



Fundació
La Marató de TV3

20^è SIMPOSIUM
Enfermedades neurodegenerativas



SEÑALIZACIÓN POR PRONGF/P75NTR EN LA NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL ADULTA: DIANA POTENCIAL PARA LA GENERACIÓN DE NUEVAS NEURONAS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Carne Espinet Mestre

IRBLL Institut Recerca Biomèdica de Lleida

1. Resumen

Durante los últimos años se ha descrito la existencia de neurogénesis en el cerebro adulto en diferentes especies, incluido el ser humano. Curiosamente, el trabajo con roedores ha demostrado que la neurogénesis adulta del giro dentado (DG) del hipocampo es importante para algunos aspectos cognitivos. El aumento de la neurogénesis mejora la memoria, mientras que su interrupción provoca efectos opuestos. La neurogénesis adulta disminuye con la edad y se ha sugerido que desempeña un papel en el deterioro cognitivo, el aprendizaje progresivo y la pérdida de memoria en la enfermedad de Alzheimer (EA). Las estrategias destinadas a incrementar la neurogénesis adulta pueden tener efectos beneficiosos para el tratamiento de la EA y pueden contrarrestar los efectos nocivos de factores tóxicos en la enfermedad. Uno de ellos, la proneurotrofina proNGF, presenta un aumento notable durante la EA en el hipocampo y el córtex entorrinal. A diferencia del NGF maduro, el proNGF posee funciones negativas para la supervivencia, proliferación y diferenciación. Nuestra hipótesis es que el proNGF y su receptor p75NTR desempeñan un papel importante en la interrupción de la neurogénesis adulta durante el desarrollo de la EA y que, por tanto, pueden ser un objetivo terapéutico prometedor. No obstante, ni los procesos regulados por proNGF/p75NTR durante la neurogénesis adulta ni los mecanismos celulares y moleculares implicados están totalmente dilucidados. En el presente proyecto, usamos modelos animales de EA, muestras humanas de EA y cultivos primarios de células neurogénicas adultas (NSC) para abordar el papel exacto de p75NTR en diferentes aspectos de la neurogénesis adulta, incluidas la supervivencia, la proliferación y la diferenciación.

2. Resultados

1. La expresión de proBDNF y la proporción de sortilina/p75NTR aumentan en el hipocampo de pacientes con EA

El hipocampo es una de las regiones cerebrales más afectadas en la EA. Son en particular vulnerables un grupo de neuronas ubicadas en el hilio, también conocidas como *mossy cells*. Hemos obtenido muestras cerebrales que contienen esta región de pacientes con EA e individuos controles, del Banco de Tejidos Neurológicos de Bellvitge, UB. Usando anticuerpos dirigidos contra el dominio extracelular de p75

(p75ECD), sortilina (el correceptor de p75) y contra el predominio del proBDNF, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para determinar los niveles y localización de estas proteínas. Observamos que la intensidad de la fluorescencia de p75NTR en células hiliares de cerebros con EA no era significativamente diferente de los cerebros controles. Sin embargo, la abundancia de sortilina, y el porcentaje de células doble positivas para sortilina y p75NTR aumentaron significativamente en el cerebro con EA. También observamos una abundante expresión de proBDNF en el citoplasma de las neuronas hiliares del hipocampo humano.

