



**Fundació**  
La Marató de TV3

20è SIMPOSIUM  
Malalties neurodegeneratives



# **SENYALITZACIÓ PER PRONGF/P75NTR EN LA NEUROGÈNESI HIPOCAMPAL ADULTA: DIANA POTENCIAL PER A LA GENERACIÓ DE NOVES NEURONES EN LA MALALTIA D'ALZHEIMER**

**Carme Espinet Mestre**

IRBLL Institut Recerca Biomèdica de Lleida

## 1. Resum

Durant els últims anys s'ha descrit l'existència de neurogènesi al cervell adult en diferents espècies, incloent-hi els humans. Curiosament, el treball amb rosegadors ha demostrat que la neurogènesi adulta al gir dentat (DG) de l'hipocamp és important per a alguns aspectes cognitius. L'augment de la neurogènesi millora la memòria, mentre que la interrupció provoca efectes oposats. La neurogènesi adulta disminueix amb l'edat i s'ha suggerit que té un paper en el deteriorament cognitiu, l'aprenentatge progressiu i la pèrdua de memòria en la malaltia d'Alzheimer (MA). Les estratègies destinades a incrementar la neurogènesi adulta poden tenir efectes beneficiosos per al tractament de la MA i poden contrarestar els efectes nocius de factors tòxics en la malaltia. Un d'aquests, la proneurotrofina proNGF, presenta un augment notable durant la MA en l'hipocamp i l'escorça entorínica. A diferència del NGF madur, el proNGF té funcions negatives sobre la supervivència, proliferació i diferenciació. La nostra hipòtesi és que el proNGF i el seu receptor p75NTR tenen un paper important en la interrupció de la neurogènesi adulta durant el desenvolupament de la MA i que, per tant, poden ser un objectiu terapèutic prometedor. No obstant això, ni els processos regulats per proNGF/p75NTR durant la neurogènesi adulta ni els mecanismes cel·lulars i moleculars implicats es comprenen del tot. En aquest projecte, aprofitem models animals de MA, mostres humanes de MA i cultius primaris de cèl·lules neurogèniques adultes (NSC) per abordar el paper exacte de p75NTR en diferents aspectes de la neurogènesi adulta, incloent-hi la supervivència, la proliferació i la diferenciació.

## 2. Resultats

### 1. L'expressió de proBDNF i la proporció de sortilina/p75NTR augmenten en l'hipocamp de pacients amb MA

L'hipocamp és una de les regions cerebrals més afectades en la MA. Particularment vulnerables són un grup de neurones situades a l'hil, també conegut com a *mossy cells*. Hem obtingut mostres cerebrals que contenen aquesta regió de pacients amb MA i individus controls, del Banc de Teixits Neurològics de Bellvitge, UB. Usant anticossos dirigits contra el domini extracel·lular de p75 (p75ECD), sortilina (el correceptor de p75) i contra el prodomini del proBDNF, es van realitzar assaigs d'immunofluorescència per determinar els nivells d'aquestes proteïnes. Vam observar que la intensitat de la

fluorescència de p75 en cèl·lules hilars de cervells amb MA no era significativament diferent dels cervells controls. Tanmateix, l'abundància de sortilina, així com el percentatge de cèl·lules doble positives per a sortilina i p75 van augmentar significativament en el cervell amb MA. També vam observar una expressió abundant de proBDNF al citoplasma de les neurones hilars de l'hipocamp humà.

## **2. Les modificacions posttraduccional de proBDNF en l'hipocamp i en CSF estan incrementades en la MA**

L'augment de l'estrès oxidatiu en el cervell amb l'envelliment s'ha proposat que pot ser un factor clau desencadenant de MA. Els mecanismes moleculars implicats són diversos i inclouen modificacions posttraduccional de proteïnes específiques. Per exemple, GO i MGO, dos dicarbonils altament reactius que augmenten durant l'envelliment, reaccionen amb grups amino lliures, de residus Lys, Arg i Cys, que condueixen a la formació dels adductes AGE/ALE CML, CEL i entrecreuaments intermoleculars. Com vàrem proposar anteriorment (Kichev *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 2009), aquestes modificacions afecten el proNGF durant la MA, la qual cosa fa que la proforma d'NGF sigui més estable (ja que no es pot convertir en NGF madur) i, com a conseqüència, augmenti la mort cel·lular. Per determinar si proBDNF també podria ser modificat per dicarbonils reactius en la MA, es van abordar diferents enfocaments. En primer lloc, es va estudiar la col·localització de proBDNF i CEL mitjançant immunohistoquímica a la regió hilar de mostres d'hipocamp humanes de controls i de cervells afectats per MA. Vam observar un augment notable de la immunoreactivitat CEL als cervells afectats en comparació amb els controls. Curiosament, gairebé totes les cèl·lules hipocampals de pacients amb MA eren CEL positives, i expressaven proBDNF, mentre que al cervell dels individus controls, poques neurones mostraven una doble immunoreactivitat. Aquests resultats van suggerir fortament que proBDNF podria ser modificat per dicarbonils reactius. Per abordar aquesta qüestió directament, es va realitzar un assaig més específic. Es va immunoprecipitar proBDNF del CSF de controls i pacients amb MA i es varen analitzar els precipitats per *Western blot* amb un anticòs contra CEL. Es va observar que el proBDNF en el CSF dels pacients amb MA estava fortament modificat amb CEL, al voltant de 6 vegades més de mitjana, en comparació amb els controls. En conjunt, aquests resultats indiquen que el proBDNF en pacients amb MA presenta modificacions posttraduccional AGE com a conseqüència d'un augment de l'estrès oxidatiu durant la malaltia, que pot impedir l'acció de convertases per produir BDNF madur.

