

mgr Bernadeta Pietrzak-Wawrzyńska

**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**

Praca doktorska wykonana w Pracowni Neurofarmakologii i Epigenetyki

Zakładu Farmakologii Uzależnień

Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

Promotor: prof. dr hab. Małgorzata Kajta

Promotor pomocniczy: dr hab. Agnieszka Wnuk

Kraków 2025

Składam najszczerze podziękowania

Pani Promotor prof. dr hab. Małgorzacie Kajta

za podzielenie się swoją wiedzą i doświadczeniem, poświęcony czas, cenne wskazówki oraz pomoc okazaną przy powstaniu niniejszej pracy

Pani Promotor Pomocniczej dr hab. Agnieszce Wnuk

za nieocenione wsparcie na każdym etapie pracy, przekazanie cennych umiejętności badawczych, nieustanne zaangażowanie i serdeczność, dzięki którym praca nad rozprawą była nie tylko wyzwaniem, ale i cenną lekcją

dr Karolinie Przepiórskiej-Drońskiej, mgr inż. Andrzejowi Łachowi i Katarzynie Tomczyk

za pomoc w realizacji doświadczeń, owocną współpracę, wartościowe dyskusje oraz stworzenie przyjaznej i twórczej atmosfery

Moim Rodzicom

za nieprzerwaną wiarę w moje możliwości, cierpliwość i troskę, dzięki którym mogę podążać za swoją pasją

Mojemu Mężowi

za cierpliwość, wyrozumiałość i nieustające wsparcie, które pozwalają mi odetchnąć i doceniać ulotne piękno codzienności

Badania opisane w tej pracy doktorskiej zostały zrealizowane w ramach funduszy pochodzących z grantu Narodowego Centrum Nauki OPUS 20 (nr 2020/39/B/NZ7/00974) na projekt pt. „Selektywna aktywacja szlaków sygnałowych niejądrowych receptorów estrogenowych przez PaPE-1 jako nowe podejście terapeutyczne wobec sporadycznej postaci choroby Alzheimera”. Kierownik grantu: prof. dr hab. Małgorzata Kajta.



NARODOWE CENTRUM NAUKI

SPIS TREŚCI

LISTA PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ.....	6
STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM	7
STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM	9
WYKAZ NAJCZĘŚCIEJ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	11
WPROWADZENIE	12
Etiologia choroby Alzheimerera	12
Molekularne mechanizmy w chorobie Alzheimerera	15
Apoptoza.....	15
Autofagia	16
Zmiany statusu epigenetycznego	17
Neurozapalenie	19
Prewencja, diagnostyka i leczenie choroby Alzheimerera.....	21
Czynniki ryzyka i prewencja	21
Diagnostyka	22
Leczenie	23
Ochronny potencjał estrogenów w chorobach ośrodkowego układu nerwowego	24
Mechanizmy działania estrogenów	25
Selektywna aktywacja inicjowanej pozajądrowo sygnalizacji estrogenowej z zastosowaniem PaPE-1	28
HIPOTEZA BADAWCZA.....	33
CEL BADAŃ.....	34
PRZEBIEG DOŚWIADCZEŃ	35
PUBLIKACJA 1	36
Podsumowanie zastosowanych metod badawczych oraz badanych parametrów i procesów	37
Uzasadnienie badań.....	38
Wyniki badań	39
PUBLIKACJA 2	42
Podsumowanie zastosowanych metod badawczych oraz badanych parametrów i procesów	43
Uzasadnienie badań.....	44
Wyniki badań	45
OPISOWA CZĘŚĆ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	48

Metody	49
Podsumowanie zastosowanych metod badawczych oraz badanych parametrów i procesów	54
Uzasadnienie badań.....	55
Wyniki badań	56
DYSKUSJA	65
PODSUMOWANIE.....	77
WNIOSKI	80
PIŚMIENNICTWO.....	81
OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW	106
PUBLIKACJE	113

LISTA PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pietrzak-Wawrzyńska BA, Wnuk A, Przepiórska-Drońska K, Łach A, Kajta M. *Posttreatment with PaPE-I Protects from A β -Induced Neurodegeneration Through Inhibiting the Expression of Alzheimer's Disease-Related Genes and Apoptosis Process That Involves Enhanced DNA Methylation of Specific Genes*. Mol Neurobiol. 2024;61(7):4130-4145. doi:10.1007/s12035-023-03819-5

100 pkt MNiSW

Pietrzak-Wawrzyńska BA, Wnuk A, Przepiórska-Drońska K, Łach A, Kajta M. *Non-nuclear Estrogen Receptor Signaling as a Promising Therapeutic Target to Reverse Alzheimer's Disease-related Autophagy Deficits and Upregulate the Membrane ESR1 and ESR2 Which Involves DNA Methylation-dependent Mechanisms*. J Mol Biol. 2025;437(7):168982. doi:10.1016/j.jmb.2025.168982

140 pkt MNiSW

Przedłożona rozprawa doktorska stanowi pracę hybrydową, łącząc wyniki zawarte w opublikowanych artykułach naukowych i elementy tradycyjnej monografii, stanowiące część opisową.

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 neuroprotektorycznych 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 neuroprotektoryczne 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 ekspozowane 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. Dowiedziałam, iż PaPE-1 (10 μ M) podany z 24-godzinny 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 *FasI/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*, *Ambra1* 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 neuroprotektoryjny 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

STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disorder affecting millions of people worldwide, constituting a significant health, social, and economic burden. The disease affects women more frequently, especially postmenopausal women, suggesting a significant role for sex hormones, particularly estrogens, in its pathogenesis. The protective effects of estrogens make them an attractive option for the prevention and treatment of Alzheimer's disease, but their clinical use carries the risk of serious side effects, such as hormone-dependent cancers and cardiovascular disease. These effects of estrogens are associated with nonselective activation of classical nuclear estrogen receptor signaling pathways and the induction of hormonal effects outside the central nervous system. These limitations highlight the need for new ligands with a more selective mode of action, capable of harnessing the neuroprotective effects of estrogens while minimizing severe side effects. PaPE-1 (Pathway Preferential Estrogen), a novel ligand for the ESR1 and ESR2 receptors that selectively activates extranuclear estrogen signaling, may represent a promising approach to achieve this goal.

Amyloid- β (A β) is one of the key factors involved in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Our previous studies have shown that PaPE-1 administered concomitantly with A β , i.e., in the co-treatment paradigm, has a protective effect, mitigating A β -induced neurotoxicity, apoptosis, and oxidative stress. In this doctoral dissertation, I decided to investigate whether PaPE-1 exerts neuroprotective effects in a delayed, post-treatment paradigm. This timeframe better reflects the clinical setting in which the drug is administered when neuropathology is already present. To verify the protective potential of PaPE-1 and understand its mechanisms of action, I used primary cultures of mouse neuronal cells and the human microglial cell line HMC3. These cells were first exposed to aggregated A β (5 or 10 μ M) for 24 hours and then treated with PaPE-1 for 6 and/or 24 hours. I demonstrated that PaPE-1 (10 μ M) administered with a 24-hour delay from A β effectively protects neuronal cells and modulates the inflammatory response of microglia. In neuronal cells, PaPE-1 partially reverses A β -induced changes, reducing neurodegeneration and increasing neurite network density. This is accompanied by a decrease in the expression of factors important in the pathogenesis of Alzheimer's disease, such as *App*, *Apoe*, *Bace2*, and *Rbfox1*, as well as upregulation of *Chat* expression. The protective effects of PaPE-1 are associated with limited apoptosis, which is manifested by a decrease in caspase-3 and -9 activity, a reduction of apoptotic chromatin condensation, as well as by downregulation of proapoptotic factors (*Bax/BAX*, *Gsk3b*, *Fas/FAS*, and *FasI/FASL*).

Furthermore, the tested ligand normalizes autophagy weakened by A β , as evidenced by an increase in the level of autophagic vesicles and an upregulation of key factors in this process (*Becn1*/BECN1, *Atg5*, *Atg7*, *Ambra1*, and *Map1lc3b*/Map1LC3AB). PaPE-1 also increases the expression of ESR1 and ESR2 receptors in the membrane fraction, and the use of selective estrogen receptor antagonists indicates that the ESR1 is required for its effects. PaPE-1 exhibits epigenetic modulator properties, stimulating the activity of histone acetylases (HAT) and modifying DNA methylation levels in the promoter regions of numerous genes, including those involved in apoptosis, autophagy, and estrogen signaling. Furthermore, PaPE-1 is capable of modulating neuroinflammation, as demonstrated in neuronal and microglial cells exposed to A β . In neuronal cells, the tested compound effectively reduces biochemical and molecular markers of the inflammatory response, such as caspase-1 activity, extracellular ATP concentration, and expression of inflammatory factors. In microglia, PaPE-1 partially normalizes the changes occurring in response to A β , including cell morphology, metabolic activity, and IL1 β level.

My research provides the first evidence that post-treatment with PaPE-1 exerts neuroprotective effects and modulates neuroinflammatory responses in cellular models of Alzheimer's disease. Based on the obtained results, I suggest that therapeutic approach based on the selective activation of extranuclear estrogen signaling may become an effective and safe strategy in the future fight against Alzheimer's disease.

WYKAZ NAJCZĘŚCIEJ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

APOE – apolipoproteina E – z ang. *Apolipoprotein E*

APP – białko prekursorowe amyloidu – z ang. *Amyloid Precursor Protein*

A β – amyloid- β

ERE – element odpowiedzi na estrogeny – z ang. *Estrogen Response Element*

ESR1/ER α – receptor estrogenowy 1 lub receptor estrogenowy α

ESR2/ER β – receptor estrogenowy 2 lub receptor estrogenowy β

HAT – acetylotransferaza histonowa – z ang. *Histone Acetyltransferase*

HDAC – deacetylaza histonowa – z ang. *Histone Deacetylase*

HMC3 – linia ludzkich komórek mikrogleju

LOAD – choroba Alzheimera o późnym początku – z ang. *Late Onset Alzheimer's Disease*

MCI – łagodne zaburzenia poznawcze – z ang. *Mild Cognitive Impairment*

mER α – błonowy receptor estrogenowy 1 lub błonowy receptor estrogenowy α

mER β – błonowy receptor estrogenowy 2 lub błonowy receptor estrogenowy β

PaPE-1 – preferencyjny dla ścieżki estrogen 1 – z ang. *Pathway Preferential Estrogen 1*

SERM – selektywny modulator receptorów estrogenowych – z ang. *Selective Estrogen Receptor Modulator*

tMCAO – przejściowa okluzja tętnicy mózgowej środkowej – z ang. *transient Middle Cerebral Artery Occlusion*

WPROWADZENIE

Etiologia choroby Alzheimer

Choroba Alzheimer jest schorzeniem neurodegeneracyjnym charakteryzującym się m.in. występowaniem pozakomórkowych agregatów amyloidu- β ($A\beta$) oraz wewnątrzkomórkowych splątków neurofibrylarnych składających się z hiperfosforylowanego białka tau (Knopman i in. 2021). Wczesne objawy choroby Alzheimer mogą obejmować subiektywny spadek zdolności umysłowych bez mierzalnych deficytów. Łagodne zaburzenia poznawcze (z ang. *mild cognitive impairment* - MCI) to najwcześniejszy etap objawowy, z łagodnym upośledzeniem w jednej lub większej ilości domen poznawczych, ale zachowanymi zdolnościami samodzielnego funkcjonowania. Z kolei demencja definiowana jest jako zaburzenie poznawcze o nasileniu wystarczającym, by istotnie upośledzić niezależność funkcjonalną oraz negatywnie wpłynąć na codzienne funkcjonowanie. Choroba Alzheimer jest uważana za główną przyczynę demencji, odpowiadając za około 60-70% jej przypadków (WHO *Dementia*, 2023). Demencja to ogólne określenie grupy objawów, takich jak pogorszenie pamięci, utrata zdolności uczenia się, problemy z orientacją w czasie i przestrzeni, trudności językowe, zanik umiejętności właściwej oceny sytuacji i podejmowania decyzji oraz apatia i wahania nastroju. Objawy te wpływają na zdolność osoby do wykonywania codziennych czynności, z czasem uniemożliwiając samodzielne funkcjonowanie. Poza demencją spowodowaną chorobą Alzheimer, powszechnie występują również: demencja naczyniowa, demencja czołowo-skroniowa, demencja z ciałami Lewy'ego i stwardnienie hipokampa. Coraz więcej badań sugeruje, że osoby z demencją, w tym osoby ze zdiagnozowaną chorobą Alzheimer, wykazują wiele współistniejących patologii mózgu, a stan ten jest znany pod terminami, takimi jak demencja mieszana (z ang. *mixed dementia*) lub demencja o zróżnicowanej etiologii, (z ang. *multi-etiology dementia*; Kapasi i in. 2017, Karanth i wsp 2020).

Według Światowej Organizacji Zdrowia (z ang. *World Health Organization* - WHO) demencja stanowi siódmą najczęstszą przyczynę zgonów i jest jedną z głównych przyczyn niepełnosprawności i niesamodzielnności osób starszych, dotykając globalnie około 55 milionów ludzi (WHO *Dementia*, 2023; WHO *Top 10 causes of death*, 2024). Każdego roku notuje się niemalże 10 milionów nowych przypadków demencji, a w związku ze starzeniem się społeczeństwa, tempo to prawdopodobnie będzie wzrastać. Przewiduje się, że w 2050 roku

liczba chorych osiągnie ponad 130 milionów (Wimo i in. 2015). Z Raportu Narodowego Funduszu Zdrowia (NFZ) wynika, że w Polsce w 2022 roku na chorobę Alzheimera i choroby pokrewne cierpiało 357 tysięcy pacjentów, z czego 256 tysięcy stanowiły kobiety, a 101 tysięcy mężczyźni. W latach 2014-2022 w Polsce rejestrowana roczna zachorowalność na chorobę Alzheimera i choroby pokrewne wynosiła 72 tysiące kobiet i 35 tysięcy mężczyzn, przy czym współczynnik zachorowalności standaryzowany względem wieku i płci na 1000 osób w wieku powyżej 55 lat wynosił odpowiednio 10,3 dla kobiet i 6,3 dla mężczyzn. Sugeruje to istotną rolę płci oraz hormonów płciowych w patologii tych chorób. Wnioski płynące z badań populacyjnych znajdują potwierdzenie w analizach molekularnych, w tym metaanalizie transkryptomu, która wykazała kluczową rolę estrogenów i androgenów w degeneracji neuronów hipokampa w przebiegu choroby Alzheimera (Winkler i Fox 2013).

Zgodnie z „hipotezą kaskady amyloidowej”, akumulacja A β jest głównym czynnikiem wywołującym obecne w chorobie Alzheimera uszkodzenie neuronów i zaburzenia synaptyczne, skutkujące deficytem funkcji poznawczych (Hampel i in. 2021). W ujęciu klasycznym przyjmuje się, że akumulacja A β pierwotnie pojawia się w korze mózgowej, następnie w śródmózgowiu, a na koniec w mózdzku (Thal i in. 2002, Grothe i in. 2017). Najnowsze badania potwierdzają ten pogląd, jednocześnie ujawniając istnienie dwóch podtypów rozprzestrzeniania się patologii A β : typ z pierwszeństwem struktur korowych – charakterystyczny dla osób dotkniętych MCI – i typ z pierwszeństwem struktur podkorowych, który dotyczy osób bez deficytów kognitywnych we wczesnych stadiach degeneracji (Sun i in. 2023). U chorych cierpiących na postać rodzinną choroby Alzheimera, zwaną również postacią dziedziczną, występuje mutacja w jednym z trzech genów pełniących kluczową rolę w powstawaniu A β , tj. *APP*, *PSEN1* i *PSEN2* (Knopman i in. 2021). Gen *APP* koduje białko prekursorowe amyloidu. Produkt tego genu ulega proteolitycznej degradacji przez kolejne sekretazy, co może angażować jedną z dwóch ścieżek: 1) Jeśli białko APP jest najpierw cięte przez α - a następnie γ -sekretazę, powstaje nietoksyczny peptyd P3. 2) Jeśli w enzymatycznym cięciu białka APP uczestniczą β - i γ -sekretaza, produktem jest A β . *PSEN1* i *PSEN2* to podjednostki katalityczne γ -sekretazy. Rodzinna postać choroby Alzheimera stanowi jednak jedynie 5% przypadków (Barber i in. 2012). Postać sporadyczna choroby Alzheimera, zwana również chorobą Alzheimera o późnym początku (z ang. *Late Onset Alzheimer's Disease* – LOAD), dotyczy większości chorych, czyli około 95% pacjentów, a jej etiologia nie jest w pełni wyjaśniona. Jednym z czynników wpływających na prawdopodobieństwo wystąpienia choroby jest posiadany wariant genu apolipoproteiny E (*APOE*). W porównaniu z nosicielami

wariantu *APOEε3*, nosiciele wariantu *APOEε4* na obu allelach mają nawet 10-15-krotnie podwyższone ryzyko zachorowania (Troutwine i in. 2022). Wśród innych czynników ryzyka zachorowania na sporadyczną postać choroby Alzheimera można wymienić wiek, choroby metaboliczne i sercowo-naczyniowe, urazy głowy, przewlekły stan zapalny oraz ekspozycję na zanieczyszczenia środowiskowe w tym metale ciężkie (Edwards et al 2019).

Etiologia sporadycznej postaci choroby Alzheimera nie jest w pełni jasna, wiele jednak wskazuje na istotną rolę Aβ w zapoczątkowaniu i przebiegu tego schorzenia. Należy jednak podkreślić, że Aβ nie występuje wyłącznie w kontekście procesów patologicznych. W warunkach fizjologicznych monomery Aβ odgrywają istotną rolę biologiczną, m.in. modulując aktywność synaptyczną oraz wspierając przeżywalność neuronów, a także wykazując działanie ochronne w warunkach stresu oksydacyjnego (Bishop i in. 2004). Jednak nawet małe zmiany w ilości Aβ, spowodowane np. przez zaburzenia enzymatycznego procesowania APP lub jego upośledzone usuwanie, mogą skutkować powstaniem toksycznych agregatów. Aβ może być usuwany z mózgu 1) do krwioobiegu przez barierę krew-mózg, w czym istotną rolę pełnią pericyty i komórki endotelialne, lub 2) do płynu mózgowo-rdzeniowego, w co zaangażowany jest system glimfatyczny (Bateman i in. 2006, Engelhardt i in. 2016). Ponadto, w usuwaniu Aβ uczestniczą komórki mikrogleju, które są zdolne do jego fagocytozy (Cai i in. 2023). Kolejnym mechanizmem oczyszczania mózgu z nadmiaru Aβ jest jego enzymatyczna degradacja, w której uczestniczą białka takie jak np. metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP-2, MMP-9), metaloendopeptydazy (NEP-1, NEP-2, IDE – z ang. *insulin degrading enzyme*) czy proteazy serynowe (np. plazmina; Leissring i in. 2003, Eckman i in. 2006, Hampel i in. 2021). Dwie główne toksyczne izoformy Aβ to Aβ₁₋₄₀ i Aβ₁₋₄₂, przy czym Aβ₁₋₄₂ jest słabiej rozpuszczalny i bardziej skłonny do agregacji. Podczas agregacji monomery Aβ łączą się w rozpuszczalne dimery, trimery, oligomery i protofibryle. Kolejnym stadium agregacji jest powstanie nierozpuszczalnych fibryli, a następnie płytek/blaszek Aβ (Rajasekhar i in. 2015). Przez wiele lat to dojrzałe fibryle były uważane za najbardziej szkodliwą formę Aβ. Jednak nowsze dane wskazują na rozpuszczalne oligomery jako najbardziej toksyczne formy Aβ (Verma i in. 2015). Niektórzy badacze sugerują nawet, że formowanie fibryli i płytek Aβ jest mechanizmem ochronnym, neutralizującym toksyczne działanie oligomerów (Verma i in. 2015).

W chorobie Alzheimera, oprócz zagregowanego Aβ, obecne są także splątki neurofibrylarne zbudowane z hiperfosforylowanego białka tau. To obecne w aksonach

i dendrytach białko reguluje stabilność mikrotubul i wspomaga prawidłowy transport wewnątrzkomórkowy (Kadavath i in. 2015). Według hipotezy etiologii choroby Alzheimera opartej o białko tau, wskutek jego nadmiernej fosforylacji dochodzi do powstania splątków neurofibrylarnych, których obecność prowadzi do upośledzenia funkcjonowania neuronów i ich degeneracji (Braak i in. 2018, Kametani i in. 2018). Patologia tau pojawia się zwykle później niż odkładanie A β , jednak silniej koreluje z zaburzeniami funkcji poznawczych. Kolejną ważną hipotezą choroby Alzheimera, na której bazuje większość dostępnych aktualnie na rynku leków, jest hipoteza cholinergiczna. Zakłada ona, że w mózgach osób z chorobą Alzheimera dochodzi do zmniejszenia syntezy i transportu acetylocholiny – neuroprzekaźnika odgrywającego kluczową rolę m.in. w procesach uczenia się i pamięci (Francis i in. 1999, Hampel i in. 2018). Poza wspomnianymi, w przebiegu choroby Alzheimera zaangażowanych jest też wiele innych mechanizmów, a na ich podstawie sformułowane zostały kolejne hipotezy, dotyczące roli np. plastyczności synaptycznej, neurozapalenia, dysfunkcji mitochondriów, stresu oksydacyjnego, autofagii, czy zaburzeń naczyniowych (Agarwal i in. 2020, Dominguez-Gortaire i in. 2025). Mnogość hipotez dodatkowo podkreśla fakt, że jest to schorzenie o złożonej etiologii, a w jego przebiegu biorą udział różne mechanizmy, skuteczne leczenie powinno więc działać plejotropowo.

Molekularne mechanizmy w chorobie Alzheimera

Apoptoza

Apoptoza to proces kluczowy w utrzymaniu homeostazy, a jej udział w przebiegu neuropatologii choroby Alzheimera został wielokrotnie potwierdzony, zarówno *post-mortem* w tkankach pacjentów, jak i w zwierzęcych modelach choroby (Goel i in. 2022). To jeden z najlepiej poznanych typów programowanej śmierci komórki. Kaspazy są centralnymi enzymami apoptozy, odpowiedzialnymi za inicjację i przeprowadzanie śmierci komórki. Morfologicznie apoptoza charakteryzuje się dezorganizacją cytoszkieletu, kondensacją chromatyny i fragmentacją DNA oraz tworzeniem otoczonych błoną cytoplazmatyczną ciał apoptycznych (Delhalle i in. 2003, Galluzzi i in. 2018). Proces apoptozy może zostać zainicjowany na jednej z dwóch głównych ścieżek: wewnętrznej lub zewnętrznej. Wewnętrzna ścieżka apoptyczna aktywowana jest na skutek zaburzeń, takich jak uszkodzenie DNA czy stres oksydacyjny. W jej przebiegu istotną rolę odgrywają białka z rodziny BCL2 pełniące funkcje proapoptyczne (np.: BAX, BID, BIM, BAK czy BAD) i antyapoptyczne (np.: BCL2 i BCL_{XL}).

Oligomeryzacja proapoptycznych białek z tej rodziny prowadzi do powstania porów w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, skutkującego utratą potencjału elektrycznego błony oraz uwolnienia czynników apoptycznych, zwłaszcza cytochromu c. Następnie dochodzi do formowania składającego się z cytochromu c, APAF1 i kaspazy-9 apoptosomu, umożliwiającego aktywację kaspaz wykonawczych, m. in. kaspazy-3 (Kajta 2004, Wnuk i Kajta 2017). Badania wskazują że w chorobie Alzheimera ulega zaburzeniu równowaga między pro- a antyapoptycznymi białkami z rodziny BCL2, co sprzyja śmierci neuronów (Callens i in. 2021). W modelach zwierzęcych, hodowlach komórek ludzkich i w mózgach pacjentów potwierdzono, że zagregowany A β zwiększa ekspresję BIM i BAX, przy jednoczesnym obniżeniu BCL2 (Paradis i in. 1996, Su i in. 1997, MacGibbon i in. 1997, Kudo i in. 2012). Zewnętrzna ścieżka apoptyczna, zwana również ścieżką receptorową, związana jest z aktywacją receptorów śmierci takich jak FAS, TNFR1, TRAILR1/2 przez odpowiednie ligandy, tj. FASL, TNF α czy TRAIL. Prowadzi ona do aktywacji kaspazy-8 lub -10 i dalszego kaskadowego cięcia kolejnych prokaspaz aż do aktywacji efektorowej kaspazy-3. W mózgach pacjentów cierpiących na chorobę Alzheimera wykazano podwyższony poziom FAS i FASL oraz ich kolokalizację ze złogami A β i aktywną kaspazą-3 i kaspazą-8 (Su i in. 2003). Dodatkowo, możliwe jest przenikanie się obu wspomnianych szlaków apoptycznych, które następuje np. gdy zaktwowana kaspaza-8 tnie białko BID, co prowadzi do aktywacji BAX i BAK, inicjując mitochondrialny szlak apoptozy.

Autofagia

Autofagia to proces prowadzący do eliminacji uszkodzonych organelli komórkowych i białek cytozolowych, który odgrywa istotną rolę w rozwoju neuronów i odpowiedzi układu nerwowego na różnego rodzaju bodźce, przy czym w zależności od sytuacji, autofagia może wspierać przetrwanie względnie eliminację komórek z ustroju. Przykładowo, w przypadku stanów ostrych, jak uszkodzenie hipoksyjno-ischemiczne, aktywacja autofagii może prowadzić do śmierci komórki (Mazure i in. 2010). Natomiast w przewlekłych chorobach neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera, autofagia wpływa ochronnie na komórki uczestnicząc w usuwaniu nieprawidłowych, toksycznych agregatów białkowych (Kesidou i in. 2013). Wyróżniamy trzy główne rodzaje autofagii, mikroautofagia, makroautofagia i autofagia zależna od białek opiekuńczych – czaperonów (z ang. *chaperones*). Kluczową różnicę między nimi stanowi sposób wychwytu substratu przeznaczonego do degradacji. W autofagii zależnej od białek opiekuńczych, białka te rozpoznają substraty

zawierające motyw KFERQ i kierują je do receptora LAMP2 (z ang. *Lysosome-Associated Membrane Protein 2*) w błonie lizosomu, co umożliwia ich transport do wnętrza i degradację. Mikroautofagia polega na bezpośrednim wchłonięciu fragmentu cytoplazmy do lizosomu (Zhang i in. 2021). W przebiegu makroautofagii występuje szereg zdarzeń obejmujących tworzenie i wydłużanie błony fagoforu, dojrzewanie pęcherzyków autofagowych oraz późniejsze usuwanie docelowego materiału, do czego konieczna jest fuzja autofagosomu z lizosomem. Sygnałem inicjującym proces makroautofagii jest inaktywacja kinazy mTOR (z ang. *mammalian target of rapamycin kinase*), co umożliwia tworzenie kompleksu ULK1/2. Następnym etapem w tworzeniu autofagosomu jest tzw. nukleacja, w której uczestniczą BECN1 i AMBRA1. Kolejno, z udziałem m.in. ATG5, ATG7 i MAP1LC3AB następuje wydłużenie i zamknięcie autofagosomu. Dojrzały autofagosom łączy się następnie z lizosomem tworząc autofagolizosom, czyli strukturę, w której zachodzi rzeczywista degradacja (Wnuk i Kajta 2017, Deng i in. 2022). Zaburzenia autofagii, w szczególności makroautofagii, zidentyfikowano zarówno u pacjentów z chorobą Alzheimera, jak i w modelach zwierzęcych choroby (Nixon i in. 2005, Ling i in. 2009, Sanchez-Varo i in. 2012, Nixon 2013, Kesidou i in. 2013, Correia i in. 2015, Lachance i in. 2019). Wykazano również, że hamująca autofagię delecja NRFB2 (składnika kompleksu BECN1-PIK3C3) prowadzi do deficytów pamięci u myszy. Z kolei nadekspresja tego czynnika w hipokampie myszy stymulując autofagię zapobiega deficytom pamięci i redukuje poziom A β (Lachance i in. 2019). Ponadto, u osób z charakterystycznymi dla choroby Alzheimera zmianami w mózgu lecz bez objawów otępienia, wykazano zachowaną aktywność autofagii (Tumurbaatar i in. 2023). Wskazuje to, że w chorobie Alzheimera autofagia pełni funkcję ochronną, a zaburzenie procesu autofagii jest istotnym elementem przebiegu neurodegeneracji.

Zmiany statusu epigenetycznego

Zmiany epigenetyczne, takie jak metylacja DNA, modyfikacje histonów oraz niekodujące RNA, odgrywają istotną rolę w patogenezie choroby Alzheimera (Liu i in. 2018, Gao i in. 2022). Wymienione mechanizmy epigenetyczne są odwracalne i dynamiczne, umożliwiając komórkom reagowanie na wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe sygnały. Są one niezbędne w przebiegu procesów takich jak rozwój, odpowiedź immunologiczna i adaptacja do stresorów środowiskowych, a zakłócenia w regulacji epigenetycznej są powiązane z chorobami neurodegeneracyjnymi. Metylacja DNA polega na dodaniu grupy metylowej do cytozyn, często w obrębie wysp CpG, znajdujących się w regionach regulacyjnych DNA

(Illingworth i in. 2009). Obecność grupy metylowej utrudnia wiązanie aktywatorów transkrypcyjnych z DNA wpływając tym samym na ekspresję genów (Lee i in. 2014). Proces metylacji DNA katalizowany jest przez enzymy z grupy DNMT (z ang. *DNA methyltransferase*, metylotransferaza DNA), natomiast enzymy TET (z ang. *Ten-Eleven Translocation enzymes*) uczestniczą w procesie aktywnej demetylacji.

Wyniki badań nad metylacją DNA u pacjentów z chorobą Alzheimera są niespójne, ponieważ obserwowano zarówno wzrosty, jak i spadki, a nawet nie stwierdzono zmian w poziomie 5mC (cytozyny zmetylowanej w 5. węglu, Perkovic i in. 2021). W środkowym zakręcie skroniowym i środkowym zakręcie czołowym pacjentów z chorobą Alzheimera zaobserwowano znaczący wzrost poziomu 5mC, który korelował z poziomem A β i splątkami neurofibrylarnymi (Coppeters i in. 2014). Poza tym, z obecnością A β związane są również zmiany poziomu metylacji genów specyficznych dla LOAD takich jak *ANK1*, *ABAC7* i *BINI* (De Jager i in. 2014, Wood 2014, Kunkle i in. 2019, Alves i in. 2024). Jednak w komórkach glejowych, neuronach piramidowych i neuronach pola CA1 hipokampu stwierdzono obniżony poziom 5mC (Chouliaras i in. 2013, Phipps i in. 2016). Dostępne dane wskazują na złożoność zmian epigenetycznych związanych z patogenezą choroby Alzheimera sugerując, iż mogą być one specyficzne np. dla regionu/struktury mózgu, rodzaju komórek lub stadium choroby.

Białka histonowe (H1, H2A, H2B, H3 i H4) wiążą się z DNA tworząc nukleosomy, czyli podstawowe jednostki chromatyny biorące udział w regulacji ekspresji genów. Modyfikacje histonów wpływają na stabilność nukleosomu i interakcje między histonami regulując ekspresję genów (Strahl i in. 2000, Wang i in. 2013). Do modyfikacji histonów dochodzi na ich N-końcach, przy czym wśród tych modyfikacji wyróżniamy metylację, acetylację, fosforylację, ubikwitynację, sumoylację, glikozylację, biotynylację i ADP-rybozylację (Cacabelos i in. 2015, Stoccoro i in. 2018). Najlepiej zbadaną z tych modyfikacji jest acetylacja histonów, która zachodzi w resztach lizyny histonów H3 i H4 i jest katalizowana przez acetylotransferazy histonowe (z ang. *histone acetyltransferases* – HAT). Natomiast deacetylacja histonów jest regulowana przez deacetylazy histonów (z ang. *histone deacetylases* – HDAC). Acetylacja neutralizuje dodatni ładunek lizyn, rozluźniając interakcję między DNA a histonami, co umożliwia dostęp maszynerii transkrypcyjnej do promotorów genów (Wang i in. 2013). U pacjentów z MCI i chorobą Alzheimera odnotowano istotnie podwyższone poziomy HDAC1, HDAC3, HDAC4 i HDAC6 (Mahady i in. 2018). Nowe terapie celujące w ten patomechanizm są aktualnie testowane zarówno w badaniach przedklinicznych jak i

klinicznych (Pereira i in. 2024). Ostatnio wykazano również, że we wczesnych fazach choroby, A β zaburza równowagę między aktywnością Tip60 (HAT) i HDAC2, a przywrócenie odpowiedniego poziomu acetylacji histonów poprzez modulację HAT staje się kolejnym coraz popularniejszym kierunkiem badań (Zhang i in. 2020, Bhatnagar i in. 2023, 2025).

Neurozapalenie

Neurozapalenie to termin odnoszący się do odpowiedzi zapalnej toczącej się w ośrodkowym układzie nerwowym, do której dochodzi w reakcji na różne sytuacje patologiczne, w tym infekcje, urazy niedokrwienie czy obecność toksyn lub agregatów białkowych takich jak złoże A β . Proces zapalny charakteryzuje się syntezą cytokin prozapalnych (np.: IL1 β i TNF), chemokin, i reaktywnych form tlenu (ROS) za co odpowiedzialne są w dużej mierze komórki głojowe m.in. mikroglej (DiSabato i in. 2016). Uwolnienie czynników zapalnych może negatywnie wpływać na neurony, powodując zahamowanie neurogenezy, dysfunkcję synaps, a nawet śmierć komórki (Lyman i in. 2014). W przebiegu neurozapalenia wytwarzane są również czynniki przeciwzapalne, takie jak IL-4 i IL-10, których rolą jest zapobieganie nadmiernej aktywacji reakcji zapalnej (Calsolaro i in. 2016). W przypadku choroby Alzheimera zakłada się, że głównym czynnikiem aktywującym mikroglej jest A β (Kinney i in. 2018), przy czym aktywacja mikrogleju może skutkować fagocytozą A β i wspomagać jego usuwanie z układu (Hansen i in. 2018). Ponadto, istnieją doniesienia sugerujące, że odpowiedź zapalna wywołana patologią A β może prowadzić do hiperfosforylacji białka tau (Kitazawa i in. 2004). Komórki mikrogleju posiadają receptory rozpoznające wzorce (z ang. *Pattern Recognition Receptors* – PRR), dzięki którym są w stanie rozpoznawać wzorce molekularne związane z uszkodzeniem (z ang. *Damage Associated Patterns* – DAMPs) i wzorce molekularne związane z patogenami (z ang. *Pathogens Associated Molecular Patterns* – PAMPs) takie jak agregaty A β czy pozakomórkowe ATP (Davalos i in. 2005 Piccinini i Midwood, 2010, Muzio i in. 2021). Aktywacja PRR może aktywować ścieżkę NF κ B prowadzącą do zwiększenia ekspresji czynników zapalnych takich jak NLRP3. NF κ B to rodzina czynników transkrypcyjnych, do której należą NF κ B1 (p50/p105), NF κ B2 (p52/p100), RelB, RelA (p65/ NF κ B3) i c-Rel. Inflamasom NLRP3 stanowi najbardziej szczegółowo opisaną platformę aktywującą kaspazę-1 (Leng i Edison 2020). Aktywacja inflamasomu w mikrogleju i astrocytach prowadzi do dojrzewania cytokin IL1 β i IL-18, które inicjują kaskadę reakcji zaangażowanych w odpowiedź zapalną w układzie nerwowym (Fujimura i in. 2023).

W nauce przez lata funkcjonował dychotomiczny podział fenotypów zaktywowanego mikrogleju na M1-podobny (prozapalny) oraz M2-podobny (przeciwzapalny; Heneka i in. 2015, Ransohoff 2016). Jednak coraz więcej dowodów wskazuje na to, że temat ten jest znacznie bardziej skomplikowany, przez co współcześnie odchodzi się od takiego podziału. W mysim transgenicznym modelu choroby Alzheimera 5xFAD, jak również w ludzkich mózgach post mortem, stwierdzono obecność mikrogleju związanego z chorobą (z ang. *Disease-Associated Microglia* – DAM), który był zlokalizowany w pobliżu złogów A β i charakteryzował się zdolnością fagocytozy oraz zmienioną ekspresją genów homeostatycznych i genów charakterystycznych dla choroby Alzheimera takich jak APOE i TREM2 (Corder i in. 1993, Guerreiro i in. 2013, Keren-Shaul i in. 2017). Co interesujące, analiza transkryptomu pojedynczych jąder komórkowych wykazała, że w korze śródwęchowej pacjentów z chorobą Alzheimera występują zmiany ekspresji APOE są zależne od typu komórki – podczas gdy w komórkach mikrogleju obserwuje się wzrost ekspresji tego czynnika, astrocyty i oligodendrocyty wykazują jego spadek (Grubman i in. 2019). W innych badaniach ludzkich mózgów post mortem, biorących pod uwagę szerszy zakres obszarów mózgu, zidentyfikowano trzy klastry komórek mikrogleju: homeostatyczny mikroglej, mikroglej typu AD1 (zlokalizowany w okolicy złogów A β , podobny do DAM) i mikroglej typu AD2 (jego lokalizacja koreluje z obecnością patologii tau; Gerrits i in. 2021). Uważa się, że aktywacja odpowiedzi zapalnej komórek mikrogleju na wczesnych etapach choroby Alzheimera wywiera pozytywny wpływ, przeciwdziałając rozwojowi choroby. Jednak przedłużona aktywacja odpowiedzi immunologicznej powoduje zaostrzenie patologii, poprzez zmniejszenie zdolności mikrogleju do rozkładania złogów A β i utrzymujący się podwyższony poziom cytokin prozapalnych i reaktywnych form tlenu, które zaczynają uszkadzać neurony (Hickman i in. 2008, Kinney i in. 2018). Podsumowując, w chorobie Alzheimera dochodzi do aktywacji mikrogleju, lecz fenotyp zaktywowanych komórek różni się w zależności od lokalizacji komórki. Zaktywowane komórki mikrogleju w początkowym stadium choroby działają pozytywnie, uczestnicząc w usuwaniu złogów A β , lecz w dalszych etapach choroby nadaktywna odpowiedź zapalna wywiera negatywny wpływ, sprzyjając progresji choroby.

Prewencja, diagnostyka i leczenie choroby Alzheimera

Czynniki ryzyka i prewencja

Dokładna etiologia sporadycznej postaci choroby Alzheimera nie została w pełni poznana, jednak coraz więcej dowiadujemy się o czynnikach ryzyka, których redukcja może posłużyć jako pierwsza linia obrony przed chorobą. Jak wspomniano, płeć jest istotnym predyktorem ryzyka choroby Alzheimera. Istotną rolę hormonów płciowych podkreśla dodatkowo fakt, iż wczesne wystąpienie menopauzy (przed 45. rokiem życia) wiąże się z podwyższonym prawdopodobieństwem zachorowania, w porównaniu do późniejszej menopauzy (Fu i in. 2021). Wśród głównych czynników ryzyka wymieniane są także: nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, otyłość, brak aktywności fizycznej, izolacja społeczna, niski poziom wykształcenia, nadmierne spożycie alkoholu, narażenie na zanieczyszczenia powietrza, palenie tytoniu, utrata słuchu, urazowe uszkodzenie mózgu i depresja (Livingston i in. 2020). Nowe dowody wskazują również nieleczoną utratę wzroku i wysoki poziom cholesterolu LDL jako kolejne czynniki istotnie zwiększające ryzyko wystąpienia choroby Alzheimera (Livingston i in. 2024). Co istotne, stwierdzono, że redukcja tych czynników może potencjalnie zapobiec 40% przypadków demencji (Livingston i in. 2020, 2024). Przykładowo, wykazano, że osoby wykonujące bardziej stymulującą umysłowo pracę mają obniżone ryzyko demencji i jest to związane z niższym poziomem białek hamujących aksonogenezę i synaptogenezę (Kivimäki i in. 2021). Natomiast metaanaliza 8 badań kohortowych z udziałem prawie 130 tysięcy osób wykazała, że osoby z ubytkiem słuchu stosujące aparat słuchowy miały istotnie niższe ryzyko pogorszenia funkcji poznawczych niż osoby niekorzystające z urządzeń wspomagających (Yeo i in. 2023). Podobnie, osoby ze zdiagnozowaną depresją, które podejmują farmakoterapię, psychoterapię lub ich kombinację, charakteryzują się obniżonym ryzykiem demencji względem osób nieleczonych (Yang i in. 2023). Natomiast jedną z najłatwiej dostępnych zmian, którą wprowadzić można niezależnie od wieku i stanu zdrowia jest aktywność fizyczna. Wykazano, że poprawia ona m.in. przepływ krwi, redukuje nadciśnienie, zwiększa neuroplastyczność i obniża stan zapalny (Huuha i in. 2022). Metaanaliza wykonana na podstawie 58 badań z udziałem niemal 260 tysięcy osób wykazała, że aktywność fizyczna wywołuje istotny spadek ryzyka choroby Alzheimera oraz demencji o różnej etiologii, a największa redukcja ryzyka widoczna była po przejściu z ekstremalnie siedzącego trybu życia na jakąkolwiek aktywność fizyczną (Iso-Markku i in. 2022). Sugeruje to, że już stosunkowo niewielkie interwencje w zakresie stylu życia mogą

znacząco obniżyć ryzyko wystąpienia choroby Alzheimera, bez potrzeby przeprowadzania drastycznych zmian.

Diagnostyka

Metody klinicznej diagnostyki choroby Alzheimera opierają się głównie na wywiadzie lekarskim, testach neuropsychologicznych, badaniu obrazowym i oznaczeniu biomarkerów. Wśród metod obrazowych wymienić można rezonans magnetyczny (z ang. *Magnetic Resonance Imaging* – MRI) pokazujący zmiany w strukturze mózgu i pozytronową tomografię emisyjną (z ang. *Positron Emission Tomography* – PET), która umożliwia śledzenie metabolizmu glukozy i identyfikację specyficznych dla choroby białek A β i tau (Villelagné i in. 2016, Pascoal i in. 2020). Obecność biomarkerów oznaczana jest również w płynie mózgoworodzeniowym, a popularne badania to przykładowo oznaczenie ilości A β ₄₂, całkowitej ilości tau oraz ilości fosforylowanego tau, łańcucha lekkiego neurofilamentu (z ang. *NeuroFilament Light chain* – NFL; Jack i in. 2016, 2018, Liu i in. 2024). Wymienione metody są jednak kosztowne i jak w przypadku punkcji lędźwiowej, stosunkowo inwazyjne, co znacząco ogranicza ich zastosowanie kliniczne. W związku z tym coraz większe zainteresowanie budzi poszukiwanie biomarkerów możliwych do wykrycia w krwi obwodowej. Przykładem są biomarkery osoczowe takie jak stosunek A β ₄₂/A β ₄₀ czy obecność specyficznych form fosforylowanego białka tau, które mają wartość diagnostyczną i prognostyczną (Schindler i in. 2019, Karikari i in. 2022, Lantero-Rodriguez i in. 2024). Jednak sama obecność biomarkerów, bez objawów klinicznych nie świadczy o chorobie. Niemniej jednak biomarkery są użyteczne np. w specyfikacji rodzaju demencji, na którą cierpi pacjent. Kluczowe znaczenie ma jak najwcześniejsze wdrożenie interwencji terapeutycznych, aby zapobiec nieodwracalnemu uszkodzeniu neuronów. Co istotne, zmiany widoczne w badaniach obrazowych oraz zauważalne w poziomie biomarkerów pojawiają się jeszcze przed wystąpieniem pierwszych funkcjonalnych objawów choroby, potencjalnie umożliwiając jej wykrycie jeszcze w stadium przedklinicznym (Liu i in. 2024).

Pojawienie się objawów poznawczych poprzedzają też zmiany inne niż kognitywne, które również mogą posłużyć do wczesnego wykrycia początków choroby Alzheimera (Chen i in. 2024). Wśród nich wymienia się zaburzenia sensoryczne, w tym osłabienie słuchu i węchu, zmiany chorobowe w obrębie siatkówki oka oraz zmiany motoryczne np. spowolnienie tempa chodu (Roberts i in. 2016, O'Bryhim i in. 2018, Tian i in. 2021, Skillbäck i in. 2022, Stevenson i in. 2022). Dodatkowo, w przedklinicznym stadium choroby występują zaburzenia rytmu

okołodobowego, a także objawy psychiczne, jak depresja i drażliwość (Shi i in. 2018, Wise i in. 2019). Zwrócenie uwagi na te subtelne sygnały może stanowić stosunkowo tanie, łatwo dostępne i nieinwazyjne narzędzie wspierające wczesną diagnostykę. Już dziś wiele z tych parametrów można monitorować za pomocą powszechnie dostępnych sensorów, takich jak inteligentne zegarki czy pierścienie śledzące aktywność i sen. Rozwój nowych technologii z pewnością pozwoli na jeszcze skuteczniejsze monitorowanie ludzkiego ciała, co może stworzyć realną szansę na wykrywanie zmian sygnalizujących rozwijającą się neurodegenerację. Poszukiwanie i walidacja takich wskaźników stanowi więc istotny kierunek badań, który może umożliwić wczesną interwencję terapeutyczną.

Leczenie

Dostępna farmakoterapia choroby Alzheimera obejmuje leki łagodzące objawy, a od niedawna także immunoterapie modyfikujące przebieg choroby. Inhibitory acetylocholinesterazy (donepezyl, galantamina, rywastygmina) działają poprzez podnoszenie poziomu acetylocholiny tj. neuroprzekaźnika o istotnej roli w procesach pamięci i uczenia się (Erkinjuntti i in. 2002, Ballard i in. 2005). Kolejnym dostępnym lekiem jest memantyna, która działając antagonistycznie wobec receptora NMDA ogranicza ekscytotoksyczność glutaminianu (Robinson i in. 2006). Mimo iż wspomniane leki są na rynku od dawna, wciąż trwają badania nad udoskonaleniem terapii z ich wykorzystaniem, poprzez dobór odpowiedniej drogi podania, dostosowanie dawki oraz połączeń leków (np. memantyna w połączeniu z donepezilem), co ma szansę zwiększyć efektywność terapii oraz zmniejszyć występowanie skutków ubocznych, takich jak nudności, zawroty głowy i utrata wagi (Howard i in. 2012, Kabir i in. 2020, Nunes i in. 2022). Obecnie dostępne leki nie oddziałują na kluczowe patomechanizmy choroby, takie jak agregacja A β , hiperfosforylacja białka tau czy przewlekłe neurozapalenie, lecz ich działanie ma głównie charakter objawowy. W związku z tym trwają intensywne prace badawcze nad opracowaniem nowych terapii.

Według bazy ClinicalTrials.gov aktualnie prowadzonych jest ponad 690 badań klinicznych weryfikujących potencjalne terapie choroby Alzheimera. Badania te koncentrują się głównie wokół 1) oddziaływania na receptory neurotransmiterów, 2) ograniczeniu produkcji i agregacji oraz zwiększeniu usuwania A β , 3) stabilizacji mikrotubul, modulacji fosforylacji i zapobieganiu agregacji białka tau oraz 4) przeciwdziałaniu neurozapaleniu (Zhang i in. 2024). W ostatnich latach coraz większą uwagę przykuwają modyfikujące przebieg choroby immunoterapie, czyli przeciwciała skierowane przeciwko A β , takie jak Aducanumab,

Lecanemab czy Donanemab (van Dyck i in. 2023, Sims i in. 2023). Wymienione terapie działają poprzez wiązanie toksycznych form amyloidu i usuwanie ich, co może spowolnić postęp choroby w jej wczesnych stadiach. Niestety przeciwciała tego typu mogą prowadzić do obrzęku mózgu i krwawień, objawiających się jako tzw. AIRA-E (z ang. *Amyloid-Related Imaging Abnormalities-Edema*), co spowodowało wstrzymanie prób klinicznych z zastosowaniem preparatu aducanumab (Haddad i in. 2022). Dodatkowo, terapia tego typu jest stosunkowo droga; koszt rocznego leczenia preparatem Lecanemab wynosi około 26500\$ (Livingston i in. 2024). Aktualnie testowane są również nowe terapie celujące w białko tau. Niedawno zakończyła się II faza badań klinicznych nad monoklonalnym przeciwciałem skierowanym przeciwko białku tau o nazwie Semorinemab, lecz uzyskane wyniki wskazują, że mimo poprawy widocznej w testach neuropsychologicznych, lek ten nie przynosi pozytywnych zmian w codziennym funkcjonowaniu pacjentów (Teng i in. 2022, Monteiro i in. 2023). Obecnie trwają również badania kliniczne fazy II nad lekiem BIIB080, który jest oligonukleotydem antysensownym, służącym ograniczeniu syntezy białka tau (Lozupone i in. 2023). Jednak warto pamiętać, że w patologii choroby Alzheimera, to nie nadprodukcja tau, lecz jego nadmierna fosforylacja i agregacja stanowią problem. W mechanizm agregacji celują z kolei inne leki o nazwach LMTM (z ang. *Leuco-Methylthioninium Bis(Hydromethanesulphonate)*) i HMTM (z ang. *hydromethylthionine mesylate*), a wstępne dane pochodzące z III fazy badań klinicznych wskazują na ich możliwe korzystne działanie (Wilcock i in. 2018, Wischik i in. 2022). Natomiast nowatorskim podejściem celującym w nadmierną fosforylację tau jest wykorzystanie białkowych chimer powodujących defosforylację konkretnego celu molekularnego (Zheng i in. 2021, Hu i in. 2023). Leki o takim mechanizmie jednak nie są jeszcze na etapie badań klinicznych. Podsumowując, mimo intensywnych badań, wciąż nie opracowano w pełni skutecznej terapii choroby Alzheimera. Kluczowe znaczenie ma więc dalsze poszukiwanie nowych strategii terapeutycznych.

Ochronny potencjał estrogenów w chorobach ośrodkowego układu nerwowego

Choroba Alzheimera znacznie częściej dotyka kobiety, szczególnie w okresie pomenopauzalnym (Rajan i in. 2021). Zróżnicowana podatność na chorobę Alzheimera w zależności od płci i wieku wskazuje na istotną rolę hormonów płciowych, takich jak estrogeny, w jej patogenezie (Lee-Lopez i in. 2024). Estrogeny to zarówno hormony obwodowe, jak i kluczowe dla utrzymania homeostazy mózgu neurosteroidy, które regulują

m.in. plastyczność synaptyczną, neurogenezę, zachowania rozrodcze, zachowania agresywne czy przetwarzanie bólu. Liczne doniesienia wskazują, że aktywacja receptorów estrogenowych wywołuje efekty neuroprotektcyjne, zmniejszając uszkodzenia w komórkowych i zwierzęcych modelach chorób neurodegeneracyjnych (Kajta i Beyer 2003, Spence i in. 2011, Kajta i in. 2013, Arevalo i in. 2015, Rzemieniec i in. 2018, Pietrzak, Wnuk i in. 2023, Shvetcov i in. 2023, Cipriano i in. 2024).

U kobiet spadający w okresie menopauzy poziom estradiolu jest powiązany z wyższym ryzykiem upośledzenia funkcji poznawczych, zaburzeń afektywnych i choroby Alzheimera, co wskazuje na neuroprotektyjną rolę estradiolu (Scott i in. 2012). Natomiast stosowana w leczeniu objawów menopauzy terapia hormonalna, zazwyczaj łącząca estrogeny i progestageny, wiąże się z poprawą funkcji poznawczych u kobiet po menopauzie, co może sugerować właściwości neuroprotektcyjne tej terapii (Tang i in. 1996, Sherwin i in. 2003). Badania na samicach gryzoni ujawniły, że obniżenie poziomu estradiolu w osoczu poprzez m.in. owariektomię zwiększa dotkliwość uszkodzenia mózgu w modelach chorób neurodegeneracyjnych, obniża metabolizm glukozy w mózgu i zwiększa ilość oligomerów A β (Azcoitia i in. 1999, 2001; Yue i in. 2005; Overk i in. 2012; Ding i in. 2013). Z kolei terapia hormonalna, która przywraca poziom estradiolu, łagodzi uszkodzenie mózgu, normalizuje metabolizm glukozy i zmniejsza poziom A β w tych modelach (Azcoitia i in. 1999; Ding i in. 2013). Wahania poziomu estradiolu w trakcie cyklu rujowego również wpływają na skalę uszkodzeń mózgu. Przykładowo, podanie neurotoksyny kwasu kainowego po fazie najwyższego stężenia estradiolu w cyklu rujowym skutkuje mniejszym uszkodzeniem hipokampa niż jej aplikacja przed osiągnięciem tego poziomu (Azcoitia i in. 1999).

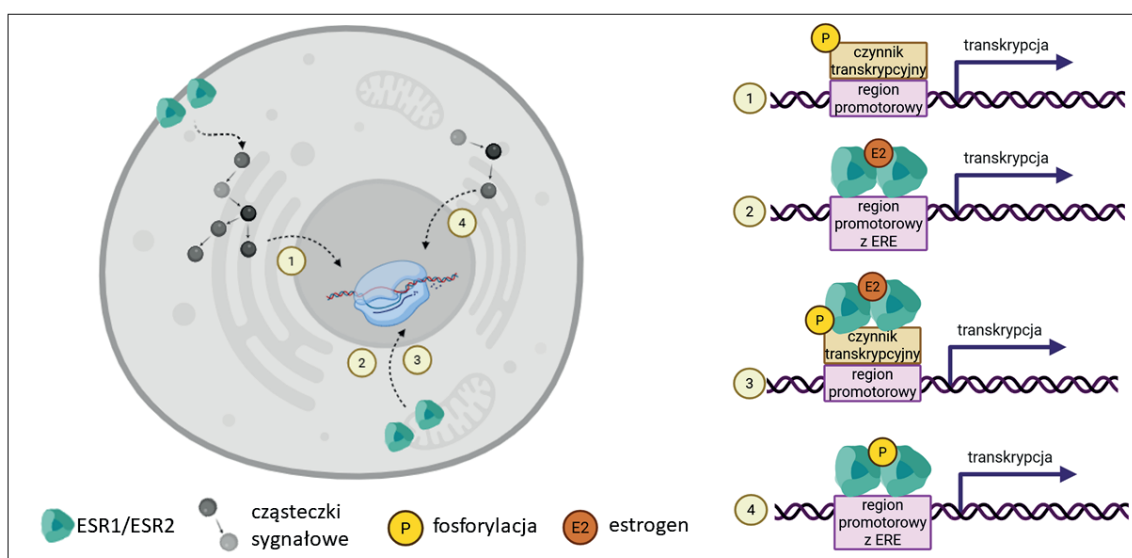
Mechanizmy działania estrogenów

Równolegle z postępem w wiedzy na temat roli estrogenów w funkcjonowaniu neuronów i neuroprotekcji, coraz dokładniej poznawane są leżące u podstaw ich działania mechanizmy molekularne. Wiązanie estrogenu z receptorami estrogenowymi aktywuje szeroki wachlarz mechanizmów sygnalizacyjnych, które mogą odgrywać kluczową rolę w ochronie przed procesami neurodegeneracyjnymi. Klasyczne receptory estrogenowe ER α /ESR1 (receptor estrogenowy 1/ receptor estrogenowy α) i ER β /ESR2 (receptor estrogenowy 2/ receptor estrogenowy β) to czynniki transkrypcyjne, składające się m.in. z domeny wiążącej DNA i domeny wiążącej ligand (Green i in. 1986, Greene i in. 1986). Ich ligandem może być zarówno endogenny estrogen (np. 17 β -estradiol), fitoestrogen (np. genisteina), ksenoestrogen

(np. bisfenol A), czy selektywny modulator receptorów estrogenowych (z ang. *Selective Estrogen Receptor Modulator* – SERM, np. tamoksyfen). Gdy taki steroid łączy się z domeną wiążącą ligand wówczas aktywuje receptor, a następnie indukuje jego homo- lub heterodimeryzację oraz translokację do jądra komórkowego. Następnie, poprzez domenę wiążącą DNA, receptor wiąże się z elementami odpowiedzi na estrogeny (ERE) w regionie promotorowym określonego genu, co skutkuje rekrutacją ko-aktywatorów i/lub ko-represorów transkrypcji np. z rodziny SRC (z ang. *Steroid Receptor Coactivators*; Shang i in. 2000, Altwegg i in. 2021). Około jedna trzecia genów regulowanych przez estrogeny nie zawiera ERE w regionach promotorowych bądź regulatorowych, tak więc klasyczne receptory estrogenowe mogą regulować transkrypcję genów w alternatywne sposoby (O'Lone i in. 2004, Vrtačnik i in. 2014). Taki mechanizm nazywany jest pośrednią sygnalizacją genomową lub transkrypcyjnym cross-talk'iem. Zaktywowane receptory estrogenowe mogą wchodzić w interakcje z innymi białkami regulującymi transkrypcję, takimi jak m.in. SP-1, AP-1, czy NFκB tym samym regulując ich aktywność transkrypcyjną w miejscach docelowych (Safe i in. 2008, Fuentes i Silveyra 2019). Ponadto, receptory estrogenowe mogą być regulowane przez wewnątrzkomórkowe ścieżki sygnałowe, przykładowo poprzez fosforylację receptora (Ma i in. 1994, Mendez i in. 2006).

Estrogeny, oprócz bezpośredniej regulacji ekspresji genów, oddziałują również na szybkie mechanizmy sygnalizacji komórkowej, aktywując pozajądrowe szlaki sygnałowe. Choć mechanizmy te najczęściej przypisuje się błonowym receptorom sprzężonym z białkami G (GPER1/GPR30, Gq mER czy ER-X), wiadomo również, że ulokowane w błonie klasyczne receptory estrogenowe, określane jako mERα i mERβ, mogą pośredniczyć w tego typu sygnalizacji (Qiu i in. 2003, Hu i in. 2016, Wnuk i in. 2023). Szybka sygnalizacja estrogenowa za pośrednictwem mERα i mERβ koncentruje się na aktywacji kinaz białkowych, głównie MAPK (kinaz białkowych aktywowanych mitogenami) w tym ERK (kinazy aktywowanej zewnątrzkomórkowo) - odpowiedzialnej za wzrost, proliferację i różnicowanie komórek – a także p38/MAPK i JNK (c-Jun), aktywowanych w odpowiedzi na stres komórkowy (Ronda i in. 2010, González-Mora i in. 2021). Kolejny mechanizm inicjowanej pozajądrowo sygnalizacji ESR1 i ESR2 polega na aktywacji kinazy białkowej B (PKB lub Akt), a mechanizm ten jest uważany za kluczowy w zależnych od E2 efektach proliferacyjnych i migracyjnych (Acconcia i in. 2011). mERα i mERβ wchodzi również w interakcje z rodziną białek Gα, dzięki czemu przekazują sygnał przez kolejne molekularne ścieżki, w tym zależną od cAMP kaskadę PKA (kinazy białkowej A), kaskadę PLC (fosfolipazy C) czy ścieżkę

zależną od Rho (Wnuk i in. 2023). Główne mechanizmy działania receptorów ESR1 i ESR2 przedstawiono na Schemacie 1.



Schemat 1. Główne mechanizmy działania receptorów ESR1 i ESR2. 1) Aktywacja inicjowanej pozajądrowo ścieżki sygnałowej ESR1 i/lub ESR2 prowadzi do uruchomienia kaskady wtórnych przekazników, które mogą regulować transkrypcję genów np. przez aktywację czynników transkrypcyjnych, poprzez ich fosforylację. 2) Aktywacja klasycznej ścieżki sygnałowej ESR1 i ESR2 polegająca na bezpośredniej aktywacji transkrypcji w regionach ERE (z ang. estrogen response element – element odpowiedzi na estrogeny). 3) Aktywacja klasycznej ścieżki sygnałowej ESR1 i ESR2 polegająca na pośredniej aktywacji transkrypcji, zależna od aktywacji innych czynników transkrypcyjnych przez zaktwowane receptory estrogenowe. 4) Niezależna od liganda ścieżka aktywacji transkrypcji w regionach ERE, inicjowana poprzez aktywację innych niż estrogenowe receptorów, prowadząca do aktywacji wtórnych przekazników, a następnie aktywacji ESR1/ESR2 poprzez fosforylację. Wykonano przy użyciu oprogramowania BioRender.com

Ochronne działanie estrogenów czyni je atrakcyjną opcją w leczeniu lub prewencji choroby Alzheimera, jednak ich zastosowanie kliniczne ograniczają działania niepożądane związane z aktywacją klasycznych szlaków receptorów estrogenowych poza ośrodkowym układem nerwowym. Nieselektywna aktywacja receptorów estrogenowych może prowadzić m.in. do zwiększenia ryzyka wystąpienia nowotworów hormono-zależnych, jak i chorób układu sercowo-naczyniowego (Deli i in. 2019, Abou-Ismael i in. 2020, Morris i in. 2023). Odkrycie roli receptorów estrogenowych w mózgu otworzyło możliwości wykorzystania nowych, selektywnych ligandów, które mogą stać się bezpieczną alternatywą dla klasycznych, endogennych ligandów, pozbawioną niebezpiecznych skutków ubocznych związanych z ich stosowaniem. Dotychczasowe badania koncentrowały się wokół fitoestrogenów oraz SERMs,

które wprawdzie stanowią bezpieczniejszą alternatywę dla estrogenów, ale ich stosowanie jest nadal obarczone pewnym ryzykiem. Substancje z grupy SERMs mogą działać jak agonista lub antagonistą w zależności od tkanki, co zdeterminowane jest między innymi dostępnością ko-aktywatorów i ko-represorów transkrypcji. Dzięki temu mogą one wywoływać efekt estrogeny w wybranej tkance, jednocześnie nie wywołując go w innej. Przykładowo, raloksyfen czyli SERM, który stosowany jest u kobiet po menopauzie w celu prewencji osteoporozy (działanie agonistyczne wobec receptorów estrogenowych) i nowotworów piersi (działanie antagonistyczne wobec receptorów estrogenowych). Mimo że stosowanie substancji z grupy SERMs jest bezpieczniejsze niż wykorzystanie estrogeny, wciąż nie są one wolne od działań niepożądanych, wśród których do najpoważniejszych należy zwiększone ryzyko chorób zakrzepowo-zatorowych (drugbank.com, Messalli i in. 2010). Początkowe badania wykazały, że stosowanie raloksyfenu może redukować ryzyko rozwoju zaburzeń poznawczych u kobiet po menopauzie (Yaffe i in. 2005). Mimo to, we wstępnych badaniach klinicznych u kobiet cierpiących na LOAD, raloksyfen nie poprawiał funkcji poznawczych (Henderson i in. 2015). Poszukiwanie nowych skutecznych strategii wykorzystujących terapeutyczny potencjał receptorów estrogenowych jest więc tematem bardzo aktualnym i wymagającym dalszych badań.

Selektywna aktywacja inicjowanej pozajądrowo sygnalizacji estrogenowej z zastosowaniem PaPE-1

Kolejnym nowym sposobem na wykorzystanie neuroprotektoryjnego potencjału aktywacji receptorów estrogenowych przy jednoczesnym uniknięciu hormonalnych skutków ubocznych jest selektywna aktywacja niejądrowych ścieżek sygnałowych tych receptorów. PaPE-1 (z ang. *Pathway Preferential Estrogen* - preferencyjny dla ścieżki estrogen; (S)-5-(4-Hydroxy-3,5-dimethyl-phenyl)-indan-1-ol) to nowa obiecująca substancja, która selektywnie aktywuje niejądrowe szlaki sygnałowe receptorów ESR1 i ESR2. Dokładnej charakterystyki tej substancji dokonali jej twórcy w pracy Madak-Erdogan i in. (2016), która jest pierwszym doniesieniem na ten temat. W porównaniu do estradiolu, PaPE-1 wykazuje 50 tysięcy razy zmniejszone powinowactwo wiązania do ESR1 i ESR2. Stała dysocjacji PaPE-1 wynosi 10 μ M w przypadku receptora ESR1 i 25 μ M w przypadku receptora ESR2. Dla porównania, stała dysocjacji dla estradiolu wynosi odpowiednio 0,2 nM dla ESR1 i 0,5 nM dla ESR2. Estradiol reguluje ekspresję większej liczby genów niż PaPE-1, przy czym 75% genów modulowanych przez PaPE-1 wykazuje zbieżność z tymi na które wpływa estradiol. Wskazuje to, że obydwa

wymienione ligandy mają zarówno wspólne jak i odmienne efekty działania. Dodatkowo, o selektywności PaPE-1 świadczy fakt, iż w komórkach linii MCF7 nie wpływa on na ekspresję genu *PgR*, którego ekspresja jest regulowana przez receptory estrogenowe w klasyczny, jądrowy sposób. Jednocześnie PaPE-1 selektywnie indukuje ekspresję genu charakterystycznego dla inicjowanych pozajądrowo szlaków sygnałowych receptorów estrogenowych – *LRRC54*. Efekt ten zostaje zniesiony wraz z wyciszeniem ekspresji/blokadą ESR1, lecz nie GPER1. Można z tego wywnioskować, że w działaniu PaPE-1 pośredniczą inicjowane pozajądrowo szlaki sygnałowe receptora ESR1. Natomiast GPER1 nie jest zaangażowany w obserwowane zmiany. Stosując tę samą linię komórkową autorzy wykazali również, że w działaniu PaPE-1 uczestniczą ścieżki sygnałowe mTOR i MAPK, a ich zablokowanie zahamowało zmianę ekspresji odpowiednio 60 i 23% genów regulowanych przez PaPE-1. Geny te związane były głównie z metabolizmem nukleotydów, odpowiedzią zapalną, procesowaniem ncRNA, transportem aminokwasów i metabolizmem glikoprotein.

Podanie PaPE-1, w przeciwieństwie do estradiolu nie powoduje wiązania koaktywatora receptorów jądrowych SRC3 (z ang. *Steroid Receptor Coactivator-3*). Oznacza to, że PaPE-1 ma inne niż estradiol interakcje z receptorami estrogenowymi tj. mniejsze powinowactwo wiązania do receptora oraz ułatwioną dysocjację. Ponadto, wyższe stężenia PaPE-1 odwracają wiązanie SRC3 do kompleksu ESR1-estradiol. Wskazuje to, na odmienne mechanizmy działania PaPE-1 i naturalnego estrogenu. Autorzy postanowili również scharakteryzować wywołane przez PaPE-1 zmiany transkrypcji w kontekście roli rekrutacji do chromatyny ESR1, ERK2 i polimerazy RNA II. PaPE-1, w przeciwieństwie do estradiolu nie indukuje rekrutacji ESR1 do chromatyny. Powoduje natomiast rekrutację ERK2 do sekwencji wzmacniających (enhancerów) genów, podczas gdy estradiol wywołuje rekrutację ERK2 i ESR1 do proksymalnych regionów promotorowych genów. Ponadto, PaPE-1 wywołuje rekrutację polimerazy RNA II, ale w inne miejsca niż estradiol, co podkreśla jego odmienne od klasycznych ligandów działanie. Podsumowanie uzyskanych wyników znajduje się w Tabeli 1.

Tabela 1. Porównanie estradiolu i PaPE-1 na podstawie pracy Madak-Erdogan i in. 2016. Wyniki opierające się na układach bezkomórkowych oraz badaniach z zastosowaniem linii MCF7

	<i>estradiol</i>	<i>PaPE-1</i>
<i>Względne powinowactwo wiązania (z ang. relative binding affinity - RBA)</i>	ESR1: 100 ESR2: 100	ESR1: 0,002 ESR2: 0,002
$K_i = K_d \text{ (dla estradiolu)} \times (100/RBA)$	ESR1: 0,2 nM ESR2: 0,5 nM	ESR1: 10 μ M ESR2: 25 μ M
<i>Rekrutacja ko-regulatora SRC3 do kompleksu ESR1-ligand</i>	obecna	nieobecna
<i>Zmiana ekspresji genów</i>	po 4 godz. ~1500 genów po 24 godz. ~3000 genów	po 4 godz. ~500 genów po 24 godz. ~2200 genów
<i>Ekspresja PgR (marker estrogenowego szlaku jądrowego)</i>	stymulacja	brak wpływu
<i>Ekspresja LRRC54 (marker estrogenowego szlaku inicjowanego pozajądrowo)</i>	stymulacja	stymulacja
<i>Rekrutacja ESR1 do chromatyny</i>	do proksymalnych regionów promotorowych	brak rekrutacji
<i>Rekrutacja polimerazy RNA II do chromatyny</i>	obecna	w inne miejsca niż w przypadku estradiolu
<i>Rekrutacja ERK2 do chromatyny</i>	do proksymalnych regionów promotorowych	do enhancerów
<i>Prolifерacja komórek linii MCF7</i>	stymulowana	brak stymulacji
<i>Aktywacja ścieżek sygnałowych MAPK i mTOR</i>	obecna	obecna

Twórcy substancji scharakteryzowali również jej działanie w modelu *in vivo*, wykorzystując owariektomizowane (tj. pobawione chirurgicznie jajników) samice myszy, którym przez dwa tygodnie podawano PaPE-1 (Madak-Erdogan i in. 2016). Podsumowanie uzyskanych wyników znajduje się w Tabeli 2. Wykazano, że PaPE-1, w przeciwieństwie do estradiolu, nie spowodował wzrostu masy macicy, involucji grasicy ani zmiany morfologii przewodów gruczołu mlekowego. Natomiast podobnie jak estradiol, PaPE-1 zmniejszył otluszczenie gruczołu sutkowego, zapobiegł wzrostowi masy ciała, zmniejszył ilość kropli lipidowych w hepatocytach i stymulował regenerację śródbłonna naczyń. Madak-Erdogan i in. (2016) sprawdzili również profile ekspresji genów w różnych tkankach i potwierdzili, że PaPE-1 i estradiol mają podobne profile działania w tkankach takich jak mięśnie szkieletowe, i wątroba, natomiast odmienne w tkankach układu rozrodczego – w macicy. Następnie w celu weryfikacji udziału ESR1 w efektach działania PaPE-1 twórcy substancji wykorzystali myszy z nokautem genu *Esr1* i myszy eksponowane na silny anty-estrogen ICI 182,780, u których nie zaobserwowali efektów działania badanej substancji.

Tabela 2. Porównanie działania estradiolu i PaPE-1 na podstawie pracy Madak-Erdogan i in. 2016. Wyniki dotyczą wywołanych pod wpływem estradiolu lub PaPE-1 zmian zaobserwowanych u owariektomizowanych samic myszy

	<i>estradiol</i>	<i>PaPE-1</i>
<i>Masa macicy</i>	wzrost	brak zmian
<i>Masa grasicy</i>	spadek	brak zmian
<i>Morfologia przewodów gruczołu mlekowego</i>	zmieniona	brak zmian
<i>Masa ciała</i>	spadek	spadek
<i>Masa tłuszczu w organizmie</i>	spadek	spadek
<i>Masa beztłuszczowa w organizmie</i>	wzrost	brak zmian
<i>Masa wody w organizmie</i>	wzrost	brak zmian

<i>Otluszczenie gruczołu mlekowego</i>	spadek	spadek
<i>Ilość kropli lipidowych w hepatocytach</i>	spadek	spadek
<i>Regeneracja śródbłonna naczyń</i>	obecna	obecna

W kolejnych badaniach z zastosowaniem PaPE-1 wykazano nową rolę inicjowanej pozajądrowo sygnalizacji ESR1 w przeprogramowaniu metabolizmu komórek nowotworu piersi w odpowiedzi na czynniki związane z otyłością obecne w osoczu (Madak-Erdogan i in. 2019). PaPE-1 wpływa pozytywnie na metabolizm w mysich modelach otyłości – modelu otyłości indukowanej dietą oraz w modelu genetycznym ob/ob – gdzie pod wpływem testowanego liganda zaobserwowano m.in. zmniejszenie masy ciała i stłuszczenia wątroby, a także ograniczenie stanu zapalnego (Zuo i in. 2021). W innych badaniach Selvaraj i in. (2018) wykazali, że PaPE-1, podane w paradygmacie przedurazowym (tzw. *pre-treatment*) zmniejsza dotkliwość udaru mózgu, łagodzi neurozapalenie i wspomaga powrót do zdrowia myszy w modelu udaru niedokrwienego tMCAO (z ang. *transient Middle Cerebral Artery Occlusion* – przejściowa okluzja tętnicy mózgowej środkowej). Nasza grupa badawcza wykazała, iż PaPE-1 działa neuroprotektoryjne nawet gdy podany jest z sześciogodzinnym opóźnieniem względem rozpoczęcia epizodu hipoksyjno-ischemicznego *in vitro* (Wnuk i in. 2021).

Nasze ostatnie badania wykazały również, że w komórkowym modelu toksyczności wywołanej A β , PaPE-1 podany łącznie z toksycznym białkiem wpływa ochronnie na komórki nerwowe (Wnuk i in. 2020). W obecnej pracy doktorskiej skupiłam się na weryfikacji neuroprotektoryjnych właściwości oraz na identyfikacji molekularnych mechanizmów działania PaPE-1 w analogicznym modelu, lecz w innym paradygmacie czasowym tj. tzw. paradygmacie „*post-treatment*”, który jest zdecydowanie bardziej zbliżony do realiów klinicznych. W moich badaniach PaPE-1 podawany był z 24-godzinnym odroczeniem czasowym względem A β .

HIPOTEZA BADAWCZA

- 1) Selektywna aktywacja niejądrowych ścieżek sygnałowych receptorów ESR1 i ESR2 chroni komórki nerwowe przed toksycznym działaniem A β , przy czym efekt ochronny występuje po podaniu PaPE-1 w paradygmacie odroczonego w czasie leczenia.
- 2) Mechanizmy ochronnego działania PaPE-1 polegają na hamowaniu procesu apoptozy i stymulowaniu procesu autofagii w komórkach narażonych na działanie A β , co ma związek ze zmianą statusu epigenetycznego.
- 3) PaPE-1 wywołuje efekty ochronne za pośrednictwem ESR1 i/lub ESR2, co jest związane ze zmianami ekspresji mRNA i/lub poziomu białka tych receptorów.
- 4) PaPE-1 moduluje odpowiedź zapalną w mysich pierwotnych komórkach neuronalnych i/lub linii komórkowej ludzkiego mikrogleju HMC3.

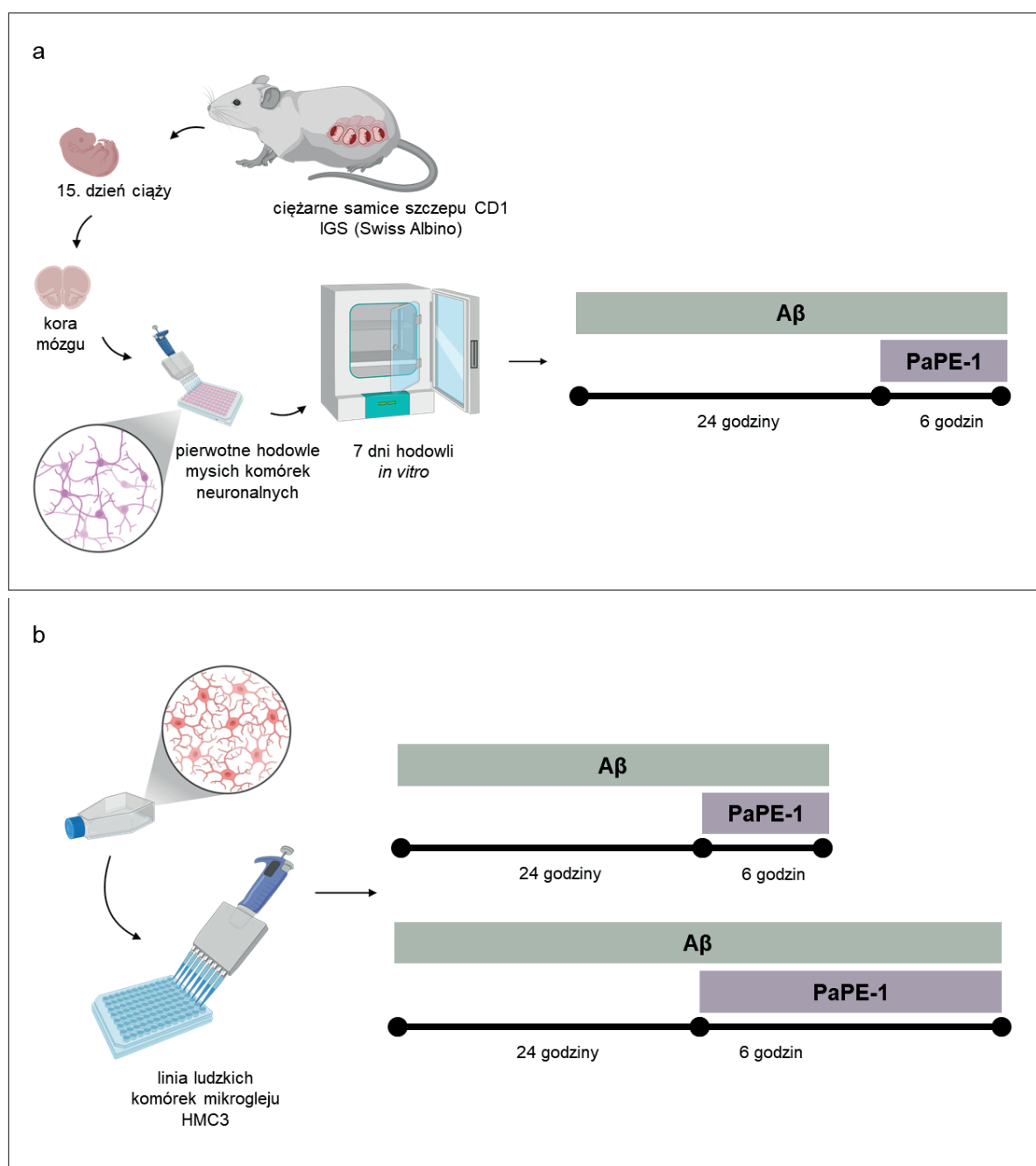
CEL BADAŃ

Choroba Alzheimerera jest schorzeniem neurodegeneracyjnym dotykającym miliony osób na całym świecie. Stanowi ona ogromny problem zdrowotny, społeczny i ekonomiczny, a dostępne opcje leczenia są niewystarczające. W przebiegu choroby Alzheimerera dochodzi do dysregulacji ścieżek sygnałowych receptorów estrogenowych, których aktywacja wywiera korzystny wpływ na układ nerwowy wywołując efekt neuroprotekcyny. Co jednak istotne, uogólniona aktywacja receptorów estrogenowych może prowadzić do niebezpiecznych skutków ubocznych, takich jak zwiększenie ryzyka wystąpienia nowotworów hormonozależnych czy powikłań ze strony układu sercowo-naczyniowego. Istotne jest więc, aby zaktywować receptory estrogenowe w sposób selektywny i bezpieczny. Sелеktywna aktywacja inicjowanej pozajądrowo sygnalizacji receptorów estrogenowych ESR1 i ESR2 umożliwia neuroprotekcję, a równocześnie pozwala uniknąć niebezpiecznych skutków ubocznych, które związane są głównie z klasyczną (jądrową, transkrypcyjną) ścieżką działania estrogenów. Z tego powodu w obecnej pracy jako substancję narzędziową wykorzystano PaPE-1, czyli syntetyczny estrogen preferencyjny dla inicjowanej pozajądrowo sygnalizacji ESR1 i ESR2.

Badania będące przedmiotem obecnej pracy doktorskiej miały na celu:

1. Wykazanie neuroprotekcynnego potencjału PaPE-1 w paradygmacie podania odroczonego w czasie względem A β .
2. Identyfikację molekularnych mechanizmów działania PaPE-1 w odniesieniu do procesów apoptozy i autofagii oraz zmian statusu epigenetycznego w odpowiedzi na A β .
3. Weryfikację udziału ESR1 i ESR2 w neuroprotekcynnych efektach działania PaPE-1 oraz określenie zmian ekspresji tych receptorów w odpowiedzi na A β .
4. Ocenę wpływu PaPE-1 na proces zapalny w komórkach ośrodkowego układu nerwowego w modelach *in vitro*.

PRZEBIEG DOŚWIADCZEŃ



Schemat. 2 Schemat procedury doświadczalnej stosowanej w eksperymentach na pierwotnych hodowlach mysich komórek neuronalnych (panel a) oraz linii komórkowej ludzkiego mikrogleju HMC3 (panel b). Mysie komórki neuronalne w 7. dniu hodowli *in vitro* ekspozowano na $A\beta$ przez 24 godziny. Następnie do hodowli dodawano PaPE-1, a komórki były narażone jednocześnie na $A\beta$ i PaPE-1 przez kolejne 6 godzin. W przypadku eksperymentów z wykorzystaniem linii HMC3, PaPE-1 podawano również po 24 godzinach ekspozycji komórek na $A\beta$, jednak czas równoczesnej ekspozycji na $A\beta$ i PaPE-1 wynosił w tym przypadku 6 lub 24 godziny. Analogiczne eksperymenty wykonano także dla grup kontrolnych tj. komórek nienarażonych na $A\beta$ względnie PaPE-1. Schemat wykonano przy użyciu oprogramowania BioRender.com

PUBLIKACJA 1

Pietrzak-Wawrzyńska BA, Wnuk A, Przepiórska-Drońska K, Łach A, Kajta M. *Posttreatment with PaPE-1 Protects from A β -Induced Neurodegeneration Through Inhibiting the Expression of Alzheimer's Disease-Related Genes and Apoptosis Process That Involves Enhanced DNA Methylation of Specific Genes. Mol Neurobiol. 2024;61(7):4130-4145. doi:10.1007/s12035-023-03819-5*

Podsumowanie zastosowanych metod badawczych oraz badanych parametrów i procesów

Metoda badawcza Badane parametry i procesy

<i>Barwienie immunofluorescencyjne</i>	Obecność A β w hodowlach neuronalnych <i>in vitro</i>
<i>Pomiar aktywności kaspazy-3</i>	Śmierć komórek, apoptoza
<i>Pomiar aktywności kaspazy-8</i>	Śmierć komórek, apoptoza – szlak zewnętrzny
<i>Pomiar aktywności kaspazy-9</i>	Śmierć komórek, apoptoza – szlak wewnętrzny
<i>Zastosowanie inhibitorów procesu apoptozy</i>	Śmierć komórek, apoptoza – charakterystyka procesu
<i>Barwienie fluorescencyjne kalceiną AM</i>	Żywotność komórek
<i>Barwienie fluorescencyjne z zastosowaniem Hoechst 33342</i>	Apoptoza, apoptyczna kondensacji chromatyny
<i>qPCR</i>	Ekspresja genów związanych z apoptozą <i>Bax</i> , <i>Bcl2</i> , <i>Gsk3b</i> , <i>Fas</i> , <i>Fasl</i> , oraz genów charakteryzujących chorobę Alzheimera: <i>Rbfox1</i> , <i>Ache</i> , <i>Apoe</i> , <i>Chat</i> , <i>Bace1</i> , <i>Bace2</i> , <i>Mapt</i> , <i>App</i> , <i>Rcan1</i> , <i>Ide</i> , <i>Nrgn</i>
<i>Western Blot</i>	Poziom białek związanych z procesem apoptozy: BAX, BCL2, GSK3 β , FAS, FASL
<i>Analiza qPCR - MethyLight</i>	Procesy epigenetyczne, poziom metylacji genów związanych z apoptozą: <i>Bax</i> i <i>Bcl2</i>
<i>Test FluoroJade-C</i>	Poziom neurodegeneracji
<i>Barwienie fluorescencyjne z zastosowaniem barwnika błon komórkowych</i>	Wizualizacja sieci neurytów

Uzasadnienie badań

Ochronny potencjał estrogenów w chorobach neurodegeneracyjnych, w tym chorobie Alzheimera, jest szeroko znany, a receptory estrogenowe wydają się interesującym celem terapeutycznym w leczeniu schorzeń centralnego układu nerwowego. Jednak z uwagi, iż terapia oparta na aktywacji receptorów estrogenowych może pociągać za sobą szereg niebezpiecznych skutków ubocznych (w tym nowotwory hormono-zależne i zaburzenia zakrzepowo-zatorowe) wciąż trwają poszukiwania sposobów na bezpieczne i skuteczne wykorzystanie ich potencjału. PaPE-1 jest preferencyjnym dla ścieżki ligandem receptorów estrogenowych ESR1 i ESR2, który selektywnie aktywuje inicjowaną pozajądrowo sygnalizację estrogenową, czyniąc tę substancję interesującą alternatywą dla klasycznych (naturalnych i syntetycznych) ligandów tych receptorów. Neuroprotektoryjny potencjał PaPE-1 został do tej pory wykazany w modelu udaru niedokrwionego *in vivo* (Selvaraj i in. 2018) oraz w modelach uszkodzeń hipoksyjno-ischemicznych *in vitro* (Wnuk i in. 2021). Wcześniejsze badania naszego zespołu prowadzone na pierwotnych mysich hodowlach neuronalnych wykazały, że PaPE-1 podany jednocześnie z A β wywołuje efekty ochronne (Wnuk i in. 2020). Biorąc pod uwagę aspekt kliniczny, w kolejnych badaniach postanowiłam skupić się na weryfikacji ochronnego potencjału PaPE-1, gdy zostanie podany z 24 godzinnym odroczeniem względem A β .

Wyniki badań

1) Charakterystyka modelu toksyczności wywołanej A β wobec mysich pierwotnych komórek neuronalnych

W moich badaniach wykorzystane zostały mysie pierwotne hodowle komórek neuronalnych, którym w siódmym dniu hodowli *in vitro* podawano zagregowany A β ₁₋₄₂ w stężeniu 10 μ M na okres 24 godzin. Po tym czasie do hodowli dodawano badaną substancję tj. PaPE-1 lub jej nośnik (roztwór DMSO) na kolejne 6 godzin. Obecność A β w hodowlach komórkowych została potwierdzona za pomocą barwienia fluorescencyjnego, na którym można zauważyć że hodowle poddane działaniu A β , oprócz wewnątrzkomórkowego, endogennego A β , charakteryzują się również obecnością zewnątrzkomórkowego A β . Zastosowany model charakteryzuje się również wzrostem stopnia neurodegeneracji oraz zmniejszeniem gęstości sieci neurytów. Kolejnym bardzo istotnym w elemencie badań była analiza ekspresji genów związanych z chorobą Alzheimera. Na jej podstawie wykazano wzrost ekspresji genów *App*, *ApoE*, *Bace2* i *Rbfox1* w hodowlach komórkowych narażonych na działanie A β , co dodatkowo potwierdza adekwatność zastosowanego modelu.

Ekspozycja komórek neuronalnych na A β prowadzi do zwiększenia aktywności kaspazy-3, co wskazuje na aktywację apoptozy. W celu pełniejszego scharakteryzowania tego procesu zastosowano inhibitory białek specyficznych dla apoptozy, tj. GSK3 β , JNK, p38 MAPK oraz kaspazy-8 i kaspazy-9 i sprawdzono ich wpływ na aktywność kaspazy-3. Uzyskane wyniki wskazują, że zahamowanie kaspazy-8 i kaspazy-9 zapobiega indukowanej przez A β aktywacji kaspazy-3. Kaspaza-3 jest kaspazą wykonawczą, która może zostać zaktywowana m.in. na drodze zewnętrznej ścieżki apoptycznej, przez kaspazę-8 i na drodze wewnętrznej ścieżki apoptycznej przez kaspazę-9. Wykazano, że w zastosowanym modelu A β stymuluje aktywność nie tylko kaspazy-3, ale również kaspazy-8 i kaspazy-9. Narażenie komórek na A β zmniejszyło także ich żywotność oraz zwiększyło apoptyczną kondensację chromatyny. Analizy molekularne dodatkowo potwierdziły, że w komórkach poddanych działaniu A β zachodzi proces apoptozy, o czym świadczy wzrost ekspresji czynników charakterystycznych dla tego procesu tj.: *Bax/BAX*, *Bcl2*, *Gsk3b*, *Fas/FAS*, *FasL/FASL* oraz zmiany metylacji regionów promotorowych genów - hipometylacja *Bax* i hipermetylacja *Bcl2*.

2) Weryfikacja antyapoptycznych właściwości PaPE-1

Kolejnym etapem badań było sprawdzenie, czy poprzedzona 24-godzinna ekspozycja na A β terapia z użyciem PaPE-1 (5 i 10 μ M przez 6 godzin) hamuje proces apoptozy w komórkach nerwowych. Uzyskane wyniki wskazują, że PaPE-1 (10 μ M) skutecznie obniża aktywność kaspazy-3 i kaspazy-9, co sugeruje jego zdolność do hamowania apoptozy, w tym zwłaszcza wewnętrznej ścieżki apoptycznej. Zastosowanie PaPE-1 poprawia również żywotność komórek oraz zmniejsza apoptyczną kondensację chromatyny. Ponadto PaPE-1 obniża ekspresję proapoptycznych czynników *Bax/BAX*, *Gsk3b*, *Fas/FAS* i *FasI/FASL*, podwyższa poziom antyapoptycznego *Bcl2* oraz zwiększa metylację w regionach promotorowych, zarówno *Bax* jak i *Bcl2*.

3) Charakterystyka wpływu PaPE-1 na proces neurodegeneracyjny związany z patologią choroby Alzheimera

Oprócz silnych efektów PaPE-1 przeciwdziałających apoptozie, uzyskane dane dowodzą również, że badana substancja skutecznie zmniejsza poziom neurodegeneracji oraz zwiększa gęstość sieci neurytów. Efekty PaPE-1 obejmują również modulację ekspresji genów związanych z chorobą Alzheimera, w tym zmniejszenie ekspresji *App*, *Apoe*, *Bace2*, *Rbfox1* i *Nrgn*, a także zwiększenie ekspresji *Chat*. Przedstawione wyniki potwierdzają ochronne właściwości PaPE-1 wobec komórek neuronalnych narażonych na A β oraz dają wgląd w dodatkowe mechanizmy działania PaPE-1.

4) Podsumowanie uzyskanych wyników

Podsumowując, w niniejszej pracy wykazano, że podanie PaPE-1 z 24 godzinnym odroczeniem względem podania A β wywołuje efekt neuroprotektoryjny. Badana substancja skutecznie hamuje wywołaną przez A β apoptozę, zmniejsza stopień neurodegeneracji oraz poprawia żywotność komórek i zwiększa gęstość sieci neurytów. Obserwowane pod wpływem A β oraz PaPE-1 zmiany w ekspresji genu i poziomie białka *Bax/BAX* odpowiadają zmianom poziomowi metylacji w obszarze promotora tego genu. Jednak w przypadku czynnika *Bcl2/BCL2* podobna korelacja nie występuje, co wskazuje na inne mechanizmy regulacyjne. Co istotne,

ochronny potencjał PaPE-1 obejmuje procesy specyficzne dla choroby Alzheimerera w tym hamowanie ekspresji charakterystycznych dla tego schorzenia genów i stymulację upośledzonej w przebiegu choroby ekspresji genu *Chat* kodującego acetylotransferazę cholinową.

PUBLIKACJA 2

Pietrzak-Wawrzyńska BA, Wnuk A, Przepiórska-Drońska K, Łach A, Kajta M. *Non-nuclear Estrogen Receptor Signaling as a Promising Therapeutic Target to Reverse Alzheimer's Disease-related Autophagy Deficits and Upregulate the Membrane ESR1 and ESR2 Which Involves DNA Methylation-dependent Mechanisms.* J Mol Biol. 2025;437(7):168982. doi:10.1016/j.jmb.2025.168982

Podsumowanie zastosowanych metod badawczych oraz badanych parametrów i procesów

<i>Metoda badawcza</i>	<i>Badane parametry i procesy</i>
<i>Barwienie immunofluorescencyjne</i>	Wizualizacja komórek neuronalnych, poziom MAP2
<i>Pomiar aktywności kaspazy-3 przy zastosowaniu inhibitorów procesu autofagii</i>	Śmierć komórek, apoptoza, autofagia, ocena interakcji między apoptozą i autofagią
<i>Pomiar aktywności kaspazy-3 przy zastosowaniu antagonistów receptorów estrogenowych</i>	Ocena zaangażowania receptorów estrogenowych w ochronne efekty PaPE-1
<i>Pomiar poziomu autofagosomów</i>	Autofagia
<i>Barwienie fluorescencyjne za pomocą CYTO-ID</i>	Autofagia, wizualizacja preautofagosomów, autofagosomów i autofagolizosomów
<i>qPCR</i>	Ekspresja genów związanych z procesem autofagii: <i>Becn1</i> , <i>Atg7</i> , <i>Atg5</i> , <i>Nup62</i> , <i>Ambra1</i> , <i>Map1lc3a</i> , <i>Map1lc3b</i> oraz receptorami estrogenowymi: <i>Esr1</i> , <i>Esr2</i> , <i>Gper1</i> , <i>Cyp19a1</i>
<i>Western Blot</i>	Poziom białek związanych z procesem autofagii: BECN1, ATG7, ATG5, NUP62, AMBRA1, MAP1LC3AB
<i>ELISA</i>	Poziom białek związanych z sygnalizacją estrogenową ESR1, ESR2, GPER1, CYP19A1
<i>Analiza qPCR - MethyLight</i>	Procesy epigenetyczne, poziom metylacji genów związanych z autofagią: <i>Becn1</i> , <i>Atg7</i> i receptorami estrogenowymi: <i>Esr1</i> , <i>Esr2</i> , <i>Gper1</i>
<i>Pomiar globalnej metylacji DNA, pomiar aktywności HAT i HDAC</i>	Procesy epigenetyczne

Uzasadnienie badań

Pomimo iż choroba Alzheimera dotyka miliony osób na całym świecie, wciąż nie dysponujemy skutecznymi metodami jej leczenia. Ostatnie badania sugerują, że inicjowana pozajądrowo sygnalizacja receptorów estrogenowych stanowi obiecujący cel terapeutyczny w leczeniu schorzeń ośrodkowego układu nerwowego (Wnuk i in. 2023). Podejście to pozwala na uzyskanie korzystnych efektów terapeutycznych, jednocześnie minimalizując ryzyko poważnych działań niepożądanych, które są głównie związane z aktywacją ścieżki jądrowej. Uzyskane do tej pory wyniki wskazują, iż PaPE-1 może hamować procesy związane z chorobą Alzheimera, w szczególności apoptozę i neurodegenerację, nawet gdy podany zostaje z odroczeniem czasowym względem A β .

Nowoczesne terapie powinny w kontrolowany sposób wpływać na szeroki wachlarz procesów komórkowych kluczowych w przebiegu choroby. Moje dalsze badania miały na celu selektywną aktywację receptorów estrogenowych za pomocą PaPE-1 i zidentyfikowanie mechanizmów neuroprotekcji związanych z autofagią w komórkowym modelu choroby. Zaangażowanie ESR1 w działanie PaPE-1 zostało do tej pory wykazane z zastosowaniem specyficznego siRNA w hodowli *in vitro* oraz u myszy z nokautem ESR1 (Madak-Erdogan i in. 2016). Jednak udział ESR1 w działaniu PaPE-1 w warunkach patologicznych związanych z toksycznością A β nie został dotąd potwierdzony. Powszechnie uważa się, że w niejądrowej sygnalizacji klasycznych receptorów estrogenowych uczestniczą ESR1 i ESR2 ulokowane w błonie cytoplazmatycznej. W celu scharakteryzowania roli ESR1 i ESR2 w odpowiedzi na A β i PaPE-1 istotne jest więc nie tylko określenie poziomu mRNA i białka tych receptorów, ale również ustalenie lokalizacji receptorów w komórce. Ponadto, w regulacji ekspresji tych czynników mogą brać udział procesy epigenetyczne, takie jak metylacja DNA i acetylacja histonów.

Wyniki badań

1) Charakterystyka modelu toksyczności wywołanej A β w pierwotnych mysich komórkach neuronalnych w kontekście procesu autofagii oraz sygnalizacji estrogenowej

Kolejny etap badań został również przeprowadzony z wykorzystaniem pierwotnych hodowli mysich komórek neuronalnych, które podobnie jak poprzednio, po 24 godzinach ekspozycji na A β poddawano działaniu PaPE-1 przez kolejne 6 godzin. W niniejszej publikacji wykazano, że w wyniku ekspozycji komórek na A β dochodzi do spadku intensywności fluorescencji MAP2, co świadczyć może o degeneracji cytoszkieletu neuronów. W celu scharakteryzowania stosowanego modelu pod względem interakcji między procesami apoptozy i autofagii sprawdzono wpływ inhibitorów białek specyficznych dla autofagii (USP10, USP13, ULK1, ULK2 i mTOR) na podwyższoną w odpowiedzi na A β aktywność kaspazy-3 – markera apoptozy. Uzyskane wyniki dowodzą, że inhibicja białek USP10 i USP13 oraz ULK1 i ULK2 prowadzi do dalszego wzrostu aktywności kaspazy-3, co sugeruje, że w komórkach narażonych na A β hamowanie autofagii dodatkowo potęguje proces apoptozy. Następnie wykazano, że pod wpływem A β dochodzi do spadku poziomu pęcherzyków autofagowych, tj. preautofagosomów, autofagosomów i autofagolizosomów, oraz obniżenia ekspresji białka MAP1LC3AB. Co interesujące, w zastosowanym modelu rośnie poziom białka ATG7, a równocześnie obniża się ekspresja mRNA *Atg7*, co może wynikać ze wzrostu metylacji regionu promotorowego genu. Uzyskane wyniki sugerują, że w zastosowanym modelu dochodzi do upośledzenia procesu autofagii.

Następny etap badań miał na celu określenie zmian wywołanych przez A β w odniesieniu do czynników związanych z sygnalizacją estrogenową. W zastosowanym modelu stwierdzono obniżony poziom białek ESR1 i ESR2, zarówno we frakcji błonowej, jak i cytozolowej, oraz obniżoną ekspresję genu *Esr1*, a analiza metylacji regionów promotorowych genów *Esr1* i *Esr2* wykazała ich hipermetylację. A β obniżył również poziom białka GPER1 i podwyższył ekspresję jego genu, lecz nie wpłynął na poziom metylacji *Gper1* i nie zmienił poziomu *Cyp19a1*/CYP19A1. Oprócz zmian w metylacji regionu promotorowego specyficznych genów w obecnej pracy sprawdzono również, w jaki sposób A β wpływa na globalną metylację DNA oraz aktywność enzymów związanych z acetylacją histonów tj. HAT i HDAC. Wykazano

wzrost aktywności HDAC, lecz nie stwierdzono zmian w poziomie globalnej metylacji DNA oraz aktywności HAT pod wpływem A β .

2) Ocena ochronnego wpływu PaPE-1 na proces autofagii w komórkach narażonych na A β

Kolejny etap badań koncentrował się na sprawdzeniu, czy PaPE-1 wywołuje normalizację autofagii upośledzonej pod wpływem A β . Biochemiczne i mikroskopowe analizy wykazały, że badana substancja skutecznie podnosi poziom pęcherzyków autofagowych, który uległ zmniejszeniu w odpowiedzi na A β . Podanie PaPE-1 wywołuje również szereg efektów na poziomie molekularnym, stymulując ekspresję czynników związanych z autofagią, w tym *Becn1/BECN1*, *Atg5*, *Atg7*, *Ambra1* i *Map1lc3b/Map1LC3AB*. Dodatkowo zaobserwowany wzrost poziomu ekspresji *Atg7* może wynikać z hipometylacji DNA w regionie promotorowym tego genu. Dane te sugerują, że PaPE-1 skutecznie przeciwdziała wywołanemu przez A β upośledzeniu procesu autofagii.

3) Weryfikacja zaangażowania receptorów estrogenowych w neuroprotektoryjne efekty działania PaPE-1 oraz określenie wpływu PaPE-1 na ich ekspresję

W celu weryfikacji zaangażowania receptorów estrogenowych ESR1, ESR2 i GPER1 w neuroprotektoryjne efekty działania PaPE-1 sprawdzono, w jaki sposób antagoniści tych receptorów (odpowiednio MPP, PHTPP i G15) wpływają na wywołany przez PaPE-1 spadek aktywności kaspazy-3 w komórkach narażonych na A β . Uzyskane wyniki wskazują, że zastosowanie MPP, czyli antagonisty ESR1, niweluje wywołane przez PaPE-1 obniżenie aktywności kaspazy-3, sugerując kluczową rolę tego receptora w ochronnych efektach działania PaPE-1.

Z moich badań wynika, że A β obniża poziom ESR1 i ESR2 zarówno we frakcji cytozolowej, jak i błonowej, natomiast PaPE-1 podwyższa poziom tych receptorów tylko we frakcji błonowej. Fakty te sugerują, że zlokalizowanych w błonie ESR1 i ESR2 pełnią szczególną rolę w efektach działania PaPE-1. Poza tym PaPE-1 obniża metylację w regionach promotorowych genów *Esr1* i *Esr2*, co przekłada się na wzrost ekspresji odpowiednich mRNA.

Wykazano również, że badana substancja stymuluje ekspresję *Cyp19a1*, nie wpływając jednocześnie na poziom jego białka. PaPE-1 powoduje też wzrost metylacji w regionie promotorowym genu *Gper1*, co może być mechanizmem determinującym obniżenie ekspresji mRNA tego czynnika, które jednak nie przekłada się na zmiany ilości białka. Podsumowując, uzyskane wyniki dowodzą, że zarówno A β , jak i PaPE-1 wywierają istotny wpływ na ilość i lokalizację ESR1 i ESR2, przy czym w ochronne efekty PaPE-1 szczególnie zaangażowany jest ESR1.

4) Określenie wpływu PaPE-1 na procesy epigenetyczne

Wiedząc, że A β oraz PaPE-1 zmieniają stopień metylacji regionów promotorowych specyficznych genów, w kolejnym etapie postanowiono sprawdzić czy PaPE-1 wpływa na globalną metylację DNA. Wykazano, że w komórkach narażonych na A β , PaPE-1 nie zmienia globalnej metylacji DNA, co może wynikać z faktu, iż zarówno A β , jak i PaPE-1 wywołują wzrosty i spadki metylacji szeregu specyficznych genów. Badania wykonane w ramach niniejszej pracy doktorskiej dowiodły, że zmiany metylacji w regionie promotorowym danego genu nie zawsze są skorelowane ze zmianami ekspresji mRNA, co wskazuje na inne mechanizmy epigenetyczne, w tym m.in. acetylację histonów regulowaną przez HAT oraz HDAC. Z moich badań wynika, że PaPE-1 zwiększa aktywność HAT, lecz nie wpływa na aktywność HDAC.

5) Podsumowanie uzyskanych wyników

Podsumowując, w obecnej pracy wykazano kolejne mechanizmy neuroprotektynowego działania PaPE-1 w komórkach narażonych na A β . PaPE-1 skutecznie zapobiega wywołanemu przez A β upośledzeniu autofagii, o czym świadczy wzrost poziomu pęcherzyków autofagowych oraz wzrost ekspresji mRNA i poziomu białka czynników związanych z tym procesem. PaPE-1 przeciwdziała również zmianom w ekspresji czynników związanych z sygnalizacją estrogenową, a efekty jego działania zależne są od ESR1. Co ciekawe, PaPE-1 nie wpływa na podwyższoną pod wpływem A β aktywność HDAC, natomiast stymuluje aktywność HAT.

OPISOWA CZĘŚĆ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Metody

Hodowla pierwotnych mysich komórek neuronalnych

Pierwotne hodowle mysich komórek neuronalnych przygotowano z kory mózgowej zarodków myszy szczepu Swiss Albino CD-1 (Charles River, Niemcy) w 15. dniu ciąży. Wyizolowane tkanki rozdzielono mechanicznie i enzymatycznie przy użyciu 0,25% roztworu trypsyny. Uzyskane komórki odwirowano i zawieszono w wolnym od czerwieni fenolowej medium Neurobasal™ uzupełnionym o B27 bez antyoksydantów (Gibco – Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone), glutaminę (Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone) oraz antybiotyki – penicylinę i streptomycynę (Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone). Przez dwa początkowe dni hodowli medium dodatkowo suplementowano 10% FBS (Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone). Komórki wysiewano w gęstości $\sim 2,0 \times 10^5$ żywych komórek na cm^2 w wielodołkowych naczyniach hodowlanych pokrytych poli-L-ornityną (Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone). Komórki hodowano w inkubatorze w atmosferze 37°C z 5% (obj./obj.) CO_2 z zachowaniem wysokiej wilgotności.

Hodowla linii ludzkiego mikrogleju HMC3

Linie komórkową HMC3 (CRL3304™, numer partii 70046457) uzyskano z American Type Culture Collection (ATCC, Stany Zjednoczone). Komórki testowano rutynowo na obecność mykoplazmy. Zgodnie z instrukcją producenta komórki hodowano w medium hodowlanym EMEM (ATCC, Stany Zjednoczone) uzupełnionym o 10% FBS (Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone). Gdy komórki osiągnęły 90% konfluencji, pasażowano je przy użyciu 0,25% (w/v) trypsyny i 0,53 mM roztworu EDTA. Ze względu na aktywność estrogenową czerwieni fenolowej, która jest obecna w dostępnym komercyjnie EMEM, medium to nie mogło zostać wykorzystane do eksperymentów w tym badaniu. W związku z tym wykorzystano medium DMEM (Gibco – Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone), które jest dostępne komercyjnie bez czerwieni fenolowej i ma zbliżony skład do EMEM. Komórki wysiewano na płytki wielodołkowe w gęstości 2×10^4 żywych komórek na cm^2 w medium o obniżonym stężeniu FBS (5%) w dniu poprzedzającym eksperyment. Obniżenie stężenia FBS wprowadzono w celu regulacji szybkości proliferacji, co zapewniło bardziej stabilne warunki eksperymentu.

Przygotowanie A β i przeprowadzenie eksperymentu

Przygotowanie A β_{1-42} (rPeptide, Stany Zjednoczone) do agregacji przeprowadzono zgodnie z wcześniej opracowanym protokołem (Messori i in. 2013, Wnuk i in. 2020, **Pietrzak-Wawrzyńska i in. 2024, 2025**). Aby wyeliminować niespecyficzne agregaty, amyloidu, zastosowano heksafluoroizopropanol (HFIP, Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone), który następnie usunięto wykorzystując delikatny przepływ azotu (95% N₂, 5% CO₂). Następnie peptyd rozpuszczono w bezwodnym dimetylosulfotlenku (DMSO, Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone), uzyskując 5 mM roztwór, który kolejno rozcieńczono, uzyskując roztwór 80 μ M. W przypadku eksperymentów z wykorzystaniem mysich pierwotnych hodowli komórek neuronalnych, roztwór ten inkubowano przez 24 godziny poprzedzające jego podanie, natomiast w eksperymentach z użyciem linii komórkowej HMC3 czas inkubacji wynosił 24 lub 48 godzin. Powstały zagregowany A β_{1-42} zaaplikowano na hodowlę komórkową w końcowym stężeniu 5 lub 10 μ M w odpowiednim medium hodowlanym tj. Neurobasal™ lub DMEM. Po 24 godzinach ekspozycji na A β_{1-42} do komórek dodano PaPE-1 (10 μ M) na dalsze 6 lub 24 godziny.

Pomiar aktywności kaspazy-1

Aktywność kaspazy-1 zmierzono w hodowlach komórek neuronalnych i mikroglejowych na podstawie hydrolizy substratu kaspazy-1 Ac-Trp-Val-Ala-Asp-*p*NA (Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone) do *p*-nitroaniliny. Procedura tego oznaczenia rozpoczyna się od lizy komórek w buforze składającym się z 50 mM HEPES, pH 7,4, 100 mM NaCl, 0,1% CHAPS, 1 mM EDTA, 10% glicerol i 10 mM DTT. Powstałe lizaty inkubowano z substratem kaspazy-1 w temperaturze 37 °C przez 60 minut. Po inkubacji poziom *p*-nitroaniliny określono mierząc absorbancję przy 405 nm za pomocą czytnika mikroplatek Infinite M200 PRO (Tecan, Mannedorf, Szwajcaria) i oprogramowania i-control. Wyniki znormalizowano do komórek kontrolnych i wyrażono jako procent kontroli $\pm$ SEM.

Pomiar pozakomórkowego ATP

Pozakomórkowe ATP mierzono przy użyciu zestawu RealTime-Glo Extracellular ATP Assay (Promega, Stany Zjednoczone). Komórki wysiano na białe płytki hodowlane z przezroczystym dnem (Corning, Stany Zjednoczone). Po eksperymencie do każdego dołka dodano 30 μ l odczynnika 4X RealTime-Glo Extracellular ATP Assay i płytkę inkubowano w temperaturze 37°C. Sygnał luminescencyjny zmierzono przy użyciu luminometru

mikro płytkowego GloMax® Navigator (Promega, Stany Zjednoczone). Wykryty sygnał był proporcjonalny do ilości pozakomórkowego ATP w hodowanych komórkach. Dane znormalizowano do intensywności sygnału komórek kontrolnych i wyrażono jako procent kontroli $\pm$ SEM.

Barwienie ThT

Tioflawina-T (z ang. *Thioflavin-T* – ThT) to fluorescencyjny znacznik wykorzystywany do sprawdzenia agregacji białek, w tym A β . Jego fluorescencja rośnie gdy w próbce znajdują się protofilamenty, fibryle i płytki/blaszki A β . Barwienie ThT wykonano w trzech punktach czasowych: na początku agregacji A β (0 godz), po 24 i 48 godzinach. Po inkubacji próbki o 20 μ M stężeniu A β w 5 μ M roztworze ThT, wykonano odczyt fluorescencji przy wzbudzeniu 420 nm i emisji 482 nm za pomocą czytnika mikro płytek Infinite M200 PRO. Wyniki znormalizowano do próbek kontrolnych i wyrażono jako procent kontroli $\pm$ SEM. Wizualizacji zagregowanego A β dokonano pod koniec eksperymentu z użyciem komórek linii HMC3 w paradygmacie polegającym na 24-godzinnej ekspozycji komórek na A β (5 μ M), a następnie 24-godzinnej ekspozycji na nośnik/PaPE-1. W tym celu, utrwalone komórki inkubowano z 20 μ M roztworem ThT przez 30 min w temperaturze pokojowej. Następnie usunięto barwnik i wykonano barwienie roztworem Hoechst 33342. Komórki inkubowano z 5 μ g/ml roztworem Hoechst 33342 (Invitrogen - Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone) w PBS w temperaturze 37°C przez 5 minut. Do wizualizacji barwień wykorzystano mikroskop konfokalny Leica TCS SP8 WLL (Leica Microsystems, Niemcy).

Pomiar aktywności metabolicznej komórek

Aktywność metaboliczną komórek mierzono przy użyciu alamarBlue™ (Invitrogen - Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone). Po zakończeniu eksperymentu medium hodowlane zastąpiono roztworem alamarBlue™ (rozcieńczonym 10x w pożywce hodowlanej), a komórki inkubowano w temperaturze 37°C przez 3 godziny. Aktywne metabolicznie komórki przeprowadzają redukcję niebieskiej resazuryny do różowej rezorufiny. Pomiar absorpcji wykonywano przy 570 i 600 nm, przy czym 600 nm stanowiło referencyjną długość fali. Pomiarów dokonano przy użyciu czytnika mikro płytek Infinite M200 PRO i oprogramowania i-control. Dane porównano z danymi kontrolnymi traktowanymi nośnikiem i wyrażono jako procent kontroli $\pm$ SEM.

Barwienie kalceiną AM

W celu oceny morfologii komórek mikrogleju wykorzystano barwienie bazujące na aktywności wewnątrzkomórkowych esteraz wykonane z zastosowaniem kalceiny AM (Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone). Po eksperymencie najpierw przepłukano komórki w PBS, a następnie inkubowano je z 2 μ M roztworem kalceiny AM w PBS w temperaturze 37°C przez 10 minut. Po tym czasie komórki umieszczono w medium hodowlanym i przeprowadzono obrazowanie za pomocą odwróconego mikroskopu Leica DM IL LED (Leica Microsystems, Niemcy). Oceny morfologii komórek mikrogleju dokonano z użyciem programu ImageJ, manualnie zaznaczając kształt każdej komórki. Uzyskane wyniki przedstawiono jako procent kontroli $\pm$ SEM.

Analiza ekspresji genów z zastosowaniem techniki qPCR

RNA zostało wyizolowane i oczyszczone przy użyciu zestawu RNeasy Mini Kit (Qiagen, Niemcy). Stężenie RNA określono spektrofotometrycznie przed przystąpieniem do odwrotnej transkrypcji i ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy (qPCR). RNA (1000 ng) zostało poddane odwrotnej transkrypcji w celu uzyskania cDNA w końcowej objętości reakcji 50 μ l przy użyciu zestawu High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems – Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone). Powstałe cDNA zostało następnie zamplifikowane z użyciem TaqMan Gene Expression Assays (TaqMan – Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone), zdefiniowanych dla genów kodujących *Cox2*, *Il1b*, *Nfkb1*, *Nfkb3* i *Nlrp3* przy użyciu systemu Real Time PCR CFX96 (Bio-Rad, Stany Zjednoczone). Każda reakcja qPCR składała się z 10 μ l Fast Probe qPCR Master Mix (Roche, Stany Zjednoczone), 8 μ l wody wolnej od RNaz, 1 μ l cDNA i 1 μ l TaqMan Gene Expression Assay tzw. sondy. Warunki przeprowadzania reakcji obejmowały 2 minuty w 50°C, 10 minut w 95°C i 55 cykli po 15 sekund w 95°C i 1 minutę w 60°C. Dane analizowano przy użyciu Ct dla każdej próbki i metody delta delta Ct. Selekcję genu referencyjnego przeprowadzono przy użyciu następujących algorytmów geNorm, NormFinder i BestKeeper, które zidentyfikowały *Hprt1* jako najbardziej stabilny gen referencyjny spośród *Gapdh*, *Hprt1* i *Actb*. Wyniki wyrażono jako zmiany krotności $\pm$ SEM.

Pomiar ilości białka z użyciem testu ELISA

Po zakończeniu eksperymentu komórki ostrożnie przepłukano zimnym PBS, a następnie w celu uzyskania lizatu, dodano bufor RIPA (Thermo Fisher Scientific, Stany

Zjednoczone) zawierający dodatkowo koktajl inhibitorów proteaz. Zebrane lizaty poddano następnie sonikacji i wirowaniu przy $15000 \times g$ przez 20 minut w temperaturze 4°C . Gotowe próbki przechowywano w temperaturze -20°C . Stężenie białka określono przy użyciu testu Bradforda (Bio-Rad, Stany Zjednoczone), stosując albuminę surowicy bydlęcej (BSA, Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone) jako standard. Testy ELISA specyficzne dla COX2, IL1 β , NF κ B1 (p105), NF κ B3 (p65, RELA) i NLRP3 (BT Lab, Chiny) wykonano zgodnie z protokołem producenta. Odczyty absorbancji wykonywano przy 450 nm za pomocą czytnika mikropłytek Infinite M200 PRO. Wyniki wyrażono jako procent wartości kontrolnej $\pm$ SEM i fg/ μ g całkowitego białka.

Analiza statystyczna

Wszystkie wyniki wyrażono jako jednostki absorbancji lub luminescencji na dołek w przypadku testów obejmujących alamarBlue™, kaspazę-1 i pozakomórkowy ATP. Jednostki fluorescencji wykorzystano do pomiarów qPCR, natomiast wyniki ELISA podano w fg/ μ g całkowitego białka. Istotność statystyczną oceniono przy użyciu analizy wariancji (ANOVA), sprawdzając wcześniej rozkład danych i stosując test Levene'a w celu oceny jednorodności wariancji. Różnice między grupami zidentyfikowano przy użyciu testu post-hoc Tukey HSD. Jeśli założenia testu ANOVA nie zostały spełnione, wykonano test Schreiera-Raya-Hare'a, a następnie test post-hoc Dunna. Wszystkie analizy przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Statistica w wersji 14.0.0.15 (TIBCO) i R w wersji 4.1.3. Istotność statystyczna przedstawiała się następująco: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$ (w porównaniu z komórkami kontrolnymi) i ^ $p < 0,05$, ^ $p < 0,01$ i ^^ $p < 0,001$ (w porównaniu z komórkami narażonymi na działanie A β).

