



Fundació
La Marató de TV3

20è SIMPOSIUM
Malalties neurodegeneratives



DESXIFRANT LA RELACIÓ ENTRE LA REACTIVITAT DES ASTRÒCITS I EL DANY NEURONAL EN LA MALALTIA D'ALZHEIMER

Elena Galea Rodríguez de Velasco

Institut de Neurociències – Universitat Autònoma de Barcelona

Javier Vitorica Ferrández

Facultat de Farmàcia - Universitat de Sevilla

Antonia Gutiérrez Pérez

Facultat de Ciències - Universitat de Màlaga

Joan Xavier Comella Carnicé

VHIR - Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebron

1. Resum

Justificació de l'estudi. La malaltia d'Alzheimer d'inici tardà (LOAD) és un tipus de demència causada per neurodegeneració que afecta més de 46 milions de persones a tot el món. Els símptomes clínics principals inclouen pèrdua de memòria, problemes de llenguatge, dificultat per fer tasques simples, pèrdua de capacitat de raonament, canvis d'humor i canvis de comportament. La causa de la LOAD no es coneix ni té guariment. Els canvis patològics inclouen plaques amiloides beta i cabdells neurofibril·lars, així com la pèrdua de sinapsis, dany vascular cerebral, canvis metabòlics i activació de cèl·lules no neuronals com ara la micròglia i els astròcits (també anomenats "astròcits reactius"). Els astròcits són un tipus de cèl·lula cerebral que exerceix funcions computacionals i homeostàtiques. Els astròcits són cèl·lules grans i atapeïdes, que presenten un cos cel·lular del qual emergeix una densa xarxa de processos primaris i secundaris. Els astròcits reactius presenten un canvi morfològic radical que consisteix en un augment dels processos primaris i secundaris, que es detecta amb estudis immunohistoquímics de la proteïna fibril·lar àcida de la glia (GFAP). Els canvis funcionals associats a aquesta transformació morfològica són desconeguts. En concret no s'ha establert fins a quin punt la pèrdua de la cognició en LOAD es deu al mal funcionament dels astròcits, ni quines vies dels astròcits estan mal regulades ni com impacten en la patogènesi de la malaltia, i en els seus biomarcadors i símptomes clínics. Un problema és que els estudis realitzats en ratolins han produït resultats contradictoris pel que fa al paper dels astròcits en LOAD. A més, els astròcits produeixen TNF-alfa, un factor que regula plasticitat sinàptica i la supervivència cel·lular. Per a aquest projecte és particularment rellevant que la producció de TNF-alfa s'incrementa dramàticament en LOAD. Es sospita, però no se sap del cert si el TNF-alfa podria contribuir a la pèrdua de les espines neuronals i la mort neuronal. Si és així, el mecanisme no està clar.

Objectius. L'objectiu general ha estat caracteritzar la disfunció dels astròcits en LOAD per avançar en la qüestió fonamental de si hi ha alteracions en la relació entre astròcits i neurones que puguin conduir a una pèrdua de sinapsis i, en última instància, a la mort neuronal, i així desenvolupar teràpies dirigides als astròcits. Quatre laboratoris han afrontat quatre objectius específics. L'objectiu específic 1 ha estat l'estudi estructural i ultraestructural dels astròcits utilitzant tècniques d'imatge avançades, incloent-hi la microscòpia electrònica. Els materials d'estudi han estat mostres *post*

mortem de pacients amb LOAD i models animals. L'objectiu específic 2 ha estat la identificació del perfil molecular dels astròcits, per mitjà d'una anàlisi informàtica de dades òmiques de mostres de cervell humà. L'objectiu específic 3 ha consistit en estudis funcionals. En concret, l'anàlisi de l'excitabilitat del calci per la tècnica de *calcium imaging*, i la fagocitosi per seguiment subcel·lular de marcadors. Els cultius primaris d'astròcits del cervell de ratolí i astròcits que sobreexpressen al·lels humans de l'apolipoproteïna tipus E (ApoE4 i ApoE3) han estat els materials d'estudi d'aquest objectiu. ApoE4 és el factor de risc genètic més important en LOAD. Com a objectiu específic 4 hem examinat l'efecte del TNF-alfa en models animals en els quals les vies activades per aquest factor han estat manipulades genèticament.

2. Resultats

2.1. La malaltia d'Alzheimer causa una disminució en l'expressió de FAIM-L (forma llarga de la molècula inhibidora apoptòtica de Fas), una proteïna implicada en la senyalització de TNF-alfa i que promou la supervivència neuronal. Hem descobert que FAIM també regula l'excitabilitat elèctrica de les neurones. Això suggereix que la disminució de l'expressió de FAIM-L en la malaltia d'Alzheimer pot no només contribuir a les accions neurotòxiques del TNF-alfa alliberat pels astròcits, sinó que també pot induir una excitació aberrant dels circuits neurals (referències 1, 3).

- *L'amiloide beta redueix l'expressió de la FAIM-L neuronal, la qual cosa transforma la resposta inflamatòria causada pel TNF-alfa de protectora a neurotòxica.* Hem descobert que FAIM-L està reduït a l'hipocamp de pacients amb LOAD. També hem observat que l'escorça entorínica i l'hipocamp d'un model de ratolí de LOAD (PS1M146LxAPP751sI) mostren una reducció d'aquesta proteïna abans de l'inici de la neurodegeneració. Alhora, neurones en cultiu tractades amb les fraccions solubles corticals d'aquests animals van mostrar una disminució en la FAIM-L endògena, un efecte que és imitat pel tractament amb lligands difusibles derivats d'amiloide beta (ADDL). La reducció en l'expressió de FAIM-L està associada amb la progressió de la neurodegeneració perquè canvia la resposta inflamatòria causada pel TNF-alfa a les neurones. En aquest sentit, també hem demostrat que la protecció del TNF-alfa contra la toxicitat d'amiloide beta cessa quan la FAIM-L endògena es redueix utilitzant ARN de forquilla curta (shRNA), o

pel tractament amb ADDL. En conjunt, aquests resultats donen suport a la idea que els nivells de FAIM-L contribueixen a determinar si l'efecte de TNF-alfa en les cèl·lules neuronals és protector o perjudicial.

- *La deficiència de FAIM causa epilèpsia, hiperexcitabilitat locomotora, canvis cognitius i alteracions socials.* Hem utilitzat ratolins *knock-out* (FAIM-KO) per establir el paper del factor en la LOAD. Abans de creuar aquests ratolins FAIM-KO amb transgènics de LOAD, hem dut a terme una caracterització fenotípica per comprendre millor la funció de FAIM en el sistema nerviós central adult (SNC). L'estudi està motivat per l'observació que els ratolins FAIM-KO pateixen atacs epilèptics de manera espontània. La incidència de les crisis epilèptiques, la seva gravetat i la durada, tant en condicions espontànies com durant la manipulació manual, es van quantificar en ratolins FAIMKO i en ratolins controls salvatges (WT) de la mateixa edat. Els estudis d'electrofisiologia van incloure corbes d'entrada/sortida, facilitació de polsos emparellats, potenciació a llarg termini (LTP) i generació de convulsions després de la injecció d'àcid caínic (8 mg/kg) a l'hipocamp. Es va fer un examen complet de comportament i funció, amb una bateria de 8 proves que van avaluar cinc dimensions: funcions motores i exploratòries, estat emocional, funcions cognitives, interacció social i funcions executives. Els resultats demostren que els ratolins FAIM-KO presenten una activitat recurrent d'atacs epilèptics dependent de l'edat, amb una ràpida recuperació entre les crisis. Els FAIM-KO també presenten valors d'LTP lleument més elevats en les propietats electrofisiològiques analitzades, així com una menor propensió a generar convulsions de l'hipocamp després de la injecció d'àcid caínic, en comparació amb els ratolins WT. Finalment, els ratolins FAIM-KO mostren hiperexcitabilitat locomotora, dèficits en la interacció social, conductes d'implantació deteriorades, i deficiència en habilitats d'aprenentatge i memòria. Aquests estudis suggereixen la participació de FAIM en la modulació de l'excitabilitat cerebral *in vivo*. Els ratolins FAIM-KO podrien proporcionar un model genètic excepcional per estudiar els mecanismes derivats de l'epilèpsia recurrent, i desenvolupar fàrmacs antiepilèptics amb validesa en LOAD.

