

Choroba Parkinsona (ChP) stanowi drugą, co do częstości występowania chorobę neurodegeneracyjną świata, o stale rosnącym współczynniku zapadalności i niedostatecznie skutecznej terapii, co w dobie starzejącego się społeczeństwa jest poważnym problemem zarówno klinicznym, jak i ekonomicznym. ChP należy do grupy chorób określanych mianem synukleinopatii, w których neurotoksyczność wywołują wewnątrzkomórkowe agregaty białkowe alfa-synukleiny (ASN). Zgodnie z aktualną dla ChP hipotezą rozprzestrzeniania się patologii z komórki na komórkę, agregaty te mogą być przekazywane do kolejnych rejonów mózgu, podobnie jak w chorobach prionowych. Kolejną istotną cechą neuropatologiczną zmienną dla ChP jest niekontrolowana aktywacja odpowiedzi zapalnej ze strony komórek glejowych. Z uwagi na wieloczynnikowe podłoże ChP terapia neuroprotekcjna, spowalniająca postęp choroby powinna wpływać na różne szlaki sygnalizacyjne, prowadzące do śmierci komórek. Zaburzenie sygnału zależnego od kinazy sfingozyny 1 i jej pro-życiowego produktu sfingozyno-1-fosforanu (SPHK1/S1P) odgrywa rolę w patogenezie wielu chorób neurodegeneracyjnych, w tym ChP. Enzym ten syntetyzując aktywną cząsteczkę sygnalizacyjną - S1P, kontroluje homeostazę bioaktywnych sfingolipidów o przeciwstawnej funkcji, tj. pro-życiowego S1P i pro-apoptotycznego ceramidu, co czyni SPHK1 cennym punktem uchwytu w cytoprotekcyjnej strategii wielu chorób. Prawdopodobną wydaje się hipoteza, SPHK1 jest istotnym negatywnym regulatorem zarówno powstawania agregatów ASN, jak i cytotoksycznej odpowiedzi zapalnej w mózgu. Nasze poprzednie badania wykazały obniżenie ekspresji/aktywności SPHK1 oraz neuroprotekcjną rolę aktywacji receptorów dla S1P w komórkowym i zwierzęcym modelu ChP. Jednak znaczenie oddziaływania SPHK1-ASN w modelu ChP nie jest w pełni zbadane. Podobnie niewyjaśniona pozostaje rola SPHK1 i jej drugiej izoforymy (SPHK2) oraz innych enzymów kluczowych dla metabolizmu i działania S1P, tj. liazy S1P (degradującej S1P) i receptorów S1P w komórkach neuronalnych i glejowych w przebiegu ChP. **Celem niniejszego projektu jest poznanie znaczenia SPHK1/S1P w modelach ChP, wywołanych toksycznością wewnątrzkomórkowej ASN.** Co ciekawe, nasze dotychczasowe badania w modelu *in vitro* ChP wskazują na pozytywną zależność między inhibicją SPHK1 a toksycznością podawanej egzogenicznie ASN, a także mogą sugerować, że interakcja ta jest zaangażowana w powstawanie agregatów innych białek o nieprawidłowej konformacji, tj. oligomerów amyloidu beta. Z jednej strony zahamowanie aktywności SPHK1 prowadzi do uwalniania ASN na zewnątrz komórki. Z drugiej strony egzogenna ASN obniża ekspresję/aktywność SPHK1, wywołując stres oksydacyjny i śmierć neuronów. Wyżej wspomniane, intrygujące obserwacje wskazują na istotną rolę regulacyjną SPHK1/S1P w synukleinopatiach, stąd nasza robocza hipoteza zakłada, że SPHK1 może hamować agregację i toksyczność ASN. Kolejno, przypuszczamy, że sygnał zależny od S1P w astrocytach i mikrogleju może przełączać odpowiedź tych komórek z klasycznej na alternatywną (neuroprotekcjną) aktywację, a tym samym obniżać cytotoksyczność ASN i spowalniać postęp neurodegeneracji w synukleinopatiach.

Celem weryfikacji powyższych hipotez zamierzamy przeprowadzić kompleksowe badania w zwierzęcym i komórkowym modelu ChP, opartym na toksyczności ASN, łączące interdyscyplinarne metody z zakresu biologii molekularnej i inżynierii biomedycznej. Wykorzystując metody mikroskopii fluorescencyjnej oraz cytometrii przepływowej połączonej z aktywowanym fluorescencją sorterem komórek zbadamy w neuronach i poszczególnych typach komórek glejowych pochodzących z mózgu oraz rdzenia kręgowego myszy transgenicznych z mutacją ASN lokalizację SPHK1 i innych białek kluczowych dla metabolizmu i działania S1P, a także neuronalną kolokalizację SPHK1 i ASN. Zadanie to częściowo zostanie zrealizowane w ramach stażu w Instytucie Neurobiologii Słowackiej Akademii Nauk. W wybranych częściach mózgu objętych agregacją ASN oraz w komórkach z genetycznie wywołaną nadekspresją ASN badać będziemy poziom białek istotnych w metabolizmie i działaniu S1P. Następnie spróbujemy odpowiedzieć na pytanie, jaka jest rola farmakologicznej aktywacji/inhibicji SPHK1 na poziom ekspresji wewnątrzkomórkowej ASN, na proces jej uwalniania poza komórkę i cytotoksyczność? Kolejno, podejmiemy próbę wyjaśnienia roli S1P w klasycznej oraz alternatywnej aktywacji komórek glejowych i wpływu sygnału przekazywanego za pośrednictwem receptorów S1P na wybrane ścieżki sygnalizacyjne, istotne dla procesu fałdowania białek, regulacji funkcji mitochondriów i inne kluczowe szlaki w procesie przeżycia/śmierci komórki nerwowej w przebiegu ChP i innych synukleinopatii. W tym celu komórki zostaną poddane działaniu siponimodu (skuteczność w III fazie badań klinicznych Stwardnienia Rozsianego), który jest selektywnym agonistą receptorów S1P1 i S1P5, nowej generacji opartej na strukturze fingolimodu (FTY720), który jest pierwszym doustnym lekiem imminosupresyjnym zatwierdzonym w powyższym schorzeniu. Efekt terapeutyczny FTY720 potwierdzono także w badaniach przedklinicznych innych chorób neurodegeneracyjnych, w tym ChP (nasze poprzednie badania).

Niniejszy projekt może przyczynić się do lepszego zrozumienia molekularnego mechanizmu zarówno synukleinopatii, jak i chorób ze współistniejącym neurozapaleniem. Przypuszczamy, że aktywacja sygnału zależnego od receptorów S1P w komórkach nerwowych w warunkach toksyczności wywołanej ASN oraz niekontrolowaną odpowiedzią zapalną działać będzie neuroprotekcjnie, co może być wykorzystane w projektowaniu efektywnej farmakoterapii ChP i innych synukleinopatii.