2. Las modificaciones postraduccionales de proBDNF en el hipocampo y en CSF están incrementadas en la EA

El aumento del estrés oxidativo en el cerebro con el envejecimiento puede ser un factor clave desencadenante de EA. Son diferentes los mecanismos moleculares involucrados e incluyen modificaciones postraduccionales de proteínas específicas. Por ejemplo, GO y MGO, dos dicarbonilos altamente reactivos que aumentan durante el envejecimiento, reaccionan con grupos amino libres, de residuos Lys, Arg y Cys, que conducen a la formación los aductos AGE/ALE CML, CEL y entrecruzamientos intermoleculares. Como ya hemos propuesto anteriormente (Kichev *et al.*, Am. J. Pathol, 2009), estas modificaciones afectan al proNGF durante la EA, dando mayor estabilidad a la proforma de NGF (ya que no puede convertirse en NGF maduro) y, como consecuencia, un aumento de la muerte celular. Para determinar si proBDNF también podría modificarse por dicarbonilos reactivos en la EA, se abordaron diferentes enfoques. En primer lugar, se estudió la co-localización de proBDNF y CEL mediante inmunohistoquímica en la región hiliar de muestras de hipocampo humanas de controles y de cerebros afectados por EA. Observamos un aumento notable de la inmunorreactividad CEL en los cerebros afectados en comparación con los controles. Curiosamente, casi todas las células hipocampales de pacientes con EA eran CEL positivas, y expresaban proBDNF, mientras que en el cerebro de los individuos controles, pocas neuronas mostraban una doble inmunorreactividad. Estos resultados sugirieron con robustez que proBDNF podría ser modificado por dicarbonilos reactivos. Para abordar esta cuestión de forma directa, se realizó un ensayo más específico. Se inmunoprecipitó proBDNF del CSF de controles y pacientes con EA y se analizaron los precipitados por *Western blot* con un anticuerpo contra CEL. Se observó que el proBDNF en el CSF de los pacientes con EA se encontraba fuertemente modificado con CEL, alrededor de 6 veces más de promedio, en comparación con los controles. En

conjunto, estos resultados indican que el proBDNF en pacientes con EA presenta modificaciones postraduccionales AGE a consecuencia de un aumento del estrés oxidativo durante la enfermedad, pudiendo así impedir la acción de convertasas para producir BDNF maduro.

3. El proBDNF modificado por MGO *in vitro* induce apoptosis y disminuye la diferenciación neuronal

Para comprobar los efectos de las modificaciones AGE de proBDNF inducidas por condiciones de estrés oxidativo sobre la supervivencia y diferenciación de las neuronas, se trató proBDNF recombinante *in vitro* con especies reactivas de oxígeno que reaccionan con residuos de Arg y Cys, provocando así la formación de modificaciones y entrecruzamientos en la proteína. Se obtuvieron cultivos primarios de NSC hipocampales adultas y se estudió el efecto del tratamiento con proBDNF modificado (MproBDNF), BDNF maduro, proBDNF no modificado y BSA modificada siguiendo el mismo protocolo que con proBDNF (MBSA), como control. Al primer día *in vitro* (DIV), las neuronas empezaron a diferenciarse, pero fue entre 4 y 7 DIV cuando el grado de maduración era significativo. En períodos de cultivo más largos, las neuronas presentaban un grado complejo de neuritogénesis y diferenciación, principalmente en los pozos tratados con mBDNF, resultando difícil su cuantificación. Las neuronas diferenciadas expresaban doblecortina (DCX), β III tubulina, SV2, p75NTR, sortilina, TrkB y calretinina. Además, estas neuronas fueron negativas para parvalbúmina y calbindina, indicando que se trataba de nuevas neuronas granulares diferenciadas. En los cultivos tratados con BDNF maduro, las neuronas aumentaron significativamente su diferenciación en comparación con los cultivos no estimulados. Curiosamente, la estimulación del control con proBDNF, sin modificaciones AGE, no aumentó la mortalidad celular por encima de los niveles basales; en cambio, produjo efectos similares al BDNF maduro, en la diferenciación neuronal. En cambio, la estimulación con MproBDNF produjo un aumento significativo de la apoptosis y diferenciación. Estos efectos fueron específicos del MproBDNF, ya que no se observaron después de la estimulación con MBSA. Estos resultados sugieren que el proBDNF no modificado es procesado rápidamente, dando lugar a la forma madura, mientras que el MproBDNF, que es más resistente a la acción de las convertasas, es más estable y desencadena la apoptosis y el déficit de diferenciación.

4. El CSF de los pacientes con EA induce apoptosis neuronal a través de proBDNF/p75NTR

Según nuestros resultados, los pacientes con EA presentan un aumento de la relación proBDNF/BDNF. Por otro lado, hemos observado que proBDNF de los pacientes con EA presentan modificaciones postraduccionales, como AGE, consecuencia del aumento del estrés oxidativo durante la neurodegeneración. Finalmente, nuestros experimentos *in vitro* sugieren que tales modificaciones producen una forma más estable de proBDNF, que puede explicar: 1) el aumento de los niveles de proBDNF en cerebros y CSF en la EA, y 2) la implicación de proBDNF en la muerte neuronal asociada a la enfermedad. Para evaluar con mayor profundidad esta hipótesis, ensayamos directamente los efectos del proBDNF contenido en el CSF de los pacientes con EA sobre cultivos de NSC diferenciados, tal como se ha indicado anteriormente. Se estimularon cultivos de 6 DIV con CSF de controles (CSAF) y de pacientes con EA (EACSF). Se usaron anticuerpos contra el dominio intracelular de p75 (p75ICD) y DAPI, para evaluar la localización subcelular de la proteína por microscopía confocal y la muerte apoptótica, respectivamente. Las neuronas tratadas con CSF control sobrevivieron y se diferenciaron normalmente, mostrando un índice de muerte celular apoptótica alrededor del 10%. Una gran proporción de estas neuronas mostraba una distribución periférica de p75ICD en el soma consistente con la presencia del receptor intacto. En cambio, los cultivos tratados con EACSF mostraron una morfología y diferenciación alterada y un aumento dramático del número de núcleos apoptóticos (hasta el 60%). Además, en el tratamiento con EACSF, se produjo un aumento significativo en el porcentaje de neuronas con translocación nuclear del fragmento de 20 kDa ICDp75. El CSF de los pacientes con EA, como ya es sabido, contiene otros factores, como A β , que podrían ser responsables de estos efectos neurotóxicos. Para determinar el grado de participación del proBDNF presente en el CSF de EA, se inmunoprecipitó el proBDNF con anticuerpos antiproBDNF-sefarosa AG. La eliminación de proBDNF fue demostrada por *Western blot* con anticuerpos contra proBDNF. A continuación, se compararon los efectos del CSF inmunoprecipitado (CSFIP) y el CSF intacto de pacientes con EA y controles, en los cultivos mencionados. La eliminación del proBDNF produjo una notable reducción del porcentaje de apoptosis, así como del porcentaje de neuronas con inmunorreactividad nuclear para p75ICD. Estos resultados indican que el proBDNF en el CSF de los pacientes con EA es biológicamente activo y el principal responsable de los efectos proapoptóticos desencadenados por el EACSF. Además, estos resultados

sugieren de forma consistente que los efectos de proBDNF del EACSF están mediados por la activación de la señalización p75.

5. En el modelo murino APP / PS1, están aumentados el procesamiento de p75 y la inducción de la apoptosis

En la EA familiar, las mutaciones más frecuentes se encuentran en el complejo de la gamma secretasa. Algunas de estas mutaciones afectan a la presenilina 1 (PS1), incluidas la supresión del exón 9 ($\Delta 9$) o M146V. Se ha descrito que estas son mutaciones de ganancia de función que conducen a un aumento de la actividad proteasa. El estudio de los mecanismos patológicos subyacentes a estas mutaciones y el desarrollo de la EA se ha centrado en varios sustratos de PS1, principalmente A β . Dado que p75NTR también es un sustrato de la actividad de PS1, se planteó la hipótesis de que las consecuencias nocivas del proBDNF sobre la supervivencia neuronal y la diferenciación en la EA, podrían ser potenciadas por los efectos de las mutaciones en PS1 sobre la señalización p75NTR. En particular, nos interesamos por saber si estos cambios podían incrementar los efectos de las proneurotrofinas. Para poner a prueba esta hipótesis, determinamos cultivos neuronales primarios de NSC a partir de ratones APP/PS1 y de sus controles. El modelo animal APP/PS1 presenta la mayoría de trastornos característicos de EA, entre otros: formación de placa amiloide y envejecimiento. Después de 6 DIV, en el tratamiento con MBSA (control), estas neuronas APP/PS1 presentaban un mayor porcentaje de núcleos apoptóticos y de neuronas con inmunorreactividad nuclear para p75NTR. La estimulación con MproBDNF indujo un mayor aumento de muerte celular y la inmunorreactividad nuclear de p75NTR en estas neuronas transgénicas en comparación con los controles. Por lo tanto, se concluye que las mutaciones PS1 implicadas en la EA familiar potencian los efectos del proBDNF sobre la muerte celular, probablemente aumentando la señalización p75NTR y, en particular, la translocación nuclear de su dominio intracelular. Nuestros resultados suponen una importante contribución al estudio de la señalización de p75NTR en la patogenia de la EA. Nuestros datos proporcionan un nuevo mecanismo proapoptótico en la EA que implica que, debido al procesamiento de p75NTR por PS1 mutada, las nuevas neuronas del giro dentado sean más sensibles a los efectos adversos de proBDNF modificado por AGE.

3. Relevancia y posibles implicaciones futuras

Debido al aumento del envejecimiento de la población en nuestra área, la EA es un grave problema para la sociedad. Desafortunadamente, no existe tratamiento específico alguno para la enfermedad reconocido con éxito. En este sentido, los resultados del proyecto indican que las proneurotrofinas pueden ser clínicamente relevantes en: a) como inductores de la apoptosis hipocampal en la EA; b) como inhibidores de la neurogénesis adulta y, por tanto, bloqueadores de memoria episódica, principalmente del establecimiento de los patrones de recuerdos; c) el efecto de las modificaciones acumuladas derivadas de estrés oxidativo que afectan a las proneurotrofinas e impiden su procesamiento, agravando su función proapoptótica; d) el diagnóstico precoz de la enfermedad, ya que hemos detectado un aumento específico y significativo de las proneurotrofinas modificadas en muestras de pacientes afectados por la EA.

Los resultados alcanzados en este trabajo pueden contribuir al diseño de métodos terapéuticos y preventivos para el tratamiento de la enfermedad.

4. Bibliografía científica generada

Fleitas C, Piñol-Ripoll G, Marfull P, Rocandio D, Ferrer I, Rampon C, Egea J, Espinet C. *proBDNF is modified by advanced glycation end products in Alzheimer's disease and causes neuronal apoptosis by inducing p75 neurotrophin receptor processing*. Mol Brain. 2018 Nov 14;11(1):68.

Fleitas C, Ferrer I, Rampon C, Egea J, Espinet C. *The lack of p75NTR in vivo ameliorates adult neurogenesis, learning and memory in PS1/APP mice model of Alzheimer's disease*. En preparación.

Principales comunicaciones en congresos:

Espinet C, Piñol G, Rampon C, Fleitas C, Peris M, Curià R, Ferran P y Egea J. *ProNGF/p75NTR signalling in hippocampal adult neurogenesis: potential target for generating new neurons in Alzheimer's disease*. AD/PD 2015. Nice, 2015.

-Fleitas C, Rampon C, Curià R, Bernaus E, Egea J y Espinet C.

ProNGF/p75/sortilin signaling: potential targets to recover neurogenesis in Alzheimer's disease.

FENS 2016 Copenague.

-Fleitas C, Rampon C, Aso E, Egea J y Espinet C.

ProNGF/p75/sortilin signaling: potential targets to recover neurogenesis in Alzheimer's disease.

Paris ISN 2017.

-C. Fleitas, G. Piñol-Ripoll, P. Marfull, D. Rocandio, I. Ferrer, C. Claire, J. Egea y C. Espinet.

proBDNF is modified by Radical Oxygen Species in Alzheimer's Disease and causes neuronal apoptosis by inducing p75 neurotrophin receptor processing.

Salamanca 2018.NGF Meetings.