### **3. El proBDNF modificat *in vitro* per MGO indueix apoptosi i disminueix la diferenciació neuronal**

Per comprovar els efectes de les modificacions AGE de proBDNF induïdes per condicions d'estrès oxidatiu sobre la supervivència i la diferenciació de les neurones, es va tractar proBDNF recombinant *in vitro* amb espècies reactives d'oxigen que reaccionen amb residus d'Arg i Cys, tot provocant la formació de modificacions i entrecreuaments en la proteïna. Es varen obtenir cultius primaris d'NSC hipocampals adultes i es va estudiar l'efecte del tractament amb proBDNF modificat (MproBDNF), BDNF madur, proBDNF no modificat i BSA modificada de la mateixa manera que el proBDNF (MBSA), com a control. El primer dia *in vitro* (DIV), les neurones es van començar a diferenciar, però va ser entre 4 i 7 DIV quan el grau de maduració era significatiu. En períodes de cultiu més llargs, les neurones presentaven un grau complex de neuritogènesi i diferenciació, principalment als pous tractats amb mBDNF, que ho feia difícil de quantificar. Les neurones diferenciades expressaven doblecortina (DCX),  $\beta$ III tubulin, SV2, p75NTR, sortilina, TrkB i calretinina. Tanmateix, aquestes neurones van ser negatives per parvalbúmina i calbindina, la qual cosa indica que es tractava de noves neurones granulars diferenciades. En els cultius tractats amb BDNF madur durant 6 DIV, les neurones van augmentar significativament la seva diferenciació en comparació amb els cultius no estimulats. Curiosament, l'estimulació del control amb proBDNF, sense modificacions AGE, no va augmentar la mortalitat cel·lular per sobre dels nivells basals; però va produir efectes similars al BDNF madur, en la diferenciació neuronal. En canvi, l'estimulació amb MproBDNF va produir un augment significatiu de l'apoptosi i diferenciació. Aquests efectes van ser específics del MproBDNF, ja que no es van observar després de l'estimulació amb MBSA. Aquests resultats suggereixen que el proBDNF no modificat es converteix ràpidament en la forma madura, mentre que el MproBDNF, que és més resistent a l'acció de convertases, és més estable i desencadena l'apoptosi i la manca de diferenciació.

### **4. El CSF dels pacients amb MA indueix apoptosi neuronal a través de proBDNF/p75NTR**

Segons els nostres resultats, els pacients amb MA presenten un augment de la relació proBDNF/BDNF. D'altra banda, hem observat que proBDNF dels pacients amb MA presenten modificacions posttraduccionals, com AGE, conseqüència de l'augment de l'estrès oxidatiu durant la neurodegeneració. Finalment, els nostres experiments *in vitro* suggereixen que aquestes modificacions produeixen una forma més estable de

