

5 Decembrie 2023

Descrierea științifică cu punerea în evidență a rezultatelor etapei anuale și gradul de realizare a obiectivelor

Boala Alzheimer (BA) este cea mai frecventă formă de demență, pentru care nu există tratament. Elementul cheie în patologia bolii Alzheimer este depunerea de β -amiloid ($A\beta$) în pereții capilarelor și arterelor determinând angiopatia amiloidă cerebrală (AAC). Observațiile clinice și studiile experimentale demonstrează că AAC rezultă prin eșecul eliminării $A\beta$ de-a lungul pereților capilarelor și arterelor. Drenajul fluidului interstițial și al $A\beta$ are loc de-a lungul membranelor bazale ale capilarelor și arterelor sub denumirea de drenaj intramural periarterial (IPAD – intramural periarterial drainage), care devine inefficient odată cu creșterea vârstei și cu posesia genotipului apolipoproteinei E4 având ca rezultat AAC (Fig 1).

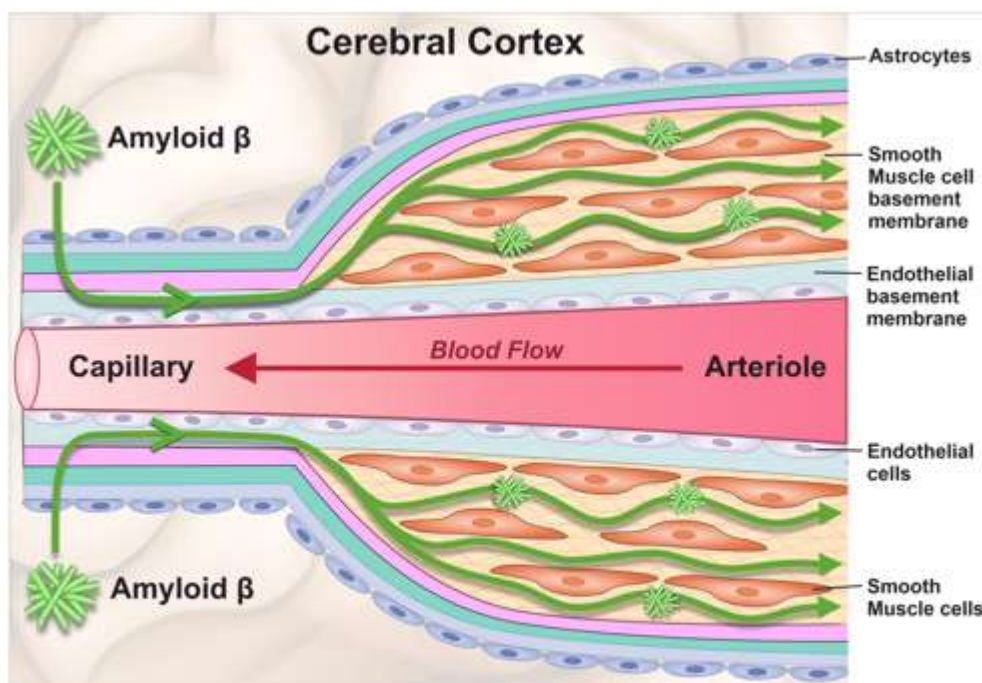


Figure 1: Intramural Periarterial Drainage (IPAD) occurs along the basement membranes of cerebral capillaries and the surrounding vascular smooth muscle cells of cerebral arteries. $A\beta$ is eliminated from the brain via IPAD.

Clusterina (apolipoproteina J) este o glicoproteină heterodimerică. Studiile genetice au demonstrat asocierea acesteia atât cu plăcile corticale, cât și cu AAC sporadică legată de vârstă.

Studiile experimentale au demonstrat că Clusterina este implicată în eliminarea A β 42 de către receptorul 2 al lipoproteinelor cu densitate scăzută. Clusterina este sechestrată împreună cu A β în AAC și în leziunile de substanță albă asociate cu arteriopatia cerebrală autosomal dominantă cu leucoencefalie (CADASIL). Studiile experimentale arată că, în absența Clusterinei, AAC se agravează la modelul de șoarece cu BA. Datele indică o posibilă implicare a Clusterinei în IPAD și în patogeneza AAC.

