



Fundació
La Marató de TV3

20è SIMPOSIUM
Malalties neurodegeneratives



EL PAPER DE LA REELINA EN LA CRUÏLLA DELS MECANISMES MOLECULARS DE LA MALALTIA D'ALZHEIMER: TAUPATIA, TOXICITAT DE L'AMILOIDE I TRANSMISSIBILITAT

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. Resum del projecte

La proteïna extracel·lular reelina estimula la plasticitat sinàptica i actua com a regulador homeostàtic del funcionament correcte del cervell. Alhora, la reelina i la seva via de senyalització estan directament involucrades en els mecanismes moleculars de la malaltia d'Alzheimer, en què tenen un paper beneficiós en el context de la patologia mitjançant un mecanisme dual: d'una banda, la reelina estimula el funcionament del cervell, ja que enforteix el sistema davant la pèrdua de funció; d'altra banda, la reelina contraresta a escala molecular les característiques pròpies de la malaltia. En concret, la reelina activa vies de senyalització que inhibeixen la fosforilació de la proteïna tau, molècula protagonista d'una de les dues característiques principals de la malaltia. Addicionalment, la reelina també modula l'altra característica principal de la malaltia unint-se a espècies d'amiloide tot reduint-ne la toxicitat, retardant la formació de fibres i produint alhora el rescat dels dèficits cognitius lligats a l'amiloïdosi en un model de ratolí transgènic. Globalment, aquest conjunt de dades situa la proteïna reelina a la cruïlla entre els processos patològics de la malaltia d'Alzheimer i els mecanismes protectors, fet que encoratja la consideració de la mateixa reelina i la seva via de senyalització com a dianes terapèutiques per combatre la malaltia d'Alzheimer.

L'objectiu principal del projecte ha estat investigar el paper detallat que té la proteïna reelina en els mecanismes involucrats en l'evolució de la malaltia d'Alzheimer, focalitzant l'estudi en la patologia de la tau, l'amiloïdosi i la transmissibilitat. El projecte es va dissenyar per clarificar si la sobreexpressió de reelina rescata la simptomatologia d'Alzheimer en models de tau (TgRln/VLW i TgRln/GSK-3 β) i si es produeix una acceleració de l'evolució de la malaltia d'Alzheimer en una soca de ratolins *knock-out* condicional de reelina (flRln/Cre/J20). Per últim, a través de l'estudi de la participació de la reelina en la transmissibilitat de l'amiloïdosi en models de malaltia d'Alzheimer i sobreexpressió de reelina (TgRln/J20), el projecte pretenia avaluar de quina manera la interacció de la reelina amb espècies d'amiloide poden modular la propagació de l'agregació d'amiloide i la seves propietats de transmissibilitat, en especial quan animals model de la malaltia són sotmesos a inducció experimental de l'amiloïdosi.

Els resultats d'aquest projecte permeten concloure que la reelina és capaç de reduir *in vitro* la inducció dels indicadors de taupatia en cultius neuronals tractats amb espècies tòxiques d'amiloide. Alhora, la sobreexpressió de reelina en models de taupatia demostra que la protecció davant aquesta patologia també es produeix en models *in vivo*. Així, la reelina redueix fenotips lligats a la patologia de tau a escala bioquímica i histopatològica, i cal destacar que també ho fa a escala electrofisiològica i comportamental. En el desenvolupament d'aquest projecte també hem estudiat una altra manifestació de la malaltia, l'amiloïdosi, en situacions experimentals específiques que inclouen la depleció de reelina i la inducció de l'amiloïdosi. Vam iniciar l'avaluació de la depleció de reelina en cervell adult a través de la caracterització comportamental, histològica i electrofisiològica, particularment quan es creuen amb el model de ratolí J20. A més, el paper de la reelina en la transmissibilitat de l'amiloïdosi es va estudiar majoritàriament *in vivo* en el model de sobreexpressió de reelina mitjançant experiments d'injecció intracerebral d'extractes de cervell. Els resultats indiquen que la presència incrementada de reelina comporta una reducció de la propagació de l'amiloïdosi en el cervell dels animals d'experimentació durant un determinat període temporal en temps curts postinducció.

