



**Fundació**  
La Marató de TV3

20è SIMPOSIUM  
Malalties neurodegeneratives



# **IMPACTE TERAPÈUTIC DE LIPOSOMES ACOBLATS A APOJ/CLUSTERIN EN MODELS EXPERIMENTALS DE MALALTIA D'ALZHEIMER**

**Mar Hernández-Guillamon**

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

## 1. Resum

**Antecedents.** Actualment no hi ha tractaments efectius per curar la malaltia d'Alzheimer (MA) o per prevenir-ne la progressió. Evidències genètiques i bioquímiques recents han posat de manifest el paper d'apolipoproteïna J/clusterin (ApoJ/Clu) com a molècula protectora en la MA, tot i que encara no se n'ha escatit la contribució molecular a la patologia.

**Objectiu.** Aquesta proposta té com a objectiu estudiar una nova estratègia terapèutica per reduir o prevenir l'acumulació de la  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ) en la MA basada en el tractament crònic amb partícules lipídiques acoblades a proteïna ApoJ recombinant humana (rApoJ).

**Metodologia.** Es pretén dissenyar, sintetitzar i caracteritzar nanopartícules lipídiques acoblades a proteïna rApoJ, requerides per als objectius següents. Es proposa provar l'efecte del tractament de nanopartícules lipídiques acoblades a rApoJ administrades per via intravenosa en un model experimental de MA (ratolins transgènics APP23). Després d'un tractament crònic, avaluarem els efectes sobre característiques neuropatològiques rellevants associades a la malaltia, com la càrrega A $\beta$  i la inflamació cerebral. A més, investigarem els mecanismes moleculars relacionats amb el tractament de nanopartícules lipídiques acoblades a rApoJ en diferents models *in vitro* basats en cèl·lules de cervell en cultiu.

**Resultats esperats.** Atenent a la capacitat de l'ApoJ/Clu d'unir-se i bloquejar l'agregació d'A $\beta$ , juntament amb el fet que potencialment pot arribar al cervell a través de la barrera hematoencefàlica (BHE), pensem que les noves partícules lipídiques acoblades a rApoJ poden servir com a esquer perifèric d'A $\beta$  i aconseguir una millora en el seu drenatge cerebral. Considerem que aquesta és una nova estratègia terapèutica per reduir la inflamació cerebral associada als depòsits d'A $\beta$  amb conseqüències prometedores per retardar la progressió de la neurodegeneració en la MA.

## 2. Resultats

**1) Producció d'ApoJ recombinant humana (rApoJ).** Com que el nostre objectiu principal era generar nanopartícules lipídiques que continguessin ApoJ, vam produir la proteïna recombinant a partir de cultius de cèl·lules humanes. La rApoJ sintetitzada va resultar altament pura i conservava la naturalesa heterodimèrica i la propensió a formar agregats d'alt pes molecular. Primer vam estudiar si la rApoJ era capaç de modular l'eliminació cerebral d'A $\beta$  a través de la BHE. Es va utilitzar un model basat en cèl·lules endotelials cerebrals primàries, cultivades en Transwells incubats amb Matrigel, i tractades amb pèptid A $\beta$ 40 fluorescent per fer un seguiment del seu trànsit a través de la BHE. Vam observar que el transport d'A $\beta$ 40 des del compartiment basolateral (corresponent al cervell) al compartiment apical (corresponent a la sang) s'incrementava quan es formava el complex A $\beta$ -rApoJ. També vam demostrar que rApoJ era capaç de creuar moderadament la BHE (des de la sang al cervell) a través d'un mecanisme en el qual estava implicada la família de proteïnes relacionades amb el receptor d'LDL (*lipoprotein receptor-related protein*, LRP). Aquests resultats i el protocol complet per a la producció de rApoJ es descriuen a la publicació Merino-Zamorano *et al.*, *Journal of Alzheimer's Disease* 2016.

**2) Producció i caracterització de nanopartícules lipídiques acoblades a rApoJ.** Vam sintetitzar i caracteritzar nanopartícules lipídiques formades amb rApoJ, les quals adoptaven estructures homòlogues a HDL (*high density lipoproteins*) reconstituïdes (rHDL-rApoJ). Aquestes nanopartícules es van preparar utilitzant el mètode de diàlisi de colat, basat en la disrupció del liposoma, seguit de la incubació amb rApoJ i la posterior eliminació de colat per diàlisi. Després de la síntesi, les nanopartícules rHDL-rApoJ van ser purificades per ultracentrifugació en gradient de densitat KBr. Les nanopartícules rHDL-rApoJ purificades es van caracteritzar per N-PAGE, dicromisme circular i microscòpia de transmissió electrònica (TEM). La preparació de partícules rHDL-rApoJ mostrava poblacions de partícules amb forma discoidal de dues mides diferents. Funcionalment, les partícules rHDL-rApoJ van mantenir la capacitat de prevenir la fibril·lació d'A $\beta$  i van permetre un increment en el transport revers de colesterol en macròfags en cultius a la corresponent proteïna rApoJ lliure. D'altra banda, nanopartícules rHDL-rApoJ fluorescents van ser administrades per via intravenosa a ratolins per tal de determinar-ne la distribució al llarg del temps mitjançant el sistema IVIS Xenogen®. Es va confirmar que les rHDL-rApoJ

s'acumulaven a la regió cranial, especialment en ratolins transgènics d'edat avançada que presentaven una alta càrrega d'A $\beta$  cerebral. Aquests resultats es van recollir a la publicació Fernandez-de Retana *et al.*, Scientific Reports 2017.

### **3) Estudi d'eficàcia del tractament amb nanopartícules lipídiques acoblades a rApoJ, en comparació amb proteïna rApoJ lliure, en ratolins transgènics**

**APP23.** El nostre principal objectiu era estudiar l'efecte d'un augment perifèric d'ApoJ en un model experimental de  $\beta$ -amiloïdosi cerebral. Amb aquest propòsit, ratolins transgènics APP23 de catorze mesos d'edat van ser sotmesos a un tractament crònic intravenós amb nanodiscs rHDL-rApoJ o rApoJ lliure durant un mes. La concentració i la distribució d'A $\beta$  al cervell, així com els nivells d'A $\beta$  en plasma i líquid cefalorraquidi (LCR), es van determinar després dels tractaments. També es van avaluar altres paràmetres associats a la patologia de la MA, com la pèrdua neuronal i la neuroinflamació. Després dels tractaments, vam determinar que ambdues teràpies, basades en l'increment d'ApoJ perifèrica, evitaven l'acumulació d'A $\beta$  en artèries cerebrals, induïen una disminució dels nivells totals d'A $\beta$ 42 insolubles en el cervell i una reducció de la pèrdua neuronal en hipocamp. El tractament perifèric amb rApoJ també va induir un augment dels nivells d'A $\beta$ 40 en LCR, sense modificar els nivells en plasma. En tots els paràmetres estudiats, la lipidació de rApoJ no millorava les propietats protectores de la proteïna lliure. Els efectes obtinguts després del tractament crònic amb rApoJ lliure van anar acompanyats d'un augment de l'expressió de marcadors fagocítics en cèl·lules de micròglia al voltant dels dipòsits d'A $\beta$  en parènquima. Finalment, malgrat l'activació d'aquest fenotip fagocític, els tractaments no van induir un estat neuroinflamatori global. De fet, els tractaments basats en rApoJ van ser capaços de reduir els nivells d'IL17 (*interleukin-17*) i KC (*keratinocyte chemoattractant chemokine*) en cervell. Aquests resultats s'han compilat en un manuscrit sotmès a revisió editorial a Alzheimer's Research & Therapy Journal (actualment en procés de revisió).

