



Fundació
La Marató de TV3

20è SIMPOSIUM
Malalties neurodegeneratives



IMPORTÀNCIA DE LA TRANSENyalITZACIÓ DE LA IL-6 EN UN RATOLÍ MODEL DE LA MALALTIA D'ALZHEIMER

Juan Hidalgo Pareja

Facultat de Biociències UAB

1. Resum

1. **La malaltia d'Alzheimer (AD) és una de les malalties neurodegeneratives més comunes en humans d'edat avançada.** Les principals característiques d'aquesta malaltia són la presència extracel·lular de plaques amiloides i la presència intracel·lular de cabdells neurofibril·lars. Les plaques amiloides i l'angiopatia amiloide són conseqüència d'agregats de pèptids beta-amiloide ($A\beta$) formats a partir de la proteïna precursora amiloide (APP) al parènquima del cervell i les regions perivasculars, respectivament. Aquests fets deriven en una prominent neuroinflamació, la qual, eventualment, reforçaria la malaltia. La interleucina-6 (IL-6) és una de les citocines afectades en l'AD, i s'ha vist que exerceix molts dels seus efectes a través de la transsenyalització.

La nostra hipòtesi proposa que un inhibidor específic de la transsenyalització, la proteïna humana sgp130-Fc, tindria un impacte significatiu en la progressió de l'AD.

L'objectiu del nostre projecte és caracteritzar la progressió de l'AD en un model animal àmpliament utilitzat, el ratolí Tg2576, quan simultàniament coprodueix l'inhibidor específic de la transsenyalització, la proteïna sgp130-Fc, produïda específicament en astròcits. Aquest ratolí bigènic (Tg2576/GFAP-sgp130) serà comparat amb la resta de cadellada, animals Tg2576, GFAP-sgp130 i WT.

A més dels objectius del projecte original, i com a conseqüència de la petició dels revisors, vam incloure l'estudi d'un altre ratolí model d'AD, el triple transgènic 3xTg-AD, fent servir una estratègia similar a la del monogènic (Tg2576).

2. Animals

S'utilitzen dues soques de ratolins models de AD, el Tg2576 (o APP_{Swe}, portadors de la mutació sueca K670N/M671L, provinents de Taconic Europe A/S [Ry, Denmark]) i el 3xTgAD, del laboratori de LaFerla (via L. Giménez-Llort, de la UAB); el 3xTgAD és un ratolí triple transgènic portador d'APP_{Swe}, PS1_{M146V} i tau_{P301L}. D'altra banda, els ratolins GFAP-sgp130 són cedits pel Dr. S. Rose-John (Christian-Albrechts-University of Kiel, Germany).

Aquests ratolins s'encreuaran de forma adequada per assolir homogeneïtat del fons genètic. Com que s'ha descrit que els animals Tg2576 presenten una mortalitat molt elevada, caldrà establir grups amb un nombre d'animals elevat. És rellevant deixar clar que es faran tongades successives d'encreuaments, ja que no es poden fer totes en paral·lel.

Després del deslletament (3 setmanes d'edat), els animals es separen per sexe i s'identifiquen, també se'n talla un tros de cua per fer-ne el genotipatge mitjançant PCR. A més, durant tota la vida de l'animal en controlem el pes i la mortalitat, i mesurem la glucosa en el moment del deslletament.

Anàlisis conductuals

Es fa la caracterització conductual del model mitjançant una bateria de tests a dues edats diferents, abans i després de l'aparició de plaques amiloides. Al Tg2576 les plaques apareixen sobre els 12 mesos d'edat; així doncs, els tests es realitzaran sobre el 5-7 mesos i als 13-14 mesos. Abans de la realització dels tests, els ratolins s'habituen a la manipulació i s'aclimaten a la sala. La bateria de tests inclou: *Open-field* (locomoció), *Hole-board* (exploració), *Elevated-plus maze* (ansietat) i *Morris water maze* (memòria espacial). L'estudi del 3xTgAD serà similar al del model monogènic d'AD.