Scopul studiului

Scopul principal al acestui studiu este de a demonstra că, Clusterina este o moleculă cheie ce îmbunătățește IPAD. Printr-o colaborare nouă între un biochimist din New South Wales, Australia, care ne-a oferit Clusterina, un neuroanatomist clinic de la Universitatea din Southampton, Marea Britanie, care a identificat și descris în detaliu mecanismul de IPAD, ipotezele care urmează să fie testate în cadrul Universității de Medicină, Farmacie, Știință și Tehnologie „George Emil Palade” Târgu Mureș folosind tehnici de ultimă generație in vivo și microscopie sunt:

1. Absența Clusterinei are ca rezultat eșecul IPAD-ului pentru A β la șoarecii Clu-/-;
2. Clusterina recombinantă previne/ameliorează depunerea de A β în modelul APP/PS1 al bolii Alzheimer.

Am testat ipoteza prin care Clusterina facilitează IPAD-ul și poate întârzia/preveni AAC și BA.

Obiectivele realizate in totalitate

1. Implementarea proiectului. Înființarea coloniilor de șoareci. Sinteza Clusterinei.
2. Genotiparea animalelor transgenice pentru studiu.
3. Studii pilot de injecții intracerebrale.
4. Injecția de clusterină și A β intrahipocampal pentru a testa IPAD-ul.
5. Imunocitochimie pentru collagen IV, actina de celule musculare netede.
6. Microscopie confocala si obtinerea de imagini pentru analiza.
7. Tratatamentul soarecilor tineri si batrani cu clusterina.
8. Imunohistochimie pentru amiloid a soarecilor transgenici tratati si lotului control.
9. Microscopie și obținerea de imagini pentru analiza severității amiloidozei în șoarecii transgenici tratați/netratați.

Obiectiv realizat partial: analiza statistica IPAD si amiloidoza

Activități specifice pentru fiecare obiectiv

1. Rezumatul executiv pentru Implementarea proiectului

1.1. O analiză amănunțită a aspectelor clinice, a patogenezei BA și AAC, IPAD și Clusterinei.

1.2. Cercetarea celor mai bune metode de studiu

Rezultat: 1 studiu care analizează IPAD-ul folosind metode in vitro, care a dus la un manuscris trimis la Scientific Reports: **The pattern of basement membrane proteins in cerebrovascular smooth muscle cells changes after exposure to amyloid beta in an ageing model. Implications for Cerebral Amyloid Angiopathy Fig 2- (Modelul proteinelor membranei bazale în celulele musculare netede cerebrovasculare se modifică după expunerea la beta amiloid într-un model de îmbătrânire. Implicații pentru angiopatia amiloidă cerebrală)**

Abby Keable^{1*} , Jennifer M Dewing^{1*} , Alexandru Laslo² , Laura Chinezu² , Adrian Ivanescu² , Raj Kalaria³ Mark Slevin² , Roxana O Carare^{1,2}

¹Facultatea de Medicină, Universitatea din Southampton, Marea Britanie

²Institutul Academic Britanico-Român de Neuroștiințe (BRAIN), Universitatea de Medicină, Farmacie, Știință și Tehnologie "G.E.Palade" Târgu-Mureș, România