El conjunt de dades generades en el projecte indica que la reelina actua de manera beneficiosa minimitzant tant la malaltia de tau com l'amiloïdosi induïda, i confirma així la hipòtesi segons la qual la proteïna reelina té un paper destacat en diversos mecanismes patològics associats a la malaltia d'Alzheimer. Podem concloure que cal considerar la proteïna reelina com a diana per al desenvolupament de noves teràpies orientades a combatre la malaltia d'Alzheimer.

2. Resultats

Un primer objectiu destacat del projecte fou l'estudi de l'efecte de la sobreexpressió de la reelina en els nivells de fosforilació de tau en dos models *in vivo* de taupatia (VLW i GSK-3 β). La sobreexpressió de reelina en aquests models (TgRln/VLW i TgRln/GSK-3 β) va produir una reducció de la fosforilació de tau, sense alterar els nivells totals d'aquesta proteïna. Les dades van demostrar una recuperació dels nivells de tau fosforilada, fet que

podria modular la progressió del fenotip propi de la malaltia d'Alzheimer en aquests animals. Aquests resultats es van complementar amb un conjunt d'experiments *in vitro* per investigar la participació de la reelina en la recuperació de l'alteració de la distribució de les proteïnes de citoesquelet tau i neurofilament cap al compartiment somatodendrític. Particularment, la reelina va ser capaç de modular la proporció de neurones que pateixen aquesta translocació de neurofilaments, així com modular també la distribució fina de la proteïna tau al llarg de les dendrites translocades, fet que va produir una acumulació més baixa d'aquesta proteïna en la part proximal de les dendrites. Aquests resultats es van complementar amb experiments *in vivo* en els models de ratolí de taupatia mitjançant l'estudi de la presència de senyal somatodendrític de proteïna tau fosforilada en epítops vinculats a la malaltia d'Alzheimer. A més a més, i per caracteritzar amb més detall els ratolins TgRln/VLW, es van estudiar les respostes d'aquests animals des d'una perspectiva electrofisiològica en el circuit intrínsec de l'hipocamp. Els ratolins VLW van mostrar unes propietats sinàptiques basals i en plasticitat a curt termini comparables a les dels animals control, però van mostrar dèficits importants en experiments de potenciació a llarg termini (LTP, acrònim de *long-term potentiation*). És important destacar que aquests dèficits en l'LTP es revertien per sobreexpressió de reelina en els animals TgRln/VLW. De forma comparable, quan els animals es van estudiar des d'una perspectiva comportamental, es va observar que els ratolins VLW no mostraven dèficits motors però sí que presentaven dèficits significatius en processos de memòria; novament aquests dèficits es trobaven recuperats per sobreexpressió de la reelina. En conjunt, les dades recollides indiquen la rellevància fisiològica de la reducció de la fosforilació produïda per la reelina i mostren que la sobreexpressió de reelina contraresta les anormalitats dels models animals de taupatia a escala histològica, electrofisiològica i comportamental.

El segon objectiu principal del projecte estava relacionat amb l'estudi de l'amiloïdosi en una diversitat de models experimentals sotmesos a alteracions en els nivells de reelina. Amb aquest propòsit, es van utilitzar animals de la soca J20 que sobreexpressen la forma mutada de la proteïna precursora d'amiloide humana per reproduir el fenotip d'amiloïdosi de la malaltia d'Alzheimer, amb acumulació de plaques senils en els animals. Mitjançant el creuament d'aquests animals amb el model condicional *knock-out* de reelina (flRln/Cre) vam obtenir animals flRln/Cre/J20, dels quals en primer lloc vam analitzar l'acumulació de