Anàlisis neuropatològiques

Els dos models d'AD estava previst que fossin eutanasiats als 14-15 mesos d'edat (vegeu més avall), i si fos possible (depenent de l'èxit dels encreuaments i la mortalitat), un grup d'animals també seria eutanasiat als 5-6 mesos. Els cervells són extrets i disseccionats, l'hemisferi dret es dissectiona en còrtex, hipocamp i resta, mentre que l'hemisferi esquerre es submergeix en paraformaldehid (PFA) 4% durant 24 h, després es renta en PBS 1x i es conserva en etanol 70% fins a la inclusió en parafina. Les tècniques que s'aplicaran seran:

- *Western blot*, per mesurar APP, A β , així com altres fragments proteolítics de la proteïna precursora.
- *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), per determinar la quantitat d'A β ₁₋₄₀ i A β ₁₋₄₂.

- Immunohistoquímica, per determinar la càrrega de plaques amiloides, respostes glials al voltant d'aquestes, i fosforilació de tau.

3. Primer any: obtenció de les colònies de ratolins (Tg2576, 3xTgAD i GFAP-sgp130), i establiment dels primers encreuaments.

4. Segon any: genotipatge dels animals, seguiment de les diferents colònies (control de la mortalitat i el pes...). Primera bateria de tests conductuals als 5-7 mesos i, si tot va bé, segona bateria als 13-14 mesos d'alguna tongada de ratolins.

Tercer any: últims tests conductuals a les darreres tongades de ratolins. L'eutanàsia dels animals estava prevista als 14 mesos d'edat per a les anàlisis neuropatològiques, però hem modificat els temps d'eutanàsia de la soca 3xTgAD a >20 mesos d'edat, perquè el desenvolupament del fenotip (producció d'A β) va anar molt més lent del previst. En el cas del model Tg2576, hem decidit també allargar el temps d'eutanàsia fins als ~18 mesos per consolidar el fenotip.

2. Resultats

Control del pes, glucèmia i mortalitat

Tant en el model Tg2576 com en el 3xTg-AD (a edats més avançades) s'observa una pèrdua de pes significativa. Aquest efecte no es reverteix amb la inhibició de la transsenyalització d'IL-6 amb sgp130.

S'ha mesurat la glucèmia al moment del deslletament (3 setmanes). Els ratolins Tg2576 presenten un nivell de glucosa inferior respecte dels animals controls. Aquest efecte no es reverteix amb la inhibició de la transsenyalització d'IL-6. En el model 3xTg-AD no hi ha diferències significatives dels nivells de glucosa.

La mortalitat, tal com esperàvem, era acusada en els animals Tg2576. En aquest cas, però, la inhibició de la transsenyalització d'IL-6 va revertir significativament la mortalitat en ambdós sexes. Els animals 3xTg-AD presenten un increment de mortalitat respecte dels controls només a edats avançades (aproximadament 20 mesos), i molt menor en comparació amb el model Tg2576. La inhibició de la

transsenyalització d'IL-6 té un efecte dependent de sexe, perjudicial en mascles i beneficiós en femelles.

Anàlisis conductuals

En la mesura que va ser possible vam fer anàlisis conductuals abans i després de l'aparició de plaques amiloïdes.

Abans de l'aparició de les plaques amiloïdes

Els resultats previs o preliminars van suggerir estudiar els animals als 5-6 i 9-11 mesos d'edat en el model Tg2576 i 3xTg-AD, respectivament. S'ha seguit l'ordre següent: Open-field (locomoció), Hole-Board (exploració), NORT (memòria), Elevated-plus Maze (ansietat) i Morris Water Maze (memòria espacial).

En el model Tg2576 els efectes són diferents segons el sexe, més acusats en femelles. Les femelles Tg2576 tenen més activitat locomotora i exploradora que les controls, i menys ansietat. La inhibició de la transsenyalització d'IL-6 amb sgp130 reverteix l'efecte en l'exploració i l'ansietat. En el cas dels mascles també veiem que els animals Tg2576 són menys ansiosos que els controls respectius, però no veiem efecte del bloqueig de la transsenyalització d'IL-6. Pel que fa a la memòria, es veuen dèficits de memòria espacial en els animals Tg2576, però la inhibició de la transsenyalització d'IL-6 no té efecte sobre aquest paràmetre. Els resultats amb el NORT no van ser concloents.