³Universitatea Newcastle, Marea Britanie

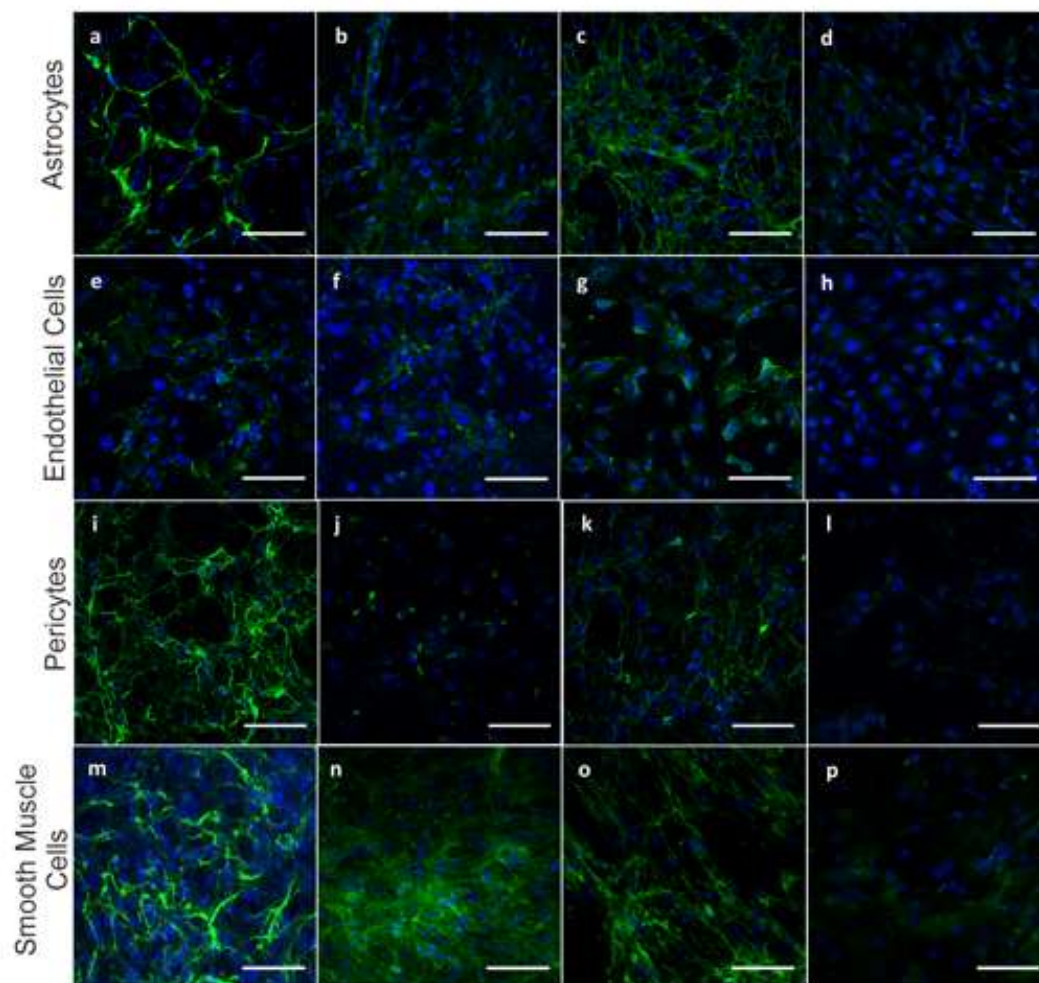


Figure 2 Basement membrane immunostaining of cerebrovascular cells in culture

HA (a,b,c,d), hCMEC/D3 (e,f,g,h), HP (i,j,k,l) and HVSMC (m,n,o,p) were grown in culture for 72 hours and immunostained for the basement membrane proteins collagen IV (a,e,i,m), laminin (b,f,j,n), fibronectin (c,g,k,o) and perlecan (d,h,l,p) shown in green and counterstained with the nuclear stain DAPI shown in blue. Scale bar = 100 μ m

1.3. Protocoale de lucru și evaluări ale riscurilor pentru studiul experimental

Rezultat: **1 protocol** de lucru cu IPAD, 1 protocol de reproducere a șoarecilor transgenici, evaluarea riscurilor pentru lucrul cu șoarecii, prelucrarea și secționarea pieselor de creier, precum și evaluarea imunohistochimică a acestora.

2. Studii pilot: Stabilirea modelului experimental:

2.1. Crearea, creșterea, înmulțirea și îmbătrânirea modelelor experimentale de șoareci

Rezultat: Șoareci transgenici Clusterin knock-out și modelul APP/PS1 de boală Alzheimer de 6 luni și 12 luni. Șoarecii au fost crescuți și transportați de la clinica Mayo la UMFST Târgu Mureș în noiembrie 2022 și au fost înmulțiți și genotipați pentru experimentele efectuate în 2023.

Genotipare APP/PS1

Izolarea ADN-ului s-a realizat din fragment de țesut provenit din codița sau urechiușa șoarecelui, utilizându-se kitul PureLink Genomic DNA Mini Kit (ThermoFisher Scientific, USA).