2.2. La malaltia d'Alzheimer causa disfunció del sistema endolisosòmic en astròcits. Això té 3 conseqüències: (i) alteració de la mitofàgia, la qual cosa produeix una fallada bioenergètica, (ii) alteració de la fagocitosi, la qual cosa provoca l'acumulació de neurones distròfiques i l'agregació del pèptid amiloide beta, pel fet que la seva eliminació és defectuosa, i (iii) augment de

les respostes de calci, que al seu torn, pot comprometre la senyalització entre neurones i astròcits (referències 2, 4, 5).

- *Caracterització bioinformàtica del mal funcionament dels astròcits en la malaltia d'Alzheimer utilitzant dades humanes.* El reclutament d'astròcits sobreexpressant GFAP al voltant de les plaques d'amiloide beta en LOAD suggereix que aquestes cèl·lules pateixen importants alteracions fenotípiques i, per tant, funcionals. No obstant això, es desconeix quines vies dels astròcits estan alterades als cervells humans amb LOAD. El progrés del coneixement sobre la contribució dels astròcits a LOAD s'ha vist obstaculitzat per la falta de dades en humans. **OBJECTIUS.** Caracteritzar l'alteració de vies astrocitàries en LOAD duent a terme una anàlisi bioinformàtica de dades humanes, a fi d'aclarir la contribució dels astròcits a la malaltia, i desenvolupar teràpies astrocitàries basades en biologia de sistemes. **MÈTODE.** Primer vam establir l'especificitat cel·lular de tots els gens cerebrals utilitzant el mètode basat en la univariable Tau, juntament amb l'agrupació jeràrquica de dades transcriptòmiques d'astròcits, neurones, micròglia, cèl·lules endotelials i oligodendròcits, aïllats, al seu torn, d'escorces d'humans. En segon lloc, vam definir les funcions d'aquests grups de gens utilitzant tant plataformes d'ontologia de gens o d'obtenció manual. En tercer lloc, vam utilitzar una anàlisi d'enriquiment de conjunts de gens (GSEA) per avaluar estadísticament els canvis en aquests grups de gens en LOAD, utilitzant dades de *microarrays* i RNAseq de pacients i subjectes controls de la mateixa edat. Vam dur a terme la mateixa anàlisi en neurones com a control positiu. **RESULTATS.** Els grups específics de neurones relacionats amb l'estructura sinàptica, la plasticitat sinàptica i la neurotransmissió estan disminuïts, tal com s'esperava, en LOAD. Els canvis més marcats en astròcits afecten gens relacionats amb el creixement, les vies de TGF-beta, el metabolisme energètic i el sistema endolisosòmic. **CONCLUSIÓ.** La compartimentació cel·lular dels gens expressats diferencialment en cervells de pacients amb LOAD vers els controls sans suggereix una disfunció multiorganular als astròcits.