Podsumowanie zastosowanych metod badawczych oraz badanych parametrów i procesów

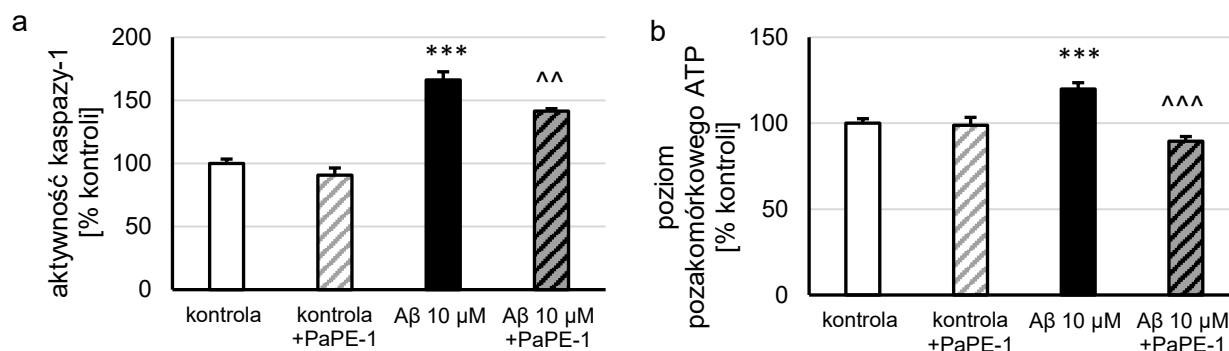
<i>Metoda badawcza</i>	<i>Badane parametry i procesy</i>
<i>Pomiar aktywności kaspazy-1</i>	Śmierć komórek, stan zapalny
<i>Pomiar pozakomórkowego ATP</i>	Śmierć komórek, stan zapalny
<i>Barwienie Tioflawiny-T (ThT)</i>	Agregacja A β
<i>Pomiar aktywności metabolicznej komórek z użyciem alamarBlue™</i>	Żywotność komórek, aktywność metaboliczna, aktywacja komórek
<i>Barwienie fluorescencyjne kalceiną AM</i>	Żywotność komórek, morfologia komórek
<i>qPCR</i>	Ekspresja genów związanych z procesem zapalnym: <i>Cox2</i> , <i>Il1b</i> , <i>Nfkb1</i> , <i>Nfkb3</i> , <i>Nlrp3</i>
<i>ELISA</i>	Poziom białek związanych z procesem zapalnym: COX2, IL1 β , NF κ B1, NF κ B3, NLRP3

Uzasadnienie badań

Uzyskane do tej pory wyniki wskazały, że PaPE-1 skutecznie przeciwdziała zmianom wywołanym przez A β , w tym m.in. nasileniu apoptozy, upośledzeniu autofagii i dysregulacji ekspresji receptorów estrogenowych. Co więcej, uzyskane wyniki sugerują, że w obserwowanych efektach działania PaPE-1 mogą pośredniczyć zmiany statusu epigenetycznego (Pietrzak-Wawrzyńska i in. 2024, 2025). PaPE-1 selektywnie aktywuje inicjowaną pozajądrowo sygnalizację klasycznych receptorów estrogenowych ESR1 i ESR2. Takie podejście umożliwia uzyskanie efektów terapeutycznych przy jednoczesnym ograniczeniu ryzyka wystąpienia działań niepożądanych, które są w dużej mierze konsekwencją aktywacji jądrowych szlaków sygnałowych receptorów estrogenowych. Skuteczne terapie chorób neurodegeneracyjnych powinny precyzyjnie oddziaływać na szerokie spektrum procesów komórkowych, z których w kontekście choroby Alzheimera szczególnie ważne wydaje się neurozapalenie. W związku z powyższym, kolejnym etapem moich badań było określenie, czy selektywna aktywacja pozajądrowych szlaków sygnałowych receptorów estrogenowych może modulować związaną z obecnością A β odpowiedź zapalną w komórkach układu nerwowego. Na przeciwzapalny potencjał testowanego liganda wskazują wyniki uzyskane przez Selvaraj i in. (2018) w modelu udaru niedokrwienego, polegającym na czasowej okluzji tętnicy środkowej mózgu (z ang. *transient Middle Cerebral Artery Occlusion* – tMCAO). W badaniu tym wykazano, że PaPE-1 skutecznie ogranicza neurozapalenie, zmniejszając infiltrację leukocytów do mózgu. Jednak przeciwzapalny potencjał PaPE-1 nie został do tej pory zweryfikowany w kontekście choroby Alzheimera.

Wyniki badań

1. PaPE-1 przeciwdziała nadmiernej aktywności kaspazy-1 i wzrostowi poziomu pozakomórkowego ATP w komórkach neuronalnych narażonych na A β



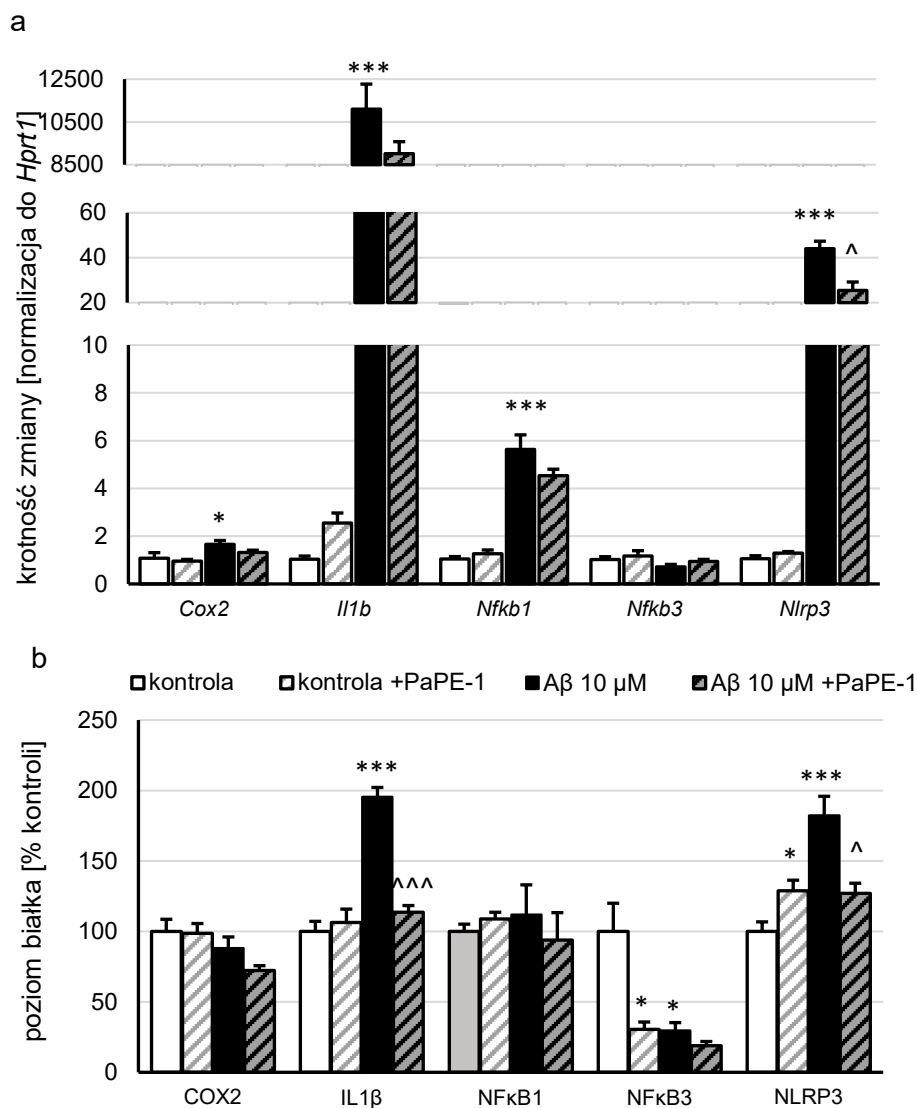
Rycina 1. W mysich pierwotnych hodowlach komórek nerwowych A β (10 μ M) spowodował wzrost aktywności kaspazy-1 (a) i zwiększył poziom pozakomórkowego ATP (b). Podanie PaPE-1 (10 μ M) zredukowało poziom obu badanych parametrów. Wyniki przedstawiono jako % kontroli $\pm$ SEM z trzech niezależnych eksperymentów składających się z 15-17 powtórzeń biologicznych. Istotne statystycznie różnice zostały przedstawione jako: *** p < 0,001 w porównaniu z grupą kontrolną, ^^ p < 0,01 i ^^ p < 0,001 w porównaniu z grupą traktowaną A β . Istotne statystycznie różnice między grupami kontrola oraz A β + PaPE-1 nie zostały uwzględnione na wykresie

Podobnie jak w omawianych wyżej pracach oryginalnych, w tej części badań pierwotne hodowle komórek neuronalnych myszy poddawano działaniu 10 μ M A β przez 24 godziny, a następnie dodawano PaPE-1 (10 μ M)/nośnik (DMSO) na kolejne 6 godzin. Kaspaza-1 to enzym który uczestniczy m.in. w odpowiedzi zapalnej, aktywacji neurotoksycznych cytokin i indukcji pyroptozy, przyczyniając się do uszkodzenia neuronów w chorobie Alzheimera. W moich eksperymentach ekspozycja na A β podwyższyła aktywność kaspazy-1 (166% kontroli), a podanie PaPE-1 obniżało tę wartość (141% kontroli, Ryc. 1a). W warunkach kontrolnych PaPE-1 nie wpłynął na aktywność kaspazy-1.

Pozakomórkowe ATP odgrywa kluczową rolę w nasilaniu odpowiedzi neurozapalnej i uszkodzeniu neuronów (Davalos i in. 2005). ATP działa jako cząsteczka sygnałowa, która aktywuje receptory purynergiczne, co powoduje aktywację inflamasomu, uwalnianie cytokin prozapalnych i śmierć komórek neuronalnych poprzez pyroptozę. Uzyskane wyniki wskazują, iż A β zwiększył poziom pozakomórkowego ATP (120% kontroli), a efekt ten został skutecznie

zniwelowany przez PaPE-1 (spadek do 90% kontroli, Ryc. 1b). W warunkach kontrolnych (bez A β) dodanie PaPE-1 nie wpłynęło na poziom pozakomórkowego ATP.

2. PaPE-1 hamuje wywołany przez A β wzrost ekspresji IL1 β i *Nlrp3*/NLRP3 w komórkach neuronalnych



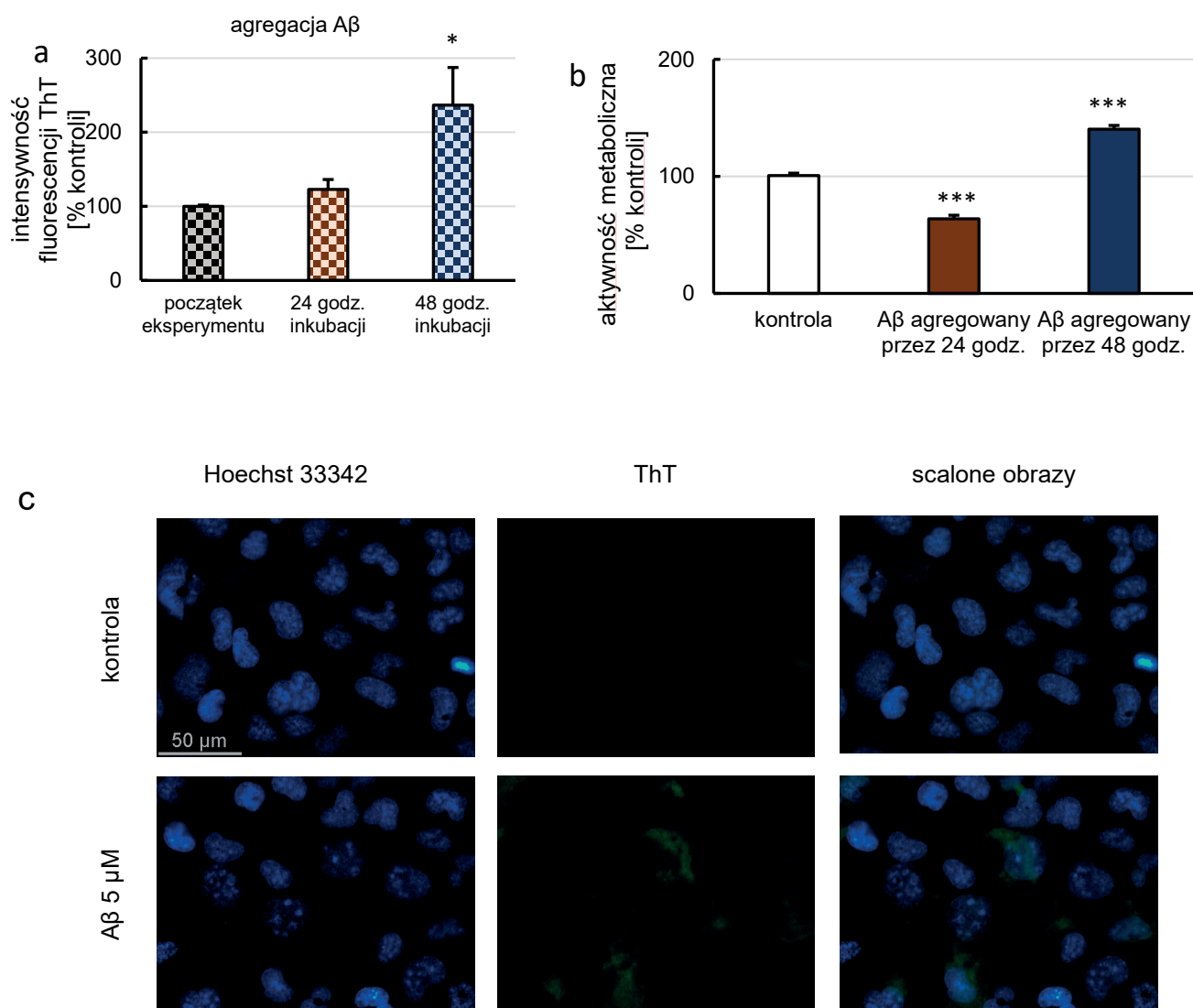
fg/ μ g	kontrola	kontrola +PaPE-1	A β 10 μ M	A β 10 μ M + PaPE-1
COX2	30,32 $\pm$ 2,61	29,93 $\pm$ 2,08	26,68 $\pm$ 2,45	21,91 $\pm$ 1,03
IL1β	1,56 $\pm$ 0,11	1,65 $\pm$ 0,15	3,04 $\pm$ 0,15	1,77 $\pm$ 0,07
NFκB1	19,68 $\pm$ 1,02	21,42 $\pm$ 0,94	21,99 $\pm$ 4,20	18,47 $\pm$ 3,84
NFκB3	5,14 $\pm$ 1,41	1,87 $\pm$ 0,34	1,52 $\pm$ 0,42	0,99 $\pm$ 0,23
NLRP3	0,34 $\pm$ 0,02	0,34 $\pm$ 0,02	0,63 $\pm$ 0,05	0,44 $\pm$ 0,02

⇔ **Rycina 2.** *Ekspozycja mysich pierwotnych hodowli komórek nerwowych na A β (10 μ M) wywołała wzrost poziomu markerów związanych ze stanem zapalnym na poziomie mRNA (a) i białka (b) Cox2, Il1b/ IL1 β , Nfkb1 i Nlrp3/NLRP3. Natomiast pod wpływem PaPE-1 (10 μ M) nastąpiła częściowa normalizacja tych zmian tj. doszło do spadku IL1 β i Nlrp3/NLRP3. Wyniki przedstawiono jako krotność zmiany $\pm$ SEM (w przypadku ekspresji mRNA) oraz % kontroli i fg/ μ g białka $\pm$ SEM (w przypadku poziomu białka). Wykonano 5 powtórzeń biologicznych w 3 powtórzeniach technicznych. Istotne statystycznie różnice zostały przedstawione jako: * $p < 0,05$ i *** $p < 0,001$ w porównaniu z grupą kontrolną, ^ $p < 0,05$ i ^^ $p < 0,001$ w porównaniu z grupą traktowaną A β . Istotne statystycznie różnice między grupami kontrola oraz A β + PaPE-1 nie zostały uwzględnione na wykresie*

Kolejnym etapem badań była ocena zmian ekspresji czynników zapalnych w hodowlach komórek neuronalnych. Ekspozycja na A β zwiększyła ekspresję czynników związanych ze stanem zapalnym na poziomie mRNA w przypadku Cox2 (1,66-krotnie; z ang. *fold-change*), Il1b (11098,49- krotnie), Nfkb1 (5,64-krotnie) i Nlrp3 (44,03- krotnie; Ryc. 2a) oraz na poziomie białka IL1 β (195% kontroli) i NLRP3 (182% kontroli; Ryc. 2b). Natomiast zastosowanie PaPE-1 częściowo odwróciło wywołany przez A β wzrost poziomu IL1 β (114% kontroli), Nlrp3 (do 25,44-krotności jego zmiany w warunkach kontrolnych) i NLRP3 (do 127% kontroli). Zarówno pod wpływem A β jak i PaPE-1 doszło także do obniżenia poziomu NF κ B3. Ekspresja COX2, NF κ B1 i Nfkb3 nie zmieniła się w odpowiedzi na A β oraz A β i PaPE-1. W warunkach kontrolnych PaPE-1 zwiększył poziom NLRP3 (128% kontroli), ale nie wpłynął na poziomy innych mRNA i białek związanych ze stanem zapalnym.

3. Charakterystyka wpływu A β na komórki mikrogleju

W chorobie Alzheimera A β występuje w różnych stanach agregacji – od monomerów, przez oligomery, protofibryle, protofilamenty, fibryle aż po płytki/blaszki A β . Tiofawina-T (ThT) to popularnie stosowany do znakowania agregacji A β barwnik fluorescencyjny, który wykrywa protofilamenty i wyższe stany agregacji A β takie jak fibryle i płytki (Persichilli i in. 2011, Herzig i in. 2014). W dotychczasowej części badań, przeprowadzonej z wykorzystaniem mysich pierwotnych komórek neuronalnych używałam A β , który uprzednio agregowany był przez 24 godziny. Uzyskane na podstawie oznaczenia ThT wyniki sugerują, że tak przygotowany A β składa się z agregatów niższego stopnia niż protofilamenty (Ryc. 3a). Natomiast agregacja A β przez 48 godzin wywołuje wzrost fluorescencji ThT do 240% kontroli, który wskazuje na obecność protofilamentów i/lub innych agregatów wyższego stopnia.



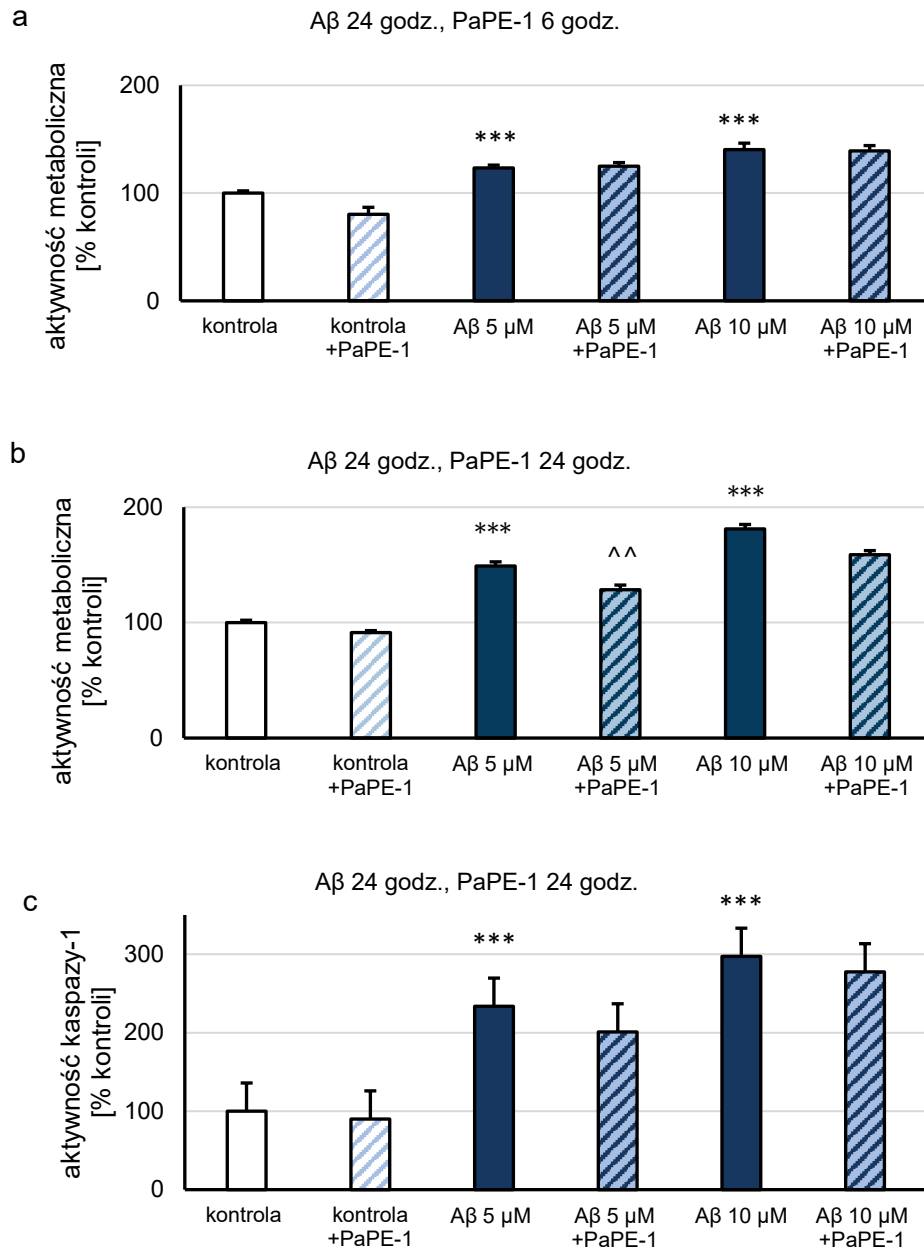
Rycina 3. Barwienie z wykorzystaniem Thioflavin-T (ThT) pokazało, że stopień agregacji Aβ jest zależny od czasu inkubacji, a widoczny po 48 godzinach inkubacji Aβ wzrost fluorescencji ThT wskazuje na obecność agregatów Aβ wyższego stopnia (panel a). Ekspozycja komórek linii HMC3 na Aβ (10 μM) wpływa na aktywność metaboliczną komórek mikrogleju w sposób zależny od stopnia agregacji Aβ (panel b). Wizualizacja barwienia ThT w komórkach linii HMC3 traktowanych Aβ (5 μM) agregowanym przez 48 godziny (panel c). Wyniki przedstawiono jako % kontroli ± SEM z trzech niezależnych eksperymentów składających się z 7-10 powtórzeń w przypadku oznaczenia aktywności metabolicznej komórek i trzech powtórzeń w przypadku barwienia ThT. Istotne statystycznie różnice zostały przedstawione jako: * $p < 0,05$ i *** $p < 0,001$ w porównaniu z grupą kontrolną

Następny etap badań przeprowadzony został z zastosowaniem linii komórkowej ludzkiego mikrogleju HMC3. Komórki mikrogleju narażone były na agregowany przez 24 i 48 godzin A β w stężeniu 10 μ M. Ekspozycja na A β wpłynęła na aktywność metaboliczną komórek mikrogleju w odwrotny sposób w zależności od czasu/stopnia agregacji (Ryc. 1b).

A β o mniejszym stopniu agregacji (po 24 godzinach agregacji) spowodował zmniejszenie aktywności metabolicznej komórek (64% kontroli). Natomiast A β o większym stopniu agregacji (po 48 godzinach agregacji) wywołał zwiększenie tego parametru (140% kontroli). Odnotowana reakcja komórek mikrogleju jest zbieżna z wynikami Pan i in. (2011). Zaobserwowane zmniejszenie aktywności metabolicznej sugeruje wystąpienie ostrej cytotoksyczności A β , podczas gdy wzrost tego parametru może sugerować aktywację mikrogleju. W kolejnych etapach badań wykorzystałam A β agregowany przez 48 godzin, gdyż moim celem było zbadanie, czy i w jaki sposób PaPE-1 wpływa na charakterystyczną dla choroby Alzheimera przewlekłą i nadmierną aktywację mikrogleju.

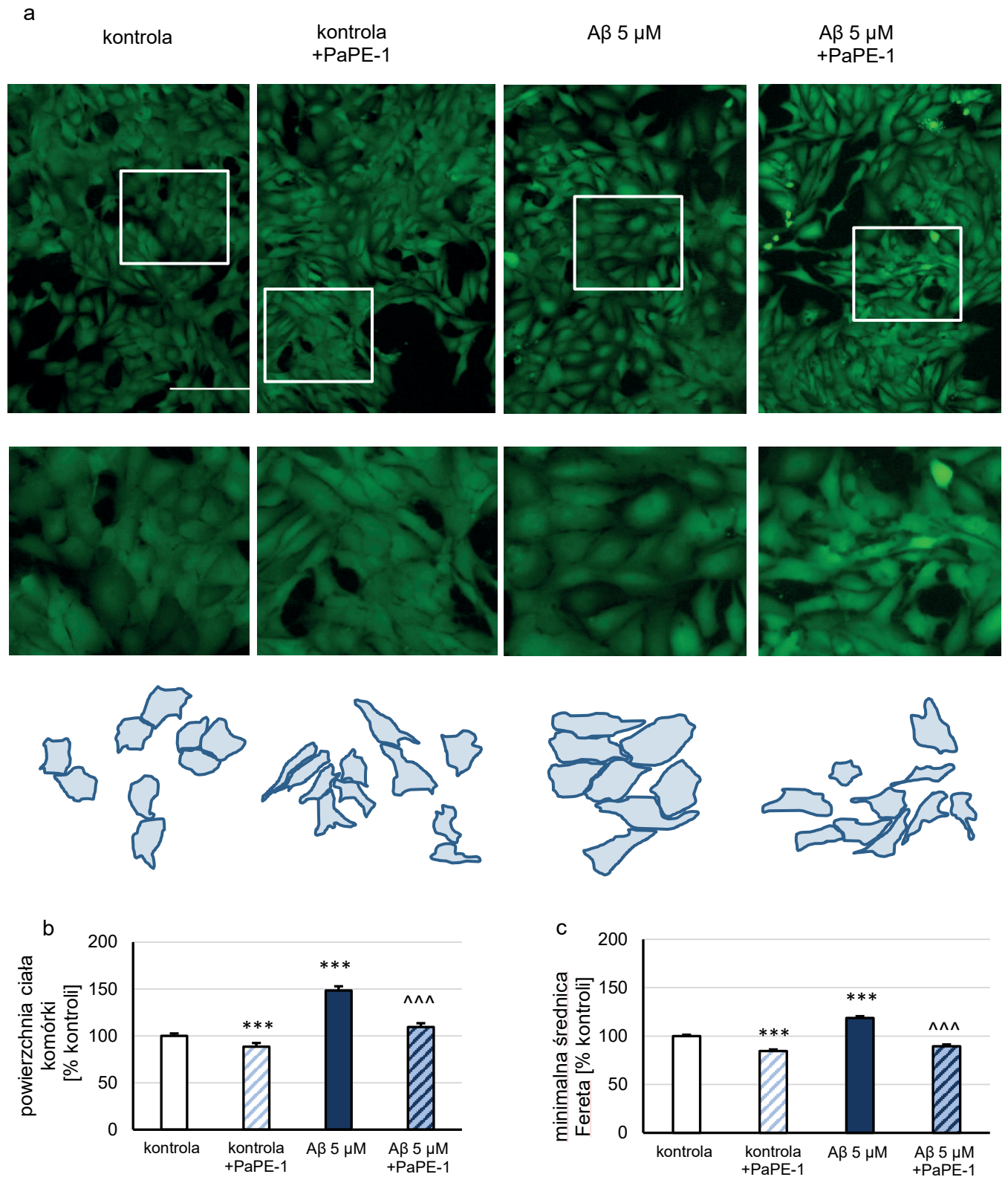
4. PaPE-1 hamuje podwyższoną aktywność metaboliczną komórek mikrogleju wywołaną ekspozycją na A β

Weryfikację wpływu PaPE-1 na wywołane przez A β zmiany w komórkach linii HMC3 zaczęłam od eksperymentu w paradygmacie czasowym identycznym ze stosowanym w przypadku wcześniejszych eksperymentów na mysich pierwotnych komórkach neuronalnych, tj. 24 godzinna ekspozycja na A β , a następnie 6 godzinna ekspozycja na PaPE-1 (10 μ M). Zaobserwowałam, że A β w stężeniach 5 i 10 μ M zwiększa aktywność metaboliczną komórek (odpowiednio 123 i 140% kontroli), natomiast PaPE-1 nie wpływa na tę zmianę (Ryc. 4a). Postanowiłam więc przedłużyć czas ekspozycji na PaPE-1, co pozwoliło na zaobserwowanie efektów działania badanego liganda. Przedłużone narażenie na A β zwiększyło aktywność metaboliczną komórek do 150 % kontroli w przypadku stężenia A β 5 μ M i 180 % kontroli w przypadku 10 μ M stężenia A β (Ryc. 4b). Po 24 godzinach od zaaplikowania, PaPE-1 obniża aktywność metaboliczną komórek mikrogleju narażonych na 5 μ M A β ze 150 do 130% kontroli. W tym samym paradygmacie czasowym ma miejsce również wzrost aktywności kaspazy-1 pod wpływem A β w stężeniu 5 μ M (234% kontroli) i 10 μ M (297% kontroli), na który nie wpływa badany ligand (Ryc. 4c). W warunkach kontrolnych PaPE-1 nie wpływa na badane parametry.



Rycina 4. Ekspozycja komórek linii HMC3 na A β (5 i 10 μ M) **agregowany uprzednio przez 48h** zwiększa aktywność metaboliczną komórek mikrogleju (panel a i b). Podanie PaPE-1 (10 μ M) na okres 24 godzin zmniejsza podniesioną pod wpływem A β 5 μ M aktywność metaboliczną komórek mikrogleju (panel b). Pod wpływem A β (5 i 10 μ M) w komórkach linii HMC3 wzrasta aktywność kaspazy-1. Wyniki przedstawiono jako % kontroli $\pm$ SEM z trzech niezależnych eksperymentów składających się z 8-10 powtórzeń biologicznych. Istotne statystycznie różnice zostały przedstawione jako: *** p < 0,001 w porównaniu z grupą kontrolną i ^^ p < 0,01 w porównaniu z grupą narażoną na A β . Istotne statystycznie różnice między grupami kontrola oraz A β + PaPE-1 nie zostały uwzględnione na wykresie

5. PaPE-1 wpływa na zmienioną w wyniku narażenia na A β morfologię komórek mikrogleju

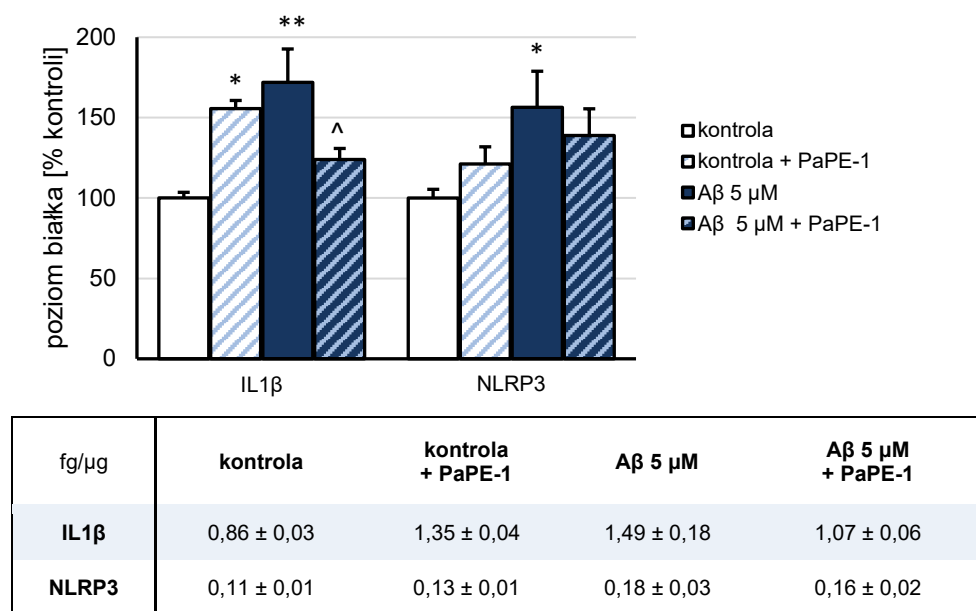


⇐ **Rycina 5.** Ekspozycja komórek linii HMC3 na A β (5 μ M) i PaPE-1 (10 μ M) zmieniają morfologię komórek mikrogleju (panele a, b i c). Górna część panelu „a” przedstawia przykładowe zdjęcie komórek linii HMC3 znakowanych kalceiną AM; część środkowa to przybliżenie obszaru zaznaczonego prostokątem; natomiast część dolna przedstawia obrysy przykładowych komórek. Wskaźnik skali odpowiada 100 μ m. Wyniki przedstawiono jako % kontroli $\pm$ SEM z 300-330 komórek na grupę. Istotne statystycznie różnice zostały przedstawione jako: *** $p < 0,001$ w porównaniu z grupą kontrolną i ^^ $p < 0,001$ w porównaniu z grupą narażoną na A β . Istotne statystycznie różnice między grupami kontrola oraz A β + PaPE-1 nie zostały uwzględnione na wykresie

Zarówno pod wpływem A β (5 μ M), jak i po dodaniu PaPE-1 (10 μ M), dochodzi do zmiany morfologii komórek linii HMC3. Do wizualizacji komórek wykorzystano kalceinę AM, która pod wpływem aktywności wewnątrzkomórkowych esteraz zmienia się we fluorescencyjny znacznik. A β zwiększa średnią powierzchnię komórek (148% kontroli) oraz najmniejszą średnicę Fereta (119% kontroli). Są to zmiany charakterystyczne dla zaktywowanego fenotypu mikrogleju, które w reakcji na A β obserwowali także inni badacze (Xie i in. 2020). Natomiast przedłużona ekspozycja na PaPE-1, trwająca 24 godziny, odwraca te zmiany (odpowiednio 109 i 90 % kontroli; Ryc. 5). W warunkach kontrolnych PaPE-1 również wpływa na morfologię komórek mikrogleju, zmniejszając powierzchnię komórki (89% kontroli) i najmniejszą średnicę Fereta (85% kontroli).

6. W komórkach mikrogleju PaPE-1 redukuje wywołany przez A β wzrost poziomu IL1 β

Kolejny etap badań dotyczył zmian poziomu czynników związanych z odpowiedzią zapalną w komórkach linii HMC3 w zastosowanym modelu. Agregowany uprzednio przez 48 godzin A β (5 μ M) wywołał wzrost poziomu IL1 β (172% kontroli) i NLRP3 (156% kontroli; Ryc. 6). Co interesujące, PaPE-1 (10 μ M) zredukował spowodowany przez A β wzrost IL1 β (spadek do 124% kontroli), podczas gdy w warunkach kontrolnych zwiększył poziom tego czynnika do 155%. Badany ligand nie wpłynął natomiast na poziom NLRP3 zarówno w obecności A β , jak i w warunkach kontrolnych.



Rycina 6. Ekspozycja komórek linii HMC3 na Aβ (5 μM) i PaPE-1 (10 μM) zmienia poziom IL1β i NLRP3. Wyniki przedstawiono jako % kontroli ± SEM z 5 powtórzeń biologicznych wykonanych w 3 powtórzeniach technicznych. Istotne statystycznie różnice zostały przedstawione jako: * $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$ w porównaniu z grupą kontrolną, ^ $p < 0,05$ w porównaniu z grupą traktowaną Aβ. Istotne statystycznie różnice między grupami kontrola oraz Aβ + PaPE-1 nie zostały uwzględnione na wykresie

7. Podsumowanie wyników

Podsumowując, w opisowej części rozprawy doktorskiej wykazałam, że mechanizmy ochronnego działania PaPE-1 obejmują również modulację procesów zapalnych indukowanych przez Aβ w komórkach neuronalnych oraz komórkach mikrogleju. Uzyskane wyniki sugerują aktywację odpowiedzi zapalnej pod wpływem Aβ, co widoczne jest poprzez stymulację aktywności kaspazy-1, wzrost poziomu zewnątrzkomórkowego ATP, zwiększenie aktywności metabolicznej komórek mikrogleju i zmianę ich morfologii, a także wzrost ekspresji czynników związanych ze stanem zapalnym m.in. IL1β i NLRP3. PaPE-1 wywołuje natomiast umiarkowany efekt ochronny, częściowo redukując indukowane przez Aβ zmiany w poziomie wybranych parametrów. W komórkach neuronalnych PaPE-1 redukuje podwyższoną aktywność kaspazy-1 i poziom pozakomórkowego ATP, a także zmniejsza ekspresję IL1β i NLRP3. Natomiast w komórkach mikrogleju powoduje obniżenie aktywności metabolicznej oraz redukcję poziomu IL1β przy jednoczesnej zmianie morfologii komórek w kierunku mikrogleju nieaktywowanego.

DYSKUSJA

Choroba Alzheimera jest najczęstszą postacią demencji, stanowiącą 60-70% wszystkich jej przypadków (WHO *Dementia*, 2023). Około dwie trzecie wszystkich przypadków tej choroby dotyczy kobiet, u których ryzyko jej wystąpienia w ciągu życia wynosi 1 na 6, co kontrastuje z ryzykiem obserwowanym u mężczyzn, wynoszącym 1 na 11 (Ali i in. 2023, Rishabh i in. 2024). Ta dysproporcja wskazuje na potencjalną rolę hormonów płciowych, w tym estrogenów, które znane są ze swoich neuroprotekcyjnych właściwości. Na podstawie licznych badań epidemiologicznych postuluje się, że spadek poziomu estrogenów zwiększa ryzyko wystąpienia choroby Alzheimera u kobiet po menopauzie (Ali i in. 2023). Natomiast późniejsze wystąpienie menopauzy, a tym samym dłuższa ekspozycja na endogenne estrogeny wiąże się ze zmniejszonym ryzykiem rozwoju choroby Alzheimera – według badań kohortowych każdy dodatkowy miesiąc oddziaływania estrogenów obniża to ryzyko o 0,5% (Fox i in. 2013, Matyi i in. 2019, Cardinali i in. 2021). Zastosowanie estrogenów w celu prewencji i/lub leczenia choroby Alzheimera wydaje się więc naturalnym krokiem. Podejście takie może jednak skutkować nadmierną i nioselektywną stymulacją klasycznych receptorów estrogenowych, a co za tym idzie wzrostem ryzyka powikłań sercowo-naczyniowych i nowotworzeniem (Deli i in. 2019, Abou-Ismael i in. 2020, Morris i in. 2023). Istotne jest więc, aby wykorzystać ochronny potencjał estrogenów w bezpieczny sposób z zastosowaniem ligandów nowej generacji.

W niniejszej pracy doktorskiej zastosowałam nowatorskie podejście polegające na selektywnej aktywacji inicjowanej pozajądrowo sygnalizacji klasycznych receptorów estrogenowych ESR1 i ESR2 z użyciem PaPE-1 w komórkowych modelach związanej z chorobą Alzheimera toksyczności A β . Po raz pierwszy neuroprotekcyjny potencjał PaPE-1 udowodniony został w modelu przejściowej okluzji tętnicy środkowej mózgu (tMCAO). W badaniach tych wykazano, że zastosowanie PaPE-1 przed wystąpieniem uszkodzenia skutecznie zmniejszyło dotkliwość udaru, poprawiło regenerację czynnościową oraz zmniejszyło neurozapalenie (Selvaraj i in. 2018). Wyniki uzyskane przez naszą grupę badawczą wskazały również, iż w komórkowych modelach hipoksji i ischemii, PaPE-1 skutecznie chroni neurony również gdy podany zostaje po wystąpieniu epizodu (Wnuk i in. 2021). Pierwsze doniesienie o skuteczności PaPE-1 w komórkowym modelu związanej z chorobą Alzheimera toksyczności A β również jest wynikiem pracy naszej grupy badawczej. W publikacji tej wskazaliśmy, że PaPE-1 podany jednocześnie z A β wywołuje efekt neuroprotekcyjny (Wnuk i in. 2020).

W obecnej pracy doktorskiej, w celu odzwierciedlenia aspektu klinicznego i zwiększenia wartości translacyjnej terapii, PaPE-1 był podawany z 24-godzinnym odroczeniem czasowym względem A β . Zaprezentowany cykl prac dotyczy więc weryfikacji ochronnego potencjału PaPE-1 zastosowanego w odroczonym czasie podania w komórkowym modelu choroby Alzheimera opartym na toksyczności A β . W moich badaniach wykorzystałam pierwotne hodowle komórek kory mózgowej myszy. Dodatkowo, moje badania uwzględniają sprawdzenie, czy PaPE-1 może modulować odpowiedź immunologiczną, do czego posłużyła linia ludzkich komórek mikrogleju HMC3. Modele doświadczalne zastosowane w moich badaniach umożliwiły szczegółową analizę mechanizmów działania PaPE-1 oraz dostarczyły istotnych danych uzasadniających kontynuację prac nad jego potencjałem terapeutycznym.

W przedstawionych badaniach wykorzystano model związanej z chorobą Alzheimera toksyczności A β , który polegał na ekspozycji pierwotnych hodowli komórek kory mózgowej myszy przez 24 godziny na zagregowany A β ₁₋₄₂, a następnie dodaniu PaPE-1 na okres 6 godzin. Dzięki realizacji badań w paradygmacie podania odroczonego względem czynnika wywołującego uszkodzenie, uzyskane wyniki można łatwiej przełożyć na sytuację kliniczną. A β jest jednym z dwóch białek o kluczowym znaczeniu w chorobie Alzheimera. Największą część pacjentów z kliniczną postacią choroby Alzheimera (89%) posiada zarówno podwyższony poziom A β , jak i tau (Jack i in. 2019). Ponadto, podwyższony poziom tau, w przeciwieństwie do podwyższonego poziomu A β , skrajnie rzadko występuje samodzielnie (Jack i in. 2019). Wraz z wiekiem wzrasta odsetek osób z podniesionym poziomem A β , który pojawia się wcześniej niż nieprawidłowości w zakresie białka tau i może być wyznacznikiem późniejszego pojawienia się patologii tau oraz związanych z nią deficytów poznawczych (Jack i in. 2019, Hanseeuw i in. 2019). Wystąpienie zmian amyloidowych wydaje się więc konieczne do wzrostu poziomu białka tau, a tym samym do rozwoju choroby Alzheimera.

Zastosowany przeze mnie model komórkowy oparty na toksyczności A β stanowi powszechnie wykorzystywane narzędzie do testowania potencjalnych leków umożliwiając ocenę skuteczności badanej substancji na wczesnych etapach neurodegeneracji. Wykazałam, że pod wpływem działania zagregowanego A β ₁₋₄₂ dochodzi do obniżenia żywotności komórek, zwiększenia stopnia neurodegeneracji oraz zmniejszenia gęstości sieci neurytów (**Pietrzak-Wawrzyńska i in. 2024**). Podobne obserwacje poczynili również inni badacze pracujący z wykorzystaniem zbliżonych modeli eksperymentalnych (Nilsen i in. 2006, Rasoolijazi i in. 2013, Kim i in. 2020, Salvadores i in. 2022). Adekwatność zastosowanego modelu dodatkowo

potwierdza wykazany przeze mnie wzrost ekspresji *App*, *Bace2*, *Apoe* i *Rbfox1* (**Pietrzak-Wawrzyńska i in. 2024**), czyli czynników charakterystycznych dla choroby Alzheimera (Matsui i in. 2007, Raghavan i in. 2020, Yeap i in. 2023, Sirisi i in. 2024, Rasmussen i in. 2024). RBFOX1 jest białkiem, które odgrywa kluczową rolę w alternatywnym splicingu i regulacji stabilności mRNA (Prashad i Gopal 2021), a także nowym loci potencjalnie zaangażowanym w patogenezę choroby Alzheimera (Raghavan i in. 2020, Kunkle i in. 2021). *Rbfox1* może promować ekspresję tau bezpośrednio wiążąc się z mRNA *Mapt* tj. genu kodującego to białko, a wyciszenie ekspresji *Rbfox1* zmniejsza ilość tau (El Fatimy i in. 2018). Z kolei zwiększenie ekspresji *Rbfox1* zaburza zależne od BDNF (z ang. *Brain-Derived Neurotrophic Factor* – czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego) długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (z ang. *Long Term Potentiation* – LTP) w hipokampie (Tomassoni-Ardori i in. 2019). Ponadto, ekspozycja neuronów w hodowli *in vitro* na oligomery A β prowadzi do specyficznej dla choroby Alzheimera hiperfosforylacji białka tau oraz degeneracji neurytów, przy czym efekt ten ulega nasileniu w warunkach nadekspresji tau i jest zniesiony po jego wyciszeniu (De Felice i in. 2008, Jin i in. 2011). W obecnej pracy doktorskiej, poziom mRNA *Mapt*, czyli genu kodującego białko tau, nie zmienia się, co jednak nie jest równoznaczne z brakiem wpływu na patologię tau, ponieważ nie zbadano poziomu tego białka i stopnia jego fosforylacji (**Pietrzak-Wawrzyńska i in. 2024**).

Mimo, iż neuroprotektoryjne efekty aktywacji receptorów estrogenowych są powszechnie znane, udział błonowych receptorów estrogenowych i inicjowanych pozajądrowo ścieżek sygnalizacyjnych klasycznych receptorów estrogenowych ESR1 i ESR2 w ochronie mózgu przed chorobą Alzheimera nie został do tej pory w pełni zbadany. W pracy **Pietrzak-Wawrzyńska i in. (2024)** po raz pierwszy wykazałam, że selektywna aktywacja inicjowanej pozajądrowo sygnalizacji estrogenowej z użyciem PaPE-1 przeciwdziała efektom wywołanym przez A β , co obejmuje poprawę żywotności komórek, zmniejszenie stopnia neurodegeneracji oraz zwiększenie gęstości sieci neurytów, jak również obniżenie ekspresji genów związanych z chorobą Alzheimera: *App*, *Bace2*, *Apoe*, *Rbfox1* i *Nrgn*. PaPE-1 stymulował także ekspresję *Chat*, co wydaje się szczególnie ważne w świetle wyników Kwakowsky i in. (2016), w których estren (4-estren-3 α ,17 β -diol) aktywując pozajądrowe ścieżki sygnałowe ESR1 hamował utratę cholinergicznym projekcji korowych i niwelował deficyty uczenia się wywołane przez A β ₁₋₄₂. Inne ligandy receptorów estrogenowych, takie jak fitoestrogeny i SERMs, również wywołują efekt ochronny przeciw zmianom związanym z chorobą Alzheimera (Zhao i in. 2015, Wang i in. 2020a i 2020b, Duan i in. 2021, Qin i in. 2021). Potwierdza to zasadność podjętych badań,

lecz nie wskazuje na szczególny udział inicjowanej pozajądrowo sygnalizacji receptorów ESR1/ESR2 w neuroprotekcji, jak ma to miejsce w naszych badaniach. Co więcej, niniejsza praca doktorska jako pierwsza dowodzi skuteczności PaPE-1, zastosowanego w paradygmacie podania odroczonego w czasie, w związanych z chorobą Alzheimera modelach komórkowych.

W publikacji **Pietrzak-Wawrzyńska i in. (2024)** udowodniłam, że w odpowiedzi na A β dochodzi do aktywacji apoptozy, na co wskazuje wzrost aktywności kaspazy-3, kaspazy-8 i kaspazy-9 oraz stymulacja ekspresji czynników proapoptycznych *Bax/BAX*, *Gsk3b*, *Fas/FAS* i *FasL/FASL*. Apoptoza i autofagia to dwa istotne w utrzymaniu homeostazy organizmu procesy, które mogą ze sobą współdziałać w różny sposób w zależności od warunków. Liczne badania wskazują na aktywację apoptozy w chorobie Alzheimera oraz związanych z nią modelach badawczych (Rohn i in. 2001 i 2002, Su i in. 2003, Matsui i in. 2006, Brokaw i in. 2020, Goel i in. 2022, Kumari i in. 2023). Początkowo zaskakującym wynikiem było zaobserwowane w naszych badaniach zwiększenie ekspresji *Bcl2*, które uznawane jest za czynnik przeciwapoptyczny (**Pietrzak-Wawrzyńska i in. 2024**). Podobne zjawisko występuje również w mózgach pacjentów, gdzie ilość BCL2 zwiększa się w miarę pojawiania się zmian neuropatologicznych związanych z chorobą Alzheimera (Satou i in. 1995, Su i in. 1996). Z drugiej strony, w neuronach zawierających splątki hiperfosforylowanego białka tau, spada ilość BCL2 (Satou i in. 1995, Su i in. 1996). Wskazuje to, że wzrost poziomu BCL2 może być mechanizmem kompensacyjnym, mającym na celu ochronę komórek przed chorobą w jej wcześniejszych etapach, tj. przed pojawieniem się patologii tau.

W pracy **Pietrzak-Wawrzyńska i in. (2024)** po raz pierwszy wykazałam, że w modelu toksyczności A β związanej z chorobą Alzheimera, odroczone w czasie podanie PaPE-1 ma działanie przeciwapoptyczne. PaPE-1 skutecznie zahamował podwyższoną na skutek działania A β aktywność kaspazy-3 i -9 oraz zniwelował apoptyczną kondensację chromatyny. Ponadto, PaPE-1 zmniejszył ekspresję czynników proapoptycznych takich jak *Bax/BAX*, *Gsk3b*, *Fas/FAS* i *FasL/FASL* oraz stymulował ekspresję przeciwapoptycznego *Bcl2*. Podobny mechanizm ochronnego działania opisano dla działającej przez aktywnowaną-ESR1 ścieżkę sygnałową PI3K/Akt formononetyny. Jej efekty polegały na hamowaniu apoptozy poprzez zmniejszenie ilości aktywnej kaspazy-3 oraz stymulację ekspresji BCL2 w komórkach linii HT22 narażonych na A β ₂₅₋₃₅ (Chen i in. 2017). Dodatkowo formononetyna promowała nieamyloidogenną obróbkę enzymatyczną APP oraz poprawę uczenia się i pamięci u myszy APP/PS1 (Fei i in. 2018).

W moich badaniach ekspozycja komórek nerwowych na A β , poza stymulacją apoptozy, doprowadziła jednocześnie do upośledzenia autofagii, o czym świadczy spadek poziomu pęcherzyków autofagowych oraz dysregulacja ekspresji *Atg7/ATG7* i *MAP1LC3AB*, czyli kluczowych w tym procesie czynników (**Pietrzak-Wawrzyńska i in. 2025**). Autofagia uznawana jest za mechanizm ochronny w chorobie Alzheimera, a jej zaburzenia prowadzące do akumulacji dysfunkcyjnych pęcherzyków autofagowych odnotowane były także przez innych badaczy (Nixon i in. 2005, Pickford i in. 2008, Rohn i in. 2011, Lucin i in. 2013). Rozbieżność między zaobserwowanym przeze mnie spadkiem poziomu pęcherzyków autofagowych a obserwowaną zazwyczaj ich akumulacją może wynikać ze stopnia zaawansowania patologii. Otóż wykazano, że do akumulacji pęcherzyków autofagowych nie dochodzi wcześniej niż na etapie formowania blaszek amyloidowych, natomiast zastosowany przeze mnie model odwzorowuje wcześniejszy etap choroby, gdyż stosowany A β jest w postaci agregatów mniejszych niż protofilamenty (Long i in. 2020). Podobny spadek poziomu markerów autofagii zaobserwowano w komórkach linii SH-SY5Y z mutacją APP_{SWE} (Long i in. 2020). W przedstawionym cyklu prac A β hamował autofagię, jednocześnie stymulując apoptozę, a zastosowanie inhibitorów autofagii, potęgowało aktywność kaspazy-3 (**Pietrzak-Wawrzyńska i in. 2024 i 2025**), co jest zgodne z zaobserwowaną u myszy APP/PS1 degradacją aktywnej kaspazy-3 w procesie autofagii (Yang i in. 2008). Wskazuje to na przeciwstawną regulację tych procesów w modelu oraz sugeruje istotną rolę wzajemnych oddziaływań apoptozy i autofagii w przebiegu choroby Alzheimera.

Powszechnie uważa się, iż stymulacja autofagii odgrywa pozytywną rolę w chorobie Alzheimera. Przykładowo, aktywacja autofagii łagodzi stres oksydacyjny, apoptozę i neurotoksyczność indukowaną przez A β w liniach komórkowych SH-SY5Y i PC12 (Singh i in. 2017, Yuan i in. 2018) oraz zmniejsza ilość złogów A β , poprawiając funkcje poznawcze u myszy 3xTg-AD (Caccamo i in. 2010). Ponadto w mózgach osób z rozwiniętą patologią A β i tau, lecz bez objawów kognitywnych choroby Alzheimera, zaobserwowano wyższą ekspresję czynników charakterystycznych dla autofagii niż u pacjentów z deficytami kognitywnymi (Tumurbaatar i in. 2023). Tak więc, sprawnie działająca autofagia może pełnić ochronną rolę w zachowaniu funkcji poznawczych mimo obecności markerów charakterystycznych dla choroby Alzheimera. Omawiane w niniejszej pracy doktorskiej badania dowiodły, że odroczone w czasie podanie PaPE-1 stymuluje autofagię, która upośledzona została w odpowiedzi na A β (**Pietrzak-Wawrzyńska i in. 2025**). Podanie PaPE-1 zwiększyło ilość pęcherzyków autofagowych oraz stymulowało ekspresję czynników związanych z autofagią

Becn1/BECN1, *Atg7*, *Atg5*, *Ambra1* i *Map1lc3b/MAP1LC3AB*. Rola inicjowanej pozajądrowo sygnalizacji estrogenowej w regulacji autofagii została potwierdzona badaniami, w których wykazano, że 17 β -estradiol wspomaga usuwanie nieprawidłowego białka tau poprzez aktywację autofagii, przy czym mechanizm ten zależy od ESR1, a dokładniej jego błonowej formy mER α (Costa i in. 2022). W tych badaniach autorzy zastosowali E2-BSA, czyli 17 β -estradiolem sprzężonym z albuminą surowicy bydlęcej, która utrudnia wnikanie estradiolu do komórki i umożliwia obserwację szybkich, niejądrowych efektów związanych z błonowymi receptorami estrogenowymi. Narzędzie to nie jest jednak w pełni selektywne, gdyż kompleks E2-BSA może ulegać hydrolizie uwalniając wolny estradiol, co utrudnia jednoznaczną interpretację wyników. Z tego względu przełomowe okazało się opracowanie nowych ligandów, umożliwiających selektywną aktywację pozajądrowych szlaków sygnałowych klasycznych receptorów estrogenowych, takich jak PaPE-1.

W swoich badaniach wykazałam, że podanie A β zmniejszyło poziom ESR1 i ESR2 zarówno w cytozolowej, jak i w błonowej frakcji komórkowej w pierwotnych hodowlach kory mózgowej (**Pietrzak-Wawrzyńska i in. 2025**). Podobnych obserwacji dokonano w próbkach krwi obwodowej i tkankach hipokampów pacjentów z chorobą Alzheimera, gdzie poziom *Esr1*/ESR1 obniżył się (Hu i in. 2003, Ishunina i in. 2007, Güven i in. 2023). Co więcej, w mózgach pacjentów cierpiących na chorobę Alzheimera zaobserwowano zaburzenia struktury tratw lipidowych zawierających mER α oraz zmniejszoną asocjację mER α i VDAC1 (Ramírez i in. 2009, Canerina-Amaro i in. 2017). mER α inaktywuje VDAC1 tym samym zmniejszając przedostawanie się A β do komórek, co chroni je przed śmiercią (Herrera i in. 2011, Smilansky i in. 2015, Sato i in. 2023). W niniejszej pracy doktorskiej wykazałam, że neuroprotektoryny wpływ PaPE-1 na uszkodzenia wywołane A β , oprócz antyapoptycznych i proautofagicznych efektów, obejmuje błonowe receptory estrogenowe (mER), o czym świadczą zwiększone poziomy mER α i mER β . Może odpowiadać za nie wzrost ekspresji mRNA *Esr1* i *Esr2* związany z hipometylacją DNA odpowiednich genów (**Pietrzak-Wawrzyńska i in. 2025**). Podwyższona ekspresja błonowego ESR1 sprzyja dojrzewaniu autofagosomów (Li i in. 2015), co potwierdza prawidłowość zaobserwowaną w naszych badaniach. Ostatnio, zależne od metylacji zmniejszenie ekspresji *Esr1* we krwi obwodowej zostało powiązane z osłabieniem funkcji poznawczych i obniżoną jakością życia u pacjentów z chorobą Alzheimera (Li i in. 2019). Ponadto, metylacja *Esr1* i *Esr2* w grzbietowo-bocznej korze przedczołowej (DLPFC) wiąże się z pogorszeniem funkcji poznawczych oraz patologią tau (Oveisgharan i in. 2023). ESR1 współwystępuje ze splątkami neurofibrylarnymi, a ekspresja tau zmniejsza aktywność

transkrypcyjną ESR1 (Wang i in. 2016). Fakty te sugerują, że w mózgu z chorobą Alzheimera białko tau hamuje neuroprotekcję zależną od ESR1. Co interesujące, interakcje między białkiem tau i ESR1 nie są obserwowane jedynie w chorobie Alzheimera. Dane literaturowe sugerują, że ekspresja białka tau może stanowić obiecujący czynnik prognostyczny w ocenie wrażliwości raka piersi na chemioterapię neoadjuwantową opartą na taksanach, szczególnie w przypadku nowotworów wykazujących ekspresję receptorów estrogenowych (Ikeda i in. 2010, Wang i in. 2013, Zhou i in. 2015, Lei i in. 2020).

