





Universitat Autònoma de Barcelona

ESTUDIO DE VARIANTES ESTRUCTURALES DE APOA-I Y APOJ RECOMBINANTES COMO APROXIMACIÓN TERAPÉUTICA EN EL CONTEXTO DE LA β -AMILOIDOSIS CEREBRAL

Sofía Fernández de Retana Alda

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>


WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>





Universitat Autònoma de Barcelona

ESTUDIO DE VARIANTES ESTRUCTURALES DE APOA-I Y APOJ RECOMBINANTES COMO APROXIMACIÓN TERAPÉUTICA EN EL CONTEXTO DE LA β -AMILOIDOSIS CEREBRAL

Sofía Fernández de Retana Alda

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE VARIANTES ESTRUCTURALES DE
APOA-I Y APOJ RECOMBINANTES COMO
APROXIMACIÓN TERAPÉUTICA EN EL
CONTEXTO DE LA β -AMILOIDOSIS CEREBRAL**

Sofía Fernández de Retana Alda

Doctorado de Neurociencias

Instituto de Neurociencias (INc)

Facultad de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)

Directores:

Dra. Mar Hernández Guillamón

Dra. Mary Cano Sarabia

Tutor:

Dr. Joan Montaner

Barcelona, 2018

Esta Tesis Doctoral se ha realizado en el Laboratorio de Investigación Neurovascular del Institut de Recerca del Hospital Vall d'Hebron (VHIR) en colaboración con el grupo de Nanoquímica Supramolecular y Materiales (NanoUp) del Institut Català de Nanociència i Nanotecnologia (ICN2). Gracias a la financiación del Instituto de Salud Carlos III (PI14/01134 and PI13/00364), cofinanciado por fondos FEDER y la Fundació Marató TV3 (40/U/2014).

El Laboratorio de Investigación Neurovascular pertenece a la red *INVICTUS+*. Y el ICN2 está financiado por fondos MINECO del gobierno de España a través del Programa para Centros de Excelencia Severo Ochoa (SEV-2013-0295).

Agradecimientos

En primer lugar, tengo que agradecer al Laboratorio de Investigación Neurovascular, y en especial a la Dra. Mar Hernández, la oportunidad de poder realizar mi Tesis Doctoral. Han sido años muy enriquecedores en los que he aprendido mucho más de lo que imaginaba, pese a lo sorprendentemente rápido que pasa el tiempo. Tengo que agradecer a Mar la confianza que ha depositado en mí y que siempre haya tenido la puerta abierta para escuchar y discutir mis dudas y propuestas, he disfrutado mucho.

Gracias también al grupo NanoUp y en especial a la Dra. Mary Cano, por acercarme al mundo de la Nanociencia. Por haber tenido siempre tanta paciencia y predisposición ayudándome con conceptos que se alejaban bastante de mi formación universitaria pero que me han resultado muy interesantes. Ha sido una oportunidad increíble poder trabajar con vosotras.

Por supuesto, gracias a todos los compañeros del LIN, tanto a los de ahora como a los que ya no están, por haber ayudado en esta Tesis Doctoral. Tengo que hacer una mención especial a las chicas “Amiloides” Paula y Montse. Porque, especialmente estos últimos meses, no sé qué hubiera sido de mí sin su ayuda. ¡Sois unas cracs! Y me ha encantado poder trabajar con vosotras. El otro agradecimiento especial, tiene que ser sí o sí para Marina y Alba, porque un sprint final es más llevadero en compañía. Gracias por las risas, las crisis, las charlas y por todo en general. ¡¡Us trobaré molt a faltar!!

A todos los buenos amigos que he hecho en Barcelona. Ana y Cris muchas gracias por todos esos raticos, ¡ha sido una suerte conocerlos! A la familia Ventalló, especialmente a Irene y Anna, por las cenas en familia y por hacer posible que vivir en el imprevisible Ventalló sea acogedor. Y ti a Aida, por ser más que familia.

A mi *kuadrila*: Ander, Arrate, Tania, Oihana, Iban, Rubén, Sergio, Nerea, Iker e Itxaso. Y también a Iratxe. Por estar siempre cerca, pese a la distancia. ¡Es una suerte teneros!

A Mikel, por poner solo facilidades y sumar siempre en positivo. Por aportar el punto de tranquilidad que a veces tanto le falta a mi caos. Te quiero mucho.

A mi *amatxo*, por ser una guerrera y por anteponerme a prácticamente todo. Gracias, porque si no hiciéramos tan buen equipo, no hubiera podido terminar esto. Te quiero.

Pero con el permiso de todos los anteriores, le dedico esta Tesis a mi *aita*. Gracias literalmente por todo, por ser mi ejemplo a seguir y por enseñarme que, por lo que merece la pena, hay que pelear hasta el final. Aunque sepas que a veces no se puede ganar. Te quiero y te echo de menos.

*“La inteligencia,
es la capacidad de adaptarse”*

J.R.R

Resumen

La β -amiloidosis cerebral se caracteriza por la acumulación del péptido β -amiloide ($A\beta$) en el parénquima y vasos cerebrales siendo la principal característica neuropatológica de la Enfermedad de Alzheimer (EA) y la Angiopatía Amiloide Cerebral (AAC). Ambas enfermedades se caracterizan por un impacto devastador en los pacientes, sin embargo actualmente no existe ningún tratamiento modificador para estas enfermedades. La hipótesis más aceptada en el campo propone que la β -amiloidosis cerebral ocurre por la desregulación de los mecanismos de eliminación de $A\beta$ de cerebro. En este contexto, se ha propuesto que las apolipoproteínas ApoA-I y ApoJ/Clusterin tienen un rol protector frente a la β -amiloidosis cerebral. Por ello, el objetivo principal de esta Tesis Doctoral es estudiar el potencial terapéutico de variantes genéticas y estructurales sobre las proteínas recombinantes ApoA-I y ApoJ, respectivamente, en un modelo animal de β -amiloidosis cerebral.

La primera estrategia se basó en el estudio del potencial terapéutico de la variante genética de ApoA-I, ApoA-I-Milano recombinante humana (rApoA-I-M). Se observó que la administración intravenosa crónica en el modelo murino de β -amiloidosis cerebral APP23 promovió una disminución de la carga β -amiloide parenquimal y vascular mediante el aclaramiento del péptido $A\beta$ de cerebro a sangre, así como una disminución de la neuroinflamación. En segundo lugar, se formuló ApoJ recombinante humana en nanodiscos de HDLs reconstituidos (nanodiscos rHDL-rApoJ). Por un lado, esta estructura mostró mayor capacidad de promover el eflujo de colesterol *in vitro* y tras la administración periférica colocalizó con vasos afectados por $A\beta$ en el modelo murino de β -amiloidosis cerebral APP23. Sin embargo, el tratamiento crónico con nanodiscos rHDL-rApoJ en el modelo APP23 no mostró una mayor capacidad de prevenir la acumulación de β -amiloide en cerebro que la proteína rApoJ libre. Por otro lado, la administración crónica periférica de rApoJ humana libre resultó en una disminución del β -amiloide vascular y carga β -amiloide insoluble, así como un aminoramiento de la muerte neuronal en hipocampo. Este efecto se acompañó de un aumento en la expresión del marcador lisosomal CD68 en la microglía alrededor de las placas neuríticas, proponiendo que la administración de ApoJ a nivel periférico promueve la eliminación de $A\beta$ mediante estimulación de la fagocitosis en el parénquima cerebral.

En resumen, consideramos que esta tesis doctoral contribuye a una mejor comprensión de los efectos de ApoA-I y ApoJ circulantes sobre la β -amiloidosis cerebral y propone el valor terapéutico potencial de rApoA-I-M y rApoJ en el contexto de la EA y AAC.

Abstract

Cerebral β -amyloidosis is characterized by parenchymal and vascular deposition of Amyloid- β peptide ($A\beta$), being the main neuropathological hallmark of Alzheimer's Disease and Cerebral Amyloid Angiopathy (CAA). Both diseases are characterized by a devastating impact on patients. Nevertheless, currently there is absence of a disease-modifying therapeutic strategy. The most accepted hypothesis in the field proposes that cerebral β -amyloidosis occurs by a deregulation of $A\beta$ elimination pathways. In this context, ApoA-I and ApoJ/Clusterin apolipoproteins have been proposed to have protective role against cerebral β -amyloidosis. Thus, the main objective of this Doctoral Thesis is to study the therapeutic potential of genetic and structural modifications in recombinant ApoA-I and ApoJ respectively, using an animal model of cerebral β -amyloidosis.

The first strategy was to study the potential therapeutic value of a naturally occurring genetic variant of ApoA-I, recombinant ApoA-I-Milano (rApoA-I-M). The chronic intravenous administration of human rApoA-I-M in the cerebral β -amyloidosis mice model APP23, lead to a significant reduction in both vascular and parenchymal $A\beta$, promoting the $A\beta$ clearance from brain into the bloodstream. The treatment also showed lower levels of certain neuroinflammatory markers. Secondly, recombinant ApoJ was formulated in reconstituted HDL nanodiscs (rHDL-rApoJ nanodiscs). On one hand, this structure was more effective than free rApoJ promoting the cholesterol efflux *in vitro* and after intravenous administration; rHDL-rApoJ nanodiscs co-localized with fibrillar $A\beta$ affected vessels. Nevertheless, the chronic peripheral administration of rHDL-rApoJ nanodiscs in the APP23 mice model did not improve the effect of free rApoJ in terms of cerebral β -amyloid accumulation. Indeed, the chronic intravenous administration of free human rApoJ prevented the number of β -amyloid affected brain vessels and the total cerebral insoluble $A\beta$ load together with amelioration of neuronal loss in the hippocampus. This effect was accompanied by an increased in the expression of the lysosomal marker CD68 in microglial cells in the periphery of $A\beta$ deposits, proposing that circulating rApoJ promotes the $A\beta$ elimination through cerebral phagocytosis stimulation.

In summary, we consider that this Doctoral Thesis contributes to the understanding of the role of circulating ApoA-I and ApoJ in cerebral β -amyloidosis and proposes the potential therapeutic value of rApoA-I-M and free rApoJ in the context of AD and CAA.

ÍNDICE

Agradecimientos 5

Resumen..... 9

Abstract 11

1- INTRODUCCIÓN 15

1.1- El péptido β -amiloide 17

 1.1.1- La producción del péptido β -amiloide..... 17

 1.1.2.- Aclaramiento de $A\beta$ de cerebro..... 18

1.2- β -amiloidosis cerebral 22

 1.2.1- Angiopatía Amiloide Cerebral 23

 1.2.1.1- Características clínicas y neuropatológicas 23

 1.2.1.2- Diagnóstico y tratamiento 26

 1.2.2- Enfermedad de Alzheimer 27

 1.2.2.1- Características clínicas y neuropatológicas 27

 1.2.2.2- Diagnóstico y terapia..... 31

1.3- Modelos animales de β -amiloidosis cerebral 34

1.4- Implicación del metabolismo lipídico en la β -amiloidosis cerebral..... 37

 1.4.1- Las lipoproteínas 37

 1.4.2- Metabolismo lipídico en el cerebro: Un nexo con la β -amiloidosis cerebral 39

1.5- El rol de las apolipoproteínas en la β -amiloidosis cerebral..... 41

 1.5.1- Apolipoproteína E (ApoE) 41

 1.5.2-Apolipoproteína A-I (ApoA-I y ApoA-I-M) 42

 1.5.2.1- Apolipoproteína A-I-Milano 44

 1.5.2.2- Estrategias terapéuticas basadas en ApoA-I-wt y ApoA-I-M 45

 1.5.3-Apolipoproteína J (ApoJ) 47

1.6- HDL reconstituidas (rHDL)..... 49

 1.6.1- Nanopartículas lipídicas con aplicaciones biomédicas 49

 1.6.2- Naturaleza y formación de las HDL reconstituidas..... 50

 1.6.3- Potencial terapéutico de las HDL reconstituidas en la β -amiloidosis cerebral..... 52

2- OBJETIVOS 55

2.1- Objetivo general	57
2.2- Objetivos específicos	57
3. PUBLICACIONES	59
3.1- ARTÍCULO 1	61
3.2- ARTÍCULO 2.....	81
4- DISCUSIÓN	101
4.1- Producción de las apolipoproteínas recombinantes y sus modificaciones estructurales	103
4.2- Potencial terapéutico de rApoA-I-wt y rApoA-I-M.....	105
4.2.1- Eficacia de rApoA-I-M en el modelo murino APP23.....	105
4.2.2- Rol del metabolismo lipídico y posibles mecanismos subyacentes	108
4.3- Formación y caracterización de nanodiscos rHDL-rApoJ	110
4.3.1- Características fisicoquímicas de los nanodiscos rHDL-rApoJ	110
4.3.2- Nanodiscos rHDL-rApoJ en el contexto de la β -amiloidosis cerebral ..	112
4.4- Potencial terapéutico de rApoJ libre y nanodiscos rHDL-rApoJ	114
4.4.1- Efecto de la administración periférica de rApoJ libre o nanodiscos rHDL- rApoJ en el modelo experimental de β -amiloidosis cerebral APP23	114
4.4.2- Mecanismo implicados e importancia de la respuesta inmune innata....	117
4.5- Perspectiva general del potencial terapéutico de ApoJ y ApoA-I-M dirigido a la β -amiloidosis cerebral.....	121
4.5.1- Perspectiva general del rol de ApoA-I y ApoJ en la β -amiloidosis.....	121
4.5.2- Perspectivas futuras.....	123
5- CONCLUSIONES.....	125
6- BIBLIOGRAFÍA.....	129
7- ANEXO	157
7.1- MANUSCRITO 3.....	159
7.2-ANEXO 1	189
7.3- Abreviaciones.....	203
Carrera investigadora de la doctoranda.....	207

1- INTRODUCCIÓN

1.1- El péptido β -amiloide

1.1.1- La producción del péptido β -amiloide

El péptido β -amiloide ($A\beta$) es el producto del procesamiento secuencial de la Proteína Precursora Amiloide (PPA). La proteína PPA (110 KDa) es una proteína con un sólo paso transmembrana que cuenta con un largo dominio extracelular y un pequeño dominio citosólico. En su procesamiento canónico se pueden distinguir el procesamiento amiloidogénico y el no amiloidogénico dependiendo de qué secuencia de secretasas actúe (Figura 1).

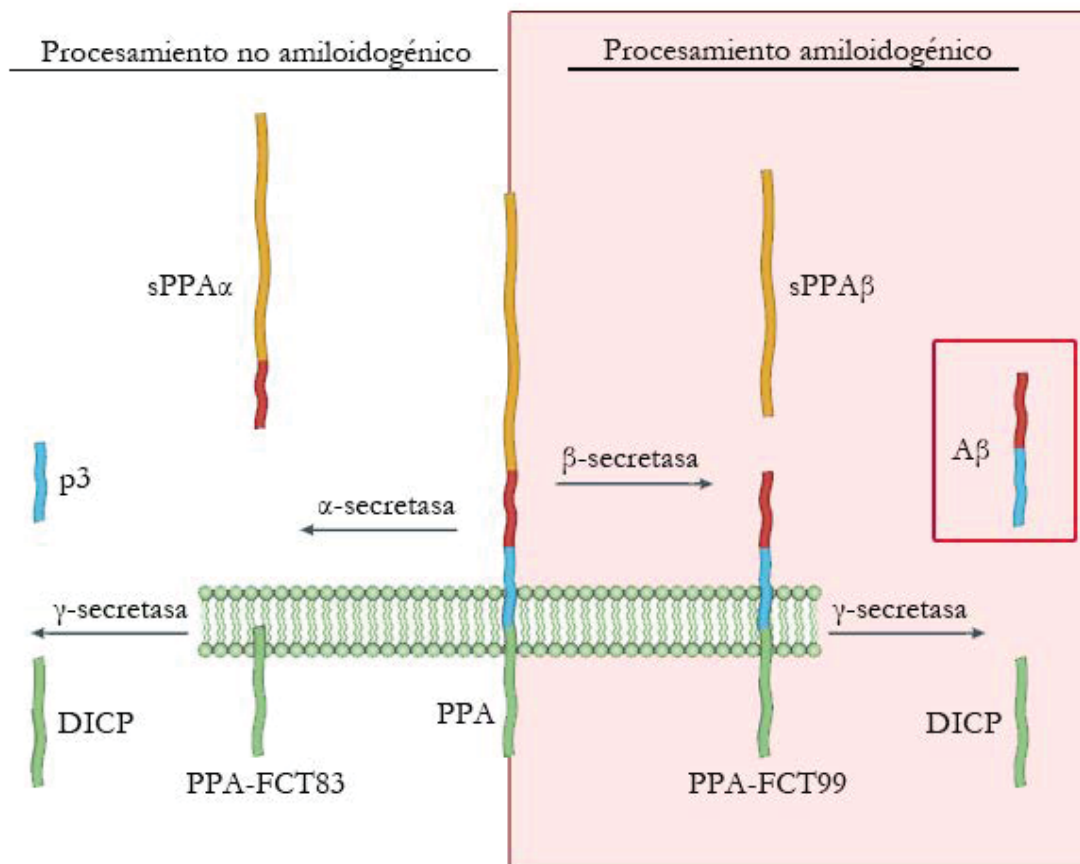


Figura 1: Esquema del procesamiento de PPA por la vía amiloidogénica y no amiloidogénica. PPA: Proteína Precursora Amiloide, s-PPA α y s-PPA β : fracciones solubles de PPA α - y β -, PPA-FCT83 y PPA-FCT99: Fragmentos C-terminales de PPA de 83 y 99 aminoácidos respectivamente, DICP: Dominio Intracelular citosólico de PPA. (Modificado de Thathiah y Strooper, 2011).

En el procesamiento no amiloidogénico, α -secretasa actúa sobre PPA liberando los fragmentos s-PPA α (soluble extracelular) y PPA-FCT83 (Fragmento C-Terminal, anclado a la membrana citosólica). Sobre este último fragmento actúa posteriormente el complejo de γ -secretasa, dando lugar a la liberación de los fragmentos solubles DICP (Dominio intracelular de PPA; citosólico) y P3 (extracelular) ambos sin tendencia a agregar. Sin embargo, en el procesamiento amiloidogénico, tras la proteólisis generada por β -secretasa sobre PPA se libera el péptido soluble s-PPA β al medio extracelular y deja anclado a la membrana citosólica el fragmento C-Terminal PPA-FCT99. Este último fragmento es susceptible a la acción de la γ -secretasa, dando lugar a la liberación del péptido DICP (citosólico) y A β (extracelular). Por otra parte, el lugar de proteólisis de la γ -secretasa en el procesamiento amiloidogénico puede variar liberando péptidos de A β de diferente longitud, siendo A β ₄₀ y A β ₄₂ (40 y 42 aminoácidos respectivamente) los de mayor interés clínico². Los monómeros de A β (\approx 4 KDa) tienden a una conformación rica en hojas- β que es propensa a agregarse formando oligómeros de peso molecular variable (Figura 1). Estos oligómeros tienen una tendencia a seguir alargándose hasta que se forman grandes fibras insolubles que se depositan en cerebro dando lugar a lo que se conoce patológicamente como β -amiloidosis cerebral. Esta acumulación de β -amiloide en cerebro da lugar a la Enfermedad de Alzheimer (EA), en la que se observan depósitos parenquimales del péptido A β y a la Angiopatía Amiloide Cerebral (AAC), caracterizada por la presencia de depósitos amiloides en los vasos cerebrales.

1.1.2.- Aclaramiento de A β de cerebro

La proteína PPA está muy conservada a lo largo de la evolución y su procesamiento secuencial está complejamente regulado. Estas características hacen pensar que PPA y su procesamiento tiene un rol de importancia biológica en condiciones no patológicas. De hecho, diversas publicaciones han intentado arrojar luz sobre este asunto. Así, distintos autores han descrito el rol de PPA como un factor clave en fases del desarrollo relacionadas con la formación, migración y diferenciación de

neuronas. Además, se ha propuesto que la fracción s-PPA α y el péptido A β podrían participar en la neurogénesis adulta³. Estas evidencias, refuerzan la idea de que la producción de A β ocurre en condiciones no patológicas y que existen vías de eliminación que evitan su acumulación. En este sentido, la hipótesis más aceptada en el campo propone que la β -amiloidosis cerebral esporádica ocurre como consecuencia de la desregulación de estos mecanismos de eliminación⁴ (Figura 2).

Existen diversas rutas de eliminación del péptido A β . Por una parte, el péptido A β puede ser degradado por proteasas secretadas por la glía o neuronas. Neprilisina (NEP) y la enzima degradadora de insulina (IDE, *Insulin degrading enzyme*) han sido las proteasas más estudiadas⁵. Esta vía de eliminación parece estar alterada en pacientes con β -amiloidosis cerebral. Así, la actividad de IDE y NEP disminuye en cerebros de enfermos con EA⁶. Por otra parte, también se ha descrito que algunas metaloproteinasas (MMP) pueden proteolizar el A β *in vitro*, como ocurre en la degradación secuencial del A β por MMP-2 y MMP-9⁷.

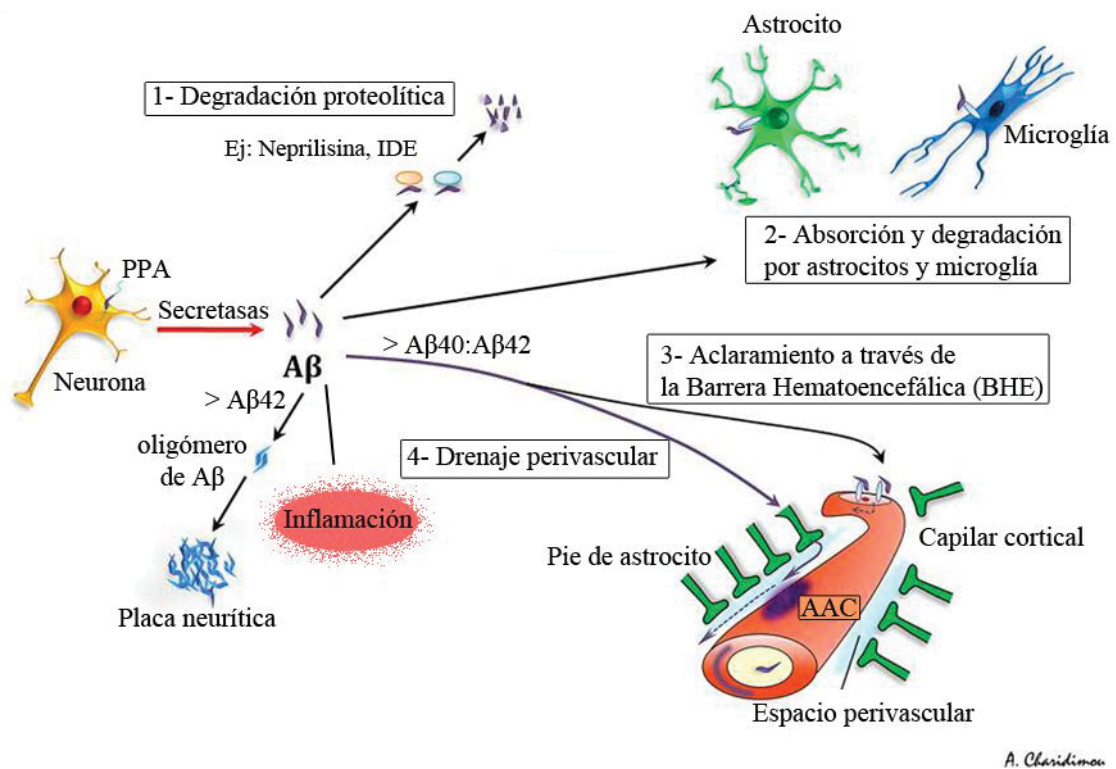


Figura 2: Mecanismos de eliminación de A β de cerebro. (Modificado de Charidimou *et al*, 2012⁸).

En otra de las vías de eliminación de A β , conocida como absorción por la glía, los astrocitos y la microglía pueden fagocitar material β -amiloide a través de distintos receptores que han sido relacionados con la enfermedad de Alzheimer como SRB-I (*Scavenger Receptor-BI*) y CD36 (*Cluster of Differentiation 36*)⁹, RAGE (*Receptor for Advanced Glycation End-products*)¹⁰ y LRP1 (*Lipoprotein Receptor Protein-1*)^{11,12} expresados tanto en microglía como astrocitos. Por otro lado, el receptor LRP2/megalin (*Lipoprotein Receptor Protein-2*)¹³ puede mediar la fagocitosis en astrocitos y el receptor TREM2 (*Triggering Receptor Expressed in Myeloid Cells- 2*) puede mediar la fagocitosis de A β específicamente en microglía^{14,15}.

La microglía es el tipo celular principal encargado de la respuesta inmune innata en cerebro¹⁶ que debido a su fenotipo fagocítico, es capaz de internalizar el péptido A β y promover su degradación por la vía lisosomal o ubiquitin-proteosoma¹⁷. Sin embargo, esta capacidad fagocítica de la microglía parece estar alterada en modelos animales de β -amiloidosis cerebral, impidiendo la correcta digestión del péptido A β ^{18,19}. Por otra parte, pese a que la infiltración de células inmunes del torrente sanguíneo a cerebro está muy regulada, se ha observado que en condiciones patológicas asociadas al depósito de A β puede ocurrir la entrada de monocitos²⁰ que rápidamente se diferenciarían a macrófagos activos²¹. Además, se ha propuesto una mayor eficacia fagocítica de los macrófagos derivados de monocitos periféricos que de la microglía residente²². Por ejemplo, en estudios previos se ha observado que la estimulación de la infiltración de macrófagos periféricos produjo una disminución cercana al 90% de la carga β -amiloide en parénquima en un modelo animal de EA (Tg2576)²³. Por otra parte, la capacidad fagocitar el péptido A β parece estar alterada en monocitos derivados de pacientes de EA²⁴. Debido a estas evidencias, la degradación lisosomal del péptido A β , tanto por la microglía residente como por macrófagos de origen periférico, parece tener un gran peso sobre el aclaramiento de A β . Por ello, tratamientos que rescaten la capacidad fagocítica de estos tipos celulares, puede ser una estrategia terapéutica prometedora en el contexto de la β -amiloidosis cerebral²⁵.

Otro de los mecanismos de eliminación de A β más estudiado en los últimos años es el “drenaje perivascular”. En este mecanismo los solutos del líquido intersticial

difunden a lo largo de la lámina basal de las arterias y capilares cerebrales, en dirección contraria al flujo sanguíneo siendo éste impulsado por las pulsaciones vasculares, hasta llegar a las arterias leptomeningeadas. Una vez allí, el A β se elimina por los nodos linfáticos cervicales²⁶. Este mecanismo de eliminación parece estar alterado en condiciones de AAC, promoviendo la acumulación de A β en los compartimentos perivasculares provocando la formación de lesiones conocidas como espacios perivasculares en el *centrum semiovale* visibles por resonancia magnética (RM), también llamados espacios de *Virchow-Robin*²⁷. Estos espacios perivasculares en el *centrum semiovale* también han sido detectados por RM en enfermos de EA²⁸, por lo que se ha propuesto que alteraciones en el drenaje perivascular también pueden contribuir a esta patología²⁶. Conjuntamente con el drenaje perivascular, también se ha propuesto la existencia de un “sistema glinfático”, en el que los solutos del líquido intersticial que fluyen por la vía de drenaje perivascular a lo largo de las arterias cerebrales, se filtrarían al neurpilo para terminar en el espacio perivenular dónde también ocurre el drenaje de A β ²⁹.

Además, el aclaramiento de A β de cerebro puede ocurrir a través de la Barrera Hematoencefálica (BHE). Los microvasos cerebrales tienen una citoarquitectura única cimentando la BHE la cual se caracteriza por tener una baja permeabilidad a pequeñas moléculas polares y péptidos, por lo que el transporte a través de la misma está estrictamente regulado mediante receptores específicos. Estas características permiten al cerebro nutrirse de todos los componentes necesarios para su correcto funcionamiento así como deshacerse de metabolitos tóxicos. La BHE está formada por las células endoteliales, la lámina basal y los pies de astrocitos y pericitos. Dentro de esta compleja estructura, la baja permeabilidad que caracteriza la BHE viene dada por la expresión de uniones estrechas (TJ, *tight junctions*, ocludinas y claudinas) y uniones adherentes (AJ, *Adherens junctions*)³⁰ en las células endoteliales.

Existen varios receptores que son capaces de interactuar con A β y facilitar su transcitosis al otro lado de la célula endotelial polarizada a nivel de la BHE. Entre ellos, destacar dos receptores de la familia de las lipoproteínas de baja densidad (*Low Density Lipoprotein Receptors*, LDLR) abundantemente expresados en la parte abluminal (hacia cerebro) de la BHE, como LRP1³¹ y LRP2/megalin^{32,33}. Asimismo,

se conoce que ciertos transportadores de la familia ABC (*ATP-binding cassette*) también están implicados en el transporte de A β , como ABCB-1/P-gp (*p-glycoprotein*)³⁴ o ABCA1³⁵.

Por último, el transporte de A β no es unidireccional. El transportador RAGE se expresa en la parte luminal de la BHE (hacia sangre) y es capaz de interactuar con A β y transportarlo hacia el cerebro³⁶. Además, tras la interacción A β -RAGE se da una transducción de señal proinflamatoria y una reducción del flujo sanguíneo cerebral³⁷. Sin embargo, existen formas solubles circulantes de LRP1 y RAGE (sLRP1 y sRAGE) formadas tras el procesamiento por α -secretasa que permiten secuestrar el A β en plasma e impedir su reentrada a cerebro a través de RAGE³⁸. Así, se ha propuesto que existe un equilibrio entre los niveles de A β circulante y cerebral y que el secuestro del A β circulante podría promover el aclaramiento de A β de cerebro. Este mecanismo se ha denominado como “hipótesis del sumidero periférico” (del inglés; *peripheral sink hypothesis*) y ha sido demostrado en modelos preclínicos donde agentes secuestradores de A β , como anticuerpos³⁹ y sLRP1b(Sagare et al. 2007), fueron capaces de facilitar la salida de A β de cerebro sin llegar a penetrar en él. A día de hoy, esta hipótesis sigue bajo investigación ante la falta de consistencia con otros estudios⁴⁰.

1.2- β -amiloidosis cerebral

Entorno al 90% del A β producido es A β ₄₀ (40 aminoácidos de longitud) aunque debido a la mayor capacidad de agregación de A β ₄₂ (42 aminoácidos de longitud), éste último es el mayoritario en los depósitos amiloides en parénquima cerebral (placas neuríticas) que caracterizan la EA⁴¹. Sin embargo, A β ₄₀ también tiende a formar fibras insolubles, pero en este caso la localización ocurre preferentemente en la vasculatura cerebral dando lugar a AAC⁴².

Aunque las enfermedades de EA y AAC funcionan como dos entidades independientes, son enfermedades estrechamente relacionadas y probablemente con mecanismos también relacionados. El 91% de los pacientes de EA también padecen

AAC⁴³. Sin embargo, la mayoría de enfermos diagnosticados con hemorragia intracerebral asociada a AAC (HIC-AAC), no presentan signos preexistentes de EA⁴⁴ y sólo una minoría de los pacientes de EA presentan HIC debido a una AAC severa⁴⁵. Sin embargo, algunos estudios han observado que poblaciones con EA tienen un mayor riesgo de sufrir un evento HIC⁴⁶. En este contexto, los mecanismos que vinculan y que diferencian estas dos enfermedades son considerablemente desconocidos. Por ello, se requieren estudios que arrojen luz sobre los distintos mecanismos que dirigen la acumulación parénquimal y/o vascular de A β .

1.2.1- Angiopatía Amiloide Cerebral

1.2.1.1- Características clínicas y neuropatológicas

La Angiopatía Amiloide Cerebral (AAC) es la principal causa de HIC de localización lobar en la población anciana. La HIC no traumática es un subtipo de ictus hemorrágico (10-15% de los casos) que se define como un sangrado en el tejido cerebral o en los ventrículos cerebrales⁴⁷. Debido a su elevada tasa de mortalidad (\approx 50%), la HIC es el tipo de ictus más devastador⁸. En este contexto, la HIC asociada a AAC se caracteriza por su elevada tasa de recurrencia, alcanzado cifras de 23% por año. A partir de autopsias en una población anciana (80-90 años) se ha estimado que la prevalencia de AAC es del 20-40% en población sin deterioro cognitivo, mientras que se eleva hasta el 50-60% en presencia de demencia⁴⁸. Pese a la elevada prevalencia de la enfermedad en población anciana, el estudio de la AAC quizás no haya recibido la atención que merece. Así la AAC ha sido descrita como “la enfermedad más devastadora de la que nunca has oído hablar” (Dr. SM Greenberg).

La AAC ocurre como consecuencia del depósito amiloide en los vasos cerebrales. Existen varios subtipos de amiloide que pueden provocar depósitos cerebrovasculares, como cistatina-C, transtirretina y la proteína priónica (PrP) entre otros. Sin embargo, la AAC causada por el depósito de A β es, con diferencia, la más común⁴⁹.

La AAC causada por el depósito de $A\beta$ se caracteriza por su elevada complejidad y heterogeneidad, acentuada por su coaparición con otras enfermedades del pequeño vaso y EA. Sin embargo, la característica fisiopatológica más evidente de la AAC es la acumulación del péptido $A\beta_{40}$ en los vasos cerebrales, especialmente en las pequeñas arterias leptomeníngicas y corticales con una distribución topográfica preferencial hacia los lóbulos occipitales⁵⁰. En los casos severos de AAC la mayoría de las arterias y arteriolas están afectadas y el depósito de $A\beta_{40}$ puede substituir casi en su totalidad la túnica media y adventicia de las arterias o disgregar la parte exterior de la túnica media, dando lugar a la apariencia patológica de doble barrera. También provoca una pérdida de músculo liso, aparición de aneurismas y necrosis fibrinoide, debilitando el vaso y favoreciendo su ruptura^{51,52}. Los pacientes de AAC también pueden presentar otros signos de la enfermedad detectables por RM tales como la presencia de microhemorragias corticales lobares, siderosis superficial cortical, hemorragias subaracnoideas, hiperintensidades de la sustancia blanca, espacios perivasculares en el *centrum semiovale* y microinfartos corticales (Figura 3). Atendiendo a la localización del depósito amiloide se pueden distinguir dos tipos patológicos. En la AAC tipo 1, también conocida como “tipo capilar”, existe afectación amiloide en los capilares (con afectación o no de otros vasos) y se ha relacionado más íntimamente con los depósitos parenquimales de $A\beta$ típicos de la EA; mientras que en el AAC tipo 2 los depósitos vasculares de $A\beta$ están restringidos a las arterias leptomeníngicas o corticales, con ausencia de amiloide en los capilares^{51,53}.

Existen casos familiares de AAC asociada a $A\beta$ causados por mutaciones en el gen *PPA*. Estas mutaciones dan lugar a hemorragias intracerebrales hereditarias con β -amiloidosis (del inglés *HCHWA*, *Hereditary Cerebral Hemorrhage With Amyloidosis*) a edades <55 años. La mutación holandesa (E693Q, *HCHWA-D*, *Dutch type*, tipo holandés⁵⁴) fue la primera en describirse y genera HIC hereditaria con β -amiloidosis cerebral en ausencia de placas seniles. Por otra parte, existen otras mutaciones, como la italiana (E693K), que provocan HIC hereditaria sin depósitos β -amiloides en parénquima y daño neuronal; u otras íntimamente relacionadas con la aparición de AAC severa como la mutación flamenca (A692G) y la Iowa (D694N)⁵⁵. Por otra

parte, otras mutaciones en el gen *PPA* (Ej. Mutación sueca (K670N/M671L)), *PSEN1* o *PSEN2* (Presenilina 1 y 2, complejos de γ -secretasa) pueden favorecer el procesamiento de PPA por la vía amiloidogénica favoreciendo la aparición de AAC a edades tempranas conjuntamente con la presencia de placas seniles⁵⁶. Sin embargo, la inmensa mayoría de los casos de AAC ocurren de manera espontánea con presentaciones clínicas a edades > 55 años.

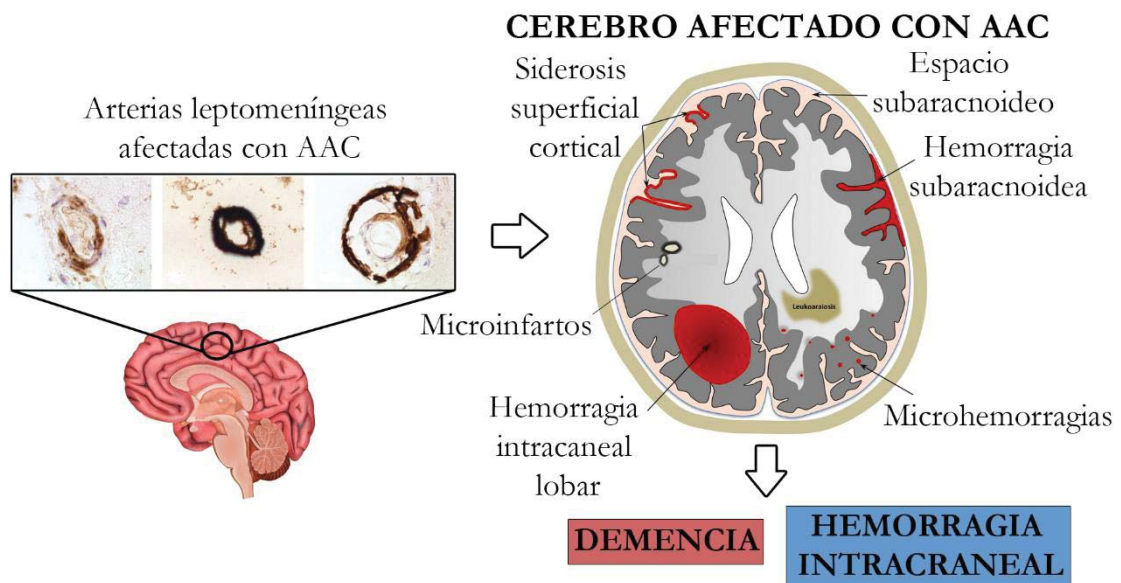


Figura 3: Características neuropatológicas de la Angiopatía Amiloide Cerebral (Modificado de Charimidou *et al*, 2012⁸).

El deterioro cognitivo y demencia son características clínicas de la enfermedad que pueden presentarse en pacientes que hayan sufrido un evento hemorrágico pero también en enfermos de AAC que no hayan padecido ningún ictus. La influencia de la AAC sobre la cognición es difícil de estudiar debido a la aparición conjunta con otras enfermedades, como la EA. Sin embargo, la capacidad independiente de la AAC de causar demencia está ampliamente aceptada. Varios estudios atribuyen a la AAC la capacidad de contribuir a la demencia y déficit cognitivo, tanto aumentando la probabilidad de padecer demencia como aumentando su severidad⁵⁷, independientemente de haber sufrido un evento HIC⁵⁸. Más concretamente, un

estudio observó que los pacientes con AAC moderada o severa tenían una menor velocidad perceptual y mayor deterioro de la memoria episódica de forma independiente a la EA⁵⁹.

1.2.1.2- Diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico definitivo de AAC sólo puede realizarse mediante necropsia de tejido cerebral. Sin embargo, en la práctica clínica se utilizan los criterios de Boston para el diagnóstico de una posible o probable HIC asociada a AAC^{60,63}. Estos criterios, sin embargo, han mostrado una sensibilidad limitada, por lo que se precisan nuevos marcadores no invasivos para mejorar el diagnóstico de AAC en vida. Así, el descubrimiento de un buen biomarcador para AAC supondría grandes ventajas en términos de diagnóstico temprano, prevención y tratamiento. En este sentido, los niveles de $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$, así como TAU total y TAU hiperfosforilada (hp-TAU) en líquido cefalorraquídeo (LCR) están siendo sujeto de investigación. Por ejemplo, un estudio reciente ha mostrado que pacientes con *HCHWA-D* presintomáticos presentan niveles más bajos de $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$ en LCR, sin cambios en los niveles de TAU total y hp-TAU⁶¹. Por otro lado, un reciente meta-análisis con casos esporádicos de AAC observó una disminución en los niveles de $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$ en LCR y un ligero aumento de TAU total en pacientes de AAC, en comparación con controles sanos. Además, este mismo estudio observó diferencias entre casos de AAC y EA. Así, los niveles de $A\beta_{42}$ no mostraron diferencias entre AAC y EA, mientras que los niveles de t-TAU, hp-TAU y $A\beta_{40}$ en LCR resultaron ser significativamente menores que en los pacientes de EA⁶². Pese a estos prometedores resultados, el valor de estos biomarcadores en el diagnóstico temprano de AAC debería consolidarse en futuros estudios clínicos multicéntricos.

Atendiendo a las terapias disponibles, los tratamientos se limitan a reducir el impacto clínico de la HIC y tratar de disminuir su elevada tasa de recurrencia. En este sentido, la bajada de la presión sanguínea ha demostrado minimizar la expansión del hematoma en ensayos clínicos⁶³. También se puede realizar la evacuación del hematoma, aunque debido a la agresividad de la lesión y a la elevada

recurrencia de esta enfermedad, el procedimiento se restringe a un número muy limitado de pacientes⁶⁴. Por otra parte, debido al elevado riesgo de recurrencia de HIC asociado a AAC, se recomienda limitar el uso de fármacos antitrombóticos si existe historial previo de un evento hemorrágico lobar⁶⁵. Finalmente, el control de la presión sanguínea mediante fármacos anti-hipertensivos también se ha propuesto como tratamiento para minimizar el riesgo de padecer recurrencia de HIC⁶⁶.

Actualmente no existe ninguna terapia modificadora de la patología AAC. En este sentido, la inmunoterapia pasiva se presenta como una posible estrategia terapéutica y está siendo evaluada en ensayos clínicos. El anticuerpo Ponezumab (PF-04360365, Pfizer) es un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido al extremo C-terminal del $A\beta_{40}$ que ha mostrado eficacia reduciendo los depósitos de AAC y mejorando la reactividad vascular en un modelo transgénico de EA y AAC (PSAPP)⁶⁷. La seguridad y farmacocinética de Ponezumab se ha estudiado en un ensayo clínico de fase II en pacientes con diagnóstico de AAC probable (www.clinicaltrials.gov, identificador: NCT01821118).

Por tanto, el desarrollo de una terapia modificadora para la AAC parece lejano. Este hecho viene dado por la ausencia de herramientas para su diagnóstico precoz, así como la falta de comprensión de los mecanismos subyacentes a la enfermedad. No obstante, la investigación de la AAC está adquiriendo mayor interés en los últimos años, lo cual promete un escenario futuro con importantes pasos hacia un mayor conocimiento de la enfermedad.