Pentru genotipare s-a utilizat o reacție de polimerizare în lanț (PCR) de tip multiplex pentru gena APP respectiv pentru gena PSEN1, primerii utilizați fiind:

Primer sens PSEN1_Fw_AAT AGA GAA CGG CAG GAG CA

Primer antisens PSEN1_Rev_GCC ATG AGG GCA CTA ATC AT

Primer sens control_PSEN1_Fw_CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT

Primer antisens control_Rev_GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C

Primer sens APP_Fw_AGG ACT GAC CAC TCG ACC AG

Primer antisens APP_Rev_CGG GGG TCT AGT TCT GCA T

Primer sens control APP_Fw_CAA ATG TTG CTT GTC TGG TG

Primer antisens control APP_Rev_GTC AGT CGA GTG CAC AGT TT

Pentru vizualizarea produsilor de amplificare s-a realizat o electroforeză în gel de agaroză 2%, folosind agaroză TopVision (Thermo Scientific, USA).

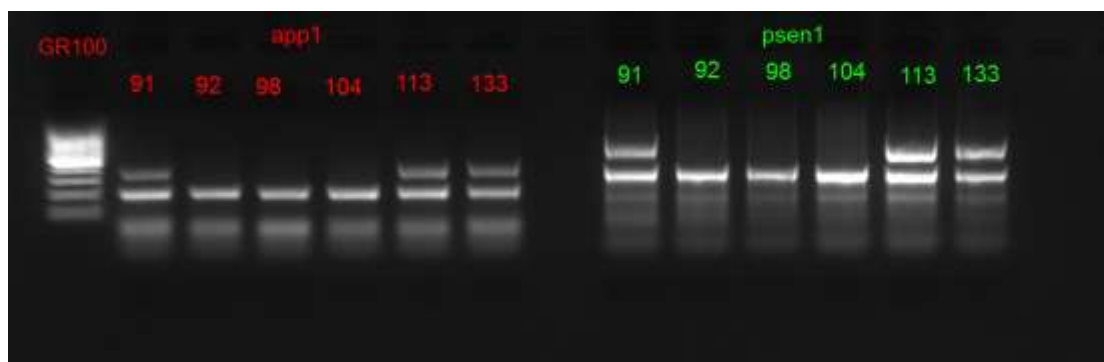


Figura 3. Genotipare APP respectiv PSEN1.

Pentru animalele de tip “wild-type” (sănătoase) se evidențiază o singură bandă (probele cu cifrele 92, 98, 104), șoarecii transgenici prezintă 2 benzi (probele cu cifrele 91, 113, 133). GR100=marker de greutate moleculară 100pb (Figura 3).

Genotipare clusterină

Extractia ADN-ului necesar pentru analiza de genotipare s-a efectuat cu ajutorul kitului PureLink Genomic DNA Mini Kit (ThermoFisher Scientific, USA) din țesut provenit din urechea șoarecelui (dimensiune de aprox 1x2 mm²).

Pentru genotipare s-a utilizat o reacție de tip PCR și 3 primeri - primer comun (c), primer sens corespunzător alelei de tip wild-type (w) și primer sens corespunzător alelei cu mutație (m). Secvențele nucleotidice ale primerilor utilizați au fost:

Clu_Fw_c_CGC TAT AAA TAG GGC GCT TC

Clu_Rev_w_ TGA TGG GGC TCT AGT CAC CT

Clu_Rev_m_ GCC AGA GGC CAC TTG TGT AG

Pentru mixul de reacție PCR s-a utilizat ADN de la șoricelul analizat, DreamTaq MasterMix (ThermoFischer Scientific), primeri (comun, primer corespunzător alelei wild-type și alelei mutante), apa liberă de nucleaze.

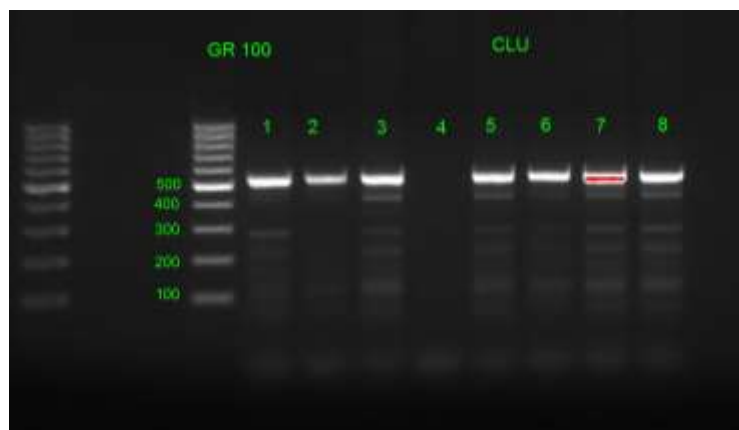


Figura 4. Electroforegrama pentru genotiparea pentru Clusterina (alela normală “wildtype”= 600pb, alela mutantă =540 pb, heterozigot alela de 540 pb și 600pb).

Probele 1, 2, 3 sunt probe control de la șoareci homozigoți pentru mutație pentru Clusterină comandați de la Laboratorul Jackson, proba 4 control negativ (utilizare apă), probele 5-8 puii

șoriceilor mutanți comandați de la Jackson Laboratory, toți cu genotip homozigot mutant (Figura 4).

2.2. Sinteza Clusterinei

Rezultat: Clusterina recombinantă a fost sintetizată, trimisă la UMFST Târgu Mureș de la Universitatea din Wollongong și pregătită pentru tratamentul șoarecilor.

3. Injecții intrahipocampale de A β la șoareci Clusterin knock-out (*Clu*^{-/-}). Cercetare experimentală *in vivo*:

3.1 . Înțelegerea modului de utilizare a cadrului stereotactic

Rezultat: În urma studiilor pilot, doctorandul a devenit competent în utilizarea cadrului stereotactic (Figura 5).

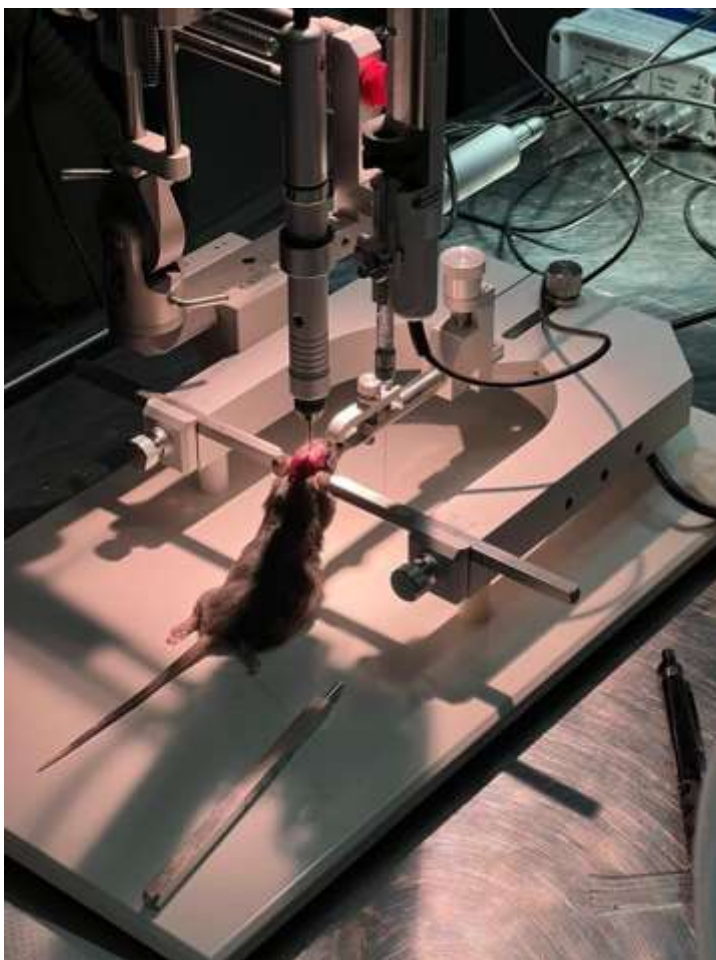


Figura 5. Șoarecele fixat în cadrul stereotactic.

