



Fundació
La Marató de TV3

20º SIMPOSIUM
Enfermedades neurodegenerativas



PAPEL DE LA REELINA EN LA INTERSECCIÓN DE MECANISMOS MOLECULARES DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER: TAUPATÍA, TOXICIDAD DE AMILOIDE Y TRANSMISIBILIDAD

Lluís Pujadas Puigdomènech

VHIR Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebron

José María Delgado García

Facultad de ciencias experimentales / Universidad Pablo de Olavide

1. Resumen del proyecto

La proteína extracelular reelina estimula la plasticidad sináptica y actúa como regulador homeostático del correcto funcionamiento del cerebro. Asimismo, la reelina y su vía de señalización están directamente involucradas en los mecanismos moleculares de la enfermedad de Alzheimer, en la que tienen un papel beneficioso en el contexto de la patología mediante un mecanismo dual: por un lado, la reelina estimula el funcionamiento del cerebro, fortaleciendo el sistema ante la pérdida de función; por otro, la reelina contrarresta a nivel molecular las características propias de la enfermedad. En concreto, la reelina activa vías de señalización que inhiben la fosforilación de la proteína tau, molécula protagonista de una de las dos características principales de la enfermedad.

Adicionalmente, la reelina modula la otra característica principal de la enfermedad uniéndose a especies de amiloide disminuyendo su toxicidad, retrasando la formación de fibras y produciendo el rescate de los déficits cognitivos ligados a la amiloidosis en un modelo de ratón transgénico. Globalmente, este conjunto de datos sitúa la proteína reelina en la intersección entre los procesos patológicos de la enfermedad de Alzheimer y los mecanismos protectores, lo que alienta la consideración de la propia reelina y su vía de señalización como dianas terapéuticas para combatir la enfermedad de Alzheimer. El objetivo principal del proyecto ha sido investigar el papel preciso que tiene la proteína reelina en los mecanismos involucrados en la evolución de la enfermedad de Alzheimer, focalizando el estudio en la patología de tau, la amiloidosis y la transmisibilidad. El proyecto se diseñó para clarificar si la sobreexpresión de reelina rescata la sintomatología de Alzheimer en modelos de tau (TgRln/VLW y TgRln/GSK-3 β) y si se produce una aceleración de la evolución de la enfermedad de Alzheimer en una cepa de ratones *knock-out* condicionales de reelina (fIRln/Cre/J20). Por último, a través del estudio de la participación de la reelina en la transmisibilidad de la amiloidosis en modelos de enfermedad de Alzheimer y sobreexpresión de reelina (TgRln/J20), el proyecto pretendía evaluar de qué manera la interacción de la reelina con especies de amiloide puede modular la propagación de la amiloidosis y sus propiedades de transmisibilidad; en especial, cuando animales modelo de la enfermedad son sometidos a inducción experimental de la amiloidosis.

Los resultados de este proyecto permiten concluir que la reelina es capaz de reducir la inducción de los indicadores de taupatía en cultivos neuronales tratados con especies tóxicas de amiloide. Asimismo, la sobreexpresión de reelina en modelos de taupatía demuestra que la protección ante esta patología también se produce en modelos *in vivo*. Así, la reelina reduce fenotipos relacionados a la patología de tau a nivel bioquímico e histopatológico y, a destacar, también a nivel electrofisiológico y comportamental. Asimismo, en el desarrollo de este proyecto hemos estudiado otra manifestación de la enfermedad, la amiloidosis, en situaciones experimentales específicas que incluyen la depleción de reelina y la inducción de amiloidosis. Iniciamos el estudio de la depleción de reelina en cerebro adulto a través de su caracterización comportamental, histológica y electrofisiológica, particularmente cuando se cruza con el modelo de ratón J20. Por otro lado, el papel de la reelina en la transmisibilidad de la amiloidosis se estudió mayoritariamente *in vivo* en el modelo de sobreexpresión de reelina mediante experimentos de inyección intracerebral de extractos de cerebro. Los resultados indican que la presencia incrementada de reelina conlleva una reducción de la propagación de la amiloidosis en el cerebro de los animales experimentales durante un determinado periodo temporal en tiempos cortos postinducción.

