

Inicjowana pozajądrowo sygnalizacja receptorów estrogenowych jako nowy punkt uchwytu terapii neuroprotektoryjnych: identyfikacja molekularnych mechanizmów działania PaPE-1 w hodowlach pierwotnych neuronów oraz komórek mikrogleju linii HMC3 narażonych na A β

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Choroba Alzheimera jest schorzeniem neurodegeneracyjnym dotykającym miliony osób na całym świecie, które stanowi ogromny problem zdrowotny, społeczny i ekonomiczny. Choroba ta znacznie częściej dotyka kobiety, szczególnie w okresie pomenopauzalnym, co sugeruje istotną rolę hormonów płciowych, a zwłaszcza estrogenów w jej patogenezie. Ochronne działanie estrogenów czyni je atrakcyjną opcją w prewencji i leczeniu choroby Alzheimera, jednak ich zastosowanie kliniczne niesie ryzyko wystąpienia poważnych skutków ubocznych, takich jak nowotwory hormono-zależne i choroby układu sercowo-naczyniowego. Te efekty estrogenów są związane z nieselektywną aktywacją klasycznych - jądrowych szlaków sygnałowych receptorów estrogenowych i wywoływaniem efektów hormonalnych poza ośrodkowym układem nerwowym. Ograniczenia te podkreślają potrzebę stosowania nowych ligandów o bardziej selektywnym sposobie działania, które umożliwią wykorzystanie neuroprotektoryjnych właściwości estrogenów, jednocześnie nie wywołując dotkliwych efektów ubocznych. Takim narzędziem może stać się PaPE-1 (z ang. *Pathway Preferential Estrogen* - preferencyjny dla ścieżki estrogen), czyli nowy ligand receptorów ESR1 i ESR2 selektywnie aktywujący inicjowaną pozajądrowo sygnalizację estrogenową.

Amyloid- β (A β) jest jednym z głównych czynników zaangażowanych w patogenezę choroby Alzheimera. Nasze wcześniejsze badania wykazały, że PaPE-1 podany jednocześnie z A β tj. w tzw. paradygmacie *co-treatment*, działa ochronnie, łagodząc neurotoksyczność, apoptozę i stres oksydacyjny wywołane ekspozycją na A β . W niniejszej pracy doktorskiej postanowiłam sprawdzić czy PaPE-1 wykazuje działanie neuroprotektoryjne w paradygmacie podania odroczonego w czasie, tzw. *post-treatment*. Taki reżim czasowy lepiej odzwierciedla warunki kliniczne, w których lek stosowany jest gdy neuropatologia jest już obecna. Aby zweryfikować ochronny potencjał PaPE-1 oraz poznać jego mechanizmy działania, wykorzystałam pierwotne hodowle mysich komórek neuronalnych oraz linię komórkową ludzkiego mikrogleju HMC3, które w pierwszej kolejności eksponowane były przez 24 godziny na zagregowany A β (5 lub 10 μ M), a następnie poddane działaniu PaPE-1 przez 6 i/lub 24 godziny. Dowiodłam, iż PaPE-1 (10 μ M) podany z 24-godzinnym odroczeniem względem A β skutecznie chroni komórki nerwowe oraz moduluje odpowiedź zapalną komórek mikrogleju. W komórkach nerwowych PaPE-1 częściowo odwraca zmiany wywołane pod wpływem A β , obniżając poziom neurodegeneracji i zwiększając gęstość sieci neurytów, czemu towarzyszy spadek ekspresji czynników istotnych w patogenezie choroby Alzheimera, takich jak *App*, *ApoE*, *Bace2* i *Rbfox1*, a także

wzrost ekspresji *Chat*. Ochronne działanie PaPE-1 związane jest m.in. z ograniczeniem apoptozy, co manifestuje się spadkiem aktywności kaspazy-3 i -9, obniżeniem apoptycznej kondensacji chromatyny i zmniejszoną ekspresją czynników proapoptycznych (*Bax/BAX*, *Gsk3b*, *Fas/FAS* i *Fasl/FASL*). Ponadto, badany ligand normalizuje osłabioną przez A β autofagię, o czym świadczy wzrost poziomu pęcherzyków autofagowych oraz nasilenie ekspresji czynników kluczowych w przebiegu tego procesu (*Becn1/BECN1*, *Atg5*, *Atg7*, *Ambral* i *Map1lc3b/Map1LC3AB*). PaPE-1 zwiększa również ekspresję receptorów ESR1 i ESR2 w błonowej frakcji komórki, a zastosowanie specyficznych antagonistów receptorów estrogenowych wykazało, że w efektach jego działania niezbędny jest receptor ESR1. PaPE-1 wykazuje cechy modulatora epigenetycznego, stymulując aktywność enzymów z grupy acetylaz histonowych (HAT) oraz modyfikując poziom metylacji DNA w regionach promotorowych licznych genów, w tym tych związanych z apoptozą, autofagią i sygnalizacją estrogenową. Co więcej, PaPE-1 ma zdolność do modulacji procesu neurozapalenia, co wykazałam z zastosowaniem eksponowanych na A β komórek neuronalnych i mikrogleju. W komórkach neuronalnych badana substancja skutecznie obniża poziom biochemicznych i molekularnych markerów odpowiedzi zapalnej, takich jak aktywność kaspazy-1, ilość pozakomórkowego ATP i ekspresja czynników zapalnych. Natomiast w hodowlach mikrogleju pod wpływem PaPE-1 dochodzi do częściowej normalizacji zmian powstałych w odpowiedzi na A β , co dotyczy m.in. morfologii komórek, ich aktywności metabolicznej oraz poziomu IL1 β .

Moje badania wskazują po raz pierwszy na neuroprotektynny potencjał PaPE-1 oraz jego zdolność do modulacji odpowiedzi zapalnej w komórkowych modelach choroby Alzheimera w warunkach podania odroczonego w czasie. Na podstawie otrzymanych wyników sugeruję, że strategie terapeutyczne bazujące na selektywnej aktywacji inicjowanej pozajądrowo sygnalizacji estrogenowej mogą w przyszłości stać się skutecznym i bezpiecznym narzędziem w walce z chorobą Alzheimera