Neuroprotektoryjny efekt działania PaPE-1 został częściowo utracony w komórkach narażonych na MPP- antagonistę ESR1, co wskazuje na główne zaangażowanie właśnie tego receptora w ochronne działanie badanego liganda (**Pietrzak-Wawrzyńska i in. 2025**). Wynik ten jest zgodny z utratą efektów PaPE-1 po zahamowaniu ekspresji *Esr1* za pomocą siRNA w komórkach linii MCF7 i u myszy z nokautem genu *Esr1*, a także z silniejszym powinowactwem PaPE-1 do ESR1 wykazanym przez Madak-Erdogan i in. (2016). PaPE-1 nie wpłynął na wywołany przez A β spadek poziomu ESR2 zlokalizowanego w cytozolu, lecz spowodował prawie dwukrotny wzrost poziomu błonowego ESR2, co mogłoby sugerować, że oprócz ESR1, to również ESR2 może przyczyniać się do neuroprotektoryjnego działania PaPE-1. Wiedząc, jednak że internalizacja zlokalizowanego w błonie receptora estrogenowego jest miarą jego aktywacji (Bondar i in. 2009) spekulujemy, że mniejszy wzrost poziomu ESR1 w porównaniu do ESR2 we frakcji błonowej sugeruje jego ciągłą translokację między cytozolem i błoną komórkową wynikającą z aktywacji receptora. Natomiast wyższy poziom ESR2 we frakcji błonowej może wskazywać na translokację receptora do błony, ale bez jego internalizacji/aktywacji, o czym świadczy brak zaangażowania ESR2 w hamowanie aktywności kaspazy-3 przez PaPE-1.

Patofizjologia choroby Alzheimera, oprócz apoptozy, autofagii i zmian w obrębie sygnalizacji estrogenowej, obejmuje również zmiany w profilu epigenetycznym w tym m.in. metylację DNA i modyfikacje histonów (Gao i in. 2022, De Plano i in. 2024), a substancje z grup estrogenów i fitoestrogenów poprzez modyfikacje epigenetyczne mogą wpływać na związane z wiekiem pogorszenie funkcji kognitywnych (Singh i Paramanik 2022). W świetle tych obserwacji uznaliśmy za zasadne zweryfikowanie, czy w zastosowanym modelu PaPE-1 indukuje zmiany w statusie epigenetycznym komórek. Uzyskane wyniki są pierwszym dowodem wskazującym, że selektywna aktywacja niejądrowych ścieżek sygnałowych receptorów estrogenowych z użyciem PaPE-1 może modyfikować poziom metylacji

specyficznych genów związanych z procesami apoptozy i autofagii a także z sygnalizacją estrogenową (Pietrzak-Wawrzyńska i in. 2024 i 2025). Wzrost poziomu metylacji w obszarze promotora genu zwykle prowadzi do jego represji transkrypcyjnej. Jednak zaobserwowane w naszych badaniach zmiany metylacji, nie w każdym przypadku odpowiadają zmianom ekspresji, jak jest to widoczne m.in. na przykładzie *Bcl2* (Pietrzak-Wawrzyńska i in. 2024). Pozwala to przypuszczać, że zaistniałe zmiany są wypadkową różnych mechanizmów epigenetycznych związanych nie tylko z metylacją DNA, lecz również m.in. z acetylacją histonów. Za modyfikację acetylacyjną histonów odpowiadają przede wszystkim acetylotransferazy histonowe (HAT) i deacetylazy histonowe (HDAC). Z moich badań wynika, że pod wpływem A β wzrasta aktywność HDAC, natomiast podanie PaPE-1 zwiększa aktywność HAT, jednocześnie nie wpływając na aktywność HDAC (Pietrzak-Wawrzyńska i in. 2025). W mózgach pacjentów cierpiących na chorobę Alzheimera często obserwuje się obniżoną acetylację histonów, co zwróciło uwagę badaczy na HAT i HDAC jako cele terapeutyczne w walce z chorobą Alzheimera (Pereira i in. 2024). Poziom acetylacji histonu H4 jest istotnie obniżony w mysim i komórkowym modelu choroby Alzheimera, a farmakologiczna inhibicja HDAC z użyciem fenylomaślanu sodu (z ang. *sodium 4-phenylbutyrate* – 4-PBA) zwiększa acetylację histonów i odwraca deficyty uczenia się i pamięci (Ricobaraza i in. 2009). Ostatnio zakończyła się II faza badań klinicznych połączenia 4-PBA i taurursodiolu, lecz badania te nie ujawniły istotnych efektów klinicznych takiego leczenia u pacjentów cierpiących na chorobę Alzheimera (Arnold i in. 2024). Autorzy wskazują jednak, że może być to skutkiem zbyt małej liczby uczestników i krótkim czasem przyjmowania leku. Warto podkreślić, że mimo braku efektów klinicznych, zaobserwowano obniżenie biomarkerów choroby takich jak p-tau181 i całkowita ilość tau oraz poziom neurograniny, FABP3 i YKL-40 czyli czynników związanych z neurodegeneracją i glejozą. Strategie terapeutyczne polegające na modulacji acetylacji histonów są więc obiecujące lecz wymagają dalszych badań. Korzystny wpływ na przebieg choroby Alzheimera może mieć również podwyższona aktywność HAT, o czym świadczy należący do tej grupy enzymów Tip60. Jego utrata w transgenicznym modelu *Drosophila melanogaster* zwiększa ekspresję APP i nasila apoptozę neuronów (Pirooznia i in. 2012). Natomiast aktywacja i/lub zwiększenie poziomu Tip60 chroni przed wywołanymi przez A β deficytami kognitywnymi i śmiercią komórek neuronalnych oraz skróconym czasem życia, a także stymuluje ekspresję genów związanych z neuroplastycznością (Zhang i in. 2020, Bhatnagar i in. 2025). W świetle tych danych, zaobserwowana w naszych badaniach stymulacja aktywności HAT przez PaPE-1

wydaje się kolejnym ważnym mechanizmem jego działania, o szczególnym potencjale w kontekście terapii choroby Alzheimera.

Kolejnym istotnym patomechanizmem towarzyszącym chorobie Alzheimera jest przewlekła i nadmierna aktywacja odpowiedzi zapalnej w układzie nerwowym. Podczas odpowiedzi zapalnej w chorobie Alzheimera dochodzi do wyrzutu czynników prozapalnych, których obecność prowadzi do degeneracji mózgu (Belkhef i in. 2024). Na kluczową rolę neurozapalenia wskazują m.in. analizy GWAS, które wykazały że polimorfizmy genetyczne w obrębie czynników w nie zaangażowanych (np.: CD33, TREM2 i CR1/CD35) związane są z wystąpieniem choroby Alzheimera (Jonsson i in. 2013, Zhao 2019, Daskoulidou i in. 2025). W swoich badaniach zastosowałam modele komórkowe, polegające na narażeniu mysich pierwotnych hodowli komórek neuronalnych oraz hodowli linii komórek ludzkiego mikrogleju na zagregowany A β . W odpowiedzi na A β zaobserwowałam m.in. wzrost aktywności kaspazy-1 oraz stymulację ekspresji czynników związanych z zapaleniem, m.in. IL1 β i NLRP3. Mikroglej to wyspecjalizowana populacja komórek układu odpornościowego, pełniąca funkcję głównych fagocytów układu nerwowego, odpowiedzialnych m.in. za usuwanie nieprawidłowych agregatów białkowych, w tym A β . Zdolność do fagocytozy A β przez mikroglej uzależniona jest jednak od jego stanu agregacji. Pan i in. (2011) wykazali, iż fibryle A β powodują podwyższenie aktywności metabolicznej oraz zwiększenie fagocytozy komórek mikrogleju w hodowli pierwotnej oraz linii BV-2. Natomiast oligomery A β obniżają jego aktywność metaboliczną (Pan i in. 2011). Potwierdza to moje obserwacje, w których reakcja mikrogleju na A β również zależała od czasu/stopnia jego agregacji – obecność protofilamentów i/lub struktur wyższego rzędu spowodowała wzrost aktywności metabolicznej. Natomiast A β o mniejszym niż protofilamenty stopniu agregacji wywołał spadek aktywności metabolicznej, sugerujący ostrą toksyczność. W dalszych badaniach zastosowałam A β o wyższym stopniu agregacji, gdyż zależało mi na uchwyceniu charakterystycznej dla choroby Alzheimera nadmiernej odpowiedzi prozapalnej, a nie ostrej toksyczności A β . Wzrost aktywności metabolicznej komórek mikrogleju nie jest jednoznacznym wyznacznikiem jego aktywacji, może natomiast na nią wskazywać, gdyż odzwierciedla zwiększone zapotrzebowanie na energię konieczną do uruchomienia odpowiedzi zapalnej i co za tym idzie produkcji cytokin i aktywacji fagocytozy (Schmidt i in. 2021). Ponadto, prozapalny fenotyp mikrogleju zweryfikowałam poprzez ocenę kolejnych parametrów. Wzrostowi aktywności metabolicznej, widocznemu pod wpływem agregatów A β wyższego stopnia towarzyszyło także powiększenie powierzchni ciała komórki oraz

zwiększenie minimalnej średnicy Fereta (tj. najmniejszej odległości między dwiema równoległymi prostymi st stycznymi do obiektu). Zaobserwowałam również typowe dla odpowiedzi prozapalnej zmiany takie jak wzrost aktywności kaspazy-1 oraz zwiększenie poziomu IL1 β i NLRP3. Tego rodzaju zmiany są charakterystyczne dla zaktywowanego (prozapalnego/M1-podobnego) fenotypu mikrogleju i są zgodne z reakcją mikrogleju na A β obserwowaną przez innych badaczy (Xie i in. 2020, Leyh i in. 2021).

W chorobie Alzheimerera, patologiczne formy A β i białka tau powodują powstanie inflamasomu NLRP3, co prowadzi do aktywacji kaspazy-1 i sekrecji cytokin prozapalnych, takich jak IL1 β (Liang i in. 2022). Uzyskane przeze mnie wyniki wskazują na aktywację tych mechanizmów w odpowiedzi na A β zarówno w modelu bazującym na mysich komórkach neuronalnych, jak i ludzkich komórkach mikrogleju. Zaskakującym wynikiem jest natomiast obecna pod wpływem PaPE-1 stymulacja ekspresji IL1 β w komórkach mikrogleju, sugerująca prozapalne działanie badanego liganda. Należy jednak zaznaczyć, że IL1 β nie jest jedynie cytokiną prozapalną, a jej ochronną dla układu nerwowego rolę wykazano w warunkach prekondukcjonowania w modelu niedokrwiennym, gdzie uczestniczy ona w budowaniu tolerancji wobec kolejnych epizodów niedokrwiennych (Ohtsuki i in. 1996). Ponadto IL1 β może chronić neurony w modelu ekscytotoksyczności związanej z nadmierną aktywacją receptorów dla glutaminianu, a efekt ten jest częściowo mediowany przez stymulację produkcji czynników neurotroficznycch (Hewett i in. 2012, Todd i in. 2019). Zważywszy że w odpowiedzi na PaPE-1 nie dochodzi do uruchomienia innych charakterystycznych prozapalnych mechanizmów, zaobserwowany wzrost IL1 β nie dowodzi prozapalnego działania PaPE-1.

W moich badaniach zaobserwowałam, zmiany w ekspresji czynników z rodziny NF κ B, kluczowych w regulacji procesów zapalnych (Kaltschmidt i in. 2025). Pod wpływem A β w mysich komórkach neuronalnych wzrasta ekspresja *Nfkb1* (p105), lecz maleje poziom NF κ B3 (p65, RELA), co stoi w kontraście z zazwyczaj obserwowanym nasileniem aktywności czynników NF κ B w chorobie Alzheimerera (Jha i in. 2019, Sun i in. 2022). Obserwacja ta może więc wskazywać na mechanizm kompensacyjny, gdyż hamowanie ścieżki sygnałowej NF κ B zapobiega wystąpieniu charakterystycznych dla choroby Alzheimerera zmian w cukrzycowym i genetycznym modelu tej choroby (Cai i in. 2011, Ferretti i in. 2012). Spadek poziomu NF κ B3 widoczny jest również w odpowiedzi na PaPE-1 w komórkach kontrolnych, a efekt ten może być związany z pośrednim hamującym wpływem receptorów estrogenowych na aktywność NF κ B, poprzez pozajądrową sygnalizację estrogenową, w której pośredniczy PI3K (Kalaitzidis

i Gilmore 2005, Ghisletti i in. 2005, Villa i in. 2016). W tym kontekście, intrygujące jest także, iż zmniejszenie ekspresji NFκB3 w wątrobie jest wspólnym mechanizmem działania interwencji przeciwstarzeniowych, takich jak restrykcja kaloryczna, czy zastosowanie rapamycyny, kanagliflozyny, meklizynu lub akarbozy (Elmansi i in. 2024). Jest to interesujący wynik, który zachęca do oceny przeciwstarzeniowego potencjału PaPE-1. Należy jednak pamiętać, że wspomniane badania zostały przeprowadzone na innym typie komórek, a działanie wymienionych ligandów może być uzależnione od rodzaju tkanki.

Hamowanie nadaktywnego stanu zapalnego w układzie nerwowym jest obiecującą strategią terapeutyczną, która może okazać się szczególnie ważna w kontekście choroby Alzheimera. W opisowej części rozprawy doktorskiej po raz pierwszy wykazałam, że PaPE-1 częściowo odwraca występujące wskutek narażenia na Aβ oznaki nasilonej odpowiedzi zapalnej, w tym m.in. zmniejsza aktywność kaspazy-1, redukuje ekspresję IL1β, NLRP3 i *Nfkb1* oraz obniża aktywność metaboliczną komórek mikrogleju, wpływając także na jego zmienioną pod wpływem Aβ morfologię. Dotychczasowe badania nad przeciwzapalnym potencjałem PaPE-1 dotyczą jego działania w modelu tMCAO. Wykazano w nich, że PaPE-1 redukuje neurozapalenie, ograniczając infiltrację leukocytów do mózgu (Selvaraj i in. 2018). W pracy tej nie zbadano jednak dokładnych mechanizmów działania, ani zmian molekularnych zachodzących pod wpływem badanego liganda. Natomiast główny wynik, na podstawie którego autorzy wnioskuje o ograniczeniu neurozapalenia, może przede wszystkim wskazywać na uszczelnienie bariery krew-mózg. Niemniej jednak, wykazane obniżenie infiltracji leukocytów może skutkować wyciszeniem stanu zapalnego w mózgu. Przedstawiony mechanizm działania PaPE-1, mimo iż istotny w modelu niedokrwienia, może mieć mniejsze znaczenie w kontekście choroby Alzheimera.

Z moich badań wynika, że PaPE-1 spowodował zmianę kształtu i rozmiaru komórek mikrogleju, czemu towarzyszyło zmniejszenie ekspresji czynników prozapalnych (IL1β, NLRP3 i *Nfkb1*) oraz spadek aktywności kaspazy-1 w hodowlach komórek neuronalnych i/lub komórek mikrogleju. Rola aktywacji pozajądrowych szlaków sygnałowych receptorów estrogenowych w przeciwzapalnych efektach estrogenów pozostaje niewystarczająco poznana. Moje badania sugerują, że zmiany zaobserwowane pod wpływem PaPE-1 wykazują podobieństwo do efektów działania naturalnych estrogenów, SERMs czy fitoestrogenów. Przykładowo, 17β-estradiol zapobiega wywołanym przez LPS (lipopolisacharyd) zmianom morfologicznym komórek mikrogleju i związanej z nimi produkcji czynników prozapalnych

(Vegeto i in. 2000, Smith i in. 2011). Ponadto, zarówno syntetyczne SERMs – tamoksyfen i raloksyfen – jak i naturalne fitoestrogeny – genisteina, daidzeina i kemferol – hamują wywołaną podaniem LPS lub A β zmianę fenotypu mikrogleju na prozapalny (Park i in. 2011, Chinta i in. 2013, Jeong i in. 2014, Ishihara i in. 2015). Przedstawione dane wskazują więc na istotną rolę aktywacji receptorów estrogenowych w kontroli procesów zapalnych. Mechanizm ten może mieć szczególne znaczenie u kobiet po menopauzie, czyli w grupie o szczególnym ryzyku choroby Alzheimera, u których obserwuje się zwiększoną ekspresję markerów prozapalnych (Villa i in. 2016). Podobne efekty występują po owariektomii, przy czym mogą one zostać zredukowane poprzez podanie przed zabiegiem estradiolu (Vegeto i in. 2006, Benedusi i in. 2012, Sárvári i in. 2012). Wymienione badania podkreślają istotną rolę aktywacji receptorów estrogenowych w hamowaniu stanu zapalnego. W tym kontekście wykazany w niniejszej pracy doktorskiej hamujący wpływ PaPE-1 na ekspresję czynników prozapalnych może wskazywać na dodatkowy mechanizm działania liganda, wzmacniający jego potencjał jako kandydata do badań nad terapią choroby Alzheimera.

Podsumowując uzyskane w niniejszej pracy doktorskiej wyniki sugerują, że PaPE-1 może okazać się cennym narzędziem w leczeniu choroby Alzheimera. Wskazują na jego właściwości neuroprotekcyjne związane z hamowaniem procesów zaangażowanych w patogenezę choroby, jak też regulacją szlaków sygnałowych receptorów estrogenowych i modulacją mechanizmów epigenetycznych. Ponadto wyniki moich badań dowodzą, iż PaPE-1 może modulować odpowiedź zapalną indukowaną przez A β w komórkach mikrogleju i komórkach neuronalnych.

PODSUMOWANIE

W przedstawionych badaniach zastosowano modele odpowiedzi komórkowej wobec zagregowanego A β ₁₋₄₂. W tym celu wykorzystałam: **A. Hodowle pierwotne mysich komórek nerwowych** oraz **B. Hodowle komórek mikrogleju ludzkiej linii HMC3**, które były ekspozowane na A β ₁₋₄₂ przez okres 24 godzin. Po tym czasie do hodowli komórkowych dodawano PaPE-1 na okres kolejnych 6 i/lub 24 godzin, stosując paradygmat podania odroczonego w czasie, czyli tzw. *post-treatment*.

Przeprowadzone badania umożliwiły uzyskanie następujących wyników:

A. Hodowle pierwotne mysich komórek nerwowych

1) Ekspozycja na zagregowany A β ₁₋₄₂ prowadzi do:

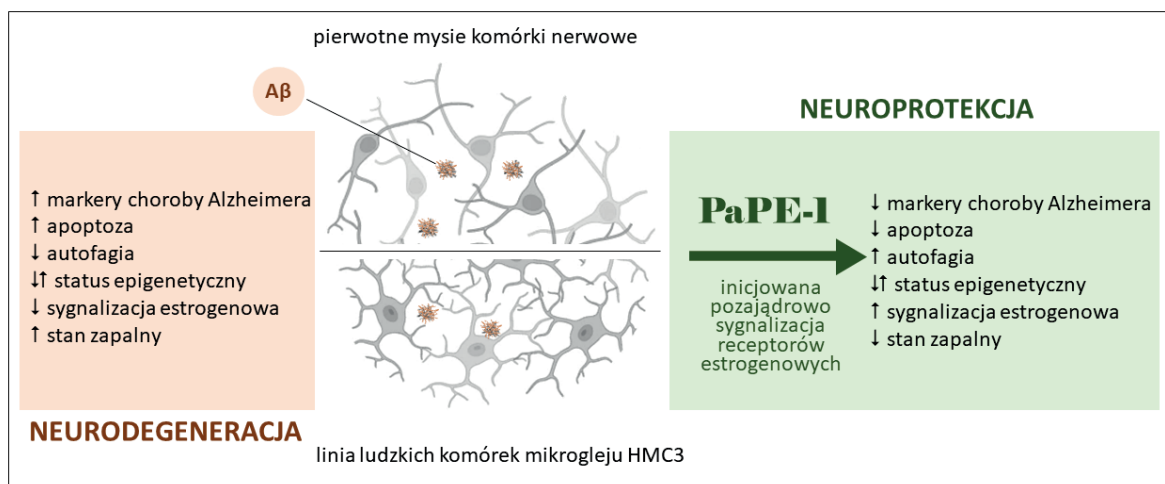
- wzrostu ekspresji markerów choroby Alzheimera (*App*, *Apoe*, *Bace2*, *Rbfox1*), zwiększenia stopnia neurodegeneracji oraz zmniejszenia gęstości sieci neurytów,
- indukcji apoptozy, charakteryzującej się aktywacją kaspazy-3, -8 i -9, apoptyczną kondensacją chromatyny oraz wzrostem ekspresji czynników proapoptycznych (*BAX/Bax*, *Gsk3b*, *FAS/Fas*, *FASL/FasI*),
- upośledzenia autofagii, wykazanego poprzez spadek poziomu pęcherzyków autofagowych i zmiany ekspresji czynników związanych z przebiegiem tego procesu (*Atg7/ATG7*, *MAP1LC3AB*),
- obniżenia ekspresji mRNA *Esr1* oraz białka ESR1 i ESR2 zarówno w błonowej jak i cytozolowej frakcji komórkowej,
- zaburzenia statusu epigenetycznego, objawiającego się zmianami poziomu metylacji specyficznych genów (*Bax*, *Bcl2*, *Atg7*, *Esr1*, *Esr2*) oraz wzrostem aktywności HDAC,
- inicjacji komórkowej odpowiedzi zapalnej, na co wskazuje wzrost poziomu pozakomórkowego ATP, aktywacja kaspazy-1 i nasilenie ekspresji czynników *Cox2*, *Il1b/IL1 β* , *Nfkb1*, *Nlrp3/NLRP3*.

2) Odroczone w czasie ekspozycja komórek nerwowych na PaPE-1 częściowo odwraca zmiany wywołane pod wpływem zagregowanego A β ₁₋₄₂, na co wskazuje:

- spadek ekspresji markerów choroby Alzheimera w tym: *App*, *Apoe*, *Bace2* i *Rbfox1*, a także symulacja ekspresji *Chat*, którym towarzyszą zwiększenie gęstości sieci neurytów oraz obniżenie poziomu neurodegeneracji,
- hamowanie apoptozy, widoczne poprzez obniżenie aktywności kaspazy-3 i kaspazy-8, zmniejszenie apoptycznej kondensacji chromatyny, a także zmiany w ekspresji czynników związanych z apoptozą, w tym spadek poziomu *Bax/BAX*, *Gsk3b*, *Fas/FAS* i *Fasl/FASL* oraz wzrost przeciwapoptycznego *Bcl2*,
- częściowe przywrócenie upośledzonej w odpowiedzi na A β ₁₋₄₂ autofagii, związane z normalizacją poziomu pęcherzyków autofagowych oraz wzrostem ekspresji kluczowych dla procesu autofagii czynników takich jak *Becn1/BECN1*, *Atg5*, *Atg7*, *Ambra1* i *Map1lc3b/MAP1LC3AB*,
- wzrost poziomu białka ESR1 i ESR2 specyficzny dla błonowej frakcji komórkowej, któremu towarzyszy podwyższenie ekspresji mRNA *Esr1* i *Esr2*, a zastosowanie specyficznych antagonistów receptorów estrogenowych wykazało, że w efektach działania PaPE-1 niezbędny jest receptor ESR1,
- modyfikacja statusu epigenetycznego, związana ze zmianami metylacji DNA specyficznych genów (*Bax*, *Bcl2*, *Atg7*, *Esr1*, *Esr2* i *Gper1*) oraz wzrostem aktywności HAT,
- częściowe zahamowanie wywołanych przez A β ₁₋₄₂ zmian związanych ze stanem zapalnym, w tym obniżenie poziomu pozakomórkowego ATP, spadek aktywności kaspazy-1 i zmniejszenie ekspresji IL1 β i *Nlrp3/NLRP3*.

B. Hodowle komórek mikrogleju ludzkiej linii HMC3

- 1) Ekspozycja komórek mikrogleju na zagregowany A β ₁₋₄₂ powoduje zwiększenie aktywności metabolicznej komórek, wzrost aktywności kaspazy-1, zmianę morfologii komórek mikrogleju wskazującą na fenotyp prozapalny oraz wzrost ekspresji czynników związanych z odpowiedzią zapalną IL1 β i NLRP3.
- 2) Odroczone w czasie ekspozycja komórek mikrogleju na PaPE-1 częściowo odwraca wywołane przez A β ₁₋₄₂ efekty, zmniejszając ich nasiloną aktywność metaboliczną, odwracając zmiany morfologiczne, a także obniżając poziom IL1 β .



Schemat 3. Podsumowanie uzyskanych wyników. Wykonano przy użyciu BioRender.com

WNIOSKI

Badania zawarte w publikacjach Pietrzak-Wawrzyńska i in. 2024 *Molecular Neurobiology*, Pietrzak-Wawrzyńska i in. 2025 *Journal of Molecular Biology* oraz w opisowej części rozprawy doktorskiej dowodzą iż:

I. Zastosowane modele odpowiedzi mysich pierwotnych komórek neuronalnych i ludzkich komórek mikrogleju linii HMC3 na zagregowany $A\beta_{1-42}$ *in vitro* odzwierciedlają procesy zachodzące w przebiegu choroby Alzheimera, w tym aktywację apoptozy, zaburzenie autofagii, indukcję odpowiedzi zapalnej a także zmiany statusu epigenetycznego.

II. Odroczone w czasie podanie PaPE-1 częściowo odwraca wywołane przez $A\beta_{1-42}$ zmiany patologiczne, co wskazuje na silny potencjał ochronny liganda, zarówno w odniesieniu do neurodegeneracji (neurony), jak i procesów zapalnych (neurony i mikroglej) związanych z chorobą Alzheimera.

III. Mechanizmy ochronnego oddziaływania PaPE-1 na komórki nerwowe polegają przede wszystkim na hamowaniu apoptozy, stymulacji autofagii oraz modulacji neurozapalenia i związane są z modyfikacją statusu epigenetycznego. Działanie PaPE-1 zależne jest od receptora ESR1, a uzyskane wyniki wskazują na szczególną rolę błonowych receptorów estrogenowych w obserwowanych efektach.

IV. Uzyskane wyniki wskazują, iż leki bazujące na selektywnej aktywacji inicjowanej pozajądrowo sygnalizacji estrogenowej mogą stać się skutecznym i bezpiecznym narzędziem w walce z chorobą Alzheimera.

PIŚMIENNICTWO

1. Abou-Ismaïl MY, Citla Sridhar D, Nayak L. Estrogen and thrombosis: A bench to bedside review. *Thromb Res*. 2020;192:40-51. doi:10.1016/j.thromres.2020.05.008
2. Acconcia F, Marino M. The Effects of 17 β -estradiol in Cancer are Mediated by Estrogen Receptor Signaling at the Plasma Membrane. *Front Physiol*. 2011;2:30. Published 2011 Jun 30. doi:10.3389/fphys.2011.00030
3. Agarwal M, Alam MR, Haider MK, Malik MZ, Kim DK. Alzheimer's Disease: An Overview of Major Hypotheses and Therapeutic Options in Nanotechnology. *Nanomaterials (Basel)*. 2020;11(1):59. Published 2020 Dec 29. doi:10.3390/nano11010059
4. Ali N, Sohail R, Jaffer SR, et al. The Role of Estrogen Therapy as a Protective Factor for Alzheimer's Disease and Dementia in Postmenopausal Women: A Comprehensive Review of the Literature. *Cureus*. 2023;15(8):e43053. Published 2023 Aug 6. doi:10.7759/cureus.43053
5. Altwegg KA, Vadlamudi RK. Role of estrogen receptor coregulators in endocrine resistant breast cancer. *Explor Target Antitumor Ther*. 2021;2(4):385-400. doi:10.37349/etat.2021.00052
6. Alves VC, Carro E, Figueiro-Silva J. Unveiling DNA methylation in Alzheimer's disease: a review of array-based human brain studies. *Neural Regen Res*. 2024;19(11):2365-2376. doi:10.4103/1673-5374.393106
7. Arevalo MA, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors. *Nat Rev Neurosci*. 2015;16(1):17-29. doi:10.1038/nrn3856
8. Arnold SE, Hendrix S, Nicodemus-Johnson J, et al. Biological effects of sodium phenylbutyrate and taurursodiol in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (N Y)*. 2024;10(3):e12487. Published 2024 Aug 9. doi:10.1002/trc2.12487
9. Azcoitia I, Fernandez-Galaz C, Sierra A, Garcia-Segura LM. Gonadal hormones affect neuronal vulnerability to excitotoxin-induced degeneration. *J Neurocytol*. 1999;28(9):699-710. doi:10.1023/a:1007025219044
10. Azcoitia I, Sierra A, Veiga S, Honda S, Harada N, Garcia-Segura LM. Brain aromatase is neuroprotective. *J Neurobiol*. 2001;47(4):318-329. doi:10.1002/neu.1038
11. Ballard C, Margallo-Lana M, Juszcak E, et al. Quetiapine and rivastigmine and cognitive decline in Alzheimer's disease: randomised double blind placebo controlled trial. *BMJ*. 2005;330(7496):874. doi:10.1136/bmj.38369.459988.8F
12. Barber RC. The genetics of Alzheimer's disease. *Scientifica (Cairo)*. 2012;2012:246210. doi:10.6064/2012/246210

13. Bateman RJ, Munsell LY, Morris JC, Swarm R, Yarasheski KE, Holtzman DM. Human amyloid-beta synthesis and clearance rates as measured in cerebrospinal fluid in vivo. *Nat Med*. 2006;12(7):856-861. doi:10.1038/nm1438
14. Belkhef M, Bekrar S, Rezaig L, et al. Neuroinflammatory Responses Occur in Brain Lesions During Alzheimer's Disease: Postmortem Case Report. *J Alzheimers Dis*. 2024;97(3):1323-1339. doi:10.3233/JAD-230910
15. Benedusi V, Meda C, Della Torre S, Monteleone G, Vegeto E, Maggi A. A lack of ovarian function increases neuroinflammation in aged mice. *Endocrinology*. 2012;153(6):2777-2788. doi:10.1210/en.2011-1925
16. Bhatnagar A, Krick K, Karisetty BC, Armour EM, Heller EA, Elefant F. Tip60's Novel RNA-Binding Function Modulates Alternative Splicing of Pre-mRNA Targets Implicated in Alzheimer's Disease. *J Neurosci*. 2023;43(13):2398-2423. doi:10.1523/JNEUROSCI.2331-22.2023
17. Bhatnagar A, Thomas CM, Nge GG, et al. Tip60 HAT activators as therapeutic modulators for Alzheimer's disease. *Nat Commun*. 2025;16(1):3347. Published 2025 Apr 9. doi:10.1038/s41467-025-58496-w
18. Bishop GM, Robinson SR. Physiological roles of amyloid-beta and implications for its removal in Alzheimer's disease. *Drugs Aging*. 2004;21(10):621-630. doi:10.2165/00002512-200421100-00001
19. Bondar G, Kuo J, Hamid N, Micevych P. Estradiol-induced estrogen receptor-alpha trafficking. *J Neurosci*. 2009;29(48):15323-15330. doi:10.1523/JNEUROSCI.2107-09.2009
20. Braak H, Del Tredici K. Spreading of Tau Pathology in Sporadic Alzheimer's Disease Along Cortico-cortical Top-Down Connections. *Cereb Cortex*. 2018;28(9):3372-3384. doi:10.1093/cercor/bhy152
21. Brokaw DL, Piras IS, Mastroeni D, et al. Cell death and survival pathways in Alzheimer's disease: an integrative hypothesis testing approach utilizing -omic data sets. *Neurobiol Aging*. 2020;95:15-25. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2020.06.022
22. Cacabelos R, Torrellas C. Epigenetics of Aging and Alzheimer's Disease: Implications for Pharmacogenomics and Drug Response. *Int J Mol Sci*. 2015;16(12):30483-30543. Published 2015 Dec 21. doi:10.3390/ijms161226236
23. Caccamo A, Majumder S, Richardson A, Strong R, Oddo S. Molecular interplay between mammalian target of rapamycin (mTOR), amyloid-beta, and Tau: effects on cognitive impairments. *J Biol Chem*. 2010;285(17):13107-13120. doi:10.1074/jbc.M110.100420

24. Cai W, Wu T, Chen N. The Amyloid-Beta Clearance: From Molecular Targets to Glial and Neural Cells. *Biomolecules*. 2023;13(2):313. Published 2023 Feb 7. doi:10.3390/biom13020313
25. Cai Z, Zhao Y, Yao S, Bin Zhao B. Increases in β -amyloid protein in the hippocampus caused by diabetic metabolic disorder are blocked by minocycline through inhibition of NF- κ B pathway activation. *Pharmacol Rep*. 2011;63(2):381-391. doi:10.1016/s1734-1140(11)70504-7
26. Callens M, Kraskovskaya N, Derevtsova K, et al. The role of Bcl-2 proteins in modulating neuronal Ca^{2+} signaling in health and in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2021;1868(6):118997. doi:10.1016/j.bbamer.2021.118997
27. Calsolaro V, Edison P. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. *Alzheimers Dement*. 2016;12(6):719-732. doi:10.1016/j.jalz.2016.02.010
28. Canerina-Amaro A, Hernandez-Abad LG, Ferrer I, et al. Lipid raft ER signalosome malfunctions in menopause and Alzheimer's disease. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2017;9(1):111-126. Published 2017 Jan 1. doi:10.2741/s476
29. Cardinali CAEF, Martins YA, Torráo AS. Use of Hormone Therapy in Postmenopausal Women with Alzheimer's Disease: A Systematic Review. *Drugs Aging*. 2021;38(9):769-791. doi:10.1007/s40266-021-00878-y
30. Chen L, Ou S, Zhou L, Tang H, Xu J, Guo K. Formononetin attenuates A β 25-35-induced cytotoxicity in HT22 cells via PI3K/Akt signaling and non-amyloidogenic cleavage of APP. *Neurosci Lett*. 2017;639:36-42. doi:10.1016/j.neulet.2016.12.064
31. Chen Y, Al-Nusaif M, Li S, et al. Progress on early diagnosing Alzheimer's disease. *Front Med*. 2024;18(3):446-464. doi:10.1007/s11684-023-1047-1
32. Chinta SJ, Ganesan A, Reis-Rodrigues P, Lithgow GJ, Andersen JK. Anti-inflammatory role of the isoflavone diadzein in lipopolysaccharide-stimulated microglia: implications for Parkinson's disease. *Neurotox Res*. 2013;23(2):145-153. doi:10.1007/s12640-012-9328-5
33. Chouliaras L, Mastroeni D, Delvaux E, et al. Consistent decrease in global DNA methylation and hydroxymethylation in the hippocampus of Alzheimer's disease patients. *Neurobiol Aging*. 2013;34(9):2091-2099. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.02.021
34. Cipriano GL, Mazzon E, Anchesi I. Estrogen Receptors: A New Frontier in Alzheimer's Disease Therapy. *Int J Mol Sci*. 2024;25(16):9077. Published 2024 Aug 21. doi:10.3390/ijms25169077

35. Coppieters N, Dieriks BV, Lill C, Faull RL, Curtis MA, Dragunow M. Global changes in DNA methylation and hydroxymethylation in Alzheimer's disease human brain. *Neurobiol Aging*. 2014;35(6):1334-1344. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.11.031
36. 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. doi:10.1126/science.8346443
37. Correia SC, Resende R, Moreira PI, Pereira CM. Alzheimer's disease-related misfolded proteins and dysfunctional organelles on autophagy menu. *DNA Cell Biol*. 2015;34(4):261-273. doi:10.1089/dna.2014.2757
38. Costa AJ, Oliveira RB, Wachilewski P, et al. Membrane estrogen receptor ER α activation improves tau clearance via autophagy induction in a tauopathy cell model. *Brain Res*. 2022;1795:148079. doi:10.1016/j.brainres.2022.148079
39. Daskoulidou N, Shaw B, Zelek WM, Morgan BP. The Alzheimer's disease-associated complement receptor 1 variant confers risk by impacting glial phagocytosis. *Alzheimers Dement*. 2025;21(7):e70458. doi:10.1002/alz.70458
40. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci*. 2005;8(6):752-758. doi:10.1038/nn1472
41. De Felice FG, Wu D, Lambert MP, et al. Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A beta oligomers. *Neurobiol Aging*. 2008;29(9):1334-1347. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2007.02.029
42. De Jager PL, Srivastava G, Lunnon K, et al. Alzheimer's disease: early alterations in brain DNA methylation at ANK1, BIN1, RHBDF2 and other loci. *Nat Neurosci*. 2014;17(9):1156-1163. doi:10.1038/nn.3786
43. De Plano LM, Saitta A, Oddo S, Caccamo A. Epigenetic Changes in Alzheimer's Disease: DNA Methylation and Histone Modification. *Cells*. 2024;13(8):719. Published 2024 Apr 21. doi:10.3390/cells13080719
44. Delhalle S, Duvoix A, Schneckeburger M, Morceau F, Dicato M, Diederich M. An introduction to the molecular mechanisms of apoptosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;1010:1-8. doi:10.1196/annals.1299.001
45. Deli T, Orosz M, Jakab A. Hormone Replacement Therapy in Cancer Survivors - Review of the Literature. *Pathol Oncol Res*. 2020;26(1):63-78. doi:10.1007/s12253-018-00569-x
46. Deng Z, Dong Y, Zhou X, Lu JH, Yue Z. Pharmacological modulation of autophagy for Alzheimer's disease therapy: Opportunities and obstacles. *Acta Pharm Sin B*. 2022;12(4):1688-1706. doi:10.1016/j.apsb.2021.12.009

47. Ding F, Yao J, Zhao L, Mao Z, Chen S, Brinton RD. Ovariectomy induces a shift in fuel availability and metabolism in the hippocampus of the female transgenic model of familial Alzheimer's. *PLoS One*. 2013;8(3):e59825. doi:10.1371/journal.pone.0059825
48. DiSabato DJ, Quan N, Godbout JP. Neuroinflammation: the devil is in the details. *J Neurochem*. 2016;139 Suppl 2(Suppl 2):136-153. doi:10.1111/jnc.13607
49. Dominguez-Gortaire J, Ruiz A, Porto-Pazos AB, Rodriguez-Yanez S, Cedron F. Alzheimer's Disease: Exploring Pathophysiological Hypotheses and the Role of Machine Learning in Drug Discovery. *Int J Mol Sci*. 2025;26(3):1004. Published 2025 Jan 24. doi:10.3390/ijms26031004
50. Drugbank: Raloxifene <https://go.drugbank.com/drugs/DB00481>
51. Duan X, Li Y, Xu F, Ding H. Study on the neuroprotective effects of Genistein on Alzheimer's disease. *Brain Behav*. 2021;11(5):e02100. doi:10.1002/brb3.2100
52. Eckman EA, Adams SK, Troendle FJ, et al. Regulation of steady-state beta-amyloid levels in the brain by neprilysin and endothelin-converting enzyme but not angiotensin-converting enzyme. *J Biol Chem*. 2006;281(41):30471-30478. doi:10.1074/jbc.M605827200
53. Edwards Iii GA, Gamez N, Escobedo G Jr, Calderon O, Moreno-Gonzalez I. Modifiable Risk Factors for Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci*. 2019;11:146. Published 2019 Jun 24. doi:10.3389/fnagi.2019.00146
54. El Fatimy R, Li S, Chen Z, et al. MicroRNA-132 provides neuroprotection for tauopathies via multiple signaling pathways. *Acta Neuropathol*. 2018;136(4):537-555. doi:10.1007/s00401-018-1880-5
55. Elmansi AM, Kassem A, Castilla RM, Miller RA. Downregulation of the NF- κ B protein p65 is a shared phenotype among most anti-aging interventions. *Geroscience*. 2025;47(3):3077-3094. doi:10.1007/s11357-024-01466-9
56. Engelhardt B, Carare RO, Bechmann I, Flügel A, Laman JD, Weller RO. Vascular, glial, and lymphatic immune gateways of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2016;132(3):317-338. doi:10.1007/s00401-016-1606-5
57. Erkinjuntti T, Kurz A, Gauthier S, Bullock R, Lilienfeld S, Damaraju CV. Efficacy of galantamine in probable vascular dementia and Alzheimer's disease combined with cerebrovascular disease: a randomised trial. *Lancet*. 2002;359(9314):1283-1290. doi:10.1016/S0140-6736(02)08267-3
58. Fei HX, Zhang YB, Liu T, Zhang XJ, Wu SL. Neuroprotective effect of formononetin in ameliorating learning and memory impairment in mouse model of Alzheimer's disease. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2018;82(1):57-64. doi:10.1080/09168451.2017.1399788

59. Ferretti MT, Allard S, Partridge V, Ducatenzeiler A, Cuello AC. Minocycline corrects early, pre-plaque neuroinflammation and inhibits BACE-1 in a transgenic model of Alzheimer's disease-like amyloid pathology. *J Neuroinflammation*. 2012;9:62. Published 2012 Apr 2. doi:10.1186/1742-2094-9-62
60. Fox M, Berzuini C, Knapp LA. Cumulative estrogen exposure, number of menstrual cycles, and Alzheimer's risk in a cohort of British women. *Psychoneuroendocrinology*. 2013;38(12):2973-2982. doi:10.1016/j.psyneuen.2013.08.005
61. Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1999;66(2):137-147. doi:10.1136/jnnp.66.2.137
62. Fu C, Hao W, Shrestha N, Virani SS, Mishra SR, Zhu D. Association of reproductive factors with dementia: A systematic review and dose-response meta-analyses of observational studies. *EClinicalMedicine*. 2021;43:101236. Published 2021 Dec 14. doi:10.1016/j.eclinm.2021.101236
63. Fuentes N, Silveyra P. Estrogen receptor signaling mechanisms. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2019;116:135-170. doi:10.1016/bs.apcsb.2019.01.001
64. Fujimura K, Karasawa T, Komada T, et al. NLRP3 inflammasome-driven IL-1 β and IL-18 contribute to lipopolysaccharide-induced septic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*. 2023;180 Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*. 2015;14(4):388-405. doi:10.1016/S1474-4422(15)70016-5:58-68. doi:10.1016/j.jmcc.2023.05.003
65. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*. 2018;25(3):486-541. doi:10.1038/s41418-017-0012-4
66. Gao X, Chen Q, Yao H, et al. Epigenetics in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci*. 2022;14:911635. Published 2022 Jun 23. doi:10.3389/fnagi.2022.911635
67. Gerrits E, Brouwer N, Kooistra SM, et al. Distinct amyloid- β and tau-associated microglia profiles in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 2021;141(5):681-696. doi:10.1007/s00401-021-02263-w
68. Ghisletti S, Meda C, Maggi A, Vegeto E. 17 β -estradiol inhibits inflammatory gene expression by controlling NF- κ B intracellular localization. *Mol Cell Biol*. 2005;25(8):2957-2968. doi:10.1128/MCB.25.8.2957-2968.2005
69. Goel P, Chakrabarti S, Goel K, Bhutani K, Chopra T, Bali S. Neuronal cell death mechanisms in Alzheimer's disease: An insight. *Front Mol Neurosci*. 2022;15:937133. Published 2022 Aug 25. doi:10.3389/fnmol.2022.937133

70. González-Mora AM, Garcia-Lopez P. Estrogen Receptors as Molecular Targets of Endocrine Therapy for Glioblastoma. *Int J Mol Sci.* 2021;22(22):12404. Published 2021 Nov 17. doi:10.3390/ijms222212404
71. Green S, Walter P, Kumar V, et al. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature.* 1986;320(6058):134-139. doi:10.1038/320134a0
72. Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science.* 1986;231(4742):1150-1154. doi:10.1126/science.3753802
73. Grothe MJ, Barthel H, Sepulcre J, et al. In vivo staging of regional amyloid deposition. *Neurology.* 2017;89(20):2031-2038. doi:10.1212/WNL.0000000000004643
74. Grubman A, Chew G, Ouyang JF, et al. A single-cell atlas of entorhinal cortex from individuals with Alzheimer's disease reveals cell-type-specific gene expression regulation. *Nat Neurosci.* 2019;22(12):2087-2097. doi:10.1038/s41593-019-0539-4
75. Guerreiro R, Wojtas A, Bras J, et al. TREM2 variants in Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2013;368(2):117-127. doi:10.1056/NEJMoa1211851
76. Güven G, Büyükkaya PK, Kılıç M, Uzun D, Cavuş B, Geyik FG, Lohmann E, Samancı B, Gürvit H, Hanağası H, Bilgiç B. Association of Estrogen Receptor 1 PvuII and XbaI Polymorphisms and Peripheral Estrogen Receptor 1 mRNA Levels with Alzheimer's Disease in Turkish Patients. *Turkish Journal of Neurology.* 2023;29(3) 195-203. doi:10.4274/tnd.2023.70481
77. Haddad HW, Malone GW, Comardelle NJ, Degueure AE, Kaye AM, Kaye AD. Aducanumab, a Novel Anti-Amyloid Monoclonal Antibody, for the Treatment of Alzheimer's Disease: A Comprehensive Review. *Health Psychol Res.* 2022;10(1):31925. Published 2022 Jan 30. doi:10.52965/001c.31925
78. Hampel H, Hardy J, Blennow K, et al. The Amyloid- β Pathway in Alzheimer's Disease. *Mol Psychiatry.* 2021;26(10):5481-5503. doi:10.1038/s41380-021-01249-0
79. Hampel H, Mesulam MM, Cuello AC, et al. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain.* 2018;141(7):1917-1933. doi:10.1093/brain/awy132
80. Hanseeuw BJ, Betensky RA, Jacobs HIL, et al. Association of Amyloid and Tau With Cognition in Preclinical Alzheimer Disease: A Longitudinal Study. *JAMA Neurol.* 2019;76(8):915-924. doi:10.1001/jamaneurol.2019.1424
81. Hansen DV, Hanson JE, Sheng M. Microglia in Alzheimer's disease. *J Cell Biol.* 2018;217(2):459-472. doi:10.1083/jcb.201709069

82. Henderson VW, Ala T, Sainani KL, et al. Raloxifene for women with Alzheimer disease: A randomized controlled pilot trial. *Neurology*. 2015;85(22):1937-1944. doi:10.1212/WNL.0000000000002171
83. Herrera JL, Diaz M, Hernández-Fernaund JR, et al. Voltage-dependent anion channel as a resident protein of lipid rafts: post-transductional regulation by estrogens and involvement in neuronal preservation against Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2011;116(5):820-827. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06987.x
84. Herrera JL, Fernandez C, Diaz M, Cury D, Marin R. Estradiol and tamoxifen differentially regulate a plasmalemmal voltage-dependent anion channel involved in amyloid-beta induced neurotoxicity. *Steroids*. 2011;76(9):840-844. doi:10.1016/j.steroids.2011.02.014
85. Herzig H, Neier R, Santi S, Barakat E. Bloch meets Alzheimer. *SPG Mitteilungen*. Januar 2014. 11-14.
86. Hewett SJ, Jackman NA, Claycomb RJ. Interleukin-1 β in Central Nervous System Injury and Repair. *Eur J Neurodegener Dis*. 2012;1(2):195-211.
87. Hickman SE, Allison EK, El Khoury J. Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *J Neurosci*. 2008;28(33):8354-8360. doi:10.1523/JNEUROSCI.0616-08.2008
88. Howard R, McShane R, Lindesay J, et al. Donepezil and memantine for moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2012;366(10):893-903. doi:10.1056/NEJMoa1106668
89. Hu P, Liu J, Yasrebi A, et al. Gq Protein-Coupled Membrane-Initiated Estrogen Signaling Rapidly Excites Corticotropin-Releasing Hormone Neurons in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus in Female Mice. *Endocrinology*. 2016;157(9):3604-3620. doi:10.1210/en.2016-1191
90. Hu XY, Qin S, Lu YP, Ravid R, Swaab DF, Zhou JN. Decreased estrogen receptor-alpha expression in hippocampal neurons in relation to hyperphosphorylated tau in Alzheimer patients. *Acta Neuropathol*. 2003;106(3):213-220. doi:10.1007/s00401-003-0720-3
91. Hu Z, Chen PH, Li W, et al. Targeted Dephosphorylation of Tau by Phosphorylation Targeting Chimeras (PhosTACs) as a Therapeutic Modality. *J Am Chem Soc*. Published online February 8, 2023. doi:10.1021/jacs.2c11706
92. Huuha AM, Norevik CS, Moreira JBN, et al. Can exercise training teach us how to treat Alzheimer's disease?. *Ageing Res Rev*. 2022;75:101559. doi:10.1016/j.arr.2022.101559
93. Ikeda H. et al. The estrogen receptor influences microtubule-associated protein tau (MAPT) expression and the selective estrogen receptor inhibitor fulvestrant downregulates MAPT and increases the sensitivity to taxane in breast cancer cells. *Breast cancer research : BCR* 12, R43, doi: 10.1186/bcr2598 (2010).

94. Illingworth RS, Bird AP. CpG islands--'a rough guide'. *FEBS Lett.* 2009;583(11):1713-1720. doi:10.1016/j.febslet.2009.04.012
95. Ishihara Y, Itoh K, Ishida A, Yamazaki T. Selective estrogen-receptor modulators suppress microglial activation and neuronal cell death via an estrogen receptor-dependent pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2015;145:85-93. doi:10.1016/j.jsbmb.2014.10.002
96. Ishunina TA, Fischer DF, Swaab DF. Estrogen receptor alpha and its splice variants in the hippocampus in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2007;28(11):1670-1681. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2006.07.024
97. Iso-Markku P, Kujala UM, Knittle K, Polet J, Vuoksima E, Waller K. Physical activity as a protective factor for dementia and Alzheimer's disease: systematic review, meta-analysis and quality assessment of cohort and case-control studies. *Br J Sports Med.* 2022;56(12):701-709. doi:10.1136/bjsports-2021-104981
98. Jack CR Jr, Bennett DA, Blennow K, et al. A/T/N: An unbiased descriptive classification scheme for Alzheimer disease biomarkers. *Neurology.* 2016;87(5):539-547. doi:10.1212/WNL.0000000000002923
99. Jack CR Jr, Bennett DA, Blennow K, et al. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2018;14(4):535-562. doi:10.1016/j.jalz.2018.02.018
100. Jack CR, Wiste HJ, Botha H, et al. The bivariate distribution of amyloid- β and tau: relationship with established neurocognitive clinical syndromes. *Brain.* 2019;142(10):3230-3242. doi:10.1093/brain/awz268
101. Jeong JW, Lee HH, Han MH, Kim GY, Kim WJ, Choi YH. Anti-inflammatory effects of genistein via suppression of the toll-like receptor 4-mediated signaling pathway in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. *Chem Biol Interact.* 2014;212:30-39. doi:10.1016/j.cbi.2014.01.012
102. Jha NK, Jha SK, Kar R, Nand P, Swati K, Goswami VK. Nuclear factor-kappa β as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2019;150(2):113-137. doi:10.1111/jnc.14687
103. Jin M, Shepardson N, Yang T, Chen G, Walsh D, Selkoe DJ. Soluble amyloid beta-protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(14):5819-5824. doi:10.1073/pnas.1017033108
104. Jonsson T, Stefansson H, Steinberg S, et al. Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2013;368(2):107-116. doi:10.1056/NEJMoa1211103

105. Kabir MT, Uddin MS, Mamun AA, et al. Combination Drug Therapy for the Management of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 2020;21(9):3272. Published 2020 May 5. doi:10.3390/ijms21093272
106. Kadavath H, Hofele RV, Biernat J, et al. Tau stabilizes microtubules by binding at the interface between tubulin heterodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(24):7501-7506. doi:10.1073/pnas.1504081112
107. Kajta M, Beyer C. Cellular strategies of estrogen-mediated neuroprotection during brain development. *Endocrine.* 2003;21(1):3-9. doi:10.1385/ENDO:21:1:3
108. Kajta M, Rzemieniec J, Litwa E, et al. The key involvement of estrogen receptor β and G-protein-coupled receptor 30 in the neuroprotective action of daidzein. *Neuroscience.* 2013;238:345-360. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.02.005
109. Kajta M. Apoptosis in the central nervous system: Mechanisms and protective strategies. *Pol J Pharmacol.* 2004;56(6):689-700.
110. Kalaitzidis D, Gilmore TD. Transcription factor cross-talk: the estrogen receptor and NF-kappaB. *Trends Endocrinol Metab.* 2005;16(2):46-52. doi:10.1016/j.tem.2005.01.004
111. Kaltschmidt B, Czaniera NJ, Schulten W, Kaltschmidt C. NF- κ B in Alzheimer's Disease: Friend or Foe? Opposite Functions in Neurons and Glial Cells. *Int J Mol Sci.* 2024;25(21):11353. Published 2024 Oct 22. doi:10.3390/ijms252111353
112. Kametani F, Hasegawa M. Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Front Neurosci.* 2018;12:25. Published 2018 Jan 30. doi:10.3389/fnins.2018.00025
113. Kapasi A, DeCarli C, Schneider JA. Impact of multiple pathologies on the threshold for clinically overt dementia. *Acta Neuropathol.* 2017;134(2):171-186. doi:10.1007/s00401-017-1717-7
114. Karanth S, Nelson PT, Katsumata Y, et al. Prevalence and Clinical Phenotype of Quadruple Misfolded Proteins in Older Adults. *JAMA Neurol.* 2020;77(10):1299-1307. doi:10.1001/jamaneurol.2020.1741
115. Karikari TK, Ashton NJ, Brinkmalm G, et al. Blood phospho-tau in Alzheimer disease: analysis, interpretation, and clinical utility. *Nat Rev Neurol.* 2022;18(7):400-418. doi:10.1038/s41582-022-00665-2
116. Keren-Shaul H, Spinrad A, Weiner A, et al. A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell.* 2017;169(7):1276-1290.e17. doi:10.1016/j.cell.2017.05.018

117. Kesidou E, Lagoudaki R, Touloumi O, Poulatsidou KN, Simeonidou C. Autophagy and neurodegenerative disorders. *Neural Regen Res.* 2013;8(24):2275-2283. doi:10.3969/j.issn.1673-5374.2013.24.007
118. Kim YJ, Kim SH, Park Y, et al. miR-16-5p is upregulated by amyloid β deposition in Alzheimer's disease models and induces neuronal cell apoptosis through direct targeting and suppression of BCL-2. *Exp Gerontol.* 2020;136:110954. doi:10.1016/j.exger.2020.110954
119. Kinney JW, Bemiller SM, Murtishaw AS, Leisgang AM, Salazar AM, Lamb BT. Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (N Y).* 2018;4:575-590. Published 2018 Sep 6. doi:10.1016/j.trci.2018.06.014
120. Kitazawa M, Yamasaki TR, LaFerla FM. Microglia as a potential bridge between the amyloid beta-peptide and tau. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1035:85-103. doi:10.1196/annals.1332.006
121. Kivimäki M, Walker KA, Pentti J, et al. Cognitive stimulation in the workplace, plasma proteins, and risk of dementia: three analyses of population cohort studies. *BMJ.* 2021;374:n1804. Published 2021 Aug 18. doi:10.1136/bmj.n1804
122. Knopman DS, Amieva H, Petersen RC, et al. Alzheimer disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2021;7(1):33. Published 2021 May 13. doi:10.1038/s41572-021-00269-y
123. Kudo W, Lee HP, Smith MA, Zhu X, Matsuyama S, Lee HG. Inhibition of Bax protects neuronal cells from oligomeric A β neurotoxicity. *Cell Death Dis.* 2012;3(5):e309. Published 2012 May 17. doi:10.1038/cddis.2012.43
124. Kumari S, Dhapola R, Reddy DH. Apoptosis in Alzheimer's disease: insight into the signaling pathways and therapeutic avenues. *Apoptosis.* 2023;28(7-8):943-957. doi:10.1007/s10495-023-01848-y
125. Kunkle BW, Grenier-Boley B, Sims R, et al. Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease identifies new risk loci and implicates A β , tau, immunity and lipid processing. *Nat Genet.* 2019;51(3):414-430. doi:10.1038/s41588-019-0358-2
126. Kunkle BW, Schmidt M, Klein HU, et al. Novel Alzheimer Disease Risk Loci and Pathways in African American Individuals Using the African Genome Resources Panel: A Meta-analysis. *JAMA Neurol.* 2021;78(1):102-113. doi:10.1001/jamaneurol.2020.3536
127. Kwakowsky A, Potapov K, Kim S, Peppercorn K, Tate WP, Ábrahám IM. Treatment of beta amyloid 1-42 (A β (1-42))-induced basal forebrain cholinergic damage by a non-classical estrogen signaling activator in vivo. *Sci Rep.* 2016;6:21101. Published 2016 Feb 16. doi:10.1038/srep21101