El conjunto de datos generados en el proyecto indica que la reelina actúa de manera beneficiosa minimizando tanto la enfermedad de tau como la amiloidosis inducida, y confirma así la hipótesis según la cual la proteína reelina tiene un papel destacado en diversos mecanismos patológicos asociados a la enfermedad de Alzheimer. Así pues, podemos concluir que hay que considerar la proteína reelina como diana para el desarrollo de nuevas terapias orientadas a combatir la enfermedad de Alzheimer.

2. Resultados

Un primer objetivo destacado del proyecto fue el estudio del efecto de la sobreexpresión de la reelina en los niveles de fosforilación de tau en dos modelos *in vivo* de taupatía (VLW y GSK-3 β). La sobreexpresión de reelina en estos modelos (TgRln/VLW y TgRln/GSK-3 β) produjo una reducción de la fosforilación de tau, sin alterar los niveles totales de esta proteína. Los resultados indicaron una recuperación de los niveles de tau fosforilada, lo que podría modular la progresión del fenotipo propio de la enfermedad de Alzheimer en estos animales. Estos resultados se complementaron con un conjunto de experimentos *in vitro* para investigar la participación de la reelina en la recuperación de la alteración de la distribución de las proteínas de citoesqueleto tau y neurofilamento hacia el compartimento somatodendrítico. Particularmente, la reelina fue capaz de modular la proporción de neuronas que sufren esta translocación de neurofilamentos, así como modular también la distribución fina de la proteína tau a lo largo de las dendritas translocadas, produciendo una menor acumulación de esta proteína en la parte proximal de las dendritas. Estos resultados se culminaron con experimentos *in vivo* en los modelos de ratón de taupatía mediante el estudio de la presencia de señal somatodendrítica de proteína tau fosforilada en epítomos vinculados a la enfermedad de Alzheimer. Además, y para caracterizar con más detalle los ratones TgRln/VLW, se estudiaron las respuestas de estos animales a nivel electrofisiológico en el circuito intrínseco del hipocampo. Los ratones VLW mostraron unas propiedades sinápticas basales y en plasticidad a corto plazo comparables a las de los animales control, pero presentaron importantes déficits en experimentos de potenciación a largo plazo (LTP, siglas de *long-term potentiation*). Es importante destacar que estos déficits en LTP se revertieron por sobreexpresión de reelina en los animales TgRln/VLW. De forma comparable, cuando los animales fueron estudiados a nivel comportamental, se observó que los ratones VLW no mostraban déficits motores pero sí presentaban déficits significativos en sus capacidades mnésicas; nuevamente, estos déficits se recuperaron con la sobreexpresión de la reelina. En conjunto, los datos recogidos evidencian la relevancia fisiológica de la reducción de la fosforilación producida por la reelina y muestran que la sobreexpresión de reelina contrarresta las anomalías de los modelos animales de taupatía a nivel histológico, electrofisiológico y comportamental.

El segundo objetivo principal del proyecto estaba relacionado con el estudio de la amiloidosis en una diversidad de modelos experimentales sometidos a alteraciones en los niveles de reelina. Con este propósito, se utilizaron animales de la cepa J20 que sobreexpresan la forma mutada de la proteína precursora de amiloide humana para reproducir el fenotipo de amiloidosis de la enfermedad de Alzheimer, con acumulación de placas seniles en los animales. Mediante el cruce de estos animales con el modelo condicional *knock-out* de reelina (fIRIn/Cre) obtuvimos animales fIRIn/Cre/J20 en los que en primer lugar se analizó la acumulación de depósitos a edades tempranas para evaluar la aceleración potencial de la aparición de placas amiloides en comparación con los ratones J20. En paralelo, las implicaciones electrofisiológicas de la depleción de reelina se estudiaron en animales fIRIn/Cre a través de la caracterización basal de la conexión CA3-CA1, así como las respuestas de esta conexión a la inducción de LTP. Los resultados indican que la depleción de reelina en edades postnatales comporta un fenotipo complejo a nivel electrofisiológico e histológico, en el que la acumulación aberrante de amiloide no se produce de manera masiva en tiempos cortos después de la depleción de reelina. Los datos obtenidos permitieron diseñar experimentos con duraciones más largas de la depleción de reelina para analizar mejor no únicamente el inicio de la acumulación de depósitos de amiloide sino sobre todo su propagación por el cerebro, lo que enlaza con el último gran objetivo del proyecto vinculado con la transmisibilidad de la amiloidosis.