1.2.2- Enfermedad de Alzheimer

1.2.2.1- Características clínicas y neuropatológicas

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es la principal causa de demencia en el mundo (72% de los casos)⁶⁸. A nivel global, se estima que la incidencia de la demencia es de 10.7‰ mientras que la prevalencia asciende a 24 millones de personas⁶⁹. La edad es el mayor factor de riesgo para padecer demencia, de tal forma que la prevalencia se duplica cada 5 años a partir de los 65 años, llegando a alcanzar cifras del 17% en

poblaciones de edades comprendidas entre los 80 y 84 años y el 30% en pacientes mayores de 90 años^{70,71}. La EA tiene un gran impacto socioeconómico debido a la baja calidad de vida de sus pacientes y a los elevados costes destinados al cuidado de los mismos. Además, las perspectivas epidemiológicas se agravarán debido al aumento de la longevidad de nuestra sociedad y se estima que la incidencia en Europa se duplicará para el año 2040⁷¹.

Más del 90% de los casos de EA son esporádicos y no se observa un aumento en la producción de A β . El 10% restante corresponde a casos de EA familiar que presentan mutaciones que promueven la producción de PPA o su procesamiento por la vía amiloidogénica. Estas mutaciones pueden ocurrir en los genes de *PPA* (Ej. Mutación sueca (K670N/M671L)), *PSEN1* o *PSEN2* (Presenilina 1 y 2, complejos de α -secretasa) que generan el desarrollo de EA a una edad temprana (<60 años)⁵⁶.

Atendiendo a los aspectos fisiopatológicos, en la EA se observa una acumulación del péptido A β (mayoritariamente A β_{42}) en el parénquima cerebral (placas neuríticas) y una acumulación intracelular de la proteína TAU hiperfosforilada (hp-TAU). Esta acumulación produce neuroinflamación, muerte neuronal y por último, una evidente y progresiva pérdida de memoria que puede llegar a impedir la ejecución de la acción más simple (Figura 4).

La proteína TAU es una fosfoproteína que está codificada por el gen *PTAM* (Proteína TAU asociada a microtúbulos) y que en condiciones normales controla la polimerización de citoesqueleto formado de microtúbulos. En condiciones patológicas asociadas a EA, esta proteína aparece hiperfosforilada y tiende a formar agregados intracelulares (ovillos neurofibrilares) afectando principalmente a neuronas piramidales de la corteza e hipocampo⁵⁶.

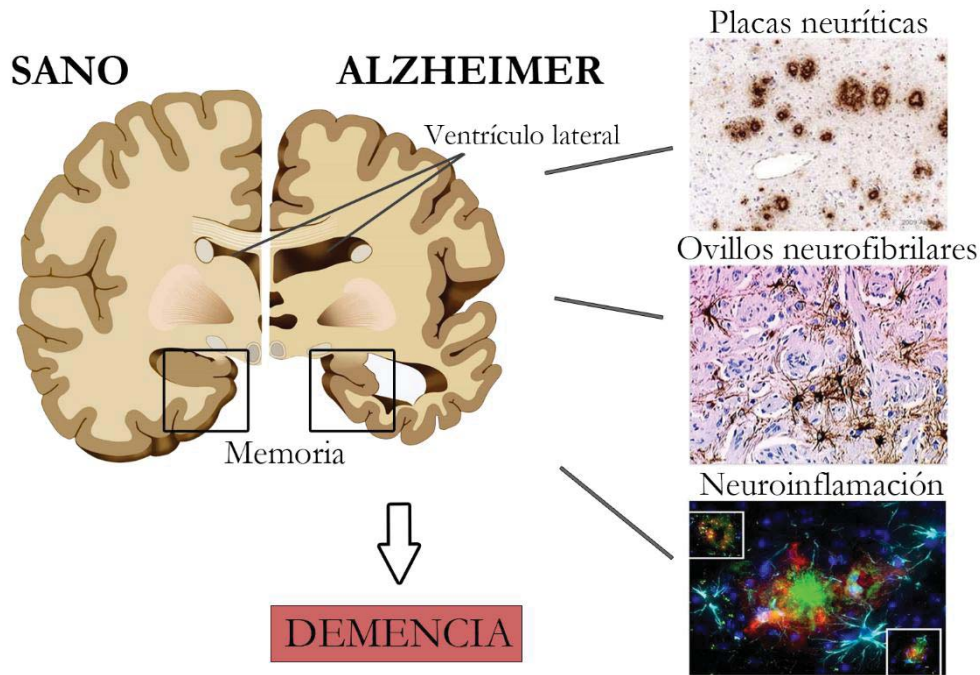


Figura 4: Representación gráfica de las características neuropatológicas de la Enfermedad de Alzheimer.

Atendiendo a las placas neuríticas, su presencia está prácticamente limitada a la sustancia gris. Sin embargo, su localización es dependiente de la fase de la enfermedad. En términos generales, la presencia de placas neuríticas comienza en el neocórtex extendiéndose hacia el hipocampo y la corteza entorrinal. Posteriormente aparece afectado el estriado y finalmente, en etapas muy avanzadas de la enfermedad, pueden aparecer placas neuríticas en el tronco cerebral y muy raramente en el cerebelo⁷². Estas placas neuríticas generan una respuesta neuroinflamatoria principalmente a cargo de la microglía y astrocitos que aparecen clásicamente rodeando los depósitos β -amiloides⁷³. A medida que avanza la enfermedad, los cerebros afectados con acumulación β -amiloide presentan una evidente atrofia cortical acompañada de un agrandamiento de los ventrículos⁷⁴ (Figura 4).

La aberrante acumulación de $A\beta$ y TAU hiperfosforilada genera una pérdida de la densidad sináptica cortical en enfermos de EA⁷⁵, lo cual ha sido catalogado como la

característica neuropatológica que mejor se correlaciona con el deterioro cognitivo⁷⁶. Por otra parte, la muerte neuronal es otro de los sellos de la enfermedad y afecta principalmente a la corteza entorrinal, donde en casos severos de la enfermedad, se puede llegar a perder el 90% del volumen neuronal⁷⁷.

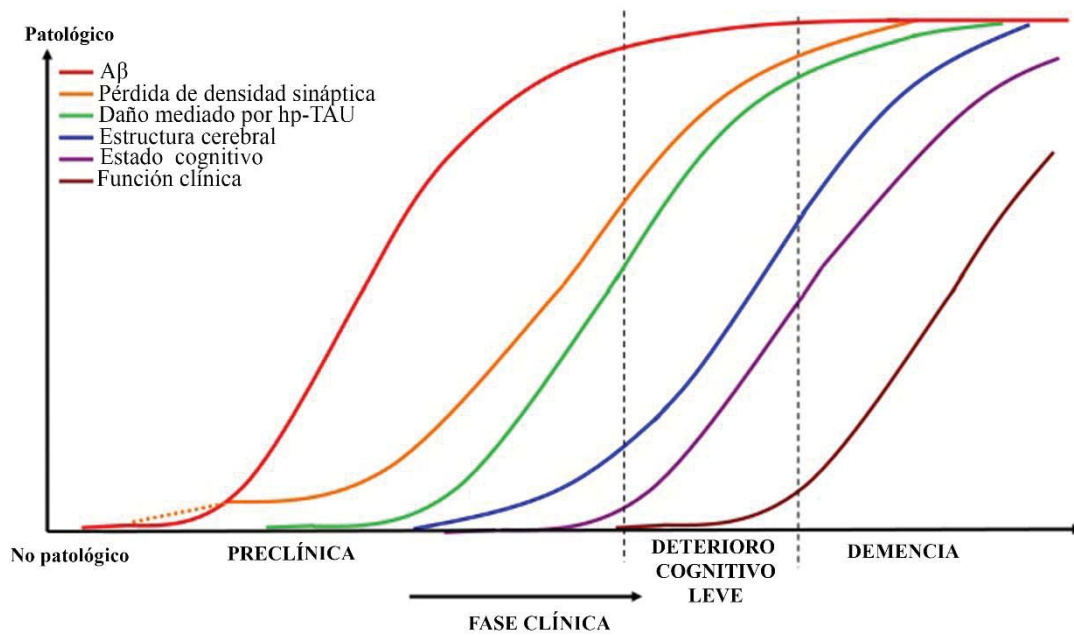


Figura 5: Hipótesis de la dinámica temporal de los distintos biomarcadores patológicos de la Enfermedad de Alzheimer. (Modificado de Jack *et al*, 2010⁷⁸ y Sperling *et al*, 2011⁷⁹).

Por otra parte, la EA se entiende como un proceso neurodegenerativo continuo en la que la acumulación de placas neuríticas u ovillos neurofibrilares en el lóbulo temporal medial pueden aparecer décadas antes de los primeros síntomas clínicos⁷⁹ (Figura 5). Los síntomas clínicos de la EA se pueden clasificar en dos grupos: “síndrome amnésico”, relacionado con lesiones en el hipocampo y “síntomas focales”, causados por lesiones en el neocórtex responsables de la agnosia visual y afasia progresiva entre otros⁵⁶. De este modo, los enfermos de EA presentan pérdida de la memoria episódica, impidiendo la habilidad de aprender y recordar nueva información, pérdida en aspectos de la memoria semántica asociada al uso del lenguaje y finalmente, en etapas avanzadas de la enfermedad, presentan déficits en la memoria funcional, afectado a la capacidad de concentración y mantenimiento de la atención⁸⁰.

1.2.2.2- Diagnóstico y terapia

El diagnóstico de EA definitivo requiere del análisis en tejido *post-mortem*. El criterio diagnóstico actual evalúa una combinación de tres escalas de alteraciones neuropatológicas en las que se clasifica la enfermedad en 4 fases de severidad ascendente. Estas escalas tienen en cuenta la topografía de la acumulación de placas neuríticas⁷², la topografía de localización de ovillos neurofibrilares⁸¹ y la densidad de placas seniles (CERAD, Consorcio para establecer un registro de EA^{82,83})^{84,85}.

Como ya se ha mencionado, las características neuropatológicas de la EA pueden comenzar décadas antes de los síntomas clínicos, por ello un diagnóstico temprano de la acumulación β -amiloide abriría una nueva ventana de actuación preventiva y terapéutica. En este sentido, el desarrollo de técnicas de imagen y biomarcadores han supuesto una auténtica revolución en el diagnóstico. La técnica de imagen PET (*Positron Emission Tomography*, Tomografía de emisión de positrones) es la más utilizada para el diagnóstico temprano de esta enfermedad. El radioligando PiB (Compuesto de Pittsburg B) ha sido el más utilizado para detectar depósitos de $A\beta$, aunque cada vez se están descubriendo nuevos radioligandos que también detectan depósitos de $A\beta$ cerebral (como Florbetapir (¹⁸F)) o medir distintos parámetros como neurodegeneración y depósitos de hp-TAU (aún en etapas preclínicas)⁸⁶. Por otra parte, la detección de $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$, así como hp-TAU y TAU total en LCR, son buenos biomarcadores para el diagnóstico de EA. En los pacientes de EA se observa una disminución del $\approx 50\%$ de $A\beta_{42}$ y un aumento de 2-3 veces de hp-TAU en LCR, mientras que los niveles de $A\beta_{40}$ no parecen alterados⁸⁷.

En cuanto a los tratamientos disponibles para la EA, existen fármacos inhibidores de la acetilcolinesterasa (Ej: Donezepilo, Galantamina) que favorecen la presencia del neurotransmisor acetilcolina en la hendidura sináptica y muestran eficacia leve pero significativa en términos de estado cognitivo acorde con el test *MMSE* (*MiniMental Stage Examination*, Examinación del estado MiniMental)⁸⁸. Además, el fármaco Memantina, un antagonista no competitivo de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), también es un fármaco disponible que ha mostrado una leve eficacia en la mejora del estado cognitivo en aquellos enfermos de EA en fase

moderada o severa previniendo los daños causados por exitotoxicidad^{89,90}. Por otra parte, diversas intervenciones psicosociales en los enfermos de EA también pueden tener un efecto beneficioso en el estado clínico general de los pacientes⁹¹. Sin embargo, los tratamientos aprobados actualmente tienen como objetivo tratar los síntomas y no son tratamientos modificadores de la enfermedad.

Debido al devastador impacto de la EA en la sociedad, el descubrimiento de una cura o tratamiento eficaz para la EA es uno de los mayores retos del Siglo XXI. En este sentido, los esfuerzos realizados por la comunidad científica han llevado al desarrollo de varios ensayos clínicos dirigidos a la EA. En total, actualmente hay 105 fármacos bajo estudio en ensayos clínicos de EA, de los cuales un 70% son terapias modificadoras de la enfermedad⁹². Debido a su complejidad, la búsqueda de un tratamiento eficaz se ha abordado mediante diversas estrategias terapéuticas: inmunización activa⁹³, tratamiento con inmunoglobulinas^{94,95}, inhibidores de γ - y β -secretasas⁹⁶, inhibidores de la hiperactividad neuronal⁹⁷, fármacos neuroprotectores, fármacos dirigidos al daño neuronal causado por hp-TAU⁹⁸ y estimulación cerebral⁹⁹, entre otros. Por desgracia, ninguno de estas estrategias ha demostrado hasta la fecha eficacia consistente en términos de beneficio cognitivo, aunque la mayoría de ellas sigue bajo investigación en diversos ensayos clínicos⁹⁰.

Dentro de este gran abanico de estrategias cabe destacar la inmunización pasiva como una de las estrategias más estudiadas englobando entorno al 25% del total de los ensayos clínicos activos en 2017⁹². La inmunización pasiva se refiere a la estrategia terapéutica basada en la infusión de anticuerpos que reconocen específicamente un epítipo activando la respuesta inmune. En el caso de la inmunización pasiva como estrategia para el tratamiento de la EA, se ha testado la eficacia de la infusión de varios anticuerpos que reconocen diferentes epítipos y conformaciones del péptido A β . La inmunización pasiva ha sido testada en modelos animales de EA obteniendo resultados muy prometedores en términos de disminución de carga amiloide cerebral, neuroinflamación y mejora de déficits de memoria¹⁰⁰⁻¹⁰². En este contexto, la eficacia de varios anticuerpos ha sido testada en ensayos clínicos en enfermos con EA, como Aducanumab (NCT01397539, Biogen), Crenezumab (NCT01723826, Genetech), Gantenerumab (NCT00531804,

Roche), Solanezumab (NCT00329082, Eli Lilly) ó Bapineuzumab (NCT00676143, Pfizer). Sin embargo, en términos generales los resultados de los ensayos clínicos no han sido positivos. Aunque algunos anticuerpos han demostrado capacidad para disminuir la cantidad de A β en cerebro, como Bapineuzumab (anticuerpo humanizado dirigido al péptido A β , NCT00676143, Pfizer), no se observaron diferencias en los parámetros de demencia y neurodegeneración¹⁰³. Además, el ensayo clínico de fase III con 901 participantes que se realizó con Bapineuzumab no consiguió reproducir los efectos de amiloramiento de carga β -amiloide cerebral¹⁰⁴. Más recientemente, se ha realizado un ensayo clínico de fase 1b con el anticuerpo Aducanumab (Biogen) que reconoce específicamente epítomos de agregados de A β tanto en oligómeros solubles como en agregados insolubles. En este ensayo, en pacientes de EA con fase prodrómica o leve, se observó una reducción significativa y dosis dependiente de los niveles cerebrales de A β analizado por PET, así como una ralentización de la progresión clínica medidos por los test Evaluación de la Demencia Clínica (EDC) y el test MiniMental (MMSE) (NCT: 01677572)¹⁰⁵. Hay que remarcar la importancia de estos resultados, ya que es la primera vez que un anticuerpo muestra eficacia deteniendo el declive cognitivo asociado a la enfermedad. Sin embargo, pese a lo prometedores que resultan estos resultados, la eficacia de Aducanumab será evaluada en un nuevo ensayo clínico de fase III con un mayor número de participantes, el cual se encuentra en fase de reclutamiento y sus primeros resultados se esperan para el año 2020 (NCT: 02484547).

Existen varias posibles hipótesis para explicar el fracaso de muchos de los anticuerpos contra diferentes fragmentos A β que han llegado a ser testados en enfermos de EA: por una parte se ha propuesto que la neurodegeneración y demencia generada por la enfermedad, no puede ser revertida por el tratamiento. Por ello, los nuevos ensayos clínicos, están dirigidos a pacientes con deterioro cognitivo leve o en fases prodrómicas de la enfermedad¹⁰⁶ (Figura 4). La otra hipótesis, es que la permeabilidad de los anticuerpos a cerebro es baja, de modo que disminuye la eficacia del fármaco. Por ello también se está estudiando, aún en una etapa preclínica, la posibilidad de vehiculizar los anticuerpos a cerebro¹⁰⁷.

Por otra parte, es importante mencionar que la inmunización pasiva no ha resultado segura en muchos casos y paradójicamente se ha relacionado con complicaciones relacionadas con AAC. Tras el tratamiento de muchos de los anticuerpos testados en ensayos clínicos como Bapineuzumab y Aducanumab, se observaron anomalías de imagen asociadas a amiloide (ARIA, *amyloid-related imaging abnormalities*). Algunos pacientes presentaron edema vasogénico (ARIA-E), mientras que otros mostraron además microhemorragias (ARIA-H), proponiendo que la inmunoterapia dirigida a A β causa una disrupción de los vasos afectados con AAC⁶⁴. Contradictoriamente, estos efectos secundarios se han relacionado precisamente con la eficacia de los anticuerpos promoviendo el aclaramiento de A β , ya que la salida masiva de A β de cerebro en un contexto de vasculatura debilitada por AAC podría explicar la aparición de los ARIA¹⁰⁸. Sin embargo, el mecanismo subyacente y la importancia clínica de estos efectos indeseados aún están bajo investigación.

1.3- Modelos animales de β -amiloidosis cerebral

La aparición de modelos animales de β -amiloidosis cerebral supuso un gran avance para el estudio de la AAC y EA; tanto para el estudio de los mecanismos subyacentes como para el estudio preclínico de tratamientos potenciales. Existen más de 100 modelos con modificaciones genéticas para el estudio de estas enfermedades. Los modelos más utilizados se basan en la modificación de los genes *PPA* y *PSEN1* (Ej: Modelos murinos APP23¹⁰⁹APP/PS1¹¹⁰etc), que provocan una mayor expresión neuronal de *PPA* así como un mayor procesamiento por la vía amiloidogénica, lo cual desemboca en una mayor producción del péptido A β . El gran abanico de modelos animales disponible permite elegir un modelo animal óptimo dependiendo de los objetivos del estudio (www.alzforum.org/research-models).

Para el caso de AAC, no existe un modelo que permita imitar las características neuropatológicas de la enfermedad esporádica. Sin embargo, existen varios modelos murinos de EA que presentan depósito vascular amiloide, permitiendo estudiar de

forma parcial el AAC, así como la relación entre los depósitos parenquimales y vasculares. Sin embargo, cabe destacar la existencia del modelo de ratón *APPDutch*, que sobreexpresa la PPA con la mutación holandesa (E693Q) bajo el promotor *Thy1* y presenta únicamente depósito amiloide en la vasculatura leptomenígea y cortical (>23 meses), así como eventos hemorrágicos y neuroinflamación, sin presencia de placas amiloides en el parénquima¹¹¹. Sin embargo, la avanzada edad a la que se comienza el depósito de A β vascular hace complejo su uso en investigación. Por otra parte, el modelo de ratón Tg-SwDI sobreexpresa la proteína PPA bajo el promotor *Thy1* con las mutaciones sueca (K670N/M671L), holandesa (E693Q) y Iowa (D694N). Estos ratones presentan placas difusas en el parénquima y especialmente afectación amiloide en la microvasculatura cerebral a partir de los 3 meses junto con déficits de memoria, pero sin demasiada afectación hemorrágica^{112,113}.

En este contexto, gran parte de los experimentos presentados en esta tesis se han realizado con el modelo de ratón APP23 (Novartis), que permite estudiar las patologías de EA y AAC. Estos animales con origen genético C57/BL6 expresan de forma hemizigota la proteína PPA humana (isoforma 157) con la mutación sueca (PPA KM670/671NL) bajo el promotor neuronal *Thy1* de ratón. Este ratón expresa siete veces más PPA con la mutación sueca principalmente en áreas corticales y en hipocampo (Figura 6).

Así, estos ratones presentan acumulación de A β_{40} y A β_{42} , aunque tal y como ocurre en humanos, la liberación del péptido A β_{40} es mucho más abundante¹¹⁴. En cuanto a sus características neuropatológicas, los animales presentan placas neuríticas a partir de los 8 meses de edad y β -amiloide vascular a partir de los 12 meses¹¹⁵. La carga amiloide en parénquima y vasos aumenta con la edad tanto en número como en tamaño en corteza e hipocampo¹¹⁶. En animales mayores de 2 años también se pueden detectar placas en el tálamo y en diversas áreas cerebrales, a excepción del cerebelo¹¹⁴. Además, tal y como ocurre en enfermos de Alzheimer, los niveles de A β en CSF disminuyen con la edad, mostrando diferencias significativas a partir de los 16 meses¹¹⁵.

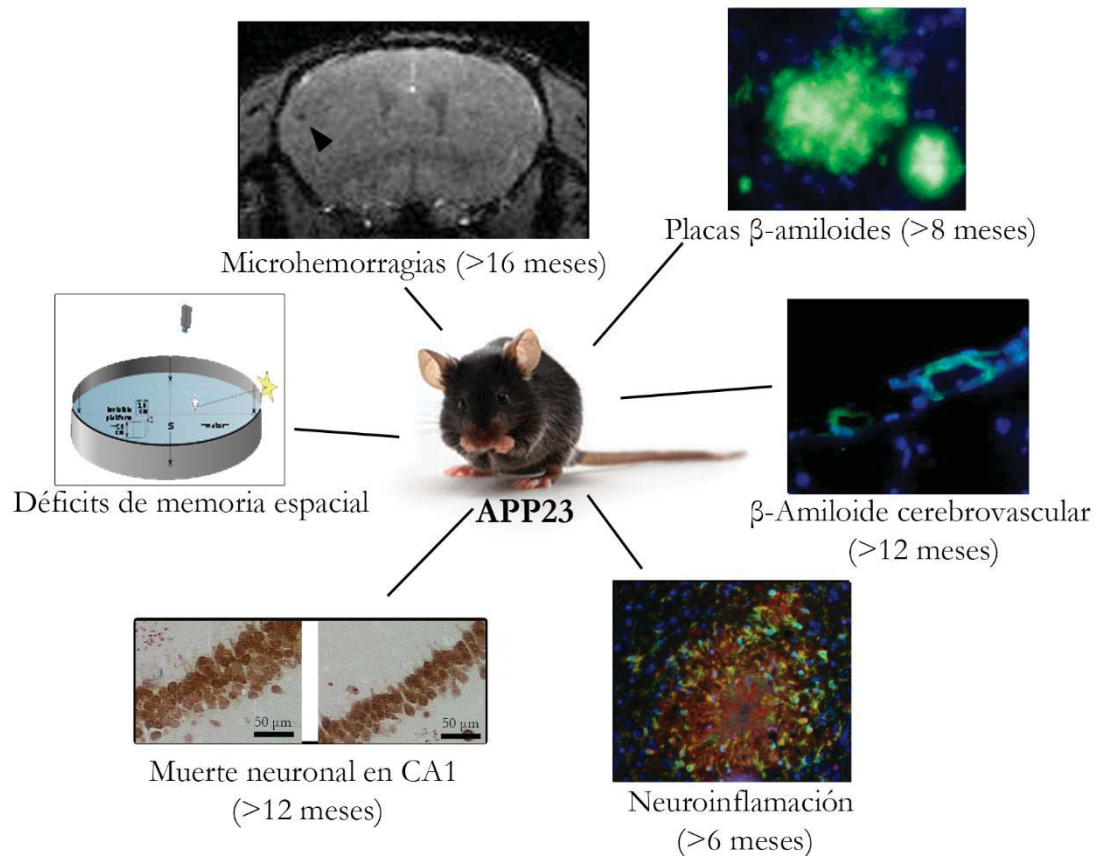


Figura 6: Características neuropatológicas de APP23.

Por otra parte, el modelo APP23 presenta niveles elevados de neuroinflamación con activación astrocitaria y microglial alrededor de las placas amiloides¹¹⁷. Finalmente, este modelo de ratón también muestra otras características neuropatológicas compartidas con la EA como muerte neuronal en CA1¹¹⁸; y con la AAC, ya que los ratones APP23 presentan microhemorragias a edad avanzada (>15 meses)¹¹⁹. La presencia de microhemorragias está íntimamente relacionada con la severidad de AAC, ya que la presencia de β -amiloide vascular afecta a los vasos produciendo angitis y pérdida de músculo liso favoreciendo su ruptura¹²⁰. Por ello, debido a la elevada afectación β -amiloide vascular que presenta el modelo de ratón APP23, es el modelo más utilizado para el estudio de los micro-sangrados espontáneos debidos a AAC^{119,120}. Sin embargo, estos ratones no presentan ovillos neurofibrilares fruto de la agregación de hp-TAU, aunque sí se observa hiperfosforilación de TAU¹¹⁵. Estos eventos neuropatológicos provocan déficits cognitivos evaluables mediante distintos

test comportamentales que permiten medir la memoria espacial (Ej: T-maze, RAM, Morris Water Maze), memoria ejecutiva (Ej: tareas de alternancia, aprendizaje invertido)¹²¹ entre otros (Figura 6).

1.4- Implicación del metabolismo lipídico en la β -amiloidosis cerebral

El desarrollo de técnicas de genómica, como los estudios de asociación del genoma completo (*Genome-wide association studies*, GWAS), han permitido arrojar luz sobre variantes genéticas o polimorfismos de un solo nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs) relacionados con factores de riesgo para padecer β -amiloidosis esporádica.

Estos *loci* de riesgo para la EA pueden ser agrupados en función de los procesos biológicos en los que estén implicados. Los más validados son *loci* implicados en la respuesta inmune (*CR1*, *HLA-DRB1*, *EPHA1*, *TREM2* y *TRIP4*), *loci* implicados en endocitosis y tráfico vesicular (*BIN1*, *CD2AP*, *PICALM* y *SORL1*) y *loci* implicados en el metabolismo lipídico (*APOE*, *CLU*, *ABCA7* y *PLD3*)¹²².

Por otro lado, varias observaciones clínicas también han propuesto la importancia de la homeostasis del metabolismo lipídico periférico en el contexto de la β -amiloidosis cerebral. Por ello, el estudio de dicho metabolismo ha adquirido gran interés en la última década.

1.4.1- Las lipoproteínas

Las lipoproteínas son un ensamblaje bioquímico compuesto por lípidos y proteínas. Más concretamente, la fracción proteica mayoritaria son las apolipoproteínas; una clase de proteína que es capaz de emulsionar fosfolípidos posibilitando su movimiento en un medio acuoso. Las lipoproteínas son esféricas y están formadas por una envoltura compuesta de fosfolípidos, colesterol no esterificado y

apolipoproteínas, y por un núcleo hidrófobo compuesto de colesterol esterificado y triglicéridos¹²³. Existen diferentes clases de lipoproteínas que se diferencian en su composición lipídica, tipo de apolipoproteína, tamaño y densidad (Figura 7).

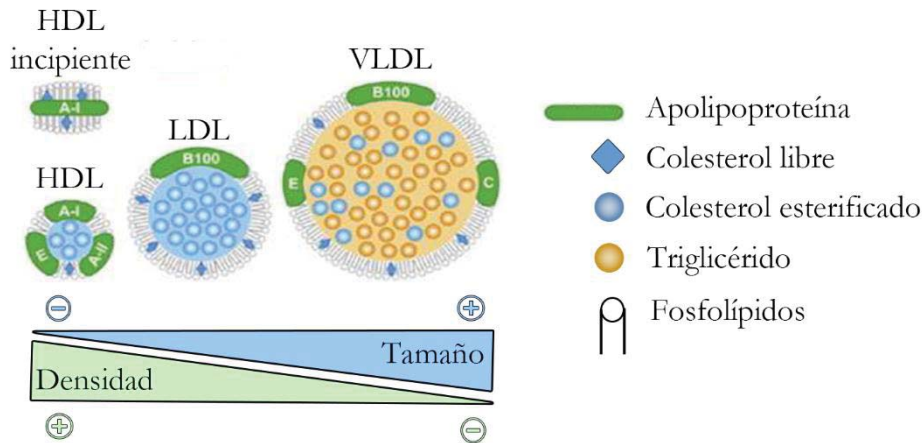


Figura 7: Clasificación y composición de las lipoproteínas (Modificada de Bricarello et al, 2010¹²³).

Las lipoproteínas se clasifican clásicamente en función de su densidad, la cual es inversamente proporcional a su tamaño. Las más densas son las lipoproteínas de alta densidad (*High Density Lipoproteins*, HDL, $d= 1.063-1.250$ mg/ml); tienen un alto ratio proteína/lípido ya que contienen muy bajos niveles de triglicéridos y colesterol esterificado. Su tamaño se encuentra dentro de una horquilla de 8-12 nm de diámetro y la apolipoproteína mayoritaria es Apolipoproteína A-I (ApoA-I). Las lipoproteínas de baja densidad (*Low Density Lipoproteins*; LDL, $d= 1.019-1.063$ mg/ml), tienen niveles bajos de triglicéridos y niveles altos de colesterol esterificado, su tamaño es de 18-35 nm y la apolipoproteína mayoritaria es la Apolipoproteína B-100 (ApoB-100). Por último, las lipoproteínas de muy baja densidad (*Very Low Density Lipoproteins*, VLDL, $d= 950-1.006$ mg/ml) son las menos densas y por tanto las de mayor tamaño (35-80nm). Son muy ricas en triglicéridos y pobres en colesterol esterificado y las apolipoproteínas mayoritarias son ApoB-100, ApoE y ApoC (Figura 7)^{124,125}.

El rol más descrito y estudiado de las lipoproteínas es realizar el transporte reverso de colesterol (TRC), transfiriendo colesterol esterificado y triglicéridos de tejidos de

la periferia al hígado para su eliminación. Este proceso comienza por la biogénesis de HDLs mediante la lipidación de ApoA-I a través de ABCA1¹²⁶. Las proteínas LCAT (Lecitin Colesterol Acil Transferasa)¹²⁷ y CETP (*Cholesteryl-ester Transfer Protein*, Proteína de transferencia de colesterol éster)¹²⁸ transfieren colesterol esterificado de células de la periferia a las HDL madurándolas a LDLs o VLDLs. Finalmente, a través de la interacción de las lipoproteínas con los receptores LDLR¹²⁹ y SRB-I¹³⁰ altamente expresados en el hígado, se transportan los triglicéridos y ésteres de colesterol de la lipoproteínas para su metabolismo. Los niveles de HDL circulantes son clave para la homeostasis del metabolismo lipídico¹³¹. Así, el buen funcionamiento de este mecanismo es esencial para la prevención de enfermedades cardiovasculares¹³² o la Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2)¹³³.

1.4.2- Metabolismo lipídico en el cerebro: Un nexa con la β -amiloidosis cerebral

El cerebro es el órgano más rico en colesterol del cuerpo humano conteniendo hasta el 25% del colesterol total¹³⁴. Estos elevados niveles de colesterol se deben principalmente a los elevados requerimientos de colesterol no esterificado de los oligodendrocitos para la formación de mielina, siendo indispensable para el buen funcionamiento de la transmisión sináptica¹³⁵. Sin embargo, el colesterol presente en el Sistema Nervioso Central (SNC) se sintetiza *de novo* en cerebro, ya que debido a la presencia de la BHE el metabolismo del colesterol está separado de la periferia¹³⁶. De la misma manera, la población de lipoproteínas también está significativamente separada de la periferia debido a que la mayoría de las LDL y VLDL no son capaces de atravesar la BHE. Sin embargo, algunas HDL parece que sí pueden sortear la BHE, lo cual explica la presencia de HDL asociadas a ApoA-I en el SNC pese a que esta apolipoproteína no se expresa en cerebro¹³⁷. Así, como ocurre para la biosíntesis de colesterol, la mayoría de las lipoproteínas cerebrales también se generan dentro del propio SNC. Los astrocitos y la microglía secretan las apolipoproteínas mayoritarias en cerebro (ApoE y ApoJ/Clusterin) y median la

biogénesis de lipoproteínas a partir de estas dos apolipoproteínas mayoritarias a través de transportadores de la familia ABC (Ej: ABCA1, ABCA8, ABCG1). Este proceso continúa con su maduración a través de LCAT y CETP^{138,139}. El rol de las lipoproteínas en cerebro es complejo y poco comprendido, aunque parecen participar en diversos procesos fisiológicos, siendo necesarias para la homeostasis cerebral y participando en la plasticidad sináptica¹⁴⁰ y balance energético^{141,142}.

Debido a las propiedades antioxidantes¹⁴³, antiinflamatorias y vasoprotectoras¹⁴⁴ que presentan las HDL, se cree que variaciones en el metabolismo lipídico¹⁴⁵ y en los niveles de HDL en la periferia pueden tener un efecto en la homeostasis cerebral. Esta idea parece estar apoyada por observaciones realizadas en un modelo experimental de EA y AAC (ratones transgénicos APP23)^{146,147}, en el que se ha descrito que una dieta crónica rica en grasa incrementó la carga amiloide cerebral así como el deterioro cognitivo, alterando el lipidoma cerebral y la expresión de genes reguladores de la apoptosis. En esta misma línea, ratones APP23 deficientes de ABCA1 (transportador principal encargado de la biogénesis de lipoproteínas) presentaron una mayor acumulación β -amiloide cerebral¹⁴⁸, mientras que su sobreexpresión promovió una bajada en la carga β -amiloide¹⁴⁹. Estos resultados también se han observado en el modelo experimental de EA APP/PS1 deficientes de ABCA7¹⁵⁰, en el que se observó un agravamiento en la acumulación de β -amiloide cerebral.

Por otra parte, el nexo entre el metabolismo lipídico y la acumulación de A β cerebral también ha sido demostrado en diferentes investigaciones clínicas en las que se ha relacionado un bajo contenido de HDL en plasma con el estado cognitivo de los pacientes. En un estudio con más de 75.000 participantes se observaron niveles más bajos de HDL en los pacientes que presentaron demencia¹⁵¹ y en un estudio longitudinal se observó que aquellos sujetos con altos niveles de HDL (>56 mg/ml) tenían menos riesgo para desarrollar EA¹⁵². Además, niveles bajos de HDL y altos de LDL se han relacionado con β -amiloidosis cerebral¹⁵³. Por otra parte, enfermedades caracterizadas o relacionadas con dislipidemia, como arterosclerosis¹⁵⁴, hipercolesterolemia¹⁵³, hipertensión¹⁵⁵ y DMT2¹⁵⁶, se han identificado como factores de riesgo para padecer deterioro cognitivo y/o EA.

1.5- El rol de las apolipoproteínas en la β -amiloidosis cerebral

Como se ha mencionado anteriormente, las apolipoproteínas son la fracción proteica de las lipoproteínas. Algunas de estas apolipoproteínas, principalmente las más expresadas en cerebro (ApoE y ApoJ) y también la apolipoproteína mayoritaria en las HDL circulantes (ApoA-I) tienen una implicación contrastada en la β -amiloidosis cerebral.

1.5.1- Apolipoproteína E (ApoE)

ApoE es una glicoproteína de 36 KDa altamente expresada en hígado. Es la apolipoproteína mayoritaria en cerebro y es principalmente secretada por astrocitos y microglía, aunque las neuronas también son capaces de secretarla¹⁵⁷. El estudio de esta proteína ha recibido gran atención debido a que el genotipo *APOE* se considera el mayor factor de riesgo para padecer Alzheimer y AAC esporádicos. Se distinguen tres alelos del gen *APOE*: *E2* (C112-C158), *E3* (C112-R158) y *E4* (R112-R158) los cuales alteran significativamente la funcionalidad de la proteína^{157,158} e influyen en el metabolismo del péptido A β . De esta manera, el alelo *E4* se ha relacionado con un mayor riesgo para padecer β -amiloidosis cerebral¹⁵⁸, mientras que el alelo *E2* se ha considerado clásicamente protector frente a EA. Sin embargo, el alelo *E2* también se ha asociado como un factor de riesgo para padecer sangrados HIC asociados a AAC^{159,160}. Además, ApoE colocaliza con las placas neuríticas y con los vasos afectados por AAC^{161,162}. Pese a que el rol de ApoE en la β -amiloidosis cerebral ha sido extensamente estudiado, hasta la fecha no existe consenso sobre el papel concreto que juega esta proteína. Pese a que la capacidad de ApoE de interactuar con el péptido A β se ha propuesto frecuentemente¹⁶³, no se conoce si esta unión previene o facilita la fibrilización, habiéndose obtenido resultados contradictorios^{164,165}. Por otro lado, el rol de ApoE modulando la salida de A β a través de la BHE mediante el receptor LRP1 también ha sido propuesto¹⁵⁷, reportando diferencias de rendimiento en este proceso entre los diferentes alelos

($E2 > E3 > E4$)¹⁶⁶. Sin embargo, otros estudios han observado que la capacidad de interacción de ApoE con $A\beta$ es casi nula en condiciones fisiológicas y que la modulación de ApoE sobre la eliminación de $A\beta$ sería compitiendo por la unión al receptor LRP1 en los astrocitos¹⁶⁷.

El rol de ApoE también ha sido evaluado en modelos animales de β -amiloidosis cerebral. Así, se observó que la deficiencia (*Knock Out, KO*) del gen *ApoE* en el modelo de β -amiloidosis PDAPP provocó una disminución de la acumulación cerebral de $A\beta$ junto con una ausencia casi completa de placas amiloides y neuritas distróficas¹⁶⁸. Sin embargo, la expresión de *APOE* humana en el modelo PDAPP tanto deficientes como no deficientes para *ApoE* murina, retrasó de forma significativa la acumulación del péptido $A\beta$. Además este efecto fue muy sensible a la variante de *APOE* que se expresara ($E2$, $E3$ o $E4$)¹⁶⁹. Estos resultados evidencian que ApoE tiene un rol significativo influenciando el depósito del material β -amiloide. Sin embargo, el mecanismo subyacente es complejo y sigue bajo investigación¹⁵⁷. El papel relevante de ApoE en la β -amiloidosis cerebral propone su potencialidad como diana terapéutica. Sin embargo, actualmente existen muchos interrogantes que se interponen en ello. Entre estos interrogantes, el más palpable es que pese a los grandes esfuerzos realizados, aún no existe acuerdo en si es mejor aumentar o disminuir los niveles de ApoE humana con el objetivo de disminuir los niveles de $A\beta$ cerebral. Por ello, futuros estudios con modelos animales que arrojen luz sobre este asunto tendrán un gran impacto en el mejor conocimiento de la patología.

1.5.2-Apolipoproteína A-I (ApoA-I y ApoA-I-M)

ApoA-I es la apolipoproteína mayoritaria asociada a las partículas HDL en sangre (≈ 116 mg/dl)¹⁷⁰. Esta proteína extracelular de 28 KDa se expresa y secreta mayoritariamente en hígado e intestino delgado y su estructura es muy rica en hélices- α permitiendo su unión a fosfolípidos para la formación de partículas HDL. Su función más descrita es el rol central en el TRC por lo que ha adquirido una gran importancia clínica en enfermedades cardiovasculares. Por otro lado, su capacidad

de interaccionar en diversas rutas bioquímicas la convierten en una proteína multifuncional. Es este sentido, a parte de su rol central en el metabolismo lipídico, se le atribuyen funciones antiinflamatorias y vasoprotectoras^{171,172}.

Pese a que ApoA-I no se expresa en cerebro, ApoA-I se encuentra en LCR y su rol en la β -amiloidosis cerebral ha sido discutido recientemente. Por un lado, el polimorfismo G75A en el promotor del gen *APOA1* se ha descrito como un factor de riesgo para desarrollar EA y se asocia con el deterioro cognitivo^{173,174}. Además, ApoA-I aparece ocasionalmente en depósitos cerebrales de $A\beta^{175}$ y se han detectado bajos niveles circulantes de ApoA-I en suero y plasma de enfermos de EA¹⁷⁶⁻¹⁷⁸. En pacientes con deterioro cognitivo leve, niveles bajos de ApoA-I circulante y altos en LCR se han relacionado con riesgo para la progresión de la demencia, especialmente en pacientes con el polimorfismo E4 en el gen *APOE*¹⁷⁹. Finalmente, los niveles de circulantes de ApoA-I se correlacionan con los niveles plasmáticos de $A\beta_{40}$ en casos de AAC¹⁸⁰.

Por otra parte, ApoA-I es capaz de unirse a $A\beta_{40}$ formando complejos estables previniendo su agregación y citotoxicidad *in vitro*^{181,182}. Pese a estas evidencias, ratones mutantes deficientes para *Apoa1* en el modelo murino de EA (PDAPP) no mostraron ninguna diferencia en la carga amiloide cerebral¹⁸³. Años más tarde, la importancia del nexo existente entre la β -amiloidosis cerebral y ApoA-I volvió a proponerse debido a un estudio en el que se administró un péptido mimético de ApoA-I conjuntamente con estatinas en un modelo murino de EA (APP/PS1). En este estudio se observó una mejora del deterioro cognitivo y de la carga amiloide cerebral, así como una bajada en los marcadores de neuroinflamación¹⁸⁴. Posteriormente, dos estudios independientes en 2010 terminaron de consolidar la implicación de ApoA-I sobre la β -amiloidosis cerebral. Ratones del modelo APP/PS1 deficientes para *Apoa1* presentaron un mayor empeoramiento de la función cognitiva. Estos resultados no se pudieron explicar por un cambio en la carga amiloide cerebral, aunque sí se observó un aumento de la carga amiloide vascular o AAC¹⁸⁵. Por otro lado, la sobreexpresión de ApoA-I en el modelo murino APP/PS1, se tradujo en una prevención del deterioro cognitivo. La carga amiloide cerebral tampoco se vio afectada por la sobreexpresión de *Apoa1* aunque,

de nuevo, se observó una disminución en la carga amiloide vascular¹⁸⁶. Estos resultados, plantean la hipótesis de que ApoA-I tiene un rol protector en la β -amiloidosis cerebral especialmente en relación al β -amiloide vascular o AAC.