128. Lachance V, Wang Q, Sweet E, et al. Autophagy protein NRBF2 has reduced expression in Alzheimer's brains and modulates memory and amyloid-beta homeostasis in mice. *Mol Neurodegener.* 2019;14(1):43. Published 2019 Nov 27. doi:10.1186/s13024-019-0342-4
129. Lantero-Rodriguez J, Salvadó G, Snellman A, et al. Plasma N-terminal containing tau fragments (NTA-tau): a biomarker of tau deposition in Alzheimer's Disease. *Mol Neurodegener.* 2024;19(1):19. Published 2024 Feb 17. doi:10.1186/s13024-024-00707-x
130. Lee CJ, Evans J, Kim K, Chae H, Kim S. Determining the effect of DNA methylation on gene expression in cancer cells. *Methods Mol Biol.* 2014;1101:161-178. doi:10.1007/978-1-62703-721-1_9
131. Lei C, Yang C, Xia B, et al. Analysis of Tau Protein Expression in Predicting Pathological Complete Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Different Molecular Subtypes of Breast Cancer. *J Breast Cancer.* 2020;23(1):47-58. doi:10.4048/jbc.2020.23.e11
132. Leissring MA, Farris W, Chang AY, et al. Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. *Neuron.* 2003;40(6):1087-1093. doi:10.1016/s0896-6273(03)00787-6
133. Leng F, Edison P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here?. *Nat Rev Neurol.* 2021;17(3):157-172. doi:10.1038/s41582-020-00435-y
134. Leyh J, Paeschke S, Mages B, et al. Classification of Microglial Morphological Phenotypes Using Machine Learning. *Front Cell Neurosci.* 2021;15:701673. Published 2021 Jun 29. doi:10.3389/fncel.2021.701673
135. Li KX, Sun Q, Wei LL, Du GH, Huang X, Wang JK. ER α Gene Promoter Methylation in Cognitive Function and Quality of Life of Patients With Alzheimer Disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 2019;32(4):221-228. doi:10.1177/0891988719835325
136. Li XZ, Sui CY, Chen Q, Chen XP, Zhang H, Zhou XP. Upregulation of cell surface estrogen receptor alpha is associated with the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase activity and promotes autophagy maturation. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(8):8832-8841. Published 2015 Aug 1.
137. Liang T, Zhang Y, Wu S, Chen Q, Wang L. The Role of NLRP3 Inflammasome in Alzheimer's Disease and Potential Therapeutic Targets. *Front Pharmacol.* 2022;13:845185. Published 2022 Feb 16. doi:10.3389/fphar.2022.845185
138. Ling D, Salvaterra PM. A central role for autophagy in Alzheimer-type neurodegeneration. *Autophagy.* 2009;5(5):738-740. doi:10.4161/auto.5.5.8626

139. Liu E, Zhang Y, Wang JZ. Updates in Alzheimer's disease: from basic research to diagnosis and therapies. *Transl Neurodegener.* 2024;13(1):45. Published 2024 Sep 4. doi:10.1186/s40035-024-00432-x
140. Liu X, Jiao B, Shen L. The Epigenetics of Alzheimer's Disease: Factors and Therapeutic Implications. *Front Genet.* 2018;9:579. Published 2018 Nov 30. doi:10.3389/fgene.2018.00579
141. Livingston G, Huntley J, Liu KY, et al. Dementia prevention, intervention, and care: 2024 report of the Lancet standing Commission. *Lancet.* 2024;404(10452):572-628. doi:10.1016/S0140-6736(24)01296-0
142. Livingston G, Huntley J, Sommerlad A, et al. Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. *Lancet.* 2020;396(10248):413-446. doi:10.1016/S0140-6736(20)30367-6
143. Long Z, Chen J, Zhao Y, et al. Dynamic changes of autophagic flux induced by Abeta in the brain of postmortem Alzheimer's disease patients, animal models and cell models. *Aging (Albany NY).* 2020;12(11):10912-10930. doi:10.18632/aging.103305
144. Lopez-Lee C, Torres ERS, Carling G, Gan L. Mechanisms of sex differences in Alzheimer's disease. *Neuron.* 2024;112(8):1208-1221. doi:10.1016/j.neuron.2024.01.024
145. Lozupone M, Dibello V, Sardone R, et al. The development of peptide- and oligonucleotide-based drugs to prevent the formation of abnormal tau in tauopathies. *Expert Opin Drug Discov.* 2023;18(5):515-526. doi:10.1080/17460441.2023.2200245
146. Lucin KM, O'Brien CE, Bieri G, et al. Microglial beclin 1 regulates retromer trafficking and phagocytosis and is impaired in Alzheimer's disease. *Neuron.* 2013;79(5):873-886. doi:10.1016/j.neuron.2013.06.046
147. Lyman M, Lloyd DG, Ji X, Vizcaychipi MP, Ma D. Neuroinflammation: the role and consequences. *Neurosci Res.* 2014;79:1-12. doi:10.1016/j.neures.2013.10.004
148. Ma ZQ, Santagati S, Patrone C, Pollio G, Vegeto E, Maggi A. Insulin-like growth factors activate estrogen receptor to control the growth and differentiation of the human neuroblastoma cell line SK-ER3. *Mol Endocrinol.* 1994;8(7):910-918. doi:10.1210/mend.8.7.7984152
149. MacGibbon GA, Lawlor PA, Sirimanne ES, et al. Bax expression in mammalian neurons undergoing apoptosis, and in Alzheimer's disease hippocampus. *Brain Res.* 1997;750(1-2):223-234. doi:10.1016/s0006-8993(96)01351-0
150. Madak-Erdogan Z, Band S, Zhao YC, et al. Free Fatty Acids Rewire Cancer Metabolism in Obesity-Associated Breast Cancer via Estrogen Receptor and mTOR Signaling. *Cancer Res.* 2019;79(10):2494-2510. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-2849

151. Madak-Erdogan Z, Kim SH, Gong P, et al. Design of pathway preferential estrogens that provide beneficial metabolic and vascular effects without stimulating reproductive tissues. *Sci Signal.* 2016;9(429):ra53. Published 2016 May 24. doi:10.1126/scisignal.aad8170
152. Mahady L, Nadeem M, Malek-Ahmadi M, Chen K, Perez SE, Mufson EJ. Frontal Cortex Epigenetic Dysregulation During the Progression of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2018;62(1):115-131. doi:10.3233/JAD-171032
153. Matsui T, Ingelsson M, Fukumoto H, et al. Expression of APP pathway mRNAs and proteins in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 2007;1161:116-123. doi:10.1016/j.brainres.2007.05.050
154. Matsui T, Ramasamy K, Ingelsson M, et al. Coordinated expression of caspase 8, 3 and 7 mRNA in temporal cortex of Alzheimer disease: relationship to formic acid extractable abeta42 levels. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006;65(5):508-515. doi:10.1097/01.jnen.0000229238.05748.12
155. Matyi JM, Rattinger GB, Schwartz S, Buhusi M, Tschanz JT. Lifetime estrogen exposure and cognition in late life: the Cache County Study. *Menopause.* 2019;26(12):1366-1374. doi:10.1097/GME.0000000000001405
156. Mazure NM, Pouyssegur J. Hypoxia-induced autophagy: cell death or cell survival?. *Curr Opin Cell Biol.* 2010;22(2):177-180. doi:10.1016/j.ceb.2009.11.015
157. Mendez P, Garcia-Segura LM. Phosphatidylinositol 3-kinase and glycogen synthase kinase 3 regulate estrogen receptor-mediated transcription in neuronal cells. *Endocrinology.* 2006;147(6):3027-3039. doi:10.1210/en.2005-1224
158. Messalli EM, Scaffa C. Long-term safety and efficacy of raloxifene in the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis: an update. *Int J Womens Health.* 2010;1:11-20. Published 2010 Aug 9. doi:10.2147/ijwh.s3894
159. Messori L, Camarri M, Ferraro T, Gabbiani C, Franceschini D. Promising in Vitro anti-Alzheimer Properties for a Ruthenium(III) Complex. *ACS Med Chem Lett.* 2013;4(3):329-332. Published 2013 Feb 13. doi:10.1021/ml3003567
160. Monteiro C, Toth B, Brunstein F, et al. Randomized Phase II Study of the Safety and Efficacy of Semorinemab in Participants With Mild-to-Moderate Alzheimer Disease: Lauriet. *Neurology.* 2023;101(14):e1391-e1401. doi:10.1212/WNL.0000000000207663
161. Morris G, Talaulikar V. Hormone replacement therapy in women with history of thrombosis or a thrombophilia. *Post Reprod Health.* 2023;29(1):33-41. doi:10.1177/20533691221148036

162. Muzio L, Viotti A, Martino G. Microglia in Neuroinflammation and Neurodegeneration: From Understanding to Therapy. *Front Neurosci.* 2021;15:742065. Published 2021 Sep 24. doi:10.3389/fnins.2021.742065
163. NFZ o zdrowiu. Choroba Alzheimera i choroby pokrewne <https://ezdrowie.gov.pl/portal/home/badania-i-dane/zdrowe-dane/raporty/nfz-o-zdrowiu-choroba-alzheimera-i-choroby-pokrewne>
164. Nikolac Perkovic M, Videtic Paska A, Konjevod M, et al. Epigenetics of Alzheimer's Disease. *Biomolecules.* 2021;11(2):195. Published 2021 Jan 30. doi:10.3390/biom11020195
165. Nilsen J, Chen S, Irwin RW, Iwamoto S, Brinton RD. Estrogen protects neuronal cells from amyloid beta-induced apoptosis via regulation of mitochondrial proteins and function. *BMC Neurosci.* 2006;7:74. Published 2006 Nov 3. doi:10.1186/1471-2202-7-74
166. Nixon RA, Wegiel J, Kumar A, et al. Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005;64(2):113-122. doi:10.1093/jnen/64.2.113
167. Nixon RA. The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat Med.* 2013;19(8):983-997. doi:10.1038/nm.3232
168. Nunes D, Loureiro JA, Pereira MC. Drug Delivery Systems as a Strategy to Improve the Efficacy of FDA-Approved Alzheimer's Drugs. *Pharmaceutics.* 2022;14(11):2296. Published 2022 Oct 26. doi:10.3390/pharmaceutics14112296
169. O'Bryhim BE, Apte RS, Kung N, Coble D, Van Stavern GP. Association of Preclinical Alzheimer Disease With Optical Coherence Tomographic Angiography Findings. *JAMA Ophthalmol.* 2018;136(11):1242-1248. doi:10.1001/jamaophthalmol.2018.3556
170. Ohtsuki T, Ruetzler CA, Tasaki K, Hallenbeck JM. Interleukin-1 mediates induction of tolerance to global ischemia in gerbil hippocampal CA1 neurons. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996;16(6):1137-1142. doi:10.1097/00004647-199611000-00007
171. O'Lone R, Frith MC, Karlsson EK, Hansen U. Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol Endocrinol.* 2004;18(8):1859-1875. doi:10.1210/me.2003-0044
172. Oveisgharan S, Yang J, Yu L, et al. Estrogen Receptor Genes, Cognitive Decline, and Alzheimer Disease. *Neurology.* 2023;100(14):e1474-e1487. doi:10.1212/WNL.0000000000206833
173. Overk CR, Lu PY, Wang YT, et al. Effects of aromatase inhibition versus gonadectomy on hippocampal complex amyloid pathology in triple transgenic mice. *Neurobiol Dis.* 2012;45(1):479-487. doi:10.1016/j.nbd.2011.08.035

174. Pan XD, Zhu YG, Lin N, et al. Microglial phagocytosis induced by fibrillar β -amyloid is attenuated by oligomeric β -amyloid: implications for Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 2011;6:45. Published 2011 Jun 30. doi:10.1186/1750-1326-6-45
175. Paradis E, Douillard H, Koutroumanis M, Goodyer C, LeBlanc A. Amyloid beta peptide of Alzheimer's disease downregulates Bcl-2 and upregulates bax expression in human neurons. *J Neurosci.* 1996;16(23):7533-7539. doi:10.1523/JNEUROSCI.16-23-07533.1996
176. Park SE, Sapkota K, Kim S, Kim H, Kim SJ. Kaempferol acts through mitogen-activated protein kinases and protein kinase B/AKT to elicit protection in a model of neuroinflammation in BV2 microglial cells. *Br J Pharmacol.* 2011;164(3):1008-1025. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01389.x
177. Pascoal TA, Therriault J, Benedet AL, et al. 18F-MK-6240 PET for early and late detection of neurofibrillary tangles. *Brain.* 2020;143(9):2818-2830. doi:10.1093/brain/awaa180
178. Pereira M, Cruz MT, Fortuna A, Bicker J. Restoring the epigenome in Alzheimer's disease: advancing HDAC inhibitors as therapeutic agents. *Drug Discov Today.* 2024;29(7):104052. doi:10.1016/j.drudis.2024.104052
179. Persichilli Ch, Hill SE, Mast J, Muschol M. Does Thioflavin-T Detect Oligomers Formed During Amyloid Fibril Assembly. *Biophysical Journal.* 2011, Volume 100, Issue 3, 538a
180. Phipps AJ, Vickers JC, Taberlay PC, Woodhouse A. Neurofilament-labeled pyramidal neurons and astrocytes are deficient in DNA methylation marks in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2016;45:30-42. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2016.05.003
181. Piccinini AM, Midwood KS. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:672395. doi:10.1155/2010/672395
182. Pickford F, Masliah E, Britschgi M, et al. The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice. *J Clin Invest.* 2008;118(6):2190-2199. doi:10.1172/JCI33585
183. Pietrzak BA, Wnuk A, Przepiórska K, Łach A, Kajta M. Posttreatment with Ospemifene Attenuates Hypoxia- and Ischemia-Induced Apoptosis in Primary Neuronal Cells via Selective Modulation of Estrogen Receptors. *Neurotox Res.* 2023;41(4):362-379. doi:10.1007/s12640-023-00644-5
184. Pietrzak-Wawrzyńska BA, Wnuk A, Przepiórska-Drońska K, Łach A, Kajta M. Posttreatment with PaPE-1 Protects from A β -Induced Neurodegeneration Through Inhibiting the Expression of Alzheimer's Disease-Related Genes and Apoptosis Process

- That Involves Enhanced DNA Methylation of Specific Genes. *Mol Neurobiol.* 2024;61(7):4130-4145. doi:10.1007/s12035-023-03819-5
185. Pietrzak-Wawrzyńska BA, Wnuk A, Przepiórska-Drońska K, Łach A, Kajta M. Non-nuclear Estrogen Receptor Signaling as a Promising Therapeutic Target to Reverse Alzheimer's Disease-related Autophagy Deficits and Upregulate the Membrane ESR1 and ESR2 Which Involves DNA Methylation-dependent Mechanisms. *J Mol Biol.* 2025;437(7):168982. doi:10.1016/j.jmb.2025.168982
 186. Pirooznia SK, Sarthi J, Johnson AA, et al. Tip60 HAT activity mediates APP induced lethality and apoptotic cell death in the CNS of a Drosophila Alzheimer's disease model. *PLoS One.* 2012;7(7):e41776. doi:10.1371/journal.pone.0041776
 187. Prashad S, Gopal PP. RNA-binding proteins in neurological development and disease. *RNA Biol.* 2021;18(7):972-987. doi:10.1080/15476286.2020.1809186
 188. Qiu J, Bosch MA, Tobias SC, et al. Rapid signaling of estrogen in hypothalamic neurons involves a novel G-protein-coupled estrogen receptor that activates protein kinase C. *J Neurosci.* 2003;23(29):9529-9540. doi:10.1523/JNEUROSCI.23-29-09529.2003
 189. Raghavan NS, Dumitrescu L, Mormino E, et al. Association Between Common Variants in RBFOX1, an RNA-Binding Protein, and Brain Amyloidosis in Early and Preclinical Alzheimer Disease. *JAMA Neurol.* 2020;77(10):1288-1298. doi:10.1001/jamaneurol.2020.1760
 190. Rajan KB, Weuve J, Barnes LL, McAninch EA, Wilson RS, Evans DA. Population estimate of people with clinical Alzheimer's disease and mild cognitive impairment in the United States (2020-2060). *Alzheimers Dement.* 2021;17(12):1966-1975. doi:10.1002/alz.12362
 191. Rajasekhar K, Chakrabarti M, Govindaraju T. Function and toxicity of amyloid beta and recent therapeutic interventions targeting amyloid beta in Alzheimer's disease. *Chem Commun (Camb).* 2015;51(70):13434-13450. doi:10.1039/c5cc05264e
 192. Ramírez CM, González M, Díaz M, et al. VDAC and ERalpha interaction in caveolae from human cortex is altered in Alzheimer's disease. *Mol Cell Neurosci.* 2009;42(3):172-183. doi:10.1016/j.mcn.2009.07.001
 193. Ransohoff RM. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist?. *Nat Neurosci.* 2016;19(8):987-991. doi:10.1038/nn.4338
 194. Rasmussen LT, de Labio RW, Dos Santos MP, et al. Changes in Expression of Key Genes in Alzheimer's Disease: A Specific Brain Tissue Change. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2024;79(5):glae023. doi:10.1093/gerona/glae023

195. Rasoolijazi H, Azad N, Joghataei MT, Kerdari M, Nikbakht F, Soleimani M. The protective role of carnosic acid against beta-amyloid toxicity in rats. *ScientificWorldJournal*. 2013;2013:917082. Published 2013 Oct 24. doi:10.1155/2013/917082
196. Ren XQ, Huang X, Xing SY, et al. Neuroprotective effects of novel compound FMDB on cognition, neurogenesis and apoptosis in APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurochem Int*. 2023;165:105510. doi:10.1016/j.neuint.2023.105510
197. Ricobaraza A, Cuadrado-Tejedor M, Pérez-Mediavilla A, Frechilla D, Del Río J, García-Osta A. Phenylbutyrate ameliorates cognitive deficit and reduces tau pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Neuropsychopharmacology*. 2009;34(7):1721-1732. doi:10.1038/npp.2008.229
198. Rishabh, Rohilla M, Bansal S, et al. Estrogen signalling and Alzheimer's disease: Decoding molecular mechanisms for therapeutic breakthrough. *Eur J Neurosci*. 2024;60(1):3466-3490. doi:10.1111/ejn.16360
199. Roberts RO, Christianson TJ, Kremers WK, et al. Association Between Olfactory Dysfunction and Amnesic Mild Cognitive Impairment and Alzheimer Disease Dementia. *JAMA Neurol*. 2016;73(1):93-101. doi:10.1001/jamaneurol.2015.2952
200. Robinson DM, Keating GM. Memantine: a review of its use in Alzheimer's disease. *Drugs*. 2006;66(11):1515-1534. doi:10.2165/00003495-200666110-00015
201. Rohn TT, Head E, Nesse WH, Cotman CW, Cribbs DH. Activation of caspase-8 in the Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Dis*. 2001;8(6):1006-1016. doi:10.1006/nbdi.2001.0449
202. Rohn TT, Rissman RA, Davis MC, Kim YE, Cotman CW, Head E. Caspase-9 activation and caspase cleavage of tau in the Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Dis*. 2002;11(2):341-354. doi:10.1006/nbdi.2002.0549
203. Rohn TT, Wirawan E, Brown RJ, Harris JR, Masliah E, Vandenabeele P. Depletion of Beclin-1 due to proteolytic cleavage by caspases in the Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Dis*. 2011;43(1):68-78. doi:10.1016/j.nbd.2010.11.003
204. Ronda AC, Buitrago C, Boland R. Role of estrogen receptors, PKC and Src in ERK2 and p38 MAPK signaling triggered by 17 β -estradiol in skeletal muscle cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010;122(4):287-294. doi:10.1016/j.jsbmb.2010.05.002
205. Rzemieniec J, Litwa E, Wnuk A, Lason W, Kajta M. Bazedoxifene and raloxifene protect neocortical neurons undergoing hypoxia via targeting ER α and PPAR- γ . *Mol Cell Endocrinol*. 2018;461:64-78. doi:10.1016/j.mce.2017.08.014

206. Safe S, Kim K. Non-classical genomic estrogen receptor (ER)/specificity protein and ER/activating protein-1 signaling pathways. *J Mol Endocrinol.* 2008;41(5):263-275. doi:10.1677/JME-08-0103
207. Salvadores N, Moreno-Gonzalez I, Gamez N, et al. A β oligomers trigger necroptosis-mediated neurodegeneration via microglia activation in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun.* 2022;10(1):31. Published 2022 Mar 9. doi:10.1186/s40478-022-01332-9
208. Sanchez-Varo R, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, et al. Abnormal accumulation of autophagic vesicles correlates with axonal and synaptic pathology in young Alzheimer's mice hippocampus. *Acta Neuropathol.* 2012;123(1):53-70. doi:10.1007/s00401-011-0896-x
209. Sárvári M, Hrabovszky E, Kalló I, et al. Menopause leads to elevated expression of macrophage-associated genes in the aging frontal cortex: rat and human studies identify strikingly similar changes. *J Neuroinflammation.* 2012;9:264. Published 2012 Dec 3. doi:10.1186/1742-2094-9-264
210. Sato K, Takayama KI, Inoue S. Expression and function of estrogen receptors and estrogen-related receptors in the brain and their association with Alzheimer's disease. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2023;14:1220150. Published 2023 Jul 4. doi:10.3389/fendo.2023.1220150
211. Satou T, Cummings BJ, Cotman CW. Immunoreactivity for Bcl-2 protein within neurons in the Alzheimer's disease brain increases with disease severity. *Brain Res.* 1995;697(1-2):35-43. doi:10.1016/0006-8993(95)00748-f
212. Schindler SE, Bollinger JG, Ovod V, et al. High-precision plasma β -amyloid 42/40 predicts current and future brain amyloidosis. *Neurology.* 2019;93(17):e1647-e1659. doi:10.1212/WNL.00000000000008081
213. Schmidt C, Schneble-Löhnert N, Lajqi T, Wetzker R, Müller JP, Bauer R. PI3K γ Mediates Microglial Proliferation and Cell Viability via ROS. *Cells.* 2021;10(10):2534. Published 2021 Sep 24. doi:10.3390/cells10102534
214. Scott E, Zhang QG, Wang R, Vadlamudi R, Brann D. Estrogen neuroprotection and the critical period hypothesis. *Front Neuroendocrinol.* 2012;33(1):85-104. doi:10.1016/j.yfrne.2011.10.001
215. Selvaraj UM, Zuurbier KR, Whoolery CW, et al. Selective Nonnuclear Estrogen Receptor Activation Decreases Stroke Severity and Promotes Functional Recovery in Female Mice. *Endocrinology.* 2018;159(11):3848-3859. doi:10.1210/en.2018-00600
216. Sherwin BB. Estrogen and cognitive functioning in women. *Endocr Rev.* 2003;24(2):133-151. doi:10.1210/er.2001-0016

217. Shi L, Chen SJ, Ma MY, et al. Sleep disturbances increase the risk of dementia: A systematic review and meta-analysis. *Sleep Med Rev.* 2018;40:4-16. doi:10.1016/j.smrv.2017.06.010
218. Shvetcov A, Ruitenberg MJ, Delerue F, Gold WA, Brown DA, Finney CA. The neuroprotective effects of estrogen and estrogenic compounds in spinal cord injury. *Neurosci Biobehav Rev.* 2023;146:105074. doi:10.1016/j.neubiorev.2023.105074
219. Sims JR, Zimmer JA, Evans CD, et al. Donanemab in Early Symptomatic Alzheimer Disease: The TRAILBLAZER-ALZ 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2023;330(6):512-527. doi:10.1001/jama.2023.13239
220. Singh AK, Bissoyi A, Kashyap MP, Patra PK, Rizvi SI. Autophagy Activation Alleviates Amyloid- β -Induced Oxidative Stress, Apoptosis and Neurotoxicity in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Neurotox Res.* 2017;32(3):351-361. doi:10.1007/s12640-017-9746-5
221. Singh P, Paramanik V. Neuromodulating roles of estrogen and phytoestrogens in cognitive therapeutics through epigenetic modifications during aging. *Front Aging Neurosci.* 2022;14:945076. Published 2022 Aug 3. doi:10.3389/fnagi.2022.945076
222. Sirisi S, Sánchez-Aced É, Belbin O, Lleó A. APP dyshomeostasis in the pathogenesis of Alzheimer's disease: implications for current drug targets. *Alzheimers Res Ther.* 2024;16(1):144. Published 2024 Jun 29. doi:10.1186/s13195-024-01504-w
223. Skillbäck T, Blennow K, Zetterberg H, et al. Slowing gait speed precedes cognitive decline by several years. *Alzheimers Dement.* 2022;18(9):1667-1676. doi:10.1002/alz.12537
224. Smilansky A, Dangoor L, Nakdimon I, Ben-Hail D, Mizrahi D, Shoshan-Barmatz V. The Voltage-dependent Anion Channel 1 Mediates Amyloid β Toxicity and Represents a Potential Target for Alzheimer Disease Therapy. *J Biol Chem.* 2015;290(52):30670-30683. doi:10.1074/jbc.M115.691493
225. Smith JA, Das A, Butler JT, Ray SK, Banik NL. Estrogen or estrogen receptor agonist inhibits lipopolysaccharide induced microglial activation and death. *Neurochem Res.* 2011;36(9):1587-1593. doi:10.1007/s11064-010-0336-7
226. Spence RD, Hamby ME, Umeda E, et al. Neuroprotection mediated through estrogen receptor- α in astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(21):8867-8872. doi:10.1073/pnas.1103833108
227. Stevenson JS, Clifton L, Kuźma E, Littlejohns TJ. Speech-in-noise hearing impairment is associated with an increased risk of incident dementia in 82,039 UK Biobank participants. *Alzheimers Dement.* 2022;18(3):445-456. doi:10.1002/alz.12416

228. Stoccoro A, Coppedè F. Role of epigenetics in Alzheimer's disease pathogenesis. *Neurodegener Dis Manag*. 2018;8(3):181-193. doi:10.2217/nmt-2018-0004
229. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 2000;403(6765):41-45. doi:10.1038/47412
230. Su JH, Anderson AJ, Cribbs DH, et al. Fas and Fas ligand are associated with neuritic degeneration in the AD brain and participate in beta-amyloid-induced neuronal death. *Neurobiol Dis*. 2003;12(3):182-193. doi:10.1016/s0969-9961(02)00019-0
231. Su JH, Deng G, Cotman CW. Bax protein expression is increased in Alzheimer's brain: correlations with DNA damage, Bcl-2 expression, and brain pathology. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1997;56(1):86-93. doi:10.1097/00005072-199701000-00009
232. Su JH, Satou T, Anderson AJ, Cotman CW. Up-regulation of Bcl-2 is associated with neuronal DNA damage in Alzheimer's disease. *Neuroreport*. 1996;7(2):437-440. doi:10.1097/00001756-199601310-00015
233. Sun E, Motolani A, Campos L, Lu T. The Pivotal Role of NF-kB in the Pathogenesis and Therapeutics of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*. 2022;23(16):8972. Published 2022 Aug 11. doi:10.3390/ijms23168972
234. Sun Y, Zhao Y, Hu K, et al. Distinct spatiotemporal subtypes of amyloid deposition are associated with diverging disease profiles in cognitively normal and mild cognitive impairment individuals. *Transl Psychiatry*. 2023;13(1):35. Published 2023 Feb 2. doi:10.1038/s41398-023-02328-2
235. Tang MX, Jacobs D, Stern Y, et al. Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. *Lancet*. 1996;348(9025):429-432. doi:10.1016/S0140-6736(96)03356-9
236. Teng E, Manser PT, Pickthorn K, et al. Safety and Efficacy of Semorinemab in Individuals With Prodromal to Mild Alzheimer Disease: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol*. 2022;79(8):758-767. doi:10.1001/jamaneurol.2022.1375
237. Thal DR, Rüb U, Orantes M, Braak H. Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology*. 2002;58(12):1791-1800. doi:10.1212/wnl.58.12.1791
238. Tian Q, Studenski SA, An Y, et al. Association of Combined Slow Gait and Low Activity Fragmentation With Later Onset of Cognitive Impairment. *JAMA Netw Open*. 2021;4(11):e2135168. Published 2021 Nov 1. doi:10.1001/jamanetworkopen.2021.35168
239. Todd L, Palazzo I, Suarez L, et al. Reactive microglia and IL1 β /IL-1R1-signaling mediate neuroprotection in excitotoxin-damaged mouse retina. *J Neuroinflammation*. 2019;16(1):118. Published 2019 Jun 6. doi:10.1186/s12974-019-1505-5

240. Tomassoni-Ardori F, Fulgenzi G, Becker J, et al. Rbfox1 up-regulation impairs BDNF-dependent hippocampal LTP by dysregulating TrkB isoform expression levels. *Elife*. 2019;8:e49673. Published 2019 Aug 20. doi:10.7554/eLife.49673
241. Troutwine BR, Hamid L, Lysaker CR, Strope TA, Wilkins HM. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. *Acta Pharm Sin B*. 2022;12(2):496-510. doi:10.1016/j.apsb.2021.10.002
242. Tumurbaatar B, Fracassi A, Scaduto P, et al. Preserved autophagy in cognitively intact non-demented individuals with Alzheimer's neuropathology. *Alzheimers Dement*. 2023;19(12):5355-5370. doi:10.1002/alz.13074
243. van Dyck CH, Swanson CJ, Aisen P, et al. Lecanemab in Early Alzheimer's Disease. *N Engl J Med*. 2023;388(1):9-21. doi:10.1056/NEJMoa2212948
244. Vegeto E, Belcredito S, Ghisletti S, Meda C, Etteri S, Maggi A. The endogenous estrogen status regulates microglia reactivity in animal models of neuroinflammation. *Endocrinology*. 2006;147(5):2263-2272. doi:10.1210/en.2005-1330
245. Vegeto E, Pollio G, Ciana P, Maggi A. Estrogen blocks inducible nitric oxide synthase accumulation in LPS-activated microglia cells. *Exp Gerontol*. 2000;35(9-10):1309-1316. doi:10.1016/s0531-5565(00)00161-3
246. Verma M, Vats A, Taneja V. Toxic species in amyloid disorders: Oligomers or mature fibrils. *Ann Indian Acad Neurol*. 2015;18(2):138-145. doi:10.4103/0972-2327.144284
247. Villa A, Vegeto E, Poletti A, Maggi A. Estrogens, Neuroinflammation, and Neurodegeneration. *Endocr Rev*. 2016;37(4):372-402. doi:10.1210/er.2016-1007
248. Villemagne VL, Chételat G. Neuroimaging biomarkers in Alzheimer's disease and other dementias. *Ageing Res Rev*. 2016;30:4-16. doi:10.1016/j.arr.2016.01.004
249. Vrtačnik P, Ostanek B, Mencej-Bedrač S, Marc J. The many faces of estrogen signaling. *Biochem Med (Zagreb)*. 2014;24(3):329-342. Published 2014 Oct 15. doi:10.11613/BM.2014.035
250. Wang C, Zhang F, Jiang S, et al. Estrogen receptor- α is localized to neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Sci Rep*. 2016;6:20352. Published 2016 Feb 3. doi:10.1038/srep20352
251. Wang J, Yu JT, Tan MS, Jiang T, Tan L. Epigenetic mechanisms in Alzheimer's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Ageing Res Rev*. 2013;12(4):1024-1041. doi:10.1016/j.arr.2013.05.003
252. Wang K, Deng QT, Liao N, et al. Tau expression correlated with breast cancer sensitivity to taxanes-based neoadjuvant chemotherapy. *Tumour Biol*. 2013;34(1):33-38. doi:10.1007/s13277-012-0507-z

253. Wang Y, Hernandez G, Mack WJ, Schneider LS, Yin F, Brinton RD. Retrospective analysis of phytoSERM for management of menopause-associated vasomotor symptoms and cognitive decline: a pilot study on pharmacogenomic effects of mitochondrial haplogroup and APOE genotype on therapeutic efficacy. *Menopause*. 2020;27(1):57-65. doi:10.1097/GME.0000000000001418
254. Wang YX, Xia ZH, Jiang X, et al. Genistein inhibits amyloid peptide 25-35-induced neuronal death by modulating estrogen receptors, choline acetyltransferase and glutamate receptors. *Arch Biochem Biophys*. 2020a;693:108561. doi:10.1016/j.abb.2020.108561
255. WHO 2023 *Dementia* <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia> odwiedzono 04.06.2024
256. WHO 2024 *Top 10 causes of death* <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> odwiedzono 04.06.2024
257. Wilcock GK, Gauthier S, Frisoni GB, et al. Potential of Low Dose Leuco-Methylthioninium Bis(Hydromethanesulphonate) (LMTM) Monotherapy for Treatment of Mild Alzheimer's Disease: Cohort Analysis as Modified Primary Outcome in a Phase III Clinical Trial. *J Alzheimers Dis*. 2018;61(1):435-457. doi:10.3233/JAD-170560
258. Wimo A, Gemma-Claire A, Malelenn G, et al. Alzheimer's Disease International, *World Alzheimer Report 2015* <https://www.alzint.org/resource/world-alzheimer-report-2015/>
259. Winkler JM, Fox HS. Transcriptome meta-analysis reveals a central role for sex steroids in the degeneration of hippocampal neurons in Alzheimer's disease. *BMC Syst Biol*. 2013;7:51. Published 2013 Jun 26. doi:10.1186/1752-0509-7-51
260. Wischik CM, Bentham P, Gauthier S, Miller S, Kook K, Schelter BO. Oral Tau Aggregation Inhibitor for Alzheimer's Disease: Design, Progress and Basis for Selection of the 16 mg/day Dose in a Phase 3, Randomized, Placebo-Controlled Trial of Hydromethylthionine Mesylate. *J Prev Alzheimers Dis*. 2022;9(4):780-790. doi:10.14283/jpad.2022.63
261. Wise EA, Rosenberg PB, Lyketsos CG, Leoutsakos JM. Time course of neuropsychiatric symptoms and cognitive diagnosis in National Alzheimer's Coordinating Centers volunteers. *Alzheimers Dement (Amst)*. 2019;11:333-339. Published 2019 Apr 18. doi:10.1016/j.dadm.2019.02.006
262. Wnuk A, Kajta M. Steroid and Xenobiotic Receptor Signalling in Apoptosis and Autophagy of the Nervous System. *Int J Mol Sci*. 2017;18(11):2394. Published 2017 Nov 11. doi:10.3390/ijms18112394
263. Wnuk A, Przepiórska K, Pietrzak BA, Kajta M. Emerging Evidence on Membrane Estrogen Receptors as Novel Therapeutic Targets for Central Nervous System Pathologies. *Int J Mol Sci*. 2023;24(4):4043. Published 2023 Feb 17. doi:10.3390/ijms24044043

264. Wnuk A, Przepiórska K, Pietrzak BA, Kajta M. Posttreatment Strategy Against Hypoxia and Ischemia Based on Selective Targeting of Nonnuclear Estrogen Receptors with PaPE-1. *Neurotox Res.* 2021;39(6):2029-2041. doi:10.1007/s12640-021-00441-y
265. Wnuk A, Przepiórska K, Rzemieniec J, Pietrzak B, Kajta M. Selective Targeting of Non-nuclear Estrogen Receptors with PaPE-1 as a New Treatment Strategy for Alzheimer's Disease. *Neurotox Res.* 2020;38(4):957-966. doi:10.1007/s12640-020-00289-8
266. Xie L, Zhang N, Zhang Q, et al. Inflammatory factors and amyloid β -induced microglial polarization promote inflammatory crosstalk with astrocytes. *Aging (Albany NY).* 2020;12(22):22538-22549. doi:10.18632/aging.103663
267. Yaffe K, Krueger K, Cummings SR, et al. Effect of raloxifene on prevention of dementia and cognitive impairment in older women: the Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) randomized trial. *Am J Psychiatry.* 2005;162(4):683-690. doi:10.1176/appi.ajp.162.4.683
268. Yang DS, Kumar A, Stavrides P, et al. Neuronal apoptosis and autophagy cross talk in aging PS/APP mice, a model of Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 2008;173(3):665-681. doi:10.2353/ajpath.2008.071176
269. Yang L, Deng YT, Leng Y, et al. Depression, Depression Treatments, and Risk of Incident Dementia: A Prospective Cohort Study of 354,313 Participants. *Biol Psychiatry.* 2023;93(9):802-809. doi:10.1016/j.biopsych.2022.08.026
270. Yeap YJ, Kandiah N, Nizetic D, Lim KL. BACE2: A Promising Neuroprotective Candidate for Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2023;94(s1):S159-S171. doi:10.3233/JAD-220867
271. Yeo BSY, Song HJJMD, Toh EMS, et al. Association of Hearing Aids and Cochlear Implants With Cognitive Decline and Dementia: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Neurol.* 2023;80(2):134-141. doi:10.1001/jamaneurol.2022.4427
272. Yuan H, Jiang C, Zhao J, et al. Euxanthone Attenuates A β 1-42-Induced Oxidative Stress and Apoptosis by Triggering Autophagy. *J Mol Neurosci.* 2018;66(4):512-523. doi:10.1007/s12031-018-1175-2
273. Yue X, Lu M, Lancaster T, et al. Brain estrogen deficiency accelerates Abeta plaque formation in an Alzheimer's disease animal model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(52):19198-19203. doi:10.1073/pnas.0505203102
274. Zhang H, Karisetty BC, Bhatnagar A, et al. Tip60 protects against amyloid- β -induced transcriptomic alterations via different modes of action in early versus late stages of neurodegeneration. *Mol Cell Neurosci.* 2020;109:103570. doi:10.1016/j.mcn.2020.103570

275. Zhang J, Zhang Y, Wang J, Xia Y, Zhang J, Chen L. Recent advances in Alzheimer's disease: Mechanisms, clinical trials and new drug development strategies. *Signal Transduct Target Ther.* 2024;9(1):211. Published 2024 Aug 23. doi:10.1038/s41392-024-01911-3
276. Zhang Z, Yang X, Song YQ, Tu J. Autophagy in Alzheimer's disease pathogenesis: Therapeutic potential and future perspectives. *Ageing Res Rev.* 2021;72:101464. doi:10.1016/j.arr.2021.101464
277. Zhao L, Woody SK, Chhibber A. Estrogen receptor β in Alzheimer's disease: From mechanisms to therapeutics. *Ageing Res Rev.* 2015;24(Pt B):178-190. doi:10.1016/j.arr.2015.08.001
278. Zhao L. CD33 in Alzheimer's Disease - Biology, Pathogenesis, and Therapeutics: A Mini-Review. *Gerontology.* 2019;65(4):323-331. doi:10.1159/000492596
279. Zheng J, Tian N, Liu F, et al. A novel dephosphorylation targeting chimera selectively promoting tau removal in tauopathies. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6(1):269. Published 2021 Jul 14. doi:10.1038/s41392-021-00669-2
280. Zhou J, Qian S, Li H, et al. Predictive value of microtubule-associated protein Tau in patients with recurrent and metastatic breast cancer treated with taxane-containing palliative chemotherapy. *Tumour Biol.* 2015;36(5):3941-3947. doi:10.1007/s13277-015-3037-7
281. Zuo Q, Chen KL, Arredondo Eve A, et al. Pathway Preferential Estrogens Prevent Hepatosteatorsis Due to Ovariectomy and High-Fat Diets. *Nutrients.* 2021;13(10):3334. Published 2021 Sep 23. doi:10.3390/nu13103334

OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW



**Instytut Farmakologii
im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk**

mgr Bernadeta Pietrzak-Wawrzyńska
Pracownia Neurofarmakologii i Epigenetyki
Zakład Farmakologii Uzależnień
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja
Polska Akademia Nauk

Kraków 19.09.2025

Oświadczenie

Oświadczam, że w ramach publikacji:

1. Pietrzak-Wawrzyńska BA, Wnuk A, Przepiórska-Drońska K, Łach A, Kajta M. *Posttreatment with PaPE-1 Protects from A β -Induced Neurodegeneration Through Inhibiting the Expression of Alzheimer's Disease-Related Genes and Apoptosis Process That Involves Enhanced DNA Methylation of Specific Genes.* Mol Neurobiol. 2024;61(7):4130-4145. doi:10.1007/s12035-023-03819-5

byłam odpowiedzialna za prowadzenie hodowli komórkowych, a także planowanie, wykonanie i nadzorowanie eksperymentów. Co więcej, zajęłam się udoskonaleniem i charakterystyką modelu badawczego. Moje zadania obejmowały również przeprowadzenie analiz biochemicznych i molekularnych, przygotowanie analiz statystycznych oraz stworzenie figur ilustrujących wyniki. Ponadto byłam odpowiedzialna za przygotowanie manuskryptu i koordynowanie pracy nad jego ostateczną wersją, a także brałam udział w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów.

2. Pietrzak-Wawrzyńska BA, Wnuk A, Przepiórska-Drońska K, Łach A, Kajta M. *Non-nuclear Estrogen Receptor Signaling as a Promising Therapeutic Target to Reverse Alzheimer's Disease-related Autophagy Deficits and Upregulate the Membrane ESR1 and ESR2 Which Involves DNA Methylation-dependent Mechanisms.* J Mol Biol. 2025;437(7):168982. doi:10.1016/j.jmb.2025.168982

byłam odpowiedzialna za prowadzenie hodowli komórkowych, a także planowanie, wykonanie i nadzorowanie eksperymentów. Moje zadania obejmowały również przeprowadzenie analiz biochemicznych i molekularnych, przygotowanie analiz statystycznych oraz stworzenie figur ilustrujących wyniki. Ponadto byłam odpowiedzialna za przygotowanie manuskryptu i koordynowanie pracy nad jego ostateczną wersją, a także brałam udział w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów.

3. W ramach opisowej części pracy doktorskiej byłam odpowiedzialna prowadzenie hodowli komórkowych, a także planowanie, wykonanie i nadzorowanie eksperymentów. Moje zadania obejmowały również opracowanie modelu badawczego, przeprowadzenie analiz biochemicznych i molekularnych, przygotowanie analiz statystycznych oraz stworzenie figur ilustrujących wyniki. Ponadto byłam odpowiedzialna za opisanie i przedyskutowanie uzyskanych wyników.

Pietrzak-Wawrzyńska B......

mgr Bernadeta Pietrzak-Wawrzyńska



**Instytut Farmakologii
im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk**

prof. dr hab. Małgorzata Kajta
Pracownia Neurofarmakologii i Epigenetyki
Zakład Farmakologii Uzależnień
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja
Polska Akademia Nauk

Kraków 19.09.2025

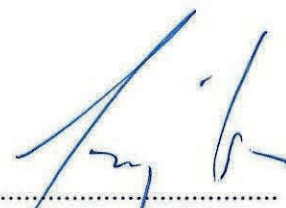
Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w pracach:

1. Pietrzak-Wawrzyńska BA, Wnuk A, Przepiórska-Drońska K, Łach A, Kajta M. *Posttreatment with PaPE-1 Protects from A β -Induced Neurodegeneration Through Inhibiting the Expression of Alzheimer's Disease-Related Genes and Apoptosis Process That Involves Enhanced DNA Methylation of Specific Genes.* Mol Neurobiol. 2024;61(7):4130-4145. doi:10.1007/s12035-023-03819-5
2. Pietrzak-Wawrzyńska BA, Wnuk A, Przepiórska-Drońska K, Łach A, Kajta M. *Non-nuclear Estrogen Receptor Signaling as a Promising Therapeutic Target to Reverse Alzheimer's Disease-related Autophagy Deficits and Upregulate the Membrane ESR1 and ESR2 Which Involves DNA Methylation-dependent Mechanisms.* J Mol Biol. 2025;437(7):168982. doi:10.1016/j.jmb.2025.168982

oraz opisowej części pracy doktorskiej polegał przede wszystkim na pozyskaniu finansowania na badania w oparciu o autorski projekt zawierający koncepcję badań, proponowane metody, hipotezy, cele i plan badań. Ponadto uczestniczyłam w zakładaniu pierwotnych hodowli mysich komórek neuronalnych, planowaniu doświadczeń i pisaniu manuskryptów, a także przygotowaniu odpowiedzi na recenzje i ostatecznej wersji publikacji. W obydwu wymienionych publikacjach pełnię rolę autora korespondującego.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszych publikacji oraz przedstawionych wyników w postępowaniu doktorskim Pani mgr Bernadety Pietrzak-Wawrzyńskiej i oświadczam, że nie zostaną one ponownie użyte w żadnym innym postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora lub doktora habilitowanego.



.....
prof. dr hab. Małgorzata Kajta



**Instytut Farmakologii
im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk**

dr Karolina Przepiórska-Drońska
Pracownia Neurofarmakologii i Epigenetyki
Zakład Farmakologii Uzależnień
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja
Polska Akademia Nauk

Kraków 19.09.2025

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w pracach:

1. Pietrzak-Wawrzyńska BA, Wnuk A, Przepiórska-Drońska K, Łach A, Kajta M. *Posttreatment with PaPE-1 Protects from A β -Induced Neurodegeneration Through Inhibiting the Expression of Alzheimer's Disease-Related Genes and Apoptosis Process That Involves Enhanced DNA Methylation of Specific Genes*. Mol Neurobiol. 2024;61(7):4130-4145. doi:10.1007/s12035-023-03819-5
2. Pietrzak-Wawrzyńska BA, Wnuk A, Przepiórska-Drońska K, Łach A, Kajta M. *Non-nuclear Estrogen Receptor Signaling as a Promising Therapeutic Target to Reverse Alzheimer's Disease-related Autophagy Deficits and Upregulate the Membrane ESR1 and ESR2 Which Involves DNA Methylation-dependent Mechanisms*. J Mol Biol. 2025;437(7):168982. doi:10.1016/j.jmb.2025.168982

oraz opisowej części pracy doktorskiej polegał na pomocy w prowadzeniu hodowli komórkowych oraz udziale w wykonaniu analiz biochemicznych i molekularnych.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszych publikacji oraz przedstawionych wyników w postępowaniu doktorskim Pani mgr Bernadety Pietrzak-Wawrzyńskiej i oświadczam, że nie zostaną one ponownie użyte w żadnym innym postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora lub doktora habilitowanego.


dr Karolina Przepiórska-Drońska



**Instytut Farmakologii
im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk**

dr hab. Agnieszka Wnuk
Zespół I
Zakład Farmakologii Uzależnień
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja
Polska Akademia Nauk

Kraków 19.09.2025

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w pracach:

1. Pietrzak-Wawrzyńska BA, Wnuk A, Przepiórska-Drońska K, Łach A, Kajta M. *Posttreatment with PaPE-1 Protects from A β -Induced Neurodegeneration Through Inhibiting the Expression of Alzheimer's Disease-Related Genes and Apoptosis Process That Involves Enhanced DNA Methylation of Specific Genes*. Mol Neurobiol. 2024;61(7):4130-4145. doi:10.1007/s12035-023-03819-5
2. Pietrzak-Wawrzyńska BA, Wnuk A, Przepiórska-Drońska K, Łach A, Kajta M. *Non-nuclear Estrogen Receptor Signaling as a Promising Therapeutic Target to Reverse Alzheimer's Disease-related Autophagy Deficits and Upregulate the Membrane ESR1 and ESR2 Which Involves DNA Methylation-dependent Mechanisms*. J Mol Biol. 2025;437(7):168982. doi:10.1016/j.jmb.2025.168982

oraz opisowej części pracy doktorskiej polegał na pomocy w planowaniu i przeprowadzaniu eksperymentów, wsparciu w wykonaniu analiz biochemicznych i molekularnych, a także statystycznych. Ponadto, uczestniczyłam w przygotowaniu manuskryptu i odpowiedzi na uwagi recenzentów.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszych publikacji oraz przedstawionych wyników w postępowaniu doktorskim Pani mgr Bernadety Pietrzak-Wawrzyńskiej i oświadczam, że nie zostaną one ponownie użyte w żadnym innym postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora lub doktora habilitowanego.

.....
dr hab. Agnieszka Wnuk



Instytut Farmakologii
im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk

mgr inż. Andrzej Łach
Zespół I
Zakład Farmakologii Uzależnień
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja
Polska Akademia Nauk

Kraków 19.09.2025

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w pracach:

1. Pietrzak-Wawrzyńska BA, Wnuk A, Przepiórska-Drońska K, Łach A, Kajta M. *Posttreatment with PaPE-1 Protects from A β -Induced Neurodegeneration Through Inhibiting the Expression of Alzheimer's Disease-Related Genes and Apoptosis Process That Involves Enhanced DNA Methylation of Specific Genes*. Mol Neurobiol. 2024;61(7):4130-4145. doi:10.1007/s12035-023-03819-5
2. Pietrzak-Wawrzyńska BA, Wnuk A, Przepiórska-Drońska K, Łach A, Kajta M. *Non-nuclear Estrogen Receptor Signaling as a Promising Therapeutic Target to Reverse Alzheimer's Disease-related Autophagy Deficits and Upregulate the Membrane ESR1 and ESR2 Which Involves DNA Methylation-dependent Mechanisms*. J Mol Biol. 2025;437(7):168982. doi:10.1016/j.jmb.2025.168982

oraz opisowej części pracy doktorskiej polegał na pomocy w prowadzeniu hodowli komórkowych i wykonaniu analiz biochemicznych.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszych publikacji oraz przedstawionych wyników w postępowaniu doktorskim Pani mgr Bernadety Pietrzak-Wawrzyńskiej i oświadczam, że nie zostaną one ponownie użyte w żadnym innym postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora lub doktora habilitowanego.

mgr inż. Andrzej Łach



Posttreatment with PaPE-1 Protects from A β -Induced Neurodegeneration Through Inhibiting the Expression of Alzheimer's Disease-Related Genes and Apoptosis Process That Involves Enhanced DNA Methylation of Specific Genes

Bernadeta A. Pietrzak-Wawrzyńska¹ · Agnieszka Wnuk¹ · Karolina Przepiórska-Drońska¹ · Andrzej Łach¹ · Małgorzata Kajta¹ 

Received: 12 July 2023 / Accepted: 19 November 2023 / Published online: 8 December 2023
© The Author(s) 2023

Abstract

Targeting the non-nuclear estrogen receptor (ER) signaling has been postulated as novel therapeutic strategy for central nervous system pathologies. Recently, we showed that newly designed PaPE-1 (Pathway Preferential Estrogen-1), which selectively activates ER non-nuclear signaling pathways, elicited neuroprotection in a cellular model of Alzheimer's disease (AD) when it was applied at the same time as amyloid- β (A β). Since delayed treatment reflects clinical settings better than cotreatment does, current basic study proposes a novel therapeutic approach for AD that relies on a posttreatment with PaPE-1. In this study, mouse neuronal cell cultures treated with preaggregated A β_{1-42} (10 μ M) showed the presence of extracellular A β_{1-42} , confirming the adequacy of the AD model used. We are the first to demonstrate that a 24-h delayed posttreatment with PaPE-1 decreased the degree of A β -induced neurodegeneration, restored neurite outgrowth, and inhibited the expression of AD-related genes, i.e., *Rbfox*, *Apoe*, *Bace2*, *App*, and *Ngrn*, except for *Chat*, which was stimulated. In addition, PaPE-1 elicited anti-apoptotic effects by inhibiting A β -induced caspase activities as well as attenuating apoptotic chromatin condensation, and in these ways, PaPE-1 prevented neuronal cell death. Posttreatment with PaPE-1 also downregulated the A β -affected mRNA expression of apoptosis-specific factors, such as *Bax*, *Gsk3b*, *Fas*, and *Fasl*, except for *Bcl2*, which was upregulated by PaPE-1. In parallel, PaPE-1 decreased the protein levels of BAX, FAS, and FASL, which were elevated in response to A β . PaPE-1 elicited a decrease in the BAX/BCL2 ratio that corresponds to increased methylation of the *Bax* gene. However, the PaPE-1-evoked *Bcl2* gene hypermethylation suggests other PaPE-1-dependent mechanisms to control A β -induced apoptosis.

Keywords Neuroprotection · Primary neocortical cell cultures · Non-nuclear estrogen receptor signaling · Caspases · Amyloid- β · Alzheimer's disease

Introduction

According to the World Health Organization, more than 55 million people suffer from dementia worldwide, and this number is predicted to increase by 10 million every year. Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia, accounting for 60–70% of all its cases. AD

is an age-related neurodegenerative disorder with characteristic progressive deterioration of memory and cognitive functions. Since it affects not only patients but also their relatives, i.e., unpaid caregivers, it is a serious economic problem in modern society. Molecular changes initiate AD long before clinical manifestation. These changes include extracellular amyloid- β (A β) plaques and intracellular neurofibrillary tangles along with synaptic and neural loss. A β peptides are derived from amyloid precursor protein (APP) following cleavage by β - and γ -secretases [1]. Then, the monomeric A β is secreted into the extracellular space, where it forms toxic oligomers and fibrils. The main mechanisms of A β toxicity involve cell membrane destruction, mitochondrial damage, Ca²⁺ homeostasis dysregulation, alteration of

✉ Małgorzata Kajta
kajta@if-pan.krakow.pl

¹ Laboratory of Neuropharmacology and Epigenetics,
Department of Pharmacology, Maj Institute
of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, Smetna
Street 12, 31–343 Krakow, Poland

receptor signaling, and aberrant activation of certain apoptotic factors [2, 3].

The loss of neurons is inversely related to patients' cognitive skills. Extensive neuronal loss in AD is attributed to apoptosis [4]. Apoptosis is a form of programmed cell death that eventually leads to the activation of apoptosis-specific cysteine-aspartic proteases, i.e., caspases. These enzymes can be divided into two categories: inducing (caspase-2, caspase-8, caspase-9, caspase-10, and caspase-12) and executive (caspase-3, caspase-6, and caspase-7) [5]. Extracellular and intracellular pathways can initiate apoptosis. The intracellular apoptotic pathway involves, among others, BCL2 and BAX, associated with the formation of pores in the mitochondrial membrane that cause cytochrome c release and caspase-9 activation [6]. The extracellular apoptotic pathway starts with the activation of death receptors by cognate ligands (e.g., FAS and FASL) and then leads to caspase-8 activation [7]. Inducing caspases (caspase-8 and caspase-9) activate executive caspase-3, which leads to cell death. Caspases are known to be engaged in AD pathology [8]. In addition to its role in apoptotic cell death, caspase-3 is also able to cleave both APP and tau [9–12] and induce tau hyperphosphorylation [13]. In the nervous system, caspases are also vital for a plethora of physiological functions, including but not limited to neural tube shaping, dendritic pruning, axon guidance, synaptogenesis, and maintenance of synaptic plasticity [14]. Caspase-8, caspase-9, and caspase-3 were also shown to be engaged in the neurite outgrowth process [15].

There is an urgent need to find novel pharmaceuticals that effectively target AD. Currently available pharmacological approaches are based on cholinesterase inhibition (donepezil, rivastigmine, and galantamine) and NMDA receptor antagonism (memantine) [16]. Although these drugs may help control some cognitive and behavioral symptoms, they do not alter disease progression. In addition, the Food and Drug Administration (FDA) has recently approved two new A β -targeting monoclonal antibodies, aducanumab and lecanemab, but their usefulness in clinical settings remains to be determined. Despite the fact that these pharmaceuticals may delay clinical progression of AD, their usage can also cause undesirable effects such as microhemorrhages and brain edema. None of the abovementioned drugs target apoptosis-related neuronal loss. Since direct caspase inhibitors are not able to distinguish between physiological and pathological caspase activation, more selective approaches are required [17]. Activation of estrogen receptors (ERs) in the nervous system has been repeatedly demonstrated to be anti-apoptotic as well as to positively impact neural plasticity and synapse formation [7]. ER signaling can be divided into nuclear and non-nuclear. In the nuclear signaling, ESR1/ER α and ESR2/ER β act as ligand-activated transcription factors. The non-nuclear signaling is often associated with activation of

membrane-associated ERs that can be divided into G protein-coupled receptors (GPCRs), which include GPER1, Gq-mER, and ER-X, and non-GPCR mER α and mER β . Many studies indicate that activation of nuclear ER signaling can lead to cardiovascular problems and hormonal-dependent cancers; for this reason, targeting non-nuclear ER signaling pathways, mainly via mER α and mER β , appears to be a much safer but still effective alternative [18]. Pathway preferential estrogen-1 (PaPE-1; (S)-5-(4-hydroxy-3,5-dimethyl-phenyl)-indan-1-ol) has been designed to preferentially activate ER non-genomic signaling without stimulating direct nuclear signaling [19].

Compared to estradiol, PaPE-1 has greatly lowered binding affinities to ER α and ER β and greatly increased dissociation rate from ER α [19]. Activation of the ER α by PaPE-1 lasts less than 1 min which is enough to initiate signaling cascades, but too short to evoke direct genomic effects [19]. PaPE-1 does not cause the recruitment of ER α or ERK2 to chromatin but stimulates the recruitment of RNA Pol II [19]. Moreover, in contrast to estradiol, ER α complexes with PaPE-1 do not bind SRC3 (steroid receptor coactivator 3) [19]. What is of importance, PaPE-1 activity is lost in ER α -knockout mice [19]. PaPE-1 selectively activates extranuclear-initiated ER-regulated genes, which was shown by *LRRC54* stimulation, but does not activate the nuclear-initiated ER gene target *PgR* [19]. In the MCF-7 cell line, PaPE-1 has been shown to selectively activate MAPK and mTOR signaling [19].

PaPE-1 has already been demonstrated to provide beneficial metabolic and vascular effects without stimulating reproductive tissues [19]. In addition, PaPE-1 administered before middle cerebral artery occlusion (MCAO) has been shown to attenuate stroke severity and neuroinflammation and promote functional recovery [20]. PaPE-1 has also been shown to be an effective neuroprotective agent in the posttreatment paradigm in hypoxic and ischemic models in vitro [21]. Our previous study demonstrated that cotreatment with PaPE-1 is a promising approach against AD, as shown in an in vitro model based on A β -induced neurotoxicity [22].

Since a posttreatment paradigm is the most relevant approach in AD treatment, the present study aims to identify the neuroprotective potential and mechanisms of action of PaPE-1 as a posttreatment therapy in an A β -based in vitro model of AD.