3.2. Injecții intrahipocampale de A β la șoareci Clu-/-.

Rezultat: Șoareci Clu-/- în vârstă de 6 săptămâni injectați cu A β 40 marcat fluorescent în hipocampus și creiere postfixate pentru analiză. Aceste experimente au fost efectuate în perioada Feb-August 2023.

3.3. Studiul IPAD în prezența/absența Clusterinei

Rezultat: Studii imunohistochimice cu anticorpi anti-colagen IV și anti-actina mușchului neted (SMA) pe secțiunile de creier obținute de la șoareci cărora li s-a injectat A β fluorescent. Microscopie confocală și analiză de imagini a fost efectuată utilizând un microscop confocal TCS Leica SP8.

Experimentele pilot pentru imunomarcajul colagenului IV și al SMA au fost efectuate pe secțiuni experimentale de creier de șoarece și in vitro, ceea ce a dus la o publicație menționată

mai sus. S-a efectuat apoi imunohistochimia pe n=5 creiere pentru fiecare lot experimental după cum este expus în tabelul de mai jos:

Group	Genotype	Injected tracer			Number	Male:Female
		Fluorescent A β 40	Clusterin	Clusterin:A β		
Group A	WT	○			5	2:3
Group B	Clusterin K/O	○			5	0:5
Group C	Clusterin K/O	○	○	1:10	5	4:1

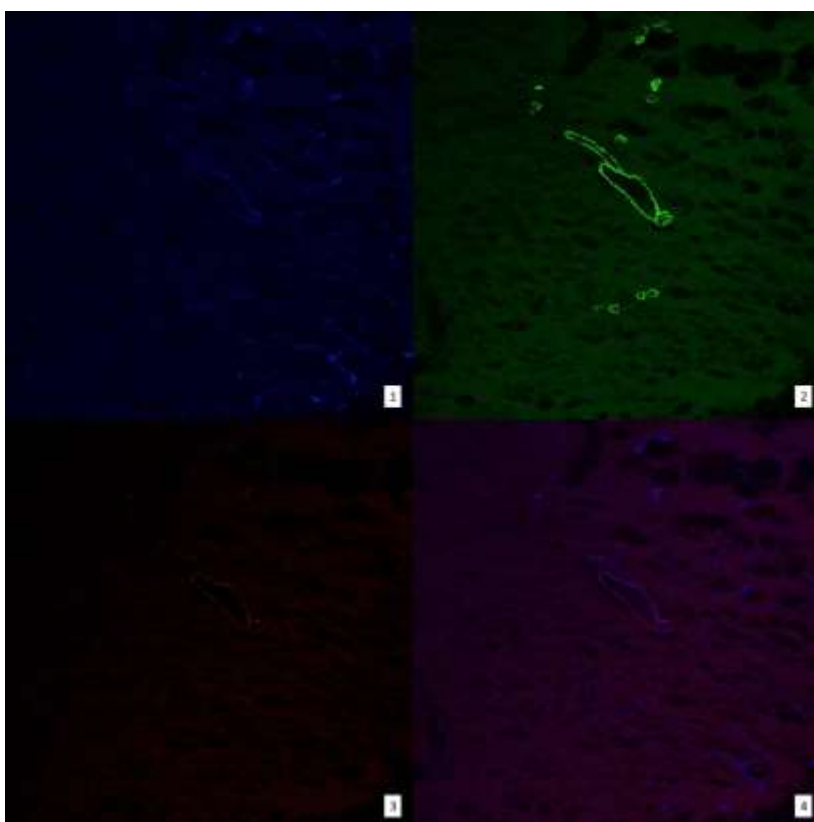


Figura 6. Exemplu de caz imunomarcant cu 1. Colagen IV (membrana bazală colorată în albastru); 2. SMA (fibrele musculare netede de la nivelul arterelor colorate în verde); 3. A β depus la nivelul vaselor sanguine (colorat cu roșu); 4. Co-localizarea A β și colagen IV la nivelul vaselor sanguine.

