



**Fundació**  
La Marató de TV3

20<sup>è</sup> SIMPOSIUM  
Enfermedades neurodegenerativas



# IMPACTO TERAPÉUTICO DE LIPOSOMAS ACOPLADOS A APOJ/CLUSTERIN EN MODELOS EXPERIMENTALES DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

**Mar Hernández-Guillamon**

Institut de Recerca Vall d'Hebron (VHIR), Barcelona

## 1. Resumen

**Antecedentes.** En la actualidad no existen tratamientos efectivos para curar la enfermedad de Alzheimer (EA) o prevenir su progresión. Recientes evidencias genéticas y bioquímicas han puesto de manifiesto el papel de apolipoproteína J/clusterin (ApoJ/Clu) como molécula protectora en la EA, aunque todavía no se ha dilucidado su contribución molecular a la patología.

**Objetivo.** Esta propuesta tiene como objetivo estudiar una nueva estrategia terapéutica para reducir o prevenir la acumulación de la  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) en la EA basada en el tratamiento crónico con partículas lipídicas acopladas a proteína ApoJ recombinante humana (rApoJ).

**Metodología.** Se pretende diseñar, sintetizar y caracterizar nanopartículas lipídicas acopladas a proteína rApoJ, requeridas para los objetivos siguientes. Se propone probar el efecto del tratamiento crónico de nanopartículas lipídicas acopladas a rApoJ administradas por vía intravenosa en un modelo experimental de EA (ratones transgénicos APP23). Después de un tratamiento crónico, evaluaremos los efectos sobre características neuropatológicas importantes asociadas a la enfermedad, como la carga  $A\beta$  y la inflamación cerebral. Además, investigaremos los mecanismos moleculares relacionados con el tratamiento de nanopartículas lipídicas acopladas a rApoJ en diferentes modelos *in vitro* basados en células de cerebro en cultivo.

**Resultados esperados.** Dada la capacidad de ApoJ/Clu para unirse y bloquear la agregación de  $A\beta$ , además de que potencialmente puede llegar al cerebro a través de la barrera hematoencefálica (BHE), creemos que las nuevas partículas lipídicas acopladas a rApoJ pueden utilizarse como cebo periférico de  $A\beta$ , alcanzando una mejora en su drenaje cerebral. Consideramos que esta es una nueva estrategia terapéutica para reducir la inflamación cerebral asociada a los depósitos de  $A\beta$  con consecuencias prometedoras para retrasar la progresión de la neurodegeneración en la EA.

## 2. Resultados

**1) Producción de ApoJ recombinante humana (rApoJ).** Debido a que nuestro objetivo principal era generar nanopartículas lipídicas formadas con ApoJ, produjimos proteína recombinante ApoJ a partir de cultivos de células humanas. La rApoJ sintetizada resultó altamente pura y conservaba la naturaleza heterodimérica y la propensión a formar agregados de alto peso molecular. Primero estudiamos si la rApoJ era capaz de modular la eliminación cerebral de A $\beta$  a través de la BHE. Se utilizó un modelo basado en células endoteliales cerebrales primarias, cultivadas en Transwells incubados con Matrigel, y tratadas con péptido A $\beta$ 40 fluorescente para realizar un seguimiento de su tráfico a través de la BHE. Observamos que el transporte de A $\beta$ 40 desde el compartimento basolateral (correspondiente al cerebro) al compartimento apical (correspondiente a la sangre) se incrementaba cuando se formaba el complejo A $\beta$ -rApoJ. También demostramos que rApoJ era capaz de cruzar moderadamente la BHE (desde la sangre al cerebro) a través de un mecanismo en el que estaba involucrada la familia de proteínas relacionadas con el receptor de LDL (*lipoprotein receptor-related protein*, LRP). Estos resultados y el protocolo completo para la producción de rApoJ se describen en la publicación Merino-Zamorano *et al.*, *Journal of Alzheimer's Disease* 2016.

**2) Producción y caracterización de nanopartículas lipídicas acopladas a rApoJ.** Se sintetizaron y caracterizaron nanopartículas lipídicas formadas con rApoJ, las cuales adoptaban estructuras homólogas a HDL (*high density lipoproteins*) reconstituidas (rHDL-rApoJ). Estas nanopartículas se prepararon utilizando el método de diálisis de colato, basado en la disrupción del liposoma, seguido de la incubación con rApoJ y la posterior eliminación de colato por diálisis. Tras el proceso de síntesis, las nanopartículas rHDL-rApoJ fueron purificadas por ultracentrifugación en gradiente de densidad KBr. Las nanopartículas rHDL-rApoJ purificadas fueron caracterizadas por N-PAGE, dicroísmo circular y microscopía de transmisión electrónica (TEM). La preparación de partículas rHDL-rApoJ mostraba poblaciones de partículas con forma discoidal de dos tamaños diferentes. Funcionalmente, las partículas rHDL-rApoJ mantenían la capacidad de prevenir la fibrilación de A $\beta$  e inducían un mayor incremento en el transporte reverso de colesterol en macrófagos en cultivos respecto a la correspondiente proteína rApoJ libre. Por otra parte, nanopartículas rHDL-rApoJ

fluorescentes fueron administradas por vía intravenosa en ratones para determinar su distribución a lo largo del tiempo mediante el sistema IVIS Xenogen®. Se confirmó que las rHDL-rApoJ se acumulaban en la región craneal, en especial en ratones transgénicos de edad avanzada que presentaban una alta carga de A $\beta$  cerebral. Estos resultados se recogieron en la publicación Fernandez-de Retana *et al.*, Scientific Reports 2017.

### **3) Estudio de eficacia del tratamiento con nanopartículas lipídicas acopladas a rApoJ, en comparación con proteína rApoJ libre, en ratones transgénicos APP23.**

Nuestro principal objetivo era estudiar el efecto de un aumento periférico de ApoJ en un modelo experimental de  $\beta$ -amiloidosis cerebral. Con este propósito, ratones transgénicos APP23 de catorce meses de edad fueron sometidos a un tratamiento crónico intravenoso con nanodiscos rHDL-rApoJ o rApoJ libre durante un mes. La concentración y distribución de A $\beta$  en cerebro, así como los niveles de A $\beta$  en plasma y líquido cefalorraquídeo (LCR), se determinaron tras los tratamientos. También se evaluaron otras características patológicas asociadas a la EA, como la pérdida neuronal y la neuroinflamación. Después de los tratamientos, determinamos que ambas terapias, basadas en el incremento de ApoJ periférica, evitaban la acumulación de A $\beta$  en arterias cerebrales, inducían una disminución de los niveles totales de A $\beta$ 42 insolubles en cerebro y una reducción de la pérdida neuronal en hipocampo. El tratamiento periférico con rApoJ también inducía un aumento de los niveles de A $\beta$ 40 en LCR, sin modificar los niveles en plasma. En todos los parámetros estudiados, la lipidación de rApoJ no mejoraba las propiedades protectoras de la proteína libre. Los efectos obtenidos después del tratamiento crónico con rApoJ libre fueron acompañados de un aumento de la expresión de marcadores fagocíticos en células de microglía alrededor de los depósitos A $\beta$  en parénquima. Finalmente, a pesar de la activación de este fenotipo fagocítico, los tratamientos no indujeron un estado neuroinflamatorio global. De hecho, los tratamientos basados en rApoJ fueron capaces de reducir los niveles de IL17 (*interleukin-17*) y KC (*keratinocyte chemoattractant chemokine*) en cerebro. Estos resultados se han compilado en un manuscrito sometido a revisión editorial en Alzheimer's Research & Therapy Journal (actualmente en proceso de revisión).

**4) Efecto de ApoA-I-Milano (ApoA-IM) en ratones APP23.** Paralelamente a las actividades directamente relacionadas con la propuesta original del proyecto, durante este período también hemos profundizado en el estudio de otra estrategia para reducir la acumulación cerebral de A $\beta$ , la cual se basa en la modificación de otras apolipoproteínas específicas con actividad chaperona. En este sentido, la apolipoproteína A-I (ApoA-I), el principal componente de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), tiene un importante papel en el metabolismo del colesterol y muestra propiedades protectoras contra la enfermedad cardiovascular. Además, se ha descrito que la ApoA-I se une a A $\beta$  y evita su agregación y toxicidad *in vitro*. En nuestro estudio, seleccionamos la estrategia de modificar genéticamente ApoA-I introduciendo una mutación natural (R173C), conocida como ApoA-I-Milano (ApoA-I-M), para testar su efecto en un modelo preclínico de EA. Previamente, se había demostrado que ApoA-I-M era más eficaz funcionalmente que la correspondiente variante salvaje en diferentes modelos experimentales de daño vascular (Ibanez *et al.*, 2012; Elshourbagy *et al.*, 2014). En este sentido, quisimos determinar el posible efecto de la administración intravenosa crónica de rApoA-I-M en un modelo experimental de MA con afectación cerebrovascular, como es el modelo de ratones transgénicos APP23. Después de los tratamientos, concluimos que los ratones que habían recibido la proteína rApo-I-M presentaban niveles inferiores de A $\beta$  en vasos cerebrales y parénquima, los cuales iban acompañados de una disminución significativa de la neuroinflamación. Estos resultados fueron compilados en la publicación Fernandez-de Retana *et al.*, Neurobiología of Aging 2017.

### 3. Relevancia e implicaciones futuras

A pesar del alto impacto socioeconómico de la EA, en la actualidad no existe ninguna terapia efectiva modificadora de la enfermedad. Por lo tanto, encontrar tratamientos para evitar o reducir la progresión de esta patología es un objetivo primordial de la comunidad científica. La implicación determinante del genotipo APOE en la EA pone de relieve cómo la regulación del metabolismo lipídico es crucial para la acumulación y el aclaramiento cerebral de A $\beta$ . En este sentido, ApoA-I y ApoJ/Clusterin, más allá de su papel principal en el metabolismo del colesterol periférico como componentes principales de lipoproteínas (especialmente HDL), también actúan como chaperonas

naturales y pueden encontrarse unidas a A $\beta$  en cerebro y plasma. En este contexto, nuestra hipótesis fue que la modulación del perfil lipídico a través del tratamiento periférico con ciertas variantes de apolipoproteínas específicas podía revertir o detener algunos de los parámetros asociados al depósito cerebral de A $\beta$ . Así pues, tras los correspondientes estudios preclínicos, nuestros resultados han permitido demostrar que la administración intravenosa de ApoJ recombinante humana y de una variante genética de ApoA-I son tratamientos seguros y eficaces, en términos de reducción de niveles cerebrales de A $\beta$  insoluble y neuroinflamación, en un modelo experimental de MA. Por tanto, el presente estudio sugiere que las apolipoproteínas fisiológicas multifuncionales pueden considerarse moléculas terapéuticas en neuropatologías asociadas al depósito anómalo de A $\beta$ , proponiendo la aplicabilidad de esta familia de apolipoproteínas (con función chaperona) como candidatas para proteger el cerebro en la EA. Además, nuestros datos refuerzan la idea de que las intervenciones periféricas ofrecen oportunidades no invasivas para regular la carga A $\beta$  intracerebral y la pérdida neuronal. Finalmente, los resultados generados del presente proyecto destacan el papel del metabolismo lipídico en la progresión de la enfermedad y alientan a la realización de nuevos estudios sobre la funcionalidad de las lipoproteínas en pacientes con AD.

#### 4. Bibliografía científica generada

##### Publicaciones

- 1) Merino-Zamorano C, Fernández-de Retana S, Montañola A, Batlle A, Saint-Pol J, Mysiorek C, Gosselet F, Montaner J, Hernández-Guillamon M.  
*Modulation of Amyloid- $\beta$ 1-40 Transport by ApoA1 and ApoJ Across an in vitro Model of the Blood-Brain Barrier.*  
J Alzheimers Dis. 2016 May 25;53(2):677-91. doi: 10.3233/JAD-150976.
- 2) Fernández-de Retana S, Montañola A, Marazuela P, De La Cuesta M, Batlle A, Fatar M, Grudzenski S, Montaner J, Hernández-Guillamon M.  
*Intravenous treatment with human recombinant ApoA-I Milano reduces beta amyloid cerebral deposition in the APP23-transgenic mouse model of Alzheimer's disease.*  
Neurobiol Aging. 2017 Dec;60:116-128. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2017.08.028.

3) Fernández-de-Retana S, Cano-Sarabia M, Marazuela P, Sánchez-Quesada JL, Garcia-Leon A, Montañola A, Montaner J, Maspoch D, Hernández-Guillamon M. *Characterization of ApoJ-reconstituted high-density lipoprotein (rHDL) nanodisc for the potential treatment of cerebral  $\beta$ -amyloidosis.*

Sci Rep. 2017 Nov 7;7(1):14637. doi: 10.1038/s41598-017-15215-w.

4) Fernández de Retana S, Marazuela P, Solé M, Colell G, Bonaterra A, Sánchez-Quesada JL, Montaner J, Maspoch D, Cano-Sarabia M, Hernández-Guillamon M. *Peripheral administration of human recombinant ApoJ/Clusterin modulates brain beta-amyloid levels in APP23 mice.*

Alzheimer's Research and Therapy. Diciembre 2018. (sometido a revisión)

5) Tesis doctoral: Sofia Fernández de Retana, UAB, Barcelona, 11 de juny de 2018. Título: *Estudi de variants estructurals d'ApoA-I i ApoJ recombinant com a estratègia terapèutica en el context de la beta-amiloïdosi cerebral.*

Directores: Mar Hernández Guillamon y Mary Cano-Sarabia

Nota: Sobresaliente Cum Laude

### **Comunicaciones**

1) Sofía Fernández-de Retana, Alex Montañola, Jose Luis Sánchez-Quesada, Maialen De-Lacuesta, Joan Montaner, Daniel Maspoch, Mary Cano, Mar Hernández-Guillamon. *Synthesis and characterization of rHDL-rApoJ nanoparticles.*

Cerebral Amyloid Angiopathy International Conference, Boston, US. Septiembre 2016.

3) Alex Montañola, Sofía Fernández-de Retana, Aina Batlle, Maialen De-Lacuesta, Joan Montaner, Mar Hernández-Guillamon.

*Effect of human recombinant ApoA-I Milano variant on experimental models of cerebral  $\beta$ -amyloidosis*

Cerebral Amyloid Angiopathy International Conference, Boston, US. Septiembre 2016.

4) Sofía Fernández-de Retana, Alex Montañola, Jose Luis Sánchez-Quesada, Maialen De-Lacuesta, Joan Montaner, Daniel Maspoch, Mary Cano, Mar Hernández-Guillamon. *Synthesis and characterization of rHDL-rApoJ nanoparticles.*

X Simposi de Neurobiologia, Octubre 2016, Barcelona.

5) Mar Hernández-Guillamon, Alex Montañola, Sofía Fernández-de Retana, Aina Batlle, Maialen De-La Cuesta, Joan Montaner.

*Recombinant ApoA-I Milano variant reduces cerebral  $\beta$ -amyloid accumulation in a mouse model of Alzheimer's disease.*

AD/PD Conference, Marzo 2017, Viena, Austria. Presentació oral

6) Mar Hernández-Guillamon, Sofía Fernández-de Retana.

*Effect of biological variants of ApoJ and ApoA-I in experimental models of cerebral  $\beta$ -amyloidosis*

Cerebral Amyloid Angiopathy International Conference, Septiembre 2018, Lille, Francia. Presentación oral.

7) Mar Hernández-Guillamon, Sofía Fernández-de Retana.

*Peripheral administration of human recombinant ApoJ/Clusterin prevents cerebral amyloid angiopathy and the accumulation of insoluble beta-amyloid in APP23 mice.*

AD/PD Conference, Marzo 2019, Lisboa, Portugal. Presentación oral (aceptada)