En el model 3xTg-AD, els efectes sobre la conducta no són tan marcats com en el model Tg2576, probablement a causa de la lenta progressió de la malaltia. Tot i així, observem que els animals 3xTg-AD exploren més que els controls, i en el cas de les femelles, tenen menys ansietat. No s'observa efecte de la inhibició de la transsenyalització d'IL-6 en aquests paràmetres, però sí que hi ha un petit efecte en els mascles, tot disminuint l'ansietat independentment de la presència del transgens AD. Pel que fa a la memòria espacial, observem que els animals 3xTg-AD presenten una velocitat de natació superior que els controls respectius. D'altra banda, en femelles, la inhibició de la transsenyalització d'IL-6 incrementa la latència en arribar a la plataforma; fet que suggereix un detriment en l'aprenentatge espacial. Els resultats amb el NORT no van ser concloents.

Després de l'aparició de les plaques amiloides

Els resultats previs van suggerir estudiar els animals als 15-16 mesos d'edat en el model Tg2576, i descartar fer més estudis conductuals en el model 3xTg-AD, atenent a les elevades edats per contemplar, el dèbil fenotip en animals heterozigots i el temps disponible.

El ratolins Tg2576 tenen més activitat locomotora que els controls; aquest efecte és revertit en mascles amb la inhibició de la transsenyalització d'IL-6, però no en femelles, entre les quals de fet hi ha un petit increment independentment del genotip Tg2576. També mostren una tendència a més activitat exploratòria, tot i que aquest efecte és significatiu només en femelles, però en aquest cas no observem efecte de la inhibició de la transsenyalització d'IL-6. L'ansietat està reduïda en els animals Tg2576 en comparació amb els controls, i no hi ha efecte de la inhibició de la transsenyalització. Finalment, els animals Tg2576 presenten dèficits en memòria i aprenentatge que no són afectats per la inhibició de la transsenyalització d'IL-6.

Anàlisis neuropatològiques

Es realitzen a partir de mostres de còrtex i hipocamp de ratolins eutanasiats a diferents edats, per tal de monitoritzar la progressió de la malaltia. S'analitza la cascada amiloide (APP, A β i altres fragments provinents de la proteòlisis de la proteïna precursora) mitjançant *Western blot*, quantitat d'A β ₄₀ i A β ₄₂ mitjançant ELISA, així com també neuroinflamació i càrrega de plaques amiloides mitjançant immunohistoquímica.

Abans de l'aparició de les plaques amiloides

En el model Tg2576 als 10-11 mesos d'edat detectem presència d'APP precursora per WB, també detectem A β ₄₀ mitjançant ELISA. No s'ha trobat un efecte clar amb la inhibició de la transsenyalització d'IL-6. En el model 3xTg-AD als 5-6 i 10-11 mesos d'edat els animals presenten proteïna APP precursora, però no hi ha detecció d'A β . Observem un increment d'APP precursora en els animals de 10-11 mesos respecte dels de 5-6 mesos. No observem efecte de la inhibició de la transsenyalització d'IL-6.

Després de l'aparició de les plaques amiloides

En el model Tg2576 als 16-17 mesos d'edat, els resultats d'ELISA indiquen que no hi ha efecte de la inhibició de la transsenyalització en la quantitat d'A β ₄₀ i A β ₄₂. Pel que fa a la quantitat de plaques mesurades per immunohistoquímica sí que observem una

disminució de plaques en les femelles causada per la inhibició de la transsenyalització d'IL-6. Les femelles Tg2576 també presenten una major resposta glial mesurada per immunohistoquímica, però en aquest cas no observem efecte de la inhibició de la transsenyalització d'IL-6. Estem en procés d'anàlisi del transcriptoma (per *microarrays*) en l'hipocamp.

En el model 3xTg-AD als 20-28 mesos d'edat, observem que la patologia avança més lentament del que esperàvem. La quantitat d'A β ₄₀ i A β ₄₂ mesurada per ELISA és molt baixa en comparació amb el model Tg2576. A més, quasi no s'observen plaques amiloides per immunohistoquímica, ni inflamació associada a aquestes. La inhibició de la transsenyalització d'IL-6 no té efecte sobre aquests paràmetres. Els resultats d'immunohistoquímica de tau indiquen una tinció precària que no permet resultats concloents.

