

**Autoreferat**

**dr Aleksandra Rutkowska**

**Czerwiec 2023 r.**

### 1. Imię i nazwisko

Aleksandra Rutkowska

### 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

2015 r. - tytuł **Doctoratus in Philosophia Ph.D.** (łac.) nadany przez Wydział Medyczny na *Trinity College Dublin* w Republice Irlandii

Tytuł pracy doktorskiej:

*"The Signalling and Function of EBI2 in the Central Nervous System"* (ang.)

"Sygnalizacja oraz funkcja EBI2 w ośrodkowym układzie nerwowym"

2011 r. - tytuł **Magisterii in Scientiis M.Sc.** (łac.) ze specjalizacją z neuronauki nadany przez *Trinity College Dublin, Trinity College Institute of Neuroscience (TCIN)* w Republice Irlandii

Tytuł pracy magisterskiej:

*"The Potential of SIP Agonists to Reduce LPS-induced Cellular Stress in Microglia"* (ang.)

"Potencjał agonistów S1P w zmniejszaniu stresu komórkowego wywołanego przez LPS w mikrogleju"

2010 r. - tytuł **Magisterii in Scientiis M.Sc.** (łac.) ze specjalizacją w stosowanych metodach badań społecznych nadany przez *Trinity College Dublin* w Republice Irlandii

Tytuł pracy magisterskiej:

*"An investigation of the relationship between the constructs of depression and vital exhaustion in cardiac patients"* (ang.)

"Badanie związku między konstruktami depresji i wyczerpaniem życiowym u pacjentów kardiologicznych"

2008 r. - tytuł **Bachelor of Arts Hons.** (*First Class Honours*, ang.) licencjat z wyróżnieniem w dziedzinie psychologii nadany przez *Higher Education and Training Awards Council* po ukończeniu studiów licencjackich w *Dublin Business School* w Republice Irlandii

### 3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- |                   |   |
|-------------------|---|
| 12.2022 – teraz   | <b>Z-ca Kierownika Badań</b> , Centrum Chorób Mózgu, Gdański Uniwersytet Medyczny   |
| 04.2020 – teraz   | <b>Adiunkt</b> , Wydział Lekarski, Katedra Anatomii, Zakład Anatomii i Neurobiologii, Gdański Uniwersytet Medyczny                  |
| 01.2023 – 06.2023 | <b>Specjalista ds. inicjatywy "Science Speed Dating"</b> , Gdański Uniwersytet Medyczny   |
| 03.2016 – 03.2019 | <b>Adiunkt</b> , Wydział Lekarski, Katedra Biochemii Klinicznej, Zakład Medycyny Laboratoryjnej, Gdański Uniwersytet Medyczny       |
| 11.2014 – 12.2015 | <b>Post-doctoral Fellow</b> , Wydział Medyczny, Katedra Gerontologii Medycznej, <i>Trinity College Dublin</i> , Republika Irlandii. |

- 10.2011 – 09.2014 **Doktorant**, Wydział Medyczny, Katedra Fizjologii, *Trinity College Dublin, Trinity Biomedical Sciences Institute*, Republika Irlandii
- 10.2011- 09.2014 **Doktorant**, *Novartis Institutes for Biomedical Research (NIBR), Novartis Pharmaceuticals*, Bazylea, Szwajcaria
- 09.2014 – 06.2015 **Asystent**, Katedra Fizjologii, *Dublin Institute of Technology (DIT)*, Dublin, Republika Irlandii
- 06.2010 – 08.2010 **Stażysta**, dział *Drug Discovery Pharmacology & Pre-clinical, Actelion Pharmaceuticals*, Bazylea, Szwajcaria
- 04.2009 – 08.2009 **Stażysta**, Katedra Psychologii, *Royal College of Surgeons (RCSI)*, Dublin, Republika Irlandii

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.). Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.

**Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2b ustawy.**

Tytuł osiągnięcia naukowego:

***"Badanie nowych potencjalnych celów terapeutycznych i ich zastosowanie w procesie odbudowy mieliny oraz terapii stwardnienia rozsianego."***

Podstawą rozprawy habilitacyjnej jest cykl czterech oryginalnych artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. We wszystkich pracach wchodzących w cykl jestem autorem korespondencyjnym. Prace powstały po zakończeniu stażu podoktorskiego w Irlandii i po powrocie do Polski.

1. Velasco-Estevez M., Koch N., Klejbor I., Laurent S., Dev K.K., Szutowicz A., Sailer A. W., **Rutkowska A.\*** EBI2 is temporarily upregulated in MO3.13 oligodendrocytes during maturation and regulates remyelination in the organotypic cerebellar slice model. *Int. J. Mol. Sci.* 2021: vol. 22, nr 9, art. ID 4342, s. 1-15

**\*autor korespondencyjny**

**[IF: 6,208; MEiN: 140]**

Mój wkład w powstanie tej pracy obejmował: współ-opracowanie koncepcji zagadnienia badawczego i sformułowanie hipotez badawczych; nawiązanie współprac z naukowcami w Polsce i za granicą; rekrutację, szkolenie i nadzorowanie magistrantki i doktorantki; uzyskanie zgody komisji bioetycznej na przeprowadzenie badań; pozyskanie materiału i innych zasobów potrzebnych do przeprowadzenia badań (ludzkiej mózgowi osób zmarłych na SM i kontrolnych z biobanku z USA; oligodendrocytów MO3.13; myszy C57BL/6; mikrogleju i

progenitorów oligodendrocytów); współdziałal w opracowaniu metodologii badawczej; współdziałal w wykonaniu prac laboratoryjnych (hodowla komórkowa i traktowanie oligodendrocytów MO3.13 oraz barwienia immunohistochemiczne i analiza qPCR; hodowla i traktowanie skrawków organotypowych mózdzku i immunohistochemia; hodowla komórkowa, traktowanie oraz barwienia immunohistochemiczne ludzkich monocytów U937, analiza qPCR i dot blot); współdziałal w interpretacji, opracowaniu i wyciągnięciu wniosków; współ-administracji nad projektem; współ-nadzoru nad osobami biorącymi udział w pracach laboratoryjnych; współdziałal w analizie danych: analiza statystyczna i wizualizacja; współ-przygotowaniu rycin; napisaniu pierwszego draftu manuskryptu, złożenie w czasopiśmie, korespondencji z redaktorem i odniesieniu się do uwag recenzentów; współ-finansowaniu (kierownik projektu **POLONEZ 2: 2016/21/P/NZ3/00897**).

2. Klejbor I., Shimshek D. R., Klimaszewska-Łata J., Velasco-Estevez M., Moryś J., Karaszewski B., Szutowicz A., **Rutkowska A.\*** EBI2 is expressed in glial cells in multiple sclerosis lesions, and its knock-out modulates remyelination in the cuprizone model. *Eur. J. Neurosci.* 2021: vol. 54, nr 3, s. 1652-1659

**\*autor korespondencyjny**

[IF: 3,698; MEiN: 100]

Mój wkład w powstanie tej pracy obejmował: współ-opracowanie koncepcji zagadnienia badawczego i sformułowanie hipotez badawczych; nawiązanie współprac z naukowcami w Polsce i za granicą; rekrutacji, szkoleniu i nadzorowaniu doktorantki; uzyskanie zgody komisji bioetycznej na przeprowadzenie badań; pozyskiwaniu materiału i innych zasobów potrzebnych do przeprowadzenia badań (ludzkich mózgowi osób zmarłych na SM i kontrolnych z biobanku z USA; mysiej tkanki z Novartis w Szwajcarii); współdziałal w opracowaniu metodologii badawczej; współdziałal w wykonaniu prac laboratoryjnych (barwienia immunohistochemiczne; testy ELISA, analiza qPCR; interpretację, opracowanie i wyciągnięcie wniosków; współ-administrację nad projektem; nadzór nad osobami biorącymi udział w pracach laboratoryjnych; analizę danych: analiza statystyczna i wizualizacja; przygotowanie rycin; napisanie pierwszego draftu manuskryptu, złożenie w czasopiśmie, korespondencje z redaktorem i odniesienie się do uwag recenzentów; finansowanie (kierownik projektu **POLONEZ 2: 2016/21/P/NZ3/00897**).

3. Velasco-Estevez M., Koch N., Klejbor I., Caratis F., **Rutkowska A.\*** Mechanoreceptor Piezo1 is downregulated in multiple sclerosis brain and is involved in the maturation and migration of oligodendrocytes in vitro. *Front. Cell. Neurosci.* 2022: vol. 16, art. ID 914985, s. 1-9

**\*autor korespondencyjny**

[IF: 6,147; MEiN: 100]

Mój wkład w powstanie tej pracy obejmował: współ-opracowanie koncepcji zagadnienia badawczego i sformułowanie hipotez badawczych; nawiązanie współprac z naukowcami w Polsce i za granicą; rekrutację, szkolenie i nadzorowanie magistrantki i doktorantek; uzyskanie zgody komisji bioetycznej na przeprowadzenie badań; pozyskiwanie materiału i innych zasobów potrzebnych do przeprowadzenia badań (ludzkich mózgowi od osób zmarłych na SM

i kontrolnych z biobanku z USA; DNA/cDNA pierwotnych ludzkich neuronów, mikrogleju i progenitorów oligodendrocytów); współudział w opracowaniu metodologii badawczej; współudział w wykonaniu prac laboratoryjnych: barwienia immunohistochemiczne oraz dot blot; współudział w interpretacji, opracowaniu i wyciągnięciu wniosków; administrację nad projektem; nadzór nad osobami biorącymi udział w pracach laboratoryjnych; współudział w analizie danych: analizę statystyczną i wizualizację; współudział w przygotowaniu rycin; współudział w napisaniu pierwszego draftu manuskryptu; złożenie artykułu w czasopiśmie, korespondencję z redaktorem i odniesienie się do uwag recenzentów; finansowanie (kierownik projektu **POLONEZ 2:2016/21/P/NZ3/00897**).

4. Kutryb-Zajac B.\*, Kawecka A., Caratis F., Urbanowicz K., Braczko A., Furihata T., Karaszewski B., Smoleński R. T., **Rutkowska A.\*** The impaired distribution of adenosine deaminase isoenzymes in multiple sclerosis plasma and cerebrospinal fluid. *Front. Mol. Neurosci.* 2022: vol. 15, art. ID 998023, s. 1-13

**\*autor korespondencyjny**

**[IF: 6,261; MEiN: 140]**

Mój wkład w powstanie tej pracy obejmował: współ-opracowanie koncepcji zagadnienia badawczego i sformułowanie hipotez badawczych; nawiązanie współprac z naukowcami w Polsce i za granicą; rekrutację, szkolenie i nadzorowanie doktorantki; uzyskanie zgody komisji bioetycznej na przeprowadzenie badań; współudział w pozyskaniu materiału i innych zasobów potrzebnych do przeprowadzenia badań (ludzkich mózgowi osób zmarłych na SM i kontrolnych z biobanku z USA; płynu mózgowo-rdzeniowy oraz krwi osób chorych na SM; współudział w opracowaniu metodologii badawczej oraz wykonaniu prac laboratoryjnych; współudział w interpretacji wyników; współudział w administracji nad projektem; nadzór nad osobami biorącymi udział w pracach laboratoryjnych; współudział w napisaniu pierwszego draftu manuskryptu; współ-finansowanie (kierownik projektu **OPUS 17: 2019/33/B/NZ4/03000**)

Całkowity IF powyższych prac: **22,314**

Całkowita punktacja MEiN powyższych prac: **480**

Podpisane oświadczenia habilitanta oraz współautorów o indywidualnym wkładzie autorskim znajdują się **załączniku nr 5**.

**Omówienie celu naukowego prac wchodzących w skład cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych, osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

## **Wprowadzenie**

Tematyka mojej pracy naukowej od blisko trzynastu lat skupia się na procesach molekularnych i komórkowych związanych z mechanizmami neurozapalnymi i szeroko rozumianą patofizjologią stwardnienia rozsianego oraz modulacją tych procesów poprzez oddziaływanie na receptory błonowe takie jak EB12. Przedstawione w ramach poszczególnych osiągnięć

naukowych publikacje są kontynuacją ścieżek badawczych realizowanych w trakcie doktoratu i stażu podoktorskiego.

Stwardnienie rozsiane (SM) to przewlekła autoimmunologiczna choroba mózgu i rdzenia kręgowego. Jest główną przyczyną nieurazowej niepełnosprawności młodych dorosłych na świecie. W SM dochodzi do niszczenia osłonek mielinowych włókien nerwowych przez układ odpornościowy. Utrata mieliny wtórnie prowadzi do degeneracji aksonów i obumierania komórek nerwowych, ale procesy neurodegeneracyjne mają w chorobie także charakter pierwotny (Walton et al., 2020). W ostatnich latach nastąpił gwałtowny wzrost liczby terapii modyfikujących przebieg choroby (*disease modifying therapies*, DMT, ang.). DMT definitywnie nie leczą SM, ale znacznie spowalniają postęp choroby i poprawiają jakość życia chorych w porównaniu z jej naturalnym przebiegiem. Średnio o kilkanaście lat mogą wydłużać okres życia niewymagającego pomocy osób drugich. Terapie te wpływają na układ odpornościowy w celu zmniejszenia liczby i nasilenia rzutów, ale mają bardzo ograniczony wpływ na odbudowę mieliny (remielinizację) lub ochronę komórek nerwowych, najpewniej przede wszystkim w związku z efektem przeciwzapalnym, a nie pierwotnie stymulującym remielinizację (De Stefano et al., 2010; Giovannoni et al., 2022). Aktualnie nie ma terapii zwiększających bądź stymulujących naturalne procesy odbudowy mieliny.

GPR183 lub EBI2 (gen 2 indukowany wirusem Epsteina-Barra, *Epstein-Barr virus-induced gene 2*, ang.), jest klasycznym błonowym receptorem sprzężonym z białkiem G (*G-protein-coupled receptor*, GPCR, ang.), którego naturalnym ligandem (agonistą) jest oksysterol  $7\alpha,25$ -dihydroksycholesterol ( $7\alpha,25$ -OHC) (Hannedouche et al., 2011; Liu et al., 2011). Wiązanie agonisty z EBI2 powoduje aktywację heterodimeru białka  $G_{i/o}$  i dalszego oddziaływania na szlaki sygnałowe poprzez wtórne przekaźniki (*second messengers*, ang.) takie jak kinazy aktywowane mitogenami (*MAPK*, ang.) ERK1/2 oraz p38, czy inhibicja cyklicznego adenozyno-3',5'-monofosforanu (cAMP), bądź czynników transkrypcyjnych takich jak NF $\kappa$ B (*nuclear factor kappa B*, ang.) i NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) (Bened-Jensen et al., 2013; Hannedouche et al., 2011; C. Liu et al., 2011; Rosenkilde et al., 2006; Rutkowska et al., 2015).

Pochodne utlenione cholesterolu (oksysterole) wykazują większą aktywność biologiczną niż cholesterol. Odgrywają wiele zróżnicowanych ról np. regulują metabolizm witamin i lipidów, transport i utrzymanie homeostazy cholesterolu, aktywację receptorów błonowych oraz jądrowych (Leoni & Caccia, 2011; Russell, 2000; Schroepfer & Wilson, 2000). Oksysterole mają również właściwości chemotaktyczne, indukujące migrację komórek zarówno *in vitro* jak i *in vivo* (np. Hannedouche et al., 2011; Liu et al., 2011). Ponadto oksysterole wykazują działanie immunomodulujące zarówno pro jak i przeciwzapalne w zależności od oksysterolu i typu komórek (Aye et al., 2012; Diczfalusy et al., 2009; Moog et al., 1988; Rosklint et al., 2002). Nieprawidłowy poziom oksysteroli został wykazany w wielu chorobach neurodegeneracyjnych np. w chorobie Alzheimera czy Parkinsona (Björkhem et al., 2013; Bosco et al., 2006; Papassotiropoulos et al., 2000) oraz chorobach autoimmunologicznych i zapalnych np. w SM, toczeniu rumieniowatym czy w nieswoistym zapaleniu jelit (Chalmin et al., 2015; Crick et al., 2017; Wyss et al., 2019; Ye et al., 2003).

