

W jaki sposób inaktywacja mitochondrialnego uniportera wapniowego chroni neurony dopaminergiczne Jacek Kuźnicki

Choroba Parkinsona (PD) to nieuleczalna choroba neurodegeneracyjna, która dotyka przeważnie osoby starsze, ponieważ największym czynnikiem ryzyka jest wiek. Około 10% pacjentów to osoby, które mają mutacje w różnych genach, np. kodujących kinazy PINK1 lub LRRK2, albo które zatręły się substancjami takimi jak rotenon znajdujący się w niektórych roślinach lub MPTP będący rzadkim zanieczyszczeniem niektórych narkotyków. Powodem choroby jest zanik neuronów w mózgu, w pierwszej kolejności neuronów dopaminergicznych, które produkują neuroprzebieżnik dopaminę. Wywołuje to objawy ruchowe jak niekontrolowane drżenia, a u niektórych osób zaburzenia węchu, snu, obniżenie nastroju i otępienie. Najczęściej stosowanymi lekami łagodzącymi objawy PD są agoniści dopaminy i L-Dopa - prekursor dopaminy. Ten ostatni lek wprowadzono do terapii w latach sześćdziesiątych XX wieku. Od tego czasu trwają poszukiwania nowych leków, które mogą opóźnić lub zatrzymać rozwój PD. Nasz projekt wpisuje się w cykl badań podstawowych poszukujących markerów umożliwiających diagnozę przed pojawieniem się objawów oraz celów terapeutycznych, które mogą dokonać przełomu w leczeniu PD.

We wszystkich modelach PD i komórkach od pacjentów z tą chorobą występują zaburzenia homeostazy jonów wapnia. Również metabolizm żelaza zmienia się u pacjentów z PD, a wzrost jego poziomu koreluje ze spadkiem produkcji dopaminy. MPTP powoduje akumulację żelaza równoległe z utratą neuronów. Takie zaburzenia homeostazy żelaza przypominają ferroptozę, zależną od jonów żelaza programowaną śmierć komórek, charakteryzującą się nadmierną peroksydacją lipidów. Opublikowane przez nas dane wskazują, że zanik neuronów dopaminergicznych w wyniku mutacji genu *pink1* lub toksyczności MPTP może być zahamowany przez inaktywację mitochondrialnego uniportera wapnia (MCU). Inni autorzy wykazali, że hamowanie MCU ratuje neurony również z mutacjami w genie *LRRK2*. Wyciszenie MCU zmniejsza liczbę umierających komórek i mitochondrialne deficyty oddechowe w neuronach korowych, zmniejsza akumulację żelaza i związane z tym uszkodzenie mózgu oraz całkowicie chroni dysfunkcję mitochondriów serca spowodowaną nadmiarem żelaza. Inaktywacja MCU zapobiega zarówno akumulacji wapnia, jak i żelaza, zmniejsza poziom stresu oksydacyjnego w modelach urazowego uszkodzenia mózgu. Na podstawie tych danych zaproponowałem hipotezę, że patologia za pośrednictwem PINK1 i LRRK2 jest częściowo spowodowana ferroptozą i że inaktywacja MCU chroni neurony dopaminergiczne poprzez ograniczenie napływu do mitochondriów nie tylko jonów wapnia, ale i żelaza, łagodząc objawy ferroptozy.

Celem tego projektu jest zidentyfikowanie genów związanych z ferroptozą (ang. *ferroptosis associated genes*, FAGs), które są włączone lub wyłączone w modelach LRRK2 i PINK1 PD, gdy inaktywacja MCU ratuje neurony dopaminergiczne oraz zrozumienie mechanizmu ich ochrony. Mutacje LRRK2 stanowią najczęstszą genetyczną przyczynę dziedzicznej PD i często występują w sporadycznej PD. Mutacje w PINK1 są odpowiedzialne za rzadkie przypadki dziedzicznej PD. Zastosujemy modele PD w danio pręgowanym i neurony dopaminergiczne, które zróżnicujemy z indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC) od pacjentów z PD. Pomiędzy danio pręgowanym a człowiekiem istnieją podstawowe podobieństwa szlaków neuroanatomicznych i neurochemicznych, w tym mechanizmy neurodegeneracji i aktywacja gleju.

Ustawimy warunki indukowania ferroptozy w liniach danio pręgowanego i w neuronach dopaminergicznych z mutacjami PINK1 lub LRRK2 i scharakteryzujemy cechy obu tych modeli PD. Następnie zidentyfikujemy geny, które zmieniają poziom ekspresji pod wpływem inhibitorów MCU w neuronach ferroptotycznych otrzymanych z ludzkich iPSC. To ludzkie „geny wrażliwe na MCU”. Mamy nadzieję, znaleźć wśród nich nowe potencjalne FAGs, oprócz znanych genów związanych z homeostazą żelaza i wapnia. Równoległe zidentyfikujemy przy użyciu sekwencjonowania w pojedynczych komórkach mózgu takie, w których ortologii tych FAGs wykazują obniżoną lub podwyższoną ekspresję przez inaktywację MCU w mutantach *lrrk2* i *pink1* danio pręgowanego. Na podstawie podobieństw między człowiekiem a danio pręgowanym zakładamy, że białka kodowane przez jego geny mają właściwości ludzkich białek. Spośród zidentyfikowanych FAGs wybierzemy geny, które optymalnie chronią zróżnicowane neurony dopaminergiczne dzięki interakcji z innymi typami komórek, takimi jak na przykład mikroglej. Będziemy manipulować poziomem wybranego białka przez nadekspresję lub nokaut poszczególnego genu w celu odwrócenia ochrony zależnej od MCU. Pozytywny wynik tej manipulacji będzie wskazywał na rolę tego białka w ochronie przed ferroptozą. Ostatni etap projektu będzie obejmował charakterystykę białek kodowanych przez te „ochronne” geny. Określimy wewnątrzkomórkową lokalizację „ochronnych” białek za pomocą przeciwciał. Oczekujemy zidentyfikowania genu lub genów, które zmieniają aktywność, gdy jony wapnia i żelaza nie mogą wnikać do mitochondriów. Te geny i białka mogą mieć wartość diagnostyczną przed pojawieniem się objawów PD, zapewniając w ten sposób podstawę nowych terapii anti-PD.