Anàlisi de l'efecte de l'obesitat induïda per dietes riques en greix en el 3xTg-AD

Com que els animals 3xTg-AD presentaven un fenotip retardat, es va decidir mirar els efectes de l'obesitat induïda en aquest model. Un grup d'animals dels dos sexes van ser exposats a una dieta rica en greixos durant 10 setmanes; es van mesurar alguns paràmetres abans i després de l'exposició per tal de fer la comparativa. Els paràmetres analitzats van ser:

- Pes corporal i ingesta: els animals 3xTg-AD presenten un pes disminuït respecte dels controls. A més, presenten una ingesta incrementada, tot suggerint un fenotip hipermetabòlic. La inhibició de la transsenyalització accentua aquest fenotip en femelles.
- Resposta al dejuni: després d'un dejuni, els animals 3xTg-AD perden pes més ràpidament que els controls. Un cop tornen a alimentar-se, els animals 3xTg-AD presenten hiperfàgia, que deriva a una recuperació més ràpida del pes perdut prèviament. El bloqueig de la transsenyalització d'IL-6 inhibeix la recuperació del pes, especialment en mascles.

- Temperatura: els animals 3xTg-AD presenten una temperatura corporal més elevada que els seus respectius controls. Aquest efecte és més marcat en mascles que en femelles, i no es veu afectat pel bloqueig de la transsenyalització d'IL-6.
- Sensibilitat a la insulina i tolerància a la glucosa (mitjançant una ITT i OGTT): els animals 3xTg-AD presenten una hipersensibilitat a la insulina, que es reverteix només en mascles per la inhibició de la transsenyalització d'IL-6 després de l'exposició a una dieta rica en greixos. Abans de la dieta grassa observem que els animals 3xTg-AD tenen més tolerància a la glucosa, disminuïda en les femelles GFAP-sgp130; un cop exposats a la dieta grassa, observem que les femelles 3xTg-AD disminueixen la tolerància observada prèviament.
- Hormones i metabòlits en sèrum: els animals 3xTg-AD presentaven un descens en insulina, leptina i colesterol. A més, en femelles la inhibició de la transsenyalització d'IL-6 disminueix els nivells de leptina encara més.
- Neuropeptids hipotalàmics: veiem una expressió d'IL-6 incrementada en els mascles 3xTg-AD, efecte que es rescata per la inhibició de la transsenyalització d'IL-6.

3. Rellevància i possibles implicacions futures

Col·lectivament, els resultats d'aquest projecte proporcionen evidència que la transsenyalització d'IL-6 té un paper al cervell de ratolins models de la malaltia d'Alzheimer (AD). L'administració de la forma soluble del coreceptor gp130 (sgp130), que ja es fa servir en altres patologies inflamatòries, podria ser una estratègia terapèutica en humans amb AD, i serien les dones el col·lectiu potencialment més sensible. Els resultats també suggereixen que els tractaments haurien de ser incorporats en fases inicials de la malaltia.

4. Bibliografia científica generada

Publicacions

Manso Y, Comes G, López-Ramos JC, Belfiore M, Molinero A, Giralt M, Carrasco J, Adlard PA, Bush AI, Delgado-García JM, Hidalgo J.

Overexpression of metallothionein-1 modulates the phenotype of the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease.

J. Alzheimer's Dis. **51** (2016) 81-95.

Comes G, Manso Y, Escrig A, Fernandez-Gayol O, Sanchis P, Molinero A, Giralt M, Carrasco J, Hidalgo J.

Influence of transgenic metallothionein-1 on gliosis, CA1 neuronal loss and brain metal levels of the Tg2576 mouse model of Alzheimer disease.

Int J Mol Sci. 18 (2017) 251.

Fernández-Gayol O, Sanchis P, Aguilar K, Navarro A, Comes G, Molinero A, Giralt M, Hidalgo J.

Different responses to a high-fat diet in IL-6 conditional knock-out mice driven by constitutive GFAP-Cre and Synapsin 1-Cre expression.

Neuroendocrinology (2019) doi: 10.1159/000496845

Publicació en revisió

Escrig A, Molinero A, Méndez B, Sanchis P, Fernández-Gayol O, Montilla A, Comes G, Giralt M, Giménez-Llort L, Becker-Paully C, Rose-John S, Hidalgo J.

IL-6 trans-signaling in the brain influences the behavioral and physio-pathological phenotype of the 3xTgAD mouse model of Alzheimer's disease.

Brain Behav. Immun.

Publicació en preparació

Escrig *et al.*

IL-6 trans-signaling in the brain influences the behavioral and physio-pathological phenotype of the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease.