. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 1997;23(1):134-147.
48. Yatin SM, Varadarajan S, Link CD, Butterfield DA. *In vitro* and *in vivo* oxidative stress associated with Alzheimer's amyloid beta-peptide (1-42). *Neurobiol Aging* 1999;20(3):325-330.
49. Fay DS, Fluet A, Johnson CJ, Link CD. *In vivo* aggregation of beta-amyloid peptide variants. *J Neurochem* 1998;71(4):1616-1625.
50. Drake J, Link CD, Butterfield DA. Oxidative stress precedes fibrillar deposition of Alzheimer's disease amyloid beta-peptide (1-42) in a transgenic *Caenorhabditis elegans* model. *Neurobiol Aging* 2003; 24(3):415-420.
51. Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, et al. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(11):6448-6453.
52. Goldberg MS, Lansbury PT. Is there a cause-and-effect relationship between alpha-synuclein fibrillization and Parkinson's disease? *Nat Cell Biol* 2000;2(7):E115-119.
53. Smith JV, Luo Y. Elevation of oxidative free radicals in Alzheimer's disease models can be attenuated by *Ginkgo biloba* extract EGb 761. *J Alzheimers Dis* 2003;5:287-300.
54. Smith JV, Burdick AJ, Golik P, Khan I, Wallace D, Luo Y. Anti-apoptotic properties of *Ginkgo biloba* extract EGb 761 in differentiated PC12 cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2002;48(6):699-707.
55. Luo Y, Smith JV, Paramasivam V, et al. Inhibition of amyloid-beta aggregation and caspase-3 activation by the *Ginkgo biloba* extract EGb 761. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(19):12197-12202.
56. Wu Y, Smith JV, Paramasivam V, et al. *Ginkgo biloba* extract EGb 761 increases stress resistance and extends life span of *Caenorhabditis elegans*. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2002;48(6): 725-731.
57. Strayer A, Wu Z, Christen Y, Link CD, Luo Y. Expression of the small heat-shock protein Hsp-16-2 in *Caenorhabditis elegans* is suppressed by *Ginkgo biloba* extract EGb 761. *FASEB J* 2003;17(15):2305-2307.
58. Smith JV, Luo Y. Studies on molecular mechanisms of *Ginkgo biloba* extract. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004;64(4):465-472.

Editorial note
Manuscript received in original form on April 5, 2013;
accepted in final form on November 25, 2013