Materials and Methods

Materials

Phosphate-buffered saline (PBS) was obtained from Biomed Lublin (Lublin, Poland). Neurobasal medium and B27 were purchased from Gibco (Grand Island, NY, USA). Culture

plates for cell cultures were obtained from Techno Plastic Products AG (Trasadingen, Switzerland), Corning (Corning, NY, USA) and Ibidi (Gräfelfing, Germany). Fetal bovine serum (FBS), *L*-glutamine, dimethyl sulfoxide (DMSO), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate (CHAPS), ammonium persulfate, N,N,N',N'-tetramethylethane-1,2-diamine (TEMED), 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol (Trizma base), sodium deoxycholate, DL-dithiothreitol, poly-*L*-ornithine, (S)-5-(4-hydroxy-3,5-dimethyl-phenyl)-indian-1-ol (PaPE-1), Tween 20, radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA) and protease inhibitor cocktail, SP600125, and GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kits were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Amyloid- β was obtained from rPeptide (Watkinsville, GA, USA). The RNeasy Mini Kit, EpiTect MethyLight PCR Kit, and EpiTect Bisulfite Kit were obtained from Qiagen (Hilden, Germany). High-Capacity cDNA-Reverse Transcription Kit, Neurite Outgrowth Staining Kit, TaqMan Gene Expression Master Mix, and TaqMan probes for specific genes encoding *Hprt*, *Actb*, *Gapdh*, *Fas*, *Fasl*, *Bax*, *Bcl2*, *Gsk3b*, *Rbfox*, *Ache*, *Apoe*, *Chat*, *Bace1*, *Bace2*, *Mapt*, *App*, *Rcan1*, *Ide*, and *Ngrn* were obtained from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Sodium dodecyl sulfate (SDS), Bradford reagent, Laemmli sample buffer, and 0.5 M Tris–HCL buffer 4–15% Mini-PROTEAN TGX Precast Protein Gels were purchased from Bio-Rad Laboratories (Munich, Germany). The ROS-Glo™ H₂O₂ assay was obtained from Promega (Madison, WI, USA). JC-10 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit, Z-IETD-FMK, Z-LEHD-FMK, TDZD 8, and SB203580 were purchased from Abcam (Cambridge, UK). 2-Mercaptoethanol was obtained from Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Germany). Immobilon-P membranes were purchased from Millipore (Bedford, MA, USA). Fluoro-Jade C was obtained from Biosensis Pty Ltd. (Thebarton, Australia). Antibodies used for western blot and immunofluorescence staining were as follows: anti-GAPDH (MAB374), anti-BCL-2 (SAB5700155), and anti-MAP2 (M9942)-obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA); anti-amyloid β (bs-0107R)-purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA); and anti-BAX (SC-7480), anti-GSK3 β (sc-9166), anti-FAS (sc-74540), anti-FASL (sc-19681), and anti-MAP2 (sc-20172)-purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA).

Primary Neuronal Cell Culture

Primary neuronal cell cultures were established using Swiss CD1 mice obtained from Charles River Laboratory (Germany) as described previously [23, 24]. Cortices acquired from embryos were fragmented and incubated with 0.1% trypsin at 37 °C for 15 min. Next, the cells were

centrifuged for 5 min at 1500×*g* in medium with 10% FBS. The obtained neuronal cells were then seeded on multiwell plates coated with poly-*L*-ornithine (0.1 mg/ml) at a density of $\sim 2.0 \times 10^5$ and further cultured in Neurobasal medium with the addition of *L*-glutamine, B27, and an antibiotic cocktail containing penicillin and streptomycin. Cells were cultured for 7 days at 37 °C with humidified air with a CO₂ concentration of 5%. For the first 2 days, the cells were cultured with FBS added to the culture medium. All animals used in the research were maintained according to the principles of the Three Rs in compliance with European Union Legislation (Directive 2010/63/EU, amended by Regulation (EU) 2019/1010).

Treatment

Preparation of A β_{1-42} was conducted as previously described [22]. Non-specific aggregation of A β_{1-42} was negated using HFIP (hexafluoroisopropanol). Next, HFIP was removed under N₂ flux, and A β_{1-42} was dissolved using DMSO to prepare a stock solution, which was further dissolved in culture medium. The obtained solution of A β_{1-42} was then incubated overnight to induce specific aggregation and then used to treat the cell cultures. After 24-h treatment with preaggregated A β_{1-42} (10 μ M), PaPE-1 (at concentrations of 5 and 10 μ M) was applied for the following 6 h. To determine the contribution of apoptotic signaling, we applied Z-IETD-FMK (caspase-8 inhibitor; 40 μ M), Z-LEHD-FMK (caspase-9 inhibitor; 40 μ M), TDZD 8 (GSK3 β inhibitor; 1 μ M), SP600125 (JNK inhibitor; 1 μ M), and SB 203580 (p38 MAPK inhibitor; 1 μ M) to cells treated with A β . DMSO was used as a solvent for all compounds at concentrations not exceeding 0.1% in the culture medium.

Assessment of Caspase Activity

In this research, we assessed the activity of caspase-3, caspase-8, and caspase-9. The assessment procedure is identical for each of the enzymes, with the only difference being the substrate used and, consequently, the product of the reaction.

For caspase-3, the colorimetric substrate was Ac-DEVD-pNA (N-acetyl-asp-glu-val-asp-*p*-nitroanilide, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA), and the product was *p*-nitroanilide. For caspase-8, the substrate was Ac-VETD-AMC (Ac-val-glu-thr-asp-AMC), and the product was 7-amino-4-methylcoumarin. For caspase-9, the substrate was Ac-DL-Leu-DL-Glu-DL-His-DL-Asp-*p*NA, and the product is *p*-nitroanilide.

The activity of caspases was measured as described earlier [25]. Samples were first incubated with CAB (*Caspase Assay Buffer*) for 15 min at 4 °C and then with substrate specific for each caspase for 60 min at 37 °C. The

levels of caspase reaction products were measured with an Infinite M200PRO microplate reader (Tecan, Switzerland) at excitation = 400 nm and emission = 530 nm for caspase-8 activity measurement and absorbance = 405 nm for caspase-3 and caspase-9 activity measurements. The obtained data were analyzed with i-control software and normalized to the blank, and the final results are presented as a percentage of the control $\pm$ SEM.

Identification of Living Cells

In this experiment, living cells were identified via calcein AM staining as previously described by Kajta et al. [26]. First, the cells grown on glass cover slips were washed with 10 mM PBS and then incubated with 2 mM calcein AM/PBS solution at room temperature for 10 min. As described above, qualitative analysis was conducted using a Leica DM IL LED Inverted Microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) coupled with a CoolSnap camera (Vision Systems GmbH, Puchheim, Germany) with MetaMorph software (MetaMorph® Microscopy Automation & Image Analysis Software, Molecular Devices LLC, California, United States). Cells presenting bright green cytoplasm were considered living cells. In this case, the intensity of fluorescence was measured from entire photos using ImageJ software. The final results are presented as a percentage of the control $\pm$ SEM.

Identification of Apoptotic Cells

Detection of apoptotic cells was conducted with Hoechst-33342 staining after the initial experiment as described [27]. Cortical primary cells cultured on glass cover slips were washed with 10 mM phosphate-buffered saline (PBS) and incubated with Hoechst-33342 at a concentration of 0.6 mg/ml at room temperature for 5 min. Qualitative analysis was conducted using a Leica DM IL LED Inverted Microscope (Leica Microsystems, Wetzlar Germany) coupled with a CoolSnap camera (Vision Systems GmbH, Puchheim, Germany) with MetaMorph software (MetaMorph® Microscopy Automation & Image Analysis Software, Molecular Devices LLC, California, United States). Bright blue stained nuclei with condensed chromatin are widely recognized as a symptom of apoptosis. Fluorescence intensity was measured based on singular nuclei using ImageJ software. The final results are presented as a percentage of the control $\pm$ SEM.

mRNA Analysis Using qPCR

Total RNA from primary cell cultures was obtained using reagents from an RNeasy Mini Kit (Qiagen, USA) in accordance with the manufacturer's protocol, as previously

described by Wnuk et al. [28, 29]. The RNA was eluted in 40 μ l of RNase-free water. Then, the amount of RNA was assessed using a NanoDrop spectrophotometer at 260 nm, and the 260/280 ratio was obtained (ND/1000UV/VIS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A A260/A280 ratio of $\sim$ 2.0 is considered to be an honest indicator of pure RNA. Subsequently, after isolation, the RNA extract was reverse transcribed to avoid freeze–thaw cycles. Reverse transcription was conducted with a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit in accordance with the manufacturer's protocol using a CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The collected cDNA was stored at -20°C overnight and subsequently subjected to quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Amplification of the cDNA was conducted using FastStart Universal Probe Master containing TaqMan Gene Expression Assays specific for *Bax*, *Bcl2*, *Gsk3b*, *Fas*, *Fasl*, *Rbfox*, *Ache*, *Apoe*, *Chat*, *Bace1*, *Bace2*, *Mapt*, *App*, *Rcan1*, *Ide*, *Ngrn*, *Hprt1*, *Gapdh*, and *Actb*. In amplification, the following substances were used: a mixture containing 10 μ l of FastStart Universal Probe Master, 1 μ l of cDNA as template, 1 μ l of the TaqMan Gene Expression Assay mix, and 8 μ l of RNase-free water in a total volume of 20 μ l. qPCR was conducted using a CFX96 Real-Time system (Bio-Rad, USA), and the procedure consisted of intervals of varying temperatures as follows: 2 min at 50°C , 10 min at 95°C , 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C . The obtained data were analyzed with the delta delta Ct method. The reference gene was chosen with the use of the following algorithms: geNorm, NormFinder, BestKeeper, and delta Ct; the three algorithms recommended hypoxanthine–guanine phosphoribosyltransferase (*Hprt1*).

Western Blot Analysis

Once the experiment was concluded, neocortical cells underwent lysis in RIPA buffer with the addition of protease inhibitor. After lysis, the cells were sonicated to obtain homogenous solution, which was subsequently centrifuged at $15,000\times g$ for 20 min at 4°C . To assess the protein concentration, a Bradford assay was conducted using Bradford reagent and bovine serum albumin as standards. Samples were then reconstituted and denatured in Laemmli sample buffer with β -mercaptoethanol. Subsequently, the samples underwent electrophoresis in 15-well [4–15%] SDS polyacrylamide gels (Bio-Rad, USA), and then, proteins were electrotransferred to PVDF membranes with the Bio-Rad Mini Trans-Blot apparatus as previously described [30, 31]. To block the non-specific binding sites, the PVDF membranes were incubated for 2 h with a solution of dried milk (5%) and Tween-20 (0.2%) in 0.02 M Tris-buffered saline (TBS). Next, the membranes were incubated overnight with primary antibodies at 4°C .

Primary antibodies were diluted using solution of Tween-20 and TBS in proportions as follows: anti-GAPDH mouse monoclonal antibody (diluted 1:3500), anti-BCL-2 rabbit polyclonal antibody (diluted 1:100), anti-BAX mouse monoclonal antibody (diluted 1:100), anti-GSK3 β rabbit polyclonal antibody (diluted 1:700), anti-FAS mouse monoclonal antibody (diluted 1:80), and anti-FASL mouse monoclonal antibody (diluted 1:80). Next, the membranes were washed with Tween-20/TBS solution and incubated for 1 h with secondary antibodies coupled with horseradish peroxidase diluted in Tween-20/TBS solution 1:100 and 1:3500. Detection of the chemiluminescent signal was conducted employing BM (Chemiluminescence Blotting Substrate) and visualization using a Luminescence Image Analyzer Fuji-Las 4000 (Fuji, Japan). The intensity of the obtained bands was quantified with the MultiGauge V3.0 program (ScienceLab).

Bax and Bcl2 Gene-Specific Methylation

Specific methylation of *Bax* and *Bcl2* genes was measured as described previously [32, 33]. Genomic DNA was obtained with GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kits, and the quantity of obtained DNA was assessed spectrophotometrically at wavelengths of 260 nm and 260/280 nm with a NanoDrop ND-1000 UV–Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Then, denaturation followed by bisulfite conversion of GC-rich DNA was conducted with an EpiTect Bisulfite Kit obtained from Qiagen (Hilden,

Germany). Samples were then eluted in a 10 μ l volume and underwent qPCR (MethyLight) with an EpiTect MethyLight PCR Kit. The methylation regions in the *Bax* and *Bcl2* genes were verified in CpG hot spots in the 5' flanking sequence (2000 bp). Methyl Primer Express Software 1.0 was employed to design primers for methylated and unmethylated target sequences. Fully methylated and fully unmethylated TaqMan probes were designed for the *Bax* and *Bcl2* promoters, and the internal reference set for the *Hprt1* gene was designed to control the input of DNA. For the EpiTect MethyLight assays, the specific TaqMan probes contained FAM™ as the reporter dye. The degree of methylation of each sample was calculated by taking the threshold cycles determined as percentage of methylation [%]: $C_{\text{meth}} = 100/[1 + 2(\Delta C_{\text{t}_{\text{meth}}} - \Delta C_{\text{t}_{\text{unmeth}}})]$.

Immunofluorescence Staining

To visualize the cellular localization of the studied proteins and to confirm the neuronal character of cultured cells, immunofluorescence labeling followed by confocal microscopy was employed as previously described [34]. The cortical cells were cultured on glass coverslips and subjected to immunofluorescence labeling. Cells were fixed with a 4% paraformaldehyde solution in PBS for 15 min at room temperature and further incubated with blocking buffer, i.e., 5% normal donkey serum and 0.3% Triton X-100 in 0.01 PBS for 1 h. Subsequently, the neurons were incubated with the following primary antibodies for 24 h at 4 °C: anti-A β rabbit (diluted 1:50), anti-MAP2 mouse (1:100), anti-BAX

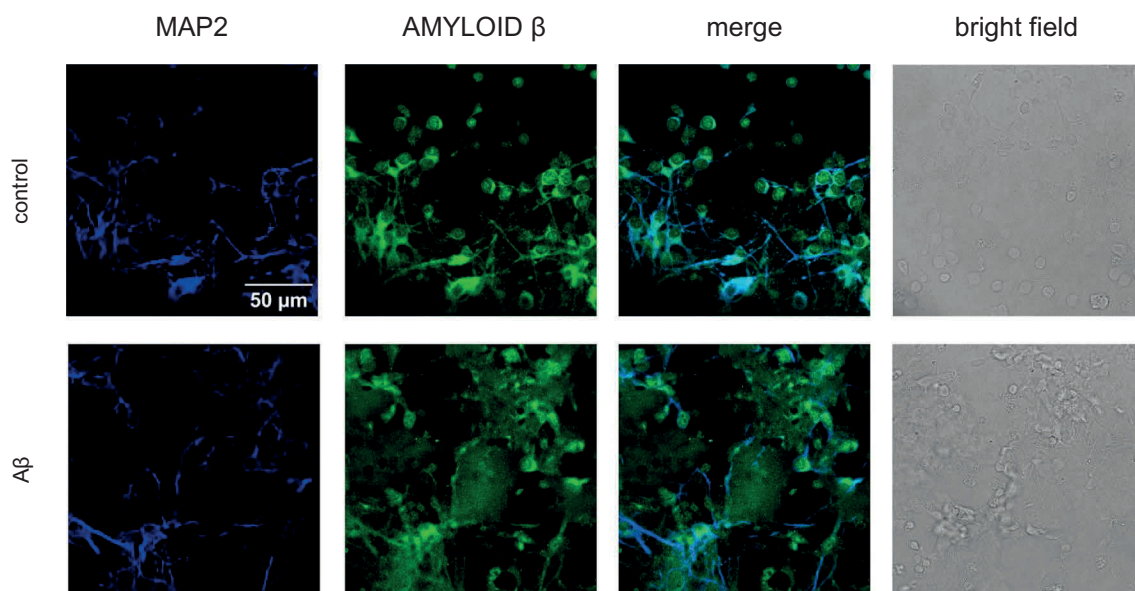
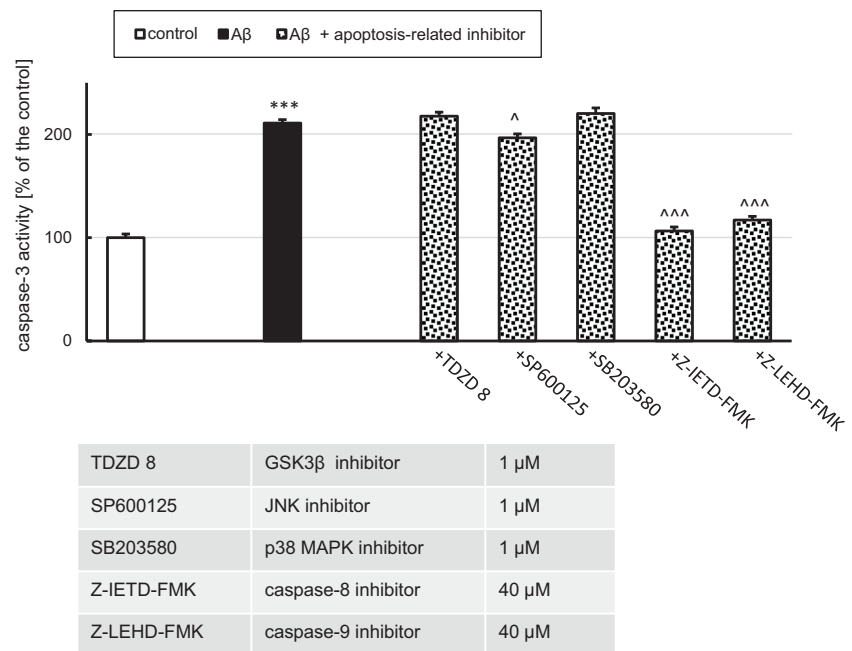


Fig. 1 Immunofluorescent labeling of A β (green staining) and the neuronal marker MAP2 (blue staining) in primary neocortical cell cultures treated with 10 μ M A β for 30 h. Bright-field images are also

shown. Staining showed the intra- and extracellular distribution of A β in neuronal cell cultures

Fig. 2 A β at a concentration of 10 μ M increased caspase-3 activity. Inhibition of caspase-8 and caspase-9 prevented A β -induced caspase-3 overactivity, while JNK inhibition slightly attenuated the A β -induced effect. Each bar represents the mean $\pm$ SEM of three independent experiments, consisting of 10 replicates per group. *** p < 0.001 versus the control and ^ p < 0.05, ^^ p < 0.001 versus A β -treated cells



mouse (1:50), anti-BCL2 rabbit (1:50), anti-FAS mouse (1:50), anti-FASL mouse (1:50), and anti-GSK3 β rabbit (1:50). Next, the neocortical cells were incubated with secondary antibodies: Alexa Fluor Plus 488-conjugated goat anti-mouse IgG (1:200 and 1:600) and Alexa Fluor Plus 647-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:200). Finally, the microscopic preparations were washed with PBS, mounted, and cover-slipped. For viewing the preparations, a Leica TCS SP8 WLL confocal laser scanning microscope (DMi8-CS, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) was employed.

Fluoro-Jade C Staining

Fluoro-Jade C staining was used to assess the level of degenerating neurons as previously described [33, 35]. To conduct the staining, a stock solution with a concentration of 0.01% was prepared by diluting the Fluoro-Jade C in distilled water. The stock solution was then further diluted into a 0.005% working solution in Neurobasal medium. Then, the culture medium was removed from the 96-well plates, and the working solution was added at 100 μ l per well. The plates were incubated for 45 min at room temperature. Then, the level of fluorescence was measured, with excitation = 490 nm and emission = 525 nm, using an Infinite M200 PRO microplate reader (Tecan Mannedorf, Switzerland). The results were analyzed by i-control software and presented as the percentage of the control $\pm$ SEM. Fluoro-Jade C is a green fluorescence dye. Microscopic images were obtained with a Leica DM IL LED Inverted Microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). In this study, we used ImageJ to change the color to magenta.

Neurite Outgrowth Staining

To assess neurite outgrowth, the Neurite Outgrowth Staining Kit was employed. First, the cells were washed with PBS, and then, the appropriate amount of 1X working Fix/Stain Solution was added to each well. Then, the cells were incubated for 15 min at room temperature. Next, the staining was visualized using a Leica TCS SP8 WLL confocal laser scanning microscope (DMi8-CS, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). The obtained images were analyzed with ImageJ, and the fluorescence intensity from entire images was measured. The data were normalized to the signal intensity of vehicle-treated cells and expressed as a percentage of the control $\pm$ SEM.

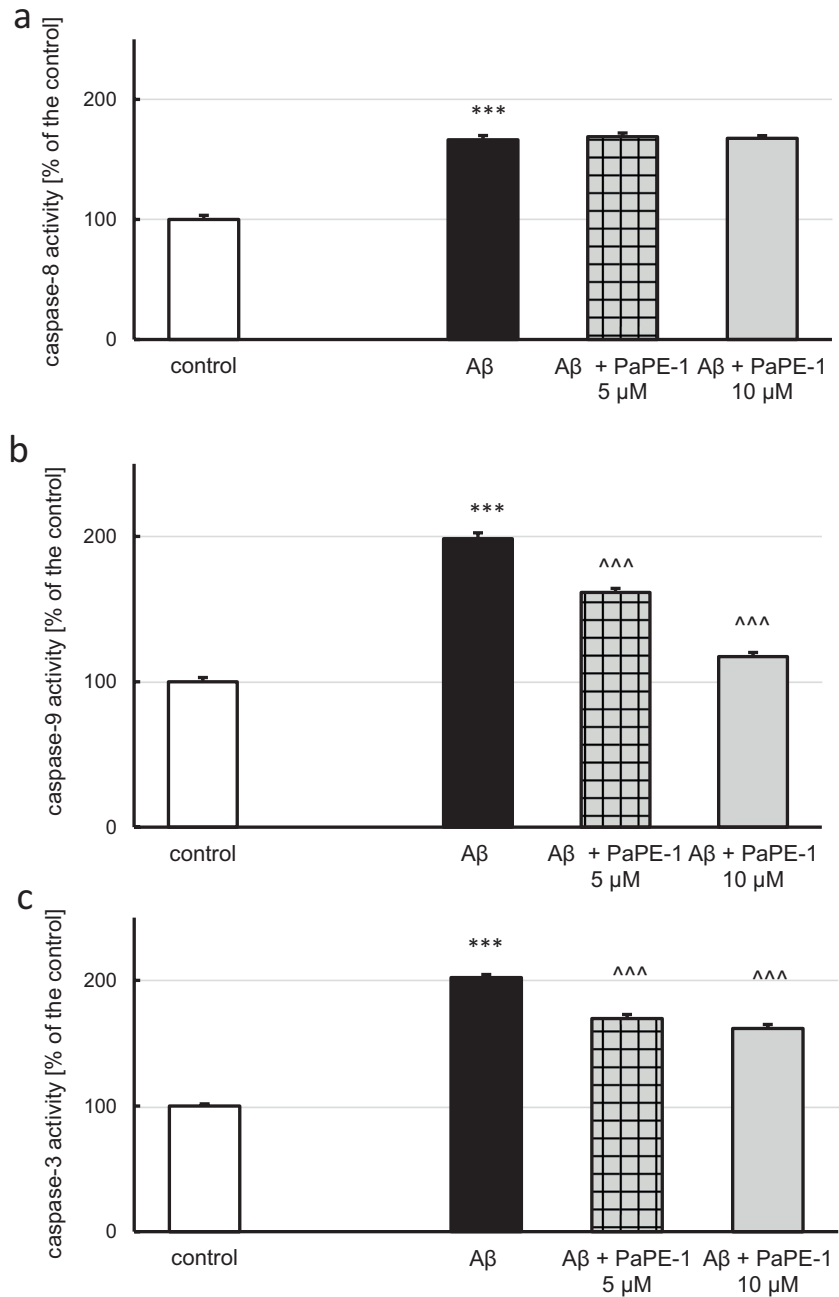
ROS Activity Measurement

The ROS-Glo™ H₂O₂ Assay was used to assess the level of reactive oxygen species (ROS) in neocortical cells exposed to A β and PaPE-1. The assay was performed according to the manufacturer's protocol. The bioluminescence was measured using a GloMax® Navigator Microplate Luminometer (Promega, Madison, WI, USA). The detected signal was proportional to the amount of H₂O₂ in cultured cells. The data were normalized to the signal intensity of vehicle-treated cells and expressed as a percentage of the control $\pm$ SEM.

Assessment of Mitochondrial Membrane Potential

The JC-10 dye is a commonly employed fluorescent marker that forms aggregates (emitting red fluorescence) within

Fig. 3 PaPE-1 (5 and 10 μ M) partially reversed A β -induced caspase-9 (b) and caspase-3 activity (c) but did not impact caspase-8 elevation (a). Each bar represents the mean $\pm$ SEM of three independent experiments, consisting of 10 replicates per group. *** p < 0.001 versus the control and ^^ p < 0.001 versus A β -treated cells

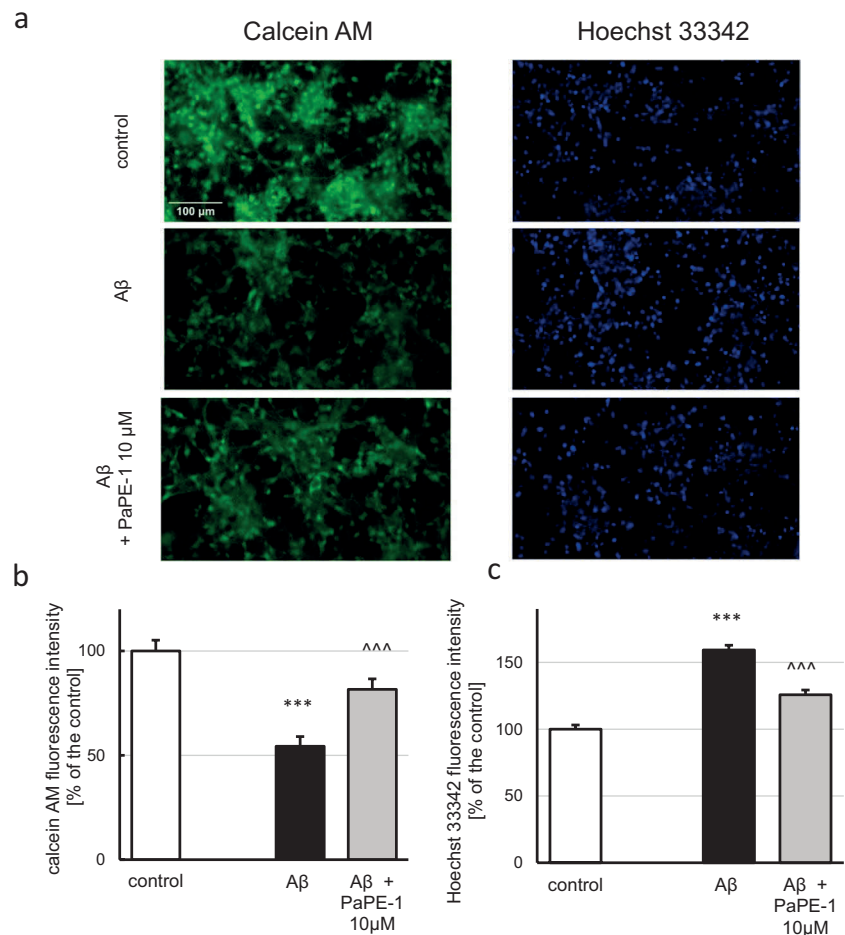


mitochondria when the mitochondrial membrane potential is high. When mitochondrial membrane potential is decreased, JC-10 stays in the cytoplasm in monomeric form (green fluorescence). The assay was performed following the manufacturer's protocol and fluorescence measurements were taken at Ex/Em = 490/525 nm and Ex/Em = 540/590 nm using an Infinite M200 PRO microplate reader (Tecan Mannedorf, Switzerland). The fluorescence intensity data were used to calculate the ratio, and the results were expressed as a percentage relative to the control, with the standard error of the mean (SEM). The data were normalized to the fluorescence intensity of control cells.

Data Analysis

Statistical analysis was performed on raw data. The obtained results are presented as the mean absorbance, fluorescence or luminescence units per well containing 50,000 cells for the caspase activity assessment, JC-10, ROS activity and Fluoro-Jade C, mean fluorescence of the whole picture or single nuclei for calcein AM, Hoechst 33342 and neurite outgrowth staining, the fluorescence units per 1.5 million cells for qPCR and specific gene methylation, and the mean optical density per 10 μ g of protein for western blot assays. To determine overall significance,

Fig. 4 Fluorescent labeling of viable cells using calcein AM (green stain) and cell nuclei using Hoechst 33342 (blue stain) (a). PaPE-1 (10 μ M) partially reversed the A β -induced decrease in cell viability (b) and increase in chromatin condensation (c). Each bar represents the mean $\pm$ SEM of the mean fluorescence intensity measured from 15 whole photos per group in calcein AM staining or 30 nuclei per picture with five pictures per group in Hoechst 33342 staining. *** p < 0.001 versus the control and ^^^ p < 0.001 versus A β -treated cells



an analysis of variance (ANOVA) was used. The differences between the control and experimental groups were defined with a post hoc Newman–Keuls test that was preceded by Levene’s test for homogeneity.

Differences of statistical significance were indicated as follows: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 (versus control cultures) and ^ p < 0.05, ^^ p < 0.01, ^^^ p < 0.001 (versus cultures exposed to A β). The results are expressed as the mean $\pm$ SEM.

Results

A β is Present in Primary Neocortical Cell Cultures 30 h Post Application

In the present study, primary neocortical cell cultures were exposed to A β (10 μ M) for 30 h. Utilized concentration was chosen based on our previous study [22]. Immunofluorescence staining with the neuronal marker MAP2 (blue labeling) and A β (green labeling) showed the presence of preaggregated extracellular A β in A β -treated cultures. However, in control and A β -treated cells, endogenous intracellular A β was also present (Fig. 1).

A β -Induced Cell Death Involves Apoptosis-Specific Pathways

In the present study, primary neocortical cell cultures exposed to A β (10 μ M) for 30 h showed increased activity of caspase-3 (211% of the control), a hallmark of apoptosis (Fig. 2). Treatment with caspase-8 and caspase-9 inhibitors prevented caspase-3 activity elevation (106 and 117% of the control). Exposure to A β together with JNK inhibitor lowered caspase-3 elevation by 15%, while GSK3 β and p38 MAPK inhibition had no effect on A β -induced caspase-3 activity (Fig. 2).

PaPE-1 Inhibited A β -Induced Caspase-3 and Caspase-9 but Not Caspase-8 Overactivation

In the current study, cells were exposed to A β (10 μ M) for 24 h, and then, PaPE-1 was added for the following 6 h. Thirty hours of exposure to A β increased caspase-8 (Fig. 3a), caspase-9 (Fig. 3b), and caspase-3 (Fig. 3c) activities to 166, 198, and 202% of the control, respectively. Posttreatment with PaPE-1 (5 and 10 μ M)

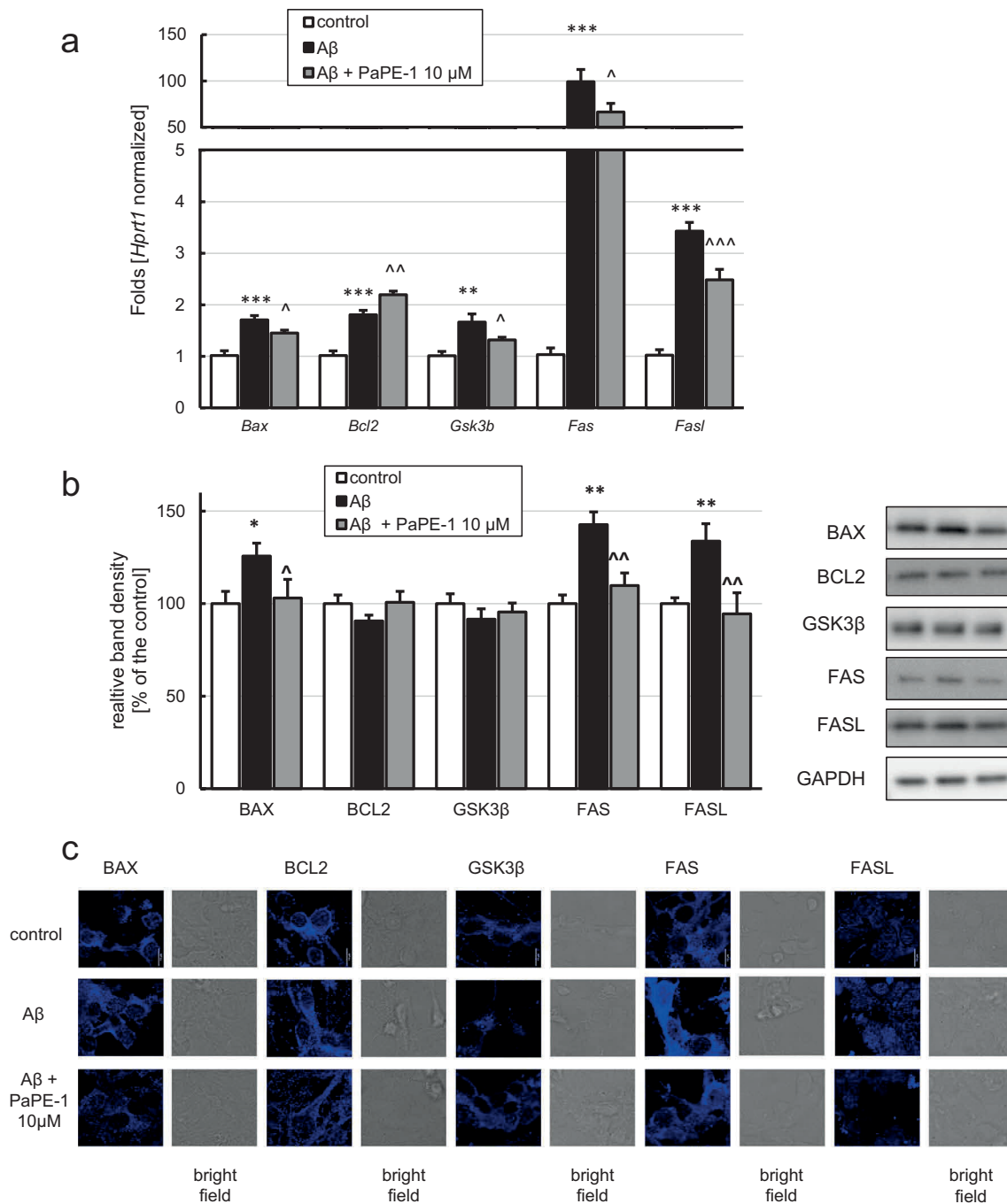


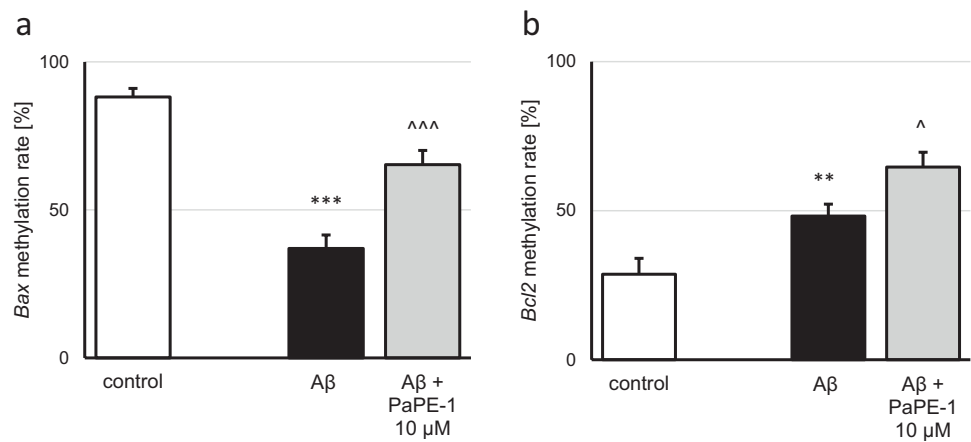
Fig. 5 PaPE-1 (10 μM) affected Aβ-increased mRNA expression (a) and protein levels (b) of apoptosis-specific factors. Each bar represents the mean ± SEM of three independent experiments, consisting of five replicates per group. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ versus

the control cultures; ^ $p < 0.05$, ^^ $p < 0.01$ and ^^ $p < 0.001$ versus Aβ-treated cells. Immunofluorescent labeling of BAX, BCL2, GSK3β, FAS, and FASL (c) confirmed the results obtained using western blotting. Scale bar equals 10 μm in all images

decreased both caspase-3 (170 and 162% of the control) and caspase-9 activities (162 and 117% of the control) but had no impact on caspase-8 activity (Fig. 3). These results indicate that PaPE-1-induced neuroprotective

effects include inhibition of caspase-9 and caspase-3. PaPE-1 did not alter the activity of any of the abovementioned enzymes under control conditions (Supplementary material Table S1).

Fig. 6 The methylation rates of the *Bax* (a) and *Bcl2* (b) genes were altered by both A β (10 μ M) and posttreatment with PaPE-1 (10 μ M). The results are presented as the mean $\pm$ SEM. There were three independent experiments, consisting of five replicates per group. $^{**}p < 0.01$ and $^{***}p < 0.001$ compared to the control group; $^{\wedge}p < 0.05$ and $^{\wedge\wedge\wedge}p < 0.001$ compared to the cultures exposed to A β



PaPE-1 Restored Cell Viability Decreased by Exposure to A β and Reversed A β -Induced Apoptotic Chromatin Condensation, but It Did Not Affect ROS Activity and Mitochondrial Membrane Potential

Staining with calcein AM showed that treatment with 10 μ M A β decreased cell viability to 55% of the control. After treatment with PaPE-1 (10 μ M), cell viability

reached approximately 80% of the control, i.e., PaPE-1 increased this parameter by 25% (Fig. 4a, b). Hoechst 33342 enables visualization of condensed chromatin—another characteristic of apoptosis. Exposure to A β resulted in an increased number of bright-blue stained nuclei (159% of the control) that was partially reversed by posttreatment with PaPE-1 (126% of the control) (Fig. 4a, c). The staining provided additional evidence of extensive apoptosis in response to A β . In the control conditions,

Fig. 7 Fluoro-Jade C was used to stain degenerating neurons (a, b). PaPE-1 decreased the A β -induced increase in the degree of neurodegeneration. Each bar represents the mean $\pm$ SEM of three independent experiments, consisting of 10 replicates per group. $^{***}p < 0.001$ versus the control and $^{\wedge\wedge\wedge}p < 0.001$ versus A β -treated cells

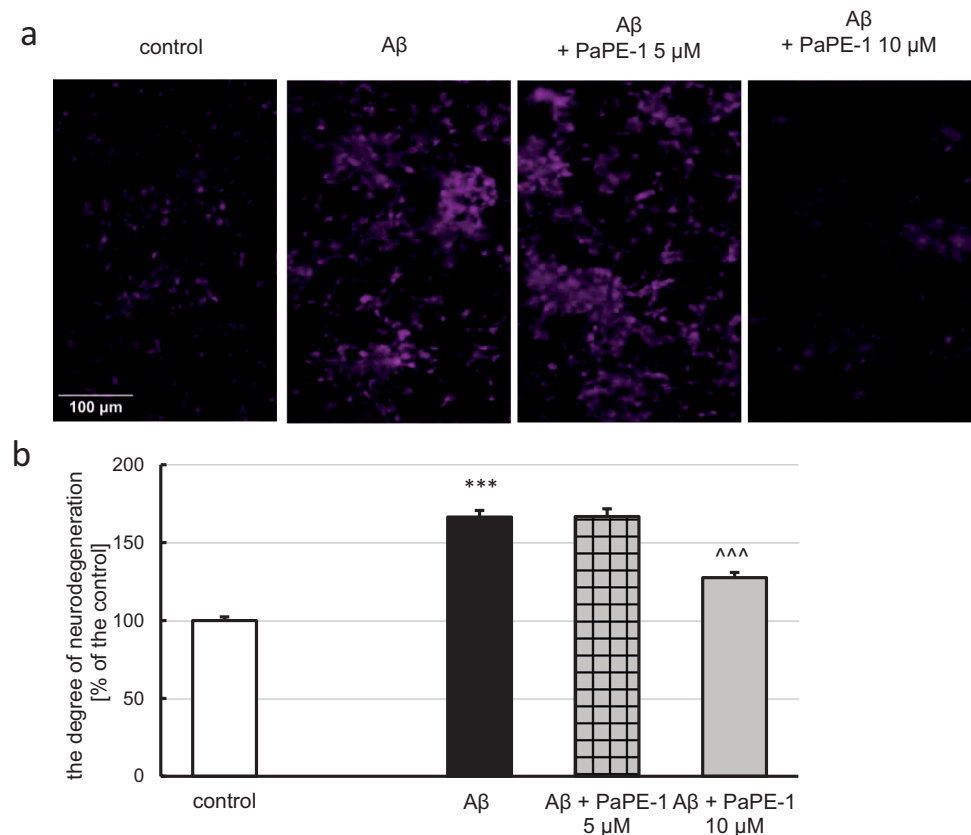


Fig. 8 PaPE-1 (10 μ M) partially reversed the A β -induced decrease in neurite outgrowth (**a, b**). Each bar represents the mean $\pm$ SEM of the mean fluorescence intensity measured from 23 to 25 photos per group. *** p < 0.001 versus the control and ^^^ p < 0.001 versus A β -treated cells

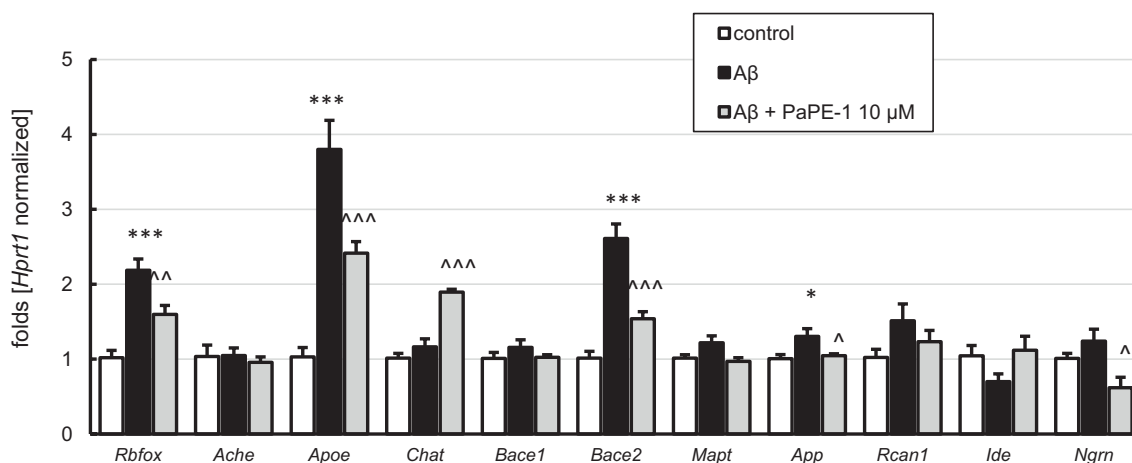
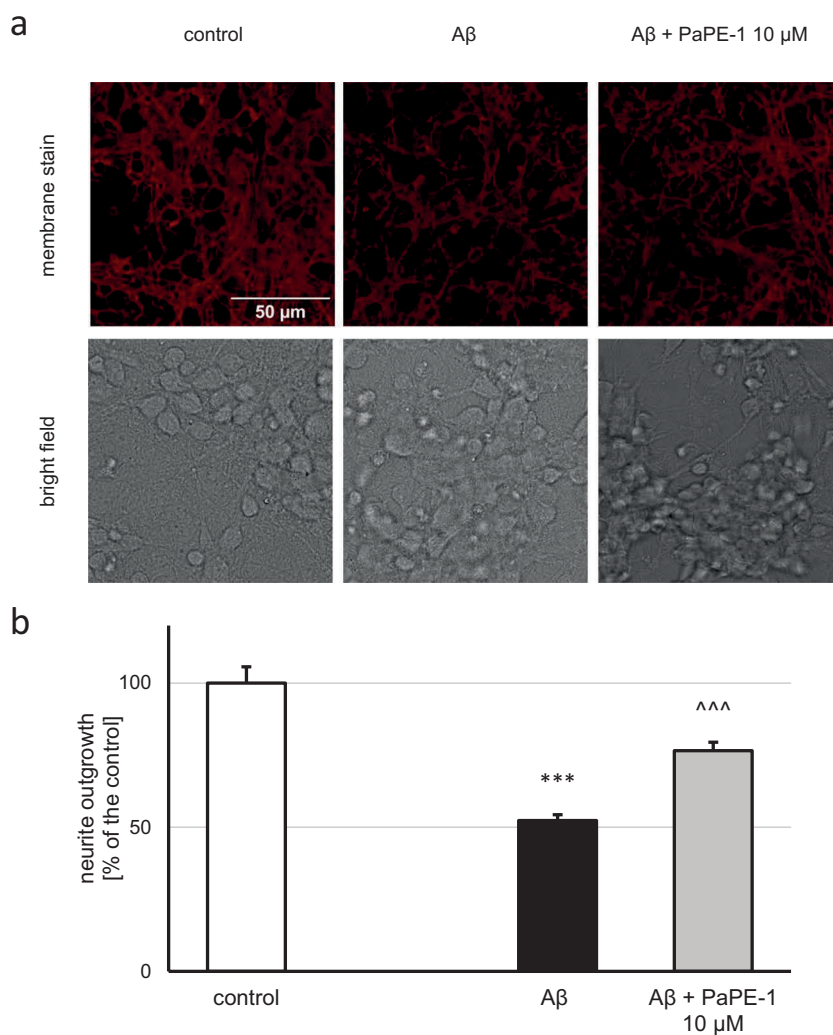


Fig. 9 A β (10 μ M) and PaPE-1 (10 μ M) affected the mRNA expression levels of AD-related genes. Each bar represents the mean $\pm$ SEM of three independent experiments, consisting of five replicates

per group. * p < 0.05 and *** p < 0.001 versus the control cultures; ^ p < 0.05, ^^ p < 0.01, and ^^^ p < 0.001 versus A β -treated cells

PaPE-1 altered neither cell viability nor apoptotic chromatin condensation (Supplementary material Table S1).

In addition, we did not observe any change in reactive oxygen species (ROS) activity in response to either A β (10 μ M) or PaPE-1 (10 μ M; Supplementary material Fig. S1). In contrast, mitochondrial membrane potential decreased in A β -treated cells, but application of PaPE-1 (5 and 10 μ M) did not evoke changes of this parameter (Supplementary material Fig. S2).

PaPE-1 Altered A β -Induced Changes in the Expression of Apoptosis-Specific Factors

Exposure to A β (10 μ M) resulted in an increase in the expression of all investigated apoptosis-specific genes, i.e., *Bax* (1.71-fold), *Bcl2* (1.81-fold), *Gsk3b* (1.66-fold), *Fas* (99.24-fold), and *Fasl* (3.43-fold; Fig. 5a). PaPE-1 at a concentration of 10 μ M partially reversed A β -induced changes in the expression of all the abovementioned proapoptotic genes, i.e., *Bax* (from 1.71-fold to 1.45-fold), *Gsk3b* (from 1.66-fold to 1.32-fold), *Fas* (from 99.24-fold to 66.50-fold), and *Fasl* (from 3.43-fold to 2.48-fold; Fig. 5a). PaPE-1 also influenced anti-apoptotic *Bcl2*, causing a further increase in its expression from 1.81-fold to 2.20-fold (Fig. 5a).

Concerning the protein levels, A β elevated the expression of BAX (126% of the control), FAS (143% of the control), and FASL (134% of the control) (Fig. 5b). Posttreatment with PaPE-1 normalized A β -induced changes in BAX, FAS, and FASL levels (Fig. 5b). Levels of BCL2 and GSK3 β were not altered in response to either A β or PaPE-1 (Fig. 5b). Immunofluorescent labeling of BAX, BCL2, GSK3 β , FAS, and FASL confirmed the results obtained using western blotting (Fig. 5c).

In the control conditions, PaPE-1 increased the mRNA expression of *Fasl* 1.66-fold (Supplementary material Table S2) and did not alter any other apoptosis-specific mRNA levels. At the protein level, PaPE-1 decreased BAX expression (70% of the control) and increased GSK3 β expression to approximately 120% of the control (Supplementary material Table S3).

A β and PaPE-1 Altered the Methylation Rate of the *Bax* and *Bcl2* Genes

The basic methylation rate of the *Bax* gene was 88%, and PaPE-1 (10 μ M) did not affect the rate (Fig. 6a, Supplementary material Table S4). A β (10 μ M) decreased the *Bax* methylation rate (37%), while posttreatment with PaPE-1 partially reversed the observed change (65%) (Fig. 6a).

The *Bcl2* methylation rate in the control condition was 29%. This value was elevated to 48% after application of

A β . PaPE-1 increased both the control and A β -affected *Bcl2* methylation rates to 69% and 65%, respectively (Fig. 6b, Supplementary material Table S4).

PaPE-1 Partially Reversed A β -Evoked Neurodegeneration

Fluoro-Jade C staining showed that A β (10 μ M) elevated the degree of neurodegeneration to 166% of the control. Posttreatment with PaPE-1 at a concentration of 10 μ M effectively decreased the parameter to 130% of the control. The 5 μ M PaPE-1 appeared ineffective (Fig. 7). PaPE-1 did not alter the parameter in the control conditions (Supplementary material Table S1).

PaPE-1 Restored Neurite Outgrowth, Which Decreased in Response to A β

A β (10 μ M) application decreased neurite outgrowth to 52% of the control, and posttreatment with PaPE-1 (10 μ M) increased the parameter to 77% of the control (Fig. 8a, b). Neurite outgrowth was not altered by treatment with PaPE-1 under control conditions (Supplementary material Table S1).

PaPE-1 Reversed A β -Induced Changes in AD-Related Gene Expression

Treatment with A β (10 μ M) increased the expression of *Rbfox* (2.2-fold), *Apoe* (3.8-fold), *Bace2* (2.6-fold), and *App* (1.3-fold) (Fig. 9). Cells posttreated with PaPE-1 (10 μ M) showed partial reversal of all of the abovementioned changes. PaPE-1 induced *Rbfox* decrease from 2.2-fold to 1.6-fold, *Apoe* from 3.8-fold to 2.2-fold, *Bace2* from 2.6-fold to 1.5 fold, and *App* from 1.3-fold to 1.0 fold (Fig. 9). In addition, in A β -treated cells PaPE-1 elevated the expression of *Chat* (1.9-fold) and reduced the expression of *Ngrn* (0.6-fold). The levels of *Ache*, *Bace1*, *Mapt*, *Rcan1*, and *Ide* did not change in response to either A β or PaPE-1 (Fig. 9). Interestingly, in the control conditions, PaPE-1 reduced the expression of *Bace1* and did not alter other AD-related mRNAs (0.03-fold) (Supplementary material Table S2).

Discussion

Targeting the non-nuclear estrogen receptor (ER) signaling, mainly via mER α and mER β , has been postulated as novel therapeutic strategy for central nervous system pathologies. Recently, we showed that PaPE-1, which selectively activates ER non-nuclear signaling pathways, elicited neuroprotection in a cellular model of

AD [22]; however, in the study, the ligand was applied at the same time as A β . In the present study, to increase the translational value of the research, we assessed the neuroprotective capacity and mechanisms of action of PaPE-1 in a posttreatment paradigm, i.e., 24 h after initiating A β -induced neurotoxicity. In this study, primary neocortical cell cultures treated with preaggregated A β_{1-42} (10 μ M) showed the presence of extracellular A β_{1-42} , confirming the adequacy of the AD model used. Extracellular storage of A β is a common feature of AD pathology and causes synaptic loss and neurodegeneration [36]. The A β protein is a primary risk factor for AD known to accumulate and aggregate in the brains of AD patients. Cerebral organoids from Dutch-type cerebral amyloid angiopathy (D-CAA) patients exhibited A β accumulation, thus confirming the potential of cerebral organoids as an in vitro disease model [37]. Similar to our study, aggregated A β was observed in primary cultures of rat hippocampal pyramidal neurons that were treated with preaggregated A β [38]. A β aggregates were also seeded in mouse primary neurons treated with APP/PSEN1 brain lysates, as detected with an antibody against A β_{42} and immunofluorescence labeling [39].

We are the first to show in this study that a 24-h delayed posttreatment with PaPE-1 decreased the degree of A β -induced neurodegeneration, restored neurite outgrowth, and inhibited the expression of AD-related genes, i.e., *Rbfox*, *Apoe*, *Bace2*, *App*, and *Ngrn*, except for *Chat*, which was stimulated. There are no relevant data to compare our results with, since except for our study no attempt has been made to selectively activate non-nuclear ER signaling pathways, particularly mER α and mER β , and to measure AD-related parameters. Furthermore, in most studies, the neuroprotective capacities of new ER ligands have been tested as pre- or cotreatment paradigms but not as posttreatment paradigm, as in the present study. The only relevant study was based upon 1-h posttreatment with a single dose of 4-estren-3 α ,17 β -diol (estren), a non-classical ER pathway activator, which inhibited the loss of cholinergic cortical projections and attenuated A β_{1-42} -induced learning deficits in ovariectomized mice [40]. This is why we discussed the neuroprotective effect of posttreatment with PaPE-1 against A β_{1-42} -induced neurotoxicity in the context of other ER ligands without dissecting non-nuclear ER signaling pathways specific effects.

Similar to our results, a phytoestrogen genistein that displays strong binding affinity for ER α and has the selective estrogen receptor modulator (SERM) property appeared to inhibit A β -induced neurotoxicity in hippocampal neurons and to improve brain function [41, 42]. In addition, selective modulators of ER β were effective in protecting against AD pathology in transgenic models of the disease [43], and treatment with hydroxytyrosol acetate caused ER β -dependent

cognitive improvement in APP/PS1 transgenic mice [44]. A phytoSERM that contains genistein, daidzein, and S-equol and preferentially targets ER β was found to preserve cognitive function in women with genetic risk modulators for AD, i.e., mitochondrial haplogroup and *APOE* genotype [45]. A functional link between ER signaling and AD could rely on APOE-mediated modulation of *ESR1* that involves CEBPB/ATF4, miR-155-5p, or miR-1-3p [46]. Therefore, the cited studies confirm the rationale for undertaking our research; however, they do not indicate the exclusive participation of non-nuclear ER signaling pathways in neuroprotection against AD as our present study does.

We demonstrated that the AD-attributed effects were accompanied by activation of apoptosis-dependent caspases (caspase-3, caspase-8, and caspase-9) and JNK kinases, as evidenced using relevant inhibitors. Previously, we also showed the involvement of apoptosis in the response of neuronal cells to A β , including activation of caspase-3, loss of mitochondrial membrane potential, and induction of apoptosis-specific factors [22]. Many other studies have also supported the process of apoptosis as an initial trigger of AD both in vivo and in vitro [4, 47]. In this study, posttreatment with PaPE-1 elicited anti-apoptotic effects by inhibiting A β -induced caspase-3 and caspase-9 activities as well as attenuating apoptotic nuclei formation, thus preventing neuronal cell death. The anti-apoptotic properties of ER agonists have been supported by a wide variety of studies, including the beneficial actions of S-equol (ER β agonist) on platelet mitochondria cytochrome oxidase (COX) activity in AD women [48] and neuroprotective effects exerted by a newly synthesized benzopyran FMDB (R-9-(4-fluorophenyl)-3-methyl-10,10-hydrogen-6-hydrogen-benzopyran) on cognition, neurogenesis, and apoptosis in APP/PS1 transgenic mice with ER β knockdown [49]. Furthermore, ER α is known to promote nonamyloidogenic APP processing via the MAPK/ERK pathway [50], and ginsenoside was shown to regulate ER α phosphorylation to protect against AD pathology [51]. Our results indicate that PaPE-1-mediated anti-apoptotic effects involve caspase-9 inhibition. Tamayev et al. [52] showed that inhibition of caspase-9 activity rescues both synaptic plasticity and memory deficits in Danish dementia knock-in mice, implicating caspase-9 in the pathogenesis of the disease and suggesting that PaPE-1 by reducing caspase-9 activity could be a valid therapeutic approach to treating human dementias.

In addition, posttreatment with PaPE-1 downregulated the A β -affected mRNA expression of apoptosis-specific factors such as *Bax*, *Gsk3b*, *Fas*, and *Fasl*, except for *Bcl2*, which was upregulated. In parallel, PaPE-1 decreased the protein levels of BAX, FAS, and FASL, which were elevated due to A β treatment, as detected by western blotting and immunofluorescence labeling. Interestingly, PaPE-1 also decreased the control level of BAX, but increased the control

level of GSK3 β . Since GSK3 β activity is determined by its phosphorylation on specific sites, and only the active GSK3 β is a measure of apoptosis, we do not interpret PaPE-1-evoked increase in the control level of GSK3 β as a proapoptotic effect. GSK3 β inhibition was observed in response to trehalose, which upregulated ER α and ER β and protected APP/PS1 mice against dietary advanced glycation end product (dAGE)-induced neurotoxicity and cognitive impairment [53]. Our results are also in line with the ER α -mediated anti-apoptotic effects of adenosine against A β _{25–35}-induced brain damage [54] and of formononetin in AD patients [55], as well as the ER/PI3K/Akt-mediated effect of naringenin against A β _{25–35}-caused damage in neuronally differentiated PC12 cells [56].

In our model of AD, A β caused *Bax* hypomethylation and *Bcl2* hypermethylation, which suggests opposite regulation of the expression levels of the genes and related proteins. Accordingly, the PaPE-1-evoked decrease in the BAX/BCL2 ratio corresponds to increased methylation of the *Bax* gene and implies a decreased BAX protein level. However, *Bcl2* gene hypermethylation and intact BCL2 protein levels suggest other PaPE-1-dependent mechanisms to control A β -induced apoptosis. BCL2 upregulation has been unexpectedly detected in response to hypoxia, ischemia, and neurodegenerative diseases and was explained as a compensatory mechanism preventing neurons from acute or chronic injury [21, 22, 33, 35, 57–59]. BCL2 dysregulation may be related to the dual role of autophagy during neurodegeneration, depending on its interaction with the process of apoptosis and abilities to bind and inhibit Ca²⁺ flux of inositol-1,4,5-trisphosphate receptors (IP3Rs) and ryanodine receptors (RyRs). Paradoxically, the anti-apoptotic function of BCL2 may be neutralized by sensitizers such as BAD, BIK, NOXA, PUMA, HRK, and BMF, which in turn may predispose cells to apoptosis. In AD patients, BCL2 immunoreactivity in neurons increases in parallel with increasing disease severity [60]. However, in AD patients with confirmed neurofibrillary degeneration, BCL2 immunoreactivity decreases, which supports the unclear role of this protein in preventing A β -induced apoptosis, including PaPE-1-evoked *Bcl2* gene hypermethylation observed in the present study.

Summing up, current basic study proposes a novel therapeutic approach for AD that relies on a posttreatment with the newly designed PaPE-1 which selectively activates ER non-nuclear signaling pathways, inhibits the expression of AD-related genes and apoptosis process that involves enhanced DNA methylation of specific genes, and in these ways protects from A β -induced neurodegeneration.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s12035-023-03819-5>.

Acknowledgements The authors appreciate the advice and assistance of Professor Davide Franceschini, PhD, in the preparation of A β oligomers.

Author Contribution B.A.P.W.: data curation, investigation, methodology, validation, and writing—original draft; A.W.: data curation, formal analysis, investigation, methodology, validation, and writing—original draft; K.P.D.: data curation, investigation, methodology, and validation; A.L.: investigation and writing—original draft; M.K.: conceptualization, funding acquisition, methodology, project administration, supervision, and writing—original draft. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding This work was supported by grant no. 2020/39/B/NZ7/00974 from the National Science Centre of Poland and the statutory fund of the Maj Institute of Pharmacology at the Polish Academy of Sciences in Krakow, Poland.

Data Availability The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request. Some data may not be made available because of privacy or ethical restrictions.

Declarations

Ethics Approval Not applicable.

Consent to Participate Not applicable.

Consent for Publication Not applicable.

Competing Interests The authors declare no competing interests.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

1. Thinakaran G, Koo EH (2008) Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem* 283(44):29615–29619. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800019200>
2. Shimohama S (2000) Apoptosis in Alzheimer's disease—an update. *Apoptosis* 5(1):9–16. <https://doi.org/10.1023/a:1009625323388>
3. Huang YR, Liu RT (2020) The toxicity and polymorphism of β -amyloid oligomers. *Int J Mol Sci* 21(12):4477. <https://doi.org/10.3390/ijms21124477>
4. Sharma VK, Singh TG, Singh S, Garg N, Dhiman S (2021) Apoptotic pathways and Alzheimer's disease: probing therapeutic potential. *Neurochem Res* 46(12):3103–3122. <https://doi.org/10.1007/s11064-021-03418-7>
5. Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA et al (1997) A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships

- established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 272(29):17907–17911. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.29.17907>
6. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, Alnemri ES, Altucci L et al (2018) Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* 25(3):486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>
 7. Wnuk A, Kajta M (2017) Steroid and xenobiotic receptor signaling in apoptosis and autophagy of the nervous system. *Int J Mol Sci* 18(11):2394. <https://doi.org/10.3390/ijms18112394>
 8. Dhage PA, Sharbidre AA, Magdum SM (2023) Interlacing the relevance of caspase activation in the onset and progression of Alzheimer's disease. *Brain Res Bull* 192:83–92. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2022.11.008>
 9. Gervais FG, Xu D, Robertson GS, Vaillancourt JP, Zhu Y, Huang J, LeBlanc A, Smith D et al (1999) Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid-beta precursor protein and amyloidogenic A beta peptide formation. *Cell* 97(3):395–406. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80748-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80748-5)
 10. Plouffe V, Mohamed NV, Rivest-McGraw J, Bertrand J, Lauzon M, Leclerc N (2012) Hyperphosphorylation and cleavage at D421 enhance tau secretion. *PLoS ONE* 7(5):e36873. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036873>
 11. Zhou Y, Shi J, Chu D, Hu W, Guan Z, Gong CX, Iqbal K, Liu F (2018) Relevance of phosphorylation and truncation of tau to the etiopathogenesis of Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* 10:27. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00027>
 12. Park G, Nhan HS, Tyan SH, Kawakatsu Y, Zhang C, Navarro M, Koo EH (2020) Caspase activation and caspase-mediated cleavage of APP is associated with amyloid β -protein-induced synapse loss in Alzheimer's disease. *Cell Rep* 31(13):107839. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107839>
 13. Pérez MJ, Vergara-Pulgar K, Jara C, Cabezas-Opazo F, Quintanilla RA (2018) Caspase-cleaved tau impairs mitochondrial dynamics in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 55(2):1004–1018. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0385-x>
 14. Nguyen TTM, Gillet G, Popgeorgiev N (2021) Caspases in the developing central nervous system: apoptosis and beyond. *Front Cell Dev Biol* 9:702404. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.702404>
 15. Hollville E, Deshmukh M (2018) Physiological functions of non-apoptotic caspase activity in the nervous system. *Semin Cell Dev Biol* 82:127–136. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.11.037>
 16. Knopman DS, Amieva H, Petersen RC, Chételat G, Holtzman DM, Hyman BT, Nixon RA, Jones DT (2021) Alzheimer disease. *Nat Rev Dis Primers* 7(1):33. <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00269-y>
 17. Rohn TT, Head E (2009) Caspases as therapeutic targets in Alzheimer's disease: is it time to “cut” to the chase? *Int J Clin Exp Pathol* 2(2):108–118
 18. Wnuk A, Przepiórska K, Pietrzak BA, Kajta M (2023) Emerging evidence on membrane estrogen receptors as novel therapeutic targets for central nervous system pathologies. *Int J Mol Sci* 24(4):4043. <https://doi.org/10.3390/ijms24044043>
 19. Madak-Erdogan Z, Kim SH, Gong P, Zhao YC, Zhang H, Chambliss KL, Carlson KE, Mayne CG et al (2016) Design of pathway preferential estrogens that provide beneficial metabolic and vascular effects without stimulating reproductive tissues. *Sci Signal* 9(429):ra53. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aad8170>
 20. Selvaraj UM, Zuurbier KR, Whoolery CW, Plautz EJ, Chambliss KL, Kong X, Zhang S, Kim SH et al (2018) Selective nonnuclear estrogen receptor activation decreases stroke severity and promotes functional recovery in female mice. *Endocrinology* 159(11):3848–3859. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00600>
 21. Wnuk A, Przepiórska K, Pietrzak BA, Kajta M (2021) Post-treatment strategy against hypoxia and ischemia based on selective targeting of nonnuclear estrogen receptors with PaPE-1. *Neurotox Res* 39(6):2029–2041. <https://doi.org/10.1007/s12640-021-00441-y>
 22. Wnuk A, Przepiórska K, Rzemieniec J, Pietrzak B, Kajta M (2020) Selective targeting of non-nuclear estrogen receptors with PaPE-1 as a new treatment strategy for Alzheimer's disease. *Neurotox Res* 38(4):957–966. <https://doi.org/10.1007/s12640-020-00289-8>
 23. Kajta M, Trotter A, Lasoń W, Beyer C (2006) Impact of 17 β -estradiol on cytokine-mediated apoptotic effects in primary hippocampal and neocortical cell cultures. *Brain Res* 1116(1):64–74. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.07.105>
 24. Przepiórska K, Wnuk A, Beyer C, Kajta M (2023) Amorphin B protects mouse brain neurons from hypoxia/ischemia by inhibiting apoptosis and autophagy processes through gene methylation- and miRNA-dependent regulation. *Mol Neurobiol* 60(2):576–595. <https://doi.org/10.1007/s12035-022-03087-9>
 25. Kajta M, Litwa E, Rzemieniec J, Wnuk A, Lason W, Zelek-Molik A, Nalepa I, Grzegorzewska-Hiczwa M et al (2014) Isomer-nonspecific action of dichlorodiphenyltrichloroethane on aryl hydrocarbon receptor and G-protein-coupled receptor 30 intracellular signaling in apoptotic neuronal cells. *Mol Cell Endocrinol* 392(1–2):90–105. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.05.008>
 26. Kajta M, Domin H, Gryniewicz G, Lason W (2007) Genistein inhibits glutamate-induced apoptotic processes in primary neuronal cell cultures: an involvement of aryl hydrocarbon receptor and estrogen receptor/glycogen synthase kinase-3 β intracellular signaling pathway. *Neuroscience* 145(2):592–604. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.11.059>
 27. Kajta M, Wójtowicz AK, Maćkowiak M, Lasoń W (2009) Aryl hydrocarbon receptor-mediated apoptosis of neuronal cells: a possible interaction with estrogen receptor signaling. *Neuroscience* 158(2):811–822. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.10.045>
 28. Wnuk A, Rzemieniec J, Litwa E, Lasoń W, Krzeptowski W, Wójtowicz AK, Kajta M (2016) The crucial involvement of retinoid X receptors in DDE neurotoxicity. *Neurotox Res* 29(1):155–172. <https://doi.org/10.1007/s12640-015-9572-6>
 29. Wnuk A, Rzemieniec J, Lasoń W, Krzeptowski W, Kajta M (2018) Apoptosis induced by the UV filter benzophenone-3 in mouse neuronal cells is mediated via attenuation of Er α /Ppar γ and stimulation of Er β /Gpr30 signaling. *Mol Neurobiol* 55(3):2362–2383. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0480-z>
 30. Rzemieniec J, Litwa E, Wnuk A, Lason W, Krzeptowski W, Kajta M (2016) Selective aryl hydrocarbon receptor modulator 3,3'-diindolylmethane impairs AhR and ARNT signaling and protects mouse neuronal cells against hypoxia. *Mol Neurobiol* 53(8):5591–5606. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9471-0>
 31. Wnuk A, Rzemieniec J, Lasoń W, Krzeptowski W, Kajta M (2018) Benzophenone-3 impairs autophagy, alters epigenetic status, and disrupts retinoid X receptor signaling in apoptotic neuronal cells. *Mol Neurobiol* 55(6):5059–5074. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0704-2>
 32. Wnuk A, Rzemieniec J, Przepiórska K, Pietrzak BA, Maćkowiak M, Kajta M (2021) Prenatal exposure to triclocarban impairs ESR1 signaling and disrupts epigenetic status in sex-specific ways as well as dysregulates the expression of neurogenesis- and neurotransmitter-related genes in the postnatal mouse brain. *Int J Mol Sci* 22(23):13121. <https://doi.org/10.3390/ijms222313121>
 33. Wnuk A, Przepiórska K, Pietrzak BA, Kajta M (2021) Post-treatment with amorfrutin B evokes PPAR γ -mediated neuroprotection against hypoxia and ischemia. *Biomedicines* 9(8):854. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9080854>
 34. Kajta M, Rzemieniec J, Litwa E, Lason W, Lenartowicz M, Krzeptowski W, Wojtowicz AK (2013) The key involvement of estrogen receptor β and G-protein-coupled receptor 30 in the

- neuroprotective action of daidzein. *Neuroscience* 238:345–360. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.02.005>
35. Pietrzak BA, Wnuk A, Przepiórska K, Łach A, Kajta M (2023) Posttreatment with ospemifene attenuates hypoxia- and ischemia-induced apoptosis in primary neuronal cells via selective modulation of estrogen receptors. *Neurotox Res*. <https://doi.org/10.1007/s12640-023-00644-5>
 36. Hampel H, Hardy J, Blennow K, Chen C, Perry G, Kim SH, Villemagne VL, Aisen P et al (2021) The amyloid- β pathway in Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry* 26(10):5481–5503. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01249-0>
 37. Daoutsali E, Peppers BA, Stamatakis S, van der Graaf LM, Terwindt GM, Parfitt DA, Buijsen RAM, van Roon-Mom WMC (2023) Amyloid beta accumulations and enhanced neuronal differentiation in cerebral organoids of Dutch-type cerebral amyloid angiopathy patients. *Front Aging Neurosci* 14:1048584. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.1048584>
 38. Ferreira A, Sinjoanu RC, Nicholson A, Kleinschmidt S (2011) A β toxicity in primary cultured neurons. *Methods Mol Biol* (Clifton, N.J.) 670:141–153. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-744-0_11
 39. Roos TT, Garcia MG, Martinsson I, Mabrouk R, Israelsson B, Deierborg T, Kobro-Flatmoen A, Tanila H et al (2021) Neuronal spreading and plaque induction of intracellular A β and its disruption of A β homeostasis. *Acta Neuropathol* 142(4):669–687. <https://doi.org/10.1007/s00401-021-02345-9>
 40. Kwakowsky A, Potapov K, Kim S, Peppercorn K, Tate WP, Ábrahám IM (2016) Treatment of beta amyloid 1–42 (A β (1–42))-induced basal forebrain cholinergic damage by a non-classical estrogen signaling activator in vivo. *Sci Rep* 6:21101. <https://doi.org/10.1038/srep21101>
 41. Wang YX, Xia ZH, Jiang X, Li LX, Wang HG, An D, Liu YQ (2020) Genistein inhibits amyloid peptide 25–35-induced neuronal death by modulating estrogen receptors, choline acetyltransferase and glutamate receptors. *Arch Biochem Biophys* 693:108561. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108561>
 42. Duan X, Li Y, Xu F, Ding H (2021) Study on the neuroprotective effects of Genistein on Alzheimer's disease. *Brain Behav* 11(5):e02100. <https://doi.org/10.1002/brb3.2100>
 43. Zhao L, Woody SK, Chhibber A (2015) Estrogen receptor β in Alzheimer's disease: from mechanisms to therapeutics. *Ageing Res Rev* 24(Pt B):178–190. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2015.08.001>
 44. Qin C, Hu S, Zhang S, Zhao D, Wang Y, Li H, Peng Y, Shi L et al (2021) Hydroxytyrosol acetate improves the cognitive function of APP/PS1 transgenic mice in ER β -dependent manner. *Mol Nutr Food Res* 65(3):e2000797. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202000797>
 45. Wang Y, Hernandez G, Mack WJ, Schneider LS, Yin F, Brinton RD (2020) Retrospective analysis of phytoSERM for management of menopause-associated vasomotor symptoms and cognitive decline: a pilot study on pharmacogenomic effects of mitochondrial haplogroup and APOE genotype on therapeutic efficacy. *Menopause* (New York, NY) 27(1):57–65. <https://doi.org/10.1097/GME.0000000000001418>
 46. Liu J, Yuan S, Niu X, Kelleher R, Sheridan H (2022) ESR1 dysfunction triggers neuroinflammation as a critical upstream causative factor of the Alzheimer's disease process. *Aging* 14(21):8595–8614. <https://doi.org/10.18632/aging.204359>
 47. Calissano P, Matrone C, Amadoro G (2009) Apoptosis and in vitro Alzheimer disease neuronal models. *Commun Integr Biol* 2(2):163–169. <https://doi.org/10.4161/cib.7704>
 48. Wilkins HM, Mahnken JD, Welch P, Bothwell R, Koppel S, Jackson RL, Burns JM, Swerdlow RH (2017) A mitochondrial biomarker-based study of S-equal in Alzheimer's disease subjects: results of a single-arm, pilot trial. *J Alzheimer's Dis* 59(1):291–300. <https://doi.org/10.3233/JAD-170077>
 49. Ren XQ, Huang X, Xing SY, Long Y, Yuan DH, Hong H, Tang SS (2023) Neuroprotective effects of novel compound FMDB on cognition, neurogenesis and apoptosis in APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 165:105510. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2023.105510>
 50. Shi C, Zhu X, Wang J, Long D (2014) Estrogen receptor α promotes non-amyloidogenic processing of platelet amyloid precursor protein via the MAPK/ERK pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol* 144 Pt B:280–285. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.06.010>
 51. Yan X, Hu G, Yan W, Chen T, Yang F, Zhang X, Zhao G, Liu J (2017) Ginsenoside Rd promotes non-amyloidogenic pathway of amyloid precursor protein processing by regulating phosphorylation of estrogen receptor alpha. *Life Sci* 168:16–23. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.11.002>
 52. Tamayev R, Akpan N, Arancio O, Troy CM, D'Adamio L (2012) Caspase-9 mediates synaptic plasticity and memory deficits of Danish dementia knock-in mice: caspase-9 inhibition provides therapeutic protection. *Mol Neurodegener* 7:60. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-7-60>
 53. Zhou HH, Luo L, Zhai XD, Chen L, Wang G, Qin LQ, Yu Z, Xin LL et al (2021) Sex-specific neurotoxicity of dietary advanced glycation end products in APP/PS1 mice and protective roles of trehalose by inhibiting tau phosphorylation via GSK-3 β -TFEB. *Mol Nutr Food Res* 65(23):e2100464. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202100464>
 54. Zeng M, Feng A, Zhao C, Zhang B, Guo P, Liu M, Zhang Q, Zhang Y, Fan R, Lyu J, Zheng X (2022) Adenosine ameliorated A β _{25–35}-induced brain injury through the inhibition of apoptosis and oxidative stress via an ER α pathway. *Brain Res* 1788:147944. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2022.147944>
 55. Xiao H, Qin X, Wan J, Li R (2019) Pharmacological targets and the biological mechanisms of formononetin for Alzheimer's disease: a network analysis. *Med Sci Monitor* 25:4273–4277. <https://doi.org/10.12659/MSM.916662>
 56. Zhang N, Hu Z, Zhang Z, Liu G, Wang Y, Ren Y, Wu X, Geng F (2018) Protective role of naringenin against A β _{25–35}-caused damage via ER and PI3K/Akt-mediated pathways. *Cell Mol Neurobiol* 38(2):549–557. <https://doi.org/10.1007/s10571-017-0519-8>
 57. Satou T, Cummings BJ, Cotman CW (1995) Immunoreactivity for Bcl-2 protein within neurons in the Alzheimer's disease brain increases with disease severity. *Brain Res* 697(1–2):35–43. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00748-f](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00748-f)
 58. O'Barr S, Schultz J, Rogers J (1996) Expression of the protooncogene bcl-2 in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Aging* 17(1):131–136. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(95\)02024-1](https://doi.org/10.1016/0197-4580(95)02024-1)
 59. Kitamura Y, Shimohama S, Kamoshima W, Ota T, Matsuoka Y, Nomura Y, Smith MA, Perry G et al (1998) Alteration of proteins regulating apoptosis, Bcl-2, Bcl-x, Bax, Bak, Bad, ICH-1 and CPP32. *Alzheimer's Dis Brain Res* 780(2):260–269. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(97\)01202-x](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(97)01202-x)
 60. Callens M, Kraskovskaya N, Derevtsova K, Annaert W, Bultynck G, Bezprozvanny I, Vervliet T (2021) The role of Bcl-2 proteins in modulating neuronal Ca²⁺ signaling in health and in Alzheimer's disease. *Biochimica et biophysica acta. Mol Cell Research* 1868(6):118997. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2021.118997>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Non-nuclear Estrogen Receptor Signaling as a Promising Therapeutic Target to Reverse Alzheimer's Disease-related Autophagy Deficits and Upregulate the Membrane ESR1 and ESR2 Which Involves DNA Methylation-dependent Mechanisms

Bernadeta A. Pietrzak-Wawrzyńska, Agnieszka Wnuk, Karolina Przepiórska-Drońska, Andrzej Łach, and Małgorzata Kajta *

Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, Department of Drug Addiction Pharmacology, Laboratory of Neuropharmacology and Epigenetics, Smetna Street 12 31–343 Krakow, Poland

Correspondence to Małgorzata Kajta: kajta@if-pan.krakow.pl (M. Kajta)

<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2025.168982>

Editor: Louise C. Serpell

Abstract

Although Alzheimer's disease (AD) affects millions of individuals worldwide, there are currently no effective treatments available. Recent findings have suggested that non-nuclear estrogen receptor (ER) signaling represents promising therapeutic target for central nervous system disorders, offering potential treatments without the significant side effects associated with the activation of nuclear ERs. Because ER signaling deficiency and autophagy impairment have been linked to AD etiology, the present study aimed to selectively target non-nuclear ERs signaling pathways with PaPE-1 and identify autophagy-related mechanisms of neuroprotection in a cellular model of AD. The present study demonstrated that PaPE-1 protected mouse cortical neurons from AD pathology, as evidenced by MAP2-specific labeling. Posttreatment with PaPE-1 reversed the amyloid- β (A β)-evoked decrease in autophagic vesicles level, and increased the expression of autophagy-related mRNAs and proteins, accompanied by hypomethylation of the *Atg7* gene. Moreover, posttreatment with PaPE-1 increased the levels of membrane fraction receptors ESR1/ER α and ESR2/ER β , which corresponds to increased *Esr1* and *Esr2* mRNA expression and DNA hypomethylation of specific genes. In addition to inhibiting DNA methylation of autophagy and ER-related genes, PaPE-1 did not alter global DNA methylation but stimulated HAT activity in A β -treated cells. In summary, PaPE-1 promoted neuroprotection against A β -induced toxicity that involved stimulation of autophagy, upregulation of membrane ESR1 and ESR2 and decreased DNA methylation of respective genes. The present study proposes a novel therapeutic approach against AD that is based on the selective activation of non-nuclear ER signaling to overcome A β -induced autophagy deficits and normalize the epigenetic status of cerebral neurons.

© 2025 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introduction

Over 55 million individuals worldwide suffer from dementia, and there are nearly 10 million new

cases every year.¹ At present, dementia ranks as the seventh leading cause of death and is a significant contributor to disability and dependency among older individuals on a global scale.¹ Alzhei-

mer's disease (AD) is the predominant cause of dementia, contributing to 60–80% of reported cases.² Despite the severity of the problem, there is still no effective treatment for AD. Available pharmacological approaches (e.g., donepezil, rivastigmine, galantamine, and memantine) primarily aim to manage symptoms and may slow down cognitive decline in some patients, but they do not address the underlying causes of AD. Two new monoclonal antibodies targeting amyloid- β (A β), namely, aducanumab and lecanemab, have recently met FDA approval, but their clinical usefulness remains uncertain because their use can lead to severe side effects, such as microhemorrhages and brain edema.³ The molecular changes associated with AD include extracellular A β plaques, intracellular neurofibrillary tangles and consequential synaptic and neuronal loss.⁴ In our studies we decided to focus on mechanisms that underlie AD, including increased apoptosis, dysregulated autophagy, disrupted estrogen receptor signaling, and epigenetic changes. Understanding these molecular intricacies is crucial for developing targeted interventions to address the complexity of AD.

Autophagy plays a role in neural development and the nervous system's response to diverse challenges, but its disruption is critical for AD pathology. Autophagy can either eliminate cells or sustain their survival, even in the absence of trophic factors. While autophagy can be detrimental in acute neural disorders, such as stroke and hypoxic/ischemic injury, exacerbating neuronal damage by promoting excessive degradation of essential cellular components,^{5–7} it exerts a protective role in chronic neurodegenerative diseases, such as AD, Huntington's disease, amyotrophic lateral sclerosis, and Parkinson's disease, where it is responsible for degrading damaged organelles and misfolded proteins.⁸ Autophagy is initiated upon mTOR inactivation, which enables ULK1/2 complex formation. The next step in autophagosome formation is so-called nucleation, which is orchestrated mainly by BECN1 and AMBRA1. Sequentially, autophagosome elongation occurs, and this step involves i.a., ATG5, ATG7, and MAP1LC3AB. The mature autophagosome then merges with the lysosome, creating an autophagolysosome, the structure where actual degradation occurs.

Estrogen receptors (ERs) are known to play crucial roles in neuroprotection, and the impairment of ER signaling has been linked to AD pathogenesis. Estrogen deficiency, particularly during and after menopause, is associated with an increased risk of developing AD and may exacerbate cognitive decline in individuals with AD.^{9–11} Furthermore, there is a significant overlap between genes stimulated by estradiol and genes downregulated in postmortem AD brains.¹² To date, ESR1/ER α and ESR2/ER β are usually perceived solely as ligand-activated transcription factors.

Nevertheless, growing evidence shows the importance of these receptors in activation of non-nuclear signaling pathways, which are attractive targets in neurological disorders.¹³ Selective targeting of non-nuclear ERs, which may act via MAPK or mTOR signaling pathways, allows avoiding the greatest concerns of classical nuclear ERs signaling, i.e., carcinogenesis and cardiovascular disease risk. So far, the involvement of this type of ER signaling in autophagy, a process that is disrupted in course of AD, has not received adequate attention. The effects of ER activation depend on the cellular context; for example, 17 β -estradiol induces autophagy in models of osteoporosis, Parkinson's disease, and nephrotoxicity but represses autophagy during myocardial injury or after ovariectomy.¹⁴

Recent studies have indicated that epigenetic factors influence chronic diseases, such as AD.^{15,16} Epigenetic modifications include DNA methylation, histone modifications, chromatin remodeling, and noncoding RNA-dependent regulation. DNA methylation alters cytosine residues by attaching methyl groups in cytosine/guanine-rich areas, such as CpG islands¹⁷ and it may be an important diagnostic marker as well as therapeutic target for AD. Global DNA methylation levels are elevated in the peripheral blood mononuclear cells of patients with late-onset Alzheimer's disease (LOAD), and higher levels of DNA methylation are linked to the presence of the APOE ϵ 4 allele and APOE ϵ 3 in the overall population.¹⁸ Furthermore, the APOE genotype influences the methylation levels associated with AD, particularly in relation to the estrogen response pathway.¹⁹ Histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs) regulate gene expression through histone acetylation and deacetylation as well as affect acetylation of non-histone proteins. AD is characterized by dysregulation of histone acetylation in specific brain regions, indicating an imbalance between HATs and HDACs activities.^{20,21}

Pathway preferential estrogen-1 (PaPE-1) is a novel promising substance that selectively activates non-nuclear ER signaling pathways. Compared to estradiol, PaPE-1 exhibits significantly reduced binding affinities for ESR1 and ESR2. PaPE-1 activates ESR1 for less than one minute, a duration sufficient to initiate signaling cascades, such as MAPK and mTOR, but insufficient to induce direct genomic effects. For example, PaPE-1 selectively activates the extranuclear-initiated ER-regulated gene, *LRRC54*, but does not activate the nuclear-initiated ER-regulated gene, *PgR*.²² Importantly, PaPE-1 activity is absent in *Esr1*-knockout mice. Moreover, PaPE-1 has been shown to decrease stroke severity, attenuate neuroinflammation, and promote recovery from middle cerebral artery occlusion (MCAO).²³

We have previously reported the neuroprotective effects of PaPE-1 against hypoxic/ischemic

damage.²⁴ Our recent studies have demonstrated that PaPE-1 protects against A β -evoked neurotoxicity, as firstly shown in the proof of concept study conducted in co-treatment paradigm,²⁵ and then in the more clinically relevant, 24 h delayed post-treatment paradigm.²⁶ In these studies we showed that PaPE-1 acts by inhibiting apoptosis, blocking ROS formation, and downregulating AD-related genes. Thus, the present study aimed to identify new mechanisms by which PaPE-1 protects against AD pathology, with a special focus on autophagy, membrane ESR1 and ESR2, and methylation-dependent regulation of specific genes.

Materials

Phosphate-buffered saline (PBS) was obtained from Biomed Lublin (Lublin, Poland). Neurobasal phenol red free medium and B27 without AO were purchased from Gibco (Grand Island, NY, USA). Cell culture plates were obtained from Techno Plastic Products AG (Transandingen, Switzerland) and Ibidi (Gräfelfing, Germany). Fetal bovine serum (FBS), L-glutamine, dimethyl sulfoxide (DMSO), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate (CHAPS), ammonium persulfate, *N,N,N,N*-tetramethylethane-1,2-diamine (TEMED), 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol (Trizma base), sodium deoxycholate, DL-dithiothreitol, poly-L-ornithine, (S)-5-(4-hydroxy-3,5-dimethyl-phenyl)-indian-1-ol (PaPE-1), Tween 20, radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA), protease inhibitor cocktail, GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kits, SBI-0206965, Spautin-1, MRT68921, temsirolimus, hexafluoroisopropanol (HFIP), an Autophagy Assay Kit (MAK138), HAT Activity Fluorometric Assay Kit, Histone Deacetylase Assay Kit, anti-GAPDH (MAB374) and anti-MAP2 (M9942) antibodies were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Amyloid- β_{1-42} was obtained from rPeptide (Watkinsville, GA, USA). The RNeasy Mini Kit, EpiTect MethylLight PCR Kit, and EpiTect Bisulfite Kit were obtained from Qiagen (Hilden, Germany). The Mem-PER™ Plus Membrane Protein Extraction Kit, Alexa Fluor Plus 488-conjugated goat anti-mouse IgG antibody, High-Capacity cDNA-Reverse Transcription Kit, TaqMan Gene Expression Master Mix, and TaqMan probes for specific genes encoding *Hprt1*, *Actb*, *Gapdh*, *Becn1*, *Atg5*, *Atg7*, *Map1lc3a*, *Map1lc3b*, *Nup62*, *Ambra1*, *Esr1*, *Esr2*, *Gper1*, and *Cyp19a1* were obtained from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Sodium dodecyl sulfate (SDS), Bradford reagent, Laemmli sample buffer, 0.5 M Tris-HCl buffer, and 4–15% Mini-PROTEAN TGX Precast Protein Gels were purchased from Bio-Rad Laboratories (Munich, Germany). 2-Mercaptoethanol was obtained from Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Germany). Immobilon-P membranes were purchased from

Millipore (Bedford, MA, USA). A CYTO-ID Autophagy Detection Kit was purchased from Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, USA). The following: anti-BECN1 (sc-11427), anti-ATG7 (sc-376212), anti-MAP1LC3AB (sc-398822), anti-NUP62 (sc-48373), and anti-AMBRA1 (sc-398204) were purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA); and anti-ATG5 (ab108327) and Global DNA Methylation Assay Kit (5-methyl Cytosine, Colorimetric) were purchased from Abcam (Cambridge, UK). ELISA kits for ESR1/ER α (E1480Mo), ESR2/ER β (E1412Mo), and CYP19A1/Aromatase (E1861Mo) were purchased from BTLAB (Shanghai, China), and an ELISA kit for GPR30/GPER1 (ELK6933) was obtained from ELK Biotechnology (Denver, CO, USA).

Methods

Primary neuronal cell culture

Primary cell cultures were established using Swiss CD1 mice (Charles River Laboratory, Germany) following the procedures described previously.²⁷ In brief, the cortices of mouse embryos on the 15th day of gestation were fragmented and subjected to a 15-min incubation at 37 °C with 0.1% trypsin. Subsequently, cells were centrifuged for 5 min at 1,500 $\times$ g. The neuronal cells were then seeded onto multiwell plates coated with poly-L-ornithine (0.1 mg/ml) at a density of $\sim 2.0 \times 10^5$ cells/well. These cells were further cultivated in phenol red-free neurobasal medium supplemented with L-glutamine, B27 minus antioxidants, penicillin, and streptomycin. Cultures were maintained for 7 days at 37 °C under a humidified atmosphere with 5% CO₂. During the initial 2 days of culture, fetal bovine serum was incorporated into the culture medium. Animal handling and experimental procedures were conducted following the principles of the three Rs and in accordance with European Union legislation (Directive 2010/63/EU, amended by Regulation (EU) 2019/1010).

Treatment

A β_{1-42} was prepared as previously described.^{25,26,28} Nonspecific aggregates of A β_{1-42} were negated using hexafluoroisopropanol (HFIP). Subsequently, HFIP was removed under N₂ flux, and A β_{1-42} was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) to prepare a 5 mM stock solution, which was further dissolved. The obtained 80 μ M A β_{1-42} solution was then incubated overnight to induce aggregation. Aggregated A β_{1-42} was applied to the cell cultures in concentration of 10 μ M for 24 h. PaPE 1 (10 μ M) was then added for the following 6 h. In the set of experiments aiming to investigate the engagement of certain estrogen receptor types in the effects of PaPE-1, estrogen receptor antagonists, i.e., MPP (an ESR1 antagonist), PHTPP (an

ESR2 antagonist), and G15 (a GPER1 antagonist), were added 30 min before the addition of PaPE-1. Autophagy inhibitors spautin-1 (an USP10 and USP13 inhibitor), MRT68921 (an ULK1 and ULK2 inhibitor), SBI-0206965 (an ULK1 inhibitor), temsirolimus (a mTOR inhibitor) were applied to the cell cultures immediately after treatment with A β ₁₋₄₂. Chosen concentrations of estrogen receptors antagonists (MPP 1 μ M, PHTPP 1 μ M, and G15 10 μ M) and autophagy inhibitors (SBI-0206965 1 μ M, Spautin-1 1 μ M, MRT68921 1 μ M, Temsirolimus 1 μ M) did not affect cell condition in control cultures.^{29,7} DMSO was used as a solvent for all compounds at concentrations not exceeding 0.1% of the culture medium.

Immunofluorescence staining for MAP2

Cortical cells were cultured on glass coverslips and subjected to immunofluorescence labeling after the experiment. After fixation with a 4% paraformaldehyde solution in PBS for 15 min at room temperature, cells were incubated with blocking buffer (5% normal donkey serum and 0.3% Triton X-100 in 0.01 PBS) for 1 h. Cells were then incubated with the primary anti-MAP2 mouse antibody (1:100) for 24 h at 4 °C. Neuronal cells were then incubated with the secondary Alexa Fluor Plus 488-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (1:600). Finally, the microscopic preparations were washed with PBS, mounted, and cover-slipped. Cells were visualized using a Leica TCS SP8 WLL confocal laser scanning microscope (DMI8-CS, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). The integrated density was measured using an equal threshold for each experimental group using ImageJ software. The final results are presented as a percentage of the control $\pm$ SEM.

Assessment of caspase-3 activity

The activity of caspase-3 was measured as described previously.³⁰ In brief, samples were incubated with caspase assay buffer for 15 min at 4 °C, followed by incubation with a specific substrate for 60 min at 37 °C. The Ac-DEVD-pNA colorimetric substrate (N-acetyl-asp-glu-val-asp-p-nitroanilide) is cleaved by caspase-3, and the amount of the product, i.e., p-nitroanilide, is measured as the absorbance (wavelength = 405 nm). The levels of the caspase reaction products were measured with an Infinite M200PRO microplate reader (Tecan, Switzerland). The obtained data were analyzed with i-control software and normalized to the blank, and the final results are presented as a percentage of the control $\pm$ SEM.

Autophagosome detection

As previously described,³¹ the culture medium was removed after the experiment, and the

autophagosomes detection reagent was added to each well. Cells were incubated at 37 °C with 5% CO₂ for 1 h, and then washed three times with wash buffer. The fluorescence intensity was measured with an Infinite M200PRO microplate reader at excitation and emission wavelengths of 360 and 520 nm, respectively. The obtained results were analyzed with i-control software and normalized to the blank, and the final results are presented as a percentage of the control $\pm$ SEM.

Staining for autophagy vesicles and apoptotic chromatin condensation

For confocal microscopy, cells were grown on black 96-well culture plates with square wells and a flat, clear bottom. As recently described,⁷ the medium was removed after the experiment, and cells were washed with assay buffer. Subsequently, a CYTO-ID green detection kit containing a cationic amphiphilic tracer (CAT) dye and Hoechst 33342 was added to each well, followed by incubation at 37 °C in the dark. The CAT dye enabled the measurement of preautophagosomes, autophagosomes, and autophagolysosomes accumulation, while Hoechst 33342 enabled the measurement of apoptotic chromatin condensation. After 30 min, cells were washed with assay buffer. Living stained cells were visualized using a Leica TCS SP8 WLL confocal laser scanning microscope (DMI8-CS, Leica Microsystems) with an incubation chamber. To quantify the CYTO-ID signal corresponding to enhanced autophagy, the integrated density was measured with an equal threshold for each group using ImageJ software. The final results are presented as a percentage of the control $\pm$ SEM.

Western blot analysis

Following the experiment, neuronal cells were lysed in RIPA buffer with a protease inhibitor cocktail. After lysis, cells were sonicated to obtain a homogeneous solution, which was then centrifuged at 15,000 $\times g$ for 20 min at 4 °C. To determine the protein concentration, a Bradford assay was performed using Bradford reagent and bovine serum albumin as a standard. Subsequently, the samples were reconstituted and denatured in Laemmli sample buffer with addition of β -mercaptoethanol. The denatured samples underwent electrophoresis in 15-well SDS polyacrylamide gels (4–15%), followed by electrotransfer of proteins to PVDF membranes using a Bio-Rad Mini Trans-Blot apparatus, as previously described.³² To block nonspecific binding sites, the PVDF membranes were incubated for 2 h in a solution of dry milk (5%) and Tween-20 (0.2%) in 0.02 M Tris-buffered saline (TBS). The membranes were then incubated with the following primary antibodies diluted in TBS with Tween-20 (TBS-T) at 4 °C: anti-GAPDH mouse

monoclonal antibody (diluted 1:3500), anti-BECN1 mouse antibody (diluted 1:100), anti-ATG7 mouse antibody (diluted 1:800), anti-ATG5 rabbit antibody (diluted 1:1000), anti-P62 mouse antibody (diluted 1:90), anti-AMBRA1 mouse antibody (diluted 1:50), and anti-MAP1LC3AB mouse antibody (diluted 1:150). The membranes were then washed with TBS-T, followed by incubation for 1 h with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies diluted in TBS-T (1:3500 for GAPDH and 1:100 for the remaining proteins). The protein bands were detected using BM Chemiluminescence Blotting Substrate and visualized using a Luminescence Image Analyzer Fuji-Las 4000 (Fuji, Japan). Band intensity was quantified using the MultiGauge V3.0 program (ScienceLab). The final results are presented as a percentage of the control $\pm$ SEM.

ELISA

To obtain membrane and cytosolic fractions, a Mem-PER™ Plus Membrane Protein-Extraction Kit was used. Cells were washed with cell culture medium, harvested, and centrifuged for 5 min at $300 \times g$. After discarding the supernatant, cells were resuspended in Cell Wash Solution and centrifuged for 5 min at $300g$. The cell pellet was resuspended in permeabilization buffer, vortexed, and incubated for 10 min at 4°C . Cells were centrifuged at $16,000 \times g$ for 15 min at 4°C . The supernatant containing the cytosolic proteins was collected. The remaining material was resuspended in solubilization buffer, incubated for 30 min at 4°C with constant mixing, and centrifuged at $16,000 \times g$ for 15 min at 4°C . The obtained supernatant contained membrane proteins. For total protein extraction, a separate set of cells was subjected to lysis using RIPA buffer with a protease inhibitor cocktail. After lysis, cells were sonicated and centrifuged at $15,000 \times g$ for 20 min at 4°C . The collected protein samples were stored at -80°C .

The levels of ESR1, ESR2, GPER1, and CYP19A1 were evaluated using mouse-specific enzyme-linked immunosorbent assay according to the manufacturer's protocol. In each well, standards and samples were immobilized with biotin-conjugated polyclonal antibodies. Subsequently, streptavidin-HRP was added, followed by thorough washing with buffer. The reaction reached completion with the addition of substrate and an acidic stop solution, leading to a color transition from blue to yellow. The absorbance at 450 nm was measured using an Infinite M200PRO microplate reader, and the values were correlated with the concentrations of the specific proteins. The results are expressed as a percentage of the control value $\pm$ SEM and pg/mg or fg/mg of total protein.

mRNA expression analysis using qPCR

Total RNA was extracted from primary cell cultures using an RNeasy Mini Kit following the manufacturer's protocol as previously described.³³ The RNA was eluted with $40 \mu\text{l}$ of RNase-free water, and the RNA concentration was determined using a NanoDrop spectrophotometer (ND/1000UV/VIS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at 260 nm. The 260/280 ratio was assessed, and results close to 2.0 were considered indicative of pure RNA. Following isolation, the RNA extract was immediately reverse transcribed utilizing a CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit according to the manufacturer's protocol. The resulting cDNA was stored at -20°C overnight and subsequently utilized for quantitative polymerase chain reaction (qPCR). For the amplification of cDNA, FastStart Universal Probe Master with TaqMan Gene Expression Assays specific for *Becn1*, *Atg5*, *Atg7*, *Map1lc3a*, *Map1lc3b*, *Nup62*, *Ambra1*, *Esr1*, *Esr2*, *Gper1*, *Cyp19a1*, *Hprt1*, *Gapdh*, and *Actb* were used. The amplification mixture was composed of $10 \mu\text{l}$ of FastStart Universal Probe Master, $1 \mu\text{l}$ of cDNA as the template, $1 \mu\text{l}$ of the TaqMan Gene Expression Assay mix, and $8 \mu\text{l}$ of RNase-free water in a total volume of $20 \mu\text{l}$. qPCR was conducted using a CFX96 Real-Time system with the following thermocycler protocol: 2 min at 50°C ; 10 min at 95°C ; and 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C . The delta delta Ct method was used for data analysis. The *Hprt1* reference gene was determined using geNorm, NormFinder, and BestKeeper.

Analysis of methylation degree of specific genes

The methylation levels of the *Esr1*, *Esr2*, *Gper1*, *Atg7*, and *Becn1* gene promoter regions were quantified following established protocols.³⁴ Genomic DNA was extracted using GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kits, and its concentration was measured spectrophotometrically at 260 nm and at a 260/280 nm ratio using a NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer. An EpiTect Bisulfite Kit was used for the denaturation and bisulfite conversion of GC-rich DNA. The obtained samples were eluted in a $10 \mu\text{l}$ volume and subjected to MethyLight qPCR using the EpiTect MethyLight PCR Kit. The methylation regions within the promoters of selected genes were examined in CpG hot spots in the 5' flanking sequence (2000 bp). Primers for methylated and unmethylated target sequences were designed using Methyl Primer Express Software 1.0. TaqMan probes for the *Atg7*, *Becn1*, *Esr1*, *Esr2*, and *Gper1* promoters, as well as fully methylated and fully unmethylated probes, were designed. An internal reference set

for the *Hprt1* gene was designed to control DNA input. In the EpiTect MethyLight assays, the specific TaqMan probes incorporated FAMTM as the reporter dye. The degree of methylation for each sample was calculated by determining the threshold cycles and expressing the percentage of methylation using the following formula: $C_{\text{meth}} = 100/[1 + 2(\Delta C_{\text{t}_{\text{meth}}} - \Delta C_{\text{t}_{\text{unmeth}}})]$.

Measurement of global DNA methylation

Genomic DNA was isolated utilizing GenEluteTM Mammalian Genomic DNA Miniprep Kits. Subsequently, its concentration was assessed spectrophotometrically at wavelengths of 260 nm and at a 260/280 nm ratio, with values close to 1.8 considered as pure DNA, employing a NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer. The global DNA methylation was assessed using Global DNA Methylation Assay Kit 5-methyl Cytosine, Colorimetric. This ELISA-like assay involves binding DNA to strip-wells that are specially treated to exhibit a strong affinity for DNA. The assay involved the following steps: reference curve preparation, DNA binding, methylated DNA detection and signal measurement at 450 nm absorbance. The results were appropriately calculated and presented as 5-mC% (5-mC/Total DNA).

HAT activity measurement

Histone acetyltransferase (HAT) activity was assessed using the HAT Activity Fluorometric Assay Kit following the manufacturer's protocol and as previously described.³⁵ The reaction product of HAT activity interacts with the developer solution, producing a signal which was measured at the excitation and emission wavelengths 535 nm and 587 nm with an Infinite M200PRO microplate. The resulting values were directly proportional to the HAT activity in the samples. The results are expressed as a percentage of the control value $\pm$ SEM.

HDAC activity measurement

To verify HDAC activity, the Histone Deacetylase Assay Kit was used as described.³⁵ The kit offers a two-step workflow, where firstly, deacetylation of the acetylated lysine side chain by the HDAC-containing sample takes place, which is followed by the cleavage of the deacetylated substrate by the developer solution. Fluorescence was measured with an Infinite M200PRO microplate reader at excitation and emission wavelengths of 365 nm and 460 nm. The release of the highly fluorescent group was proportional to the deacetylation activity. The results are expressed as a percentage of the control value $\pm$ SEM.

Data analysis

Statistical analyses were conducted on the raw data, and the results are presented in various units depending on the assay as follows: mean fluorescence units per well containing 50,000 cells for caspase activity assessment and autophagosomes measurement; fluorescence units per 1.5 million cells for qPCR and specific gene methylation; and mean optical density per 10 μ g of protein for western blot assays; integrated density in selected area for MAP2 and CYTO-ID. Overall significance was determined using analysis of variance (ANOVA) preceded by Levene's test for homogeneity. Differences between the control and experimental groups were identified through a post-hoc Tukey HSD test. In case the assumptions for ANOVA were not met, Schreier-Ray-Hare test followed by Dunn post-hoc was conducted. Analyses were conducted using Statistica version 14.0.0.15 (TIBCO) and R version 4.1.3.

Statistically significant differences were denoted as follows: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ compared to control cultures; $\hat{p} < 0.05$, $\hat{\hat{p}} < 0.01$, and $\hat{\hat{\hat{p}}} < 0.001$ compared to cultures exposed to A β ; and $\&\& p < 0.01$ versus cells treated with A β and PaPE-1. The results are expressed as the mean $\pm$ SEM. F and p values for ANOVA can be found in the supplementary information List S1.

Results

PaPE-1 partially reverses the A β -induced reduction in MAP2 levels

In the present study, neuronal cells were treated with 10 μ M A β for 24 h, followed by the addition of 10 μ M PaPE-1 for an additional 6 h. MAP2 is a neuron-specific cytoskeletal protein. There was a decrease in MAP2 immunofluorescence staining in response to A β (52% of the control), while posttreatment with PaPE-1 partially reversed this decrease (68% of the control, [Figure 1a, b](#)). In control cells, PaPE-1 did not change the MAP2 immunofluorescence staining (Supplementary material Table S1).

A β -induced caspase-3 activity is stimulated by autophagy inhibitors, and A β -induced reduction in the level of autophagy vesicles is inhibited by PaPE-1

Exposure to 10 μ M A β increased the activity of caspase-3, a hallmark of apoptosis (approximately 135% of the control). Cotreatment with spautin-1 (an USP10 and USP13 inhibitor) and MRT68921 (an ULK1 and ULK2 inhibitor) increased A β -induced caspase-3 elevation to 150% and 170% compared to the control, respectively. Treatment with SBI-0206965 (an ULK1 inhibitor) or

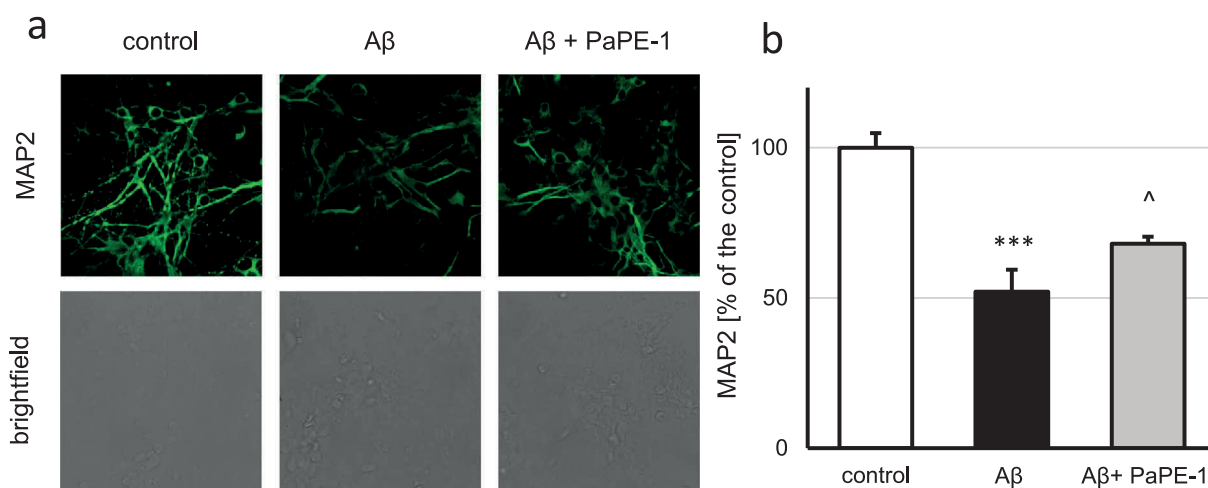


Figure 1. PaPE-1 (10 μ M) partially reversed the amyloid- β (A β)-induced (10 μ M) decrease in MAP2 immunofluorescence staining (green), bright field images are shown. For MAP2 immunofluorescent staining $n = 13$ biological replicates per group. The results are expressed as the mean $\pm$ SEM. *** $p < 0.001$ versus the control group; and ^ $p < 0.05$ versus the A β -treated group.

temsirolimus (a mTOR inhibitor) had no effect (Figure 2a).

Exposure to A β decreased autophagosomes level to 76% of that in the control group, while posttreatment with PaPE-1 counteracted the A β -induced changes, as shown by normalization of this parameter (96% of the control, Figure 2b). CYTO-ID is used to label vesicles at different stages of autophagy i.e., preautophagosomes, autophagosomes, and autophagolysosomes. Exposure to 10 μ M A β resulted in a decrease in CYTO-ID-positive autophagic vesicles (24% of the control), whereas PaPE-1 treatment partially reversed the observed changes (to 67% of the control, Figure 2c). Considering Hoechst 33342 staining, treatment with A β increased chromatin condensation, a hallmark of apoptosis, while treatment with PaPE-1 effectively reduced apoptotic chromatin condensation (Figure 2c).

Under control conditions, PaPE-1 did not alter autophagosomes formation or CYTO-ID-positive vesicles (Supplementary material Table S1). Rapamycin, which was used as a positive control, increased CYTO-ID staining to 176% compared to the control (Supplementary material Table S1).

In cells treated with A β , PaPE-1 upregulates autophagy-related proteins and mRNAs as well as decreases the methylation rate of *Atg7*

Autophagy-related factors were measured regarding protein levels, mRNA expression and DNA methylation. At the protein level, A β downregulated the expression of MAP1LC3AB (to 25% of the control) but increased the expression of ATG7 (to 236% of the control). However, A β did not affect the levels of other autophagy-related

factors, i.e., BECN1, ATG5, NUP62, or AMBRA1. Treatment with PaPE-1 counteracted the A β -induced changes in MAP1LC3AB by increasing its protein level from 25 to 65% of the control. In addition, in cells treated with A β PaPE-1 upregulated BECN1 level from 85 to 122% but did not affect the levels of the remaining autophagy-related proteins (Figure 3a).

Treatment with 10 μ M A β decreased the mRNA expression of *Atg7* (0.51-fold), while not affecting all the remaining autophagy-related mRNAs (*Becn1*, *Atg5*, *Nup62*, *Ambra1*, *Map1lc3a*, *Map1lc3b*). In cells treated with A β , PaPE-1 increased the expression of *Becn1* (from 0.68-fold to 1.61-fold), *Atg7* (from 0.51-fold to 2.08-fold), *Atg5* (from 0.70-fold to 1.52-fold), *Ambra1* (2.26-fold), and *Map1lc3b* (from 0.56-fold to 1.28-fold), but did not affect *Nup62* and *Map1lc3a* (Figure 3b).

DNA methylation is a crucial epigenetic modification that regulates gene expression, maintains genomic integrity, and plays important roles in development, differentiation, and disease. This process enables cells to modulate gene activity, selectively activating or silencing genes to ensure precise cellular function and identity. Under the control conditions, the *Atg7* methylation rate was 37% (Figure 3c). Treatment with A β increased the *Atg7* methylation rate to 81% and this value decreased to 32% after treatment with PaPE-1. Methylation rate of *Becn1* in the control conditions was 62% and it did not change in cells treated with A β alone or A β and PaPE-1.

In cells that were not treated with A β , PaPE-1 did not alter the protein levels of autophagy-related proteins (Supplementary material Table S3). As for mRNA expression, PaPE-1 upregulated the expression of *Atg7* (1.76-fold), *Map1lc3b* (1.85-

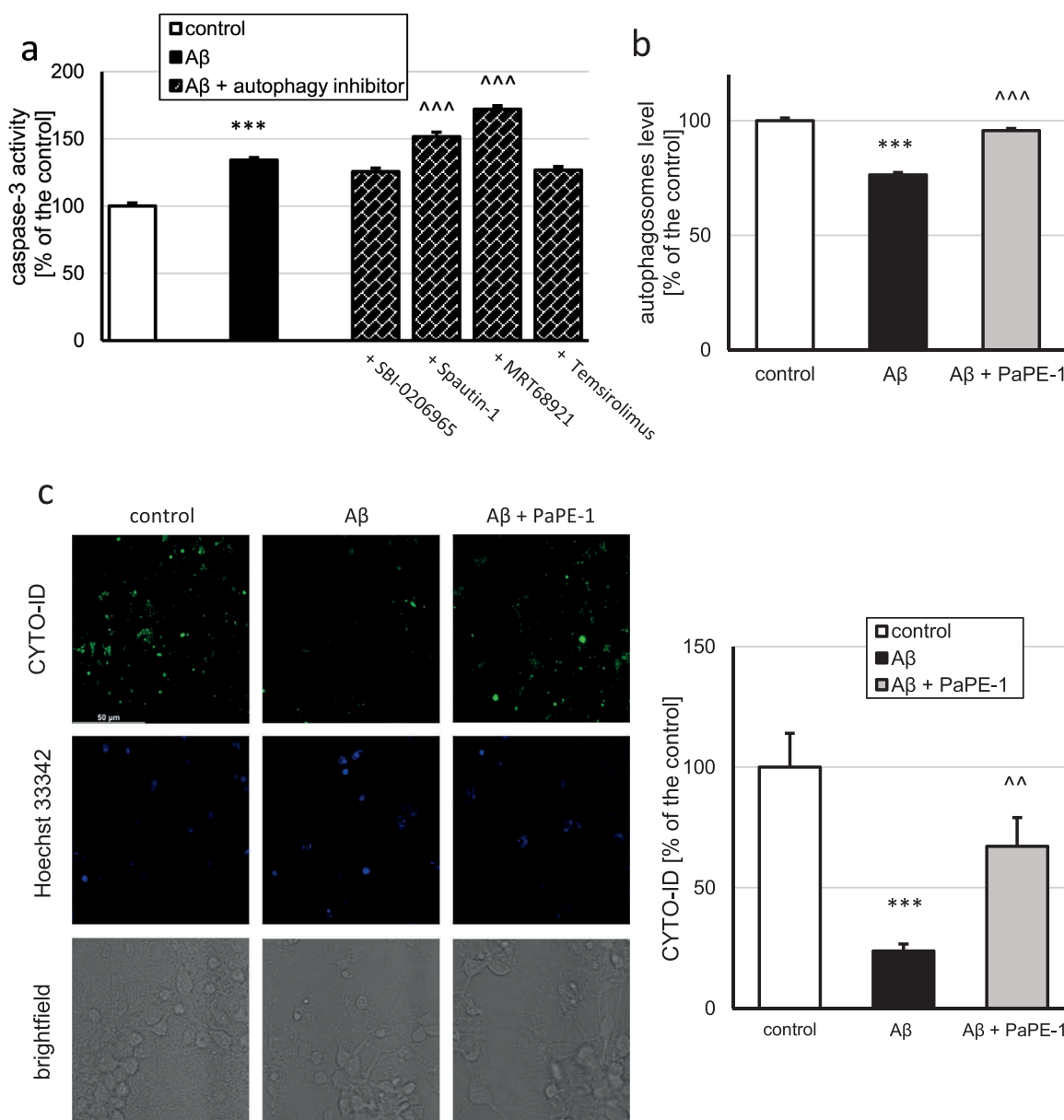


Figure 2. Caspase-3 activity increased in response to treatment with Aβ (10 μM) and was potentiated by the spautin-1 (an USP10 and USP13 inhibitor) and MRT68921 (an ULK1 and ULK2 inhibitor) autophagy inhibitors but not by SBI-0206965 (an ULK1 inhibitor) or temsirolimus (a mTOR inhibitor) (a). Treatment with 10 μM PaPE-1 reversed the Aβ-induced reduction in the level of autophagosomes (b) and CYTO-ID stained autophagy vesicles i.e., preautophagosomes, autophagosomes, and autophagolysosomes (c). The results are expressed as the mean ± SEM with $n = 10$ –12 replicates per group conducted in two independent experiments for caspase-3 activity; in two independent experiments with $n = 18$ biological replicates per group for autophagosomes formation, and $n = 10$ –14 biological replicates per group for CYTO-ID. *** $p < 0.001$ versus the control group; ^^ $p < 0.01$ and ^^ $p < 0.001$ versus the Aβ-treated group.

fold), and *Ambra1* (2.46-fold) but did not influence the other investigated mRNAs (Supplementary material Table S2). Neither the *Atg7* nor the *Becn1* methylation rates were changed by PaPE-1 in the control cultures (Supplementary material Table S4).

ESR1 antagonist partially abolishes PaPE-1-evoked decrease in Aβ-induced caspase-3 overactivity

As previously published, caspase-3 activity increases in response to Aβ and decreases upon

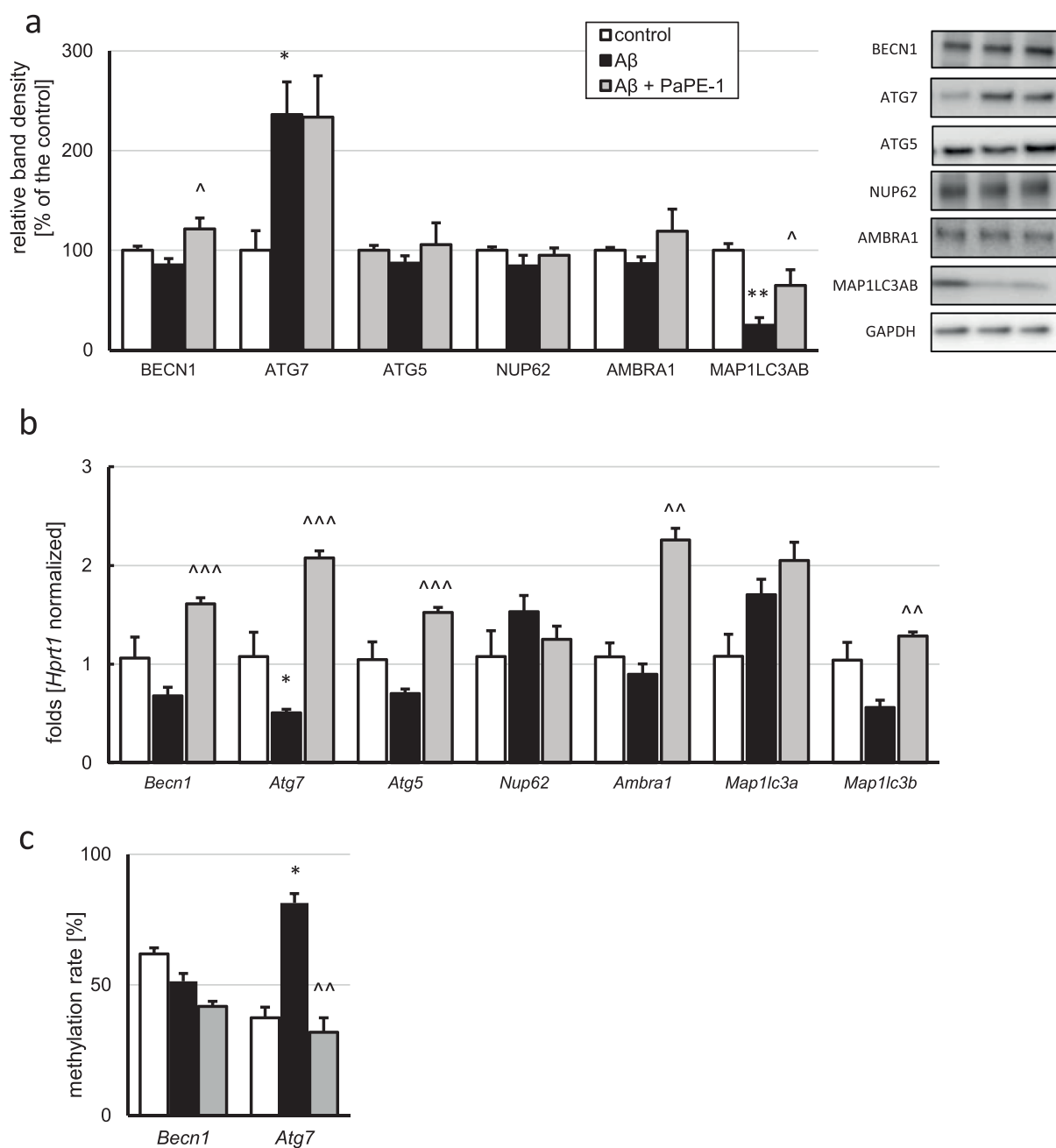


Figure 3. PaPE-1 (10 μ M) partially normalized A β -induced (10 μ M) changes in the expression of autophagy-related proteins (a) and mRNAs (b), as well as influenced DNA methylation of *Atg7* but not *Becn1* (c). The results are expressed as the mean $\pm$ SEM from $n = 5$ –6 independent samples run in 3 replicates. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ versus the control; and ^ $p < 0.05$, ^^ $p < 0.01$ and ^^ $p < 0.001$ versus A β -treated cells.