Finalmente, el proyecto pretendía clarificar la posible participación de la reelina en la propagación de depósitos de amiloide por todo el cerebro durante la evolución de la enfermedad de Alzheimer. Para estudiar este proceso, modelamos experimentalmente la inducción de amiloidosis en nuestros animales modelo. El estudio se inició con una serie de experimentos que incluyeron la caracterización electrofisiológica y comportamental del modelo TgRIn/J20, el modelado *in vitro* de la inducción de agregación de amiloide y la optimización de la inducción experimental de la amiloidosis *in vivo* en el modelo de ratón J20. Los tiempos adecuados para la implementación de la amiloidosis inducida experimental fueron 8 semanas para los animales de 4 a 6 meses de edad y de un mínimo de 12 semanas para los animales de 2 meses de edad, y se observó que a partir de las 16 semanas también se producía amiloidosis en regiones alejadas del punto de inyección como son la corteza entorinal y el hipocampo contralateral. Estudios extensivos de

amiloidosis inducida en el contexto de sobreexpresión de reelina indicaron que esta proteína es capaz de reducir la transmisibilidad tanto a nivel local como en regiones alejadas del punto de inyección para un periodo temporal concreto durante las etapas iniciales de acumulación de depósitos de amiloide en cada una de las áreas analizadas.

3. Relevancia e implicaciones futuras

En conjunto, los resultados surgidos del proyecto complementan los datos ya conocidos que atribuyen a la reelina un efecto beneficioso en el marco de la patología de Alzheimer y otorgan a la vía de señalización de reelina un papel de regulador negativo de la progresión de la enfermedad dado que ocasiona una recesión de las patologías de tau y de amiloide. A partir de los resultados del proyecto, proponemos que la activación de la vía de reelina representa una aproximación terapéutica útil para reducir algunos de los mecanismos patológicos asociados a la taupatía y la amiloidosis tanto para la enfermedad de Alzheimer como potencialmente para otros tipos de proteinopatías. Teniendo en cuenta estos resultados, podemos concluir que la reelina interviene en forma positiva contra diversos procesos patológicos vinculados a la amiloidosis (propagación de agregados de amiloide y translocación de tau inducida por especies amiloides) y contra varios procesos patológicos asociados a la taupatía (distribución aberrante de tau fosforilada, déficits sinápticos y pérdida de memoria a tiempos largos). Así pues, el papel de la reelina como modulador central de los mecanismos patológicos asociados tanto a amiloide como a tau en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer requiere más atención para el futuro desarrollo de nuevas terapias.

4. Bibliografía

Rossi D, Gruart A, Contreras-Murillo G, Ávila J, **Delgado-García JM, Pujadas L[#]** i Soriano E[#].

Reelin reverts biochemical, physiological and cognitive alterations in mouse models of tauopathy. Progress in Neurobiology (en segunda revisión).

Rossi D., Pardo M., Jordan K., Tarutani A., Hasegawa M.S., Soriano E[#]. and **Pujadas L[#]**.
Reelin decreases prion-like induced-proteinopathy for amyloid and α -synuclein species in murine models.
Nature Medicine (en preparación).

Gruart A., Rossi D., Soriano E., **Pujadas L.** and **Delgado-García J.M**
Electrophysiological and functional characterization of Reelin-overexpression in the context of Alzheimer's disease amyloidogenesis
En elaboración, revista no especificada.

Manso Y., Vilchez A., Rossi D., Gruart A., **Delgado-García J.M.**, **Pujadas L.** and Soriano E.
Structural and functional characterization of conditional depletion of reelin in the context of Alzheimer's disease
En elaboración, revista no especificada.

[#] Responsables de la correspondencia.