- *Eliminació per fagocitosis de distròfies presinàptiques per astròcits reactius en la malaltia d'Alzheimer.* L'astrogliosi reactiva, que és un procés complex caracteritzat per una hipertròfia cel·lular i la regulació positiva dels components dels filaments intermedis, és una característica comuna als cervells dels pacients amb LOAD. Els astròcits reactius es troben en estreta associació amb les plaques neurítiques, però és desconegut el paper precís d'aquestes cèl·lules glials en la patogènesi de la malaltia. En

aquest estudi, utilitzant tècniques immunohistoquímiques i microscòpia òptica i electrònica, hem descobert que els astròcits reactius associats a la placa envolten, engoleixen i poden digerir distròfies presinàptiques en ratolins de l'hipocamp de la proteïna precursora amiloide/presenilina-1 (APP/PS1). La micròglia, la població fagocítica per excel·lència del cervell, no està implicada en aquesta eliminació de neurites distròfiques. Els astròcits reactius fagocítics estan presents en el 35% i el 67% de les plaques amiloides als 6 i 12 mesos d'edat, respectivament. La proporció de neurites distròfiques engolides és baixa, aproximadament del 7% del total de distròfies al voltant de les plaques en les dues edats. Aquest fet, juntament amb l'acumulació de neurites distròfiques durant el curs de la malaltia, suggereix que l'eficiència del procés fagocític dels astròcits està limitada o deteriorada. També es van detectar, per anàlisi confocal i ultraestructural, astròcits reactius envoltant i embolicant neurites distròfiques a l'hipocamp de pacients amb LOAD. Proposem que l'activitat fagocítica dels astròcits reactius podria contribuir a eliminar les sinapsis malmeses, o els residus sinàptics, i restaurar, per tant, els circuits neuronals deteriorats i reduir l'impacte inflamatori de les parts neuronals malmeses, i/o limitant la patologia amiloide. Per tant, la potenciació de les propietats fagocítiques dels astròcits reactius pot representar una teràpia potencial en LOAD.

- *ApoE4 causa disfunció lisosòmica i mitocondrial als astròcits.* Les apolipoproteïnes (ApoE) són molècules portadores de colesterol al cervell i en humans n'hi ha tres al·lels: E2, E3 i E4. L'ApoE4 és el factor de risc genètic més important de LOAD, però el seu mecanisme patogènic, probablement multifactorial, continua sense estar clar. L'objectiu dels nostres estudis va ser estudiar l'efecte de l'ApoE4 intracel·lular als astròcits, ja que aquestes cèl·lules són les que produeixen la major part de l'ApoE al cervell. Postulàvem que l'ApoE4 altera el trànsit normal de lípids als astròcits, la qual cosa causava una disfunció suborgànica. Com a materials d'estudi vam utilitzar astròcits immortalitzats generats pel grup del Dr. Holtzman en els quals s'havia substituït l'ApoE endògena per isoformes humanes de l'ApoE. Com a paràmetres funcionals, vam examinar les concentracions de calci amb tècniques d'imatge després de manipular els fluxos de calci amb una bateria de fàrmacs. La dinàmica mitocondrial es va estudiar mitjançant el seguiment de la fusió i la fissió mitocondrials per microscòpia de fluorescència i morfometria computada. Vam trobar tres diferències principals entre els astròcits ApoE4 i ApoE3. En primer lloc, l'excitabilitat dels astròcits mesurada com a respostes de calci induïdes per ATP,

noradrenalina i acetilcolina, està regulada pels lípids extracel·lulars als astròcits ApoE3, però no als astròcits ApoE4. Aquest fet és per la impossibilitat dels astròcits ApoE4 de regular l'entrada de calci extracel·lular. Per contra, als astròcits ApoE4 hi ha una alta concentració de calci d'òrgànuls àcids relacionats, com ara els lisosomes, fet que provoca que les seves respostes siguin sempre grans i prolongades en el temps. En segon lloc, les mitocòndries als astròcits amb ApoE4 mostren una fissió defectuosa, ja que no responen a estímuls com l'oligomicina, que fragmenten les mitocòndries. També presenten una major motilitat, detectada amb mesures de desplaçament al quadrat (D2, Imaris), així com una disminució de l'expressió de la parkina (proteïna clau per a la mitofàgia), una disminució de la producció d'ATP i un augment de la producció de lactat. En tercer lloc, un estudi de lipidòmica no dirigida revela una proporció reduïda de lisofosfatidilcolina/ fosfatidilcolina als astròcits ApoE4 respecte dels ApoE3. Concloem que els astròcits amb ApoE4 presenten una alteració de fluxos de calci associada a un deteriorament de la dinàmica mitocondrial i a un canvi del metabolisme energètic a la glucòlisi. Estem duent a terme estudis per identificar els canals de calci que expliquen les diferències entre els astròcits ApoE3 i ApoE4, així com per examinar les relacions causa-efecte entre la disfunció lisosòmica i la mitocondrial als astròcits ApoE4, i el paper dels fosfolípids.