dipòsits a edats primerenques per avaluar l'acceleració potencial de l'aparició de plaques amiloides en comparació amb els ratolins J20. En paral·lel, les implicacions electrofisiològiques de la depleció de reelina es van estudiar en animals fIRIn/Cre mitjançant la caracterització basal de la connexió CA3-CA1, així com les respostes d'aquesta connexió a la inducció d'LTP. Els resultats indiquen que la depleció de reelina en edats postnatsals comporten un fenotip complex a escala electrofisiològica i histològica, en el qual l'acumulació aberrant d'amiloide no es produeix de manera massiva a temps curts després de la depleció de reelina. Les dades obtingudes van permetre dissenyar experiments amb durades més llargues de la depleció de reelina per tal d'analitzar millor no únicament l'inici de l'acumulació de dipòsits d'amiloide sinó sobretot la seva propagació pel cervell, fet que enllaça amb l'últim gran objectiu del projecte vinculat amb la transmissibilitat de l'amiloïdosi.

Finalment, el projecte pretenia clarificar la possible participació de la reelina en la propagació de dipòsits d'amiloide per tot el cervell durant l'evolució de la malaltia d'Alzheimer. Per estudiar aquest procés, vam modelar experimentalment la inducció d'amiloïdosi en els nostres animals model. Es va iniciar l'estudi amb una sèrie d'experiments preliminars que inclouen la caracterització electrofisiològica i comportamental del model TgRIn/J20; el modelatge *in vitro* de la inducció d'agregació d'amiloide, i l'optimització de la inducció experimental de l'amiloïdosi *in vivo* en el model de ratolí de J20. Els temps adequats per a la implementació de l'amiloïdosi induïda experimental van ser de 8 setmanes per als animals de 4-6 mesos d'edat i d'un mínim de 12 setmanes per als animals de 2 mesos d'edat, i vam observar que a partir de les 16 setmanes també es produïa amiloïdosi en regions allunyades del punt d'injecció com són l'escorça entorínica i l'hipocamp contralateral. Estudis extensius d'amiloïdosi induïda en el context de sobreexpressió de reelina van indicar que aquesta proteïna és capaç de reduir la transmissibilitat tant a escala local com en regions allunyades del punt d'injecció per un període temporal concret durant etapes inicials d'acumulació de dipòsits d'amiloide en cadascuna de les àrees analitzades.

3. Rellevància i implicacions futures

En conjunt, els resultats sorgits del projecte complementen les dades ja conegudes que atribueixen a la reelina un efecte beneficiós en el marc de la patologia d'Alzheimer i atorguen a la via de senyalització de reelina un paper de regulador negatiu de la progressió de la malaltia atès que ocasiona una recessió de les patologies de tau i d'amiloide. A partir dels resultats del projecte, proposem que l'activació de la via de reelina representa una aproximació terapèutica útil per reduir alguns dels mecanismes patològics associats a la taupatia i l'amiloïdosi tant per a la malaltia d'Alzheimer com, potencialment, per a altres proteïnopaties. Tenint en compte aquestes dades del projecte, podem concloure que la reelina intervé en positiu contra diversos processos patològics vinculats a l'amiloïdosi (propagació d'agregats d'amiloide, translocació de tau induïda per espècies amiloïdes) i contra diversos processos patològics associats a la taupatia (distribució aberrant de tau fosforilada, dèficits sinàptics, pèrdua de memòria a temps llargs). Així doncs, el paper de la reelina com a modulador central dels mecanismes patològics associats tant a amiloide com a tau en malalties neurodegeneratives com l'Alzheimer requereix més protagonisme en el desenvolupament futur de noves teràpies.

4. Bibliografia

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

Reelin reverts biochemical, physiological and cognitive alterations in mouse models of tauopathy.

Progress in Neurobiology (en segona revisió).

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 preparació).

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 elaboració, 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 elaboració, revista no especificada.

Responsables de la correspondència.