7 $\alpha$ ,25-OHC i blisko spokrewnione oksysterole wykazują powinowactwo do receptora EBI2 w zakresie nanomolowym. EBI2 ulega ekspresji przede wszystkim w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (*PBMC*, ang.) w tym głównie w limfocytach T oraz B, komórkach NK oraz w monocytach, makrofagach i innych komórkach układu immunologicznego (Bened-Jensen et al., 2012; Birkenbach et al., 1993; Hannedouche et al., 2011; C. Liu et al., 2011; Preuss et al., 2014). EBI2 reguluje rozmieszczenie limfocytów B w obrębie tkanki limfatycznej mając kluczowe znaczenie dla właściwej odpowiedzi humoralnej zależnej od limfocytów T.

Po doktoracie i stażu podoktorskim wróciłam do Polski w ramach otrzymanego **grantu POLONEZ 2** z Narodowego Centrum Nauki (NCN), w którym byłam kierownikiem, by kontynuować moje badania nad rolą EBI2/7 $\alpha$ ,25-OHC w mielinizacji. W tym projekcie, zrealizowanym na Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (GUMed), scharakteryzowałam rolę EBI2 w ludzkich oligodendrocytach oraz znalazłam dowody na to, że modulacja szlaków sygnałowych EBI2 może być celem terapii modulującej odbudowę mieliny. Wykazałam, że (i) sygnalizacja, w której pośredniczy EBI2, jest niezbędna do remielinizacji w skrawkach mózgu myszy, w których mielina została chemicznie usunięta (**Velasco-Estevez et al., 2021, praca nr. 1**) oraz że, (ii) odbudowa mieliny jest mniej wydajna u myszy z nokautem EBI2 w modelu kuprizonowym SM (**Klejbor et al., 2021, praca nr. 2**). Ponadto, w ramach grantu POLONEZ 2 poszerzyłam zakres moich działań naukowych i rozpocząłam badania nad funkcją kanału jonowego Piezo1 w oligodendrocytach i SM (**Velasco-Estevez et al., 2022, praca nr.3**) oraz, w ramach otrzymanego **grantu OPUS 17** (NCN), w którym pełnię rolę kierownika, prowadzę badania mające na celu znalezienie nowych cząsteczek biorących udział w procesach patofizjologicznych SM w płynie mózgowo-rdzeniowym (PMR) i krwi osób chorych na SM oraz *in vitro* w komórkach endotelialnych naczyń włosowatych mózgu, astrocytach i pericytach (**Kutryb-Zajac et al., 2022, praca nr.4**). Te cztery publikacje składają się na cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych i będą poniżej szczegółowo omówione.

### **Cel naukowy osiągnięcia naukowego**

Identyfikacja, zbadanie profilu ekspresji oraz funkcji potencjalnych nowych celów terapeutycznych w kontekście chorób demielinizacyjnych ośrodkowego układu nerwowego, takich jak stwardnienie rozsiane.

### **Opis wyników uzyskanych w poszczególnych pracach wraz z ich potencjalnym zastosowaniem**

Celem **pracy nr. 1** (**Maria Velasco-Estevez et al., 2021**) było przeprowadzenie dogłębnej analizy ekspresji oraz funkcji receptora EBI2 w ludzkich oligodendrocytach oraz jego kluczowej roli w procesie regeneracji mieliny. Receptor EBI2 reguluje układ odpornościowy i ulega ekspresji w komórkach układu immunologicznego, w tym najbardziej w limfocytach B i T. Występuje również w komórkach OUN takich jak astrocyty gdzie reguluje uwalnianie prozapalnych cytokin, chemotaksję i chroni przed chemicznie indukowaną demielinizacją w skrawkach organotypowych mózgu (**Rutkowska et al., 2015, 2016, 2017, 2018**). Naturalny ligand EBI2, oksysterol 7 $\alpha$ ,25-OHC, jest syntetyzowany enzymatycznie z cholesterolu poprzez 25-hydroksylazę cholesterolu (CH25H) i 7-alfa-hydroksylazę 25-hydroksycholesterolu

(CYP7B1). Rozregulowana ekspresja EBI2 jak i jego ligandu zostały wykazane w szeregu chorób autoimmunologicznych i neurodegeneracyjnych, w tym w SM, gdzie jego ekspresja jest zwiększona w naciekających komórkach odpornościowych w plakach (blaszkach) demielinizacyjnych (Wanke et al., 2017). Ponieważ rola receptora EBI2 była badana w mysich i ludzkich astrocytach, mysim modelu SM, eksperymentalnym autoimmunizacyjnym zapaleniu rdzenia kręgowego i mózgu (*experimental autoimmune encephalomyelitis*, EAE, ang.) oraz w SM, w tej pracy postanowiłam zbadać jego funkcje w oligodendrocytach, czyli komórkach tworzących osłonki mielinowe włókien nerwowych, które ulegają niszczeniu w SM. Najpierw zbadałam ekspresję EBI2 w progenitorach oligodendrocytów (*oligodendrocyte progenitor cells*, OPC, ang., PDGFR+) i dojrzałych oligodendrocytach (MBP+) w ludzkim mózgu. Następnie prześledziłam zmiany w ekspresji EBI2 podczas dojrzewania oligodendrocytów i jego właściwości chemotaktycznych używając do tego ludzkiej linii oligodendrocytów MO3.13. Na koniec zbadałam czy receptor EBI2 pełni rolę w odbudowie mielin w skrawkach organotypowych mózdzku.

Moje badania potwierdziły obecność EBI2 w progenitorach oligodendrocytów (oznaczanych jako PDGFR $\alpha$ +), astrocytach (oznaczanych jako GFAP+) oraz mikrogleju (oznaczanych jako Iba1+). Co ciekawe, wykazałam, że receptor EBI2 nie jest obecny w dojrzałych oligodendrocytach (oznaczane jako MBP+), ani w neuronach (oznaczanych jako NFH+). Wykazaliśmy również, że ludzkie oligodendrocyty MO3.13 tymczasowo zwiększają ekspresję EBI2 podczas dojrzewania indukowanego PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*, ang.) i że traktowanie tych komórek oksysterolem 7 $\alpha$ ,25-OHC, bądź antagonistą receptora EBI2 (NIBR189), hamują wzrost tymczasowej ekspresji EBI2, ale nie blokują ich dojrzewania. Dane te wskazują, że EBI2 może być zaangażowany w dojrzewanie oligodendrocytów, ale nie jest niezbędny do prawidłowego przebiegu mielinizacji.

W kolejnym etapie naszych badań udało się wykazać, że aktywacja receptora EBI2 przez oksysterol 7 $\alpha$ ,25-OHC w oligodendrocytach linii MO3.13, prowadzi do silnego stymulowania ich chemotaksji. Ten efekt okazał się zależny od aktywacji szlaków sygnałowych związanych z receptorem EBI2, co zostało potwierdzone przez zdolność hamowania chemotaksji indukowanej przez 7 $\alpha$ ,25-OHC poprzez jednoczesne traktowanie komórek antagonistą EBI2, tj. NIBR189.

W końcowej fazie naszego badania udowodniliśmy, że aktywacja szlaków sygnałowych receptora EBI2 jest konieczna do prawidłowej odbudowy mielin w organotypowych skrawkach mózdzku w następstwie demielinizacji indukowanej lizofosfatydylocholiną (LPC). Blokowanie receptora EBI2 antagonistą NIBR189 zahamowało endogenne procesy odbudowy mielin zachodzące w organotypowych skrawkach mózdzku. Te dane wskazały na udział receptora EBI2 w procesie odbudowy mielin i wymagały dalszej weryfikacji w modelu zwierzęcym, takim jak model kuprizonowy.

**Podsumowując, praca ta dostarczyła nowych danych na temat ekspresji i roli EBI2 w oligodendrocytach i odbudowie mielin i otworzyła nowe możliwości modulacji biologii oligodendrocytów (chemotaksji) i potencjalnie w przyszłości nowych metod terapeutycznych chorób demielinizacyjnych.** W następnej pracy zbadałam rolę EBI2 w procesach odbudowy mielin w modelu kuprizonowym SM.



Praca nr.1 jest efektem indywidualnego projektu badawczego finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu **POLONEZ 2** (nr. rej. **2016/21/P/NZ3/00897**), którego byłam kierownikiem, pod tytułem: *The function of EBI2 receptor in human oligodendrocytes and its role in the cuprizone model for demyelination*.

Receptor EBI2, pełniący istotną rolę w regulacji układu immunologicznego, odgrywa znaczącą funkcję w kontekście SM - przewlekłej, zapalnej autoimmunologicznej choroby OUN. W pracy nr 1 wykazałam, że długotrwałe farmakologiczne blokowanie receptora EBI2 poprzez użycie antagonisty (NIBR189) hamuje spontaniczną odbudowę mieliny w mysich skrawkach organotypowych mózdzku, w których mielina została usunięta chemicznie. W **pracy nr 2. (Klejbor et al., 2021)** kontynuowałam badania nad rolą EBI2 w odbudowie mieliny w modelu zwierzęcym SM i z wykorzystaniem myszy z nokautem EBI2. Ponadto, zbadałam ekspresję EBI2 w komórkach OUN w mózgowiach osób chorych na SM.

Receptor EBI2 jest jednym z kluczowych mediatorów zarówno wrodzonego, jak i adaptacyjnego układu odpornościowego (Baptista et al., 2019; Lu & Cyster, 2019). Odgrywa rolę w koordynowaniu odpowiedniej odpowiedzi humoralnej i komórkowej układu odpornościowego. Badania na myszach wykazały, że EBI2 ulega ekspresji przede wszystkim w dojrzałych limfocytach B i komórkach T CD4<sup>+</sup>. Naturalny ligand receptora EBI2, oksysterol 7 $\alpha$ ,25-dihydroksycholesterol (7 $\alpha$ ,25-OHC) wykazuje silne działanie chemotaktyczne poprzez receptor EBI2 w komórkach takich jak astrocyty, progenitory oligodendrocytów, makrofagi, limfocyty B oraz T i monocyty (np. Chalmin et al., 2015; Clottu et al., 2017; Hannedouche et al., 2011; Preuss et al., 2014; **Rutkowska et al., 2015**). Właściwości chemotaktyczne EBI2 są szczególnie istotne w chorobach autoimmunologicznych takich jak SM, w których naciekające komórki odpornościowe propagują postęp choroby.

Sygnalizacja wewnątrzkomórkowa poprzez EBI2/7 $\alpha$ ,25-OHC została powiązana z kilkoma zaburzeniami zapalnymi i autoimmunologicznymi, takimi jak nieswoiste zapalenie jelit, reumatoidalne zapalenie stawów, cukrzyca typu 1 oraz SM (Clottu et al., 2017; Heinig et al., 2010; Misselwitz et al., 2020; Perucha et al., 2019; Wanke et al., 2017). W SM, autoreaktywne limfocyty T CD4<sup>+</sup> przekraczają barierę krew-mózg, indukują stan zapalny i niszczą mielinę. Badania wskazują na bezpośredni udział EBI2/oksysterolu w patofizjologii SM. Wykazano zwiększoną gęstość EBI2 w naciekających komórkach układu immunologicznego wewnątrz plak (blaszek) demielinizujących oraz zaburzenia poziomu cholesterolu, oksysteroli i lipidów w SM, które korelują z aktywnością choroby (Crick et al., 2017; Giubilei et al., 2002; Wanke et al., 2017; Weinstock-Guttman et al., 2011). Moje wcześniejsze badania wykazały również udział receptora EBI2 w prawidłowym rozwoju mieliny u noworodków myszy oraz jego działanie ochronne w stanach neurozapalnych (**Rutkowska et al., 2017, 2018**). W tych badaniach szlaki sygnałowe indukowane receptorem EBI2 chroniły przed chemicznie indukowaną demielinizacją, najprawdopodobniej poprzez hamowanie uwalniania prozapalnych cytokin. Natomiast analiza markerów progenitorów oligodendrocytów i białek mieliny u myszy typu dzikiego i myszy z nokautem EBI2 w okresie okołoporodowym wykazała obniżony poziom białka MBP (*myelin basic protein*, ang.) u myszy z nokautem EBI2 (**Rutkowska et al., 2017**). Odkrycia te sugerują, że EBI2 odgrywa kluczową rolę zarówno w rozwoju jak i ochronie mieliny i może być potencjalnym celem terapeutycznym w chorobach

demielinizacyjnych, takich jak SM. W **pracy nr.2** zbadalam rolę receptora EBI2 podczas demielinizacji i procesach odbudowy mieliny w mysim modelu kuprizonowym.

Model kuprizonowy przeprowadzony został na samicach myszy szczepu C57BL/6 i polegał na podawaniu kuprizonu (bis(cyclohexanone)oxaldihydrazone), chelatu miedzi, myszom w paszy przez pięć tygodni. Kuprizon prowadzi do obumierania dojrzałych, tworzących mielinę oligodendrocytów i zanikania osłonek mielinowych głównie w ciełe modzelowatym. Po pięciu tygodniach diety zawierającej kuprizon myszy przeszły na normalną paszę (bez dodatku kuprizonu) na okres dwóch tygodni podczas których zachodzą naturalne procesy odbudowy mieliny. Zakres demielinizacji oraz remielinizacji w ciełe modzelowatym myszy został oceniony w skrawkach wybarwionych histochemicznie luxolem oraz immunofluorescencyjnie.

Badania wykazały większy stopień demielinizacji u myszy z wyłączonym (nokautem) genem EBI2 po pięciu tygodniach diety zawierającej kuprizon (szczytowy okres), a także spowolnioną (mniej efektywną) regenerację mieliny po kolejnych dwóch tygodniach na normalnej diecie bez dodatku kuprizonu (okres rekonwalescencji). Następnie zbadalam wpływ kuprizonu na progenitory oligodendrocytów i dojrzałe, tworzące mielinę oligodendrocyty (oznaczone jako CC1+). Zaobserwowaliśmy znaczną utratę dojrzałych oligodendrocytów u myszy szczepu dzikiego po pięciu tygodniach diety z kuprizonem i tylko niewielkie straty u myszy z nokautem EBI2. Ogólny wpływ kuprizonu na liczbę progenitorów oligodendrocytów (oznaczonych jako PDGFR $\alpha$ +) i ich rekrutację był niewielki.

Astrocyty i mikroglej są głównymi mediatorami neurodegeneracji indukowanej kuprizonem. W naszym badaniu zaobserwowaliśmy znacznie mniej astrocytów (oznaczanych jako GFAP+) w ciełe modzelowatym myszy z nokautem EBI2 po dwóch tygodniach na normalnej diecie (okres rekonwalescencji) oraz znaczny wzrost transkrypcji *Ebi2* w lizatach mózgowi myszy szczepu dzikiego po dwóch tygodniach na normalnej diecie wskazując na zaangażowanie szlaków sygnałowych indukowanych receptorem EBI2 w procesach odbudowy mieliny.

Następnie zbadalam zmiany w poziomie pro-zapalnych cytokin oraz aktywacji szlaków sygnałowych. Dane wskazały nieznaczne różnice w poziomie pro-zapalnych cytokin w mózgowiach myszy z nokautem oraz szczepu dzikiego. Natomiast zaobserwowaliśmy znaczny wzrost poziomu mRNA pro-zapalnej kinazy *Abl1* po pięciu tygodniach diety z kuprizonem w mózgowiach myszy szczepu dzikiego wskazując na udział tej kinazy w demielinizacji w modelu kuprizonowym. Ponadto, nasze nieopublikowane badania wykazały, że aktywacja EBI2 jego ligandem 7 $\alpha$ ,25-OHC skutkuje fosforylacją kinazy *Abl1* wskazując na kolejny szlak sygnałowy receptora EBI2 zaangażowanym w procesy odbudowy mieliny w modelu kuprizonowym.

Wanke i współpracownicy (2017) zaobserwowali zwiększoną ekspresję receptora EBI2 w komórkach odpornościowych infiltrujących blaszki demielinizacyjne w SM. W naszym badaniu dodatkowo wykryliśmy obecność receptora EBI2 w astrocytach i mikrogleju obecnych w plakach demielinizacyjnych SM.

Podsumowując, w tej pracy wykazałam większy stopień demielinizacji oraz wolniejszą (mniej wydajną) odbudowę mieliny po dwóch tygodniach rekonwalescencji u myszy z nokautem EBI2. Dystrybucja receptora EBI2 w komórkach glejowych w plakach (blaszkach) SM

ponownie wskazała na zaangażowanie receptora EB12 w patofizjologii SM. Ponadto, ta praca zademonstrowała, że szlaki sygnałowe indukowane receptorem EB12 odgrywają ważną rolę podczas regeneracji mieliny w modelu kuprizonowym. **Obecnie nie ma terapii zwiększających bądź indukujących odbudowę mieliny w OUN i ta praca wskazała, że EB12 jest potencjalnym celem terapeutycznym dla takiej terapii.**

Bazując na wynikach uzyskanych zarówno podczas doktoratu jak i w ramach grantu POLONEZ 2 w maju 2023 uzyskałam **trzeci indywidualny grant z NCN w konkursie SONATA 18** (nr. rej. **2022/47/D/NZ3/02613**). Jako kierownik tego projektu będę kontynuować badania nad rolą EB12 w odbudowie mieliny w komórkach glejowych przygotowanych z myszy szczepu dzikiego i z nokautem receptora EB2 oraz testować odpowiednio zmodyfikowany oksysterol 7 $\alpha$ ,25-OHC na myszach szczepu dzikiego w modelu kuprizonowym.

W pracy nr. 1 i 2 wykazałam, że receptor EB12 bierze udział w procesach odbudowy mieliny w modelu kuprizonowym SM, moduluje procesy neurozapalne i chemotaksje oligodendrocytów oraz, że ulega ekspresji w komórkach glejowych w plakach SM. Moja kolejna **praca nr. 3 (Maria Velasco-Estevez et al., 2022)** jest kontynuacją badań nad biologią oligodendrocytów w kontekście SM oraz mechanizmami komórkowymi biorącymi udział w budowie i regeneracji mieliny.

Wysiłki podjęte w ostatniej dekadzie dotyczące właściwości biomechanicznych w OUN wykazały, że zarówno sygnały chemiczne, jak i mechaniczne mogą wywoływać stany patofizjologiczne. Ponadto, istnieją dowody na to, że oligodendrocyty i ich progenitory są najbardziej topograficznie wrażliwym typem komórek w OUN i mogą odpowiednio dostosowywać się do konturów powierzchni tak rzadkich jak 100 nm. Wykazano, że oligodendrocyty tworzą mielinę wokół elektroprzewodzonych nanowłóknach polistyrenowych o wielkości podobnej do aksonów. Wskazuje to na to, że sygnały aksonalne nie są konieczne, aby oligodendrocyty zainicjowały mielinizację, natomiast mechaniczne sygnały są niezbędne ponieważ przyczyniają się do różnicowania progenitorów w tworzące mielinę oligodendrocyty (Rosenberg et al., 2008). Wykazano również, że miękkie podłoża wzmacniają różnicowanie, a sztywne podłoża i bliskość dojrzewających oligodendrocytów hamują ich różnicowanie (Hernandez et al., 2016; Jagielska et al., 2017; Urbanski et al., 2016). Co ciekawe, demielinizacja nie prowadzi do zmniejszenia gęstości tkanki nerwowej (Schregel et al., 2012; Wuerfel et al., 2010). Wykazano, że gdy demielinizacja jest przewlekła, jak w postępującym SM, ogólna gęstość wzrasta w wyniku astrogliozy i tworzenia nieprawidłowych osadów składników macierzy pozakomórkowej (ECM), takich jak fibronektyna (Urbanski et al., 2019).

Fizyczne właściwości środowiska wyczuwane są przez komórki poprzez mechanoreceptory, takie jak np. Piezo1. Ten mechanicznie czuły kanał jonowy został po raz pierwszy opisany przez Ardema Patapoutiana w 2010 roku (Coste et al., 2010), który otrzymał nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii lub medycyny w 2021 roku za jego odkrycie i scharakteryzowanie. Od tego czasu Piezo1 przyciąga znaczną uwagę naukowców w kontekście patofizjologii chorób. Piezo1 wykazuje konstytutywnie ekspresję w neuronach w mózgu człowieka i gryzonia (Roh et al., 2020; María Velasco-Estevez et al., 2018a; Wang et al., 2019). Co ciekawe, jego ekspresja wzrasta w neuronach podczas udaru niedokrwinnego (Wang et al., 2019). W astrocytach Piezo1 jest nieobecny lub ulega ekspresji na niskim poziomie w warunkach fizjologicznych.

Jednakże, po stymulacji bakteryjnym lipopolisacharydem (LPS) lub w mysim modelu choroby Alzheimera u starzejącym się zwierząt znacząco wzrasta ekspresja Piezo1 (Velasco-Estevez et al., 2018, 2020).

Piezo1 wykazuje ekspresję również w mikrogleju w warunkach fizjologicznych, ale podobnie jak w astrocytach, jego ekspresja wzrasta w warunkach zapalnych (Liu et al., 2021). Stosunkowo niedawno wykazano ekspresję Piezo1 w OPC gryzoni (Segel et al., 2019). Piezo1 jest jednym z kluczowych pośredników, przez które OPC wyczuwają sztywność/gęstość matrycy/podłoża. W sztywniejszych podłożach OPC przestają różnicować i proliferować, podczas gdy blokowanie Piezo1 umożliwia różnicowanie i namnażanie OPC w sztywniejszym mikrośrodku (Segel et al., 2019). Ponadto, wykazano, że blokowanie Piezo1 inhibitorem GsMTx4 chroni przed demielinizacją indukowaną lizofosfatydylocholiną (LPC) *in vivo* u gryzoni, co sugeruje, że blokowanie tego kanału jonowego może mieć działanie chroniące mielinę w warunkach patofizjologicznych (Velasco-Estevez, Gadalla, et al., 2020).

Piezo1 nie tylko odgrywa istotną rolę w procesach tworzenia i degradacji mieliny, lecz również ma znaczenie w regulacji odpowiedzi immunologicznej w przypadku SM. W eksperymentalnym modelu SM u myszy, znanym jako eksperymentalne autoimmunologiczne zapalenie mózgu i rdzenia (EAE), zaobserwowano łagodniejszy przebieg choroby u myszy z niedoborem limfocytów T wykazujących deficyt Piezo1 (Jairaman et al., 2021). Następnie, podobne zmniejszenie nasilenia EAE i wzmocnienie funkcji komórek Treg zaobserwowano u myszy z limfocytami Treg, w których występował niedobór Piezo1.

W pracy nr. 3 najpierw przeprowadziliśmy analizę ekspresji genu Piezo1 w prekursorach oligodendrocytów (OPC), dojrzałych oligodendrocytach tworzących mielinę oraz w osłonkach mielinowych w ludzkim mózgu. Następnie, przystąpiliśmy do badania szlaków sygnałowych aktywowanych przez Piezo1 w oligodendrocytach. Uzyskane dane wykazały, że aktywacja receptora Piezo1 za pomocą agonisty Yoda-1 prowadzi do uwalniania wewnątrzkomórkowych jonów wapnia, co potwierdza funkcjonalność Piezo1 w ludzkich oligodendrocytach.

Następnie, zbadaliśmy wpływ aktywacji szlaków sygnałowych Piezo1 na migrację i proliferację ponieważ te funkcje oligodendrocytów są krytyczne dla prawidłowej budowy i odbudowy mieliny w OUN. Używając inhibitora Piezo1 (GsMTx4) oraz agonisty (Yoda-1) zademonstrowaliśmy, że blokowanie Piezo1 indukuje migrację i proliferację, a aktywacja tego kanału je hamuje. Zaobserwowaliśmy również, że ekspresja Piezo1 w oligodendrocytach stopniowo maleje w miarę dojrzewania tych komórek.

Na końcu, przeprowadziliśmy analizę ekspresji genu Piezo1 w mózgowiach osób zmarłych na SM. Uzyskane dane wykazały obniżoną ekspresję Piezo1 w istocie białej u pacjentów z SM w porównaniu do osób zdrowych. Ponadto, nie zaobserwowano istotnych różnic w ekspresji Piezo1 między plakami demielinizacyjnymi a obszarami normalnie wyglądającymi w istocie białej w SM.

W tej pracy wykazałam, że mechanoreceptor Piezo1 występuje w oligodendrocytach i OPC w ludzkim mózgu i że jego ekspresja ulega zmniejszeniu w istocie białej w mózgowiach osób zmarłych na SM. Ponadto nasze dane wykazały, że Piezo1 odgrywa ważną rolę w

funkcjonowaniu oligodendrocytów. Aktywacja Piezo1 hamuje proliferację i migrację, podczas gdy efekt odwrotny, zwiększoną proliferację i migrację zaobserwowaliśmy, gdy Piezo1 był farmakologicznie blokowany przez GsMTx4. **Reasumując, farmakologiczna modulacja wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych Piezo1 może być potencjalnie wykorzystana jako terapia stymulująca odbudowę mieliny w warunkach patofizjologicznych takich jak zachodzą w SM, czyniąc tym samym kanał jonowy Piezo1 nowym celem terapeutycznym do odbudowy mieliny w OUN.**

W SM aktywne plaki demielinizacyjne z naciekającymi komórkami odpornościowymi zlokalizowane są najczęściej dookoła uszkodzonych naczyń krwionośnych (Spencer et al., 2018). Ponadto w eksperymentalnym autoimmunologicznym zapaleniu mózgu i rdzenia (ang. EAE) wykazano, że stężenie  $7\alpha,25\text{-OHC}$  gwałtownie rośnie w OUN zwiększając tym samym ilość naciekających komórek (Wanke et al., 2017). W ramach projektu finansowanego przez NCN w konkursie **OPUS 17** (nr rej. **2019/33/B/NZ4/03000**), którego jestem kierownikiem, badam ekspresję receptora EB12 oraz enzymów biorących udział w syntezie ligandu EB12 w naczyniach krwionośnych mózgu w warunkach fizjologicznych i zapalnych używając do tego modelu *in vitro* bariery-krew mózg, mózgowi osób zmarłych na SM oraz w płynie mózgowo-rdzeniowym (PMR) osób z SM. W ramach tego projektu, korzystając z pozyskanych materiałów biologicznych oraz opracowanych modeli komórkowych, we współpracy z **dr hab. Kutryb-Zajac**, zainicjowane i zrealizowane zostało zadanie badawcze, którego wyniki opublikowane zostały w **pracy nr. 4 (Kutryb-Zajac et al., 2022)**. W tej pracy zbadaliśmy dystrybucję i aktywności izoenzymów deaminazy adenozykowej 1/2 (ADA1/2) w osoczu i PMR pacjentów z SM, a także *in vitro* w komórkach endotelialnych naczyń włosowatych mózgu (HBMEC), astrocytach (HASTR) i perycytach (HBPC). **Modyfikacja aktywności enzymów w naczyniach krwionośnych może potencjalnie ograniczać infiltrację komórek w przypadku chorób neurozapalnych, takich jak SM, i stanowi obiecujący cel terapeutyczny dla leków.**

Jednostka nerwowo-naczyniowa (ang. *neurovascular unit*), zasadniczo składa się z błony podstawnej, komórek endotelialnych, perycytów, astrocytów, a także mikrogleju i neuronów, które razem regulują przepływ cząsteczek między krwią i OUN. Dysfunkcja naczyń krwionośnych pojawia się wcześniej i ogniskowo w SM i ich zwiększona przepuszczalność jest markerem stanu neurozapalnego związanego z SM (Cramer et al., 2015; Spencer et al., 2018).

Sygnalizacja adenozynowa w neuronach i komórkach glejowych odgrywa istotną rolę w chorobach neurologicznych ze względu na swój udział w neuroprzebieżności, neuromodulacji, stanach zapalnych, regeneracji i regulacji przepuszczalności bariery krew-mózg (Dunwiddie & Masino, 2001). W warunkach patofizjologicznych, komórki intensywnie uwalniają trifosforan adenozyminy (ATP) drogą transportu pęcherzykowego, kanałów jonowych, transporterów ABC oraz koneksyn i paneksyn. Promuje on reakcje prozapalne poprzez interakcje z purynergicznymi receptorami P2X i P2Y, natomiast produkt jego metabolizmu, adenozymina, wykazuje działanie przeciwzapalne i neuroprotektoryjne aktywując receptory typu P1 (Domercq et al., 2019).

Metabolizm zewnątrzkomórkowego ATP zachodzi poprzez szeroko wyrażane w OUN ektoenzymy znajdujące się na powierzchni komórek (Zimmermann, 2008). Należą do nich ekto-difosfohydrolaza trifosfonukleozydowa 1 (eNTPD1, CD39), która hydrolizuje ATP poprzez difosforan (ADP) do monofosforanu (AMP) i ekto-5'-nukleotydaza (e5'NT, CD73), która defosforyluje AMP, tworząc adenozyne. Powierzchniowa deaminaza adenozynowa (ADA) katalizuje nieodwracalną deaminację adenozyne do inozyne (Kutryb-Zajac et al., 2016). Utrzymuje ona również aktywność katalityczną wewnątrzkomórkowo, gdzie deaminuje również deoksyadenozyne, oraz występuje w postaci rozpuszczalnej w płynach ustrojowych (Franco et al., 1997). Procesy te są kontrolowane przez uwalnianie cytokin na powierzchni komórek po aktywacji limfocytów T (Cordero et al., 2001). Wyższe stężenia inozyne w surowicy zaobserwowano u pacjentów z SM i stwierdzono, że aktywność rozpuszczalnego ADA wzrasta w SM (Polachini et al., 2014). Podobnie aktywność ADA jest zwiększona w płynie mózgowo-rdzeniowym (PMR) pacjentów z SM (Samuraki et al., 2017).

Istnieją dwa izoenzymy deaminazy adenozyne, ADA1 i ADA2. ADA1 ma wyższe powinowactwo do adenozyne i optymalne pH jej działania zbliżone jest do neutralnego. Ulega największej ekspresji w limfocytach B i T oraz jest niezbędna w prawidłowym funkcjonowaniu nabytego układu odpornościowego. Jej działanie zapobiega gromadzeniu się toksycznej deoksyadenozyne w proliferujących komórkach i zmniejsza stężenie zewnątrzkomórkowej adenozyne (Garcia-Gil et al., 2021). ADA1 oddziałuje również z powierzchniowym białkiem CD26 (dipeptydylopeptydazą-4, DPP4), skutkując powstawaniem powierzchniowej ekto-ADA (eADA) oraz z receptorami adenozynowymi A1 i A2, zwiększając ich aktywność w prążkowie (Gracia et al., 2011). CD26 ulega większej ekspresji w mikrogleju i astrocytach niż w neuronach. Również komórki śródbłoka odgrywają kluczową rolę jako źródło aktywności ekto-ADA1, która jest zwiększona w warunkach aktywacji i dysfunkcji śródbłoka (Kutryb-Zajac et al., 2016, 2019). Może to mieć szczególne znaczenie w OUN, gdzie ADA pochodząca ze śródbłoka mikronaczyniowego może wyciszać szlaki ochronne zależne od receptorów adenozynowych (Bynoe et al., 2015). Chociaż udział ADA2 w deaminacji adenozyne jest mniejszy niż ADA1 ze względu na jej mniejsze powinowactwo do substratu, może ona mieć kluczowe znaczenie w stanach, gdzie stężenie adenozyne jest podwyższone, na przykład w zapaleniu i nowotworach (Meyts & Aksentijevich, 2018). ADA2 występuje na bardzo wysokim poziomie w komórkach mieloidalnych i mikrogleju, a jej niedobór może prowadzić do dysfunkcji naczyń, stanu zapalnego, udaru krwotocznego i innych zaburzeń neurologicznych (Sozeri et al., 2021). W przeciwieństwie do ADA1, ADA2 nie oddziałuje z CD26, ale spekuluje się, że ten izoenzym może również wiązać się z powierzchnią komórki i działać jako ektoenzym (Zavialov et al., 2010). Ponadto wykazano, że rozpuszczalna ADA2 jest dominującym izoenzymem ADA w surowicy ludzkiej (Andreasyan et al., 2005). Brakuje doniesień dotyczących aktywności izoenzymów ADA u pacjentów z SM. Dlatego niniejsze badanie miało na celu analizę dystrybucji ADA1 i ADA2 w osoczu i PMR chorych na SM, jak również określenie ich aktywność w HBMEC, HBPC oraz HASTR.

Po uzyskaniu zgody Niezależnej Komisji Bioetycznej ds. Badań Naukowych GUMed (NKBBN/457/2019) oraz świadomej zgody pełna krew oraz PMR zostały pobrane od pacjentów z klinicznie izolowanym zespołem (CIS) podczas rutynowej procedury diagnostycznej lub od pacjentów bez SM (grupa kontrolna) z podejrzeniem schorzeń

wymagających wykonania nakłucia lędźwiowego w celach diagnostycznych. Doświadczenia *in vitro* przeprowadzone zostały na warunkowo unieśmiertelnionym klonie HBMEC 18 (ludzkie komórki endotelialne naczyń włosowatych mózgu), klonie HBPC 37 (ludzkie perycyty z naczyń krwionośnych mózgu) oraz klonie HASTR 35 (ludzkie astrocyty) stworzonych przez prof. Tomomiego Furihatę z Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences w Japonii.

Badania wykazały, że aktywność całkowitej rozpuszczalnej ADA była zwiększona w osoczu pacjentów z SM w porównaniu z osobami zdrowymi, ale poszczególne izoenzymy wykazywały zmiany aktywności w przeciwnych kierunkach. Stosunek ADA1 do ADA2 był wyższy w osoczu pacjentów z SM niż w grupie kontrolnej. Nie zaobserwowaliśmy żadnych znaczących różnic między aktywnościami tADA i ADA1 lub ADA2 w PMR między pacjentami z SM a tymi z grupy kontrolnej, ale stosunek ADA1 do ADA2 był zwiększony w SM.

W hodowli komórkowej zaobserwowaliśmy najwyższą aktywność całkowitą eADA na powierzchni komórek HBMEC w porównaniu z HBPC i HASTR. Perycyty (HBPC) i komórki śródbłonna (HBMEC) wykazywały obecność obu izoenzymów powierzchniowej ADA, podczas gdy HASTR wykazywały jedynie niewielką aktywność ADA1. Następnie zmierzaliśmy efekty stymulacji komórek HBMEC, HBPC oraz HASTR koktajlem prozapalnych cytokin IL17/TNF $\alpha$ . Dane wskazały brak wpływu prozapalnych cytokin na aktywność całkowitej (t)eADA1 oraz (t)eADA2 w HASTR oraz w HBPC. Traktowanie komórek śródbłonna (HBMEC) koktajlem pro-zapalnych cytokin IL17/TNF $\alpha$  wykazało wyższą aktywność całkowitej (t)eADA. Istotne różnice zaobserwowano również w izoenzymach ADA. Aktywność eADA1 była zwiększona, podczas gdy eADA2 obniżona po stymulacji IL17/TNF $\alpha$ .

Podsumowując, w tej pracy po raz pierwszy wykazano zmiany w aktywności izoenzymów ADA zarówno w osoczu, jak i PMR u chorych na SM. Zwiększony stosunek ADA1 do ADA2 w PMR i osoczu osób chorych na SM może przekładać się na niekorzystny fenotyp wyzwalający mechanizmy prozapalne, w których pośredniczy ADA1 i zmniejszający działanie neuroprotektoryjne i pobudzające wzrost zależne od ADA2. **Modyfikacja ścieżek sygnałowych ADA1/ADA2 może stanowić potencjalny cel terapeutyczny do modulacji stanu zapalnego w SM.**

### **Wnioski końcowe z prac wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego (cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych)**

Omówione powyżej prace pomogły scharakteryzować potencjalne nowe cele terapeutyczne, które mogą zostać wykorzystane do opracowania terapii modulujących stan zapalny w stwardnieniu rozsianym (SM) oraz stymulujących proces odbudowy mieliny w przypadku chorób demielinizacyjnych, takich jak SM. Owe cele dla leków to i. receptor EBI2, ii. kanał jonowy Piezo1 oraz ii. izoenzymy deaminazy adenozy, ADA1 i ADA2. **Praca nr. 1** dostarczyła nowych danych o roli receptora EBI2 w oligodendrocytach i odbudowie mieliny i otworzyła nowe możliwości modulacji biologii oligodendrocytów. W **pracy nr 2** wykazano, że receptor EBI2 pełni ważną rolę w odbudowie mieliny w modelu zwierzęcym i potwierdzono zaangażowanie receptora EBI2 w patofizjologię SM. W **pracy nr.3** wykazano, że kanał jonowy

Piezo1 jest również potencjalnym celem terapeutycznym dla leków w chorobach demielinizujących takich jak SM. Jego ekspresja ulega zmniejszeniu w istocie białej w mózgowiach osób zmarłych na SM i odgrywa ważną rolę w funkcjonowaniu (np. chemotaksji, dojrzewaniu) oligodendrocytów. W **pracy nr. 4** wykazano zmiany w aktywności izoenzymów ADA zarówno w osoczu, jak i PMR u chorych na SM wskazując na ich zaangażowanie w patofizjologii SM. **Podsumowując, obecnie nie ma terapii indukujących odbudowę mieliny w OUN. Znalezienie takiej terapii jest jednym z największych wyzwań w neurologii. Prace powyżej omówione wskazują na potencjalne nowe cele terapeutyczne dla takiej terapii.** Obecnie kontynuuję badania nad rolą receptora EBI2 (grant SONATA 18, zgłoszenie patentowe), Piezo1 oraz ADA1/2 w odbudowie mieliny testując aktywne cząsteczki oddziałujące z tymi białkami w modelach *in vitro*, *ex vivo* (skrawki organotypowe), jak i *in vivo* w zwierzęcych modelach SM, odpowiednio do stopnia zaawansowania badań każdego z celów.

### **Pozostałe osiągnięcia naukowe nie wchodzące w skład cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych**

Po uzyskaniu tytułu doktora, zostałam pracownikiem naukowym na stanowisku typu post-doc w projekcie o nazwie **BiomarkAPD** (ang. *Biomarkers for Alzheimer's and Parkinson's disease*) finansowanym w programie JPND (ang. *EU Joint Programme – Neurodegenerative Diseases*), który był realizowany w **St. James's Hospital** (szpitalu uniwersyteckim Trinity College Dublin) pod opieką **Profesora Briana Lawlora**. W tym projekcie zajmowałam się **walidacją biomarkerów w płynie mózgowo-rdzeniowym w diagnostyce otępienia**. Projekt BiomarkAPD był międzynarodowym przedsięwzięciem, w którym uczestniczyło 52 partnerów z 21 krajów. Jego głównym celem było zwiększenie wykorzystania biomarkerów w płynie mózgowo-rdzeniowym w diagnostyce otępienia w Europie. Realizacja projektu koncentrowała się na redukcji zróżnicowania metodologicznego stosowanego w analizach laboratoryjnych płynu mózgowo-rdzeniowego oraz opracowaniu wspólnych wytycznych dotyczących ich klinicznej interpretacji. Jednym z zadań badawczych, w których brałam udział w ramach tego projektu, było wspomaganie przygotowania ankiet oraz analiza zebranych danych dotyczących zastosowania biomarkerów w płynie mózgowo-rdzeniowym w celach diagnostycznych w klinikach i laboratoriach w Europie. Wyniki z tego zadania badawczego zostały opublikowane w czasopiśmie *Journal of Alzheimer's Disease*.

Miller, A. M., Balasa, M., Blennow, K., Gardiner, M., **Rutkowska, A.**, Scheltens, P., Teunissen, C. E., Visser, P. J., Winblad, B., Waldemar, G., & Lawlor, B. (2017). Current Approaches and Clinician Attitudes to the Use of Cerebrospinal Fluid Biomarkers in Diagnostic Evaluation of Dementia in Europe. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 60(1), 201–210. <https://doi.org/10.3233/JAD-170502>

Natomiast, moim głównym zadaniem badawczym w projekcie BiomarkAPD była walidacja białka łańcucha lekkiego neurofilamentu (ang. *neurofilament light chain*), białka amyloid  $\beta$  oraz Tau jako potencjalnych biomarkerów diagnostycznych i różnicujących w otępieniu. W tym celu badałam krew i płyn mózgowo-rdzeniowy pobrane od pacjentów z demencją, analizowałam i integrowałam dane badawcze własne z danymi od partnerów projektu z



jednostek w całej Europie, interpretowałam wyniki badań laboratoryjnych, przygotowałam ryciny do publikacji, uczestniczyłam w pisaniu manuskryptu oraz przygotowywałam krew oraz płyn mózgowo-rdzeniowy do biobankowania w centralnym biobanku w Luksemburgu. Wyniki analiz laboratoryjnych wyżej wspomnianych biomarkerów zostały opublikowane w czasopiśmie *Bioanalysis* w 2016 roku.

Miller, A. M.\*, **Rutkowska, A.\***, Bahl, J. M., Herukka, S. K., Koel-Simmelink, M. J. A., Kruse, N., Mollenhauer, B., Siloaho, M., Skinningsrud, A., Zetterberg, H., Teunissen, C. E., & Lawlor, B. A. (2016). Multicenter immunoassay validation of cerebrospinal fluid neurofilament light: a biomarker for neurodegeneration. *Bioanalysis*, 8(21), 2243–2254. <https://doi.org/10.4155/BIO-2016-0114>

**\*pierwsi autorzy**

### **Pozostała działalność naukowa**

a) badania przeprowadzone przed doktoratem w czasie **studiów magisterskich ze Stosowanych Metod Badań Społecznych na Trinity College w Dublinie.**

Głównym celem badań było przeprowadzenie systematycznego przeglądu literatury z meta analizą Cochrane na temat wpływu depresji na odstawienie tytoniu u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca. Projekt był zrealizowany na Wydziale Psychologii w **Royal College of Surgeons (RCSI)** w Dublinie pod opieką **dr Franka Doyle** oraz **Professor Hanny McGee**. Mój udział w badaniu polegał na selekcji artykułów naukowych według założonych kryteriów włączenia, ekstrakcja danych z wyselekcjonowanych publikacji i pomoc w opisanu wyników do publikacji. Publikacja została opublikowana w czasopiśmie *Psychosomatic Medicine*.

Doyle, F., Rohde, D., **Rutkowska, A.**, Morgan, K., Cousins, G., & McGee, H. Systematic review and meta- analysis of the impact of depression on subsequent smoking cessation in patients with coronary heart disease: 1990 to 2013. *Psychosomatic Medicine*. 2014; 76(1), 44-57.

Kolejnym celem badań była ocena wielowymiarowości objawów psychosomatycznych z zastosowaniem skalowania Mokkena. Czterystu trzydziestu pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym wypełniło kwestionariusze oceniające depresję i wyczerpanie życiowe. Skalowanie Mokkena utworzyło silną jednowymiarową skalę, uporządkowaną hierarchicznie, odzwierciedlającą częstość występowania: zmęczenie (*exhaustion*, ang.) (częste), depresję (mniej częste) i beznadziejność (*hopelessness*, ang.) (rzadkie). Moim zadaniem było przeprowadzenie przeglądu literatury i analiza danych z kwestionariuszy. Wyniki badania zostały opublikowane w czasopiśmie *Irish Journal of Psychological Medicine*.

Doyle, F., **Kowalczyk, A.**, McGee, H., & Conroy, R.M. Exhaustion, depression and hopelessness in cardiac patients: a unidimensional hierarchy of symptoms revealed by Mokken scaling. *Irish Journal of Psychological Medicine*, 2011; 28(01), 29-31.

b) badania przeprowadzone przed doktoratem w czasie **studiów magisterskich z Neuronauki w Trinity College Institute of Neuroscience, Trinity College w Dublinie.**

Mój projekt magisterski pt. *"The potential of SIP agonists to reduce LPS-induced cellular stress in microglia"* był zrealizowany w firmie farmaceutycznej Actelion w Bazylei w Szwajcarii pod opieką **dr Johannes Mosbachera**. Efektem tego trzymiesięcznego stażu jest **praca magisterska** złożona w Trinity College w Dublinie na Wydziale Medycznym. W trakcie niniejszego stażu naukowego zdobyłam wiele wartościowych doświadczeń w zakresie pracy doświadczalnej i laboratoryjnej, a także nawiązałam kilka współprac, które utrzymuję do dzisiaj. Zdołyłam praktyczne umiejętności w zakresie planowania i przeprowadzania eksperymentów związanych z komórkami pierwotnymi, takimi jak izolacja komórek glejowych, poddawanie ich działaniu różnych aktywnych cząsteczek, takich jak agonista receptora SIP czy amyloid  $\beta$ , oraz wykonywanie pomiarów i analiz białek przy użyciu technik, takich jak cytometria przepływowa, immunohistochemia, RT qPCR, Western blot i testy ELISA.

c) badania przeprowadzone w czasie studiów doktoranckich w **Trinity Biomedical Sciences Institute (TBSI), Trinity College Dublin** w Irlandii

Mój projekt doktorski finansowany był z grantu, który otrzymałam z *Irish Research Council* w programie *Enterprise Partnership Scheme* i realizowany był w partnerstwie Trinity College Dublin w Irlandii z firmą farmaceutyczną Novartis w Szwajcarii. W 2011 roku, kiedy rozpoczęłam mój projekt doktorski na temat biologii receptora EBI2 w OUN było zaledwie 20 publikacji, w których receptor EBI2 był przedmiotem badań. Również w 2011 roku naturalny ligand EBI2, oksysterol  $7\alpha,25\text{OHC}$ , został odkryty przez jednego z moich promotorów, dr Andreasa Sailera z firmy farmaceutycznej Novartis w Szwajcarii. Wyniki tych badań zostały opublikowane w czasopiśmie *Nature* (Hannedouche et al., 2011). W tamtym czasie było tylko kilka grup badawczych na świecie, które zajmowały się tematyką EBI2 i wszystkie badały jego funkcje w układzie immunologicznym. Mój projekt doktorski był pierwszym, który badał występowanie oraz funkcję EBI2 poza obwodowym układem odpornościowym. W mojej pracy doktorskiej zrealizowanej pod opieką **Profesora Kumlesha Deva (TCD)** oraz **dr Andreasa Sailera (Novartis)**, jako pierwsza wykazałam, że EBI2 występuje w komórkach OUN, że jest w nich wysoce funkcjonalny i pełni wiele ważnych ról regulacyjnych, takich jak (i) migracja astrocytów (**Rutkowska et al., 2015**), (ii) regulacja syntezy i uwalniania oksysteroli w stanach zapalnych OUN (**Rutkowska, O'Sullivan, et al., 2016**), (iii) komunikacja między astrocytami a makrofagami (**Rutkowska, O'Sullivan, et al., 2016**) (iv) modulacja uwalniania prozapalnych cytokin w OUN (**Rutkowska et al., 2018**), (v) udział w tworzeniu mieliny i ochrona przed demielinizacją w warunkach patofizjologicznych (**Rutkowska et al., 2017**). Mające kluczowe znaczenie dla mojego późniejszego kierunku badań było odkrycie, że u myszy z nokautem (wyłączonym genem) EBI2 normalny rozwój mieliny jest opóźniony po narodzeniu (**Rutkowska et al., 2017**) oraz, że aktywacja EBI2 jego ligandem  $7\alpha,25\text{-OHC}$  chroni przed chemicznie indukowaną demielinizacją w organotypowych skrawkach mózdku myszy poprzez, między innymi, hamowanie uwalniania pro-zapalnych cytokin. Dane te po raz pierwszy wskazały, że receptor EBI2 może odgrywać ważną rolę w tworzeniu mieliny.

Efektom mojej pracy doktorskiej są następujące prace:

**Rutkowska, A.**, Preuss, I., Gessier, F., Sailer, A.W., Dev, K.K. EBI2 regulates intracellular signaling and migration in human astrocytes. *Glia*. 2015 63(2):341-51.

**Rutkowska, A.**, Shimshek, D.R., Sailer, A.W., Dev, K.K. The oxysterol receptor EBI2 regulates pro-inflammatory signalling and cytokine release in the central nervous system. *Neuropharmacology* 2018; 133:121-128.

**Rutkowska, A.**, Sailer, A.W., Dev, K.K. EBI2 receptor regulates myelin development and inhibits LPC- induced demyelination. *Journal of Neuroinflammation*. 2017;16;14(1):250.

**Rutkowska, A.**, O'Sullivan, S.A., Christen, I., Zhang, J., Sailer, A.W., Dev, K.K. The EBI2 signalling pathway plays a role in cellular crosstalk between astrocytes and macrophages. *Scientific Reports*. 2016 May 11; 6:25520.

**Rutkowska, A.**, Dev, K.K., Sailer, A.W. The Role of the Oxysterol/EBI2 Pathway in the Immune and Central Nervous Systems. *Current Drug Targets*. 2016; 17(16):1851-1860.

d) Dodatkowo, oprócz opisanego powyżej głównego projektu w czasie studiów doktoranckich brałam udział w projektach we współpracy z badaczami w Irlandii i Szwajcarii. Projekty te opisuję poniżej:

Brałam udział w projekcie badającym funkcje receptora sfingozyno-1-fosforanowego 1 (*sphingosine-1-phosphate receptor 1*, S1P1) we współpracy z **dr Florianem Mullershausenem** z *Novartis Institutes for Biomedical Research* w Szwajcarii. W tym projekcie przeprowadzałam doświadczenia na pierwotnych mysich i ludzkimi astrocytach, które traktowałam cząsteczkami aktywującymi receptory S1P (np. fingolimod, pFTY720) i następnie wykonywałam cały szereg oznaczeń biochemicznych i molekularnych. Efekty tej współpracy zostały opublikowane w czasopiśmie *British Journal of Pharmacology*.

Healy, L.M., Sheridan, G.K., Pritchard, A.J., **Rutkowska, A.**, Mullershausen, F., & Dev, K.K. Pathway specific modulation of S1P1 receptor signalling in rat and human astrocytes. *British Journal of Pharmacology*, 2013; 169(5), 1114-1129.

W kolejnym projekcie we współpracy z **dr Anisem Mirem** z *Novartis Institutes for Biomedical Research* w Szwajcarii, testowałam działanie przeciwciała monoklonalnego przeciwko interleukinie-17A o nazwie *secukinumab* na zmniejszenie uwalniania prozapalnych cytokin w ludzkich astrocytach. Wykonywałam oznaczenia i pomiary zmian poziomu białek i mRNA metodą Western blot, ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) i innych. Wyniki tych badań zostały opublikowane w czasopiśmie *GLIA*.

Elain, G., Jeanneau, K., **Rutkowska, A.**, Mir, A.K., Dev, K.K. The selective anti-IL17A monoclonal antibody secukinumab (AIN457) attenuates IL17A-induced levels of IL6 in human astrocytes. *Glia*. 2014; 62(5), 725- 735.

e) aktualna praca i plany na przyszłość

Po otrzymaniu **grantu POLONEZ (NCN)** w grudniu 2016 roku, umożliwiającemu rozpoczęcie samodzielnej działalności naukowej, powróciłam do Polski i podjęłam pierwsze badania na **Gdańskim Uniwersytecie Medycznym**. Objęłam stanowisko adiunkta/kierownika projektu, który został zrealizowany na Wydziale Lekarskim w Zakładzie Medycyny Laboratoryjnej. Współpracowałam z **Profesorem Andrzejem Szutowiczem**, pełniącym rolę partnera naukowego. W projekcie POLONEZ pt. „Funkcja receptora EBI2 w ludzkich progenitorach oligodendrocytów oraz jego rola w kuprizonowym modelu stwardnienia rozsianego” badałam funkcje receptora EBI2 w ludzkich oligodendrocytach oraz w modelu zwierzęcym stwardnienia rozsianego. Nawiązałam również współpracę z **Profesorem Bartoszem Karaszewskim, Profesorem Januszem Morysiem** oraz **dr Marią Velasco-Estevez**. Wyniki z projektu dostarczyły nowych danych na temat roli receptor EBI2 w OUN, a zwłaszcza jego funkcji regulacyjnych w oligodendrocytach (**Maria Velasco-Estevez et al., 2021, praca nr. 1 w cyklu powiazanych artykułów**). Dane uzyskane z kuprizonowego modelu zwierzęcego umożliwiły wgląd w patomechanizmy demielinizacji i remielinizacji u myszy z nokautem EBI2. Znajomość tych patomechanizmów uotowało nową ścieżkę modulacji funkcji oligodendrocytów oraz ścieżek sygnalizacyjnych biorących udział w remielinizacji (**Klejbor et al., 2021, praca nr. 2 w cyklu powiazanych artykułów**).

W grudniu 2019 roku otrzymałam **grant OPUS (NCN)**, którego realizację rozpoczęłam po powrocie z trzeciego urlopu macierzyńskiego w kwietniu 2020 roku w **Zakładzie Anatomii i Neurobiologii** na **Gdańskim Uniwersytecie Medycznym**. Projekt OPUS pt. „Szlaki sygnałowe receptora EBI2/oksysterolu w patofizjologii, terapii oraz diagnostyce stwardnienia rozsianego” jest realizowany we współpracy z **Profesorem Bartoszem Karaszewskim, Kierownikiem Kliniki Neurologii Dorosłych UCK**. Prowadzimy serię eksperymentów, których celem jest ocena ewentualnych różnic w poziomie receptora oraz oksysterolu w PMR i krwi u pacjentów z rozpoznaniem SM w porównaniu z osobami zdrowymi. Ponadto, prowadzimy badania mające na celu zbadanie wpływu PMR pobranego od pacjentów z SM na poziom białek pro-zapalnych w OUN myszy. W ramach badania, skoncentrujemy się również na analizie potencjalnych interakcji patogennych między białkami obecnymi w PMR pobranym od pacjentów z SM i porównamy je z osobami zdrowymi. Potencjalne odkrycia z obecnego projektu są bardzo ważne ponieważ dostarczą nowych danych odnośnie roli receptora EBI2 w mózgu, w SM oraz przyczynią się do odkrycia nowych procesów chorobowych, markerów diagnostycznych oraz potencjalnie nowych terapii SM.

Od 2019 roku współpracuję z **Profesorem Gerhardem Roglerem, Kierownikiem Kliniki Gastroenterologii i Hepatologii** w **Szpitalu Uniwersyteckim w Zurychu** w Szwajcarii. Nasza współpraca skupia się na badaniu funkcji receptorów aktywowanych protonami (GPP65, GPR4, GPR68) w kontekście przewlekłych chorób zapalnych, takich jak choroba zapalna jelit (*inflammatory bowel disease* ang., IBD) oraz SM. W 2022 roku otrzymałam wsparcie finansowe „**Młody Twórca Nauki**” z programu „Inicjatywa Doskonałości-Uczelnia Badawcza” na realizację zadań w ramach tej współpracy. Nasza pierwsza wspólna publikacja

znajduje się w internetowym repozytorium naukowym *BioRxiv* i jest w recenzji w czasopiśmie PLOS One.

Opielka, M., Caratis, F., Hausmann, M., Velasco-Estevez, M., Vallière, C. de, Seuwen, K., Rogler, G., Karaszewski, B., **Rutkowska, A.\*** (2023). The proton-activated receptor TDAG8 is upregulated in oligodendrocytes during maturation and under acidic conditions. *BioRxiv*, 2023.03.02.530787. W recenzji w czasopiśmie *PLOS One*

\*autor korespondencyjny

W 2021 roku nawiązałam współpracę z **Profesorem Tomomim Furihatą** z **Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences** w Japonii. Z Profesorem Furihatą prowadzimy badania nad patofizjologią bariery krew-mózg w SM używając do tego ludzkiego trójkomórkowego modelu bariery. Modele, które budujemy (sferoidy 3D i model typu transwell) z ludzkich komórek śródbłonna naczyniowego, ludzkich perycytów oraz astrocytów pochodzą z naczyń włosowatych mózgu i zostały warunkowo unieśmiertelnione przez Prof. Furihatę. Pierwsza publikacja, która powstała we współpracy z Prof. Furihatą została opublikowana w czasopiśmie *Frontiers in Molecular Neuroscience* (**Kutryb-Zajac et al., 2022, praca nr. 4 w cyklu powiązanych artykułów**). Kolejna praca znajduje się w internetowym repozytorium naukowym *BioRxiv* i jest w recenzji w czasopiśmie *Frontiers in Neuroscience*.

Caratis, F., Karaszewski, B., Klejbor, I., Furihata, T., **Rutkowska, A.\*** Systemic inflammation differentially modulates the levels of EBI2 and CH25H/CYP7B1 enzymes in the brain microvascular cells. *BioRxiv*, 2023.04.16.537063. W recenzji w czasopiśmie *Frontiers in Neuroscience*

\*autor korespondencyjny

We wrześniu 2022 nawiązałam współpracę z **dr Lucią Fernandez** z **Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO)** z Madrytu w Hiszpanii. Dr Fernandez opracowuje innowacyjną terapię z użyciem komórek CAR-T dla pacjentów pediatrycznych z nawracającymi i opornymi na leczenie guzami litymi w OUN. W ramach współpracy w czerwcu 2023 przyjechała do mojej grupy na trzymiesięczny staż badawczy doktorantka **Marta Ibanez Navarro**. W mojej grupie, pani Ibanez Navarro testuje migrację komórek CAR-T oraz przedostawanie się egzosomów uwalnianych przez komórki CAR-T przez barierę krew-mózg *in vitro*. Buduje również sferoidy z komórek nowotworowych pochodzących od pacjentów, ludzkich komórek śródbłonna naczyniowego oraz ludzkich perycytów w celu zbadania wpływu komórek nowotworowych na przepuszczalność bariery krew-mózg.

W marcu 2023 roku zainicjowałam i zostałam koordynatorem konsorcjum międzynarodowego we wniosku projektowym pt. „*Dementia and Myelination: Uncovering the Role of Myelination in the Pathogenesis and Progression of Alzheimer’s and Parkinson’s disease*” złożonym w konkursie grantowym sieci Joint Programme – Neurodegenerative Disease Research (JPND). Partnerami w tym projekcie są **Prof. Bartosz Karaszewski** (Gdański Uniwersytet Medyczny), **Prof. Andrew Harkin** oraz **Dr. Nengwei Hu** (Trinity College Institute of Neuroscience, Dublin, Irlandia), **Dr. Sinead O’Sullivan** (Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE), Bonn, Niemcy), **Prof. Hilal Lashuel** (Swiss

**Federal Institute of Technology Lausanne, Brain Mind Institute, Szwajcaria**). Poprzez zastosowanie wielowarstwowego podejścia, które obejmuje badania *in vitro*, rozległe badania przedkliniczne *in vivo* oraz badania kliniczne, naszym celem jest zidentyfikowanie celów terapeutycznych w celu przywrócenia funkcji progenitorów oligodendrocytów oraz mielinizacji w przypadku chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera i Parkinsona. Przeprowadzimy szeroką i na dużą skalę analizę istniejących oraz nowo pozyskanych danych OMICS w celu uchwycenia i zrozumienia związku pomiędzy zdolnością oligodendrocytów do mielinizacji a rozwojem patologii  $\alpha$ Syn i A $\beta$ .

W grudniu 2022 zostałam **zastępcą Kierownika Badań Centrum Chorób Mózgu (CChM) GUMed**. Moja działalność naukowa w CChM skupia się na badaniu mechanizmów oraz poszukiwaniu i testowaniu nowych celów terapeutycznych do odbudowy mieliny na modelach zwierzęcych chorób demielinizacyjnych i neurodegeneracyjnych. W marcu 2023 projekt CChM, którego jestem kierownikiem pt. „Ocena toksyczności ostrej i przewlekłej zmodyfikowanego oksysterolu CF3-7 $\alpha$ ,25OHC i barbadyny *in vivo*” otrzymał finansowanie w ramach programu "Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza" (IDUB) dla działania Inkubator GUMed. Projekt ma na celu zbadanie toksyczności (ostrej/podostrej i przewlekłej) CF3-7 $\alpha$ ,25OHC i barbadyny, określenie optymalnej dawki, oraz częstotliwości podawania CF3-7 $\alpha$ ,25OHC i barbadyny (barbadyna: selektywny małowcząsteczkowy inhibitor interakcji  $\beta$ -arestyna/ $\beta$ 2-adaptyna, blokuje internalizację indukowaną agonistą receptorów sprzężonych z białkiem G). Badania prowadzone w tym projekcie mogą przyczynić się do opracowania pierwszej terapii naprawczej mieliny oraz modulującej SM. Jesteśmy na etapie opracowywania dokumentów do złożenia **zgłoszenia patentowego w Urzędzie Patentowym RP**.

W maju 2023 otrzymałam **trzeci indywidualny grant z NCN w konkursie SONATA 18**. Projekt pt. „Receptor EBI2 jako nowy target terapii naprawczej mieliny w stwardnieniu rozsianym” będzie realizowany w CChM i ma na celu zbadanie molekularnych i funkcjonalnych efektów zwiększonej sygnalizacji wewnątrzkomórkowej receptora EBI2 w pierwotnych komórkach glejowych, zbadanie mechanizmu działania remielinizacji indukowanej EBI2/7 $\alpha$ ,25OHC w modelu organotypowym mózdzku oraz zbadanie promielinizacyjnych właściwości oksysterolu 7 $\alpha$ ,25OHC w modelu kuprizonowym SM.

Obecnie jako Adiunkt/Kierownik projektu OPUS (NCN) oraz Zastępca Kierownika Badań CChM kieruje sześciuosobowym zespołem składającym się z trzech doktorantów, pracownika naukowo-technicznego oraz dwóch magistrantów. Głównymi metodami badawczymi są mikroskopia konfokalna i fluorescencyjna oraz analizy biochemiczne, molekularne oraz testy czynnościowe (*functional readouts*, ang.). Doświadczenia prowadzimy na pierwotnych komórkach mózgowych (astrocytach, mikrogleju, progenitorach oligodendrocytów (OPC)), organotypowych skrawkach mózdzku, trójkomórkowych ludzkich modelach bariery krew-mózg, pierwotnych komórkach immunologicznych (np. PBMC, CD4+) oraz liniach komórkowych (np. oligodendrocytach MO3.13, U937, THP-1, Jurkat). Wykorzystujemy również ludzkie mózgowia oraz krew i PMR od pacjentów. Obiecujące cele terapeutyczne testujemy na mysich modelach *in vivo* (np. model LPS, model kuprizonowy, czy doświadczalne autoimmunologiczne zapalenie mózgu i rdzenia (EAE)).

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

**2014-11-17 do 2015-12-31 Post-doctoral Fellow**, Wydział Medyczny, Katedra Gerontologii Medycznej, Trinity College Dublin, Republika Irlandii.

Staż podoktorski w projekcie BiomarkAPD (ang. *Biomarkers for Alzheimer's and Parkinson's disease*) finansowanym w programie JPND (ang. *EU Joint Programme – Neurodegenerative Diseases*) pod opieką **Profesora Briana Lawlora**.

Efekty działalności naukowej w jednostce zagranicznej:

Miller A.M.\*, **Rutkowska A.\***, Bahl J.M., Herukka S.K., Koel-Simmeling M.J., Kruse N., Mollenhauer B., Siloaho M., Skinningsrud A., Zetterberg H., Teunissen C.E., Lawlor B.A. (2016c). Multicenter immunoassay validation of cerebrospinal fluid neurofilament light: a biomarker for neurodegeneration. *Bioanalysis*. 2016; 8(21):2243-2254.

\*pierwsi autorzy

Miller, A.M., Balasa, M., Blennow, K., Gardiner, M., **Rutkowska A.**, Scheltens, P., Teunissen, C.E., Visser, P.J., Winblad, B., Waldemar, G., Lawlor, B. Current Approaches and Clinician Attitudes to the Use of Cerebrospinal Fluid Biomarkers in Diagnostic Evaluation of Dementia in Europe. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2017;60(1):201-210.

**2011-10-01 do 2014-09-30 Doktorant**, Wydział Medyczny, Katedra Fizjologii, Trinity College Dublin, Republika Irlandii

**2011-10-01 do 2014-09-30 Doktorant**, Novartis Institutes for Biomedical Research (NIBR), Novartis Pharmaceuticals, Bazylea, Szwajcaria

Mój projekt doktorski realizowany był w Trinity College Dublin w Irlandii oraz w firmie farmaceutycznej Novartis w Szwajcarii po uzyskaniu grantu z *Irish Research Council* w programie *Enterprise Partnership Scheme*. Promotorami mojej pracy byli **Profesor Kumlesh Dev (TCD)** oraz **dr Andreas Sailer (Novartis)**.

Efekty działalności naukowej w jednostce zagranicznej:

**Rutkowska, A.**, Preuss, I., Gessier, F., Sailer, A.W., Dev, K.K. EBI2 regulates intracellular signaling and migration in human astrocytes. *Glia*. 2015 63(2):341-51.

**Rutkowska, A.**, Shimshek, D.R., Sailer, A.W., Dev, K.K. The oxysterol receptor EBI2 regulates pro-inflammatory signalling and cytokine release in the central nervous system. *Neuropharmacology* 2018; 133:121-128.

**Rutkowska, A.**, Sailer, A.W., Dev, K.K. EBI2 receptor regulates myelin development and inhibits LPC- induced demyelination. *Journal of Neuroinflammation*. 2017;16;14(1):250.

**Rutkowska, A.,** O'Sullivan, S.A., Christen, I., Zhang, J., Sailer, A.W., Dev, K.K. The EBI2 signalling pathway plays a role in cellular crosstalk between astrocytes and macrophages. *Scientific Reports*. 2016 May 11; 6:25520.

**Rutkowska, A.,** Dev, K.K., Sailer, A.W. The Role of the Oxysterol/EBI2 Pathway in the Immune and Central Nervous Systems. *Current Drug Targets*. 2016; 17(16):1851-1860.

**2011-10-01 do 2014-09-30 Student-badacz,** Wydział Medyczny, Katedra Fizjologii, Trinity College Dublin, Republika Irlandii.

W czasie studiów doktoranckich zatrudniona byłam jako student-badacz do pracy w projektach badawczych we współpracy z **dr Florianem Mullershausenem** oraz **dr Anisem Mirem** z *Novartis Institutes for Biomedical Research* w Szwajcarii. Doświadczenia w ramach tych projektów wykonywałam w TCD w Irlandii oraz w Novartisie w Szwajcarii.

Efekty działalności naukowej w jednostce zagranicznej:

Healy, L.M., Sheridan, G.K., Pritchard, A.J., **Rutkowska, A.,** Mullershausen, F., & Dev, K.K. Pathway specific modulation of S1P1 receptor signalling in rat and human astrocytes. *British Journal of Pharmacology*, 2013; 169(5), 1114-1129.

Elain, G., Jeanneau, K., **Rutkowska, A.,** Mir, A.K., Dev, K.K. The selective anti-IL17A monoclonal antibody secukinumab (AIN457) attenuates IL17A-induced levels of IL6 in human astrocytes. *Glia*. 2014; 62(5), 725- 735.

**2010-06-01 do 2010-08-31 Stażysta** (3 miesiące), dział *Drug Discovery Pharmacology & Pre-clinical* (ang.), Actelion Pharmaceuticals, Bazylea, Szwajcaria

Studia magisterskie z Neuronauki na Trinity College Dublin obejmowały staż badawczy, który zrealizowałam w firmie farmaceutycznej **Actelion** w Bazylei w Szwajcarii w dziale *Drug Discovery Pharmacology & Pre-clinical* pod opieką **dr Johannesesa Mosbachera**

Efekty działalności naukowej w jednostce zagranicznej:

Praca magisterska złożona na Trinity College w Dublinie na Wydziale Medycznym pod tytułem: "*The potential of SIP agonists to reduce LPS-induced cellular stress in microglia*".

**2009-04-20 do 2009-08-14 Stażysta** (5 miesięcy), Katedra Psychologii, *Royal College of Surgeons Ireland (RCSI)*, Dublin, Republika Irlandii

Studia magisterskie ze Stosowanych Metod Badań Społecznych na Trinity College Dublin obejmowały staż badawczy, który zrealizowałam na Royal College of Surgeons Ireland (RCSI) w Dublinie w grupie **dr Franka Doylea** oraz **Profesor Hanny McGee**.

Efekty działalności naukowej w jednostce zagranicznej:

Doyle, F., **Kowalczyk, A.,** McGee, H., & Conroy, R.M. Exhaustion, depression and hopelessness in cardiac patients: a unidimensional hierarchy of symptoms revealed by Mokken scaling. *Irish Journal of Psychological Medicine*, 2011; 28(01), 29-31.



Doyle, F., Rohde, D., **Rutkowska, A.**, Morgan, K., Cousins, G., & McGee, H. Systematic review and meta- analysis of the impact of depression on subsequent smoking cessation in patients with coronary heart disease: 1990 to 2013. *Psychosomatic Medicine*. 2014; 76(1), 44-57.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

### **Działalność dydaktyczna**

Promotor pomocniczy prac doktorskich realizowanych w ramach kierowanych projektów badawczych finansowanych ze środków zewnętrznych (NCN):

- a) **mgr Fiona Caratis** tytuł pracy doktorskiej: „*The expression and function of EBI2 receptor in the human and mouse blood-brain barrier under normal and inflammatory conditions and multiple sclerosis*”.  
Okres sprawowania opieki: 2021 – teraz
- b) **Pan Mikołaj Opielka** tytuł pracy doktorskiej: “*The function of proton-activated receptors TDAG8 and GPR4 in the central nervous system*”.  
Okres sprawowania opieki: 2022 - teraz
- c) **mgr Joanna Frączek** tytuł pracy doktorskiej: “*Identification and characterisation of EBI2 receptor interacting proteins and biomarkers in the blood and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients*”.  
Okres sprawowania opieki: 2021 - 2022
- d) Opieka merytoryczna oraz naukowa nad pracą magisterską **Pani Agnieszki Baranowskiej**, studentki Biologii Medycznej na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego. Roboczy tytuł pracy magisterskiej: „*The role of the mechanosensing ion channel Piezo1 in OPC-mediated remyelination.*”  
Okres sprawowania opieki: 02.2023 – teraz
- e) Opieka naukowa merytoryczna oraz techniczna nad Panem **Oliwierzem Krajewskim**, studentem Kierunku Lekarskiego na Gdańskim Uniwersytecie Medycznym. Pan Krajewski zdobywa wiedzę i doświadczenie w pracy naukowo-badawczej nad OUN badając funkcję receptora TDAG8 w pierwotnym mikrogleju.  
Okres sprawowania opieki: 12.2022 – teraz
- f) Opieka merytoryczna oraz techniczna podczas stażu badawczego mgr **Niny Koch**. Staż Pani Koch został zrealizowany w Zakładzie Medycyny Laboratoryjnej na Wydziale Medycznym Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w ramach projektu POLONEZ 2 (NCN), którego byłam kierownikiem.  
Okres sprawowania opieki: 06.2019 do 08.2019

- g) Opieka merytoryczna i techniczna podczas pierwszego stażu podoktorskiego **dr Marii Velasco-Estevez**. Staż dr Velasco-Estevez został zrealizowany w Zakładzie Medycyny Laboratoryjnej na Wydziale Medycznym Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w ramach projektu POLONEZ 2 (NCN), którego byłam kierownikiem.  
Okres sprawowania opieki: 06.2019 do 09.2019
- h) Opieka naukowa merytoryczna oraz techniczna nad Panem **Pavlem Demidovem** studentem Fizjologii na Trinity College Dublin. Tytuł pracy licencjackiej: „*Investigation of EB12 receptor in the central nervous system*”.  
Okres sprawowania opieki: 11.2012 do 03.2013
- i) Opieka naukowa merytoryczna oraz techniczna nad Panią **Emmą O'Brien** studentką *Human Health & Disease* na Trinity College w Dublinie. Tytuł pracy licencjackiej: “*Effects of 7α25OHC on EB12-mediated pERK signalling in human astrocytes & levels of IIIβ in mouse cerebellar slices*”.  
Okres sprawowania opieki: 11.2012 do 03.2013

Asystent wykładowcy:

- 2011-2014 *Trinity College Dublin*, Wydział Medyczny, Katedra Fizjologii, Dublin, Irlandia. Przedmioty: eksperymentalna neuronauka (*Experimental Neuroscience*, ang.), neuronauka komórki (*Cellular Neuroscience*, ang.), klub dyskusyjny (*Journal Clubs*, ang.)
- 2014-2015 *Dublin Institute of Technology*, Dublin, Irlandia. Przedmiot: Fizjologia (zajęcia laboratoryjne).

### Popularyzacja nauki

- a) W maju 2023 r. zostałam jedną z 25 bohaterek/ów projektu pt. „*Gdansk. The city of young scientists*” realizowanym na Gdańskim Uniwersytecie Medycznym. Jego celem jest promocja i upowszechnianie oryginalnych badań prowadzonych przez naukowców GUMed wśród międzynarodowych kandydatów pragnących kontynuować swoją karierę naukową i medyczną na Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (<https://youngscientists.mug.edu.pl/mechanisms-regulating-myelin-repair/>).
- b) W lutym 2023 r. odwiedziłam szkołę podstawową „Nowy Świat” w Gdańsku, aby promować neuronaukę i badania medyczne wśród małych dzieci. Podczas mojej wizyty rozmawialiśmy o pracy naukowca, jego codziennych zajęciach i rodzaju badań, które można wykonywać na uczelni badawczej. Dzieci wzięły udział w różnych konkursach, które między innymi obejmowały układanie łąmigłówek i składanie części dużego modelu mózgu.

- c) W październiku 2022 r. udzieliłam wywiadu w formie podcastu dla NeuronuSound, Koła naukowego Neuronaukowców „Neuronus” na Uniwersytecie Jagiellońskim podczas *12th Neuronus 2022 Neuroscience Forum* w Krakowie. Podcast pt. „*Is the cure for multiple sclerosis in our reach?*” dostępny jest między innymi na kanałach NeuronuSound na *Spotify* i YouTube [www.youtube.com/watch?v=MVLTYZ5Fnrg](http://www.youtube.com/watch?v=MVLTYZ5Fnrg).
- d) W maju 2022 r. wzięłam aktywny udział w Pikniku Naukowym Fahrenheita, który odbył się w Gdańsku. Społeczność akademicka trzech uczelni: Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Politechniki Gdańskiej i Uniwersytetu Gdańskiego wraz z Hevelianum i Partnerami zaprosiła szerszą publiczność do wspólnie odkrywać naukę poprzez zabawę. Podczas pikniku demonstrowałam eksperymenty naukowe, modele ludzkiego mózgu oraz przeprowadzałam konkurs o nazwie „mózgo-puzzle” dla dzieci i młodzieży.
- e) W lipcu 2019 r. zaprosiłam dzieci z gdańskiego przedszkola do Zakładu Medycyny Laboratoryjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Celem wizyty było przybliżenie dzieciom funkcjonowania i charakteru uczelni medycznej, jaką jest GUMed, a także pokazanie, czym zajmują się naukowcy w laboratorium. Dzieci spędziły dzień pełen ciekawych zajęć naukowych i zabaw edukacyjnych. Poznawały komórki krwi, budowę mózgu oraz miały okazję przeprowadzać „eksperymenty” w laboratorium oraz obejrzeć komórki w hodowli pod mikroskopem.
- f) W marcu 2019 r. napisałam krótkie streszczenie jednej z moich publikacji o roli receptora EB12 w oligodendrocytach do internetowego portalu *Atlas of Science*. Portal został założony przez naukowców w celu promowania i rozpowszechniania badań naukowych w społeczeństwie. W tym celu naukowcy piszą krótki i przystępny tekst podsumowujący ich najnowsze badania oparty na recenzowanych artykułach. Publikacje w tym medium mają tę zaletę, że mają odbiorców na całym świecie w każdym wieku i z różnych środowisk.
- g) W marcu 2018 r. razem ze Stowarzyszeniem Absolwentów Marie Curie (*Marie Curie Alumni Association*, ang.), którego jestem członkiem odwiedziłam miejscowa szkole średnią. Działania informacyjne miały formę prezentacji i dyskusji z uczniami ostatnich klas szkół średnich. Celem spotkania było podniesienie świadomości na temat możliwości kariery naukowej oraz możliwości oferowanych przez Akcje Marie Skłodowska-Curie współorganizowane z Polskim Oddziałem Stowarzyszenia Absolwentów Marie Curie (MCAA).
- h) Wszystkie moje działania naukowe są na bieżąco aktualizowane na stronie internetowej [www.rutkowskalab@gumed.edu.pl](http://www.rutkowskalab@gumed.edu.pl) Aktywność naukowa jak i inne działania w mojej grupie badawczej są na tej stronie aktualizowane w sekcji „nowości”.
- i) Aktywność i działania mojej grupy badawczej są również regularnie aktualizowane na Twitterze [@Rutkowska\\_Lab](https://twitter.com/Rutkowska_Lab)

## 7. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej

### Przerwy w karierze naukowej

W 2015 roku po uzyskaniu tytułu doktora urodziłam moje pierwsze dziecko. Drugie urodziłam w roku 2017 i trzecie w 2020 roku.