3. Rellevància i implicacions futures

- El descobriment que el FAIM-L està disminuït en mostres *post mortem* de pacients de LOAD i de models de ratolí proporciona una nova diana per a estratègies neuroprotectores destinades a preservar la integritat de les neurones, així com un biomarcador de dany neuronal.
- El descobriment que la depleció de FAIM causa epilèpsia, símptoma altament ignorat en la LOAD, i una alteració dels paràmetres electrofisiològics a l'escorça cerebral del ratolí FAIM-KO, suggereixen que FAIM regula l'activitat de circuits cerebrals. Aquesta evidència obre el camí a teràpies que corregeixin excés d'excitabilitat neuronal en la LOAD mitjançant la restauració de l'expressió FAIM.
- La fallada multifuncional causada per la disfunció del sistema endolisosòmic als astròcits, descobert en diversos models relacionats amb la LOAD, suggereix que la

recuperació de la funció d'aquest orgànu serà clau per aconseguir una millora global dels funcions homeostàtiques i computacionals dels astròcits. La biologia de sistemes és necessària per identificar nodes diana de teràpies multifuncionals, usant mapes d'interacció de proteïnes dels astròcits.

4. Bibliografia científica generada

1. P. Carriba, S. Jimenez, V. Navarro, I Moreno-Gonzalez, B. Barneda-Zahonero, RS Moubarak, J Lopez Soriano, A. Gutiérrez, J. Vitorica, J.X. Comella.

Amyloid- β reduces the expression of neuronal FAIM-L, thereby shifting the inflammatory response mediated by TNF α from neuronal protection to death.

[Cell Death Dis.](#) 2015 6:e1639. doi: 10.1038/cddis.2015.6.

2. A. Gómez-Arboledas, J.C. Davila, E. Sánchez-Mejías, V. Navarro, C. Nuñez-Diaz, R. Sánchez-Varo, M.V. Sánchez-Mico, L.Trujillo-Estrada, J.J. Fernández-Valenzuela, M. Vizueté, J.X. Comella, E. Galea, J. Vitorica, A. Gutiérrez.

Phagocytic clearance of presynaptic dystrophies by reactive astrocytes in Alzheimer's disease.

Glia 2018, 66:637-653.

3. I. Calleja-Yagüe, E. Sánchez-Mejías, A. Gómez-Arboledas, S. Xu, A. Gruart, K-P. Lam, J. López-Soriano, N. Llecha-Cano, E. Galea, J. Vitorica, A. Gutiérrez, J-M. Delgado-García, J.Huo, J. X Comella, L. Giménez-Llort. M-J. Perez-Garcia.

Fas apoptosis inhibitory molecule deficiency promotes seizure susceptibility, locomotor hyperexcitability, cognitive changes and social alterations.

Sotmès a revisió

4. E. Galea, L. Weinstock, R. Larramona, R. Masgrau, J. Clarimont, A. Lleó, A. Gutiérrez, J. Vitorica, L. Wood.

Identification of Astrocytic Gene Signatures in Alzheimer's disease by Bioinformatic Compartmentalization of Human Brain Transcriptomes into Cell-Specific Gene Clusters.

En preparació.

5. R. Larramona, M. Martínez, M. Vila, M. A. Gutierrez, J. Vitorica, JL García-Ariza, E. Galea, R. Masgrau.

Altered subcellular fluxes in ApoE4 astrocytes.

En preparació.