S-a pregătit un macro în programul Image J pentru a analiza procentajul de capilare, artere, venule cu amiloid fluorescent în pereți și rezultatele preliminare sunt următoarele:

	Tratați	Netratați
Area (c)	655.52	160.73
Procentaj acoperit de amiloid (c)	0.01	0.88
Nr. particule amiloid (c)	0.04	0.12
Dimensiune particule amiloid (c)	2.25	13.37
Area (a)	970.85	1764.88
Procentaj acoperit de amiloid (a)	0.70	11.79
Nr. particule amiloid (a)	0.68	4.12
Dimensiune particule amiloid (a)	15.63	77.40

c= capilare a=arteriole

3.4. Tratamentul șoarecilor APP/PS1 tineri (2-4 luni) și bătrâni (7 luni – 2 ani) cu Clusterină

Rezultat: Șoareci APP/PS1 în vârstă de 2-4 luni, respectiv 7 luni – 2 ani (n= 5 per grup) au fost tratați cu Clusterină. Creierele au fost postfixate și pregătite pentru analiza imunohistochimică a încărcăturii AAC. Imunohistochimia pentru amiloid a fost efectuată pe secțiuni de 4 micrometri grosime. În funcție de distribuția amiloidului la nivelul vaselor sanguine s-au constituit trei grupuri (1-3, Figura 7). Rezultatele preliminare ale distribuției Aβ la cele două loturi de șoareci tratați cu Clusterină/PBS pot fi observate în tabelul de mai jos:

	Șoareci bătrâni			Șoareci tineri		
Nr. Crt.	IHC % de Beta-Amiloid	Injectare intraperitoneală de CLU/PBS	Grup	IHC % de Beta-Amiloid	Injectare intraperitoneală de CLU/PBS	Grup
1	70	CLU	1	5	CLU	3
2	80-90	PBS	1	0	CLU	3
3	80-90	CLU	1	0	CLU	3
4	70-80	CLU	1	10	CLU	3
5	40	PBS	2	5	CLU	3
6	30-40	PBS	2	5	PBS	3
7	40	CLU	2	0	PBS	3
8	30	CLU	3	0	PBS	3
9	20	PBS	3	5	PBS	3
10				5	PBS	3

Procentul de beta-Amilod (imunohistochimie cu anticorpi anti-BetaAmiloid ab230297 (Abcam))

Grup 1	$>2/3$ ($>66,6\%$)
Grup 2	$1/3 - 2/3$ ($33,3-66,6\%$)
Grup 3	$<1/3$ ($<33,3\%$)