Urlopy związane z opieką i wychowaniem dzieci udzielone na zasadach określonych w Kodeksie pracy, liczba dni: **912**, liczba dzieci: **3**

### Nagrody za działalność naukową

- 2021 Nagroda Specjalna Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za publikację: pt. „EBI2 is temporarily upregulated in MO3.13 oligodendrocytes during maturation and regulates remyelination in the organotypic cerebellar slice model” *Int. J. Mol. Sci.*, 2021: vol. 22, nr 9, art. ID 4342, s. 1-15
- 2020 Nominacja do Polskiej Nagrody Inteligentnego Rozwoju 2020 w kategorii: Naukowiec przyszłości za realizację projektu pt.: „Szlaki sygnałowe receptora EBI2/oksysteroli w patofizjologii, terapii oraz diagnostyce stwardnienia rozsianego.”
- 2017 Laureatka w konkursie Gdyński Biznes Plan w kategorii „Innowacyjne rozwiązania i technologie”
- 2016 Nominacja do nagrody „Pomorskie Sztormy 2016” w kategorii „Młoda Firma Roku” dla startupu Laberis Scientific, którego byłam pomysłodawczynią oraz główną badaczką
- 2013 Najlepszy poster na konferencji *Frontiers in Neurology Ireland*, Dublin w Irlandii

### Szkolenia, kursy i certyfikaty

- 2018-2019 Szkolenia w ramach grantu POLONEZ 2 (NCN) przeprowadzone przez Vitae's Researcher Development Programmes, Warszawa  
*Tematy szkoleń: Protecting IP; Project Management; Working with Others; Personal Effectiveness*
- 2014 Warsztaty pt. *Neuroinflammation & Drug Discovery* zorganizowane i przeprowadzone w Novartis Pharmaceuticals, Bazylea, Szwajcaria
- 2009 Szkolenie i certyfikat z przeprowadzania *Cochrane Systematic Reviews*, Dublin Irlandia
- 2016 Uczestniczka kilkutygodniowego programu *Startups Wanted* w Pomorskim Parku Nauko-Technologicznym w Gdyni  
*Tematy szkoleń: Business Models; Know the market; Service Blueprint; Obtaining Funds; Pitching to Investors*

.....  
(podpis wnioskodawcy)

## Bibliografia

- Andreasyan, N. A., Hairapetyan, H. L., Sargisova, Y. G., & Mardanyan, S. S. (2005). ADA2 isoform of adenosine deaminase from pleural fluid. *FEBS Letters*, *579*(3), 643–647. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2004.11.109>
- Aye, I. L. M. H., Waddell, B. J., Mark, P. J., & Keelan, J. A. (2012). Oxysterols exert proinflammatory effects in placental trophoblasts via TLR4-dependent, cholesterol-sensitive activation of NF- $\kappa$ B. *Molecular Human Reproduction*, *18*(7), 341–353. <https://doi.org/10.1093/molehr/gas001>
- Baptista, A. P., Gola, A., Huang, Y., Milanez-Almeida, P., Torabi-Parizi, P., Urban, J. F., Shapiro, V. S., Gerner, M. Y., & Germain, R. N. (2019). The Chemoattractant Receptor Ebi2 Drives Intranodal Naive CD4<sup>+</sup> T Cell Peripheralization to Promote Effective Adaptive Immunity. *Immunity*, *50*(5), 1188-1201.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.04.001>
- Bened-Jensen, T., Madsen, C. M., Arfelt, K. N., Smethurts, C., Blanchard, A., Jepras, R., Rosenkilde, M. M., Smethurst, C., Blanchard, A., Jepras, R., Rosenkilde, M. M., Smethurts, C., Blanchard, A., Jepras, R., & Rosenkilde, M. M. (2013). Small molecule antagonism of oxysterol-induced Epstein-Barr virus induced gene 2 (EBI2) activation. *FEBS Open Bio*, *3*(1), 156–160. <https://doi.org/10.1016/j.fob.2013.02.003>
- Bened-Jensen, T., Norn, C., Laurent, S., Madsen, C. M., Larsen, H. M., Arfelt, K. N., Wolf, R. M., Frimurer, T., Sailer, A. W., & Rosenkilde, M. M. (2012). Molecular characterization of oxysterol binding to the Epstein-Barr virus-induced gene 2 (GPR183). *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(42), 35470–35483. <https://doi.org/10.1074/JBC.M112.387894>
- Birkenbach, M., Josefsen, K., Yalamanchili, R., Lenoir, G., & Kieff, E. (1993). Epstein-Barr virus-induced genes: first lymphocyte-specific G protein-coupled peptide receptors. *Journal of Virology*, *67*(4), 2209–2220.
- Björkhem, I., Lövgren-Sandblom, A., Leoni, V., Meaney, S., Brodin, L., Salvesson, L., Winge, K., Pålhagen, S., & Svenningsson, P. (2013). Oxysterols and Parkinson's disease: Evidence that levels of 24S-hydroxycholesterol in cerebrospinal fluid correlates with the duration of the disease. *Neuroscience Letters*, *555*, 102–105. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.09.003>
- Bosco, D. A., Fowler, D. M., Zhang, Q., Nieva, J., Powers, E. T., Wentworth, P., Lerner, R. A., & Kelly, J. W. (2006). Elevated levels of oxidized cholesterol metabolites in Lewy body disease brains accelerate alpha-synuclein fibrilization. *Nature Chemical Biology*, *2*(5), 249–253. <https://doi.org/10.1038/NCHEMBIO782>
- Bynoe, M. S., Viret, C., Yan, A., & Kim, D. G. (2015). Adenosine receptor signaling: a key to opening the blood-brain door. *Fluids and Barriers of the CNS*, *12*(1). <https://doi.org/10.1186/S12987-015-0017-7>
- Chalmin, F., Rochemont, V., Lippens, C., Clottu, A., Sailer, A. W. W., Merkler, D., Hugues, S., & Pot, C. (2015). Oxysterols regulate encephalitogenic CD4<sup>+</sup> T cell trafficking during central nervous system autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*, *56*, 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2014.10.001>
- Clottu, A. S., Mathias, A., Sailer, A. W., Schluep, M., Seebach, J. D., Du Pasquier, R., & Pot, C. (2017). EBI2 Expression and Function: Robust in Memory Lymphocytes and Increased by Natalizumab in Multiple Sclerosis. *Cell Reports*, *18*(1), 213–224. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.006>
- Cordero, O. J., Salgado, F. J., Fernández-Alonso, C. M., Herrera, C., Lluís, C., Franco, R., & Nogueira, M. (2001). Cytokines regulate membrane adenosine deaminase on human activated lymphocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, *70*(6), 920–930. <https://doi.org/10.1189/JLB.70.6.920>

- Coste, B., Mathur, J., Schmidt, M., Earley, T. J., Ranade, S., Petrus, M. J., Dubin, A. E., & Patapoutian, A. (2010). Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science (New York, N.Y.)*, *330*(6000), 55–60. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1193270>
- Cramer, S. P., Modvig, S., Simonsen, H. J., Frederiksen, J. L., & Larsson, H. B. W. (2015). Permeability of the blood-brain barrier predicts conversion from optic neuritis to multiple sclerosis. *Brain : A Journal of Neurology*, *138*(Pt 9), 2571–2583. <https://doi.org/10.1093/brain/awv203>
- Crick, P. J., Griffiths, W. J., Zhang, J., Beibel, M., Abdel-Khalik, J., Kuhle, J., Sailer, A. W., & Wang, Y. (2017). Reduced Plasma Levels of 25-Hydroxycholesterol and Increased Cerebrospinal Fluid Levels of Bile Acid Precursors in Multiple Sclerosis Patients. *Molecular Neurobiology*, *54*(10), 8009–8020. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0281-9>
- De Stefano, N., Giorgio, A., Battaglini, M., Rovaris, M., Sormani, M. P., Barkhof, F., Korteweg, T., Enzinger, C., Fazekas, F., Calabrese, M., Dinacci, D., Tedeschi, G., Gass, A., Montalban, X., Rovira, A., Thompson, A., Comi, G., Miller, D. H., & Filippi, M. (2010). Assessing brain atrophy rates in a large population of untreated multiple sclerosis subtypes. *Neurology*, *74*(23), 1868–1876. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181e24136>
- Diczfalusy, U., Olofsson, K. E., Carlsson, A. M., Gong, M., Golenbock, D. T., Rooyackers, O., Fläring, U., & Björkbacka, H. (2009). Marked upregulation of cholesterol 25-hydroxylase expression by lipopolysaccharide. *Journal of Lipid Research*, *50*(11), 2258–2264. <https://doi.org/10.1194/JLR.M900107-JLR200>
- Domercq, M., Zabala, A., & Matute, C. (2019). Purinergic receptors in multiple sclerosis pathogenesis. *Brain Research Bulletin*, *151*, 38–45. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESBULL.2018.11.018>
- Dunwiddie, T. V., & Masino, S. A. (2001). The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annual Review of Neuroscience*, *24*, 31–55. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.NEURO.24.1.31>
- Franco, R., Casadó, V., Ciruela, F., Saura, C., Mallol, J., Canela, E. I., & Lluís, C. (1997). Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. *Progress in Neurobiology*, *52*(4), 283–294. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(97\)00013-0](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(97)00013-0)
- García-Gil, M., Camici, M., Allegrini, S., Pesi, R., & Tozzi, M. G. (2021). Metabolic Aspects of Adenosine Functions in the Brain. *Frontiers in Pharmacology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2021.672182/PDF>
- Giovannoni, G., Popescu, V., Wuerfel, J., Hellwig, K., Iacobescu, E., Jensen, M. B., García-Domínguez, J. M., Sousa, L., De Rossi, N., Hupperts, R., Fenu, G., Bodini, B., Kuusisto, H. M., Stankoff, B., Lycke, J., Airas, L., Granziera, C., & Scalfari, A. (2022). Smouldering multiple sclerosis: the ‘real MS.’ *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, *15*. <https://doi.org/10.1177/17562864211066751>
- Giubilei, F., Antonini, G., Di Legge, S., Sormani, M. P., Pantano, P., Antonini, R., Sepe-Monti, M., Caramia, F., & Pozzilli, C. (2002). Blood cholesterol and MRI activity in first clinical episode suggestive of multiple sclerosis. *Acta Neurologica Scandinavica*, *106*(2), 109–112. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12100371>
- Gracia, E., Pérez-Capote, K., Moreno, E., Barkešová, J., Mallol, J., Lluís, C., Franco, R., Cortés, A., Casadó, V., & Canela, E. I. (2011). A2A adenosine receptor ligand binding and signalling is allosterically modulated by adenosine deaminase. *The Biochemical Journal*, *435*(3), 701–709. <https://doi.org/10.1042/BJ20101749>
- Hannedouche, S., Zhang, J., Yi, T., Shen, W., Nguyen, D., Pereira, J. P., Guerini, D., Baumgarten, B. U., Roggo, S., Wen, B., Knochenmuss, R., Noël, S., Gessier, F., Kelly,

- L. M., Vanek, M., Laurent, S., Preuss, I., Miault, C., Christen, I., ... Sailer, A. W. (2011). Oxysterols direct immune cell migration via EBI2. *Nature*, *475*(7357), 524–527. <https://doi.org/10.1038/nature10280>
- Heinig, M., Petretto, E., Wallace, C., Bottolo, L., Rotival, M., Lu, H., Li, Y., Sarwar, R., Langley, S. R., Bauerfeind, A., Hummel, O., Lee, Y.-A. A., Paskas, S., Rintisch, C., Saar, K., Cooper, J., Buchan, R., Gray, E. E., Cyster, J. G., ... Niblett, D. (2010). A trans-acting locus regulates an anti-viral expression network and type 1 diabetes risk. *Nature*, *467*(7314), 460–464. <https://doi.org/10.1038/nature09386>
- Hernandez, M., Patzig, J., Mayoral, S. R., Costa, K. D., Chan, J. R., & Casaccia, P. (2016). Mechanostimulation Promotes Nuclear and Epigenetic Changes in Oligodendrocytes. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *36*(3), 806–813. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2873-15.2016>
- Jagielska, A., Lowe, A. L., Makhija, E., Wroblewska, L., Guck, J., Franklin, R. J. M., Shivashankar, G. V., & Van Vliet, K. J. (2017). Mechanical strain promotes oligodendrocyte differentiation by global changes of gene expression. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *11*. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2017.00093/PDF>
- Jairaman, A., Othy, S., Dynes, J. L., Yeromin, A. V., Zavala, A., Greenberg, M. L., Nourse, J. L., Holt, J. R., Cahalan, S. M., Marangoni, F., Parker, I., Pathak, M. M., & Cahalan, M. D. (2021). Piezo1 channels restrain regulatory T cells but are dispensable for effector CD4 + T cell responses. *Science Advances*, *7*(28). <https://doi.org/10.1126/SCIADV.ABG5859>
- Klejbor, I., Shimshek, D. R., Klimaszewska-Łata, J., Velasco-Estevez, M., Moryś, J., Karaszewski, B., Szutowicz, A., & Rutkowska, A. (2021). EBI2 is expressed in glial cells in multiple sclerosis lesions, and its knock-out modulates remyelination in the cuprizone model. *The European Journal of Neuroscience*, *54*(3), 5173–5188. <https://doi.org/10.1111/EJN.15359>
- Kutryb-Zajac, B., Kawecka, A., Caratis, F., Urbanowicz, K., Braczko, A., Furihata, T., Karaszewski, B., Smolenski, R. T., & Rutkowska, A. (2022). The impaired distribution of adenosine deaminase isoenzymes in multiple sclerosis plasma and cerebrospinal fluid. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *15*. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2022.998023/PDF>
- Kutryb-Zajac, B., Mateuszuk, L., Zukowska, P., Jaształ, A., Zabielska, M. A., Toczek, M., Jablonska, P., Zakrzewska, A., Sitek, B., Rogowski, J., Lango, R., Slominska, E. M., Chlopicki, S., & Smolenski, R. T. (2016). Increased activity of vascular adenosine deaminase in atherosclerosis and therapeutic potential of its inhibition. *Cardiovascular Research*, *112*(2), 590–605. <https://doi.org/10.1093/CVR/CVW203>
- Kutryb-Zajac, B., Mierzejewska, P., Sucajtys-Szulc, E., Bulinska, A., Zabielska, M. A., Jablonska, P., Serocki, M., Koszalka, P., Milczarek, R., Jaształ, A., Bartoszewski, R., Chlopicki, S., Slominska, E. M., & Smolenski, R. T. (2019). Inhibition of LPS-stimulated ecto-adenosine deaminase attenuates endothelial cell activation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *128*, 62–76. <https://doi.org/10.1016/J.YJMCC.2019.01.004>
- Leoni, V., & Caccia, C. (2011). Oxysterols as biomarkers in neurodegenerative diseases. In *Chemistry and Physics of Lipids* (Vol. 164, Issue 6, pp. 515–524). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2011.04.002>
- Liu, C., Yang, X. V., Wu, J., Kuei, C., Mani, N. S., Zhang, L., Yu, J., Sutton, S. W., Qin, N., Banie, H., Karlsson, L., Sun, S., & Lovenberg, T. W. (2011). Oxysterols direct B-cell migration through EBI2. *Nature*, *475*(7357), 519–523. <https://doi.org/10.1038/nature10226>
- Liu, H., Bian, W., Yang, D., Yang, M., & Luo, H. (2021). Inhibiting the Piezo1 channel