PaPE-1 treatment.²⁴ The present study investigated the impact of estrogen receptor antagonists on the PaPE-1-evoked decrease in caspase-3 activity (Figure 4). Firstly, we confirmed that PaPE-1 reduced the A β -induced caspase-3 overactivity, decreasing the value from 147% to 124% of the control. The ESR1 antagonist (MPP) reduced the extent of PaPE-1-induced neuroprotection to 137% of the control, while the ESR2 and GPER1 antagonists (PHTPP and G15, respectively) had no effect.

PaPE-1 upregulates ESR1 and ESR2 in the membrane fraction and counteracts A β -induced hypermethylation of the *Esr1* and *Esr2* genes

A β decreased the abundance of ESR1 and ESR2 in both the membrane (22 and 53% of the control, respectively) and cytosolic (53 and 52% of the control, respectively) fractions (Figure 5a, b). Treatment with PaPE-1 increased the expression of ESR1 and ESR2 in the membrane fraction (88

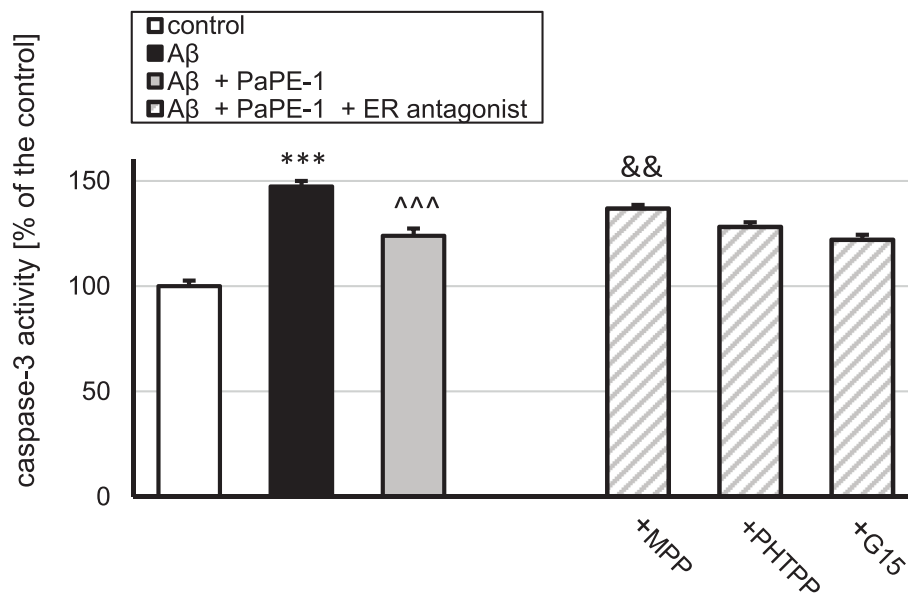


Figure 4. PaPE-1 partially decreased Aβ-induced (10 μM) increase in caspase-3 activity. Treatment with MPP (an ESR1 antagonist) partially inhibited 10 μM PaPE-1-evoked neuroprotective effect, while PHTPP (an ESR2 antagonist) and G15 (a GPER1 antagonist) had no effect. The results are expressed as the mean ± SEM from 2 independent experiments with $n = 11$ –12 replicates per group. *** $p < 0.001$ versus control cells; ^^ $p < 0.001$ versus Aβ-treated cells; && $p < 0.01$ versus cells treated with Aβ and PaPE-1.

and 193% of the control, respectively), but not in the cytosolic fraction.

Treatment with Aβ decreased *Esr1* (0.69-fold) but did not change *Esr2* expression (Figure 5c). In cells treated with Aβ, addition of PaPE-1 upregulated both *Esr1* (from 0.69-fold to 1.00-fold) and *Esr2* levels (from 0.89-fold to 1.64-fold).

The *Esr1* and *Esr2* methylation rates in the control group were 17 and 24%, respectively, while Aβ treatment increased these values to 80 and 48%, respectively (Figure 5d). PaPE-1 partially reversed the Aβ-induced changes in *Esr1* and *Esr2* methylation to 39 and 24%, respectively.

In control cells, PaPE-1 treatment affected only the membrane fraction of ESR1 (31% of the control) and ESR2 (132% of the control) but did not influence the cytosolic fraction of the receptors (Supplementary material Table S5). Under control conditions, PaPE-1 treatment did not alter *Esr1* or *Esr2* expression (Supplementary material Table S2). Moreover, PaPE-1 treatment did not influence the *Esr1* methylation rate but caused *Esr2* hypermethylation (Supplementary material Table S4).

Treatment with Aβ and/or PaPE-1 dysregulates the protein and mRNA levels of GPER1/*Gper1* and CYP19A1/*Cyp19a1*, as well as *Gper1* methylation

Treatment with Aβ downregulated GPER1 (62% of the control), while PaPE-1 treatment had no effect on this Aβ-induced change. CYP19A1

protein level did not change upon Aβ as well as addition of PaPE-1 to the Aβ-treated cells (Figure 6a).

Aβ treatment upregulated *Gper1* (3.5-fold) but did not affect *Cyp19a1* expression (Figure 6b). Posttreatment with PaPE-1 partially inhibited the Aβ-induced increase in *Gper1* (from 3.5- to 2.32-fold) and upregulated *Cyp19a1* expression (1.71-fold).

The basal methylation rate of *Gper1* was 11%, which was not affected by Aβ treatment but was increased in response to PaPE-1 (37%, Figure 6c).

Under control conditions, PaPE-1 treatment did not affect the CYP19A1 protein level (Supplementary material Table S5) but increased the mRNA expression of *Cyp19a1* (2.68-fold; Supplementary material Table S2). Under control conditions, PaPE-1 treatment decreased GPER1 (69% of the control) and caused hypermethylation of the *Gper1* gene promoter (Supplementary material Table S4), while not affecting *Gper1* mRNA expression.

The effects of Aβ and PaPE-1 on global DNA methylation, HAT and HDAC activities

5-methylcytosine (5-mC) is a specific form of DNA methylation where a methyl group is added to the 5th carbon atom of the cytosine ring in DNA. This modification is a key epigenetic marker involved in regulating various biological processes. Global DNA methylation was not affected by Aβ nor the

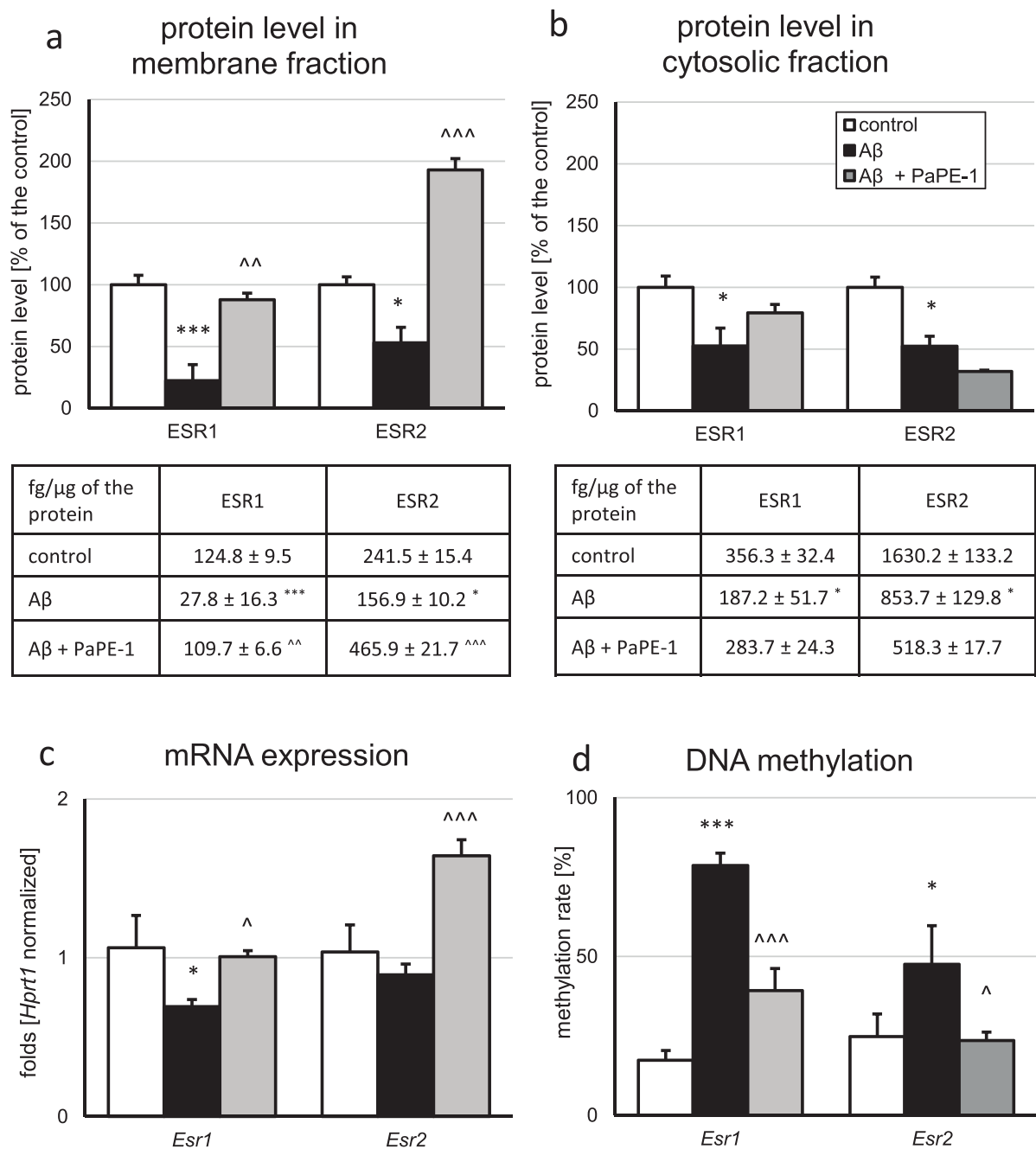


Figure 5. PaPE-1 (10 μ M) reversed the A β -evoked (10 μ M) decrease in ESR1 and ESR2 in the membrane fraction (a) but not in the cytosolic fraction (b). PaPE-1 also upregulated *Esr1* and *Esr2* mRNA levels (c) and partially reversed A β -induced DNA hypermethylation of *Esr1* and *Esr2*. The results are expressed as the mean $\pm$ SEM of $n = 5$ –6 biological replicates conducted in 3 technical replicates. * $p < 0.05$, and *** $p < 0.001$ versus control cells; and ^ $p < 0.05$ and ^^^ $p < 0.001$ versus A β -treated cells.

treatment of A β -treated cells with PaPE-1 (Figure 7a). HATs and HDACs dynamically regulate the acetylation status of histones, which in turn modulates chromatin structure and gene expression. This balance is crucial for normal cellular function and can be disrupted in various diseases. A β did not induce HAT activity change, but treatment with PaPE-1 induced an elevation of

HAT activity (136% of the control, Figure 7b). HDAC activity increased in A β -treated cells (130% of the control), but did not change when PaPE-1 was added (Figure 7c).

In the control conditions, PaPE-1 did not induce changes in HAT or HDAC activity but decreased global DNA 5-mC from 0.14 to 0.09 5-mC % (Supplementary material Table S6).

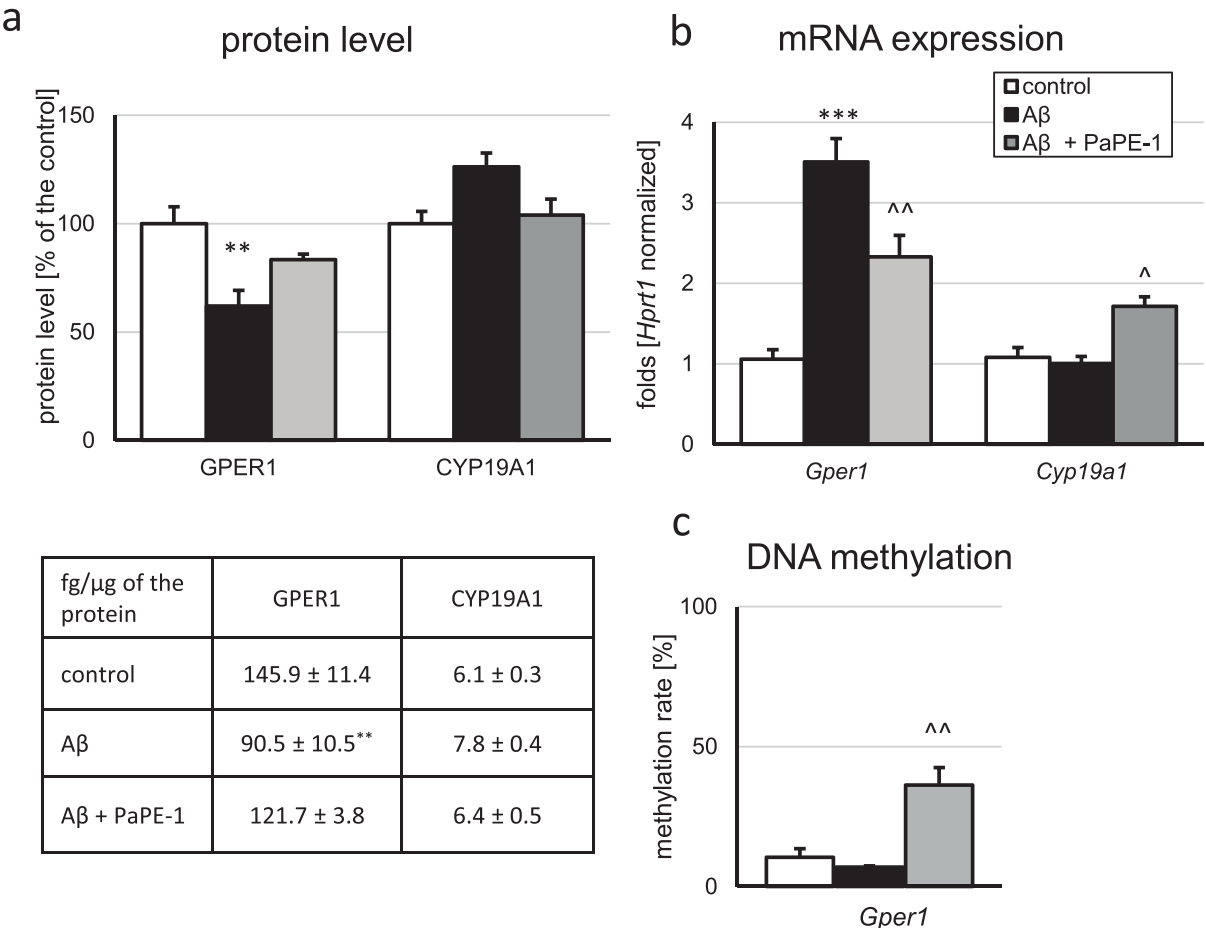


Figure 6. Treatment with Aβ (10 μM) and PaPE-1 (10 μM) affected GPER1/*Gper1* and CYP19A1/*Cyp19a1* protein (a) and mRNA (b) levels. DNA methylation of *Gper1* was not affected by Aβ alone, but PaPE-1 treatment induced hypermethylation (c). The results are expressed as the mean ± SEM of $n = 5-6$ biological replicates conducted in 3 technical replicates ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ versus control cells; and ^ $p < 0.05$, and ^^ $p < 0.01$ versus Aβ-treated cells.

Discussion

Although AD is a serious condition affecting millions of individuals worldwide, there are currently no effective treatment available. Recent findings have suggested that non-nuclear ER signaling represents promising therapeutic targets for central nervous system disorders, offering potential treatment without the severe side effects associated with the activation of nuclear ERs. Because estrogen signaling deficiency and autophagy process impairment have been linked to AD etiology, the present study aimed to investigate autophagy-related mechanisms of neuroprotection evoked by selective targeting of non-nuclear ER signaling pathways with PaPE-1 against Aβ-induced toxicity. Our recent findings have demonstrated that PaPE-1, a compound that selectively activates non-nuclear ER signaling pathways, provides neuroprotection in an Aβ-based cellular model of AD.^{25,26}

The present study further investigated the mechanisms underlying the neuroprotective effects of PaPE-1, demonstrating that PaPE-1 reverses Aβ-induced autophagy deficits (autophagic vesicles, *Atg7*, MAP1LC3AB), stimulates autophagy-related *Becn1*, *Atg5*, *Ambra1*, *Map1lc3b*, BECN1, and upregulates membrane ESR1/ERα and ESR2/ERβ, influencing the methylation of specific genes (*Atg7*, *Esr1* and *Esr2*), even when used in a delayed, clinically relevant paradigm.

The present study confirmed the neuroprotective capacity of PaPE-1 against AD pathology. Posttreatment with PaPE-1 partially reversed the Aβ-evoked decrease in MAP2 neuron-specific labeling. Soluble Aβ oligomers have been shown to induce time-dependent degradation of cytoskeletal proteins, including MAP2, via perturbation of Ca²⁺ homeostasis with subsequent calpain activation.³⁶ Decreased levels of MAP2 have been found in the hippocampus of the P301L

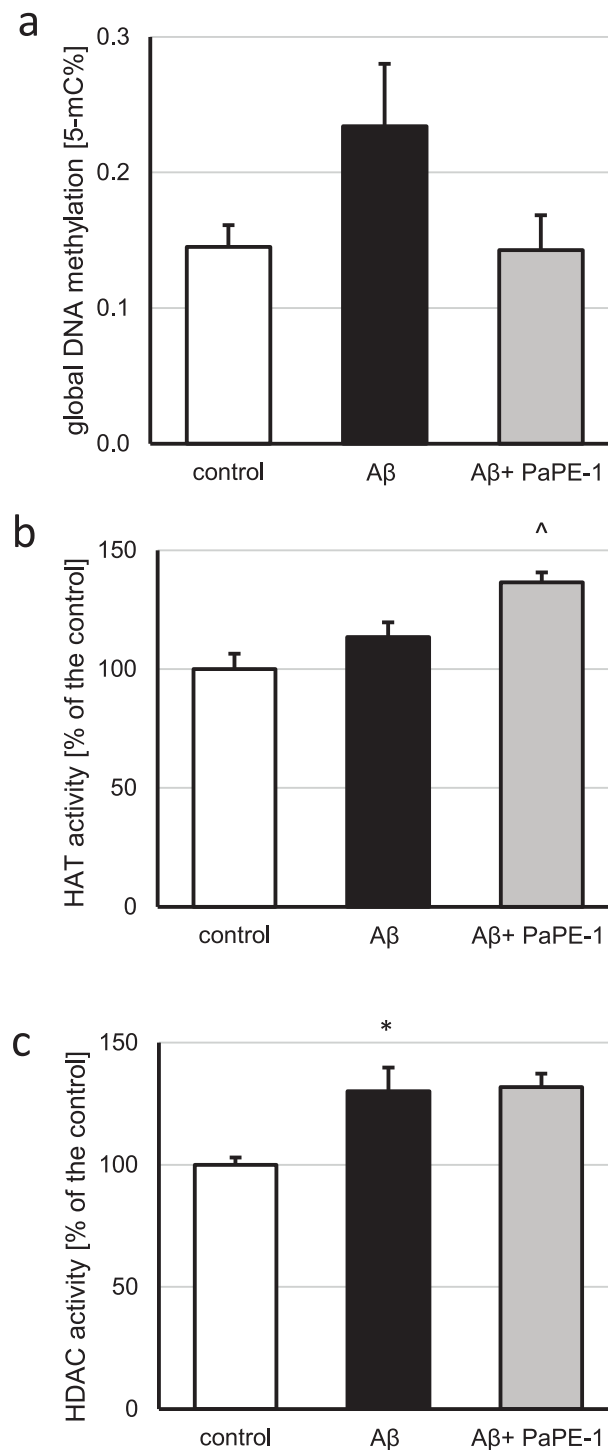


Figure 7. No changes in global DNA 5-methylcytosine (5-mC) were observed in response to Aβ (10 μM) nor PaPE-1 (10 μM) (a). PaPE-1 elevated histone acetyltransferase (HAT) activity (b) but did not change histone deacetylase (HDAC) activity which was increased in response to Aβ (c). The results are expressed as the mean ± SEM of $n = 4-5$ biological replicates. ^{*} $p < 0.05$ versus the control group; and [^] $p < 0.05$ versus the Aβ-treated group.

mouse model of AD³⁷ and in the parietal cortex of AD patients,³⁸ confirming the adequacy of the cellular model of AD used in the present study. However, no previous study has investigated the impact of PaPE-1 on the MAP2-dependent cytoskeleton in Aβ-challenged neuronal cells. Shah et al.³⁹ reported

that 17α-estradiol- and 17β-estradiol-induced changes in the microtubular system correlate with a decreased susceptibility of aging neurons to Aβ neurotoxicity; nonetheless, the authors did not discriminate between genomic and nongenomic effects of steroids.

For the first time, the present study demonstrated that posttreatment with PaPE-1 reversed the A β -evoked deficits in autophagic vesicles, as well as downregulation of autophagy-related *Atg7* mRNA and MAP1LC3AB protein, which was accompanied by hypomethylation of *Atg7* gene. *Atg7* gene hypomethylation corresponds to *Atg7* mRNA upregulation that supports stimulatory effect of PaPE-1 on autophagy during AD-related pathology. Thus, in neurons exposed to A β , the pro-autophagic effects of PaPE-1 may rely, at least partially, on epigenetic modifications of autophagy-related genes. Autophagy plays a crucial role in both the production and elimination of A β .⁴⁰ Previous data have indicated that increased autophagy in the early stages of AD plays a protective role in response to stress; however, as AD progresses, autophagolysosomes maturation and retrograde passage toward the neuronal cell body are impeded,⁴¹ and autophagic flux becomes compromised.⁴² By stimulating autophagy, membrane ESR1 (mER α) activation by 17 β -estradiol has been shown to protect SH-SY5Y cells against chronic minimal peroxide treatment⁴³ and 1-methyl-4-phenylpyridinium in a cellular model of Parkinson's disease.⁴⁴ In a tauopathy cellular model, mER α activation by 17 β -estradiol has been shown to improve tau clearance via autophagy induction,⁴⁵ similar to the pro-autophagic effect of mER-oriented PaPE-1 observed in the present study. Therefore, the present results indicated that treatment with PaPE-1 is an effective approach for overcoming A β -induced autophagy deficits, as evidenced by the normalization of autophagy-specific parameters in response to PaPE-1.

In addition to reversing A β -induced deficits in autophagy, PaPE-1 stimulated the mRNA and protein expression levels of other autophagy-related factors that were unaffected by A β , such as *Becn1*, *Atg5*, *Ambra1*, *Map1lc3b*, and *BECN1*. Beclin-1 levels have been demonstrated to decrease in the early stages of AD, and a heterozygous deletion of *Becn1* leads to an increase in both intracellular and extracellular A β accumulation.⁴⁶ Although PaPE-1 modulated *Becn1* mRNA and *BECN1* protein levels, it did not affect gene methylation, that suggests other regulatory mechanism of gene expression. Indeed, in present study, except for inhibiting DNA methylation of autophagy-related *Atg7* gene, PaPE-1 did not alter global DNA methylation but stimulated HAT activity in A β -treated cells. Increased HAT activity corresponds to highly acetylated histone, suggesting higher transcriptional activity and more gene products in response to PaPE-1 than in control conditions, as we observed in the autophagy-related genes examined. HAT activity may be beneficial in AD since TIP60, a factor belonging to HAT group has been suggested as neuroprotective in AD; its loss in APP transgenic *Drosophila* model of AD increases the APP transcriptional expression,

inducing neuronal apoptosis.⁴⁷ AD is characterized by dysregulation of histone acetylation reflecting an imbalance between HAT and HDAC activities.^{20,21} Reversing this imbalance through HDAC inhibition or HAT activation is gaining increasing attention as a promising therapeutic target for AD. Although in our study A β did not affect HAT activity, it induced HDAC activity which is known to counteract HAT and in this way may decrease acetylation of histone and non-histone proteins (e.g. α -tubulin). Similar effects were observed in post-mortem brain samples from patients with AD where HDAC2 and HDAC6 levels are elevated in particular regions of cortex and hippocampus^{48,49} which supports adequacy of AD model used in our experiments. It has been shown that reducing endogenous HDAC6 in an AD mouse model can restore learning and memory deficits and enhance α -tubulin acetylation.⁵⁰ Additionally, in an hAPP 3x Tg AD mouse model, HDAC inhibitors W2 and/or I2 have been shown to lower A β levels, decrease tau phosphorylation at Thr181, and enhance learning and memory.⁵¹ Therefore, one may assume that acetylation disturbances that may occur in response to A β could be indirectly altered by PaPE-1 via increasing the activity of HAT.

The interplay between the processes of apoptosis and autophagy seems of great importance in AD. In the present study, A β inhibited autophagy parameters but stimulated apoptotic parameters, such as chromatin condensation and caspase-3 activity. Furthermore, apoptosis-specific caspase-3 activity was accelerated in the presence of autophagy inhibitors (Spautin-1 and MRT68921), suggesting that apoptosis and autophagy are regulated in an opposite manner in the AD model. This observation is in line with other studies, e.g., autophagic impairment induced by leupeptin led to an increase in the number of apoptotic neurons in PS/APP mice,⁵² thus confirming the relevance of the processes investigated and the adequacy of the model used to mimic AD pathology. The induction of autophagy has been repeatedly shown to improve AD-related parameters. For example, activation of autophagy mitigates oxidative stress, apoptosis, and neurotoxicity induced by A β in human neuroblastoma SH-SY5Y and rat pheochromocytoma PC12 cells.^{53,54} In addition, the administration of rapamycin (an autophagy inducer) results in reduced intracellular A β levels and enhanced cognitive function in 3xTg-AD mice.⁵⁵ Furthermore, autophagy serves as a protective mechanism preserving cognitive integrity in non-demented individuals with AD neuropathology.⁵⁶ Therefore, the ability of PaPE-1 to promote autophagy and inhibit apoptosis supports the neuroprotective capacity of this compound and provides prospects for its therapeutic use against AD.

Although ERs are widely known for mediating neuroprotection, the involvement of mERs and nongenomic estrogen signaling in protecting

cerebral tissue from AD pathology has only been partially recognized. The present study demonstrated that the neuroprotective effect of PaPE-1 against A β , in addition to its anti-apoptotic and pro-autophagic effects, involves mERs, as evidenced by increased levels of membrane fraction receptors ESR1 and ESR2, which corresponds to upregulation of *Esr1* and *Esr2* mRNA levels and DNA hypomethylation of respective genes. In addition, the neuroprotective potential of PaPE-1 was partially lost in cells treated with MPP, an ESR1 antagonist. Similarly, loss of PaPE-1-induced effects has been demonstrated in *Esr1*-silenced cells (with mRNA degraded by siRNA) and in *Esr1*-knockout mice,²² suggesting that ESR1 is necessary for the effects of PaPE-1. Importantly, *Esr1* downregulation has been observed in blood samples from AD patients⁵⁷ and in postmortem AD brains,⁵⁸ where ESR1 colocalizes with neurofibrillary tangles and interacts with the tau protein. Tau overexpression hampers ESR1 transcriptional activity, indicating that tau inhibits ESR1-mediated neuroprotection in the AD brain.⁵⁹ Given that ESR1 also facilitates non-transcriptional effects, particularly when located in the membrane, treatment with PaPE-1 might serve to partially restore ESR1-associated neuroprotection, particularly in its non-genomic part.

In the present AD model, A β decreased the levels of both the cytosolic and membrane ER fractions, and PaPE-1 only counteracted the decrease in the levels of membrane-localized ERs, i.e., mER α and membrane ESR2 (mER β), thus supporting the specific orientation of the compound to nongenomic actions. Although PaPE-1 did not affect A β -evoked decrease in the level of cytosol-localized ESR2, it caused nearly twofold increase in the level of membrane ESR2 suggesting that in addition to ESR1, ESR2 may also contribute to the neuroprotective effect of PaPE-1. However, the use of selective antagonists showed that PaPE-1 engaged ESR1 but not ESR2 to cause neuroprotection against AD-related pathology. Knowing that internalization of the membrane-located ER is a measure of its activation,⁶⁰ we speculate that the lower level of ESR1 compared to ESR2 in the membrane fraction may suggest its continuous trafficking to the membrane and back present due to its activation. Accordingly, since in our model ESR2 is not involved in PaPE-1's effects on caspase-3 activity, its higher levels in the membrane fraction suggest the receptor translocation to the membrane but lack of its internalization/activation. Other studies have shown that in the human cortex and hippocampus, mER α associates with voltage-dependent anion-selective channel 1 (VDAC1) to induce VDAC1 inactivation, subsequently hindering A β cellular entry and A β -induced cell death.⁶¹ It has been reported that the disruption of mER α /VDAC1/IGF-1R β /Cav-1 signalosomes is more pronounced in advanced stages of AD, sug-

gesting increased susceptibility to protein misclustering and toxic cellular signaling.⁹ Thus, the present finding suggested that through selective upregulation of mERs, PaPE-1 mobilizes and/or restores A β -impaired ER signaling to protect neurons from AD pathology. According to the present results, PaPE-1 stimulated *Cyp19a1* mRNA expression in A β -treated cells. Compared to aromatase-expressing mice, APP23 mice with genetically induced aromatase deficiency exhibit faster and more severe A β plaque formation and less effective A β clearance.⁶² Assuming that brain-derived 17 β -estradiol (a result of aromatase activity) is able to counteract A β plaque formation, the PaPE-1-induced increase in *Cyp19a1* mRNA expression may serve as an additional pathway for neuroprotection.

In the present study, A β -induced hypermethylation of the *Esr1* and *Esr2* was reversed by PaPE-1, suggesting the involvement of epigenetic mechanisms in PaPE-1-evoked neuroprotection and control of AD pathology. PaPE-1 normalized *Esr2* methylation and substantially reduced *Esr1* methylation, accounting for the increased ERs mRNA which corresponds to greater protein levels present in the membrane fraction. In addition to the above receptors, PaPE-1 induced *Gper1* hypermethylation and reduced *Gper1* mRNA expression but not receptor protein level. Recently, methylation-dependent suppression of *Esr1* expression in peripheral blood has been linked to diminished cognitive function and reduced quality of life in AD patients.⁶³ Moreover, methylation of *Esr1*, *Esr2*, and *Gper1* in the dorsolateral prefrontal cortex (DLPFC) has been associated with AD-related cognitive and pathological traits, i.e., cognitive decline and enhanced tau tangle density.⁶⁴ In the present study, no changes in global 5-mC DNA methylation were observed in response to A β or posttreatment with PaPE-1, however, numerous studies have examined changes in global DNA methylation across different brain regions in individuals with AD.¹⁵ In brain tissue samples from the middle temporal gyrus and middle frontal gyrus of individuals with AD, global DNA methylation has been shown to be elevated compared to that in age-matched cognitively normal controls.^{65,66} Individuals with AD also have higher levels of DNA methylation in the frontal cortex and hippocampus than individuals without AD, i.e., cognitively normal controls.^{67,68} Conversely, Chouliaras et al.⁶⁹ reported a notable reduction in hippocampal DNA methylation in AD patients compared to that in unaffected, age-matched controls. However, there is no studies showing PaPE-1's effect on global DNA methylation in cerebral neurons, to compare with.

These original data have been obtained using mouse primary neuronal cells, which despite being widely accepted experimental system and an important advancement compared to immortalized cell lines, still holds some limitations. Firstly, the cells of mouse origin may not accurately predict

human neuronal responses, limiting the relevance of findings for clinical applications. Secondly, usage of 2D monocultures results in a simplistic representation of the CNS, devoid of supporting cells such as glial cells and 3D structural organization. In this study, the use of A β -based cellular AD model has been instrumental in advancing our understanding of the pathology, but it does not fully reflect the complexity of the disease. Regardless of these limitations, usage of such cellular system enabled identifying novel mechanisms of PaPE-1-evoked beneficial effects against AD pathology, which target epigenetic and autophagy-related processes. We anticipate that our cellular study will be complemented by the use of animal models of AD to verify effectiveness of PaPE-1 *in vivo* and address its potential clinical relevance.

Conclusions

In conclusion, the present study demonstrated that treatment with PaPE-1 promotes neuroprotection against A β -induced toxicity through stimulation of autophagy and the upregulation of mER α and mER β , that involved decrease in DNA methylation of respective genes. The present study proposes a novel therapeutic approach against AD that is based on the selective activation of non-nuclear ER signaling to overcome A β -induced autophagy deficits and normalize the epigenetic status of cerebral neurons.

CRedit authorship contribution statement

Bernadeta A. Pietrzak-Wawrzyńska: Writing – original draft, Validation, Investigation, Formal analysis, Data curation. **Agnieszka Wnuk:** Validation, Supervision, Investigation, Formal analysis, Data curation. **Karolina Przepiórska-Drońska:** Validation, Investigation, Formal analysis, Data curation. **Andrzej Łach:** Validation, Investigation, Formal analysis, Data curation. **Małgorzata Kajta:** Writing – original draft, Supervision, Funding acquisition, Conceptualization.

Funding

This study was supported by the National Science Centre of Poland (grant no. 2020/39/B/NZ7/00974) and the statutory fund of the Maj Institute of Pharmacology at the Polish Academy of Sciences in Krakow, Poland.

DATA AVAILABILITY

Data will be made available on request.

DECLARATION OF COMPETING INTEREST

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors thank Julita Wesołowska (Environmental Laboratory of *in vivo* and *in vitro* imaging of the Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences) for kindly helping with confocal microscopy. Graphical abstract has been created using biorender.com. The manuscript has been edited by American Journal Experts for English language and grammar 454E-1A5D-1C8A-3677-7849.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary material to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2025.168982>.

Received 3 October 2024;
Accepted 31 January 2025;
Available online 4 February 2025

Keywords:

Alzheimer's disease;
epigenetic mechanisms;
neuroprotection;
pathway preferential estrogen

Abbreviations:

ER, estrogen receptor; mER, membrane estrogen receptor; ESR1/ER α , estrogen receptor alpha; ESR2/ER β , estrogen receptor beta; AD, Alzheimer's disease; A β , amyloid beta; PaPE-1, pathway preferential estrogen-

1

References

- <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia> (accessed 09.08.2024).
- Anon., (2023). 2023 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* **19** (4), 1598–1695. <https://doi.org/10.1002/alz.13016>.
- Avgerinos, K.I., Manolopoulos, A., Ferrucci, L., Kapogiannis, D., (2024). Critical assessment of anti-amyloid- β monoclonal antibodies effects in Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis highlighting target engagement and clinical meaningfulness. *Sci. Rep.* **14** (1), 25741. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-75204-8>.

4. Knopman, D.S., Amieva, H., Petersen, R.C., et al., (2021). (2021) Alzheimer disease. *Nat. Rev. Dis. Primers* **7** (1), 33. <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00269-y>.
5. Chen, W., Sun, Y., Liu, K., Sun, X., (2014). Autophagy: a double-edged sword for neuronal survival after cerebral ischemia. *Neural Regen. Res.* **9** (12), 1210–1216. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.135329>.
6. Wnuk, A., Kajta, M., (2017). Steroid and xenobiotic receptor signalling in apoptosis and autophagy of the nervous system. *Int. J. Mol. Sci.* **18** (11), 2394. <https://doi.org/10.3390/ijms18112394>.
7. Przepiórska, K., Wnuk, A., Beyer, C., Kajta, M., (2023). Amorfutin B protects mouse brain neurons from hypoxia/ischemia by inhibiting apoptosis and autophagy processes through gene methylation- and miRNA-dependent regulation. *Mol. Neurobiol.* **60** (2), 576–595. <https://doi.org/10.1007/s12035-022-03087-9>.
8. Kesidou, E., Lagoudaki, R., Touloumi, O., Poulatsidou, K. N., Simeonidou, C., (2013). Autophagy and neurodegenerative disorders. *Neural Regen. Res.* **8** (24), 2275–2283. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-5374.2013.24.007>.
9. Canerina-Amaro, A., Hernandez-Abad, L.G., Ferrer, I., Quinto-Aleman, D., Mesa-Herrera, F., Ferri, C., Puertas-Avendano, R.A., Diaz, M., Marin, R., (2017). Lipid raft ER signalosome malfunctions in menopause and Alzheimer's disease. *Front. Biosci. (Schol. Ed.)* **9** (1), 111–126. <https://doi.org/10.2741/s476>.
10. Ali, N., Sohail, R., Jaffer, S.R., Siddique, S., Kaya, B., Atwoju, I., Imran, A., Wright, W., Pamulapati, S., Choudhry, F., Akbar, A., Khawaja, U.A., (2023). The role of estrogen therapy as a protective factor for Alzheimer's disease and dementia in postmenopausal women: a comprehensive review of the literature. *Cureus* **15**, (8) e43053 <https://doi.org/10.7759/cureus.43053>.
11. Rishabh, R.M., Bansal, S., Bansal, N., Chauhan, S., Sharma, S., Goyal, N., Gupta, S., (2024). Estrogen signalling and Alzheimer's disease: decoding molecular mechanisms for therapeutic breakthrough. *Eur. J. Neurosci.* **60** (1), 3466–3490. <https://doi.org/10.1111/ejn.16360>.
12. Ratnakumar, A., Zimmerman, S.E., Jordan, B.A., Mar, J. C., (2019). Estrogen activates Alzheimer's disease genes. *Alzheimers Dement (N Y)* **9** (5), 906–917. <https://doi.org/10.1016/j.trci.2019.09.004>.
13. Wnuk, A., Przepiórska, K., Pietrzak, B.A., Kajta, M., (2023). Emerging evidence on membrane estrogen receptors as novel therapeutic targets for central nervous system pathologies. *Int. J. Mol. Sci.* **24** (4), 4043. <https://doi.org/10.3390/ijms24044043>.
14. Xiang, J., Liu, X., Ren, J., Chen, K., Wang, H.L., Miao, Y. Y., Qi, M.M., (2019). How does estrogen work on autophagy?. *Autophagy* **15** (2), 197–211. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1520549>.
15. Yokoyama, A.S., Rutledge, J.C., Medici, V., (2017). DNA methylation alterations in Alzheimer's disease. *Environ. Epigenet.* **3**, (2)dvx008 <https://doi.org/10.1093/eep/dvx008>.
16. Gao, X., Chen, Q., Yao, H., Tan, J., Liu, Z., Zhou, Y., Zou, Z., (2022). Epigenetics in Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* **23**, (14)911635 <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.911635>.
17. Moore, L.D., Le, T., Fan, G., (2013). DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology* **38** (1), 23–38. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>.
18. Di Francesco, A., Arosio, B., Falconi, A., Micioni Di Bonaventura, M.V., Karimi, M., Mari, D., Casati, M., Maccarrone, M., D'Addario, C., (2015). Global changes in DNA methylation in Alzheimer's disease peripheral blood mononuclear cells. *Brain Behav. Immun.* **45**, 139–144. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.11.002>.
19. Panitch, R., Sahelijo, N., Hu, J., Nho, K., Bennett, D.A., Lunetta, K.L., Au, R., Stein, T.D., Farrer, L.A., Jun, G.R., (2024). APOE genotype-specific methylation patterns are linked to Alzheimer disease pathology and estrogen response. *Transl. Psychiatry* **14** (1), 129. <https://doi.org/10.1038/s41398-024-02834-x>.
20. Lu, X., Wang, L., Yu, C., Yu, D., Yu, G., (2015). Histone acetylation modifiers in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Front. Cell. Neurosci.* **16** (9), 226. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00226>.
21. Santana, D.A., Smith, M.A.C., (2023). Chen ES (2023) histone modifications in Alzheimer's disease. *Genes (Basel)* **14** (2), 347. <https://doi.org/10.3390/genes14020347>.
22. Madak-Erdogan, Z., Kim, S.H., Gong, P., Zhao, Y.C., Zhang, H., Chambliss, K.L., Carlson, K.E., Mayne, C.G., Shaul, P.W., Korach, K.S., Katzenellenbogen, J.A., Katzenellenbogen, B.S., (2016). Design of pathway preferential estrogens that provide beneficial metabolic and vascular effects without stimulating reproductive tissues. *Sci. Signal.* **9** (429), ra53. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aad8170>.
23. Selvaraj, U.M., Zuurbier, K.R., Whoolery, C.W., Plautz, E. J., Chambliss, K.L., Kong, X., Zhang, S., Kim, S.H., Katzenellenbogen, B.S., Katzenellenbogen, J.A., Mineo, C., Shaul, P.W., Stowe, A.M., (2018). Selective nonnuclear estrogen receptor activation decreases stroke severity and promotes functional recovery in female mice. *Endocrinology* **159** (11), 3848–3859. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00600>.
24. Wnuk, A., Przepiórska, K., Pietrzak, B.A., Kajta, M., (2021). Posttreatment strategy against hypoxia and ischemia based on selective targeting of nonnuclear estrogen receptors with PaPE-1. *Neurotox. Res.* **39** (6), 2029–2041. <https://doi.org/10.1007/s12640-021-00441-y>.
25. Wnuk, A., Przepiórska, K., Rzemieniec, J., Pietrzak, B., Kajta, M., (2020). Selective targeting of non-nuclear estrogen receptors with PaPE-1 as a new treatment strategy for Alzheimer's disease. *Neurotox. Res.* **38** (4), 957–966. <https://doi.org/10.1007/s12640-020-00289-8>.
26. Pietrzak-Wawrzyńska, B.A., Wnuk, A., Przepiórska-Drońska, K., Łach, A., Kajta, M., (2024). Posttreatment with PaPE-1 protects from Aβ-induced neurodegeneration through inhibiting the expression of Alzheimer's disease-related genes and apoptosis process that involves enhanced DNA methylation of specific genes. *Mol. Neurobiol.* **61** (7), 4130–4145. <https://doi.org/10.1007/s12035-023-03819-5>.
27. Messori, L., Camarri, M., Ferraro, T., Gabbiani, C., Franceschini, D., (2013). Promising in vitro anti-Alzheimer properties for a Ruthenium(III) complex (2013). *ACS Med. Chem. Lett.* **4** (3), 329–332. <https://doi.org/10.1021/ml3003567>.
28. Kajta, M., Litwa, E., Rzemieniec, J., Wnuk, A., Lason, W., Zelek-Molik, A., Nalepa, I., Grzegorzewska-Hiczwia, M., Tokarski, K., Golas, A., Guzik, E., Grochowalski, A., Szychowski, K.A., Wojtowicz, A.K., (2014). Isomer-nonspecific action of dichlorodiphenyltrichloroethane on

- aryl hydrocarbon receptor and G-protein-coupled receptor 30 intracellular signaling in apoptotic neuronal cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **392** (1–2), 90–105. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.05.008>.
29. Kajta, M., Rzemieniec, J., Litwa, E., Lason, W., Lenartowicz, M., Krzeptowski, W., Wójtowicz, A.K., (2013). The key involvement of estrogen receptor β and G-protein-coupled receptor 30 in the neuroprotective action of daidzein. *Neuroscience* **15** (238), 345–360. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.02.005>.
30. Kajta, M., Wójtowicz, A.K., Maćkowiak, M., Lasoń, W., (2009). Aryl hydrocarbon receptor-mediated apoptosis of neuronal cells: a possible interaction with estrogen receptor signaling. *Neuroscience* **158** (2), 811–822. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.10.045>.
31. Wnuk, A., Rzemieniec, J., Przepiórska, K., Wesołowska, J., Wójtowicz, A.K., Kajta, M., (2020). Autophagy-related neurotoxicity is mediated via AHR and CAR in mouse neurons exposed to DDE. *Sci. Total Environ.* **10**, (742) 140599 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140599>.
32. Wnuk, A., Rzemieniec, J., Litwa, E., Lasoń, W., Kajta, M., (2018). Prenatal exposure to benzophenone-3 (BP-3) induces apoptosis, disrupts estrogen receptor expression and alters the epigenetic status of mouse neurons. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **182**, 106–118. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.04.016>.
33. Wnuk, A., Rzemieniec, J., Lasoń, W., Krzeptowski, W., Kajta, M., (2018). Apoptosis induced by the UV filter benzophenone-3 in mouse neuronal cells is mediated via attenuation of $Er\alpha$ /Ppar γ and stimulation of $Er\beta$ /Gpr30 signaling. *Mol. Neurobiol.* **55** (3), 2362–2383. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0480-z>.
34. Wnuk, A., Rzemieniec, J., Przepiórska, K., Pietrzak, B.A., Maćkowiak, M., Kajta, M., (2021). Prenatal exposure to triclocarban impairs ESR1 signaling and disrupts epigenetic status in sex-specific ways as well as dysregulates the expression of neurogenesis- and neurotransmitter-related genes in the postnatal mouse brain. *Int. J. Mol. Sci.* **22** (23), 13121. <https://doi.org/10.3390/ijms222313121>.
35. Wnuk, A., Przepiórska, K., Pietrzak, B.A., Kajta, M., (2021). Post-treatment with amorfutin B evokes PPAR γ -mediated neuroprotection against hypoxia and ischemia. *Biomedicines* **9** (8), 854. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9080854>.
36. Ffrench, A., Spönnle, I., Koziol, V., Kriem, B., Yen Potin, F.T., Bihain, B.E., Olivier, J.L., Oster, T., Pillot, T., (2006). Microtubule-associated protein MAP1A, MAP1B, and MAP2 proteolysis during soluble amyloid beta-peptide-induced neuronal apoptosis. Synergistic involvement of calpain and caspase-3. *J. Biol. Chem.* **281** (1), 229–240. <https://doi.org/10.1074/jbc.M507378200>.
37. Kandimalla, R., Manczak, M., Yin, X., Wang, R., Reddy, P. H., (2018). Hippocampal phosphorylated tau induced cognitive decline, dendritic spine loss and mitochondrial abnormalities in a mouse model of Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* **27** (1), 30–40. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx381>.
38. Thubron, E.B., Rosa, H.S., Hodges, A., Sivaprasad, S., Francis, P.T., Pienaar, I.S., Malik, A.N., (2019). Regional mitochondrial DNA and cell-type changes in post-mortem brains of non-diabetic Alzheimer's disease are not present in diabetic Alzheimer's disease. *Sci. Rep.* **9** (1), 11386. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47783-4>.
39. Shah, R.D., Anderson, K.L., Rapoport, M., Ferreira, A., (2003). Estrogen-induced changes in the microtubular system correlate with a decreased susceptibility of aging neurons to beta amyloid neurotoxicity. *Mol. Cell. Neurosci.* **24** (2), 503–516. [https://doi.org/10.1016/s1044-7431\(03\)00166-0](https://doi.org/10.1016/s1044-7431(03)00166-0).
40. Nilsson, P., Saido, T.C., (2014). Dual roles for autophagy: degradation and secretion of Alzheimer's disease A β peptide. *Bioessays* **36** (6), 570–578. <https://doi.org/10.1002/bies.201400002>.
41. Nixon, R.A., (2007). Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *J. Cell Sci.* **120** (Pt 23), 4081–4091. <https://doi.org/10.1242/jcs.019265>.
42. Chung, K.M., Hernández, N., Sproul, A.A., Yu, W.H., (2019). Alzheimer's disease and the autophagic-lysosomal system. *Neurosci. Lett.* **1** (697), 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.05.017>.
43. Barbati, C., Pierdominici, M., Gambardella, L., Malchiodi Albedi, F., Karas, R.H., Rosano, G., Malorni, W., Ortona, E., (2012). Cell surface estrogen receptor alpha is upregulated during subchronic metabolic stress and inhibits neuronal cell degeneration. *PLoS One* **7**, (7) e42339 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042339>.
44. Li, X.Z., Sui, C.Y., Chen, Q., Chen, X.P., Zhang, H., Zhou, X.P., (2015). Upregulation of cell surface estrogen receptor alpha is associated with the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase activity and promotes autophagy maturation. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8** (8), 8832–8841.
45. Costa, A.J., Oliveira, R.B., Wachilewski, P., Nishino, M.S., Bassani, T.B., Stilhano, R.S., Cerutti, J.M., Nozima, B., Porto, C.S., Pereira, G.J.D.S., Ramirez, A.L., Smaili, S.S., Ureshino, R.P., (2022). Membrane estrogen receptor ER α activation improves tau clearance via autophagy induction in a tauopathy cell model. *Brain Res.* **15**, (1795)148079 <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2022.148079>.
46. Pickford, F., Masliah, E., Britschgi, M., Lucin, K., Narasimhan, R., Jaeger, P.A., Small, S., Spencer, B., Rockenstein, E., Levine, B., Wyss-Coray, T., (2008). The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice. *J. Clin. Invest.* **118** (6), 2190–2199. <https://doi.org/10.1172/JCI33585>.
47. Pirooznia, S.K., Sarthi, J., Johnson, A.A., Toth, M.S., Chiu, K., Koduri, S., Elefant, F., (2012). Tip60 HAT activity mediates APP induced lethality and apoptotic cell death in the CNS of a Drosophila Alzheimer's disease model. *PLoS One* **7**, (7)e41776 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041776>.
48. Gräff, J., Rei, D., Guan, J.S., Wang, W.Y., Seo, J., Hennig, K.M., Nieland, T.J., Fass, D.M., Kao, P.F., Kahn, M., Su, S. C., Samiei, A., Joseph, N., Haggarty, S.J., Delalle, I., Tsai, L.H., (2012). An epigenetic blockade of cognitive functions in the neurodegenerating brain. *Nature* **483** (7388), 222–226. <https://doi.org/10.1038/nature10849>.
49. Ding, H., Dolan, P.J., Johnson, G.V., (2008). Histone deacetylase 6 interacts with the microtubule-associated protein tau. *J. Neurochem.* **106** (5), 2119–2130. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05564.x>.
50. Govindarajan, N., Rao, P., Burkhardt, S., Sananbenesi, F., Schlüter, O.M., Bradke, F., Lu, J., Fischer, A., (2013). Reducing HDAC6 ameliorates cognitive deficits in a mouse model for Alzheimer's disease. *EMBO Mol. Med.* **5** (1), 52–63. <https://doi.org/10.1002/emmm.201201923>.

51. Sung, Y.M., Lee, T., Yoon, H., DiBattista, A.M., Song, J.M., Sohn, Y., Moffat, E.I., Turner, R.S., Jung, M., Kim, J., Hoe, H.S., (2012). Mercaptoacetamide-based class II HDAC inhibitor lowers A β levels and improves learning and memory in a mouse model of Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* **239**, 192–201. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.10.005>.
52. Yang, D.S., Kumar, A., Stavrides, P., Peterson, J., Peterhoff, C.M., Pawlik, M., Levy, E., Cataldo, A.M., Nixon, R.A., (2008). Neuronal apoptosis and autophagy cross talk in aging PS/APP mice, a model of Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* **173** (3), 665–681. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.071176>.
53. Singh, A.K., Bissoyi, A., Kashyap, M.P., Patra, P.K., Rizvi, S.I., (2017). Autophagy activation alleviates amyloid- β -induced oxidative stress, apoptosis and neurotoxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurotox. Res.* **32** (3), 351–361. <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9746-5>.
54. Yuan, H., Jiang, C., Zhao, J., Zhao, Y., Zhang, Y., Xu, Y., Gao, X., Guo, L., Liu, Y., Liu, K., Xu, B., Sun, G., (2018). Euxanthone attenuates A β 1-42-induced oxidative stress and apoptosis by triggering autophagy. *J. Mol. Neurosci.* **66** (4), 512–523. <https://doi.org/10.1007/s12031-018-1175-2>.
55. Caccamo, A., Majumder, S., Richardson, A., Strong, R., Oddo, S., (2010). Molecular interplay between mammalian target of rapamycin (mTOR), amyloid-beta, and Tau: effects on cognitive impairments. *J. Biol. Chem.* **285** (17), 13107–13120. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.100420>.
56. Tumurbaatar, B., Fracassi, A., Scaduto, P., Guptarak, J., Woltjer, R., Jupiter, D., Tagliatela, G., (2023). Preserved autophagy in cognitively intact non-demented individuals with Alzheimer's neuropathology. *Alzheimers Dement.* **19** (12), 5355–5370. <https://doi.org/10.1002/alz.13074>.
57. Güven, G., Köseoğlu-Büyükkaya, P., Kılıç, M., Uzun, D., Çavuş, B., Güçlü-Geyik, F., Lohmann, E., Samancı, B., Gürvit, H., Hanağası, H., Bilgiç, B., (2023). Association of estrogen receptor 1 PvuII and XbaI polymorphisms and peripheral estrogen receptor 1 mRNA levels with Alzheimer's disease in Turkish patients. *Turk. J. Neurol.* **29** (3), 195–203. <https://doi.org/10.4274/tnd.2023.70481>.
58. Ishunina, T.A., Fischer, D.F., Swaab, D.F., (2007). Estrogen receptor alpha and its splice variants in the hippocampus in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **28** (11), 1670–1681. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.07.024>.
59. Wang, C., Zhang, F., Jiang, S., Siedlak, S.L., Shen, L., Perry, G., Wang, X., Tang, B., Zhu, X., (2016). Estrogen receptor- α is localized to neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Sci. Rep.* **3** (6), 20352. <https://doi.org/10.1038/srep20352>.
60. Bondar, G., Kuo, J., Hamid, N., Micevych, P., (2009). Estradiol-induced estrogen receptor-alpha trafficking. *J. Neurosci.* **29** (48), 15323–15330. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2107-09.2009>.
61. Sato, K., Takayama, K.I., Inoue, S., (2023). Expression and function of estrogen receptors and estrogen-related receptors in the brain and their association with Alzheimer's disease. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **4**, (14)1220150. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1220150>.
62. Yue, X., Lu, M., Lancaster, T., Cao, P., Honda, S., Staufenbiel, M., Harada, N., Zhong, Z., Shen, Y., Li, R., (2005). Brain estrogen deficiency accelerates Abeta plaque formation in an Alzheimer's disease animal model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102** (52), 19198–19203. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505203102>.
63. Li, K.X., Sun, Q., Wei, L.L., Du, G.H., Huang, X., Wang, J. K., (2019). ER α gene promoter methylation in cognitive function and quality of life of patients with Alzheimer disease. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* **32** (4), 221–228. <https://doi.org/10.1177/0891988719835325>.
64. Oveisgharan, S., Yang, J., Yu, L., Burba, D., Bang, W., Tasaki, S., Grodstein, F., Wang, Y., Zhao, J., De Jager, P. L., Schneider, J.A., Bennett, D.A., (2023). Estrogen receptor genes, cognitive decline, and Alzheimer disease. *Neurology* **100** (14), e1474–e1487. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000206833>.
65. Coppieters, N., Dragunow, M., (2011). Epigenetics in Alzheimer's disease: a focus on DNA modifications. *Curr. Pharm. Des.* **17** (31), 3398–3412. <https://doi.org/10.2174/138161211798072544>.
66. Coppieters, N., Dieriks, B.V., Lill, C., Faull, R.L., Curtis, M. A., Dragunow, M., (2014). Global changes in DNA methylation and hydroxymethylation in Alzheimer's disease human brain. *Neurobiol. Aging* **35** (6), 1334–1344. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.11.031>.
67. Rao, J.S., Keleshian, V.L., Klein, S., Rapoport, S.I., (2012). Epigenetic modifications in frontal cortex from Alzheimer's disease and bipolar disorder patients. *Transl. Psychiatry* **2** (7), e132. <https://doi.org/10.1038/tp.2012.55>.
68. Bradley-Whitman, M.A., Lovell, M.A., (2013). Epigenetic changes in the progression of Alzheimer's disease. *Mech. Ageing Dev.* **134** (10), 486–495. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2013.08.005>.
69. Chouliaras, L., Mastroeni, D., Delvaux, E., Grover, A., Kenis, G., Hof, P.R., Steinbusch, H.W., Coleman, P.D., Rutten, B.P., van den Hove, D.L., (2013). Consistent decrease in global DNA methylation and hydroxymethylation in the hippocampus of Alzheimer's disease patients. *Neurobiol. Aging* **34** (9), 2091–2099. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.02.021>.