**4) Efecte d'ApoA-I-Milano (ApoA-I-M) en ratolins APP23.** Paral·lelament a les activitats directament relacionades amb la proposta original del projecte, durant aquest període també hem aprofundit en l'estudi d'una altra estratègia per reduir l'acumulació cerebral d'A $\beta$ , la qual es basa en la modificació d'altres apolipoproteïnes específiques amb activitat xaperona. En aquest sentit, l'apolipoproteïna A-I (ApoA-I), el principal component de les lipoproteïnes d'alta densitat (HDL), té un paper important en el

metabolisme del colesterol i mostra propietats protectores contra la malaltia cardiovascular. A més, s'ha descrit que l'ApoA-I s'uneix a l'A $\beta$  i n'evita l'agregació i toxicitat *in vitro*. Per al nostre estudi, vam seleccionar l'estratègia de modificar genèticament ApoA-I introduint una mutació natural (R173C), coneguda com ApoA-I-Milano (ApoA-I-M), per tal de testar el seu efecte en un model preclínic de MA. Prèviament, s'havia demostrat que ApoA-I-M era més eficaç funcionalment que la corresponent variant salvatge en diferents models experimentals de dany vascular (Ibanez *et al.*, 2012; Elshourbagy *et al.*, 2014). En aquest sentit, vam voler determinar el possible efecte de l'administració intravenosa crònica de rApoA-I-M en un model experimental de MA amb afectació cerebrovascular, com és el model de ratolins transgènics APP23. Després dels tractaments, vam concloure que els ratolins que havien rebut la proteïna rApoA-I-M presentaven nivells inferiors d'A $\beta$  en vasos cerebrals i parènquima, els quals anaven acompanyats d'una disminució significativa de la neuroinflamació. Aquests resultats van ser compilats a la publicació Fernandez-de Retana *et al.*, *Neurobiology of Aging* 2017.

### 3. Rellevància i implicacions futures

Malgrat l'alt impacte socioeconòmic de la MA, no existeix actualment cap teràpia efectiva modificadora de la malaltia. Per tant, trobar tractaments per evitar o reduir la progressió d'aquesta patologia és un objectiu primordial de la comunitat científica. La implicació determinant del genotip APOE en la MA posa en relleu com la regulació del metabolisme lípidic és crucial per a l'acumulació i aclariment cerebral d'A $\beta$ . En aquest sentit, ApoA-I i ApoJ/Clusterin, més enllà del seu paper principal en el metabolisme del colesterol perifèric com a components principals de lipoproteïnes (especialment HDL), també actuen com a xaperones naturals i es poden trobar unides a A $\beta$  en cervell i plasma. En d'aquest context, la nostra hipòtesi va ser que la modulació del perfil lipídic a través del tractament perifèric amb certes variants d'apolipoproteïnes específiques podia revertir o aturar certes conseqüències patològiques associades al dipòsit cerebral d'A $\beta$ . Així doncs, després dels estudis preclínic corresponents, els nostres resultats han permès demostrar com l'administració intravenosa d'ApoJ recombinant humana i d'una variant genètica d'ApoA-I són tractaments segurs i eficaços, en termes de reducció de nivells cerebrals d'A $\beta$  insoluble i neuroinflamació, en un model experimental de MA. Per tant, aquest estudi suggereix que les apolipoproteïnes

fisiològiques multifuncionals es poden considerar molècules terapèutiques en neuropatologies associades al dipòsit anòmal d'A $\beta$ , tot proposant l'aplicabilitat d'aquesta família d'apolipoproteïnes (amb funció xaperona) com a candidates per protegir el cervell en la MA. A més, les nostres dades reforcen la idea que les intervencions perifèriques ofereixen oportunitats no invasives per regular la càrrega A $\beta$  cerebral i la pèrdua neuronal. Finalment, els resultats generats d'aquest projecte destaquen el paper del metabolisme lipídic en la progressió de la malaltia i encoratgen la realització de nous estudis sobre la funcionalitat de les lipoproteïnes en pacients amb AD.

#### 4. Bibliografia científica generada

##### Publicacions

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. Desembre 2018. (sotmès a revisió)

5) Tesis doctoral: Sofia Fernández de Retana, UAB, Barcelona, 11 de juny de 2018.

Títol: *Estudi de variants estructurals d'ApoA-I i ApoJ recombinant com a estratègia terapèutica en el context de la beta-amiloïdosi cerebral.*

Directors: Mar Hernández Guillamon i Mary Cano-Sarabia

Nota: Excel·lent Cum Laude

### **Comunicacions**

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. Setembre 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. Setembre 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, Març 2017, Viena, Àustria. 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, Setembre 2018, Lilla, França.  
Presentació 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, Març 2019, Lisboa, Portugal. Presentació oral (acceptada)