- protects microglia from acute hyperglycaemia damage through the JNK1 and mTOR signalling pathways. *Life Sciences*, 264. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118667>
- Lu, E., & Cyster, J. G. (2019). G-protein coupled receptors and ligands that organize humoral immune responses. In *Immunological Reviews* (Vol. 289, Issue 1, pp. 158–172). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/imr.12743>
- Meyts, I., & Aksentijevich, I. (2018). Deficiency of Adenosine Deaminase 2 (DADA2): Updates on the Phenotype, Genetics, Pathogenesis, and Treatment. *Journal of Clinical Immunology*, 38(5), 569–578. <https://doi.org/10.1007/S10875-018-0525-8>
- Misselwitz, B., Wyss, A., Raselli, T., Cerovic, V., Sailer, A. W., Krupka, N., Ruiz, F., Pot, C., & Pabst, O. (2020). The oxysterol receptor GPR183 in inflammatory bowel diseases. *British Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1111/bph.15311>
- Moog, C., Luu, B., Beck, J. P., Italiano, L., & Bischoff, P. (1988). Studies on the immunosuppressive properties of 7,25-dihydroxycholesterol — I. Reduction of interleukin production by treated lymphocytes. *International Journal of Immunopharmacology*, 10(5), 511–518. [https://doi.org/10.1016/0192-0561\(88\)90067-7](https://doi.org/10.1016/0192-0561(88)90067-7)
- Papassotiropoulos, A., Lütjohann, D., Bagli, M., Locatelli, S., Jessen, F., Rao, M. L., Maier, W., Björkhem, I., von Bergmann, K., & Heun, R. (2000). Plasma 24S-hydroxycholesterol: a peripheral indicator of neuronal degeneration and potential state marker for Alzheimer's disease. *Neuroreport*, 11(9), 1959–1962. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10884051>
- Perucha, E., Melchiotti, R., Bibby, J. A., Wu, W., Frederiksen, K. S., Roberts, C. A., Hall, Z., LeFric, G., Robertson, K. A., Lavender, P., Gerwien, J. G., Taams, L. S., Griffin, J. L., de Rinaldis, E., van Baarsen, L. G. M., Kemper, C., Ghazal, P., & Cope, A. P. (2019). The cholesterol biosynthesis pathway regulates IL-10 expression in human Th1 cells. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08332-9>
- Polachini, C. R. N., Spanevello, R. M., Casali, E. A., Zanini, D., Pereira, L. B., Martins, C. C., Baldissareli, J., Cardoso, A. M., Duarte, M. F., da Costa, P., Prado, A. L. C., Schetinger, M. R. C., & Morsch, V. M. (2014). Alterations in the cholinesterase and adenosine deaminase activities and inflammation biomarker levels in patients with multiple sclerosis. *Neuroscience*, 266, 266–274. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2014.01.048>
- Preuss, I., Ludwig, M.-G. G., Baumgarten, B., Bassilana, F., Gessier, F., Seuwen, K., & Sailer, A. W. (2014). Transcriptional regulation and functional characterization of the oxysterol/EBI2 system in primary human macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 446(3), 663–668. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.01.069>
- Roh, J., Hwang, S. M., Lee, S. H., Lee, K., Kim, Y. H., & Park, C. K. (2020). Functional Expression of Piezo1 in Dorsal Root Ganglion (DRG) Neurons. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11). <https://doi.org/10.3390/IJMS21113834>
- Rosenberg, S. S., Kelland, E. E., Tokar, E., De La Torre, A. R., & Chan, J. R. (2008). The geometric and spatial constraints of the microenvironment induce oligodendrocyte differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(38), 14662–14667. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0805640105>
- Rosenkilde, M. M., Benned-Jensen, T., Andersen, H., Holst, P. J., Kledal, T. N., Lüttichau, H. R., Larsen, J. K., Christensen, J. P., & Schwartz, T. W. (2006). Molecular pharmacological phenotyping of EBI2: An orphan seven-transmembrane receptor with constitutive activity. *Journal of Biological Chemistry*, 281(19), 13199–13208. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602245200>
- Rosklint, T., Ohlsson, B. G., Wiklund, O., Norén, K., & Hultén, L. M. (2002). Oxysterols induce interleukin-1beta production in human macrophages. *European Journal of Clinical Investigation*, 32(1), 35–42. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2362.2002.00931.X>

- Russell, D. W. (2000). Oxysterol biosynthetic enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1529(1–3), 126–135. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00142-6](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00142-6)
- Rutkowska, A., O’Sullivan, S. A., Christen, I., Zhang, J., Sailer, A. W., & Dev, K. K. (2016). The EBI2 signalling pathway plays a role in cellular crosstalk between astrocytes and macrophages. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep25520>
- Rutkowska, A., Preuss, I., Gessier, F., Sailer, A. W., & Dev, K. K. (2015). EBI2 regulates intracellular signaling and migration in human astrocyte. *GLIA*, 63(2), 341–351. <https://doi.org/10.1002/glia.22757>
- Rutkowska, Aleksandra, O’Sullivan, S. A. S. A. S. A., Christen, I., Zhang, J., Sailer, A. W. A. W. A. W., Dev, K. K. K. K. K., O’Sullivan, S. A., Christen, I., Zhang, J., Sailer, A. W. A. W. A. W., Dev, K. K. K. K. K., O’Sullivan, S. A. S. A. S. A., Christen, I., Zhang, J., Sailer, A. W. A. W. A. W., & Dev, K. K. K. K. K. (2016). The EBI2 signalling pathway plays a role in cellular crosstalk between astrocytes and macrophages. *Scientific Reports*, 6(1), 25520. <https://doi.org/10.1038/srep25520>
- Rutkowska, Aleksandra, Preuss, I., Gessier, F., Sailer, A. W. A. W., & Dev, K. K. K. K. (2015). EBI2 regulates intracellular signaling and migration in human astrocyte. *GLIA*, 63(2), 341–351. <https://doi.org/10.1002/glia.22757>
- Rutkowska, Aleksandra, Sailer, A. W., & Dev, K. K. (2017). EBI2 receptor regulates myelin development and inhibits LPC-induced demyelination. *Journal of Neuroinflammation*, 14(1), 250. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-1025-0>
- Rutkowska, Aleksandra, Shimshek, D. R., Sailer, A. W., & Dev, K. K. (2018). EBI2 regulates pro-inflammatory signalling and cytokine release in astrocytes. *Neuropharmacology*, 133(1), 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.01.029>
- Samuraki, M., Sakai, K., Odake, Y., Yoshita, M., Misaki, K., Nakada, M., & Yamada, M. (2017). Multiple sclerosis showing elevation of adenosine deaminase levels in the cerebrospinal fluid. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 13, 44–46. <https://doi.org/10.1016/J.MSARD.2017.02.005>
- Schregel, K., Wuerfel, E., Garteiser, P., Gemeinhardt, I., Prozorovski, T., Aktas, O., Merz, H., Petersen, D., Wuerfel, J., & Sinkus, R. (2012). Demyelination reduces brain parenchymal stiffness quantified in vivo by magnetic resonance elastography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(17), 6650–6655. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200151109>
- Schroepfer, G. J., & Wilson, W. K. (2000). Oxysterols: Modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiological Reviews*, 80(1), 361–554. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.2000.80.1.361>
- Segel, M., Neumann, B., Hill, M. F. E., Weber, I. P., Viscomi, C., Zhao, C., Young, A., Agle, C. C., Thompson, A. J., Gonzalez, G. A., Sharma, A., Holmqvist, S., Rowitch, D. H., Franze, K., Franklin, R. J. M., & Chalut, K. J. (2019). Niche stiffness underlies the aging of central nervous system progenitor cells. *Nature*, 573(7772), 130. <https://doi.org/10.1038/S41586-019-1484-9>
- Sozeri, B., Ercan, G., Dogan, O. A., Yildiz, J., Demir, F., & Doğanay, L. (2021). The same mutation in a family with adenosine deaminase 2 deficiency. *Rheumatology International*, 41(1), 227–233. <https://doi.org/10.1007/S00296-019-04444-Z>
- Spencer, J. I., Bell, J. S., & DeLuca, G. C. (2018). Vascular pathology in multiple sclerosis: reframing pathogenesis around the blood-brain barrier. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 89(1), 42–52. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2017-316011>
- Urbanski, M. M., Brendel, M. B., & Melendez-Vasquez, C. V. (2019). Acute and chronic demyelinated CNS lesions exhibit opposite elastic properties. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-018-37745-7>
- Urbanski, M. M., Kingsbury, L., Moussouros, D., Kassim, I., Mehjabeen, S., Paknejad, N., &

- Melendez-Vasquez, C. V. (2016). Myelinating glia differentiation is regulated by extracellular matrix elasticity. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/SREP33751>
- Velasco-Estevez, María, Gadalla, K. K. E., Liñan-Barba, N., Cobb, S., Dev, K. K., & Sheridan, G. K. (2020). Inhibition of Piezo1 attenuates demyelination in the central nervous system. *Glia*, 68(2), 356–375. <https://doi.org/10.1002/GLIA.23722>
- Velasco-Estevez, Maria, Koch, N., Klejbor, I., Caratis, F., & Rutkowska, A. (2022). Mechanoreceptor Piezo1 Is Downregulated in Multiple Sclerosis Brain and Is Involved in the Maturation and Migration of Oligodendrocytes in vitro. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 16. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2022.914985>
- Velasco-Estevez, Maria, Koch, N., Klejbor, I., Laurent, S., Dev, K. K., Szutowicz, A., Sailer, A. W., & Rutkowska, A. (2021). Ebi2 is temporarily upregulated in mo3.13 oligodendrocytes during maturation and regulates remyelination in the organotypic cerebellar slice model. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9). <https://doi.org/10.3390/ijms22094342>
- Velasco-Estevez, María, Mampay, M., Boutin, H., Chaney, A., Warn, P., Sharp, A., Burgess, E., Moendarbary, E., Dev, K. K., & Sheridan, G. K. (2018a). Infection augments expression of mechanosensing Piezo1 channels in amyloid plaque-reactive astrocytes. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10(OCT). <https://doi.org/10.3389/FNAGI.2018.00332/PDF>
- Velasco-Estevez, María, Mampay, M., Boutin, H., Chaney, A., Warn, P., Sharp, A., Burgess, E., Moendarbary, E., Dev, K. K., & Sheridan, G. K. (2018b). Infection augments expression of mechanosensing Piezo1 channels in amyloid plaque-reactive astrocytes. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10(OCT). <https://doi.org/10.3389/FNAGI.2018.00332/PDF>
- Velasco-Estevez, María, Rolle, S. O., Mampay, M., Dev, K. K., & Sheridan, G. K. (2020). Piezo1 regulates calcium oscillations and cytokine release from astrocytes. *Glia*, 68(1), 145–160. <https://doi.org/10.1002/GLIA.23709>
- Walton, C., King, R., Rechtman, L., Kaye, W., Leray, E., Marrie, R. A., Robertson, N., La Rocca, N., Uitdehaag, B., van der Mei, I., Wallin, M., Helme, A., Angood Napier, C., Rijke, N., & Baneke, P. (2020). Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 26(14), 1816. <https://doi.org/10.1177/1352458520970841>
- Wang, Y. Y., Zhang, H., Ma, T., Lu, Y., Xie, H. Y., Wang, W., Ma, Y. H., Li, G. H., & Li, Y. W. (2019). Piezo1 mediates neuron oxygen-glucose deprivation/reoxygenation injury via Ca<sup>2+</sup>/calpain signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 513(1), 147–153. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2019.03.163>
- Wanke, F., Moos, S., Croxford, A. L., Heinen, A. P., Gräf, S., Kalt, B., Tischner, D., Zhang, J., Christen, I., Bruttger, J., Yogeve, N., Tang, Y., Zayoud, M., Israel, N., Karram, K., Reißig, S., Lacher, S. M., Reichhold, C., Mufazalov, I. A., ... Kurschus, F. C. (2017). EB12 Is Highly Expressed in Multiple Sclerosis Lesions and Promotes Early CNS Migration of Encephalitogenic CD4 T Cells. *Cell Reports*, 18(5), 1270–1284. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.020>
- Weinstock-Guttman, B., Zivadinov, R., Mahfooz, N., Carl, E., Drake, A., Schneider, J., Teter, B., Hussein, S., Mehta, B., Weiskopf, M., Durfee, J., Bergsland, N., & Ramanathan, M. (2011). Serum lipid profiles are associated with disability and MRI outcomes in multiple sclerosis. *Journal of Neuroinflammation*, 8, 127. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-127>
- Wuerfel, J., Paul, F., Beierbach, B., Hamhaber, U., Klatt, D., Papazoglou, S., Zipp, F., Martus, P., Braun, J., & Sack, I. (2010). MR-elastography reveals degradation of tissue integrity in multiple sclerosis. *NeuroImage*, 49(3), 2520–2525.

<https://doi.org/10.1016/J.NEUROIMAGE.2009.06.018>

- Wyss, A., Raselli, T., Perkins, N., Ruiz, F., Schmelzer, G., Klinke, G., Moncsek, A., Roth, R., Spalinger, M. R., Hering, L., Atrott, K., Lang, S., Frey-Wagner, I., Mertens, J. C., Scharl, M., Sailer, A. W., Pabst, O., Hersberger, M., Pot, C., ... Misselwitz, B. (2019). The EB12-oxysterol axis promotes the development of intestinal lymphoid structures and colitis. *Mucosal Immunology*, *12*(3), 733–745. <https://doi.org/10.1038/s41385-019-0140-x>
- Ye, S., Pang, H., Gu, Y.-Y., Hua, J., Chen, X.-G., Bao, C.-D., Wang, Y., Zhang, W., Qian, J., Tsao, B. P., Hahn, B. H., Chen, S.-L., Rao, Z.-H., & Shen, N. (2003). Protein interaction for an interferon-inducible systemic lupus associated gene, IFIT1. *Rheumatology (Oxford, England)*, *42*(10), 1155–1163. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keg315>
- Zavialov, A. V., Gracia, E., Glaichenhaus, N., Franco, R., Zavialov, A. V., & Lauvau, G. (2010). Human adenosine deaminase 2 induces differentiation of monocytes into macrophages and stimulates proliferation of T helper cells and macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, *88*(2), 279–290. <https://doi.org/10.1189/JLB.1109764>
- Zimmermann, H. (2008). Ectonucleotidases in the Nervous System. *Purinergic Signalling in Neuron-Glia Interactions*, 113–130. <https://doi.org/10.1002/9780470032244.CH10>