1.5.2.1- Apolipoproteína A-I-Milano

ApoA-I-Milano (ApoA-I-M) es una variante genética natural del gen *APOA1* descrita en una familia del norte Italia, producida por la sustitución de una arginina por una cisteína en la posición 173 (R173C)^{187,188}. La mutación R173C parece alterar significativamente el comportamiento de la proteína. De este modo, los portadores de la mutación presentan niveles bajos de colesterol asociado a partículas HDL y una hipertriglicemia moderada¹⁸⁹. Este perfil lipídico ha sido ampliamente identificado como un factor de riesgo para padecer aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares. Paradójicamente, los portadores de la mutación Milano presentaban una protección frente a estas enfermedades, por lo que ApoA-I-M se concibe como una variante beneficiosa y protectora frente a enfermedades cardiovasculares. Esta idea ha sido reforzada por varios estudios en los que ApoA-I-M ha demostrado eficacia previniendo aterosclerosis en distintos modelos animales (ratones ApoE^{-/-} con dietas altas en grasa y conejos Nueva Zelanda sometidos a una dieta rica en colesterol y sometidos a dos denudaciones aórticas)¹⁹⁰⁻¹⁹². En el mismo sentido, ApoA-I-M ha mostrado propiedades antiinflamatorias y vasoprotectoras únicas en distintos modelos animales de aterosclerosis. Así, la administración de ApoA-I-M disminuyó la estenosis aórtica en un modelo de aterosclerosis murino, previniendo su estrechamiento y calcificación, además de mostrar una gran capacidad antiinflamatoria en un modelo *in vitro* a partir de válvulas aórticas porcinas¹⁹³. La capacidad antiinflamatoria de ApoA-I-M parece superar la propia de ApoA-I-tipo salvaje (*wild type*, ApoA-I-wt)¹⁷². Así se ha demostrado en estudios previos en los que la administración de ApoA-I-M en un modelo de aterosclerosis de conejo, fue más eficaz que la administración de ApoA-I-wt previniendo la presencia de macrófagos en la placa aterótica aórtica, además de ser más eficaz disminuyendo marcadores de inflamación¹⁹². Las propiedades vasoprotectoras de

ApoA-I-M también se han observado un el modelo murino de aterosclerosis (ratones deficientes de ApoE), en el que la administración de ApoA-I-M mejoró de forma significativa la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio. Además, este mismo estudio observó que ApoA-I-M es más eficaz que la variante ApoA-I-wt mejorando la respuesta vasodilatadora en un modelo *in vitro* a partir de arterias carótidas de conejo¹⁹⁴. Por último, ApoA-I-M también parece tener mayores propiedades antioxidantes que ApoA-I-wt, ya que ApoA-I-M fue más eficaz previniendo la oxidación de fosfolípidos *in vitro*¹⁹⁵.

Aunque el mecanismo de acción subyacente se ha estudiado en profundidad, cabe destacar la existente falta de consenso respecto a los cambios en la funcionalidad que genera la mutación. Algunos estudios han mostrado una mayor capacidad de ApoA-I-M de promover el eflujo de colesterol^{196,197}, pese a que otros estudios no han mostrado diferencias^{198,199}. Estructuralmente, se ha descrito un aumento en el contenido de hélices- α ²⁰⁰, aunque estos resultados tampoco son consistentes¹⁹⁶. Por otra parte, se ha descrito que ApoA-I-M es capaz de formar homodímeros mediante puentes disulfuro²⁰¹, lo que le aporta la capacidad de generar HDL de distintos tamaños que podrían tener distintas capacidades de interacción con receptores como ABCA1 y diferente catabolismo^{202,203}.

1.5.2.2- Estrategias terapéuticas basadas en ApoA-I-wt y ApoA-I-M

Como ya se ha mencionado con anterioridad, ApoA-I juega un rol central en el metabolismo lipídico y en la prevención de enfermedades cardiovasculares. Por ello, tanto ApoA-I-wt como la variante genética ApoA-I-M han sido utilizadas como estrategias terapéuticas en ensayos clínicos dirigidos a enfermedades cardiovasculares.

La eficacia de dos fármacos basados en ApoA-I-wt lipidada están siendo estudiados en ensayos clínicos. Por una parte, el efecto del fármaco CER-001 (Cerenis therapeutics S.A) se ha analizado en un ensayo clínico de fase II en pacientes con síndrome coronario agudo (NCT: 01201837). En base a los resultados prometedores

obtenidos, en los próximos meses se harán públicos los resultados de un nuevo ensayo clínico recientemente finalizado (NCT02484378)²⁰⁴. Por otra parte, el fármaco CSL-112 (CSL Behring S.A), también basado en la ApoA-I-wt purificada de plasma lipídada está en fase de desarrollo clínico en el que se están obteniendo resultados prometedores. Este fármaco ha mostrado ser seguro tras la administración en pacientes en fase aguda de infarto de miocardio y en pacientes con aterosclerosis crónica, así como ser eficaz promoviendo el eflujo de ésteres de colesterol (NCT: 021008262 y 01499420) ^{205,206}. El impacto terapéutico de CSL-112 sigue bajo investigación.

También se ha estudiado la eficacia de ApoA-I-M lipídada con el fármaco ETC-216 desarrollado por Pfizer y posteriormente adquirido y mejorado por The Medicines Company, siendo renombrado como MDCO-216. Este fármaco se basa en la formulación de ApoA-I-Milano recombinante producida de *Escherichia coli* (*E. coli*) con fosfolípidos POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)²⁰⁷. Por un lado, la administración intravenosa de ETC-216 en pacientes con síndrome coronario agudo redujeron el volumen de la placa aterótica²⁰⁸. Por otro lado, una sola dosis de MDCO-216 fue suficiente para generar cambios significativos en la composición de las lipoproteínas y promover la movilización de ésteres de colesterol ^{207,209}. Además, recientemente ha finalizado un ensayo clínico randomizado en pacientes con síndrome coronario agudo en el que se testó la eficacia de MDCO-216 reduciendo el volumen aterótico total como objetivo primario. Sin embargo, aunque el tratamiento resultó seguro, el tratamiento con MDCO-216 no mostró diferencias en la reducción del volumen aterótico total (NCT02678923).

Pese a que los beneficios de ApoA-I-M han sido profundamente estudiados en el contexto de las enfermedades cardiovasculares, su rol en la β -amiloidosis cerebral no ha sido estudiado hasta la fecha. Debido a la documentada implicación de ApoA-I en la β -amiloidosis cerebral y el avanzado estado de desarrollo de fármacos basados en ApoA-I-M (MDCO-216), el estudio de los posibles beneficios de la administración de ApoA-I-M en modelos de EA y AAC podría tener un impacto importante como futura estrategia terapéutica.

1.5.3-Apolipoproteína J (ApoJ)

ApoJ, también conocida como clusterin (Clu) y codificada en el gen *CLU*, es la segunda apolipoproteína más expresada en cerebro después de ApoE. ApoJ es una proteína multifuncional, altamente glicosilada y heterodimérica de ≈ 80 KDa, compuesta por dos subunidades unidas por puentes disulfuro (α y β , ≈ 40 KDa). Debido a su naturaleza de apolipoproteína, ApoJ puede aparecer libre o formando partículas HDL en el torrente sanguíneo. Así, se estima que un 20% de la ApoJ circulante va unida a HDLs^{210,211}. ApoJ también aparece en forma lipídada en el SNC ya que se han detectado lipoproteínas asociadas a ApoJ en LCR²¹². Estas lipoproteínas asociadas a ApoJ parecen sintetizarse *de novo* en cerebro secretadas por los astrocitos y microglía y han sido descritas como lipoproteínas densas ricas en fosfolípidos y pobres en colesterol esterificado^{213,214}. Sin embargo, a día de hoy, el rol específico de las lipoproteínas asociadas a ApoJ en cerebro es prácticamente desconocido.

ApoJ participa en diversas rutas bioquímicas, como en la modulación de la respuesta inmune inhibiendo la activación de la ruta del complemento²¹⁵, modulando la migración de células endoteliales y favoreciendo la fagocitosis de restos de células necróticas²¹⁶. Una de las principales propiedades de ApoJ es su rol como chaperona natural, uniéndose a proteínas con un plegamiento defectuoso y previniendo su agregación. De esta manera, ApoJ codeposita con $A\beta$ fibrilar en placas neuríticas y vasos cerebrales^{217,218} y se han detectado complejos $A\beta$ -ApoJ en LCR y plasma^{219,220}. La importancia de ApoJ en la β -amiloidosis cerebral se ha consolidado gracias a estudios GWAS en los variantes del gen *CLU* se han identificado como factor de riesgo para padecer EA^{221,222}. De hecho, la variante genética rs11136000^C en el gen *CLU*, provoca una menor expresión de la proteína y se ha identificado como un factor de riesgo para padecer EA, mientras que la variante rs11136000^T genera mayor expresión de *CLU* y se ha identificado como una variante protectora frente a EA^{223,224}. En este sentido, niveles altos de ApoJ en plasma se han relacionado con mayor prevalencia y severidad de EA^{225,226}. De esta manera, la detección de elevados

niveles circulantes de ApoJ, se ha interpretado como una respuesta protectora frente a la patología.

Por otra parte, se ha propuesto que ApoJ tiene un efecto directo sobre la agregación del péptido A β y su aclaramiento. Así, varios estudios *in vitro* han demostrado que ApoJ es muy eficaz uniéndose al péptido A β formando complejos estables y previniendo el elongamiento de las fibras β -amiloides^{32,227,228}. Cabe mencionar que esta capacidad de prevención de la agregación es muy sensible al ratio ApoJ:A β , ya que un ratio bajo parece favorecer la fibrilización de A β , mientras que una mayor proporción de ApoJ previene de forma muy eficaz la agregación²²⁹. Además, acorde a resultados experimentales *in vivo*, el complejo ApoJ:A β se elimina de forma más eficaz a través de la BHE mediante el receptor LRP2/megalin que el péptido A β libre^{13,230}. Finalmente, también se ha propuesto que ApoJ puede facilitar la fagocitosis del péptido A β por parte de la microglía a través de la interacción con el receptor TREM2¹⁴, aunque otros estudios proponen que ApoJ dificulta la absorción de A β por la glía²³¹.

Sin embargo, el rol protector de ApoJ también ha sido discutido. En este sentido, ratones PDAPP deficientes para *Clu*, presentaron un menor número de depósitos amiloides, aunque el contenido de A β total no disminuyó²³². Curiosamente, ratones PDAPP doblemente deficientes para *ApoE* y *Clu*, mostraron un aceleramiento severo de la β -amiloidosis cerebral, mientras que los animales deficientes solamente para *ApoE* o *Clu* no mostraron cambios en la carga β -amiloide total, proponiendo que ApoJ y ApoE están conjuntamente implicados en los mecanismos de aclaramiento de A β ¹⁶⁵. Más recientemente, un estudio en ratones APP/PS1 deficientes para *Clu*, mostró una significativa disminución de depósitos de A β parenquimales, mientras que los depósitos de A β en los vasos leptomenígeos y arteriolas cerebrales aumentaron de forma drástica. También se observó que la deficiencia de *Clu* provocaba una bajada en el A β cerebral total (soluble e insoluble) y un aumento en el ratio A β_{40} /A β_{42} . Por otro lado, en este mismo estudio se observó una disminución en la tasa de eliminación de A β_{40} del líquido intersticial en aquellos animales que no expresaban *Clu*, proponiendo la importancia de ApoJ para el aclaramiento de A β_{40} . En base a estos resultados, se propuso que la ausencia de

ApoJ interfiere con el correcto funcionamiento de la vía del drenaje perivascular e imposibilita el correcto aclaramiento de $A\beta_{40}$ ^{233,234}.

En este contexto, el nexo entre ApoJ y la β -amiloidosis cerebral, aunque no es comprendido en su totalidad, está apoyado por un gran número de evidencias. Debido a ello, actualmente se requieren nuevos estudios para poder testar el valor terapéutico de fármacos dirigidos a alterar los niveles de ApoJ circulantes o cerebrales frente a las patologías de EA y AAC.

1.6- HDL reconstituidas (rHDL)

1.6.1- Nanopartículas lipídicas con aplicaciones biomédicas

Las propiedades anfífilas de los fosfolípidos permiten la formación de un gran abanico de nanopartículas lipídicas. En este contexto, los liposomas han sido los más extensamente estudiados. La formación de liposomas se basa en la preparación de bicapas lipídicas concéntricas que permiten la encapsulación de compuestos hidrofílicos (en el núcleo acuoso de la partícula) y lipofílicos (embedidos en la bicapa lipídica) con fines terapéuticos o tecnológicos. La gran versatilidad de tamaño (de escasos nanómetros a varios micrómetros), estructural (micelas, nanopartículas no lamelares, liposomas unilamelares y multilamelares entre otros) y funcional, permitiendo su funcionalización con un amplio abanico de opciones (PEGlicaciones, carga negativa o positiva, partículas magnéticas, etc.), convierten a las nanopartículas lipídicas en una de las estrategias terapéuticas más prometedoras de los últimos años en el campo biomédico²³⁵.

En este contexto, las partículas HDL reconstituídas (rHDL, *reconstituted HDL*) se presentan en el campo de la nanociencia como una nueva nanoestructura lípido-proteica de naturaleza sintética y de bajo costo que permite mimetizar la funcionalidad de las HDL.

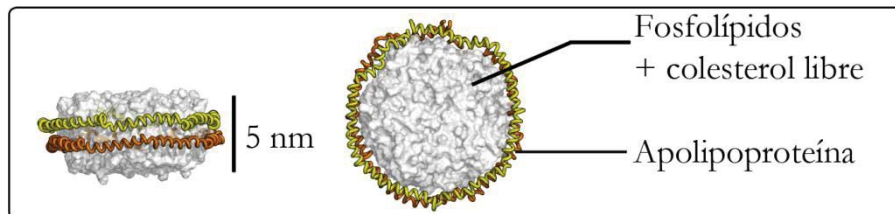
1.6.2- Naturaleza y formación de las HDL reconstituidas

Tal y como se explicaba en apartados anteriores (ver 1.4.1), las HDL son un ensamblaje bioquímico formado por lípidos polares y no polares emulsionados por las apolipoproteínas. En estas estructuras los lípidos anfífilicos (fosfolípidos) forman una monocapa en la superficie de las HDL, mientras que los lípidos hidrófobos no polares (colesterol esterificado y triglicéridos) se encuentran en el núcleo generando una partícula esférica. La capacidad única de las apolipoproteína de emulsionar los lípidos, permite la reproducción de este fenómeno en condiciones *ex vivo*²³⁶. En este sentido, las HDL reconstituidas (rHDL) también conocidas como nanodiscos, son nanopartículas discoidales de unos pocos nanómetros de diámetro compuestas por fosfolípidos y apolipoproteínas (Figura 8A). Para producirlas se requiere una mezcla de fosfolípidos y apolipoproteína bajo unas condiciones concretas. De esta forma, la generación de las rHDL se dará de forma espontánea debido a la capacidad de la apolipoproteína de producir un cambio en su estructura secundaria, aumentando su contenido en hélices- α y unirse a las colas hidrófobas de los fosfolípidos mediante enlaces hidrófobos^{202,237}.

Existen dos estrategias principales de formación de rHDL. Por una parte, en la estrategia de *solubilización espontánea*, se parte de una solución de fosfolípidos en cloroformo que se evapora para dar lugar a la formación de un film lipídico. Tras la resuspensión de este film en una solución acuosa, los fosfolípidos se reorganizan en bicapas lipídicas dando lugar a vesículas multilamelares heterogéneas (MLV). A continuación, se homogeneiza el tamaño de los MLV y se añade la apolipoproteína, la cual, bajo las condiciones de incubación adecuadas, es capaz de solubilizar las bicapas lipídicas dando lugar a la formación de los rHDL (Figura 8A). En la otra estrategia, *diálisis con colato*, el film lipídico se resuspende con una solución acuosa suplementada con el detergente colato dando lugar a la formación de micelas mixtas¹²³ (Figura 8B). La apolipoproteína se añade a dichas micelas y bajo las condiciones de incubación adecuadas, además de una diálisis extensa para eliminar el colato, ocurre la formación de los rHDL. Sin embargo, existen varias variables a tener en cuenta durante la formación de las estructuras. Las principales son la

apolipoproteína utilizada, la composición lipídica, el método de preparación y la estequiometría. La elección óptima de estos parámetros dará lugar a nanopartículas rHDL de diferentes propiedades, tamaño y forma. Algunos ejemplos de la preparación de rHDL están resumidos en la Tabla 1.

A) Naturaleza de los nanodiscos rHDL



B) Métodos de formación

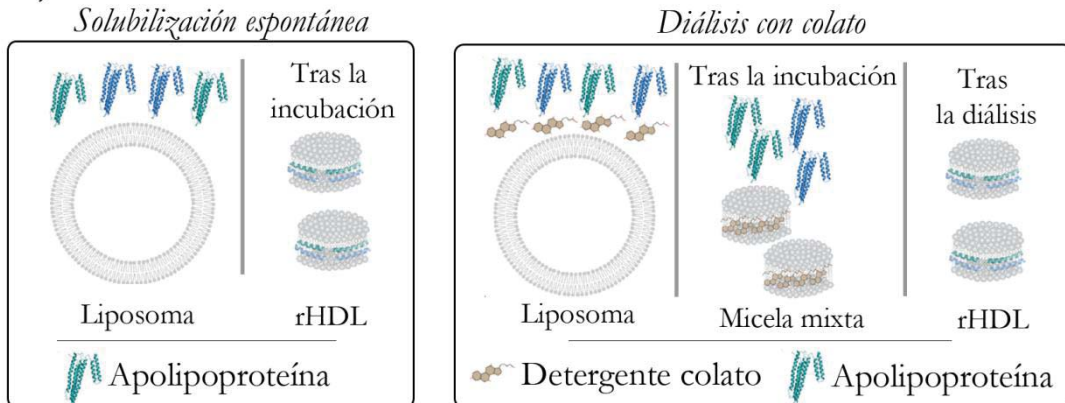


Figura 8: **A)** Naturaleza de las rHDL. **B)** Métodos de formación de los nanodiscos rHDL. (Modificada de Bricarello et al, 2010¹²³).

La gran versatilidad de los nanodiscos es una de sus características más importantes, ya que ha permitido su aplicación en diversos campos de investigación. Algunos ejemplos de estas aplicaciones son su utilización para estudios estructurales de proteínas transmembrana²³⁸, conversión química y energética mediante la inmovilización de proteínas transmembrana fotoactivas²³⁹, aplicaciones biomédicas funcionalizando las nanopartículas rHDL con agentes antimicrobianos²⁴⁰, encapsulando fármacos hidrófobos²⁴¹ y como herramienta de diagnóstico en técnicas de imagen encapsulando contrastes magnéticos para RM²⁴². Por otra parte, debido al rol central que tienen las HDL en enfermedades cardiovasculares (ver *apartado 1.4*), las rHDL también tienen un gran valor terapéutico. De hecho,

los fármacos CER-001, CSL-112 y MDCO-216 (ver apartado 1.5.2.2) se basan en la formulación de ApoA-I-wt y ApoA-I-M en forma de nanopartículas rHDL.

Tabla 1A: Parámetros de formación y caracterización de nanopartículas rHDL descritos en literatura (Adaptado de Bricarello, 2010¹²³).

Apolipoproteína	Composición lipídica	Método de preparación	Estequiometría (MI/Mp)	Forma	Diámetro (nm)	Ref.
ApoA-I	PC	Diálisis con colato	90 a 189	Disco	10-26	243
ApoA-I	DMPC	<i>S. Espontánea</i>	101	Disco	9,5	244
ApoA-I	DMPC-C	Diálisis con colato	104 a 263	Disco	10-13	245
ApoA-I	DPPC	<i>S. Espontánea</i>	115 a 233	Disco	9-19	246
ApoA-I	DPPC-C	<i>S. Espontánea</i>	110 a 221	Disco	10-19	246
ApoA-I	DSPC-C	Diálisis con colato	82	Disco	10	245
ApoA-I	DOPC-C	Diálisis con colato	80	Disco	10	245
ApoA-I	POPC-C	Diálisis con colato	31 a 156	Disco	8-10	247
ApoA-I	POPC-C-CE	Diálisis con colato	68	Esfera	9,3	248
ApoA-II	DMPC	<i>S. Espontánea</i>	44 a 245	Disco	11-24	249
ApoB	DMPC	<i>S. Espontánea</i>	1125	Disco	24	250
ApoC-I	PC-COL	Diálisis con colato	18	Disco	12	251
ApoC-II	PC-COL	Diálisis con colato	22	Disco	18	251
ApoE	POPC	Diálisis con colato	58	Disco	11	252
ApoJ	POPC	Diálisis con colato	200	Disco	20	253

^A**Abreviaciones:** PC: Fosfatidilcolina; DMPC: Dimistiril-fosfatidilcolina; DPPC: Dipalmitoil-fosfatidilcolina; POPC: Palmitoil-fosfatidilcolina; DOPC: Dioleil-fosfatidilcolina; C: Colesterol; CE: Colesterol esterificado; *S. Espontánea*: Solubilización espontánea; MI= Moles de lípido; Mp= moles de proteína.

1.6.3- Potencial terapéutico de las HDL reconstituidas en la β -amiloidosis cerebral

Por otro lado, debido a las alteraciones lipídicas observadas en enfermos de EA, el impacto de las rHDL también ha sido estudiado en modelos experimentales murinos de β -amiloidosis cerebral. Una sola dosis del fármaco CSL-111 (ApoA-I-wt formulada en nanodiscos rHDL) en el modelo murino de Alzheimer APP/PS1

disminuyó los niveles cerebrales de $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$ soluble²⁵⁴, sin modificar el número de placas neuríticas. Por otro lado, el tratamiento crónico con rHDL reconstituidas con ApoE3 en el modelo murino de envejecimiento SAMP8, disminuyó el depósito amiloide, la neuroinflamación, los cambios neurológicos y el déficit cognitivo²⁵⁵. Estos nanodiscos asociados a ApoE3 fueron funcionalizados con compuestos neuroprotectores, como NAP (un péptido neuroprotector sintético) o α -mangosina, demostrando la capacidad de atravesar la BHE, favorecer la eliminación de depósitos amiloides mediante absorción por la glía y recuperar la pérdida de memoria en el modelo de ratón SAMP8^{256,257}. A parte de ApoE y ApoA-I-wt, ApoJ también se ha formulado previamente en nanodiscos rHDL y se ha caracterizado en el contexto de la β -amiloidosis cerebral *in vitro*. En este estudio se observó una capacidad de interacción con el péptido $A\beta$ similar por parte de la ApoJ libre como de la lipídada ²⁵³. Sin embargo, se detectó una mayor afinidad de la ApoJ formulada en rHDL por el receptor LRP2/megalin, el receptor mediante el cual interaccionan los complejos $A\beta$ -ApoJ para su transporte a través de la BHE²³⁰.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo general

La β -amiloidosis cerebral, englobando la Enfermedad de Alzheimer (EA) y Angiopatía Amiloide Cerebral (AAC), tiene un impacto socio-económico devastador en la sociedad, por lo que la búsqueda de un tratamiento eficaz es uno de los mayores retos del S.XXI. Un gran número de evidencias sustentan actualmente el rol del metabolismo lipídico y de las apolipoproteínas, ApoA-I y ApoJ, sobre la β -amiloidosis cerebral. Por ello, el objetivo principal de esta tesis es testar el valor terapéutico de variantes de ApoA-I (rApoA-I-Milano) y ApoJ (rApoJ formulada en nanopartículas rHDL) recombinantes humanas en modelos experimentales de β -amiloidosis cerebral.

2.2- Objetivos específicos

1. Producción y purificación de las proteínas humanas recombinantes funcionales ApoA-I-wt, ApoA-I-M y ApoJ (rApoA-I-wt, rApoA-I-M, rApoJ).
2. Testar la eficacia *in vitro* e *in vivo* de rApoA-I-wt y rApoA-I-M en modelos experimentales de β -amiloidosis cerebral.
3. Optimización y caracterización de la formulación de rApoJ en nanodiscos rHDL (nanodiscos rHDL-rApoJ) en el contexto de la β -amiloidosis cerebral.
4. Testar la eficacia *in vivo* de la administración de los nanodiscos rHDL-rApoJ o rApoJ en un modelo experimental de β -amiloidosis cerebral.

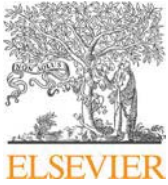
3. PUBLICACIONES

3.1- ARTÍCULO 1

Intravenous treatment with human recombinant ApoA-I Milano reduces beta amyloid cerebral deposition in the APP23-transgenic mouse model of Alzheimer's Disease

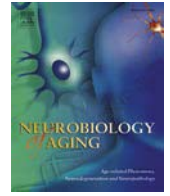
Neurobiology of Aging (2017)

Dec; 60:116-128. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2017.08.028. Epub 2017 Sep 5



Contents lists available at ScienceDirect

Neurobiology of Aging

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neuaging

Intravenous treatment with human recombinant ApoA-I Milano reduces beta amyloid cerebral deposition in the APP23-transgenic mouse model of Alzheimer's disease



Sofía Fernández-de Retana^a, Alex Montaña^a, Paula Marazuela^a,
Maialen De La Cuesta^a, Aina Batlle^a, Marc Fatar^b, Saskia Grudzenski^b, Joan Montaner^a,
Mar Hernández-Guillamon^{a,*}

^a Neurovascular Research Laboratory, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

^b Department of Neurology, Universitätsmedizin Mannheim, Heidelberg University, Mannheim, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 February 2017

Received in revised form 18 August 2017

Accepted 26 August 2017

Available online 5 September 2017

Keywords:

Beta amyloid
ApoA-I
ApoA-I-Milano
Alzheimer's disease
APP23
Neuroinflammation

ABSTRACT

Beyond the crucial role of apolipoprotein A-I (ApoA-I) on peripheral cholesterol metabolism, this apolipoprotein has also been implicated in beta amyloid (A β)–related neuropathologies. ApoA-I-Milano (M) is a mutated variant, which showed increased vasoprotective properties compared to ApoA-I-wild type in models of atherosclerosis and cardiovascular damage. We speculated that ApoA-I-M may also protect A β -affected vasculature and reverse some of the pathological features associated with Alzheimer's disease (AD). For this purpose, we produced and characterized human recombinant ApoA-I-wild type and ApoA-I-M proteins. Both of them were able to avoid the aggregation of A β in vitro, even though recombinant ApoA-I-M was significantly more effective in protecting endothelial cells from A β (1–42)-toxicity. Next, we determined the effect of chronic intravenous administration of rApoA-I-M in the APP23-transgenic mouse model of AD. We found reduced cerebral A β levels in mice that received rApoA-I-M, which were accompanied by a lower expression of astrocyte and microglia neuro-inflammatory markers. Our results suggest an applicability of this molecule as a therapeutic candidate for protecting the brain in AD.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is pathologically characterized by the deposition of beta amyloid (A β) peptide in cerebral parenchyma forming neuritic plaques and the intracellular accumulation of hyperphosphorylated tau protein, which induce synaptic loss and progressive neurodegeneration (Duyckaerts et al., 2009). In sporadic AD, several evidences support that lipid metabolism is related to the processing, accumulation, and clearance of parenchymal A β (Hartmann, 2001). First, apolipoprotein E (ApoE), the most abundant apolipoprotein in the brain, has been widely confirmed to influence the development of A β -associated pathologies, as the possession of the APOE ϵ 4 allele is the strongest genetic risk factor for AD (Schmechel et al., 1993) and cerebral amyloid angiopathy (CAA) (Greenberg et al., 1995). Furthermore, diseases characterized

by alterations in the lipid profile, such as diabetes mellitus type 2 (Vagelatos and Eslick, 2013), atherosclerosis (Reitz et al., 2010), and hypercholesterolemia (Solomon et al., 2009), are defined as risk factors for developing AD (Stukas et al., 2014). In this context, apolipoprotein A-I (ApoA-I), the major component of high-density lipoproteins (HDLs) in plasma and responsible for the transport of cholesterol to the liver, has also been linked to AD pathology. ApoA-I binds to circulating A β peptides (Koudinov et al., 1998) and was found to be associated with A β in occasional senile plaques in AD brains (Harr et al., 1996). Moreover, previous reports showed a decrease in plasma ApoA-I in AD and dementia patients (Kawano et al., 1995; Saczynski et al., 2007) and this decrease correlated with the severity of the disease (Merched et al., 2000). On the other hand, in vitro studies showed the capacity of ApoA-I to bind and prevent A β aggregation and toxicity (Koldamova et al., 2001; Paula-Lima et al., 2009). Although ApoA-I was initially considered to be a minor A β carrier (Ghiso et al., 1993) and APOA1 deficiency did not modify the total A β load in a mouse model of AD (Fagan et al., 2004), 2 independent studies in 2010 emphasized again the involvement of ApoA-I in A β regulation. These studies demonstrated that the

* Corresponding author at: Neurovascular Research Laboratory, Institut de Recerca, Pg. Vall d'Hebron, 119–129 Hospital Universitari Vall d'Hebron, 08035 Barcelona, Spain. Tel.: +34934894029; fax: +34934894015.

E-mail address: Mar.hernandez.guillamon@vhir.org (M. Hernández-Guillamon).

overexpression (Lewis et al., 2010) or the lack of APOA1 (Lefterov et al., 2010) specifically affected the A β deposition in cerebral blood vessels or CAA, in addition to the modulation of the cognitive function in transgenic mouse models of AD. On the other hand, more recently, the acute administration of lipidated ApoA-I (reconstituted HDLs) resulted in a reduction of soluble A β levels in amyloid precursor protein (APP)/presenilin-1 mice (Robert et al., 2016). Thus, different pieces of evidence reinforce the idea that ApoA-I-based therapies may also be considered to treat pathologies associated with A β deposition. In this context, structural modified ApoA-I forms can provide novel opportunities to improve some of the protective properties attributed to this lipid carrier.

ApoA-I-Milano (M) is a natural variant of APOA1 first discovered in 1974 in individuals from northern Italy (Franceschini et al., 1980). This mutation is caused by a cysteine substituting an arginine in the 173 position (R173C) (Weisgraber et al., 1983), facilitating the homodimer formation through disulfide bonds (Alexander et al., 2009a). Interestingly, although carriers of this variant exhibited a lipid profile consistent with low HDL-cholesterol (HDL-C) and moderate hypertriglyceridemia, ApoA-I-M seemed to confer protection against the development of atherosclerosis and cardiovascular disease (Sirtori et al., 2001). This finding was supported experimentally, because the administration of different forms of recombinant ApoA-I-M resulted in the prevention of atherosclerosis progression (Ibanez et al., 2008; Shah et al., 1998), an improvement of endothelial dysfunction (Kaul et al., 2004) and enhanced vasoprotective (Giannarelli et al., 2012), antioxidant (Bielicki and Oda, 2002) and anti-inflammatory properties (Ibanez et al., 2012; Speidl et al., 2010) compared to that observed with the administration of ApoA-I-wild type (wt). Furthermore, in humans, a randomized controlled trial in patients with acute coronary syndrome demonstrated that intravenous infusions of recombinant ApoA-I-M (rApoA-I-M)/phospholipid complex (ETC-216, Pfizer) significantly reduced the coronary atherosclerosis (Nissen et al., 2003). More recently, the manufacturing process of ETC-216 has been improved, and the compound has been renamed as MDCO-216 (The Medicines Company) (Kallend et al., 2016).

From this background, our hypothesis was that the modulation of the lipidic status by treatment with recombinant ApoA-I-M could also ameliorate the features associated with cerebral A β deposition. Thus, our main objective was to determine the effect of chronic intravenous administration of rApoA-I-M in APP23 mice as a transgenic model of AD and CAA pathologies.

2. Materials and methods

2.1. Production and purification of human recombinant ApoA-I-wt and ApoA-I-M

The production and purification methodology used to obtain rApoA-I-wt is extensively described in Merino-Zamorano et al. (2016). Briefly, pcDNA4.0 plasmids containing the cDNA of human APOA-I-wt or APOA-I-M were used to transfect human embryonic kidney 293T cells (HEK293T) cells. Cells producing the recombinant proteins were grown in HYPERFlask systems (Corning Inc, New York, NY, USA). Purification of the supernatants containing the rApoA-I-wt or rApoA-I-M was performed with Ni-affinity chromatography in an FPLC ÄKTA Purifier 100 System (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ, USA) using HiScreen Ni FF columns (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.). After the elution of the proteins of interest, a dialysis against phosphate-buffered saline (PBS) 0.1X and a lyophilisation step were performed. Proteins were reconstituted in water, and the concentration was assessed with the BCA assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Their purity was determined by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

(SDS-PAGE) followed by Coomassie SafeBlue staining (Nzytech, Lisboa, Portugal) in reductive conditions and analyzed using ImageJ software (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Both recombinant proteins showed $\geq 95\%$ purity, and aliquots were stored at -80°C until their use.

2.2. Liquid chromatography-mass spectrometry analysis

The correct amino acid sequence of both recombinant proteins produced was assessed by mass spectrometry. Briefly, the SDS-PAGE gel slices containing the proteins of interest were cut and digested using modified porcine trypsin (Promega, Madison, WI, USA). The eluted peptides were dried in a SpeedVac and stored at -20°C until analysis by mass spectrometry. The tryptic digests from excised bands were analyzed using linear ion trap Velos-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). Instrument control was performed using the Xcalibur 2.1.0 software package (Thermo Fisher Scientific). The analysis was carried out by the Proteomics Facility of Vall d'Hebron Oncology Institute (VHIO, Barcelona).

2.3. Thioflavin-T binding assay

The ability to prevent the aggregation of A β (1–40) and A β (1–42) peptides was compared between rApoA-I-wt and rApoA-I-M using the thioflavin T (ThT) binding methodology. A β (1–40) and A β (1–42) (Anaspec, Fremont, CA, USA) 1-mM stock solutions were prepared from lyophilized powders following the manufacturer's instructions to avoid aggregation. Aliquots were stored at -80°C until their use. The kinetic of A β fibrillization was studied over time using different A β :Apo molar ratios: 13 μM of A β (1–40) or A β (1–42) were mixed with 0.13 μM or 0.013 μM of ApoA-I-wt/ApoA-I-M (1:0.1 and 1:0.01 molar ratio). The fibrillization state of the samples was studied at 0, 2, 6, 24, and 48 hours after incubation at 37°C under vigorous agitation. To this end, 5 μL of freshly prepared 0.1 mM ThT (Sigma-Aldrich; Saint Louis, MO, USA) and 50 mM Tris buffer (pH 8.5) were added to a final volume of 200 μL . Fluorescence was recorded after 300 seconds in a fluorometer (SynergyMx; Biotek, Winooski, VT, USA) at 435 nm/490 nm. Data are represented in fluorescence intensity units subtracting the value at $t = 0$ for each sample. All measurements are obtained from 3 independent experiments run in duplicate.

2.4. Treatments and cell viability analysis in cultured cells

The ability of rApoA-I-wt and rApoA-I-M to prevent A β (1–42) cytotoxicity was determined using the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma-Aldrich) reduction assay in the cerebral human microvascular endothelial cell line (human cerebral microvascular endothelial cell/D3 cell line [hCMEC/D3]), which was kindly provided by Dr Couraud, Cochin Institute, France (Weksler et al., 2005). Cells were placed at 1×10^5 cells/mL in 24-well plates in wells precoated with rat collagen I (1:50; Cultrex; Gaithersburg, MD, USA), grown in EBM-2 medium (Lonza, Barcelona, Spain) supplemented with 1:2 of the provided factors, human fibroblast growth factor-basic, vascular endothelial growth factor, human epidermal growth factor, long arginine 3- insulin-like growth factor 1, hydrocortisone, heparin, ascorbic acid, 0.1% of gentamicin sulfate anphotericin-B (GA), and 2% fetal bovine serum (FBS), and maintained at 37°C in a humidified incubator containing 5% CO_2 and atmospheric oxygen for 24 hours. First, the cytotoxic effect induced by A β (1–42) was determined in hCMEC/D3. For this purpose, cells were treated with 1 or 10 μM of A β (1–42) in EBM-2 supplemented with 0.1% GA during 24 or 48 hours. After the end of the treatment, cell viability

was determined by adding 0.5 mg/mL of MTT, followed by incubation for 2 hours at 37 °C. Then, the media was replaced by 200 μ L of dimethyl sulfoxide. The amount of formazan blue formed after MTT reduction was quantified spectrophotometrically at 590 nm. Once the optimal cytotoxic conditions were selected, cells were then cotreated with 10 μ M A β (1–42) and 1 μ M rApoA-I-wt or 1 μ M rApoA-I-M in EBM-2 medium supplemented with 0.1% GA. Alternatively, cells were first treated with 10 μ M A β (1–42) for 24 hours, and then, the medium was replaced, and cultures were post-treated with 1 μ M rApoA-I-wt or 1 μ M rApoA-I-M for 24 hours. Corresponding cells were treated with PBS as vehicle. At the end of treatments, cell viability was determined by the MTT reduction methodology, as previously described. All results are presented as a percentage of the MTT reduction in PBS-treated cells.

On the other hand, the effect of rApoA-I-wt and rApoA-I-M on the cytotoxicity induced by A β (1–42) was also studied in the neuroblastoma cell line SH-SY5Y (Sigma-Aldrich). Cells were placed at 1×10^5 cells/mL in 24-well plates in wells precoated with rat collagen I (1:50), grown in DMEM-F12 medium (Thermo Fisher) supplemented with 20% FBS, 1% penicillin/streptomycin, and 1% of essential amino acids and maintained at 37 °C in a humidified incubator containing 5% CO₂ and atmospheric oxygen. Cells were cotreated with 10 μ M of A β (1–42) and 1 μ M rApoA-I-wt or rApoA-I-M in DMEM-F12 supplemented with 1% penicillin/streptomycin and 1% essential amino acids for 24 hours. At the end of the treatments, cell viability was determined by the MTT reduction methodology, as previously described.

2.5. *In vivo* experiments

All procedures were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Vall d'Hebron Research Institute (protocol number 78/13) and conducted in compliance with the Spanish legislation and in accordance with the Directives of the European Union. Animals were maintained in climate-controlled environment on a 12-hour light/12-hour dark cycle. Food and water were available *ad libitum*. The stability of rApoA-I-M in plasma was analyzed in 8-month-old C57/BL6 (Janvier, Saint Berthevin Cedex, France) male mice. For the administration, animals were first anesthetized under spontaneous respiration with isoflurane (5%) in oxygen (2%) and then treated by retro-orbital injection, a reliable method for intravenous (IV) delivery in mice (Yardeni et al., 2011). Mice were treated intravenously with rApoA-I-M (at 2 mg/kg) at 7 different time points (5 minutes, 30 minutes, 1 hour, 3 hours, 24 hours, 48 hours, and 72 hours) before euthanasia. Blood was then collected through cardiac puncture, and ethylenediaminetetraacetic acid plasma was separated and stored at –80 °C. Chronic treatment with rApoA-I-M or saline was carried out in APP23 transgenic mice (Novartis, Basel, Switzerland). These animals overexpress the APP protein containing the Swedish mutation (K670M/N671L) under the Thy1 neuronal promoter. Hemizygote B6, D2-TgN[Thy-APP^{SW}]-23-Tg mice (APP23) provided by Novartis Institutes for BioMedical Research, Novartis Pharma AG (Basel, Switzerland) were backcrossed twice with C57BL/6 mice (Janvier). The APP genotype was tested by Transnetyx (Cordova, TN, USA) from tail samples and hemizygote mice and wt littermates were bred to reach the final study cohort. For the chronic *in vivo* study, 16-month-old APP23 male mice received 24 IV doses (3 doses/week) of rApoA-I-M at 2 mg/kg ($n = 10$) or saline ($n = 10$) via retro-orbital sinus. Mortality was not associated with the treatment ($\chi^2 = 0.531$), as 1 mouse from the rApoA-I-M-treated group and 1 mouse from the saline-treated group were found dead before the end of the treatment, and another mouse from the rApoA-I-M-treated group died during the manipulation at the end of the treatment.

To determine the ability of rApoA-I-M to promote A β efflux from brain after IV administration, an acute single-dose treatment was performed. To this end, APP23 male mice ($n = 5$) were anesthetized under isoflurane flow, and plasma was obtained through retro-orbital puncture. Forty-eight hours later, animals were treated with 2 mg/kg of rApoA-I-M, as previously described. Finally, 1 hour after administration, animals were anesthetized under isoflurane flow and euthanized, followed by blood collection through cardiac puncture.

2.6. Tissue processing

After 12 hours of fasting conditions, mice subjected to the chronic treatment were anesthetized under isoflurane flow and euthanized 24 hours after the last treatment administration. Blood was collected through cardiac puncture and transcardial perfusion with 25 mL of cold 0.1 M PBS, pH 7.4. Brains were rapidly removed and divided into hemispheres. The first hemisphere was quickly frozen at –80 °C for posterior homogenization. The other hemisphere was drop fixed in 10% formalin (Diapath, Martinengo, Italy) solution at room temperature (RT) for 48 hours before paraffin embedding.

2.7. Brain homogenates

Soluble, membrane-associated and insoluble protein fractions were obtained from each hemisphere of the mice. Brain tissue was homogenized in 4 mL of tris-buffered saline (pH = 7.4) supplemented with cOmplete, ethylenediaminetetraacetic acid-free protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany), and the samples were centrifuged at 8000g for 30 minutes at 4 °C. The supernatant was selected as the soluble A β fraction, whereas the pellet was homogenized in 4 mL of tris-buffered saline supplemented with 1% Triton X-100 and protease inhibitors (pH = 7.4). Samples were subjected to centrifugation at 8000g for 30 minutes at 4 °C. The supernatant was selected as the membrane-associated fraction, whereas the pellet was homogenized in 4 mL of 5M guanidine (Sigma-Aldrich) supplemented with protease inhibitors (pH = 8). Samples were then maintained in shacking conditions for 3 hours at RT, followed by centrifugation at 8000g for 30 minutes at 4 °C. The new supernatant was selected as the insoluble fraction, and the pellet was discarded. Selected fractions were aliquoted and stored at –80 °C until their use.

2.8. Enzyme-linked immunosorbent assay

A β was quantified in plasma and soluble, membrane-associated and insoluble protein fractions from brain homogenates with the commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits for both A β (1–40) (KHB3481) and A β (1–42) (KHB3441, Thermo Fisher Scientific). The levels of interleukin-1 β (IL-1 β) were measured in soluble brain homogenates with commercial ELISA for mouse IL-1 β (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Human ApoA-I ELISA (Ab108803, Abcam, Cambridge, UK) was used to detect the presence of rApoA-I-M in mouse plasma and brain after the acute or chronic IV treatment (samples processed 1 or 24 hours after the last infusion, respectively), following the manufacturer's instructions.

2.9. Immunohistochemistry

A series of 3 paraffin-embedded sagittal sections were selected 800 μ m apart, starting from the division of the hemispheres. All samples were deparaffinized for 1 hour at 65 °C and treated with 2% H₂O₂ and 10% methanol diluted in PBS for 15 minutes. The sections were incubated during 1 hour in blocking solution (PBS, 0.2%

Triton-X, 10% FBS and 1.5 g/mL glycine) and, then, incubated overnight (ON) at 4 °C with an anti-human A β monoclonal antibody (A β 4G8, Covance, Princeton, NY, USA) diluted 1/5000 in blocking solution. After that, slices were incubated with biotinylated α -mouse IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) diluted 1/200 in blocking solution for 1 hour at RT and then 1 hour with streptavidin-HRP (Vector Laboratories) diluted 1/200 in blocking solution. Finally, diaminobenzidine (Dako, Denmark) was applied until a brown end-product was visualized and contrast staining was done with Harris hematoxylin solution (Sigma-Aldrich). The number of A β deposits larger than 50 pixels² was counted from each section using ImageJ Software. The mean number of deposits for each mouse was obtained from the analysis of the 3 brain sections.

Immunohistochemistry to detect neuronal loss in mice brains was performed following the same methodology using mouse anti-neuronal nuclear antigen (NeuN) (1/200; Millipore). The NeuN-positive cell quantification was done in cortex and hippocampus (CA1, CA3, and polymorphic layer of dentate gyrus) of paraffin-embedded sagittal sections. In each condition, 3 independent images were obtained from brain areas obtained at 40 \times magnification. In each image, NeuN-positive cells were counted in 3 different random squares of 150 μ m² in cortical areas, whereas for the different regions of the hippocampus, squares of 100 μ m² were used. Results are presented as the mean of counted cells per mm².

2.10. Thioflavin S staining

Thioflavin S (ThS) staining was carried out to visualize the fibrillar A β deposits in the mouse brains after the treatment. After deparaffinization, series of 3 sagittal sections selected 800 μ m apart, were immersed in 1% ThS (Sigma-Aldrich) dissolved in ethanol 75% during 30 seconds. The excess of ThS was drained and the slices were again immersed in 0.1% ThS in ethanol 75% for 1 minute, then, sections were dehydrated, and DAPI (4',6-diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride) was used as contrast staining before mounting the preparations.

2.11. Resorufin staining

For vascular-specific amyloid detection, resorufin staining was performed using paraffin-embedded mice brain hemispheres following the protocol previously described (Han et al., 2011). Briefly, all samples were deparaffinized for 1 hour at 65 °C, washed 3 times in PBS during 5 minutes and permeabilized in PBS-0.25% Triton X-100 for 30 minutes. Samples were then stained with resorufin 1 mM (Sigma-Aldrich) diluted in PBS-0.25% Triton X-100 for 5 minutes. After 3 washes in PBS, followed by a wash in PBS-50% ethanol for 3 minutes, samples were dehydrated and DAPI (Vector Laboratories) was used as contrast staining before mounting the preparations. The vascular amyloid deposition was calculated by determining the fluorescent-positive area (pixels²) in the brain with ImageJ Software. The mean vascular positive area for each mouse was obtained from the analysis of the 3 brain sections.

2.12. Immunofluorescence combined with ThS staining

The expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) or cluster of differentiation 68 (CD68), as markers of reactive astrocytes and phagocytic microglial cells respectively, was determined by immunofluorescence. Deparaffinized samples were subjected to antigen retrieval process through the immersion of samples in sodium citrate buffer (10 mM sodium citrate, 0.05 % tween 20, pH = 6) at 95 °C for 30 minutes. Then, samples were incubated during 1 hour in blocking solution (PBS, 0.2% Triton-X, 10% FBS and

1.5 g/mL glycine) and incubated ON at 4 °C with mouse anti-GFAP (Thermo Fisher) diluted 1/200 in blocking solution or rabbit anti-CD68 (Abcam) diluted 1 μ g/mL in blocking solution. Samples were incubated with the corresponding Alexa Fluor 563-labeled α -rabbit IgG or α mouse IgG diluted 1/200 in blocking solution. Finally, sections were stained with ThS staining, as previously described, and DAPI was used as nuclear contrast staining before mounting the preparations.

2.13. Plasma lipid profile

Fasting total cholesterol (TC), HDL-C, and triglyceride (TG) levels in the mouse plasma were analyzed automatically using an AU 5800 analyzer (Beckman Coulter, Pasadena, CA, USA), located in Clinic Laboratories in Vall d'Hebron Hospital (Barcelona, Spain). Reagents were purchased from Beckman Coulter, and the quantification was done following the manufacturer's instructions. The level of low-density lipoprotein (LDL-C) was calculated by subtracting the HDL-C levels from the TC levels.

2.14. Western blotting

For the immunodetection of different protein profiles, 1 μ L of plasma or 80 μ g of brain homogenates (soluble or membrane-bound fraction) was loaded in a 12% acrylamide SDS-PAGE under reducing conditions. Then, the gels were transferred to nitrocellulose membranes (Amersham Bioscience, Amersham, UK) for 1 hour at 100 V. Blocking was done in 10% nonfat milk for 1 hour, followed by ON incubation at 4 °C with specific antibodies diluted 1/1000 in blocking solution. The primary antibodies used were rabbit anti-human ApoA-I (1/1000) (Abcam), goat anti-mouse ApoA-I (1/1000) (Novus, Littleton, CO, USA), rabbit anti-ApoE (1/1000) (Abcam), goat anti-apolipoprotein J (ApoJ) (1/1000) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), rabbit anti-LRP1 (1/1000) (lipoprotein receptor protein-1; Calbiochem, San Diego, CA, USA), goat anti-RAGE (1/1000) (receptor for advanced glycosylated end-products; R&D Bioscience), mouse anti-ABCA1 (1/1000) (ATP-binding cassette-A1; Abcam), rabbit anti-mouse SRB-I (1/500) (scavenger receptor-B-I; Abcam), rabbit-neprilysin (1/1000) (Neprilysin; Abcam), rabbit-IDE (1/2000) (insulin degrading enzyme; Abcam), rabbit anti-GFAP (1/1000) (glial fibrillary acidic protein; Sigma-Aldrich), rat anti-CD68 (1/1000) (cluster of differentiation 68; Abcam), rabbit anti-mouse IBA-1 (1/2000) (ionized calcium-binding adapter-1; Wako-Chem, Richmond, VA, USA), mouse anti β -actin (1/10,000) (Sigma-Aldrich), mouse anti-GAPDH (1/2000) (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; Thermo Fisher Scientific), rabbit anti-APP (1/5000) (Alzheimer precursor protein; Millipore, Madrid, Spain) to determine full-length APP and α -CTF and β -CTF fragments, mouse anti-sAPP α (1/1000) (soluble APP alpha-fragment; Takara, Kusatsu, Japan) and mouse anti-sAPP β (1/1000) (soluble APP Beta-fragment; Takara). Membranes were next immunoreacted with HRP-conjugated antibodies diluted in blocking solution for 1 hour at RT. Anti-rabbit-HRP (1/1000) (GE HealthCare Bio-Sciences Corp.), anti-mouse-HRP (1/1000) (GE HealthCare Bio-Sciences Corp.), anti-Rat-HRP (1/2000), or anti-goat-HRP (1/5000) (Sigma-Aldrich) were used as HRP-conjugated antibodies. Membranes were further developed by enhanced chemiluminescence using PierceECL Western Blotting Luminol/Enhancer and Stable Peroxide solutions (Thermo Fisher Scientific). The amount of target protein was quantified by measuring the intensity of the corresponding band using ImageJ software. The expression of β -actin or glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase was used as a loading control when analyzing proteins expressed in the brain.

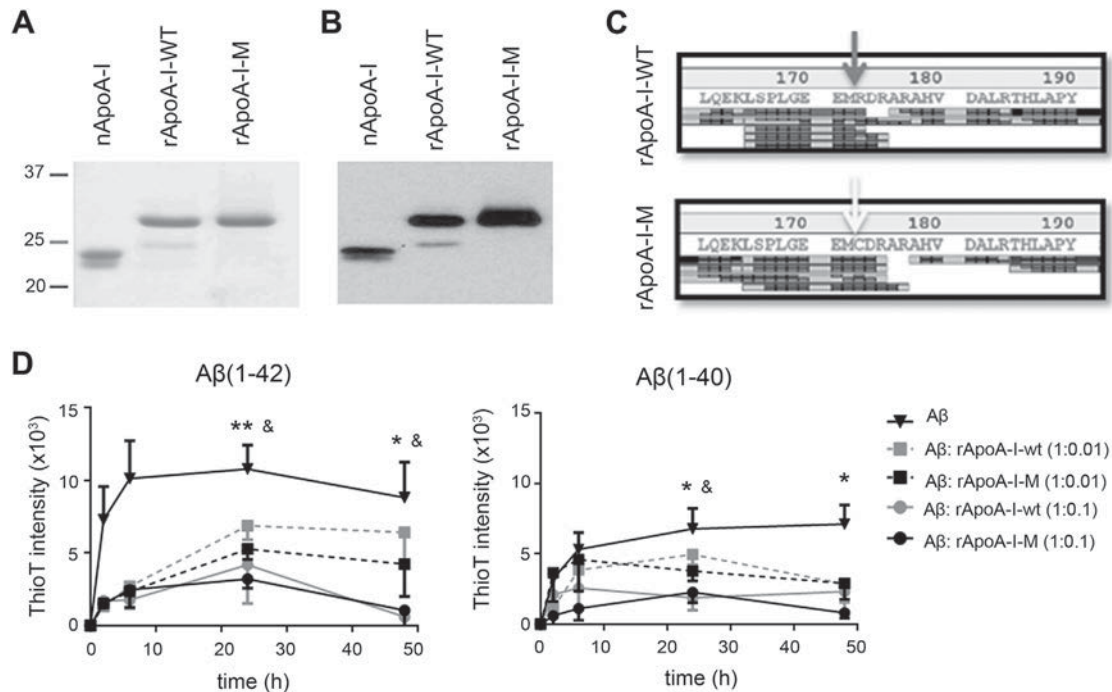


Fig. 1. Production and characterization of human recombinant ApoA-I-wt and ApoA-I-Milano (M). (A) Coomassie blue-stained gel and (B) Western blot showing anti-ApoA-I of purified rApoA-I-wt, rApoA-I-M, and human native protein (nApoA-I). (C) Mass spectrometric analysis of the sequences of rApoA-I-wt (containing an arginine residue at position 173) and rApoA-I-M (containing a cysteine at position 173) proteins. (D) In vitro functional test: ThT fluorescence intensity of A β (1–42) and A β (1–40) after the incubation with or without rApoA-I-wt or rApoA-I-M at 37 °C over time (concentration ratio A β :rApoA-I = 1:0.01 and 1:0.1). ** p < 0.01, * p < 0.05 A β versus A β : rApoA-I-M 1:0.1. [§] p < 0.05 A β versus A β : rApoA-I-wt 1:0.1. Abbreviations: A β , beta amyloid; ApoA-I, apolipoprotein A-I; rApoA-I, recombinant ApoA-I; ThT, Thioflavin T; wt, wild type.

For the determination of SDS-stable rApoA-I-M/A β complexes, nonreductive SDS-PAGE was performed. For this purpose, 1 μ L of plasma from acutely treated and nontreated APP23 or wt mice was loaded in 10% acrylamide SDS-PAGE (without 5% β -mercaptoethanol or sample heating). Gels were transferred into nitrocellulose membranes as previously described. rApoA-I-M was detected using the rabbit-anti-human ApoA-I antibody and the A β -linked species with the anti-human A β monoclonal antibody A β 4G8.

2.15. Statistical analysis

GraphPad Prism 5 was used for statistical analysis. The normality was checked with the Shapiro-Wilk normality test. The significant differences were assessed using t test or analysis of variance with Dunnett's multiple comparison post hoc tests as appropriate. The data represent the mean \pm standard error of the mean, unless specified otherwise. A p -value < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Production and characterization of human recombinant ApoA-I-wt and ApoA-I-Milano (M)

Highly pure recombinant ApoA-I and ApoA-I-M variants were produced from stable transfection of cultured HEK293T cells. Coomassie protein staining and Western blot demonstrated that both recombinant proteins showed a higher molecular weight than the native ApoA-I purified from human plasma. The recombinant proteins contain a c-Myc tag and a polyhistidine tag at the N-terminus for their purification that conferred a 4.81 kDa increase in their molecular weight (Fig. 1A and B). The analysis of the amino acid sequences confirmed that the rApoA-I-M variant had a cysteine

residue at position 173 (R173C) (Fig. 1C). The functionality of rApoA-I-wt and rApoA-I-M was assessed by ThT A β -binding assay, which demonstrated that both of them were equally able to avoid the aggregation of A β (1–42) and A β (1–40) peptides in vitro at the higher concentration rate assayed. The kinetics of the reaction of A β coincubated with the rApoA-1 proteins (concentration ratio 1:0.1) presented a reduced ThT intensity plateau than the corresponding A β (1–42) or A β (1–40) samples (Fig. 1D).

3.2. Effect of rApoA-I-wt and rApoA-I-M on the cytotoxicity induced by A β in cultured cerebral endothelial cells

The capability of rApoA-I-wt and rApoA-I-M to prevent the cytotoxicity induced by A β (1–42) peptide in vascular brain cells was tested. First, the proper experimental conditions were selected by determining the cell viability reduction induced by increasing doses of A β (1–42) at different time points in cerebral microvascular endothelial cells (hCMEC/D3; Suppl. Fig. 1A). Next, we observed that both rApoA-I-wt and rApoA-I-M were able to protect the cultured endothelial cells when they were cotreated with 10 μ M A β (1–42) for 24 hours (Fig. 2A). Because we previously determined that rApoA-I-wt and rApoA-I-M were equally able to prevent the aggregation of A β (1–42), we next wanted to analyze whether these apolipoproteins also exhibited cytoprotective properties without considering their A β binding effect. Therefore, hCMEC/D3 cells were treated with 10 μ M A β (1–42) for 24 hours and post-treated with or without 1 μ M rApoA-I-wt or rApoA-I-M for another 24 hours. In this case, we found that rApoA-I-M was significantly more effective than rApoA-I-wt in protecting brain endothelial cells from A β (1–42)-toxicity (Fig. 2B). In fact, rApoA-I-wt did not modify the reduction in cell viability induced by A β (1–42) after the 24-hour incubation. Isolated treatment with rApoA-I-wt or rApoA-I-M did not influence hCMEC/D3 viability in

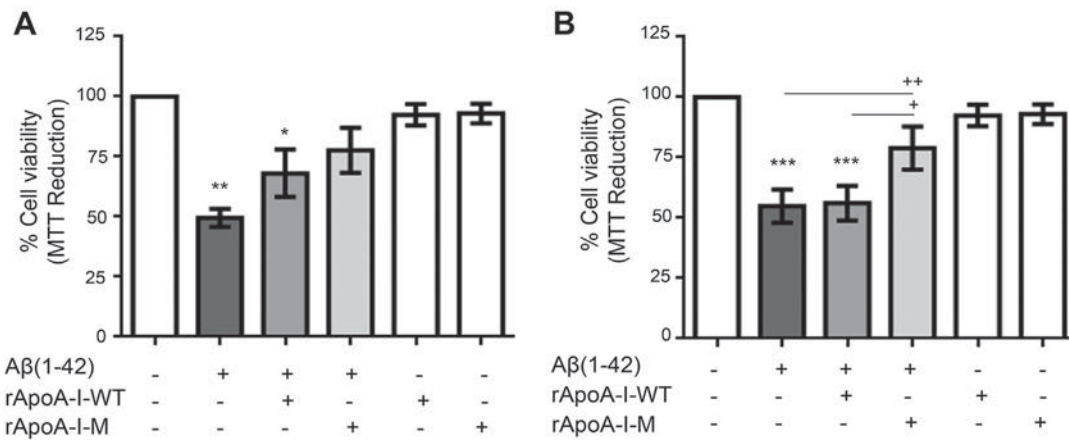
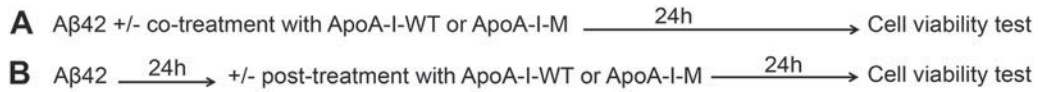


Fig. 2. Effect of rApoA-I-wt and rApoA-I-M on the cytotoxicity induced by Aβ(1–42) in hCMEC/D3 cells. MTT reduction viability assay in cultured cells (A) cotreated with 10 μM Aβ(1–42) and 1 μM rApoA-I-wt/rApoA-I-M for 24 hours ***p* < 0.01 and **p* < 0.05 compared to control condition; (B) cells treated with 10 μM Aβ(1–42) for 24 hours and post-treated with or without 1 μM rApoA-I-wt/rApoA-I-M for 24 hours ****p* < 0.001 compared to control condition. ++*p* < 0.01 and +*p* < 0.05 compared to the corresponding Aβ(1–42)-treated condition. Abbreviations: Aβ, beta amyloid; ApoA-I, apolipoprotein A-I; rApoA-I, recombinant ApoA-I; wt, wild type.

any of the approaches. We also tested the protective potential effect of rApoA-I-wt or rApoA-I-M in the neuroblastoma cell line SH-SY5Y, as an in vitro model of neuronal function. However, in this case, the cotreatment with the recombinant proteins did not modify the cell viability reduction induced by Aβ(1–42) (Suppl. Fig. 1B).

3.3. Aβ levels in old APP23 mice chronically treated with rApoA-I-M

From our in vitro results and previous literature showing the vasoprotective properties of the mutated ApoA-I compared to the wt variant (Bielicki and Oda, 2002; Cimmino et al., 2009; Ibanez et al., 2012), we planned to specifically determine the effect of

chronic treatment with rApoA-I-M in an AD experimental model in vivo. For this purpose, we first confirmed the stability of the human recombinant protein in mouse plasma after an IV administration (2 mg/kg of rApoA-I-M) at different time points. The difference in the molecular weight of the infused human recombinant protein (rApoA-I-M) in comparison to the plasma mouse ApoA-I protein analyzed by Western blot allowed us to determine that rApoA-I-M was circulating in the bloodstream up to 72 hours after its administration (Fig. 3A and B).

Next, 16-month-old APP23 transgenic mice were given a chronic treatment of 2 mg/kg of rApoA-I-M, which consisted of 3 doses per week for 8 weeks (24 doses) in order to ensure a continuous load of rApoA-I-M in circulation during the procedure

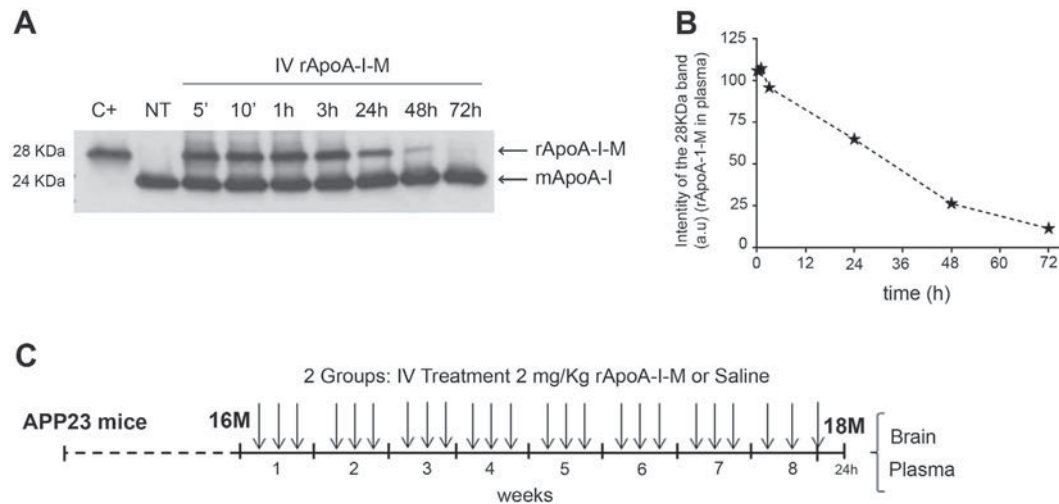


Fig. 3. Plasma stability of rApoA-I-M in mouse plasma. (A) Western blot anti-ApoA-I of plasma samples from mice treated intravenously with 2 mg/Kg rApoA-I-Milano (M) after different time points. C+: 50 ng rApoA-I-M recombinant human ApoA-I-M. (B) Representation of the presence of the rApoA-I-M molecule in mouse plasma after a single IV dose. (C) Time diagram showing the experimental design of the study based on the chronic treatment of 16-month-old APP23 mice with rApoA-I-Milano or saline. Abbreviations: ApoA-I, apolipoprotein A-I; APP, amyloid precursor protein; a.u, arbitrary units; IV, intravenous; mApoA-I, mouse ApoA-I; NT, plasma sample of nontreated mice; rApoA-I, recombinant ApoA-I.

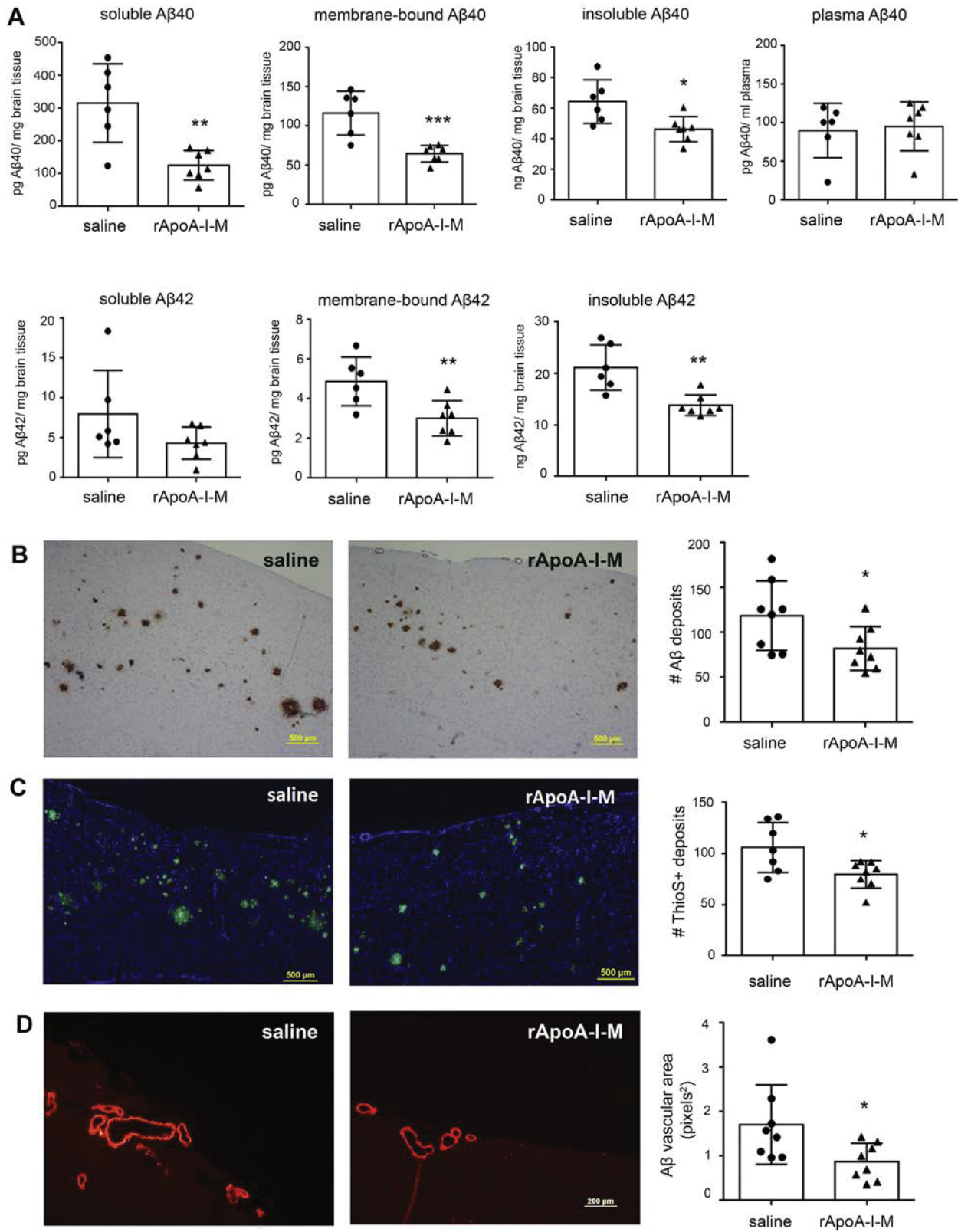


Fig. 4. Aβ levels in 18-month-old APP23 mice chronically treated with rApoA-I-M. (A) Aβ(1–40) and Aβ(1–42) levels in soluble, membrane-bound and insoluble fractions of brains from 18-month-old APP23 mice determined by ELISA. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ rApoA-I-M versus saline treated-group. (B) Representative images of Aβ staining by immunohistochemistry of the cerebral cortex of saline and rApoA-I-M-treated mice and the analysis of the number of Aβ-positive deposits (>50 pixels²) in those brains. * $p < 0.05$ rApoA-I-M versus saline-treated group. (C) Representative images of ThioS staining to detect the presence of fibrillar Aβ in the cerebral cortex of saline and rApoA-I-M-treated mice and the analysis of the number of ThS-positive deposits (>50 pixels²) in those brains. * $p < 0.05$ rApoA-I-M versus saline-treated group. (D) Representative images of vascular Aβ deposits determined by resorufin staining of the cerebral cortex of saline or rApoA-I-M-treated mice and the analysis of the area of positive fluorescent staining in those brains. * $p < 0.05$ rApoA-I-M versus saline-treated group. The data represent the mean ± SD, N = 6–8/group. Abbreviations: Aβ, beta amyloid; ApoA-I, apolipoprotein A-I; APP, amyloid precursor protein; rApoA-I, recombinant ApoA-I; SD, standard deviation; ThS, Thioflavin S.

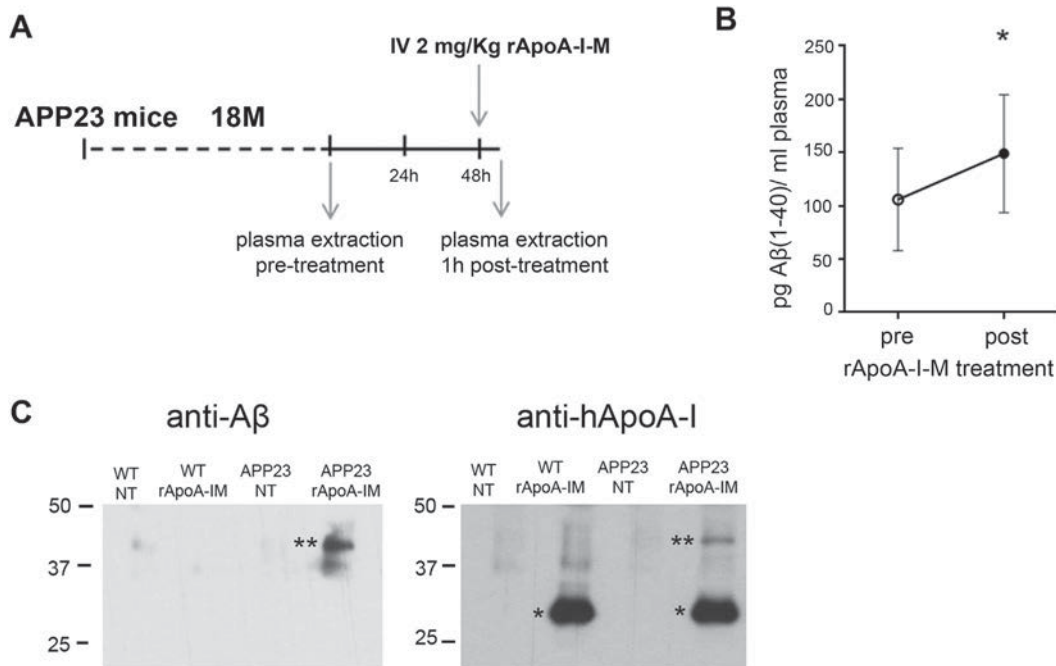


Fig. 5. Effect of acute rApoA-I-M treatment on Aβ plasma levels in APP23 mice. (A) Time diagram showing the experimental design of the acute treatment procedure with rApoA-I-Milano in old APP23 mice. (B) Plasma Aβ(1–40) levels before and after the rApoA-I-M IV treatment. * $p < 0.05$, paired t test. The data represent the mean \pm SD, $N = 5$. (C) Parallel nonreductive SDS-PAGE and Western blot analysis of plasma samples from nontreated (NT) and rApoA-I-M-treated wt and APP23 mice, using antibodies against anti-Aβ and anti-human ApoA-I. *Indicates the presence of rApoA-I-M in plasma and **indicates possible SDS-stable complexes of Aβ/rApoA-I-M in plasma. Abbreviations: Aβ, beta amyloid; ApoA-I, apolipoprotein A-I; APP, amyloid precursor protein; IV, intravenous; rApoA-I, recombinant ApoA-I; SD, standard deviation; wt, wild type.

(Fig. 3C). The age for starting the treatment was selected according to the progression of cerebral Aβ deposition in the APP23 transgenic line (Suppl. Fig. 2). Mice that received chronic doses of rApoA-I-M did not show differences in weight, appearance, or behavior compared to that of the saline-treated group. After 8 weeks of treatment, we found reduced levels of membrane-bound and insoluble Aβ(1–40) and Aβ(1–42), as well as lower soluble Aβ(1–40) levels, in the 18-month-old mice that received rApoA-I-M compared to that observed in the saline-treated group as determined by ELISA (Fig. 4A). The concentration of Aβ(1–40) and Aβ(1–42) in plasma obtained 24 hours after the last administration was also analyzed by ELISA, although plasma Aβ(1–42) was not detected in mice. We did not find differences in plasma Aβ(1–40) levels among APP23-treated groups. As expected, wt mice did not present detectable Aβ(1–42) or Aβ(1–40) in the brain or plasma. We also found less parenchymal Aβ deposits, determined by immunohistochemistry (Fig. 4B) and fewer fibrillar Aβ deposits, determined by ThS staining (Fig. 4C), in rApoA-I-M-treated APP23 mice. The intravenous treatment with rApoA-I-M also resulted in a reduction of CAA load (Fig. 4D), determined by resorufin staining which preferentially binds cerebrovascular amyloid deposits over plaques.

3.4. Effect of acute rApoA-I-M treatment on Aβ plasma levels

With the aim to detect whether rApoA-I-M was able to bind Aβ in vivo, we acutely treated APP23 mice with 2 mg/Kg of rApoA-I-M and obtained plasma 1 hour after the administration (Fig. 5A). First, when Aβ(1–40) levels were determined by ELISA in plasma before and after the rApoA-I-M administration, we observed a significant increase in circulating Aβ(1–40) levels in all mice analyzed (Fig. 5B). We then examined if we were able to identify rApoA-I-M/Aβ complexes in those plasma samples obtained only 1 hour after the treatment by nonreductive SDS-PAGE and Western blot. As shown

in the new Fig. 5C, we detected SDS-stable species (~40 kDa) that were recognized by both anti-human ApoA-I and anti-Aβ antibodies only in plasma from rApoA-I-M-APP23-treated mice, suggestive of complexes formed by rApoA-I-M/Aβ. In plasma from nontreated and treated wt mice or nontreated APP23 mice, complexes were not detected.

3.5. Effect of peripheral chronic treatment with rApoA-I-M on APP processing and expression of Aβ clearance receptors

We evaluated whether the lower levels of Aβ(1–42) and Aβ(1–40) in the brains of mice that received rApoA-I-M could be explained by a modification of APP processing or the Aβ clearance induced by the treatment. Fig. 6A demonstrates that there was no difference in brain levels of full-length APP expression or in the presence of the secreted APP fragment products (sAPPα and sAPPβ) and C-terminal APP fragments (α-CTF and β-CTF), indicating that chronic rApoA-I-M administration did not modify the processing of APP. We also confirmed that the expression of LRP-1 and RAGE, receptors involved in Aβ clearance at the blood-brain barrier (BBB), were not altered by the treatment with rApoA-I-M (Fig. 6B). The expression of insulin-degrading enzyme and neprilysin, which are 2 of the principal enzymes involved in Aβ degradation, was also not different in brains from saline or rApoA-I-M-treated mice (Fig. 6C).

3.6. Brain inflammatory status of APP23 mice chronically treated with rApoA-I-M

We determined the effect of the peripheral rApoA-I-M chronic treatment in brain inflammation through the evaluation of specific markers. We observed that the treatment effectively reduced glial reactivity, as assayed by the presence of GFAP, as well as activated microglia. Indeed, brains from rApoA-I-M-treated mice

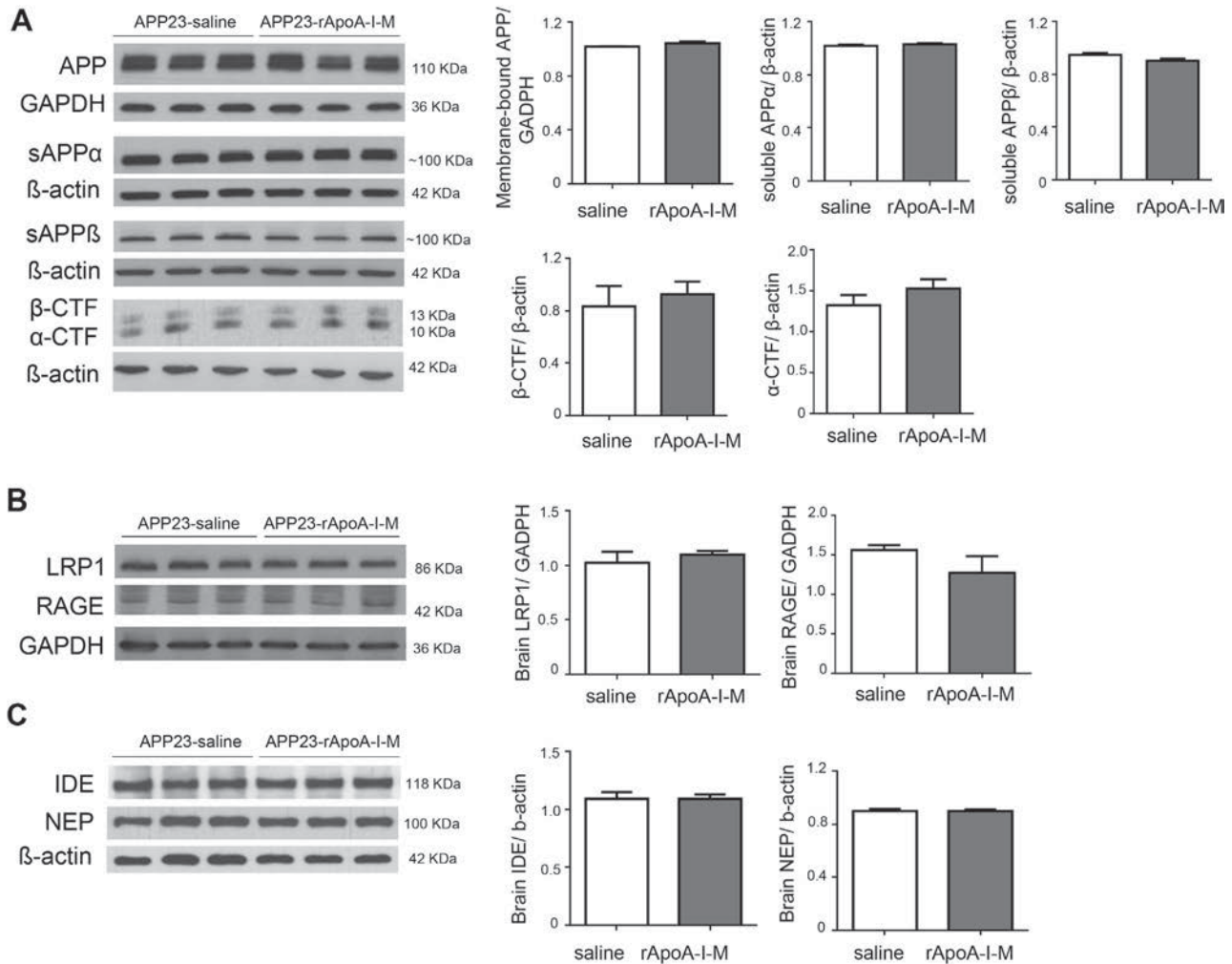


Fig. 6. Effect of rApoA-I-M treatment on the production and clearance of A β in APP23 mice. Western blot analysis to determine the levels of (A) full-length APP, soluble APP α , soluble APP β , α -CTF, and β -CTF, (B) the expression of A β receptors at the BBB level (LRP1 and RAGE), and (C) the expression of the principal A β degrading enzymes (IDE and NEP), in brain homogenates of rApoA-I-M and saline-treated mice. N = 4/group. Abbreviations: ApoA-I, apolipoprotein A-I; APP, amyloid precursor protein; IDE, insulin degrading enzyme; LRP1, lipoprotein receptor protein-1; NEP, neprilysin; RAGE, receptor for advanced glycosylated endproducts; rApoA-I, recombinant ApoA-I; α -CTF, APP C-terminal fragment α ; β -CTF, APP C-terminal fragment β .

showed a lower expression of the phagocytic microglia marker CD68, but no detectable changes in the brain expression of the resting microglia marker ionized calcium-binding adapter-1 (Fig. 7A). Immunofluorescence analysis confirmed the expression of GFAP in reactive astrocytes, as well as the CD68 positivity in cells surrounding the A β plaques in old APP23 mouse brains (Suppl. Fig. 3). On the other hand, the analysis of IL-1 β levels in the soluble fraction of brain homogenates determined by ELISA showed a trend towards a reduction in the rApoA-I-M-treated mice compared to that of the saline-treated group (1.18 ± 0.13 vs. 2.15 ± 0.46 pg/mg brain, respectively; $p = 0.089$), presenting comparable levels to the wt mouse brains (1.26 ± 0.20 pg/mg brain). Moreover, the concentration of the proinflammatory cytokine IL-1 β was positively correlated with soluble and insoluble levels of A β (1–42) and A β (1–40) in the whole APP23 mice cohort, confirming the relevant neuroinflammation associated with the A β deposition in this model (Fig. 7B). Neuroinflammation in APP23 mice was associated to fewer NeuN-positive cells in the CA1 area of the hippocampus compared with wt mice. However, rApoA-I-M treatment did not alter the neuronal loss in this area (Suppl. Fig. 4).

3.7. Lipidic profile of APP23 mice chronically treated with rApoA-I-M

Because APOA1-M carriers show an altered lipidic profile in plasma (Franceschini et al., 1980; Sirtori et al., 2001), we next analyzed whether the 2 months of treatment with rApoA-I-M could influence those parameters in mice. Twenty-four hours after the last infusion, we found indistinguishable levels of TC, HDL, LDL, and TGs in fasting plasma of rApoA-I-M- or saline-treated mice compared to the profile in wt mice (Fig. 8A). We also evaluated whether the treatment with rApoA-I-M resulted in a compensatory effect on the levels of ApoA-I, as well as on the most relevant apolipoproteins in the brain. An increased level of human ApoA-I, corresponding to the human recombinant protein used for the treatment, was confirmed in the rApoA-I-M-treated group (Fig. 8B). However, no differences between groups were obtained either in the plasma levels of mouse ApoA-I and ApoE or in the brain expression of ApoE and ApoJ (Fig. 8B and C). The treatment with rApoA-I-M did not alter the expression of cerebral ABCA1 or SRB-I (Fig. 8D), which are considered the key mediators of the cellular cholesterol efflux pathway. On the other hand, the

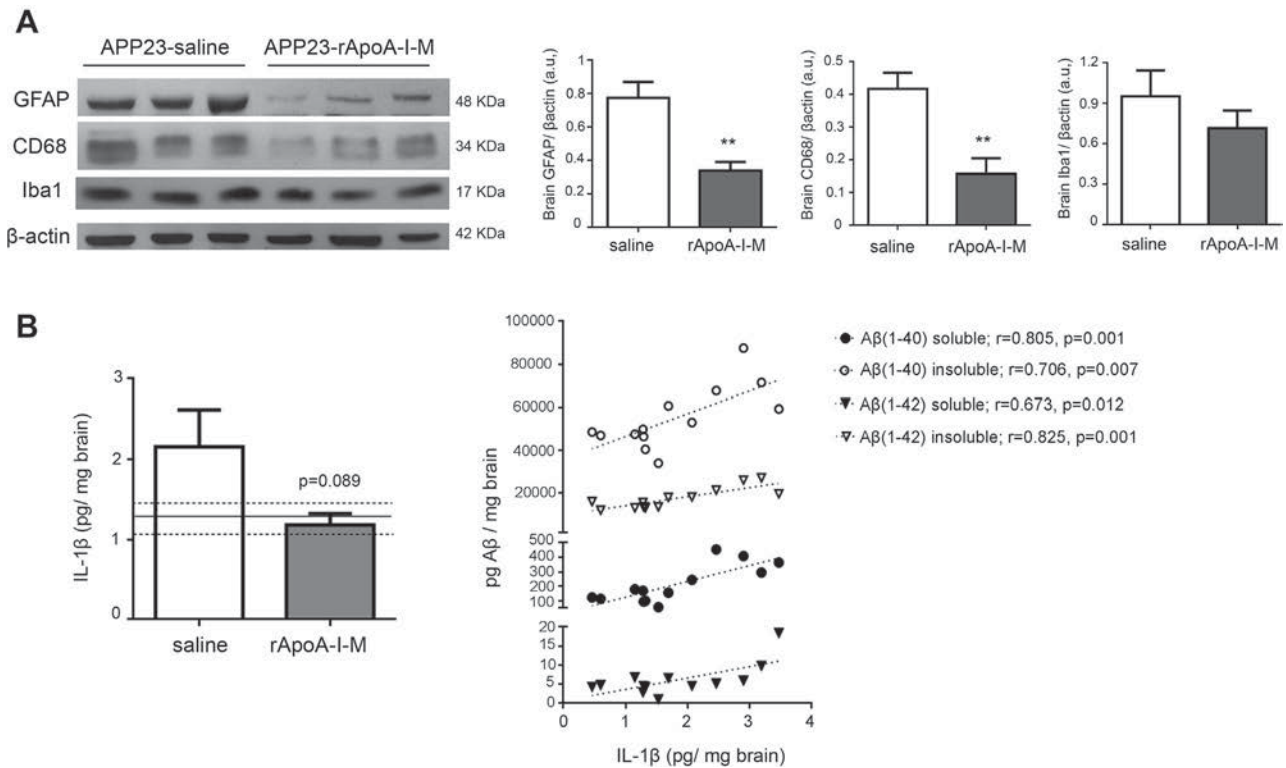


Fig. 7. Brain inflammatory status of APP23 transgenic mice chronically treated with rApoA-I-M. (A) Western blot analysis of GFAP (glial reactivity marker), IBA-1 (resting microglia marker), and CD68 (activated microglia marker) in the membrane-bound protein fraction of brain homogenates of rApoA-I-M and saline-treated mice. ** $p < 0.01$, $N = 8$ /group. (B1) IL-1 β levels determined by ELISA in the soluble protein fraction of brain homogenates of rApoA-I-M and saline-treated mice compared to the values obtained in wt mice, as indicated by the reference line in the graph. $N = 8$ /group. (B2) Scatter plot and correlations between brain IL-1 β levels and soluble and insoluble A β (1–40)/A β (1–42) in APP23. Abbreviations: A β , beta amyloid; ApoA-I, apolipoprotein A-I; APP, amyloid precursor protein; CD68, cluster of differentiation 68; GFAP, glial fibrillary acidic protein; IBA-1, ionized calcium-binding adapter-1; rApoA-I, recombinant ApoA-I; wt, wild type.

expression of mouse ApoA-I was undetectable in the brain analyzed either by Western blot or immunohistochemistry (data not shown). Furthermore, after an acute or chronic IV administration, rApoA-I-M was not detected in brain (processed 1 hour or 24 hours after the last infusion) by Western blot or ELISA (Suppl. Fig. 5), which suggested that the rApoA-I-M did not cross the BBB and supported the fact that it did not act via binding to cerebral A β .

4. Discussion

Currently, there is no treatment that improves the outcome of patients suffering from A β -related pathologies, such as AD or CAA. Therefore, proteins that bind A β material, prevent its aggregation, and modulate its transport may be powerful therapeutic tools. In this study, we have investigated the impact of a chronic peripheral treatment based on the intravenous administration of a natural variant of ApoA-I. The implication of ApoA-I in AD is not completely elucidated. Beyond its proposed role in preventing the formation of A β fibrils in vitro (Koldamova et al., 2001; Merino-Zamorano et al., 2016; Paula-Lima et al., 2009) or acting as an A β -peripheral transporter (Ghisso et al., 1993; Koudinov et al., 1998; Montañola et al., 2016), ApoA-I/HDL possesses vasoprotective, anti-inflammatory, and antioxidative properties (Mineo and Shaul, 2012) that makes ApoA-I-based therapies a suitable tool not only for coronary artery disease but also for cerebral β -amyloidosis. In fact, epidemiological data suggest that AD and cardiovascular disease share common risk factors, such as high blood pressure, high total plasma cholesterol, and severe atherosclerosis (Hofman et al., 1997; van Oijen et al., 2007). In this context, the main objective of this study was to

particularly determine the effect of the ApoA-I R173C-mutated protein (ApoA-I-M variant) in an experimental model of AD. For this purpose, we first produced and purified recombinant ApoA-I-M and ApoA-I-wt proteins from human cultured cells. We confirmed that both proteins were functional and equally effective in preventing the formation of high molecular species of A β (1–40) and A β (1–42). This result suggested that the R173C mutation did not confer a change in the conformation that interfered with the A β binding affinity. Thus, rApoA-I-M seemed to maintain the capacity of ApoA-I to act as an A β chaperone (Koldamova et al., 2001; Paula-Lima et al., 2009). We then tested their capability to avoid the cell viability reduction induced by A β (1–42) in brain endothelial cells. To our knowledge, this is the first time that cerebrovascular cells were challenged with the rApoA-I-M variant. We found that when the recombinant proteins were postincubated in A β (1–42)-damaged cells, only the rApoA-I-M had a protective impact, suggesting that this mutated form presented vasoprotective properties, beyond the A β binding effect.

The next step was to determine the effect of rApoA-I-M in an in vivo AD model. Among the different APP transgenic models, the APP23 mouse model was selected because it is characterized by a prominent vascular amyloid deposition and resultant amyloid angiopathy, in addition to the increasing number of fibrillar A β plaques with age (Sturchler-Pierrat et al., 1997). After confirming that the human protein rApoA-I-M was relatively stable in mouse plasma after its IV administration, a chronic treatment for 8 weeks (3 doses/week) was carried out in old APP23 mice. The treatment showed efficacy since the cerebral A β levels were significantly reduced in mice that received rApoA-I-M compared to that in the saline-treated mice. In particular, we found not only lower levels of

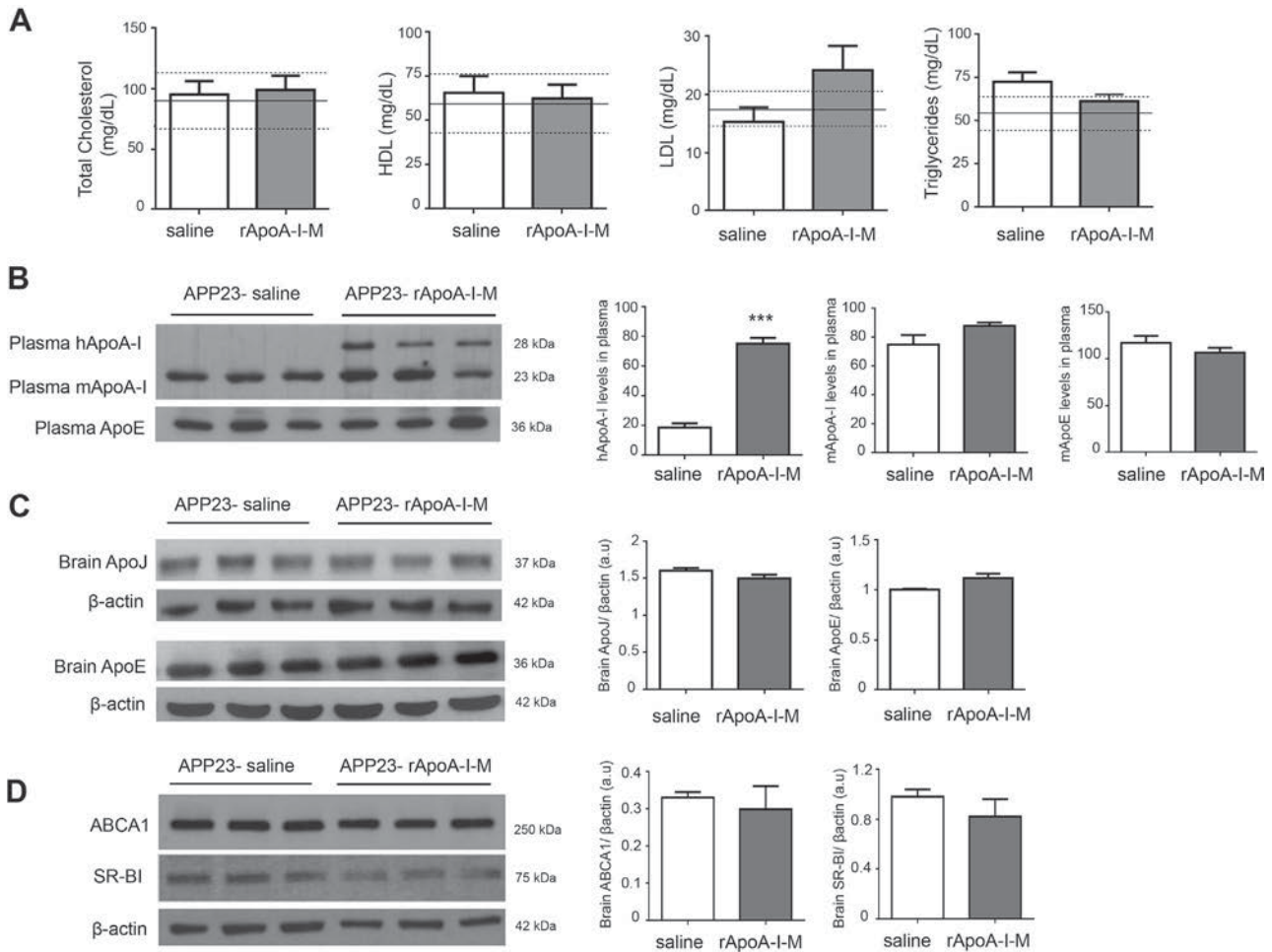


Fig. 8. Plasma and brain lipidic profile of APP23 transgenic mice chronically treated with rApoA-I-M. (A) Total cholesterol, HDL, LDL, and triglyceride levels in fasting plasma of rApoA-I-M and saline-treated mice compared to the values obtained in wt mice, as indicated by the reference line in the graphs (N = 5/group). (B) Western blot analysis of human ApoA-I, mouse ApoA-I, and ApoE in fasting plasma from rApoA-I-M and saline-treated mice. *** $p < 0.001$, N = 4/group. (C) Western blot analysis of ApoJ and ApoE in brain homogenates from rApoA-I-M and saline-treated mice, N = 4/group. (D) Western blot analysis of ABCA1 and SR-BI in brain homogenates from rApoA-I-M and saline-treated mice, N = 8/group. Abbreviations: ABCA1, ATP-binding cassette-A1; ApoA-I, apolipoprotein A-I; ApoE, apolipoprotein E; ApoJ, apolipoprotein J; APP, amyloid precursor protein; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; rApoA-I, recombinant ApoA-I; SR-BI, scavenger receptor-B-I; wt, wild type.

membrane-bound A β (1–40) and A β (1–42) and soluble A β (1–40) but also decreased levels of insoluble A β peptides in mouse brains treated with rApoA-I-M, as detected by ELISA and immunohistochemistry. Interestingly, rApoA-I-M-treated mice also presented less CAA load. These differences in A β levels could not be attributed to changes in A β production or degradation. Nevertheless, we found that the reduced cerebral levels of A β were accompanied by a lower expression of neuroinflammatory markers. In AD brains, neuroinflammation is a chronic feature that is believed to be initiated by A β deposition, which activates microglia and increases the production of proinflammatory cytokines and chemokines that lead to the activation of astrocytes (Eikelenboom et al., 2010; Minetti et al., 2016). In this regard, we found a lower expression of the glial reactivity marker GFAP and the phagocytic microglia marker CD68 in brains from mice that received rApoA-I-M chronically. Furthermore, those brains presented lower levels of IL-1 β , which is one of the major proinflammatory cytokines produced by microglia during central nervous system inflammation. Hence, our results suggest that the lower expression of brain inflammatory markers in rApoA-I-M-treated APP23 mice might be explained by the reduction of A β cerebral deposition induced by the peripheral chronic treatment.

Because carriers of the Milano mutation in APOA1 present low HDL levels and elevated TGs in plasma (Franceschini et al., 1980;

Sirtori et al., 2001) and the infusion of a high dose of lipidated rApoA-I-M in humans resulted in a similar profile (Kallend et al., 2016), we evaluated the possible modulation of the lipidic profile in mouse plasma after chronic treatment with human rApoA-I-M. We did not detect alterations in TC, HDL, LDL, TGs, or ApoA-I levels in plasma obtained 24 hours after the last rApoA-I-M infusion compared to that observed in the saline-treated group. It is worth mentioning that we used much lower doses of rApoA-I-M compared to that used in previous studies in animals or humans (Kallend et al., 2016; Kaul et al., 2004; Kempen et al., 2016; Nissen et al., 2003). The levels of the other principal apolipoproteins related to brain cholesterol metabolism, ApoJ and ApoE, were also analyzed and were shown to be unaltered by the rApoA-I-M treatment. Therefore, although ApoE levels have a profound effect on A β accumulation (Kanekiyo and Xu, 2014), rApoA-I-M did not seem to prevent the deposition of cerebral A β load through a mechanism mediated by ApoE. On the other hand, although the mechanisms responsible for the atheroprotective effects of rApoA-I-M are not fully understood, many studies have proposed that the benefits would be mediated via an enhancement in the reverse cholesterol transport (Cimmino et al., 2009; Franceschini et al., 1999; Kallend et al., 2016; Kempen et al., 2014; Ma et al., 2012; Shah et al., 1998). In fact, a phase I randomized trial has shown

that the infusion of lipidated rApoA-I-M (MDCO-216) increases the cholesterol efflux capacity mediated by ABCA1 and SRB-I receptors *ex vivo* (Kallend et al., 2016). Other studies showed discrepancies and claimed that rApoA-I-M and rApoA-I-wt have a similar capacity to stimulate cellular lipid mobilization (Alexander et al., 2009b; Weibel et al., 2007). In the neurological context, the deletion of SRB-I (Thanopoulou et al., 2010) or ABCA-1 (Koldamova et al., 2005; Wahrle et al., 2005) induced an increase in fibrillar A β levels and cognitive worsening in AD mouse transgenic models, suggesting that the modulation of cholesterol metabolism defines relevant features of the A β -associated pathology. In our study, we did not detect differences in ABCA1 or SRB-I expression in brain homogenates from mice that received rApoA-I-M or saline chronically, at least 24 hours after the last infusion. Hence, the fact that rApoA-I-M reduces or prevents A β cerebral accumulation in our model cannot be explained by a profound modulation of cholesterol metabolism. However, dedicated experiments to determine the possible changes in the levels or distribution of HDL subfractions by rApoA-I-M in our model should be conducted (Kempen et al., 2014). We were not able to detect rApoA-I-M in brain after a peripheral administration, indicating that the recombinant apolipoprotein does not cross the BBB. Alternatively, we determined that rApoA-I-M bound A β in plasma and induced a fast increase of circulating A β (1–40) level after a single IV infusion. Therefore, our results suggest that rApoA-I-M could lower cerebral A β by enhancing the efflux out of the brain from the circulation. Such mechanism, previously termed as “peripheral sink mechanism,” proposes that A β binding molecules in the periphery can regulate A β clearance from the central nervous system (DeMattos et al., 2001; Fitz et al., 2015). In our study, the exact mechanism by which the interaction of rApoA-I-M and A β in plasma results in a mobilization of A β accumulated in parenchyma still needs to be established.

An important limitation of our study is the lack of data regarding the effect of rApoA-I-M on cognition and behavior. Although we determined that the treatment did not modify the neurodegeneration associated to the APP23 mice model at 18 months of age, the neuronal loss observed in CA1 might have occurred before the chronic treatment started (at 16 months of age). Further studies testing the efficacy, in terms of cognitive function related to A β cerebral accumulation, of acute or chronic rApoA-I-M treatment at different ages and using alternative administration routes, are needed. In future experiments, the effect of rApoA-I-wt in comparison to the impact of the rApoA-I-M variant *in vivo* should be also considered.

In summary, the significant reduction of cerebral A β levels (including number of A β plaques and CAA load) achieved by the chronic treatment with rApoA-I-M reinforces the idea that ApoA-I/HDL-based therapies could be an effective approach to prevent the development and progression of AD. Other groups have contributed to this hypothesis from a genetic perspective (Fagan et al., 2004; Fitz et al., 2015; Lefterov et al., 2010; Lewis et al., 2010) or using a pharmacological treatment approach (Handattu et al., 2009; Robert et al., 2016). In this regard, reconstituted HDL/ApoA-I was shown to acutely reduce only soluble brain A β levels in APP/presenilin-1 mice; however, neither total nor vascular cortical amyloid loads were altered after chronic treatment with rHDLs assembled with ApoA-I (Robert et al., 2016). Evident differences between our study and this last report (lipidated vs. free apolipoprotein, ApoA-I wt vs. mutated form, different AD experimental model, higher doses, and different timing for the chronic treatment) may explain the differences obtained in the principal end point. However, altogether these studies emphasize that a peripheral early intervention using ApoA-I variants might be a promising strategy to avoid A β accumulation in the brain and consequently ameliorate AD pathology.

5. Conclusions

Prolonged peripheral treatment with rApoA-I-M in old APP23 mice significantly reduced the cerebral A β load and neuroinflammation associated with this model. Although rApoA-I-M can be considered as a safe and promising therapeutic candidate to protect the brain in AD, its precise mechanism of action still needs to be elucidated.

Disclosure statement

The authors have no actual or potential conflicts of interest.

Acknowledgements

This work has been funded by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (PI14/01134), co-financed by the European Regional Development Fund, (FEDER), Fundació La Marató de TV3 (40/U/2014) and an EU Joint Programme—Neurodegenerative Disease Research (JPND) project, supported through ISCIII, Spain (SNOWBALL project). The Neurovascular Research Laboratory is part of the INVICTUS+ network, ISCIII, Spain (RD16/0019/0021). M.H.-G. is supported by the Miguel Servet program, ISCIII, Spain (CP12/03259).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.08.028>.

References

- Alexander, E.T., Tanaka, M., Kono, M., Saito, H., Rader, D.J., Phillips, M.C., 2009a. Structural and functional consequences of the Milano mutation (R173C) in human apolipoprotein A-I. *J. Lipid Res.* 50, 1409–1419.
- Alexander, E.T., Weibel, G.L., Joshi, M.R., Vedhachalam, C., de la Llera-Moya, M., Rothblat, G.H., Phillips, M.C., Rader, D.J., 2009b. Macrophage reverse cholesterol transport in mice expressing ApoA-I Milano. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 1496–1501.
- Bielicki, J.K., Oda, M.N., 2002. Apolipoprotein A-I(Milano) and apolipoprotein A-I(Paris) exhibit an antioxidant activity distinct from that of wild-type apolipoprotein A-I. *Biochemistry* 41, 2089–2096.
- Cimmino, G., Ibanez, B., Vilahur, G., Speidl, W.S., Fuster, V., Badimon, L., Badimon, J.J., 2009. Up-regulation of reverse cholesterol transport key players and rescue from global inflammation by ApoA-I(Milano). *J. Cell Mol. Med.* 13, 3226–3235.
- DeMattos, R.B., Bales, K.R., Cummins, D.J., Dodart, J.C., Paul, S.M., Holtzman, D.M., 2001. Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 8850–8855.
- Duyckaerts, C., Delatour, B., Potier, M.C., 2009. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol.* 118, 5–36.
- Eikelenboom, P., van Exel, E., Hoozemans, J.J., Veerhuis, R., Rozemuller, A.J., van Gool, W.A., 2010. Neuroinflammation - an early event in both the history and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurodegener. Dis.* 7, 38–41.
- Fagan, A.M., Christopher, E., Taylor, J.W., Parsadanian, M., Spinner, M., Watson, M., Fryer, J.D., Wahrle, S., Bales, K.R., Paul, S.M., Holtzman, D.M., 2004. ApoA1 deficiency results in marked reductions in plasma cholesterol but no alterations in amyloid-beta pathology in a mouse model of Alzheimer's disease-like cerebral amyloidosis. *Am. J. Pathol.* 165, 1413–1422.
- Fitz, N.F., Tapias, V., Cronican, A.A., Castranio, E.L., Saleem, M., Carter, A.Y., Lefterova, M., Lefterov, I., Koldamova, R., 2015. Opposing effects of ApoE/ApoA1 double deletion on amyloid- β pathology and cognitive performance in APP mice. *Brain* 138, 3699–3715.
- Franceschini, G., Calabresi, L., Chiesa, G., Parolini, C., Sirtori, C.R., Canavesi, M., Bernini, F., 1999. Increased cholesterol efflux potential of sera from ApoA-I/Milano carriers and transgenic mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 1257–1262.
- Franceschini, G., Sirtori, C.R., Capurso 2nd, A., Weisgraber, K.H., Mahley, R.W., 1980. A-I/Milano apoprotein. Decreased high density lipoprotein cholesterol levels with significant lipoprotein modifications and without clinical atherosclerosis in an Italian family. *J. Clin. Invest.* 66, 892–900.
- Ghiso, J., Matsubara, E., Koudinov, A., Choi-Miura, N.H., Tomita, M., Wisniewski, T., Frangione, B., 1993. The cerebrospinal-fluid soluble form of Alzheimer's amyloid beta is complexed to SP-40,40 (apolipoprotein J), an inhibitor of the complement membrane-attack complex. *Biochem. J.* 293, 27–30.

- Giannarelli, C., Cimmino, G., Ibanez, B., Chiesa, G., Garcia-Prieto, J., Santos-Gallego, C.G., Alique-Aguilar, M., Fuster, V., Sirtori, C., Badimon, J.J., 2012. Acute ApoA-I Milano administration induces plaque regression and stabilisation in the long term. *Thromb. Haemost.* 108, 1246–1248.
- Greenberg, S.M., Rebeck, G.W., Vonsattel, J.P., Gomez-Isla, T., Hyman, B.T., 1995. Apolipoprotein E epsilon 4 and cerebral hemorrhage associated with amyloid angiopathy. *Ann. Neurol.* 38, 254–259.
- Han, B.H., Zhou, M.L., Vellimana, A.K., Milner, E., Kim, D.H., Greenberg, J.K., Chu, W., Mach, R.H., Zipfel, G.J., 2011. Resorufin analogs preferentially bind cerebrovascular amyloid: potential use as imaging ligands for cerebral amyloid angiopathy. *Mol. Neurodegener.* 6, 86.
- Handattu, S.P., Garber, D.W., Monroe, C.E., van Groen, T., Kadish, I., Nayyar, G., Cao, D., Palgunachari, M.N., Li, L., Anantharamaiah, G.M., 2009. Oral apolipoprotein A-I mimetic peptide improves cognitive function and reduces amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 34, 525–534.
- Harr, S.D., Uint, L., Hollister, R., Hyman, B.T., Mendez, A.J., 1996. Brain expression of apolipoproteins E, J, and A-I in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 66, 2429–2435.
- Hartmann, T., 2001. Cholesterol, A beta and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 24, 45–48.
- Hofman, A., Ott, A., Breteler, M.M., Bots, M.L., Slieter, A.J., van Harskamp, F., van Duijn, C.N., Van Broeckhoven, C., Grobbee, D.E., 1997. Atherosclerosis, apolipoprotein E, and prevalence of dementia and Alzheimer's disease in the Rotterdam Study. *Lancet* 349, 151–154.
- Ibanez, B., Giannarelli, C., Cimmino, G., Santos-Gallego, C.G., Alique, M., Pinero, A., Vilahur, G., Fuster, V., Badimon, L., Badimon, J.J., 2012. Recombinant HDL (Milano) exerts greater anti-inflammatory and plaque stabilizing properties than HDL (wild-type). *Atherosclerosis* 220, 72–77.
- Ibanez, B., Vilahur, G., Cimmino, G., Speidl, W.S., Pinero, A., Choi, B.G., Zafar, M.U., Santos-Gallego, C.G., Krause, B., Badimon, L., Fuster, V., Badimon, J.J., 2008. Rapid change in plaque size, composition, and molecular footprint after recombinant apolipoprotein A-I Milano (ETC-216) administration: magnetic resonance imaging study in an experimental model of atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 51, 1104–1109.
- Kallend, D.G., Reijers, J.A., Bellibas, S.E., Bobillier, A., Kempen, H., Burggraaf, J., Moerland, M., Wijngaard, P.L., 2016. A single infusion of MDCO-216 (ApoA-I Milano/POPC) increases ABCA1-mediated cholesterol efflux and pre-beta 1 HDL in healthy volunteers and patients with stable coronary artery disease. *Eur. Heart J. Cardiovasc. Pharmacother.* 2, 23–29.
- Kanekiyo, T., Xu, H., 2014. Bu ApoE and Aβ in Alzheimer's disease: accidental encounters or partners? *Neuron* 81, 740–754.
- Kaul, S., Coin, B., Hedayati, A., Yano, J., Cercek, B., Chyu, K.Y., Shah, P.K., 2004. Rapid reversal of endothelial dysfunction in hypercholesterolemic apolipoprotein E null mice by recombinant apolipoprotein A-I (Milano)-phospholipid complex. *J. Am. Coll. Cardiol.* 44, 1311–1319.
- Kawano, M., Kawakami, M., Otsuka, M., Yashima, H., Yaginuma, T., Ueki, A., 1995. Marked decrease of plasma apolipoprotein AI and AII in Japanese patients with late-onset non-familial Alzheimer's disease. *Clin. Chim. Acta* 239, 209–211.
- Kempen, H.J., Asztalos, B.F., Moerland, M., Jeyarajah, E., Otvos, J., Kallend, D.G., Bellibas, S.E., Wijngaard, P.L., 2016. High-density lipoprotein subfractions and cholesterol efflux capacities after infusion of MDCO-216 (Apolipoprotein A-I Milano/Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylcholine) in healthy volunteers and stable coronary artery disease patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 36, 736–742.
- Kempen, H.J., Schranz, D.B., Asztalos, B.F., Otvos, J., Jeyarajah, E., Drazul-Schrader, D., Collins, H.L., Adelman, S.J., Wijngaard, P.L., 2014. Incubation of MDCO-216 (ApoA-I Milano/POPC) with human serum Potentiates ABCA1-mediated cholesterol efflux capacity, generates new Prebeta-1 HDL, and causes an increase in HDL size. *J. Lipids* 2014, 923903.
- Koldamova, R., Staufenbiel, M., Lefterov, I., 2005. Lack of ABCA1 considerably decreases brain ApoE level and increases amyloid deposition in APP23 mice. *J. Biol. Chem.* 280, 43224–43235.
- Koldamova, R.P., Lefterov, I.M., Lefterova, M.I., Lazo, J.S., 2001. Apolipoprotein A-I directly interacts with amyloid precursor protein and inhibits A beta aggregation and toxicity. *Biochemistry* 40, 3553–3560.
- Koudinov, A.R., Berezov, T.T., Kumar, A., Koudinova, N.V., 1998. Alzheimer's amyloid beta interaction with normal human plasma high density lipoprotein: association with apolipoprotein and lipids. *Clin. Chim. Acta* 270, 75–84.
- Lefterov, I., Fitz, N.F., Cronican, A.A., Fogg, A., Lefterov, P., Kodali, R., Wetzel, R., Koldamova, R., 2010. Apolipoprotein A-I deficiency increases cerebral amyloid angiopathy and cognitive deficits in APP/PS1DeltaE9 mice. *J. Biol. Chem.* 285, 36945–36957.
- Lewis, T.L., Cao, D., Lu, H., Mans, R.A., Su, Y.R., Jungbauer, L., Linton, M.F., Fazio, S., LaDu, M.J., Li, L., 2010. Overexpression of human apolipoprotein A-I preserves cognitive function and attenuates neuroinflammation and cerebral amyloid angiopathy in a mouse model of Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 285, 36958–36968.
- Ma, C.L., Beckstead, J.A., Thompson, A., Hafiane, A., Wang, R.H., Ryan, R.O., Kiss, R.S., 2012. Tweaking the cholesterol efflux capacity of reconstituted HDL. *Biochem. Cell Biol.* 90, 636–645.
- Merched, A., Xia, Y., Visvikis, S., Serot, J.M., Siest, G., 2000. Decreased high-density lipoprotein cholesterol and serum apolipoprotein AI concentrations are highly correlated with the severity of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 21, 27–30.
- Merino-Zamorano, C., Fernández-de Retana, S., Montañola, A., Batlle, A., Saint-Pol, J., Mysiorek, C., Gosselet, F., Montaner, J., Hernández-Guillamon, M., 2016. Modulation of amyloid-β1-40 transport by ApoA1 and ApoJ across an in vitro model of the blood-brain barrier. *J. Alzheimers Dis.* 53, 677–691.
- Mineo, C., Shaul, P.W., 2012. Novel biological functions of high-density lipoprotein cholesterol. *Circ. Res.* 111, 1079–1090.
- Minett, T., Classey, J., Matthews, F.E., Fahrenhold, M., Taga, M., Brayne, C., Ince, P.G., Nicoll, J.A., Boche, D. MRC CFAS, 2016. Microglial immunophenotype in dementia with Alzheimer's pathology. *J. Neuroinflammation* 13, 135.
- Montañola, A., de Retana, S.F., López-Rueda, A., Merino-Zamorano, C., Penalba, A., Fernández-Álvarez, P., Rodríguez-Luna, D., Malagelada, A., Pujadas, F., Montaner, J., 2016. Hernández-Guillamon M. ApoA1, ApoJ and ApoE plasma levels and genotype frequencies in cerebral amyloid angiopathy. *Neuro-molecular Med.* 18, 99–108.
- Nissen, S.E., Tsunoda, T., Tuzcu, E.M., Schoenhagen, P., Cooper, C.J., Yasin, M., Eaton, G.M., Lauer, M.A., Sheldon, W.S., Grines, C.L., Halpern, S., Crowe, T., Blankenship, J.C., Kerensky, R., 2003. Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. *JAMA* 290, 2292–2300.
- Paula-Lima, A.C., Triccerri, M.A., Brito-Moreira, J., Bomfim, T.R., Oliveira, F.F., Magdesian, M.H., Grinberg, L.T., Panizzutti, R., Ferreira, S.T., 2009. Human apolipoprotein A-I binds amyloid-beta and prevents Abeta-induced neurotoxicity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 1361–1370.
- Reitz, C., Tang, M.X., Schupf, N., Manly, J.J., Mayeux, R., Luchsinger, J.A., 2010. Association of higher levels of high-density lipoprotein cholesterol in elderly individuals and lower risk of late-onset Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 67, 1491–1497.
- Robert, J., Stukas, S., Button, E., Cheng, W.H., Lee, M., Fan, J., Wilkinson, A., Kulic, I., Wright, S.D., Wellington, C.L., 2016. Reconstituted high-density lipoproteins acutely reduce soluble brain Aβ levels in symptomatic APP/PS1 mice. *Biochim. Biophys. Acta* 1862, 1027–1036.
- Saczynski, J.S., White, L., Peila, R.L., Rodriguez, B.L., Launer, L.J., 2007. The relation between apolipoprotein A-I and dementia: the Honolulu-Asia aging study. *Am. J. Epidemiol.* 165, 985–992.
- Schmechel, D.E., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Crain, B.J., Hulette, C.M., Joo, S.H., Pericak-Vance, M.A., Goldgaber, D., Roses, A.D., 1993. Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 9649–9653.
- Shah, P.K., Nilsson, J., Kaul, S., Fishbein, M.C., Ageland, H., Hamsten, A., Johansson, J., Karpe, F., Cercek, B., 1998. Effects of recombinant apolipoprotein A-I (Milano) on aortic atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 97, 780–785.
- Sirtori, C.R., Calabresi, L., Franceschini, G., Baldassarre, D., Amato, M., Johansson, J., Salvetti, M., Monteduro, C., Zulli, R., Muiesan, M.L., Agabiti-Rosei, E., 2001. Cardiovascular status of carriers of the apolipoprotein A-I (Milano) mutant: the Limone sul Garda study. *Circulation* 103, 1949–1954.
- Solomon, A., Kivipelto, M., Wolozin, B., Zhou, J., Whitmer, R.A., 2009. Midlife serum cholesterol and increased risk of Alzheimer's and vascular dementia three decades later. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 28, 75–80.
- Speidl, W.S., Cimmino, G., Ibanez, B., Elmariah, S., Hutter, R., Garcia, M.J., Fuster, V., Goldman, M.E., Badimon, J.J., 2010. Recombinant apolipoprotein A-I Milano rapidly reverses aortic valve stenosis and decreases leaflet inflammation in an experimental rabbit model. *Eur. Heart J.* 31, 2049–2057.
- Stukas, S., Robert, J., Wellington, C.L., 2014. High-density lipoproteins and cerebrovascular integrity in Alzheimer's disease. *Cell Metab.* 19, 574–591.
- Sturchler-Pierrat, C., Abramowski, D., Duke, M., Wiederhold, K.H., Mistl, C., Rothacher, S., Ledermann, B., Bürki, K., Frey, P., Paganetti, P.A., Waridel, C., Calhoun, M.E., Jucker, M., Probst, A., Staufenbiel, M., Sommer, B., 1997. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 13287–13292.
- Thanopoulou, K., Fragkouli, A., Stylianopoulou, F., Georgopoulos, S., 2010. SR-BI regulates perivascular macrophages and modifies amyloid pathology in an Alzheimer mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 20816–20821.
- Vagelatos, N.T., Eslick, G.D., 2013. Type 2 diabetes as a risk factor for Alzheimer's disease: the confounders, interactions, and neuropathology associated with this relationship. *Epidemiol. Rev.* 35, 152–160.
- van Oijen, M., de Jong, F.J., Wittman, J.C., Hofman, A., Koudstaal, P.J., Breteler, M.M., 2007. Atherosclerosis and risk for dementia. *Ann. Neurol.* 61, 403–410.
- Wahrle, S.E., Jiang, H., Parsadanian, M., Hartman, R.E., Bales, K.R., Paul, S.M., Holtzman, D.M., 2005. Deletion of Abca1 increases Abeta deposition in the PDAPP transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 280, 43236–43242.
- Weibel, G.L., Alexander, E.T., Joshi, M.R., Rader, D.J., Lund-Katz, S., Phillips, M.C., Rothblat, G.H., 2007. Wild-type ApoA-I and the Milano variant have similar abilities to stimulate cellular lipid mobilization and efflux. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 2022–2029.
- Weisgraber, K.H., Rall Jr., S.C., Bersot, T.P., Mahley, R.W., Franceschini, G., Sirtori, C.R., 1983. Apolipoprotein A-I Milano. Detection of normal A-I in affected subjects and evidence for a cysteine for arginine substitution in the variant A-I. *J. Biol. Chem.* 258, 2508–2513.
- Weksler, B.B., Subileau, E.A., Perrière, N., Charneau, P., Holloway, K., Leveque, M., Tricoire-Leignel, H., Nicotra, A., Bourdoulous, S., Turowski, P., Male, D.K., Roux, F., Greenwood, J., Romero, I.A., Couraud, P.O., 2005. Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB J.* 19, 1872–1874.
- Yardeni, T., Eckhaus, M., Morris, H.D., Huizing, M., Hoogstraten-Miller, S., 2011. Retro-orbital injections in mice. *Lab Anim. (NY)* 40, 155–160.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Intravenous treatment with human recombinant ApoA-I Milano reduces β -amyloid cerebral deposition in the APP23-transgenic mouse model of Alzheimer's disease

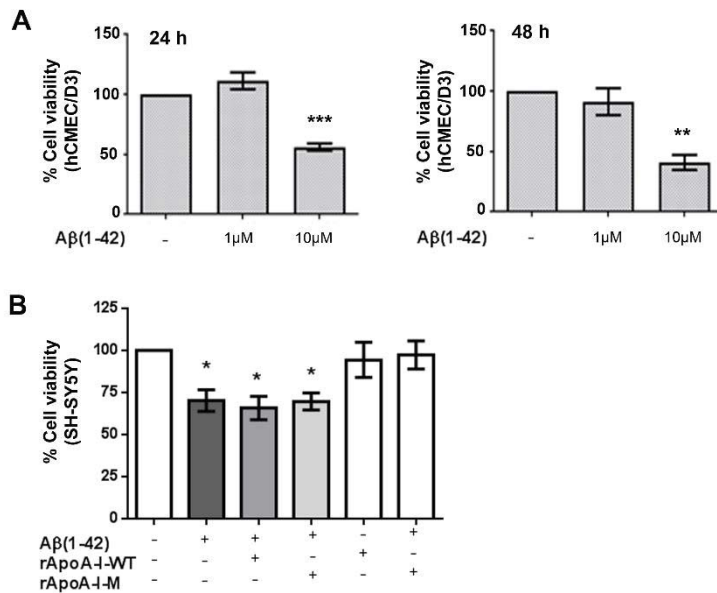
Sofía Fernández-de Retana¹, Alex Montaña¹, Paula Marazuela¹, Maialen De La Cuesta¹, Aina Batlle¹, Marc Fatar², Saskia Grudzenski², Joan Montaner¹, Mar Hernández-Guillamon^{1*}

¹ Neurovascular Research Laboratory, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.; ² Department of Neurology, Universitätsmedizin Mannheim, Heidelberg University, 68167 Mannheim, Germany.

* Corresponding author:

Mar Hernández-Guillamon: Mar.hernandez.guillamon@vhir.org / marguillamon@gmail.com

Supplementary Figure S1

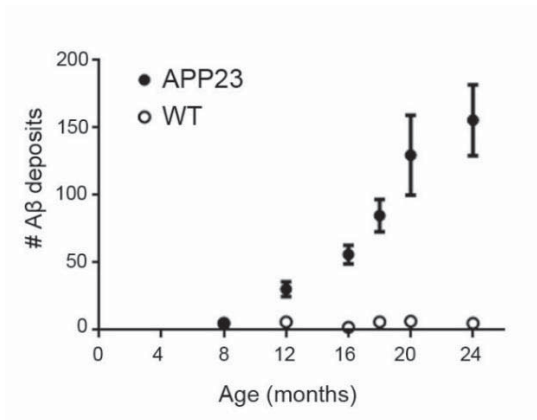


Supplementary Figure S1. Effect of Aβ(1-42) on hCMEC/D3 or SH-SY5Y cell lines. (A) MTT reduction viability assay after the treatment with 1 μM or 10 μM Aβ(1-42) in hCMEC/D3 for 24 h or 48 h. **(B)** MTT reduction viability assay after the co-treatment with 10 μM Aβ(1-42) and 1 μM rApoA-I-wt/ rApoA-I-M for 24 h in SH-SY5Y cells. Data represent mean ± SEM of at least 4 independent experiments. *** p<0.001, ** p<0.01 and * p<0.05 compared to the control condition.

Supplementary Information

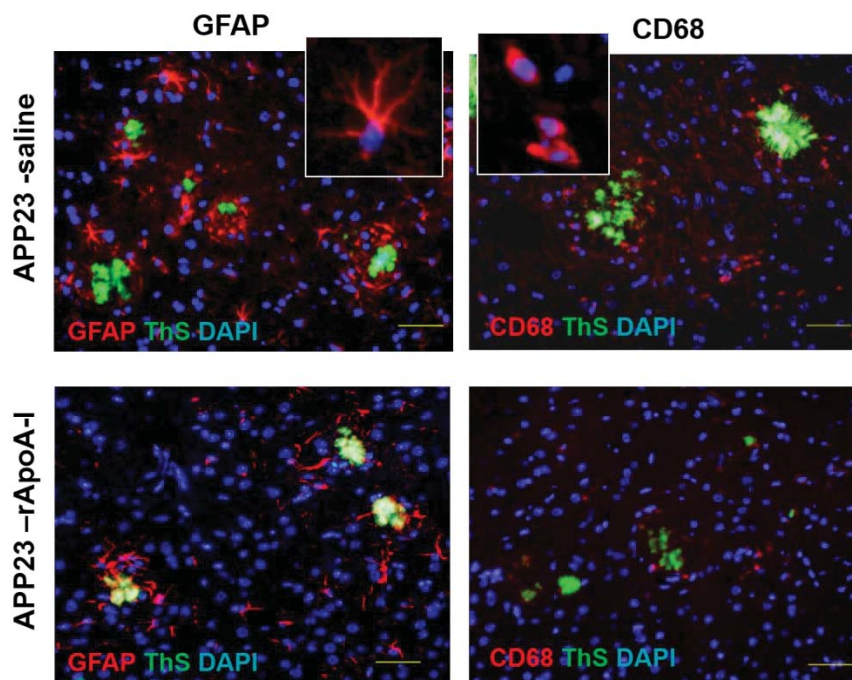
Intravenous treatment with human recombinant ApoA-I Milano reduced β -amyloid cerebral deposition in the APP23-transgenic mouse model of Alzheimer's disease

Supplementary Figure S2



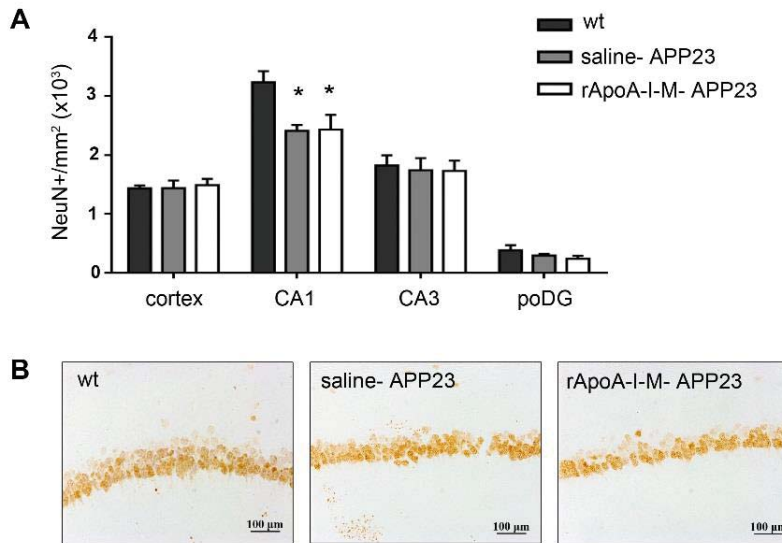
Supplementary Figure S2. Time-course of parenchymal A β deposition in WT and APP23 mice with age. Analysis of the number of human A β -positive deposits (>50 pixels²) in parenchyma assessed by immunohistochemistry. N=4-8/ group.

Supplementary Figure S3



Supplementary Figure S3. Expression of GFAP and CD68 in APP23 brains. GFAP and CD68 immunofluorescence (red) and ThS staining (green) in brains from APP23 mice chronically treated with saline or rApoA-I-M. Nuclei are stained with DAPI (blue). The zoomed images allow the visualization of the morphology of cells expressing GFAP or CD68.

Supplementary Figure S4



Supplementary Figure S4. Neuronal loss evaluation through the quantification of NeuN positive cells. (A) Quantification of cells/mm² in cortex, CA1 and CA3 regions of hippocampus and polymorphic layer of dentate gyrus (poDG). *p<0.05 vs wt mice. (B) Representative images of the NeuN immunohistochemistry showing the CA1 region of hippocampus from wt, saline and rApoA-I-M-treated APP23 mice.

SUPPLEMENTARY METHODS

Neuronal loss quantification

The neuronal loss was evaluated quantifying the NeuN positive cells in paraffin-embedded sagittal sections from C57/BL6 wt mice, saline treated APP23 mice and rApoA-I-M treated mice (n=4/5). To this end, brain sections were deparaffinized for 1h at 65°C, rehydrated and incubated during 1 h in blocking solution (PBS, 0.2% triton-X, 10% FBS and 1.5 g/ml glycine). Samples were then incubated o/n at 4°C with anti-NeuN antibody (Millipore) diluted 1/200 in blocking solution. After that, slices were incubated with biotinylated α -mouse IgG diluted 1/500 in blocking solution for 1h at RT, followed by 1 h incubation with streptavidin-HRP diluted 1/200 in blocking solution. Finally, DAB was applied until a brown end-product was visualized. The NeuN positive cells quantification was done in cortex and hippocampus (CA1, CA3 and polymorphic layer of dentate gyrus (poDG)). To this end, 3 independent images were obtained from studied brain areas with the 40X objective. In each image, NeuN positive cells were counted in 3 different random squares of 150 μ m² in cortical areas, whereas for the different regions of hippocampus, squares of 100 μ m² were used. Results are presented as the mean of counted cells per mm².

3.2- ARTÍCULO 2

Characterization of ApoJ-reconstituted high-density lipoproteins (rHDL) nanodisc for the potential treatment of cerebral β -amyloidosis

Scientific Reports (2017)

Nov 7; 7(1):14637. doi: 10.1038/s41598-017-15215-w

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Characterization of ApoJ-reconstituted high-density lipoprotein (rHDL) nanodisc for the potential treatment of cerebral β -amyloidosis

Sofía Fernández-de-Retana¹, Mary Cano-Sarabia², Paula Marazuela¹, Jose Luis Sánchez-Quesada³, Annabel García-Leon³, Alex Montañola¹, Joan Montaner¹, Daniel MasPOCH^{2,4} & Mar Hernández-Guillamon¹

Cerebral β -amyloidosis is a major feature of Alzheimer's disease (AD), characterized by the accumulation of β -amyloid protein (A β) in the brain. Several studies have implicated lipid/lipoprotein metabolism in the regulation of β -amyloidosis. In this regard, HDL (High Density Lipoprotein)-based therapies could ameliorate pathological features associated with AD. As apolipoprotein J (ApoJ) is a natural chaperone that interacts with A β , avoiding its aggregation and toxicity, in this study we propose to prepare reconstituted rHDL-rApoJ nanoparticles by assembling phospholipids with recombinant human ApoJ (rApoJ). Hence, rHDL particles were prepared using the cholate dialysis method and characterized by N-PAGE, dynamic light scattering, circular dichroism and electron transmission microscopy. The preparation of rHDL particles showed two-sized populations with discoidal shape. Functionally, rHDL-rApoJ maintained the ability to prevent the A β fibrillization and mediated a higher cholesterol efflux from cultured macrophages. Fluorescently-labelled rHDL-rApoJ nanoparticles were intravenously administrated in mice and their distribution over time was determined using an IVIS Xenogen® imager. It was confirmed that rHDL-rApoJ accumulated in the cranial region, especially in old transgenic mice presenting a high cerebral A β load. In conclusion, we have standardized a reproducible protocol to produce rHDL-rApoJ nanoparticles, which may be potentially considered as a therapeutic option for β -amyloid-related pathologies.

Cerebral β -amyloidosis is a major feature of Alzheimer's disease (AD), characterized by the accumulation of β -amyloid protein (A β) in the brain. A β is originated by the sequential processing of the amyloid precursor protein (APP), primarily generating peptides constituted by 40- and 42-amino acids, A β_{40} and A β_{42} , respectively. High concentrations of A β promote its aggregation into toxic species, such as oligomers and fibrils, within the brain extracellular space. In sporadic AD, in addition to the formation of neuritic plaques formed by the aggregation of A β species in the parenchyma, the intracellular accumulation of the hyperphosphorylated TAU protein induces progressive neuronal loss triggering cognitive and memory impairment¹. Besides, 91% of sporadic AD cases also present vascular accumulation of A β , known as Cerebral Amyloid Angiopathy (CAA)².

Several studies have implicated lipid/lipoprotein metabolism in the AD pathology. Firstly, the genotype of the lipid-carrier apolipoprotein E (ApoE) is the major genetic risk factor for developing sporadic AD³. The presence of the APOE ϵ 4 allele is strongly associated with a greater incidence of AD, whereas the APOE ϵ 2 allele is related

¹Neurovascular Research Laboratory, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. ²Catalan Institute of Nanoscience and Nanotechnology (ICN2), CSIC and the Barcelona Institute of Science and Technology, Campus UAB, Bellaterra, Barcelona, Spain. ³Cardiovascular Biochemistry Group, Research Institute of the Hospital de Sant Pau (IIB Sant Pau), Barcelona, Spain. ⁴Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), 08100, Barcelona, Spain. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.C.-S. (email: Mary.cano@icn2.cat) or M.H.-G. (email: Mar.hernandez.guillamon@vhir.org)

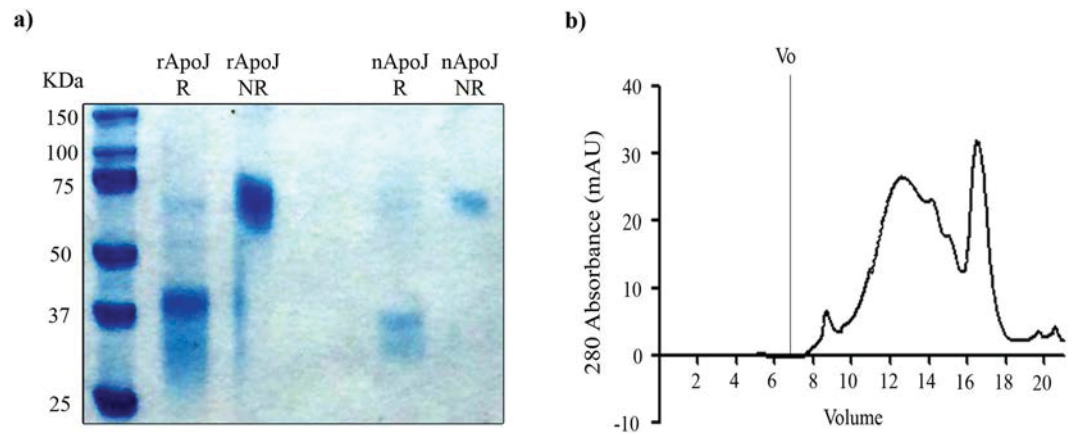


Figure 1. rApoJ characterization (a) SDS-PAGE of purified recombinant ApoJ (rApoJ) and native ApoJ purified from plasma (nApoJ) under both reducing (R) and non-reducing (NR) conditions. (b) SEC analysis of rApoJ. V_0 = Void volume.

with a lower risk of developing dementia⁴. In addition, diseases characterized by alterations in the lipid profile, such as diabetes mellitus type 2⁵, atherosclerosis⁶ and hypercholesterolemia⁷ are also risk factors for developing AD⁸. These evidences, together with the association of cerebrovascular dysfunction in AD⁹, make the regulation of lipid metabolism a promising therapeutic approach to protect the AD-affected brain^{10,11}. In this regard, HDL (High Density Lipoprotein)-based therapies have been also considered for the treatment of pathologies associated with A β deposition^{8,12,13}. In the cerebral β -amyloidosis context, HDL levels (>55 mg/dL) in plasma were related with a lower risk of developing AD⁶. Furthermore, low plasma HDL-Cholesterol (HDL-C) was recently associated with higher A β binding, as measured using Pittsburgh compound-B positron emission tomography, in cognitively normal subjects and elderly subjects with mild cognitive impairment¹⁴.

The HDLs circulating in plasma are mainly comprised of apolipoproteinA-I (ApoA-I), cholesterol and phospholipids, and their principal role is to conduct the reverse cholesterol transport (RCT). However, plasma HDLs are extremely heterogeneous, presenting a diverse lipid and protein composition^{15,16}, which may confer different functions associated with immunity regulation and vascular integrity¹⁷. In fact, multiple protective roles have been attributed to HDLs, such as anti-oxidant¹⁸, anti-apoptotic¹⁹, vasoprotective²⁰ and anti-inflammatory properties²¹. The major apolipoprotein constituent of HDL in the brain is ApoE, followed by apolipoprotein J (ApoJ, also known as clusterin). ApoJ is a multifunctional heterodimeric protein which acts as a natural chaperone²². In AD brains, ApoJ is co-deposited with fibrillar A β in cerebrovascular and parenchymal lesions^{23,24}. ApoJ also binds to A β in CSF and plasma^{25,26}, and increased circulating levels of plasma ApoJ are associated with a higher prevalence and severity of AD^{27,28}. On the other hand, the link between ApoJ and AD was highlighted in genome-wide association study that found a statistical association between a SNP within the CLU gene and the risk of suffering AD^{29,30}. The rs11136000C SNP in CLU gene was the associated with reduced ApoJ expression and increased risk of AD³¹, whereas the protective rs11136000T was related with increased ApoJ expression in brain tissue and reduces the risk of AD^{32,33}. These results propose the higher expression of rApoJ as a protective response against AD pathology. Moreover, experimental studies have shown that ApoJ is able to inhibit the aggregation of soluble A β ²³ and participates in the clearance of A β across the Blood Brain Barrier (BBB)^{34–36}.

In this study, we have designed and prepared new functional nanoparticles to be considered as a novel therapeutic approach to ameliorate the features associated with AD. Because of the capacity of ApoJ to act as an A β chaperone, we have produced reconstituted HDL nanodiscs formulated with recombinant ApoJ (rHDL-rApoJ nanodiscs). The nanodiscs have been characterized in terms of size, morphology, A β binding and RCT *in vitro*. We have also determined the distribution of rHDL-rApoJ nanodiscs *in vivo* after a single intravenous (IV) administration using a transgenic mouse model of cerebral β -amyloidosis.

Results

rApoJ protein production and characterization. Highly pure secreted His-tagged recombinant ApoJ (rApoJ) protein was obtained through a single step purification from human cultured cell supernatants. The electrophoretic profile of rApoJ was compared with the native ApoJ purified from human plasma through Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). First, under reducing conditions, the cleavage of rApoJ into α - and β -chains during its maturation was conserved, as two chains of \approx 40 KDa were obtained. In contrast, the non-reducing conditions confirmed the maintenance of disulfide bonds and the heterodimeric state of rApoJ (\approx 77 KDa). On the other hand, the rApoJ showed a higher molecular weight due to the His-tag and the C-Myc epitope, which conferred a 3.30 KDa increase compared to the nApoJ (Fig. 1a). To test the aggregation proclivity of rApoJ, the purified recombinant protein was submitted to Size Exclusion Chromatography (SEC) analysis. Our results confirmed that rApoJ was prone to aggregation and the formation of heterogeneous high molecular weight oligomers as shown by the wide peak observed between 12–16 ml of the elution volume. Moreover, a homogeneous peak appeared at 16–18 ml of the elution volume with a maximum at 16.5 ml, corresponding to lesser aggregation state oligomers (Fig. 1b).

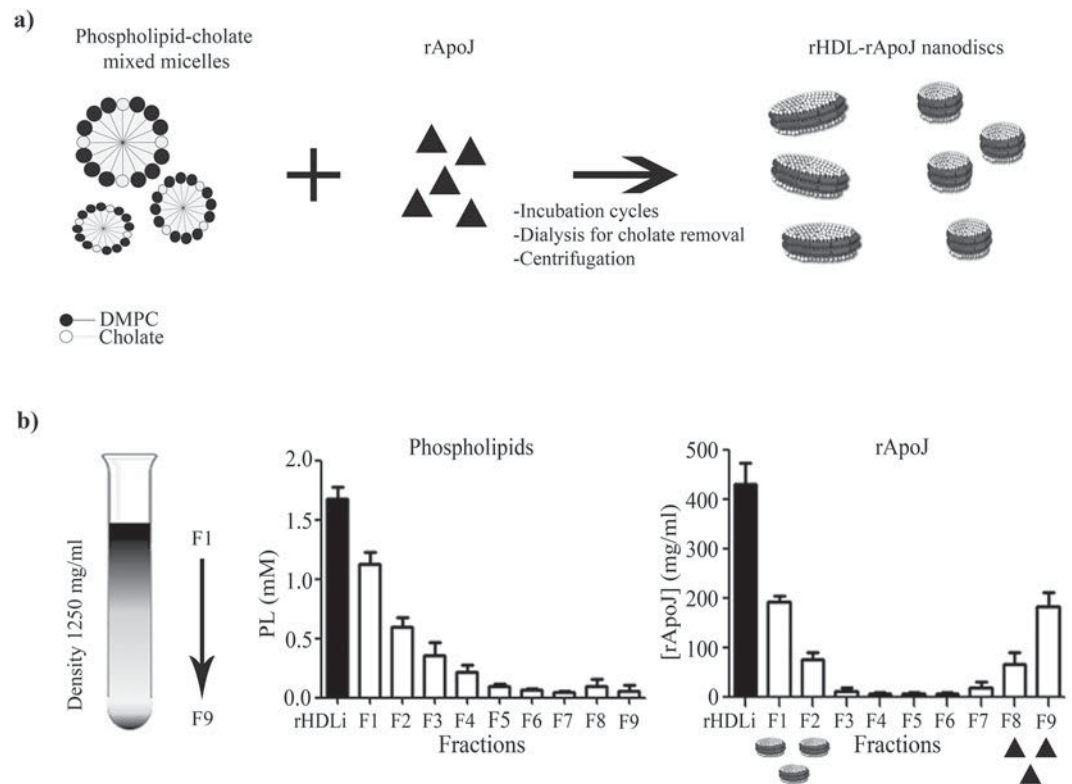


Figure 2. rHDL-rApoJ synthesis and purification. **(a)** Schematic representation of rHDL-rApoJ nanodisc synthesis. **(b)** Schematic representation of the purification process by KBr density ultracentrifugation. Phospholipid and rApoJ (protein) quantification in the different fractions (F1-F9) after the purification process. PL = Phospholipids. N = 6 independent experiments.

rHDL-rApoJ purification in KBr density gradient ultracentrifugation. The preparation and purification protocols were optimized to maximize the rHDL-rApoJ nanodisc collection and resulted to be highly reproducible (Fig. 2a,b). The lower density of rHDL-rApoJ nanodiscs (<1250 mg/ml) in comparison to free rApoJ (1300 mg/ml) allowed the correct purification of nanodiscs through KBr gradient density ultracentrifugation. After the ultracentrifugation step in the KBr gradient, phospholipids and total protein amounts were measured in all fractions obtained (Fig. 2b). We confirmed that the concentration of lipids decreased from top-F1 to bottom-F9 fractions due to their low density. In contrast, the highest concentrations of rApoJ were found in the fractions F1-F2 and F8-F9. Because of the density switch caused by the lipidation of rApoJ, rHDL-rApoJ nanodiscs were present in F1 and F2 ($d < 1250$ mg/ml), whereas free rApoJ (unbound to the lipids, $d > 1300$ mg/ml) was mainly found in F8 and F9.

rHDL-rApoJ nanoparticles characterization. Purified rHDL-rApoJ nanoparticles were characterized by Dynamic Light Scattering (DLS), Native-PAGE (N-PAGE), Transmission Electron Microscopy (TEM) and Circular dichroism (CD). The methodology used for the rHDL-rApoJ preparation resulted highly reproducible, obtaining two homogeneous populations of rHDL-rApoJ nanoparticles after the purification, one centered at 30 ± 3 nm and the other at 70 ± 1 nm, according to the DLS analysis (Fig. 3a). Next, F1 (purified rHDL nanoparticles) and F9 (discarded free rApoJ) fractions obtained after the KBr density ultracentrifugation were analyzed by N-PAGE, and the protein content in the solution was determined by Coomassie blue staining, whereas the fluorescent lipids were detected using ODYSSEY Imager recoding (Fig. 3b). Our results confirmed that F1 contained rHDL-rApoJ particles, as shown by the co-detection of protein and fluorescent lipids from the same species. In fact, two different populations of rHDL-rApoJ particles appeared after the purification, as previously shown in the DLS analysis. In contrast to F1, when the densest fraction of the purification step (F9) was analyzed, only free protein was detected by Coomassie Blue staining whereas no lipids were detected, confirming the correct purification of rHDL-rApoJ nanodiscs.

The morphology and size of rHDL-rApoJ nanoparticles was determined by TEM. From the measurement of 1000 nanoparticles, we determined that the F1 fraction was constituted by two size populations of discoidal shaped particles, whose diameter means are centered on 24 ± 5 nm and 48 ± 2 nm. The nanodiscs thickness was 5 ± 1 nm in height (Fig. 3c; Supplementary Fig. S1). Most of nanodiscs are viewed edge-on, whereas others are viewed face-on in TEM (orange stars in Fig. 3c), confirming the discoidal shape of nanodiscs. The presence of two populations is in agreement with the results observed by DLS and N-PAGE (Fig. 3a,b). Moreover, the conformational changes that occurred in rApoJ due to its lipidation were studied by CD (Fig. 3d), where rHDL-rApoJ nanodiscs were compared to free rApoJ and liposomes prepared with the same phospholipid composition. As

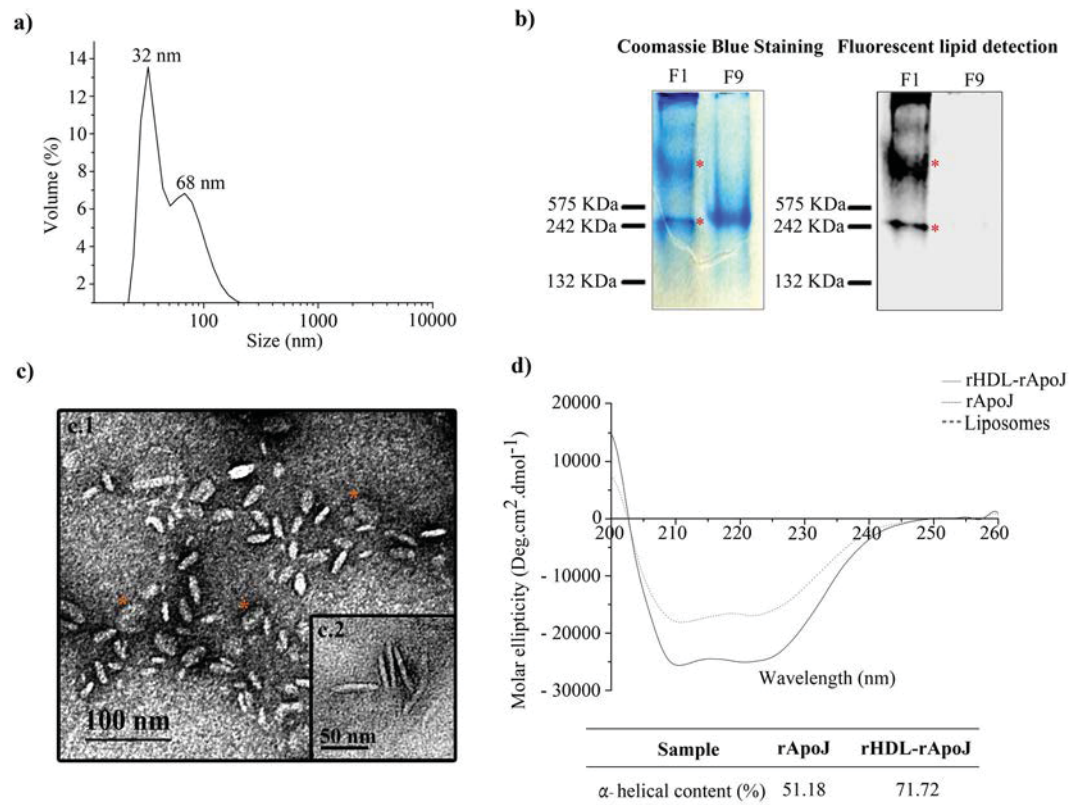


Figure 3. rHDL-rApoJ characterization. **(a)** Particle-size analysis by DLS showing the particle size after purification. **(b)** Native-PAGE analysis: Left panel; Coomassie Blue Staining, and, right panel; phospholipid fluorescence detection using the ODYSSEY imager. F1 refers to the first fraction of the purification step and corresponds to the purified rHDL-rApoJ nanodiscs. F9 refers to the ninth and last fraction of the purification step and corresponds to the discarded non-lipidated rApoJ. **(c)** Representative images of TEM showing two size populations of rHDL-rApoJ (F1) with a diameter of 24 ± 5 nm (C1) and 48 ± 2 nm (C2) both with 5 ± 1 nm of height. Orange stars indicate the face-on view of rHDL-rApoJ nanodiscs. **(d)** Circular Dichroism plot showing the non-lipidated rApoJ (dotted line), rHDL-rApoJ nanodisc (solid line) and the liposome (dashed line) spectra and the corresponding α -helical content calculation (%). Liposome ellipticity resulted 0 coinciding with the x-axis.

expected, the liposomes did not show any polarized-light absorption. Comparing free rApoJ with rHDL-rApoJ nanodiscs (rHDL-rApoJ), a gain in α -helical content was detected as result of the lipidation. The α -helical content calculated for free rApoJ was 51.18%, whereas this percentage increased up to 71.72% in the rHDL-rApoJ preparation, which demonstrated the structural ability of rApoJ to form rHDL particles and the underlying conformational change. Taking these results together, we could confirm the correct and reproducible preparation of rHDL-rApoJ nanoparticles, obtaining discoidal shape nanodiscs with 30 and 70 nm of diameter and 5 nm of height, generating an increase in the α -helical content of rApoJ. Resulting rHDL-rApoJ nanodiscs were stable after storage at -80°C up to 3 months and after freeze-thaw cycles and did not show any difference in DLS diameter nor in TEM analysis after the dispersion of nanodiscs in different working buffers (TBS, PBS, KBr density solution).

Study of rHDL-rApoJ functionality. The functionality of rHDL-rApoJ nanodisc was studied through different strategies. First, we tested the chaperone-like activity exhibited by nanodiscs in comparison with free rApoJ measuring the ability preventing the fibrillization of A β_{40} and A β_{42} through the ThiOflavin T (ThT) binding assay (Fig. 4a). We observed a high ability of both rApoJ and rHDL-rApoJ nanodiscs to avoid A β_{40} aggregation. In the case of A β_{42} , both non-lipidated and lipidated rApoJ were effective preventing its fibrillization *in vitro*. No statistical differences regarding the effect of rHDL-rApoJ nanodiscs in comparison to free ApoJ were detected in any case. This result indicated that the ability of rApoJ to act as an A β chaperone was maintained despite its structural modification to form rHDL-rApoJ nanodiscs. On the other hand, the ability of rHDL-rApoJ nanodiscs to promote cholesterol ester efflux from cultured mouse macrophages was also analyzed (Fig. 4b). We determined that the RCT mediated by rHDL-rApoJ nanodiscs increased in a dose-dependent manner and was significantly higher compared to the cholesterol ester transport of free rApoJ at all the concentrations tested. As a reference value, 10 mg/L of rHDL-rApoJ removed the same percentage of esterified cholesterol as 10 mg/L of ApoA-I *in vitro*, highlighting the functionality of these particles in terms of cholesterol metabolism regulation. We confirmed that rHDL-rApoJ nanodiscs did not result cytotoxic *in vitro* (Supplementary Fig. S2).

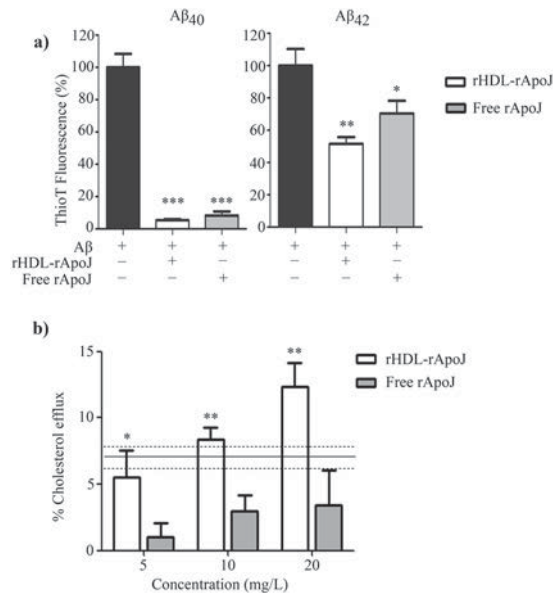


Figure 4. rHDL-rApoJ *in vitro* functionality. **(a)** Thi flavin T binding assay: ThT fluorescence intensity of A β ₄₂ and A β ₄₀ after 24 h at 37 °C with rApoJ or rHDL-rApoJ. Concentration ratio A β : free rApoJ/rHDL-rApoJ 1:0.01 (N = 4). One way ANOVA and Dunnett's post hoc test: ***p < 0.001, *p < 0.01 compared to control condition. **(b)** [³H] Cholesterol efflux removal from J774A.1 cells by rHDL-rApoJ and free rApoJ. The reference line indicates the mean \pm SEM of the value obtained using ApoA-I (N = 3). t-test analysis: *p < 0.05, **p < 0.01 comparing free ApoJ vs. rHDL-rApoJ at each tested dose.

rHDL-rApoJ biodistribution in mice. Once we had confirmed the functionality of the rHDL-rApoJ nanodiscs, we wondered whether these functional particles could reach the Central Nervous System (CNS). Therefore, we determined whether the rHDL-rApoJ nanodiscs could accumulate in the CNS after their peripheral administration in mice using the IVIS Xenogen system. For this purpose, as a control treatment, liposome particles with equal particle size and lipid composition as the rHDL-rApoJ nanoparticles were synthesized. We then compared the biodistribution of Alexa Fluor 750 (AF750) labelled rHDL-rApoJ nanodiscs and liposomes, after intravenous (IV) administration in young animals, by recording the fluorescent signal specifically in the cranial and spine regions at different time points. First, both preparations were analyzed *in vitro* using the IVIS Xenogen system, which demonstrated equal fluorescence in both samples (the fold-change increase relative to Tris Buffer Saline (TBS) of rHDL-rApoJ and liposomes was 15.1 and 14.8, respectively; Fig. 5a). After the infusion, rHDL-rApoJ showed a maximum record at 30 min in the cranial region, although the signal did not diminished significantly along the studied time-points. On the other hand, a higher signal in the cranial region was observed in mice treated with rHDL-rApoJ compared to liposome-treated mice at 30 min and 2 h after administration (Fig. 5b,c). In fact, after the background subtraction, no specific cranial accumulation was observed after the particle size-matched labelled-liposome administration (Fig. 5b), although the equal plasma detection and the bladder signal obtained after 4 h confirmed the correct infusion of both treatments (Supplementary Fig. S3). On the other hand, rHDL-rApoJ nanodiscs and liposomes were eliminated from circulation through renal clearance, as their fluorescent signal in the bladder increased over time. No differences in the fluorescent signal were observed in plasma 4 h after treatments, suggesting a similar elimination rate for rHDL-rApoJ nanodiscs and liposomes. No differences between groups were observed in the spine region either (Supplementary Fig. S3).

rHDL-rApoJ retention in APP23 mice and wt mice. Due to the high capacity of ApoJ to bind A β material^{23,26}, we studied whether the distribution of peripherally administered fluorescent labelled-rHDL-rApoJ would vary in an *in vivo* model of cerebral β -amyloidosis. To accomplish this objective, we used 24-month-old APP23 mice, which is a well characterized transgenic model of AD³⁷. In fact, A β immunohistochemistry and Thi flavin S (ThS) staining in brain slices from 24-month-old mice showed high accumulation of fibrillar A β material in the cortex, hippocampus and brain vessels of APP23 transgenic mice, whereas the corresponding wt littermates did not exhibit detectable A β deposition in the brain (Fig. 6a). In old mice, after the IV administration of labelled-rHDL-rApoJ and using the *in vivo* imaging system, we determined that the fluorescent signal diminished over time for both APP23 and wt animals in cranial, spine and liver regions (Fig. 6c,d). In turn, the fluorescent signal in the cranial region was higher in APP23 mice at all the time points analyzed in comparison to the signal obtained in the wt mice (Fig. 6b,c). These genotype-dependent differences were exclusive to the cranial region, as no differences were observed in the spine (Fig. 6c) and other body-regions studied, such as bladder, liver or in plasma 4 h after administration (Supplementary Fig. S4).

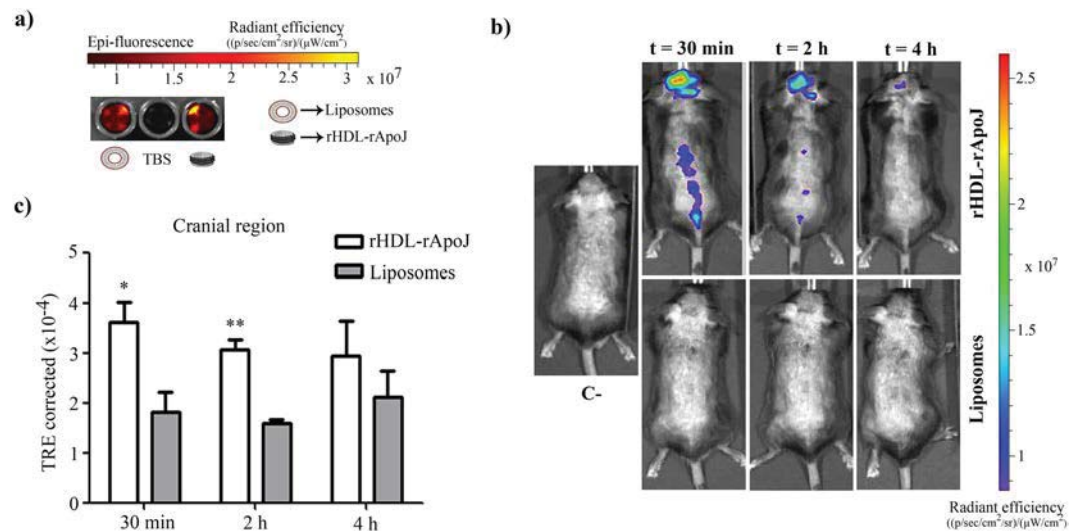


Figure 5. rHDL-rApoJ and liposome biodistribution in C57/BL6 mice. **(a)** IVIS Xenogen *in vitro* images of the epi-fluorescence of rHDL-rApoJ nanodisc and liposome preparations. **(b)** Representative *in vivo* IVIS Xenogen images of mice at 30 min, 2 h and 4 h after IV administration of labelled-rHDL-rApoJ or labelled-liposomes. C- = Non-treated control mouse. **(c)** Quantification of the fluorescent signal obtained in the cranial region after IV administration of labelled-rHDL-rApoJ nanodiscs or labelled-liposomes in 8 week-old C57/BL6 mice (N = 5–6/group). t-test analysis: *p < 0.05; **p < 0.01 signal from rHDL-rApoJ nanodiscs compared to liposome treatment at each time-point.

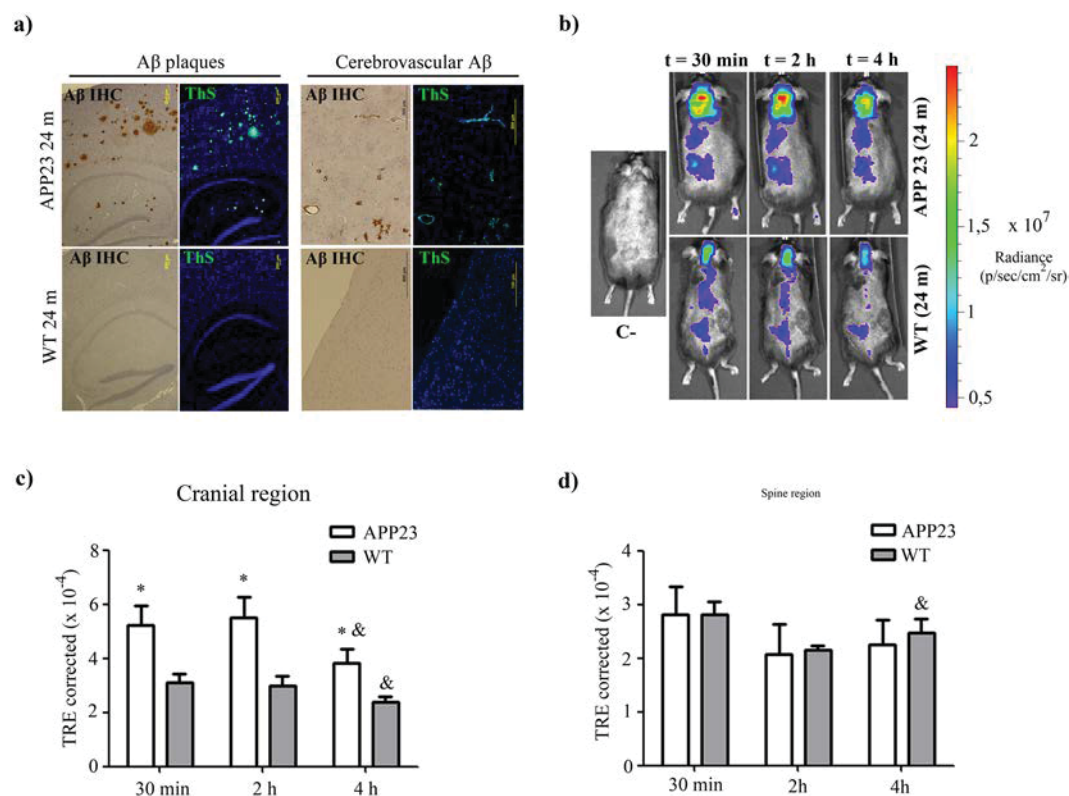


Figure 6. rHDL-rApoJ biodistribution in aged APP23 or wt mice. **(a)** Brain ThS staining and Aβ immunohistochemistry (IHC) from 24-month-old APP23 and wt mice showing the parenchymal and vascular accumulation of fibrillary Aβ. **(b)** Representative *in vivo* IVIS Xenogen images of mice at 30 min, 2 h and 4 h after IV administration of labelled-rHDL-rApoJ. C- = Non-treated control mouse. Quantification of the fluorescent signal obtained in the **(c)** cranial region and **(d)** spine region after IV administration of labelled-rHDL-rApoJ nanodiscs in 24-month-old APP23 and age-matched wt mice (N = 5–6/group). t-test analysis: *p < 0.05 comparison of the signal obtained in APP23 vs. wt mice at each time point. Paired t-test analysis: &p < 0.05 comparison of t = 30 min and t = 4 h for each genotype.

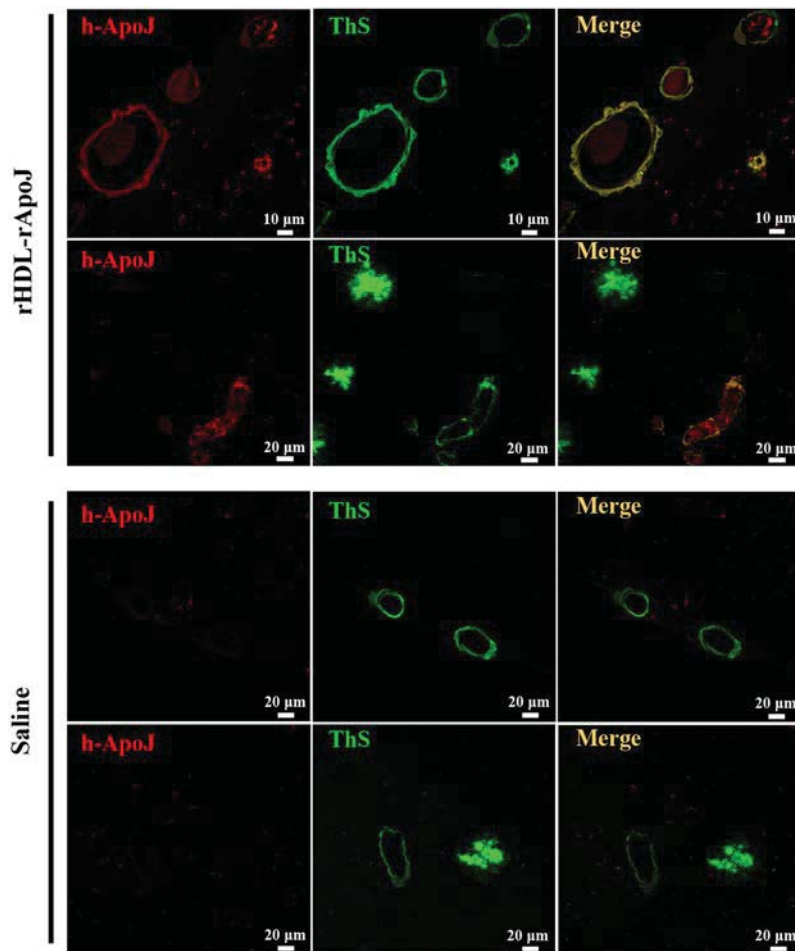


Figure 7. Localization of human rApoJ in brain after IV administration of rHDL-rApoJ nanodiscs in APP23 mice. Double labelling of human rApoJ (rApoJ in red) and fibrillary A β (ThS in green) in old APP23 animals treated with 1 mg/kg of rHDL-rApoJ nanodiscs or saline. Co-localization of rApoJ and fibrillary A β is observed in merged images (yellow).

rHDL-rApoJ cranial localization. In order to describe more insightfully the cranial accumulation of rHDL-rApoJ nanodiscs, we performed an immunofluorescence analysis to detect the presence of human rApoJ in brain sections of rHDL-rApoJ or saline-treated old APP23 mice. Under the studied conditions, we detected a specific co-localization of human ApoJ (from rHDL-rApoJ nanodiscs) with fibrillar A β (as shown by the positivity in ThS staining) in amyloid-affected cerebral vessels, whereas human ApoJ was not present in parenchymal amyloid plaques. In turn, human ApoJ was not detected in saline treated animals (Fig. 7).

Discussion

Currently, there are no effective treatments to cure AD or to prevent the disease progression. Despite the fact that we are facing a multifactorial neurodegenerative disorder, recent evidence demonstrates that A β accumulation in AD is mainly explained by an impairment in its clearance from the brain³⁸. Therefore, therapies based on molecules able to bind A β and promote its clearance are a plausible strategy to prevent the pathological hallmarks associated to AD. In this study, we present a new method to prepare and purify reconstituted HDL nanoparticles by assembling lipids with human recombinant ApoJ (rHDL-rApoJ). We consider that the treatment with rHDL-rApoJ may result in an increase in ApoJ circulating levels and this may be a promising strategy to treat pathologies associated with cerebral A β deposition because: (1) Some of the risk alleles of AD-associated SNPs in the CLU locus are associated with a decrease in ApoJ plasma levels³¹, whereas increased ApoJ circulating levels are associated with a higher prevalence of AD²⁷, suggesting a protective role for high concentrations of plasma ApoJ in AD; (2) ApoJ is a natural A β chaperone, acting as the main A β escorting protein^{34,35,39}; (3) Protective and anti-inflammatory properties have been attributed to ApoJ in experimental models, and particularly in cellular models challenged with A β ^{40,41}.

Back in the sixties, it was demonstrated that the mixture of the major constituents of HDLs (apolipoproteins, phospholipids and free cholesterol) under appropriate conditions resulted in the formation of discoidal shaped nanoparticles with comparable size and density to native Pre β -HDLs (density > 1.21 mg/ml, discoidal shape and without triglycerides and cholesterol esters in the core). These particles were called reconstituted HDL nanoparticles or nanodiscs (rHDL)^{42,43}. Because our aim was to generate rHDL containing ApoJ, we first

produced the recombinant protein from human cell cultures: this rApoJ was highly pure and conserved the heterodimeric nature and the propensity to form high molecular aggregates, as previously described for the human native ApoJ⁴⁴. Next, we optimized the methodology to produce pure rHDL-rApoJ nanodiscs. To our knowledge, there is only one previous publication about rHDL nanodisc formulated with rApoJ⁴⁵, although in that methodology a mixture of phospholipids and ApoJ purified from plasma were used. Complementary, the purpose of our study was to standardize a reproducible protocol to produce large amounts of rHDL-rApoJ for therapeutic purposes. Following the protocol here presented, we reproducibly obtained two populations with different hydrodynamic diameters of 30 ± 3 nm and 70 ± 1 nm as detected by DLS. N-PAGE analysis with posterior protein and lipid staining confirmed the presence of these two differently sized particles after the purification process with KBr density ultracentrifugation. The collection of different size population of rHDL synthesized with the cholate-dialysis method was previously observed for rHDL formulated with ApoA-I, where the diverse populations were attributed to the tertiary structure that the protein adopted⁴⁶. Based in the DMPC:Chol:rApoJ molar ratio in purified rHDL-rApoJ sample (550:150:1) the small population is possibly composed by 1 molecule of rApoJ, whereas the bigger one could have at least 4 molecules of rApoJ, although this approximation needs to be further confirmed. In addition, TEM allowed the visualization of two-sized rHDL-rApoJ populations with a well dispersed discoidal shape. This nature is commonly observed in ApoA-I and ApoE containing rHDL, although in these cases nanoparticles usually present a more stacked distribution^{47,48}.

Size distribution from TEM images confirmed the presence of two nanodiscs size populations whose mean diameters are centered on 24 ± 5 nm and 48 ± 2 nm respectively. The detection of smaller particles when size distribution was analyzed using TEM images in comparison to the ones obtained by DLS (hydrate state) is due to the dehydrated state of nanodiscs during TEM observation^{49,50}. On the other hand, the discoidal morphology was confirmed using TEM, which allowed the edge-on and face-on visualization of the nanoparticles. Finally, nanodiscs were characterized using CD, which showed that the α -helical content of rApoJ increased 20.5% when the protein was assembled to form the rHDL structure. Indeed, an increase in the α -helical content was also described for ApoA-I nanodiscs⁵¹. This secondary structural change induced by the lipid-binding might have consequences regarding the functionality or stability of the protein. Regarding the bonding mechanism between lipids and rApoJ, it has been extensively described that apolipoprotein-lipid interaction in HDL particles is due to hydrophobic bonds between the hydrophobic chains of phospholipids and the amphipathic regions of apolipoproteins with α -helical structure^{52,53}. The presence of 5 amphipathic α -helix in the structure of ApoJ⁵⁴ support the idea of hydrophobic bonds between phospholipids and rApoJ. This binding has demonstrated to be stable to dilution and temperature effect⁵¹.

Therefore, the next step in our study was to analyze the *in vitro* functionality of the rApoJ-rHDL. First, we studied the chaperone-like activity exhibited by the nanodiscs in comparison to the free protein. We observed that both rHDL-rApoJ and free rApoJ were significantly effective in preventing A β ₄₀ and A β ₄₂ fibrillization. This chaperone-like ability is well established for ApoJ and it has been also observed for lipid-ApoJ complexes^{39,45}. We also evaluated the regulation and transport of cholesterol esters, which is a relevant property of HDLs. In particular, we determined the cholesterol ester efflux ability of rHDL-rApoJ *in vitro* using cultured macrophages. rApoJ-nanodiscs showed a significantly higher activity in promoting the efflux of cholesterol esters than the free rApoJ, which was previously associated with cholesterol homeostasis⁵⁵. We consider these results particularly relevant in relation to the treatment of β -amyloidosis neuropathologies. Cerebral atherosclerosis has been related with AD pathology^{56,57} and, while this issue has been a matter for discussion⁵⁸, other authors have highlighted the relation existing between lipid metabolism and AD^{6,14}. Therefore, we postulate that the administration of rHDL-rApoJ nanodiscs could promote the antiatherogenic properties of ApoJ and enhance its protective role in AD. In addition, studies performed in animal models of AD have shown that the genetic deletion of SR-BI⁵⁹ or ABCA-1^{60,61}, which are key mediators of the cellular cholesterol efflux pathway, induced an increase in fibrillar A β levels and cognitive worsening, suggesting that the modulation of cholesterol metabolism defines relevant features of the A β -associated pathology. Besides, some studies have highlighted the importance of ApoJ lipidation for its antiatherosclerotic properties⁶². Thus, although these results need to be confirmed *in vivo*, the possible enhancement of RCT by a pharmacological approach using rHDL-rApoJ may also bring promising results regarding brain A β accumulation levels. On the other hand, the successful brain delivery into CNS is one of the major challenges for the effective treatment of neurological disorders in general⁶³ and AD in particular⁶⁴. For this reason, we studied the biodistribution of rHDL-rApoJ nanodiscs after peripheral administration in mice in comparison with the distribution of size-matched liposome particles. We wondered whether the nanodisc structure obtained by the assembling of a lipid mixture with rApoJ was specifically able to be retained in the CNS. Administering fluorescent-labelled nanodiscs or liposomes in young mice and using an imaging system *in vivo*, we observed higher cranial accumulation of rHDL-rApoJ nanodiscs 30 min and 2 h after IV infusion, although similar metabolism rates were observed for both treatments, according to plasma and bladder biodistribution. Focusing on the possible relevance of rHDL-rApoJ nanodiscs for the treatment of AD, we studied the biodistribution of rHDL-rApoJ nanodiscs in an experimental model of cerebral β -amyloidosis. In particular, we determined whether the elevated brain A β deposition shown in 24-month-old APP23 transgenic mice induced changes in the cerebral distribution pattern of the infused rHDL-rApoJ particles. Therefore, after IV administration, we followed the fluorescent-labelled particles *in vivo* in old transgenic mice and wt littermates, which allowed us to observe a consistent and specific higher accumulation of rHDL-rApoJ nanodiscs in the cranial region of APP23 animals at all the time points studied.

It has previously been described that ApoJ is able to cross the BBB through the megalin/LRP2 receptor^{34,36}, therefore, one can speculate that the accumulation of cerebral A β also activates the *in vivo* recruitment of circulating ApoJ. Using fluorescent-labelling techniques in brain sections, we observed a specific accumulation of human ApoJ in A β -affected brain arterioles after an IV administration of rHDL-rApoJ nanodiscs. This evidence suggests that rHDL-rApoJ nanodiscs may be retained in brain vessels due to the binding of ApoJ to the specific receptor at a vascular level. The molecular mechanisms driving the specific entrapment of ApoJ in amyloid affected vessels has to be more deeply studied, although its chaperone function and the high affinity of ApoJ for A β seem to be crucial for

the process. In fact, using an *in vitro* model of the BBB, our group showed that basolateral treatment with A β_{40} (corresponding to the brain side) enhanced the apical-to-basolateral influx of rApoJ³⁵. Nevertheless, the present results did not allow us to conclude that rHDL-rApoJ nanoparticles intravenously administered were able to penetrate the brain, since no human ApoJ was detected in parenchyma or bound to A β -plaques. Indeed, the absence of human ApoJ in parenchyma indirectly confirmed that the accumulation of fluorescent signal in rHDL-rApoJ treated-APP23 mice, shown in the IVIS analysis, was not likely to be due to a BBB leakage caused by cerebral β -amyloidosis. In fact, no parenchymal infiltration of trypan blue or horseradish peroxidase was observed in a previous study using very old APP23 mice⁶⁵. Besides, it has recently been shown that BBB integrity remains intact in different AD mice models, as no differences were observed in the passage of different tracers and antibodies⁶⁶. However, we cannot rule out that an alternative treatment design, as the infusion of a higher dose or an rHDL-rApoJ nanodiscs chronic administration, might bring out different results and a more extensive presence of the nanoparticles in parenchyma.

It has been demonstrated that ApoJ-A β complexes are more efficiently cleared than soluble A β through the megalin receptor^{34,35}. Therefore, we hypothesize that treatment with rHDL-rApoJ nanodiscs may enhance the cerebral A β removal, as a higher megalin binding affinity of lipidated ApoJ has previously been demonstrated⁴⁵. Taking these results together, the performance of future efficacy studies is essential to demonstrate whether a chronic peripheral treatment with rHDL-rApoJ nanodiscs reduces cerebral A β deposition and ameliorates the cognitive decline associated with the pathological features. On the other hand, the value of rHDL-rApoJ nanodiscs as a diagnostic tool to target vascular amyloid deposition merits further studies^{67,68}.

Several arguments support the use of rApoJ-rHDL nanodiscs, rather than the recombinant ApoJ, since the functionality of these nanoparticles can surpass the effect of the apolipoprotein. First, we have demonstrated that rApoJ-rHDL nanodiscs improved the cholesterol efflux transport compared to the free protein, which reinforces the use of HDL-based therapies in cerebral β -amyloidosis pathologies. Furthermore, lipid-based strategies have been shown to increase bioavailability and stability of proteins in plasma. Finally, the advancement of rHDL technology allows the functionalization of rHDL nanodiscs through a wide range of strategies⁶⁹. Therefore, taking into account that rHDL-rApoJ nanoparticles are able to accumulate in brain vessels affected by A β deposition, rHDL-rApoJ may be theoretically functionalized with different therapeutic molecules to specifically target vascular A β .

In conclusion, we have designed a highly reproducible protocol for the formation and purification of large amounts of rHDL-rApoJ nanodiscs. We have demonstrated that the rHDL-rApoJ nanodiscs not only maintained the A β -chaperone functionality of rApoJ, but also improved *in vitro* cholesterol efflux abilities. We have also determined that rHDL-rApoJ nanodiscs accumulated in the cranial region of mice, especially in transgenic mice presenting a high cerebral A β load. Therefore, therapies based on rHDL-rApoJ nanodiscs may be considered for their potential use to treat neurological disorders associated to cerebral A β deposition.

Methods

Free recombinant ApoJ. The production and purification of rApoJ has been previously described by our group³¹. Briefly, rApoJ was produced in human cells (Human Embryonic Kidney 293T cells, HEK293T) and purified through Ni-affinity chromatography obtaining a purity >75%. The resulting recombinant protein was characterized by SDS-PAGE in both reductive and non-reductive conditions and by SEC. A detailed technical protocol for the production, purification and characterization of free rApoJ is supplied as Supplementary Information.

Preparation of rHDL-rApoJ nanodiscs and liposomes. The nanodisc preparation protocol here presented is the result of an extensive optimization process. We tested the effect of different 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC, Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) and rApoJ molar ratios (1000:1, 500:1, 200:1, 100:1 and 50:1) and different DMPC and free cholesterol (Chol, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) molar ratios (5:1, 10:1 and 1:0). Besides, two lipid-solubilisation methods commonly used for the rHDL preparation were tested (spontaneous solubilisation method and cholate-dialysis method)^{42,48,51}. Different nanodisc formation temperature (24 °C and 37 °C) and disc formation buffers (TBS or PBS) were tested. The selected conditions allowed high reproducibility of the rHDL-rApoJ nanodisc formation. First, a lipid mixture of DMPC and free Chol in chloroform solutions was prepared with a 5:1 DMPC:Chol molar ratio, the presence of free cholesterol in the lipid mixture enhanced the lipid-protein interaction⁴⁸. The organic solvent was removed under vacuum and nitrogen to afford a dry lipid film, which was rehydrated with the disc formation buffer, TBS supplemented with 40 mM sodium deoxycholate (cholate, Sigma-Aldrich). This suspension was incubated at 37 °C for 30 min until a clear solution was obtained.

For rHDL-rApoJ nanodisc preparation, rApoJ and DMPC/Chol/cholate mixed micelles were mixed to afford DMPC:Chol:rApoJ molar ratio of 550:110:1. These incubation cycles of warming to 37 °C and freezing to 4 °C with vortexing were performed to promote rApoJ-DMPC interaction. After incubation, rHDL-rApoJ nanodisc self-assembly was initiated by cholate removal through extensive dialysis against a 1000-fold excess of TBS buffer at 4 °C for 48 h in 10,000 MW cut-off SnakeSkin dialysis tubing membranes (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) with two buffer changes (1×10^9 overall dilution factor to ensure the correct nanodisc formation). Finally, unbound lipids were eliminated by sample centrifugation at $16,000 \times g$ at 4 °C for 30 min. For the preparation of the liposome control without rApoJ, the liposomes were formed by cholate removal from the direct DMPC/Chol/cholate mixed micelles by extensive dialysis, as described.

The nanodiscs and liposomes were fluorescently labelled for specific experiments. To this end, Alexa Fluor 750 succinimidyl ester (AF750, ThermoFisher) and 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE-NH₂, Avanti Polar Lipids) were conjugated as previously described⁷⁰. Only conjugated AF750 was detected by thin-layer chromatography (R_f = 0.6), indicating that conjugation was complete. The fluorescently labelled AF750 rHDL-rApoJ nanodiscs and liposomes were prepared by incorporating AF750-DOPE into the lipid mixture (0.08 mM). The following steps were not altered.

Purification of rHDL-rApoJ nanodiscs with KBr density gradient ultracentrifugation. The rHDL-rApoJ nanodiscs were collected and separated from free rApoJ by potassium bromide (KBr; Sigma-Aldrich) density gradient ultracentrifugation⁷¹. After the ultracentrifugation step (100,000 × g, 24 h, 1250 mg/ml density of KBr), the sample was fractionated in 200 µl aliquots from top to bottom and quantification of lipids (DMPC and free cholesterol) and proteins of all fractions was performed using a Cobas c501/6000 autoanalyzer (Wako Chemicals GmbH, Neuss, Germany) and the BCA assay, respectively. Fractions with density < 1,250 mg/ml containing the rHDL-rApoJ particles were dialysed together against TBS-Sucrose 2% (Sigma-Aldrich) to eliminate KBr from the solution. The lower density of rHDL-rApoJ nanodiscs in comparison with free rApoJ allowed the successful purification of rHDL-rApoJ nanodiscs and the total elimination of free rApoJ. The DMPC:Chol:rApoJ molar ratio in the purified rHDL-rApoJ sample was estimated to be 550:150:1 according to the lipid and protein quantification. Samples were stored at -80 °C.

Characterization of rHDL-rApoJ nanodiscs. rHDL-rApoJ nanodiscs were characterized through different strategies. First, the colocalization of rApoJ and phospholipids, together with the molecular weight of nanodiscs were determined with N-PAGE in precast acrylamide gradient gels (BioRad, Hercules, California, USA) using fluorescent rHDL-rApoJ nanodiscs. Fluorescence of the lipids was detected using an ODYSSEY Imager (Li-Cor Biotechnology, Lincoln, NE, USA) followed by Coomassie staining for protein detection. Particle-size distributions of rHDL-rApoJ nanodiscs and liposomes were determined using a DLS analyzer combined with non-invasive backscatter technology (Malvern Zetasizer, Malvern Instruments, UK). The morphology of rHDL-rApoJ nanodiscs was determined by subjecting the sample to TEM with uranyl acetate negative staining. Far Ultraviolet (UV) CD spectrum was recorded to detect the conformational changes that occurred in rApoJ due to its lipidation. CD measurements (190–260 nm) were made of rApoJ and rHDL-rApoJ in TBS solutions in a JASCO815 spectropolarimeter. A detailed protocol of the techniques used for the rHDL-rApoJ characterization is supplied as Supplementary Information.

ThT Binding assay. ThT binding methodology was used to compare the ability of free rApoJ and rHDL-rApoJ nanodiscs to avoid aggregation of A β ₄₂ and A β ₄₀ peptides in amyloid fibrils⁷². The A β ₄₂ and A β ₄₀ (Anaspec, Fremont, CA, USA) solutions were prepared from the lyophilized powder, resuspended in 1% NH₄OH to a final concentration of 1 mM. The A β ₄₀ or A β ₄₂ and protein (rHDL-rApoJ or free rApoJ) concentration in the sample was 13 µM and 0.13 µM respectively in a final volume of 150 µl in TBS solution (molar ratio A β : rApoJ 1:0.01). The fluorescence of each sample was measured in triplicate, mixing 40 µl of sample with 5 µl of ThT (Sigma-Aldrich; 0.1 mM) and 50 mM Tris buffer (pH = 8.5) until a final volume of 200 µl. Fluorescence was recorded in 96-well clear bottom plates after 300 s in a fluorometer (SynergyMx, Biotek, Winooski, Vermont, USA) (Ex/Em: 435/490).

In vitro cholesterol ester efflux from J774A.1 cells. The *in vitro* ability of free rApoJ and rHDL-rApoJ nanodisc promoting cholesterol ester efflux was compared in mouse J774A.1 (ATCC® TIB-67™) macrophage-like cells, as previously described⁷³. Briefly, mouse J774A.1 macrophage-like cells (2 × 10⁵ cells/ml) were cultured in 6-well culture plates in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (DDBiolab, Barcelona, Spain) and 1% penicillin/streptomycin (P/S), for 3 days at 37 °C. The cells were labelled with [1 α ,2 α (n)-³H]cholesterol (GE Healthcare, 1 µCi per ml) for 48 h in RPMI 1640 medium, supplemented with 5% FBS, 1% P/S and acetylated Low Density Lipoproteins (LDL, 0.05 mg apoB/ml). The labelled cells were equilibrated overnight in RPMI 1640 medium containing 0.2% fatty acid-free Bovine Serum Albumin (BSA) and then incubated for 4 h at 37 °C with free rApoJ or rHDL-rApoJ nanodiscs (5, 10 and 20 mg/L). Human ApoA-I (10 mg/L; Sigma-Aldrich) was used as a positive control. Culture media were collected and centrifuged to discard detached cells. Then, 1 ml of 0.5 N NaOH was added to the wells and incubated overnight at 4 °C. Radioactivity was then measured in both culture media and NaOH-cell extracts, and the percentage of relative cholesterol ester efflux was calculated as the percentage of the [³H] counts released in the medium divided by the total [³H] counts (medium + cells).

rHDL-rApoJ and free rApoJ cytotoxicity in hCMEC/D3 and SH-SY5Y cell cultures. The cytotoxicity of 80 mg/L rHDL-rApoJ nanodiscs or free rApoJ was measured using the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma-Aldrich) reduction assay after 24 h in the cerebral human microvascular endothelial cell line (hCMEC/D3), provided by Dr. Couraud, Cochin Institute, France (Weksler *et al.*, 2005) and in a neuroblastoma cell line (SH-SY5Y). The detailed methodology is extensively described previously⁷⁴.

Ethic statement for animal experimentation. All procedures were approved by the Vall D'Hebron Research Institute Ethics Committee for Animal Experimentation (protocol number 78/13) and conducted in compliance with Spanish legislation and in accordance with the relevant European Union Directives. All animals in the study were maintained in a climate-controlled environment on a 12-hour light/12-h dark cycle. Food and water were available *ad libitum*.

rHDL-rApoJ nanodisc and liposome biodistribution in vivo. Fluorescently labelled rHDL-rApoJ nanodiscs and liposomes with equivalent size and lipid composition were used to monitor the biodistribution of administered rHDL-rApoJ nanodiscs in mice. To ensure this equal lipid concentration and fluorescence, the DMPC concentration was quantified using the Cobas c501/6000 autoanalyser and adjusted to the rHDL-rApoJ DMPC concentration with TBS. Then, the comparable fluorescence was confirmed in 96-well black plates in the fluorometer (Ex/Em: 750/780). Besides, 50 µl of rHDL-rApoJ nanodiscs and liposomes were loaded in 96-well black plates and the epi-fluorescence was measured in an IVIS® Spectrum imaging system (PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA), located in the Preclinical Imaging Platform (PIP) of VHIR. For the *in vivo* experiments, eight-week old C57/BL6 mice (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) were used. The mice were shaved on their dorsal and ventral sides and anesthetized under spontaneous respiration with isoflurane (5%) in oxygen (2%). Next, 150 µl of fluorescent

rHDL-rApoJ nanodiscs (100 µg/ml of rApoJ and 1.5 mM of DMPC) or fluorescent liposomes (1.5 mM of DMPC) were administered IV via tail vein (N = 5–6/group). A non-treated animal was used for background extraction. Images of cranial, spine and bladder regions were acquired *in vivo* after IV administration of rHDL-rApoJ nanodiscs and liposomes at 30 min, 2 h and 4 h using the IVIS[®] Spectrum imaging system. EDTA-plasma was acquired through cardiac puncture at the 4 h time-point followed by euthanasia with decapitation under isoflurane anesthesia. Plasma fluorescence was quantified in 96-well black plates in the fluorometer. The results obtained from IVIS[®] Spectrum were analyzed using the Living Image 4.3.1 software (PerkinElmer Inc.). All data obtained by Xenogen IVIS[®] Spectrum experiments are expressed as Total Radiant Efficiency (TRE) considered a calibrated measurement of the photon emission from the subject and technically defined as fluorescence emission radiance per incident excitation intensity: photons/s/cm²/sr (steradian)/µW/cm². TRE was corrected using the non-treated animal autofluorescence in each region, as well as the fluorescence of the infused sample measured in the fluorometer.

rHDL-rApoJ nanodiscs biodistribution in old APP23 and wt mice. The biodistribution of administered rHDL-rApoJ nanodiscs in old APP23 and wt littermate mice was studied. APP23 mice overexpress the APP protein containing the Swedish mutation (K670M/N671L) under the Thy1 neuronal promoter. Hemizygote B6, D2-TgN[Thy-APP^{SWE}]-23-Tg mice (APP23) provided by Novartis Institutes for BioMedical Research, Novartis Pharma AG (Basel, Switzerland) were backcrossed twice with C57BL/6 mice (Janvier). The APP genotype was tested by Transnetyx (Cordova, TN, US) from tail-samples. For the biodistribution experiment using the Xenogen IVIS[®] Spectrum system, 24-month-old APP23 animals and age-matched wt mice were treated IV via tail vein (N = 5–6/group, 100 µg/ml rApoJ and 1.5 mM DMPC) and images were obtained as previously described for young mice. A 24-month-old wt animal was used for background subtraction.

Aβ Immunohistochemistry. For Aβ analysis in brain, 24-month-old APP23 and wt mice were anesthetized under isoflurane flow and euthanized, followed by transcardial perfusion with 25 ml of cold 0.1 M PBS, pH 7.4. Brains were rapidly removed, divided into hemispheres, and paraffin embedded. For the Aβ immunohistochemistry analysis, all samples were deparaffinized for 1 h at 65 °C and treated with 2% H₂O₂ and 10% methanol diluted in PBS for 15 min. The sections were incubated for 1 h in blocking solution (PBS, 0.2% triton-X, 10% FBS and 1.5 g/ml glycine) and, then, incubated overnight (ON) at 4 °C with an anti-human Aβ monoclonal antibody (Aβ4G8, Covance, Princeton, NY, USA) diluted 1:5000 in blocking solution. After that, slices were incubated with biotinylated α-mouse IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) diluted 1:200 in blocking solution for 1 h at RT and then for 1 h with streptavidin-HRP (Vector Laboratories) diluted 1:200 in blocking solution. Finally, diaminobenzidine (DAB) (Dako, Denmark) was applied until a brown end-product was visible and contrast staining was done with Harris hematoxylin solution (Sigma-Aldrich).

ThS staining. Paraffin-embedded brain sagittal sections from 24-month-old APP23 and age-matched wt mice were used. All samples were deparaffinized for 1 h at 65 °C and immersed in 1% ThS dissolved in ethanol 75% during 30 s. The excess of ThS was drained and the slices were again immersed in 0.1% ThS in ethanol 75% for 1 min, then, slices were dehydrated and DAPI was used as contrast staining before mounting the preparations.

Localization of rHDL-rApoJ nanodiscs in brain sections. To determine the cranial localization of rHDL-rApoJ nanodiscs after IV administration, 28 month old APP23 mice were treated with 1 mg/kg of rHDL-rApoJ nanodiscs via retroorbital injection. Animals were euthanized by decapitation 30 minutes after the administration and brains were rapidly removed, divided in two hemispheres and rapidly paraffin embedded. For immunofluorescence preparations, deparaffinization and blocking steps were done as previously described and anti-human ApoJ antibody (RD Bioscience, San Diego, CA, USA) diluted 1/100 in blocking solution was incubated ON at 4 °C. After that, slices were incubated with Alexa-Fluor594 labelled anti-mouse IgG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) diluted 1/500 in blocking solution 1 h at RT. Finally, ThS staining was done as previously described and preparations were mounted.

Statistical analysis. GraphPad Prism 5 was used for the statistical analysis. The significant differences were assessed using t-test, paired t-test and ANOVA with Dunnett's multiple comparison post-hoc test, as appropriate. The variables are shown as mean ± SEM and a p-value < 0.05 was considered statistically significant.

Data availability statement. The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

References

1. Duyckaerts, C., Delatour, B. & Potier, M. C. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol.* **118**, 5–36 (2009).
2. Thal, D. R., Griffin W. S., de Vos, R. A. & Ghebremedhin, E. Cerebral amyloid angiopathy and its relationship to Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **115**, 599–609 (2008).
3. Strittmatter, W. J. *et al.* Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 1977–1991 (1993).
4. Corder, E. H. *et al.* Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet.* **7**, 180–184 (1994).
5. Vagelatos, N. T. & Eslick, G. D. Type 2 diabetes as a risk factor for Alzheimer's disease: the confounders, interactions, and neuropathology associated with this relationship. *Epidemiol Rev.* **35**, 152–160 (2013).
6. Reitz, C. *et al.* Association of higher levels of high-density lipoprotein cholesterol in elderly individuals and lower risk of late-onset Alzheimer disease. *Arch Neurol.* **67**, 1491–1497 (2010).
7. Solomon, A., Kivipelto, M., Wolozin, B., Zhou, J. & Whitmer, R. A. Midlife serum, cholesterol and increased risk of Alzheimer's and vascular dementia three decades later. *Dement Geriatr Disord.* **28**, 75–80 (2009).
8. Stukas, S., Robert, J. & Wellington, C. L. High-density lipoproteins and cerebrovascular integrity in Alzheimer's disease. *Cell Metab.* **19**, 574–591 (2014).

9. Zlokovic, B. V. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci.* **12**, 723–738 (2011).
10. Liu, C. C., Kanekiyo, T., Xu, H. & Bu, G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat Rev Neurol.* **9**, 106–118 (2013).
11. Feldman, H. H. *et al.* Randomized controlled trial of atorvastatin in mild to moderate Alzheimer disease: LEADe. *Neurology.* **74**, 956–964 (2010).
12. Tardif, J. C. *et al.* Effects of reconstituted high-density lipoprotein infusions on coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. *JAMA.* **297**, 1675–1682 (2007).
13. Robert, J. *et al.* Reconstituted high-density lipoproteins acutely reduce soluble brain A β levels in symptomatic APP/PS1 mice. *Biochim Biophys Acta.* **1862**, 1027–1036 (2016).
14. Reed, B. *et al.* Associations between serum cholesterol levels and cerebral amyloidosis. *JAMA Neurol.* **71**, 195–200 (2014).
15. Camont, L., Chapman, M. J. & Kontush, A. Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. *Trends Mol Med.* **17**, 594–603 (2011).
16. Kontush, A., Lhomme, M. & Chapman, M. J. Unraveling the complexities of the HDL liposome. *J Lipid Res.* **54**, 2950–2963 (2013).
17. Shah, A. S., Tan, L., Long, J. L. & Davison, W. S. Proteomic diversity of high density lipoproteins: our emerging understanding of its importance in lipid transport and beyond. *J Lipid Res.* **54**, 2575–2585 (2013).
18. Proudfoot, J. M. *et al.* HDL is the major lipoprotein carrier of plasma F2-isoprostanes. *J Lipid Res.* **50**, 716–722 (2009).
19. Nofer, J. R. *et al.* Suppression of endothelial cell apoptosis by high density lipoproteins (HDL) and HDL-associated lysosphingolipids. *J Biol Chem.* **276**, 34480–34485 (2001).
20. Seetharam, D. *et al.* High-density lipoprotein promotes endothelial cell migration and reendothelialization via scavenger receptor-B type I. *Circ Res.* **98**, 63–72 (2006).
21. Park, S. H., Park, J. H., Kang, J. S. & Kang, Y. H. Involvement of transcription factors in plasma HDL protection against TNF-alpha-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression. *Int J Biochem Cell Biol.* **35**, 168–182 (2003).
22. Nuuntien, T., Suuronen, T., Kauppinen, A. & Saminen, A. Clusterin: a forgotten player in Alzheimer's disease. *Brain Res Rev.* **61**, 89–104 (2009).
23. Matsubara, E., Frangione, B. & Ghiso, J. Characterization of apolipoprotein J-Alzheimer's A beta interaction. *J Biol Chem.* **270**, 7563–7567 (1995).
24. Howlett, D. R., Hortobágyi, T. & Francis, P. T. Clusterin associates specifically with A β 40 in Alzheimer's disease brain tissue. *Brain Pathol.* **23**, 623–632 (2013).
25. Koudinov, A., Matsubara, E., Frangione, B. & Ghiso, J. The soluble form of Alzheimer's amyloid beta protein is complexed to high density lipoprotein 3 and very high density lipoprotein in normal human plasma. *Biochem Biophys Res Commun.* **205**, 1164–1171 (1994).
26. Koudinov, A. R., Berezov, T. T., Kumar, A. & Koudinova, N. V. Alzheimer's amyloid beta interaction with normal human plasma high density lipoprotein: association with apolipoprotein and lipids. *Clin Chim Acta.* **270**, 75–84 (1998).
27. Schrijvers, E. M., Koudstaal, P. J., Hofman, A. & Breteler, M. M. Plasma clusterin and the risk of Alzheimer disease. *JAMA.* **305**, 1322–1326 (2011).
28. Jongbloed, W. *et al.* Clusterin Levels in Plasma Predict Cognitive Decline and Progression to Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* **46**, 1103–1110 (2015).
29. Schürmann, B. *et al.* Association of the Alzheimer's disease clusterin risk allele with plasma clusterin concentration. *J Alzheimers Dis.* **25**, 421–424 (2011).
30. Lambert, J. C. *et al.* Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.* **41**, 1094–1099 (2009).
31. Roussotte, F. F. *et al.* Combined effects of Alzheimer risk variants in the CLU and ApoE genes on ventricular expansion patterns in the elderly. *J Neurosci.* **7**, 6537–45 (2014).
32. Ling, I. F., Bhongsatiern, J., Simpson, J. F., Fardo, D. W. & Estus, S. Genetics of clusterin isoform expression and Alzheimer's disease risk. *PLoS One.* **7**, e33923 (2012).
33. Nelson, A. R., Sagare, A. P. & Zlokovic, B. V. Role of clusterin in the brain vascular clearance of amyloid- β . *PNAS.* **5**, 8681–8682 (2017).
34. Bell, R. D. *et al.* Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid beta-peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system. *J Cereb Blood Flow Metab.* **27**, 909–918 (2007).
35. Merino-Zamorano, C. *et al.* Modulation of Amyloid- β 1-40 Transport by ApoA1 and ApoJ Across an *in vitro* Model of the Blood-Brain Barrier. *J Alzheimers Dis.* **53**, 677–691 (2016).
36. Zlokovic, B. V. Cerebrovascular transport of Alzheimer's amyloid beta and apolipoproteins J and E: possible anti-amyloidogenic role of the blood-brain barrier. *Life Sci.* **59**, 1483–1497 (1996).
37. Van Dam, D., Vloeberghs, E., Abramowski, D., Staufenbiel, M. & De Deyn, P. P. APP23 mice as a model of Alzheimer's disease: an example of a transgenic approach to modeling a CNS disorder. *CNS Spectr.* **10**, 207–222 (2005).
38. Mawuenyega, K. G. *et al.* Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science.* **330**, 1774 (2010).
39. Matsubara, E., Soto, C., Governale, S., Frangione, B. & Ghiso, J. Apolipoprotein J and Alzheimer's amyloid beta solubility. *Biochem J.* **316**, 671–679 (1996).
40. Santilli, G., Aronow, B. J. & Sala, A. Essential requirement of apolipoprotein J(clusterin) signaling for IkappaB expression and regulation of NF-kappaB. *J Biol Chem.* **278**, 38214–38219 (2003).
41. Killick, R. *et al.* Clusterin regulates β -amyloid toxicity via Dickkopf-1-driven induction of the wnt-PCP-JNK pathway. *Mol Psychiatry.* **19**, 88–98 (2014).
42. Bricarello, D. A., Smilowitz, J. T., Zivkovic, A. M., German, J. B. & Parikh, A. N. Reconstituted lipoprotein: a versatile class of biologically-inspired nanostructures. *ACS Nano.* **5**, 42–57 (2011).
43. Scanu, A. Binding of human serum high density lipoprotein apoprotein with aqueous dispersions of phospholipids. *J Biol Chem.* **242**, 711–719 (1967).
44. Dabbs, R. A. & Wilson, M. R. Expression and purification of chaperone-active recombinant clusterin. *PLoS One.* **9**, e86989 (2014).
45. Calero, M. *et al.* Functional and structural properties of lipid-associated apolipoprotein J(clusterin). *Biochem J.* **344**, 375–383 (1999).
46. Chen, B. *et al.* Apolipoprotein AI tertiary structures determine stability and phospholipid-binding activity of discoidal high-density lipoprotein particles of different sizes. *Protein Sci.* **18**, 921–935 (2009).
47. Song, Q. *et al.* Lipoprotein-based nanoparticles rescue the memory loss of mice with Alzheimer's disease by accelerating the clearance of amyloid-beta. *ACS Nano.* **8**, 2345–2359 (2014).
48. Massey, J. B. & Pownall, H. J. Cholesterol is a determinant of the structures of discoidal high density lipoproteins formed by the solubilization of phospholipid membranes by apolipoprotein A-I. *Biochim Biophys Acta.* **1781**, 245–253 (2008).
49. Lim, J., Yeap, S. P., Che, H. X. & Low, S. C. Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. *Nanoscale Res Lett.* **8**, 381 (2013).
50. Grapentin, C., Barnert, S. & Schbert, R. Monitoring the stability of perfluorocarbon nanoemulsions by cryo-TEM image analysis and dynamic light scattering. *PLoS One.* **10**, e0130674 (2015).
51. Zeno, W. F., Hilt, W. F., Risbud, S., Voss, S. H. J. C. & Longo, M. L. Spectroscopic characterization of structural changes in membrane scaffold protein entrapped within mesoporous silica gel monoliths. *ACS Appl Mater Interfaces.* **7**, 8640–8649 (2015).
52. Segrest, J. P., Jackson, R. L., Morrisett, J. D. & Gotto, A. M. Jr. A molecular theory of lipid-protein interactions in the plasma lipoproteins. *FEBS Lett.* **15**, 247–58 (1974).

53. Gursky, O. Hot spots in apolipoprotein A-II misfolding and amyloidosis in mice and men. *FEBS Lett.* **18**, 845–50 (2014).
54. Bailey, R. W., Dunker, A. K., Brown, C. J., Garner, E. C. & Griswold, M. D. Clusterin, a binding protein with a molte globule-like region. *Biochem.* **40**, 11828–11840 (2001).
55. Gelissen, I. C. *et al.* Apolipoprotein J (clusterin) induces cholesterol export from macrophage-foam cells: a potential anti-atherogenic function? *Biochem J.* **331**, 231–237 (1998).
56. Beach, T. G. *et al.* Circle of Willis atherosclerosis: association with Alzheimer's disease, neuritic plaques and neurofibrillary Tangles. *Acta Neuropathol.* **113**, 13–21 (2007).
57. Yarchoan, M. *et al.* Cerebrovascular atherosclerosis correlates with Alzheimer pathology in neurodegenerative dementias. *Brain* **135**, 3749–3756 (2012).
58. Zheng, L. *et al.* Cerebral atherosclerosis is associated with cystic infarcts and microinfarcts but not Alzheimer pathologic changes. *Stroke.* **44**, 2835–2541 (2013).
59. Thanopoulou, K., Fragkouli, A., Stylianopoulou, F. & Georgopoulos, S. Scavenger receptor class B type I (SR-BI) regulates perivascular macrophages and modifies amyloid pathology in an Alzheimer mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 20816–20820 (2010).
60. Kolmodova, R., Staufenbiel, M. & Lefterov, I. Lack of ABCA1 considerably decreases brain ApoE level and increases amyloid deposition in APP23 mice. *J Biol Chem.* **280**, 43224–43235 (2005).
61. Wahrle, S. E. *et al.* Deletion of Abca1 increases Abeta deposition in the PDAPP transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem.* **280**, 43236–43242 (2005).
62. Rull, A. *et al.* Increased concentration of clusterin/apolipoprotein J (apoJ) in hyperlipidemic serum is paradoxically associated with decreased apoJ content in lipoproteins. *Atherosclerosis.* **241**, 463–70 (2015).
63. Stenehjem, D. D., Hartz, A. M., Bauer, B. & Anderson, G. W. Novel and emerging strategies in drug delivery for overcoming the blood-brain barrier. *Future Med Chem.* **1**, 1623–1641 (2009).
64. Pardridge, W. M. Alzheimer's disease drug development and the problem of the blood-brain barrier. *Alzheimers Dement.* **5**, 427–432 (2009).
65. Winkler, D. T. *et al.* Spontaneous hemorrhagic stroke in a mouse model of cerebral amyloid angiopathy. *J Neurosci.* **21**, 1619–1327 (2001).
66. Bien-Ly, N. *et al.* Lack of Widespread BBB Disruption in Alzheimer's Disease Models: Focus on Therapeutic Antibodies. *Neuron.* **88**, 289–297 (2015).
67. Yamada, M. Cerebral amyloid angiopathy: emerging concepts. *J Stroke.* **17**, 17–30 (2015).
68. Farid, K., Charidimou, A. & Baron, J. C. Amyloid positron emission tomography is sporadic cerebral amyloid angiopathy: A systematic critical update. *Neuroimage Clin.* **5**, 247–263 (2017).
69. Simonsen, J. B. Evaluation of reconstituted high-density lipoprotein (rHDL) as a drug delivery platform – a detailed survey of rHDL particles ranging from biophysical properties to clinical implications. *Nanomedicine.* **12**, 2161–2179 (2016).
70. Papagiannaros, A. *et al.* Near infrared planar tumor imaging and quantification using nanosized Alexa 750-labeled phospholipid micelles. *Int J Nanomedicine.* **4**, 123–131 (2009).
71. Havel, R. J., Eder, H. A. & Bragdon, J. H. The distribution and chemical composition of centrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest.* **34**, 1245–1253 (1955).
72. Walsh, D. M. *et al.* Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *J Biol Chem.* **274**, 25945–25952 (1999).
73. Escolà-Gil, J. C. *et al.* Quantification of *in vitro* macrophage cholesterol efflux and *in vivo* macrophage-specific reverse cholesterol transport. *Methods Mol Biol.* **1339**, 211–233 (2015).
74. Fernández-de Retana, S. 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.* **5**, 116–128 (2017).

Acknowledgements

This work has been funded by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) [PI14/01134 and PI13/00364], co-financed by the European Regional Development Fund, (FEDER) and Fundació La Marató de TV3 [40/U/2014]. The Neurovascular Research Laboratory is part of the INVICTUS+ network, ISCIII, Spain [RD16/0019/0021]. M.H.-G. is supported by the Miguel Servet programme, ISCIII, Spain [CP12/03259]. ICN2 acknowledges the support of the Spanish MINECO through the Severo Ochoa Centres of Excellence Programme, under Grant SEV-2013-0295.

Author Contributions

M.H.-G. and M.C.-S. designed the study. J.M. and D.M. and S.F.-R. participated in the design of the study. S.F.-R. performed most of the experiments, collected and analysed data and wrote the manuscript. A.M. and P.M. participated actively in the experiments, performing A β immunohistochemistry in mice slices and being responsible of mice colony care. J.L.S.-Q. and A.G.-L. did the *in vitro* cholesterol efflux experiments and kindly allowed their installations to perform KBr density ultracentrifugation step.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15215-w>.

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Characterization of ApoJ-reconstituted high-density lipoprotein (rHDL) nanodisc for the potential treatment of cerebral β -amyloidosis

Sofía Fernández-de-Retana¹, Mary Cano-Sarabia² *, Paula Marazuela¹, Jose Luis Sánchez-Quesada³, Annabel Garcia-Leon³, Alex Montañola¹, Joan Montaner¹, Daniel MasPOCH^{2,4}, Mar Hernández-Guillamon¹ *

¹ Neurovascular Research Laboratory, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain; ² Catalan Institute of Nanoscience and Nanotechnology (ICN2), CSIC and the Barcelona Institute of Science and Technology, Campus UAB, Bellaterra, Barcelona, Spain; ³ Cardiovascular Biochemistry Group, Research Institute of the Hospital de Sant Pau (IIB Sant Pau), Barcelona, Spain; ⁴ Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), 08100 Barcelona, Spain

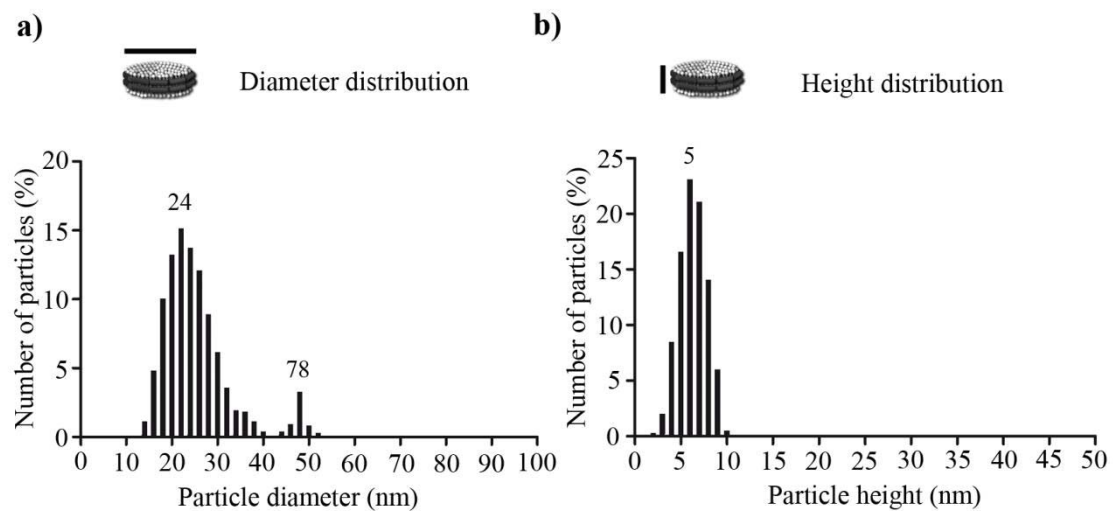
* Corresponding Authors:

Dr. Mar Hernández-Guillamon: Mar.hernandez.guillamon@vhir.org / marguillamon@gmail.com

Dr. Mary Cano-Sarabia: Mary.cano@icn2.cat

SUPPLEMENTARY FIGURES

Supplementary Figure S1

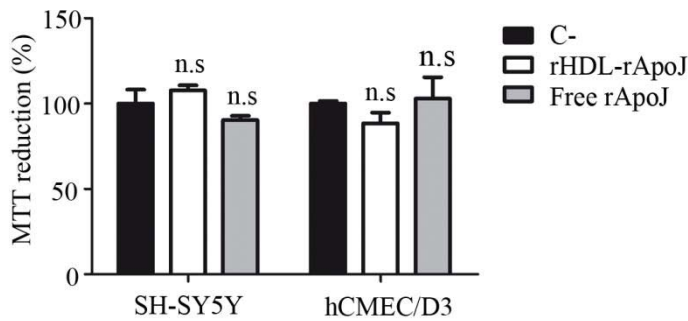


Supplementary Figure S1: Size distribution of purified rHDL-rApoJ nanodiscs at the ultrastructural level from the measurement of 1000 particles: a) Diameter distribution of purified rHDL-rApoJ nanodiscs. b) Height distribution of rHDL-rApoJ nanodiscs.

Supplementary Information

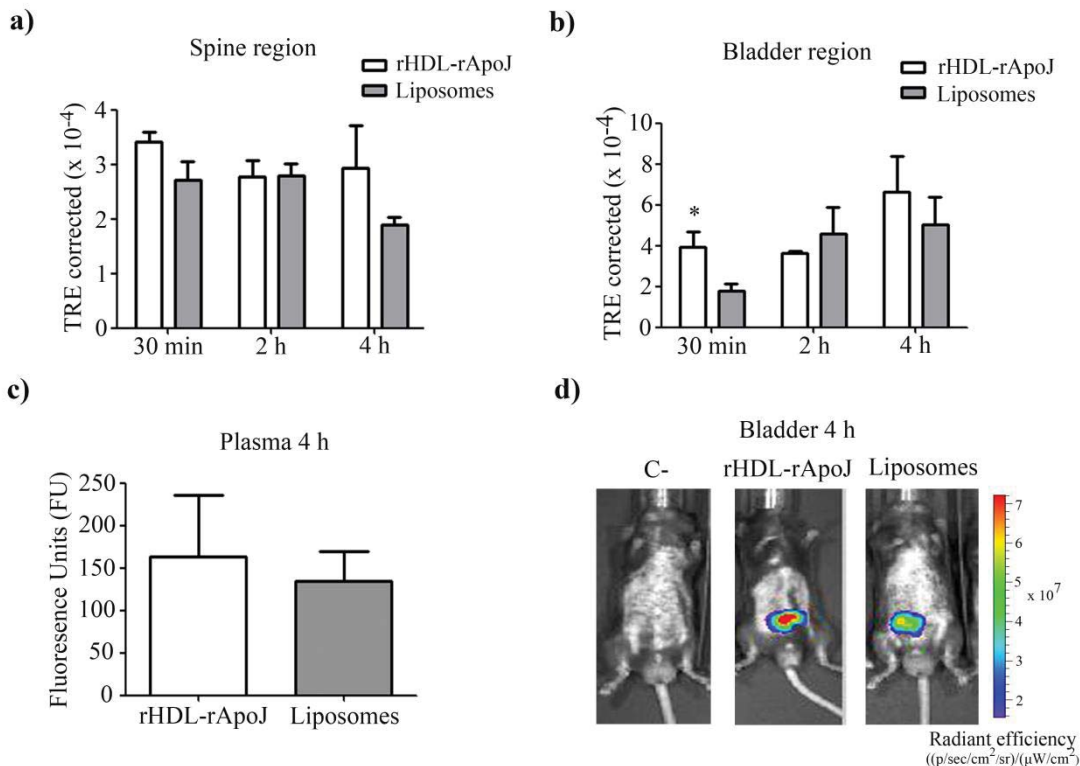
Characterization of rApoJ-reconstitutes high-density lipoprotein (rHDL) for the potential treatment of cerebral β -amyloidosis

Supplementary Figure S2



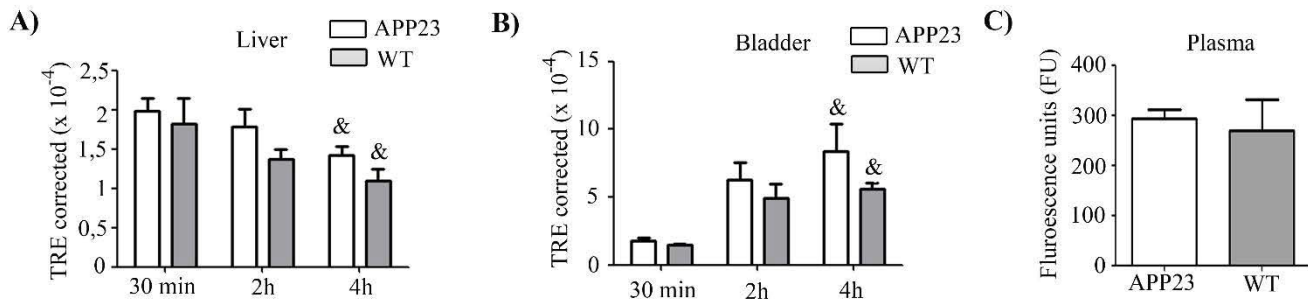
Supplementary Figure S2: Citotoxicity analysis of free rApoJ and rHDL-rApoJ nanodiscs. MTT reduction assay in cultured microvascular endothelial cells (hCMEC/D3) and neuroblastoma SH-SY5Y cells (as an *in vitro* model of neuronal function) after the treatment with rHDL-rApoJ nanodiscs or free rApoJ (80 mg/L) for 24 h. N=3; one way-ANOVA and Dunnett's post-hot test; n.s.= non-significant.