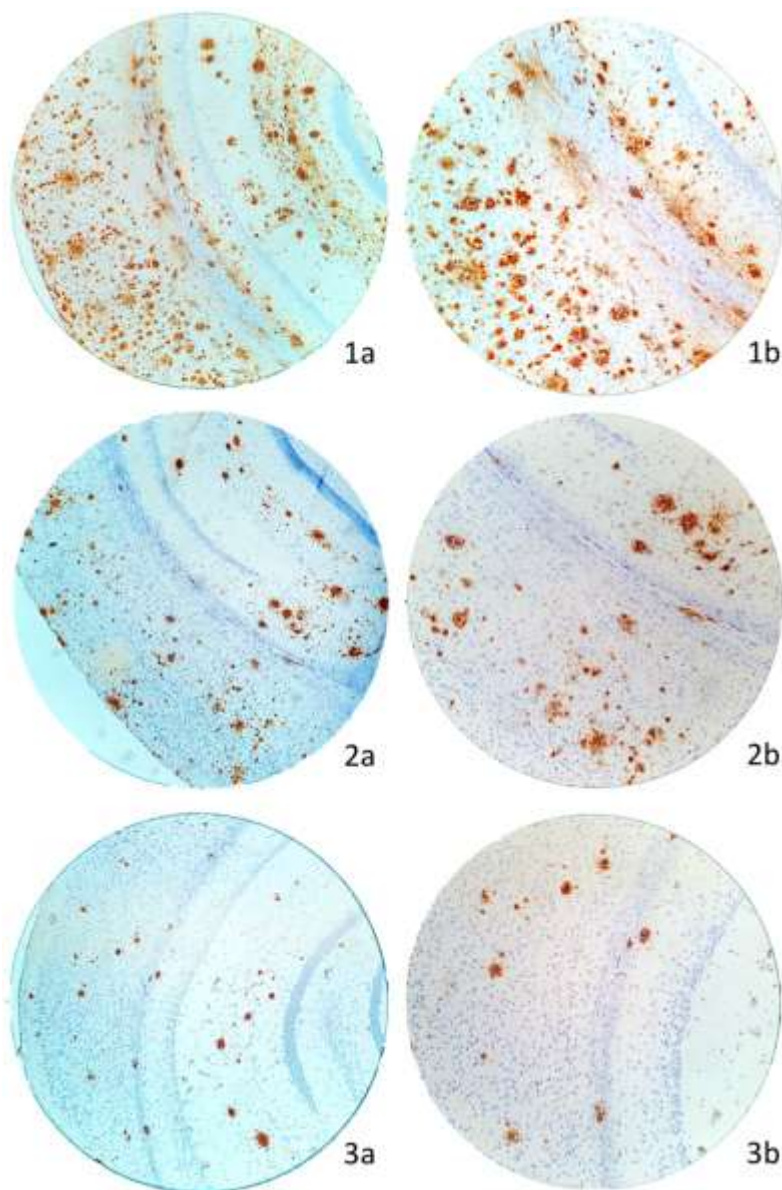


Figura 7. Încadrarea cazurilor în cele trei grupe de imunohistochimie: 1. Grupul 1 (1a. obiectiv 10x, 1b. obiectiv 20x); 2. Grupul 2 (2a. obiectiv 10x, 2b. obiectiv 20x); 3. Grupul 3 (3a. obiectiv 10x, 3b. obiectiv 20x).

Concluzii:

- 1) Procentajul capilarelor cu amiloid+CLU injectat intracerebral este crescut comparativ cu procentajul capilarelor cu amiloid simplu injectat intracerebral;
- 2) Procentajul arteriolelor cu amiloid+CLU injectat intracerebral este scazut comparativ cu procentajul arteriolelor cu amiloid simplu injectat intracerebral;
- 3) Aceste rezultate vor fi validate cu teste statistice ANOVA one way, dar sugereaza ca tratamentul cu CLU rezulta intr-o capacitate redusa a capilarelor de a drena amiloidul care nu ajunge in peretii arteriolari;
- 4) Grupul soarecilor batrani care are procentaj redus de amiloidoza este mixt, format atat din soareci tratati cat si netratati, iar in cadrul grupului soarecilor tineri, nu exista nici o diferenta a efectului tratamentului
- 5) Aceste rezultate care vor trebui validate cu teste statistice t- test, sugereaza ca efectul tratamentului este mixt si doar in cadrul amiloidozei. Un potential efect preventiv ar putea fi observat la soareci tineri transgenici care ar trebui lasati sa imbatraneasca 3 luni.

Rezumat al livrabilelor

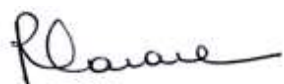
În această etapă finală a proiectului am realizat următoarele:

1. Analiza in vitro a căilor IPAD-ului pentru a înțelege mai bine relația dintre Clusterină și IPAD. Acest lucru a avut ca rezultat un manuscris trimis spre publicare la Scientific Reports, Impact Factor 4.6 (Q1).
2. Atât șoarecii APP/PS1, cât și șoarecii Clusterin knock-out au fost genotipați și coloniile sunt în prezent la UMFST.
3. Experimentele pentru analiza IPAD în prezența/absența Clusterinei au fost finalizate.
4. Experimentele pentru analiza efectului Clusterinei în severitatea amiloidozei în APP/PS1 au fost finalizate.
5. Progresele proiectului în contextul progreselor în cercetarea BA au fost prezentate în cadrul conferințelor internaționale AAIC Amsterdam, Olanda, iulie 2023, VasCog Gothenburg, Suedia, Septembrie 2023, zilelor de cercetare ale UMFST Târgu Mureș 5-10 dec 2022 și urmează a fi prezentate și în cadrul zilelor de cercetare UMFST Târgu Mureș 12-15 Dec 2023.

Obiective in desfasurare:

1. Analiza statistica IPAD si amiloidoza (se va finaliza in 3 saptamani)
2. Manuscris cu rezultatele finale (in 3-5 saptamani).

Prof. dr. Roxana Carare

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Roxana Carare', with a stylized, cursive script.