proBDNF, que pot explicar: 1) l'augment dels nivells de proBDNF en cervells i CSF en MA, i 2) la implicació de proBDNF en la mort neuronal associada a la malaltia. Per avaluar més a fons aquesta hipòtesi, vàrem assajar directament els efectes del proBDNF contingut en el CSF dels pacients amb MA sobre neurones primàries diferenciades, tal com s'ha dit anteriorment. Així, es van estimular cultius de 6 DIV amb CSF de controls (CSAF) i de pacients amb MA (MACSF). Es varen usar anticossos contra el domini intracel·lular de p75 (p75ICD) i DAPI, per tal d'avaluar la localització subcel·lular de la proteïna per microscòpia confocal i la mort apoptòtica, respectivament. Les neurones tractades amb CSF control varen sobreviure i es varen diferenciar normalment, tot mostrant un índex basal de mort cel·lular apoptòtica al voltant del 10%. Una gran proporció d'aquestes neurones mostrava una distribució perifèrica de p75ICD en el soma consistent amb la presència del receptor intacte. En canvi, els cultius tractats amb MACSF van mostrar una morfologia i diferenciació alterada i un augment dramàtic del nombre de nuclis apoptòtics (fins al 60%). A més, en el marc del tractament amb MACSF, es va produir un augment significatiu en el percentatge de neurones amb translocació nuclear del fragment de 20 kDa ICDp75. El CSF dels pacients amb MA, com ja és conegut, conté altres factors, com A $\beta$ , que podrien ser responsables d'aquests efectes neurotòxics. Per determinar el grau de participació en aquest efecte del proBDNF present al CSF de MA, es va immunoprecipitar el proBDNF amb anticossos antiproBDNF-sefarosa AG. L'eliminació de proBDNF va ser demostrat per *Western blot* amb anticossos contra proBDNF. A continuació, es van comparar els efectes del CSF immunoprecipitat (CSFIP) i el CSF normal d'ambdós pacients, amb MA i controls, en els cultius esmentats. L'eliminació del proBDNF va produir una notable reducció del percentatge d'apoptosi, així com del percentatge de neurones amb immunoreactivitat nuclear per p75ICD. Aquests resultats indiquen que el proBDNF al CSF dels pacients amb MA és biològicament actiu i que és el principal responsable dels efectes proapoptòtics desencadenats pel MACSF. A més, aquests resultats suggereixen amb consistència que els efectes de proBDNF del MACSF estan mediat per l'activació de la senyalització p75.

## **5. En el model murí APP/PS1, estan augmentats el processament de p75 i la inducció a l'apoptosi**

En la MA familiar, les mutacions més freqüents es troben al complex de la gamma secretasa. Algunes d'aquestes mutacions afecten la presenilina 1 (PS1), incloent-hi la supressió de l'exó 9 ( $\Delta$ 9) o M146V. S'ha descrit que aquestes són mutacions de guany

de funció que condueixen a un augment de l'activitat proteasa. L'estudi dels mecanismes patològics subjacents a aquestes mutacions i el desenvolupament de la MA s'ha centrat en diversos substrats de PS1, principalment A $\beta$ . Atès que p75NTR també és un substrat de l'activitat de PS1, es va plantejar la hipòtesi que les conseqüències nocives del proBDNF sobre la supervivència neuronal i la diferenciació en la MA, podrien ser potenciades pels efectes de les mutacions en PS1 sobre la senyalització p75. En particular, vam estar interessats a saber si aquests canvis poden incrementar els efectes de les proneurotrofines. Per posar a prova aquesta hipòtesi, vàrem establir cultius neuronals primaris d'NSC a partir de ratolins APP/PS1 i dels seus controls. Aquest model animal APP/PS1 presenta la majoria de trastorns característics de MA: formació de placa amiloide i envelliment. Després de 6 DIV, en el tractament amb MBSA (control), aquestes neurones APP/PS1 presentaven un percentatge més alt de nuclis apoptòtics i un major percentatge de neurones amb immunoreactivitat nuclear per p75NTR. L'estimulació amb MproBDNF va induir un augment més fort i significatiu de la mort cel·lular i la immunoreactivitat nuclear de p75NTR en aquestes neurones transgèniques en comparació amb els controls. Per tant, es conclou que les mutacions PS1 implicades en la MA familiar potencien els efectes del proBDNF sobre la mort cel·lular, probablement augmentant la senyalització p75 i, en particular, la translocació nuclear de p75ICD.

Els nostres resultats suposen una important contribució a l'estudi de la senyalització de p75NTR en la patogènia de la MA. Les nostres dades proporcionen un nou mecanisme proapoptòtic en AD que implica que, pel processament de p75NTR a causa de mutacions en PS1, les noves neurones del gir dentat siguin més sensibles als efectes adversos de proBDNF modificat per AGE.

### **3. Rellevància i possibles implicacions futures**

A causa de l'augment de l'envelliment de la població a la nostra àrea, la MA és un problema important per a la societat. Malauradament, no hi ha cap tractament específic per a la malaltia reconegut amb èxit. En aquest sentit, els resultats del projecte indiquen que les proneurotrofines poden ser clínicament rellevants en: a) com a inductors de l'apoptosi hipocampal a la MA; b) com a inhibidors de la neurogènesi adulta i, per tant, bloquejadors de memòria episòdica, principalment de l'establiment

dels patrons de records; c) l'efecte de les modificacions acumulades derivades de l'estrès oxidatiu que afecten les proneurotrofines i impedeixen el seu processament agreuja la seva funció proapoptòtica; d) el diagnòstic precoç de la malaltia, ja que hem detectat un augment específic i significatiu de les proneurotrofines modificades en mostres de malalts afectats per la MA.

Els resultats obtinguts en aquest treball poden contribuir al disseny de mètodes terapèutics i preventius per al tractament de la malaltia.

#### 4. Bibliografia 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 preparació.

#### Principals comunicacions a congressos

Espinet C, Piñol G, Rampon C, Fleitas C, Peris M, Curià R, Ferran P i 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 i 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 i 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 i 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.