

Choroba Alzheimera (ChA) jest neurodegeneracyjnym schorzeniem, które stanowi ponad połowę wszystkich przypadków demencji na świecie. Do głównych przyczyn ChA zalicza się zmiany w ekspresji i metabolizmie białka prekursorowego amyloidu  $\beta$  (APP), prowadzące do powstawania peptydu amyloidu  $\beta$  ( $A\beta$ ), który występuje w postaci rozpuszczalnych monomerów, oligomerów oraz nierozpuszczalnych fibryli i płytek starczych. Choć te ostatnie są cechą charakterystyczną kory mózgowej i hipokampa chorych na ChA, to liczne badania wskazują na oligomery ( $A\beta$ ) jako najbardziej patogenną formę  $A\beta$ . Jednym z celów toksycznego działania  $A\beta$  są mitochondria, których dysfunkcje i upośledzoną morfologię obserwuje się już we wczesnym stadium choroby. Zaburzenia mitochondrialne prowadzą do zwiększonej ekspresji białek proapoptotycznych i obniżonej ekspresji białek antyapoptotycznych, hamowania szlaku PI3K/AKT/GSK3 $\beta$  i ostatecznie do apoptozy neuronów. Co więcej,  $A\beta$  powoduje nadmierną aktywację mikrogleju, związaną ze zwiększonym uwalnianiem cytokin prozapalnych, co nasila neurotoksyczność  $A\beta$ .

Wyżej wymienionym zmianom towarzyszy zaburzony metabolizm prożyciowego bioaktywnego sfingolipidu, sfingozyno-1-fosforanu (S1P) i S1P-zależnego przekąźnictwa poprzez specyficzne receptory (S1PR<sub>1-5</sub>). Wykazano, że modulacja czterech z pięciu receptorów dla S1P (S1PR<sub>1,3,4,5</sub>) przez fingolimod (FTY720), lek zatwierdzony do leczenia stwardnienia rozsianego, łagodzi niektóre zmiany. Inny, bardziej selektywny (S1PR<sub>1,5</sub>) lek z tej rodziny, siponimod (BAF312), nie został jeszcze przebadany w ChA. Dlatego głównym celem tego projektu jest porównanie wpływu obu modulatorów, fingolimodu i siponimodu, na funkcję mitochondriów, śmierć i przeżywalność komórek oraz zmiany zapalne w komórkowym modelu ChA wywołanym podaniem  $A\beta$ . Dodatkowo zostanie przeanalizowana rola poszczególnych receptorów S1P w wyżej wymienionych procesach, co pozwoli wyjaśnić ewentualne różnice w neuroprotektoryjnym działaniu badanych modulatorów.

Mysie linie neuronalnych komórek hipokampa (HT22) i komórek mikrogleju (BV2), traktowane  $A\beta$  zostaną wykorzystane w obecnym projekcie jako komórkowy model ChA. Następnie komórki zostaną potraktowane ufosforylowaną (aktywną farmakologicznie) formą fingolimodu, siponimodem i selektywnymi agonistami receptorów S1P: ponesimodem (dla S1PR<sub>1</sub>), CYM5541 (dla S1PR<sub>3</sub>), CYM50308 (dla S1PR<sub>4</sub>) i A-971432 (dla S1PR<sub>5</sub>). Na początku sprawdzony zostanie wpływ  $A\beta$  na poziom mRNA i białka receptorów dla S1P (S1PR<sub>1,3,4,5</sub>). Funkcja mitochondriów zostanie oceniona na podstawie pomiaru potencjału błony mitochondrialnej, aktywności metabolicznej i wewnątrzkomórkowego poziomu wolnych rodników. Ocena śmierci i przeżywalności komórek będzie przeprowadzona na podstawie znakowania komórek aneksyną V/jodkiem propidyny (PI), analizy poziomu mRNA i białka wybranych białek pro- i antyapoptotycznych, jak również analizy poziomu białka i stopnia ufosforylowania białek PI3K, AKT i GSK3 $\beta$ . Analiza poziomu mRNA i białka wybranych cytokin prozapalnych wraz z obserwacją mikroskopową zostaną przeprowadzone w celu oceny zmian zapalnych.

Wyniki uzyskane w ramach tego projektu dostarczą wiedzy na temat skuteczności dwóch modulatorów receptorów dla S1P w łagodzeniu wybranych toksycznych skutków działania  $A\beta$ . Ponadto, projekt przyczyni się do lepszego zrozumienia roli poszczególnych receptorów dla S1P w toksyczności indukowanej przez  $A\beta$ , co może być przydatne przy opracowywaniu nowych leków do terapii ChA.