Supplementary Figure S3



Supplementary Figure S3: Biodistribution of infused rHDL-rApoJ nanodiscs or liposomes in 8 week-old C57/BL6 mice. Quantification of the *in vivo* fluorescent signal obtained using the IVIS Xenogen system at 30 min, 2 h and 4 h after IV administration of labelled-rHDL-rApoJ or labelled-liposomes in (A) the spine and (B) the bladder of 8 week-old C57/BL6 mice, N=5-6/group. (C) Quantification of the fluorescent signal obtained in plasma from 8 week-old C57/BL6 mice treated with labelled-rHDL-rApoJ or labelled-liposomes determined at Ex/Em: 750/780, N=4-5/ group. (D) Representative IVIS Xenogen *in vivo* images of ventral mice sections at 4 h after IV administration of labelled-rHDL-rApoJ or labelled-liposomes. C- = Non-treated control mouse. t-test analysis; *p< 0.05 comparison of the signal obtained from mice treated with rHDL-rApoJ vs. liposomes at each time point.

Supplementary Figure S4

**Supplementary Figure S4: Biodistribution of IV infused rHDL-rApoJ in aged APP23 and wt mice.**

Quantification of the *in vivo* fluorescent signal obtained using the IVIS Xenogen system at 30 min, 2 h and 4 h after IV administration of labelled-rHDL-rApoJ in (A) the liver and (B) the bladder of 24-month-old APP23 and wt mice, N=5-6/group. (C) Quantification of the fluorescent signal obtained in plasma from 24-month-old APP23 and wt mice 4 h after administration of labelled-rHDL-rApoJ determined at Ex/Em: 750/780. N=3/group. Paired t-test analysis; & p<0.05 comparison between t= 30 min and t= 4 h for each treatment.

SUPPLEMENTARY METHODS**Production, purification and characterization of free rApoJ**

The production and purification of recombinant human ApoJ (rApoJ) has been previously described by our group³¹. Here below, we provide a detailed technical protocol for the production, purification and characterization of human free rApoJ:

Production and purification of free rApoJ: Human Embryonic Kidney 293T cells (HEK293T) were transfected with a pcDNA4.0TM vector containing human APOJ cDNA (Abgent, Clairemont, San Diego, USA). Stable transfected clones were cultured in HYPERFlask systems (Corning Inc., New York, USA), followed by supernatant recollection and purification. The protein was purified with Ni-affinity chromatography in a FPLC ÄKTA Purifier 100 System) with HiScreen Ni FF columns (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ, USA). Purified protein was dialyzed, lyophilized and reconstituted in Tris Buffer Saline (TBS, pH = 6.4) and its concentration was assessed using BCA assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Aliquots were stored at -80°C.

SDS-PAGE: The purity of rApoJ was determined using SDS-PAGE in 4-12% polyacrylamide gels under reducing (5% 2-mercaptoethanol and heating at 95 °C for 5 min) and non-reducing conditions, followed by Coomassie SafeBlue staining (Nzytech, Lisbon, Portugal). The purity of rApoJ was > 75%, determined by analysis of the bands using the ImageJ software (rsweb.nih.gov). Human native ApoJ (nApoJ; Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) was used as a positive control.

Size Exclusion Chromatography (SEC): The native state of free rApoJ protein was characterized by SEC in an ÄKTA Purifier 100 system. One-hundred μ l of free rApoJ (4 mg/ml) was injected in a Superose 6 10/300 GL column (GE HealthCare Bioscience Corp.). Equilibration and elution were performed with Phosphate Buffered Saline (PBS) at 0.4 ml/min, and the

Supplementary Information

Characterization of rApoJ-reconstitutes high-density lipoprotein (rHDL) for the potential treatment of cerebral β -amyloidosis

absorbance at 280 nm was monitored continuously obtaining a size dependent elution of different rApoJ aggregated species.

Characterization of rHDL-rApoJ nanodiscs

Once rHDL-rApoJ nanodisc were prepared and purified as described in the main text, resulting nanodiscs were characterized in terms of size, morphology and secondary structure of rApoJ. All the technical procedures used for the nanodiscs characterization are extensively described here below:

Native-PAGE: Purified rHDL-rApoJ particles were characterized by Native-PAGE in precast 4-20% acrylamide gradient gels (BioRad, Hercules, California, USA) using fluorescent rHDL-rApoJ nanodiscs. The Kit for High Molecular Marker 14,000-500,000 Non-Denaturing PAGE (Sigma-Aldrich) was used as molecular marker. A 25 μ l sample aliquot was loaded and gels were run for 3 h at 140 V at 4°C. The fluorescence of the lipids was detected using an ODYSSEY Imager (Li-Cor Biotechnology, Lincoln, NE, USA), recording the emission at 700 nm followed by Coomassie staining for protein detection.

Dynamic Light Scattering (DLS): Particle-size distributions of rHDL-rApoJ nanodiscs and liposomes were determined using a DLS analyzer combined with non-invasive backscatter technology (Malvern Zetasizer, Malvern Instruments, UK).. The mean of 3 different measurements was taken as the mean diameter.

Transmission Electron Microscopy (TEM): Isolated rHDL-rApoJ fractions were analysed by negative staining TEM. An 8 μ l aliquot of rHDL-rApoJ nanodiscs was added to freshly glow-discharged carbon 300 Mesh copper grids (Ted Pella Inc. Redding, CA, USA) for 1 min. After blotting excess fluid, samples were stained with 8 μ l of 5% uranyl acetate for 1 min. Samples were then examined in a JEM 1400 Transmission Electron Microscope (JEOL USA, Peabody, MA, USA). The diameter and height of 1000 discoidal particles was measured with ImageJ software.

Circular dichroism (CD): Far Ultraviolet (UV) CD spectrum was recorded to detect the conformational changes that occurred in rApoJ due to its lipidation. CD measurements (190-260 nm) were made of rApoJ and rHDL-rApoJ in TBS solutions (0.1 mg/ml) in a 1 mm path-length quartz cuvette in a JASCO-815 spectropolarimeter (JASCO Inc. Maryland, USA). The measurements were corrected by subtracting the spectra of a liposome solution in TBS (1 mM). The α -helical content was calculated from molar ellipticity at 222 nm ($[\theta]_{222}$) as previously described^{1,2}, using the Equation (1):

$$\alpha - \text{helical content (\%)} = \frac{-[\theta]_{222} + 3000}{39000} \times 100 \quad (1)$$

SUPPLEMENTARY REFERENCES

- [1] Morrow, J. A. *et al.* Differences in stability among the human apolipoprotein E isoforms determined by the amino-terminal domain. *Biochemistry*. **39**, 11657-11666 (2000).
- [2] WF. Zeno, W. F., Hilt, S., Risbud, S. H., Voss, J. C. & Longo, M. L. Spectroscopic characterization of structural changes in membrane scaffold protein entrapped within mesoporous silica gel monoliths. *ACS Appl Mater Interfaces*. **7**, 8640-8649 (2015).

4- DISCUSIÓN

La β -amiloidosis cerebral, englobando la Enfermedad de Alzheimer (EA) y la Angiopatía Amiloide Cerebral (AAC), induce consecuencias patológicas devastadoras en los pacientes. Lamentablemente, en la actualidad no existen terapias modificadoras para ninguna de estas dos enfermedades. En los casos esporádicos de β -amiloidosis cerebral ($\approx 90\%$ de los casos), no se observa un aumento de la producción del péptido $A\beta^4$ y la acumulación cerebral del péptido $A\beta$ se explica por una desregulación de los mecanismos de eliminación²⁵⁸. Por ello, el desarrollo de terapias que estimulen dichas vías podría tener un gran impacto en pacientes con EA o AAC.

En este contexto, se ha propuesto que ApoA-I¹⁸⁶ y ApoJ²³⁴ están implicadas en aclaramiento cerebral del péptido $A\beta$, aunque su rol concreto y los mecanismos subyacentes no son totalmente comprendidos. En este sentido, hipotetizamos que modificaciones estructurales realizadas sobre ApoA-I-wt y ApoJ (rApoA-I-M y nanodiscos rHDL-rApoJ respectivamente) podrían aumentar su eficacia en este proceso. Por estas razones, consideramos que la administración periférica de estas apolipoproteínas recombinantes y/o sus modificaciones estructurales puede arrojar luz sobre su potencial terapéutico y los mecanismos en los que intervienen.

4.1- Producción de las apolipoproteínas recombinantes y sus modificaciones estructurales

La producción y comercialización de proteínas recombinantes con objetivos terapéuticos ha supuesto una auténtica revolución en el tratamiento de diversas enfermedades. De hecho, 18 de los 27 fármacos aprobados por la Administración de Alimentación y Fármacos (FDA, *Food and Drug Administration*) entre 2008 y 2011 estaban basados en proteínas recombinantes²⁵⁹. Por otra parte, de esos 18 fármacos, 12 fueron producidos en células de mamíferos, acentuando la importancia de este sistema de producción en la aplicabilidad de los fármacos. Un buen ejemplo del impacto terapéutico de las proteínas recombinantes producidas en células mamíferas

es el activador tisular del plasminógeno recombinante (rt-PA, *Recombinant Tissue plasminogen activator*), ampliamente utilizado para la terapia trombolítica en el ictus isquémico e infarto de miocardio²⁶⁰.

En este contexto, en nuestros estudios, rApoA-I-wt, rApoA-I-M y rApoJ fueron producidas en células humanas (HEK293T). Consideramos que utilizar este sistema de expresión permite reproducir con mayor veracidad las modificaciones post-transcripcionales y el patrón de glicosilación de las proteínas humanas. Más concretamente, pensamos que la producción de rApoJ en células humanas es crítica para obtener una proteína funcional. Esto viene dado por la elevada complejidad estructural de ApoJ y las múltiples modificaciones post-transcripcionales a las que está sujeta. Tras su traducción, ApoJ es sometida a una proteólisis generando las subunidades α - y β - que quedan unidas por puentes disulfuro. Además es una proteína altamente y complejamente glicosilada²¹⁶. Así, la dificultad de producir ApoJ en sistemas de producción diferentes a los mamíferos se ha documentado con anterioridad²⁶¹.

La producción de proteínas recombinantes en sistemas de producción de células mamíferas (Ej: células HEK293) supone sacrificar los elevados rendimientos de producción obtenidos en *Escherichia coli* (*E.coli*) o *Pischia pastoris* (*P.pastoris*)²⁵⁹. Sin embargo, debido a la importancia de la producción en células mamíferas para la generación de agentes terapéuticos, se han desarrollado procesos industriales que permitan la producción de proteínas recombinantes en células mamíferas a gran escala. Así, las células HEK293 se pueden crecer en suspensión en biorreactores, multiplicando por 100 los rendimientos de producción que se obtenían hace dos décadas ²⁶⁰.

Por otra parte, atendiendo a la aplicabilidad de rApoA-I, rApoJ y sus modificaciones estructurales, la administración intravenosa de la variante genética rApoA-I-M ya ha sido probada en diferentes ensayos clínicos en el contexto de la aterosclerosis. En ellos, no se han observado efectos secundarios indeseados, proponiendo que la administración de rApoA-I-M es segura. De la misma manera, la reconstitución de apolipoproteínas recombinantes en nanodiscos rHDL (MDCO-216) también ha

llegado a ensayos clínicos enfocados a diferentes enfermedades, en los que tampoco se observaron síntomas indeseados relacionados con toxicidad generada por las mismas (NCT02678923). En base a estas evidencias, consideramos que la producción de rApoA-I, rApoA-I-M y rApoJ en células humanas, así como su modificación estructural para la formación de nanodiscos rHDL es un proceso escalable a nivel industrial. Además, para el caso de rApoA-I-M su seguridad ya ha sido probada en humanos, lo que facilitaría su traslado a la clínica en el caso de que su potencial terapéutico fuera consolidado.

4.2- Potencial terapéutico de rApoA-I-wt y rApoA-I-M

4.2.1- Eficacia de rApoA-I-M en el modelo murino APP23

Como primer paso para evaluar el rol de ApoA-I-wt y ApoA-I-M en relación a patologías asociadas al depósito cerebral del péptido $A\beta$, en el **Artículo 1** se analizó la capacidad citoprotectora de rApoA-I-wt y rApoA-I-M frente a $A\beta_{42}$ en cultivos de la línea celular endotelial humana hCMEC/D3. Consideramos que debido a la gran capacidad previniendo el daño vascular que ha mostrado ApoA-I-M en estudios previos,^{195,209} esta proteína podría tener un efecto beneficioso protegiendo a las células endoteliales de la citotoxicidad generada por $A\beta$. Así, ambas apolipoproteínas recombinantes mostraron eficacia previniendo la citotoxicidad de $A\beta$. Sin embargo, tras el post-tratamiento con rApoA-I-wt o rApoA-I-M en células previamente sometidas a la citotoxicidad generada por el péptido, solamente rApoA-I-M fue capaz de prevenir muerte celular. Las mayores capacidades protectoras¹⁹⁴ y antiinflamatorias¹⁹² de ApoA-I-M frente a ApoA-I-wt ya se han propuesto anteriormente, aunque esta fue la primera vez en la que ApoA-I-M se estudió en relación al efecto citotóxico inducido por el péptido $A\beta$. A continuación, se testó el efecto de su administración intravenosa crónica en ratones APP23 de 16 meses, como modelo experimental de EA/AAC.

Una vez finalizado el tratamiento, se observó una reducción de la carga de $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$ cerebral total, así como de la formación de placas neuríticas y AAC en aquellos ratones que habían sido tratados con rApoA-I-M. En cuanto al mecanismo de actuación, se observó que 30 minutos después de una sola dosis de proteína recombinante, los niveles plasmáticos de $A\beta_{40}$ aumentaron, detectándose el complejo rApoA-I-M: $A\beta$ en plasma. Estos resultados propusieron que la administración periférica de rApoA-I-M es capaz de prevenir la acumulación del péptido $A\beta$ fomentando su eliminación a través de la BHE. No obstante, no se detectó rApoA-I-M en el parénquima cerebral, por lo que el mecanismo que dirige la disminuida acumulación de $A\beta$ en cerebro, parece estar mediado desde la periferia. Se ha propuesto que ApoA-I es capaz de atravesar la BHE tanto *in vitro*, a través de receptores LRP1²⁶², como *in vivo* a través del plexo coroideo²⁶³. Por estas razones, no se puede descartar que se dé la entrada de rApoA-I-M al parénquima cerebral y que esta no sea detectable mediante las técnicas utilizadas (Western Blot y ELISA). Frente a la aparente ausencia de rApoA-I-M en cerebro, los resultados obtenidos podrían ser explicados mediante la “hipótesis del sumidero periférico” (*peripheral sink hypothesis*), en la que se propone que moléculas que presenten gran afinidad por $A\beta$ en el plasma pueden favorecer su degradación periférica, provocando una movilización del $A\beta$ de cerebro a sangre. De hecho, en un modelo *in vitro* de la BHE murina, se observó un mayor del transporte del péptido $A\beta_{40}$ de cerebro a sangre en presencia de rApoA-I-wt en el compartimento apical (sangre)²⁶². Por otra parte, también se ha propuesto que la eficacia de la inmunización pasiva contra $A\beta$ observada en modelos experimentales de ratón de β -amiloidosis cerebral está mediada por este mecanismo²⁶⁴. No obstante, las rutas implicadas en esta vía de eliminación son ampliamente desconocidas y la naturaleza de este mecanismo sigue bajo discusión⁴⁰. Por estas razones, consideramos que estudiar más en profundidad el mecanismo de acción de ApoA-I-M permitiría una mejor comprensión del rol periférico de ApoA-I y esclarecer su potencial terapéutico.

Por otra parte, tras la administración periférica de rApoA-I-M se observó una disminución de los marcadores celulares neuroinflamatorios microgliales (Iba1 y CD68) y astrocíticos (GFAP). Como ya se ha mencionado, ApoA-I-M presenta unas

propiedades antiinflamatorias únicas¹⁹², que podrían explicar la disminución en los marcadores de inflamatorios. No obstante, debido a que la concentración de IL-1 β correlacionó de manera muy significativa con los niveles de cerebrales de A β , la mitigación de la respuesta inmune cerebral se podría identificar como una consecuencia de la disminución en los niveles totales de A β .

Por otro lado, pese a las mejorías observadas en términos de acumulación de A β y neuroinflamación, el tratamiento crónico con rApoA-I-M no fue capaz de mostrar eficacia previniendo la muerte neuronal que ocurre en el hipocampo de los ratones APP23 a partir de los 12 meses¹¹⁸. En este mismo contexto, no se evaluó el impacto de la administración periférica de rApoA-I-M sobre el estado cognitivo de los ratones APP23, lo cual es una de las limitaciones de nuestro estudio. Consideramos que futuros estudios que establezcan si los efectos protectores observados tras la administración crónica de rApoA-I-M son capaces de prevenir el déficit cognitivo en ratones APP23, serán claves para consolidar el potencial terapéutico de rApoA-I-M.

Asimismo, no se puede descartar que la administración periférica de ApoA-I-wt también tenga un rol protector frente a la acumulación patológica de A β en el modelo de ratón APP23. De hecho, aunque el **Artículo 1** es la primera publicación que estudia el efecto de ApoA-I-M en el contexto de la β -amiloidosis cerebral, el rol de ApoA-I-wt había sido propuesto anteriormente. Así, se ha observado que ratones APP/PS1 deficientes para *Apoa1*, mostraron una agudización de la AAC y del deterioro cognitivo sin afectar a la acumulación parenquimal de A β ¹⁸⁵. En el mismo sentido, la sobreexpresión de esta apolipoproteína resultó en una disminución de la neuroinflamación y la AAC¹⁸⁶; una vez más sin mostrar diferencias en los depósitos parenquimales. Además, una sola dosis de rApoA-I formulada en rHDL (fármaco CSL-111) en el modelo APP/PS1, fue capaz de reducir los niveles solubles de A β ₄₀ y A β ₄₂²⁵⁴. Sin embargo, en este último estudio, la administración crónica de rApoA-I lipídada no generó ninguna diferencia en la carga de A β o la neuroinflamación²⁵⁴, pese a la elevada dosis que se administró (60 mg/kg) en comparación a nuestro estudio con rApoA-I-M (2 mg/kg). Estos resultados, junto a la bibliografía que apoya mayores propiedades protectoras de ApoA-I-M frente a ApoA-I-wt¹⁹², nos

sugieren que rApoA-I-M tiene mayor potencial terapéutico que su forma wt, ya que a dosis más bajas que las estudiadas anteriormente, mostraron eficacia previniendo tanto la acumulación de A β vascular como parenquimal. No obstante, esta afirmación debe ser evaluada en futuros estudios, en los que se estudie la eficacia de ambas variantes genéticas bajo el mismo diseño experimental.

4.2.2- Rol del metabolismo lipídico y posibles mecanismos subyacentes

Debido al rol central que juega ApoA-I en el metabolismo lipídico¹⁷⁰, estudiar si los procesos biológicos involucrados en dicho metabolismo (eflujo de colesterol, activación de rutas antiinflamatorias y vasoprotectoras entre otros)^{171,172}, están implicados en los efectos protectores observados tras la administración periférica de rApoA-I-M podría ser de gran interés. En este contexto, como ya se ha mencionado a lo largo de esta Tesis Doctoral, varios estudios clínicos han observado que alteraciones en los niveles de HDL son un factor de riesgo para padecer EA¹⁵². En este mismo contexto, ApoE juega un rol indispensable en el metabolismo lipídico, y como se ha comentado anteriormente, el genotipo ApoE es el principal factor de riesgo para padecer EA esporádica¹⁵⁸. Así, ratones deficientes para el gen *ApoE*, son un modelo experimental de aterosclerosis muy validado, ya que en ausencia de la misma, los ratones presentan una marcada aterosclerosis e hiperlipidemia²⁶⁵. Estos resultados, refuerzan la idea de que alteraciones en el metabolismo lipídico están implicadas en la patología de β -amiloidosis cerebral.

En este contexto, ApoA-I es la apolipoproteína mayoritaria en las HDL (70% de las proteínas unidas a HDL²⁶⁶) y juega un papel indispensable en la biogénesis de partículas HDL, así como en el correcto funcionamiento del TRC²⁶⁷. Asimismo, ApoA-I-M se ha identificado como una variante protectora, ya que los portadores están protegidos frente a aterosclerosis¹⁸⁷. Además, se ha propuesto que la administración de rApoA-I-M lipidada en pacientes con enfermedad coronaria promueve una rápida redistribución de las subespecies de HDL, aumentando el nivel HDL incipientes²⁰⁹. En este mismo estudio, se observó que la infusión de rApoA-I-M lipidada promovía cambios lipídicos sustanciales, aumentando los

niveles de triglicéridos y disminuyendo los niveles de colesterol asociado a HDL, imitando así el perfil lipídico que muestran los portadores de ApoA-I-M¹⁸⁸. Por ello, se investigaron los niveles de colesterol total, HDL, LDL y triglicéridos en los ratones APP23 tratados con rApoA-I-M. Sin embargo, no se observó ninguna diferencia. No obstante, un análisis más detallado de las diferentes subespecies de HDL en los animales tratados con rApoA-I-M podría arrojar luz sobre los mecanismos subyacentes a los efectos protectores observados en el **Artículo 1**.

En esta misma línea, la implicación del eflujo de colesterol en EA también ha sido propuesta²⁶⁸. De hecho, alteraciones en la expresión de receptores implicados en el metabolismo lipídico y en el TRC en modelos experimentales de β -amiloidosis cerebral tienen consecuencias directas sobre la acumulación de A β . Así, la sobreexpresión de *ABCA1* (clásicamente implicada en el eflujo de colesterol²⁶⁹) en el modelo PDAPP resultó en una clara disminución de la carga de A β cerebral¹⁴⁹. En el mismo sentido, la deficiencia de *Abca1* en el mismo modelo animal, resultó en una mayor acumulación cerebral de A β ³⁵. Asimismo, la eliminación del gen *Srb-I* (receptor de partículas HDL e implicado en el TRC²⁷⁰) en el modelo animal de β -amiloidosis cerebral J20, también resultó en un aumento de la carga amiloide fibrilar y AAC, así como un empeoramiento del estado cognitivo de los ratones²⁷¹. Finalmente, la administración de agonistas del Receptor X de hígado (LXR, *Liver X Receptor*), en el modelo de β -amiloidosis Tg2576, también implicado en el metabolismo lipídico²⁷², mostraron una disminución muy significativa de la acumulación cerebral de A β ²⁷³. Por ello, en nuestro estudio, se evaluaron los niveles cerebrales de ABCA1 y SRB-I en los ratones APP23 sometidos al tratamiento crónico con rApoA-I-M. En este sentido, no se observaron diferencias en la expresión de dichos receptores. No obstante, debido a que se ha propuesto que ApoA-I-M podría tener mayor capacidad que ApoA-I-wt promoviendo el eflujo de colesterol¹⁹⁷, estudiar la posible estimulación de este mecanismo en el contexto de la β -amiloidosis cerebral podría ser de gran interés. Más concretamente, investigar la capacidad de rApoA-I-M de promover el eflujo de colesterol y su implicación sobre el transporte de A β a través de un modelo *in vitro* de la BHE²⁷⁴, podría ser útil para

determinar si el aclaramiento observado *in vivo* tras la administración de rApoA-I-M está relacionada con la estimulación del eflujo de colesterol.

Finalmente, los pacientes de EA muestran alteraciones en el correcto funcionamiento de la vasculatura cerebral, como una reducción del flujo sanguíneo cerebral²⁷⁵ y una menor densidad de microvasos cerebrales²⁷⁶. Además, los pacientes de AAC también muestran significativas alteraciones vasculares, mostrando pérdida de músculo liso y angitis; aparte de la evidente debilitación del vaso que conduce a eventos de HIC-AAC⁵¹. Estas alteraciones parecen tener un impacto tangible sobre la homeostasis cerebral. Así, se ha llegado a proponer que disfunciones cerebrovasculares pueden provocar una cascada de eventos nocivos que culminan en el desarrollo de la EA²⁷⁷. En este contexto, debido a las ya mencionadas propiedades protectoras que presenta ApoA-I-M (antiinflamatorias, promoción del eflujo de colesterol y moduladora del metabolismo lipídico)^{192,198,209}, está justificado proponer que rApoA-I-M pueda tener potentes propiedades vasoprotectoras que podrían modular la homeostasis cerebrovascular. Esta protección de la vasculatura cerebral, podría mediar los efectos protectores frente a la β -amiloidosis cerebral observados tras la administración de rApoA-I-M en el **Artículo 1**. Por ello, estudiar los efectos de la administración de rApoA-I-M sobre la disfunción vascular que exhibe el modelo transgénico APP23 podría esclarecer la importancia de este mecanismo.

4.3- Formación y caracterización de nanodiscos rHDL-rApoJ

4.3.1- Características fisicoquímicas de los nanodiscos rHDL-rApoJ

En el **Artículo 2** se presenta un protocolo para la preparación de nanodiscos rHDL-rApoJ con una alta reproducibilidad. La formación de estos nanodiscos conllevó un extenso proceso de optimización, el cual se puede encontrar resumido en el **Anexo 1**.

Mediante el método de diálisis colato se consiguió la formación de nanodiscos rHDL-rApoJ obteniendo dos poblaciones con ≈ 30 y 70 nm de diámetro respectivamente. La obtención de poblaciones de rHDL con diferentes diámetros ha sido previamente descrito para nanodiscos formulados con ApoA-I, donde la diferencia de tamaño se explicó por un diferente plegamiento terciario de la proteína²⁷⁸. Por otra parte, los nanodiscos presentaron una morfología discoidal con una densidad menor a $1,25$ g/ml.

Atendiendo a la estructura de los nanodiscos rHDL-rApoJ, se ha descrito que ApoJ tiene 3 grandes regiones nativamente desordenadas (*molten globule regions*) que potencialmente pueden adquirir estructura secundaria en forma de 5 hélices- α anfífilicas^{279,280}. De hecho, estos nanodiscos presentaron un incremento en el contenido de hélices- α en comparación la proteína libre. En este contexto, la presencia de hélices- α anfífilicas es esencial para la interacción proteína lípido, ya que el contenido tanto de residuos hidrofílicos como hidrofóbicos es necesaria para interactuar en la interfaz polar/no polar generada entre las fases de fosfolípido y agua²⁸¹. Así se permitiría la formación de enlaces hidrofóbicos entre las cadenas carbonadas de los fosfolípidos y residuos hidrófobos de ApoJ que da lugar a la formación de los nanodiscos rHDL-rApoJ.

Bajo nuestro conocimiento, sólo existe una publicación previa que estudie la formulación de ApoJ en rHDL²⁵³. Debido a la sensibilidad de la formación de rHDL a las condiciones de formación utilizadas, las diferencias en tamaño y morfología observados en comparación a nuestro estudio son fácilmente explicables por las diferencias metodológicas entre ambos protocolos. Por un lado, Calero *et al*²⁵³ utilizaron ApoJ purificada de plasma, mientras que nosotros utilizamos ApoJ recombinante producida en células humanas. Por otra parte, el fosfolípido utilizado y el ratio fosfolípido:proteína tampoco coincidió. Sin embargo, consideramos que nuestro protocolo da pie a futuras aplicaciones, ya que la utilización de ApoJ recombinante en lugar de purificada de plasma aumenta la seguridad y facilita la reproducibilidad y el escalado de la producción.

4.3.2- Nanodiscos rHDL-rApoJ en el contexto de la β -amiloidosis cerebral

En circulación y cerebro, ApoJ aparece tanto formando parte de partículas HDL como en su forma libre no lipidada. De hecho, se ha propuesto que una vez ApoJ es secretada se puede unir a HDLs preformadas²⁸², pero también se puede liberar en forma de lipoproteína tanto en la periferia a partir de células hepáticas²⁸³, como dentro del SNC a partir de astrocitos²¹³. Se estima que en torno a un 20% de la ApoJ circulante está formando parte de lipoproteínas²¹¹. Sin embargo, el impacto de la lipidación de ApoJ sobre su funcionalidad en el contexto de la β -amiloidosis cerebral es poco conocido.

Las consecuencias de la modificación estructural de ApoJ en forma de nanodiscos rHDL-rApoJ se investigaron en condiciones *in vitro*. En primer lugar, debido a que ApoJ es capaz de unirse al péptido A β y prevenir su fibrilización²²⁹, se investigó la capacidad de los nanodiscos rHDL-rApoJ de prevenir la fibrilización de A β ₄₀ y A β ₄₂ en comparación a la proteína libre. No se observaron diferencias en términos de prevención de la agregación de A β ₄₀ o A β ₄₂, demostrando que la lipidación de rApoJ bajo nuestras condiciones no modifica las características de chaperona que presenta ApoJ. Por otra parte, se ha propuesto que ApoJ interviene en el metabolismo lipídico promoviendo el eflujo de ésteres de colesterol²⁸⁴. En este sentido, observamos que los nanodiscos rHDL-rApoJ fueron más eficaces que la proteína libre promoviendo el eflujo de ésteres de colesterol *in vitro*. Así, como ya se ha mencionado con anterioridad, la relación existente entre la EA y el metabolismo lipídico está apoyada por varias evidencias^{151,152}. Además, tal y como se argumentaba en el *Apartado 4.2.2*, alteraciones en la expresión de receptores implicados en el eflujo de colesterol y metabolismo lipídico tienen efectos tangibles sobre la acumulación cerebral de A β ^{149,271}. Asimismo, las capacidades vasoprotectoras y antiinflamatorias que se les atribuyen a las partículas HDL podrían tener un impacto protector sobre la vasculatura cerebral²⁸⁵; lo que a su vez podría influir sobre la homeostasis cerebral. Por todo ello, la mayor capacidad promoviendo el eflujo de colesterol *in vitro* que mostraron los nanodiscos rHDL-rApoJ, podría suponer un aumento de función en relación a la β -amiloidosis cerebral. En este sentido, como se

ha propuesto para rApoA-I-M, estudiar el efecto de la lipidación de rApoJ sobre la capacidad de promover el eflujo de colesterol en un modelo *in vitro* de la BHE acoplado al transporte de A β podría ser de gran interés.

A continuación, nanodiscos rHDL-rApoJ y liposomas de tamaño equivalente, ambos marcados con fluorescencia, se administraron en ratones C57/BL6 vía intravenosa. Mediante la monitorización de esta fluorescencia a lo largo del tiempo se pudo determinar su biodinámica y biodistribución. Se observó que los nanodiscos eran capaces de acumularse específicamente en la zona craneal, algo que no se observó tras la administración de liposomas. Estos resultados, proponen que la presencia de rApoJ en los nanodiscos, es necesaria para su acumulación craneal. Dicha acumulación disminuyó a lo largo del tiempo, aunque esta era aún detectable 4 horas después de la administración tanto en la zona craneal como en plasma. Además, se observó que el metabolismo de eliminación era renal debido al aumento de señal progresivo observado en vejiga.

Por otra parte, se estudió la biodistribución de los nanodiscos rHDL-rApoJ tras su administración intravenosa en ratones de avanzada edad (28 meses) con genotipo APP23 en comparación con ratones wt. Se observó una mayor acumulación craneal de nanodiscos en los ratones con genotipo APP23, proponiendo que una elevada carga de A β en el parénquima y vasculatura cerebral promovería la retención de los nanodiscos. Para determinar la localización de rApoJ tras la administración periférica de nanodiscos rHDL-rApoJ, se realizó un análisis inmunohistoquímico en cortes de cerebro donde se observó acumulación de ApoJ humana en la vasculatura cerebral afectada con AAC. Sin embargo, no hubo detección en el parénquima, proponiendo que los nanodiscos rHDL-rApoJ no son capaces de atravesar la BHE. Atendiendo a la capacidad de rApoJ de atravesar la BHE, estudios *in vivo* anteriores en cobayas han propuesto que ApoJ es capaz de atravesar la BHE²⁸⁶ de sangre a cerebro. De la misma manera, se ha descrito que ApoJ es capaz de atravesar la BHE de cerebro a sangre a través del receptor LRP2²³⁰. Sin embargo, la capacidad de HDLs acopladas a ApoJ de atravesar la BHE es poco conocida. No obstante, no se puede descartar una entrada no detectable mediante inmunofluorescencia.

Por otra parte, las capacidades antiinflamatorias y antiapoptóticas²¹⁶ que se le atribuyen a ApoJ podrían tener un impacto sobre la cerebrovasculatura afectada con AAC así como afectar al aclaramiento del péptido A β . En el mismo sentido, se ha propuesto que ApoJ favorece la eliminación del péptido A β mediante la vía del drenaje perivascular²³⁴, por lo que la co-localización entre el A β vascular y rApoJ podría tener un impacto sobre la estimulación de esta vía.

Las evidencias presentadas en el **Artículo 2** generaron dos incógnitas principales: (1) Si las propiedades presentadas por los nanodiscos y rApoJ libre tienen un efecto terapéutico tras su administración en modelos experimentales de β -amiloidosis cerebral y (2) si el cambio estructural generado en rApoJ produce un incremento de la funcionalidad en el marco de la β -amiloidosis cerebral. En el **Manuscrito 3** se intentó dar respuesta a estas cuestiones.

4.4- Potencial terapéutico de rApoJ libre y nanodiscos rHDL-rApoJ

4.4.1- Efecto de la administración periférica de rApoJ libre o nanodiscos rHDL-rApoJ en el modelo experimental de β -amiloidosis cerebral APP23

En el **Manuscrito 3** se estudió el efecto de la administración crónica periférica de rApoJ libre o formulada en nanodiscos rHDL-rApoJ en el modelo transgénico murino APP23.

En primer lugar, estudios previos han descrito un aumento de los niveles cerebrales²⁸⁷ y circulantes²²⁵ de ApoJ en casos de EA. Sin embargo, si estas observaciones son causa o consecuencia de la acumulación patológica del péptido A β sigue bajo investigación. Por ello, en primer lugar investigamos las variaciones de los niveles de ApoJ murina (m-ApoJ) en función del aumento progresivo de depósito A β que presenta el modelo experimental de ratón APP23. Observamos que la creciente acumulación del péptido A β iba acompañada de un aumento de los

niveles cerebrales de m-ApoJ, detectando diferencias en ratones APP23 de 24 meses de edad en comparación a ratones wt y ratones APP23 de 15 meses. Sin embargo, a los 15 meses las diferencias entre APP23 y wt aún no eran significativas. Debido a que nuestra hipótesis inicial era que el aumento de los niveles de ApoJ es fruto de una respuesta protectora del organismo frente al insulto que supone la acumulación de A β , se estudió el efecto de la administración periférica de rApoJ humana o nanodiscos rHDL-rApoJ a edades en las que aún no se observó un aumento en los niveles plasmáticos o cerebrales de m-ApoJ (15 meses de edad).

Así, tras la administración crónica de rApoJ libre o nanodiscos rHDL-rApoJ, se detectó la presencia de rApoJ humana en plasma, mientras que en el SNC, sólo se observó rApoJ humana en el lumen de arterias leptomeningeas. Estos resultados van en consonancia con los obtenidos tras la administración de nanodiscos rHDL-rApoJ del **Artículo 2**, en el que no se detectó rApoJ humana en el parénquima cerebral. No se puede descartar que haya una sutil entrada de rApoJ a cerebro, pero dados los elevados niveles cerebrales de m-ApoJ²⁸⁸, consideramos que este hipotética entrada difícilmente generaría un aumento significativo de los niveles cerebrales totales de ApoJ.

Tras el análisis de los niveles de A β cerebrales, observamos niveles inferiores de A β ₄₀ y A β ₄₂ insoluble en los animales tratados con rApoJ libre en comparación al grupo salino, así como una reducción en el tamaño medio de los depósitos de A β fibrilar. Además, el tratamiento con nanodiscos rHDL-rApoJ mostró una reducción en los niveles insolubles de A β ₄₂. Asimismo, ambos tratamientos basados en el aumento de los niveles circulantes de rApoJ mostraron eficacia reduciendo el número de vasos cerebrales afectados por AAC. En este contexto, la reducción del número de vasos afectados por depósito de A β observado tras los tratamientos con rApoJ es coherente con resultados previos en los que ratones APP/PS1 deficientes para el gen *Clu* (APP/PS1/*Clu*^{-/-}), mostraron una impactante exacerbación del A β vascular, proponiendo la participación de ApoJ en la eliminación de A β mediante la vía del drenaje perivascular²³⁴. Sin embargo, en este mismo estudio se observó que la agudización del AAC fue acompañada de una reducción de los niveles totales de A β y una ausencia casi total de placas neuríticas. Estos resultados predecían que un

aumento de los niveles de ApoJ podría agravar el depósito A β cerebral, sin embargo, nuestro estudio demostraba niveles reducidos de A β_{40} y A β_{42} insoluble totales tras el aumento periférico con rApoJ. Pese a la aparente discordancia, estos resultados fundamentan la implicación de ApoJ regulando el depósito de A β cerebral, aunque determinar si elevados niveles de ApoJ son beneficiosos o nocivos sigue siendo un interrogante. Notablemente, esta misma cuestión sigue bajo investigación en cuanto a la apolipoproteína mayoritaria en cerebro (ApoE). En este caso, los resultados de numerosos estudios que han pretendido determinar el papel de ApoE en el desarrollo y progresión de β -amiloidosis cerebral no han ido en la misma dirección^{169,289}. En este contexto, debido a que nuestro estudio es el primer trabajo que evalúa el aumento circulante de ApoJ en un modelo transgénico de EA, consideramos que estos resultados aportan una pieza más para resolver el complejo puzzle que dibuja el rol de ApoJ en la β -amiloidosis cerebral.

Atendiendo a la muerte neuronal, los ratones de 15 meses APP23 tratados con salino mostraron pérdida neuronal en el hipocampo en comparación a los animales wt de la misma edad, tal y como está descrito en bibliografía²⁹⁰. El tratamiento con rApoJ libre mostró neuroprotección previniendo la muerte neuronal en CA1 y poDG, mientras que el tratamiento con nanodiscos rHDL-rApoJ solamente redujo la muerte neuronal en poDG. En base a esto resultados, refiriéndonos al efecto de la lipidación sobre la funcionalidad de ApoJ, no observamos diferencias significativas entre ambos tratamientos en términos de reducción de la carga de A β . Sin embargo, en los parámetros testados, el tratamiento con rApoJ libre mostró una tendencia hacia un mayor efecto previniendo la acumulación cerebral de A β . Sin embargo, teniendo en cuenta que en el SNC los astrocitos secretan ApoJ en forma de lipoproteína²¹³, el rol de la lipidación de ApoJ en el parénquima cerebral debería ser estudiado más en profundidad. En base a los resultados obtenidos, tanto ApoJ libre como los nanodiscos rHDL-rApoJ fueron capaces de prevenir la acumulación cerebrovascular de A β , mientras que ApoJ mostró mayor eficacia previniendo la acumulación de A β insoluble total, así como la capacidad de prevenir la muerte neuronal en CA1. Esto parece indicar que la modificación estructural que ocurre en ApoJ debido a su lipidación interfiere en la activación de los mecanismos

protectores observados. De hecho, previamente se ha descrito que la distribución de ApoJ en las lipoproteínas o en su forma libre está alterado en enfermedades como aterosclerosis²⁹¹. Por ello, el estudio de la distribución de ApoJ circulante en pacientes de EA y AAC podría esclarecer este asunto.

No obstante, hay que destacar que los nanodiscos rHDL-rApoJ sí mostraron eficacia previniendo la acumulación cerebrovascular de A β . Por ello, su valor terapéutico dirigido a pacientes con AAC debe tenerse en cuenta. Debido a que el modelo transgénico APP23 es un buen modelo para estudiar el AAC¹¹⁹, investigar la eficacia de los nanodiscos rHDL-rApoJ en ratones APP23 de avanzada edad evaluando parámetros como la prevención de microhemorragias y de la disfunción cerebrovascular podría ser de gran interés. Además, la estructura de nanodiscos posee unas características únicas que permiten su funcionalización mediante un gran abanico de estrategias²⁹². Así, nanodiscos rHDL-rApoJ unidos a diferentes agentes terapéuticos dirigidos a la β -amiloidosis cerebral, podrían funcionar como nanosportes para enviar fármacos a la vasculatura afectada con AAC, que además disfrutarían de funcionalidad propia previniendo la acumulación vascular de A β .

4.4.2- Mecanismo implicados e importancia de la respuesta inmune innata

Con el objetivo de determinar el mecanismo de acción de ApoJ mediante la prevención de la acumulación de A β , en primer lugar, se evaluaron los niveles de A β en LCR y plasma tras el tratamiento crónico intravenoso con rApoJ libre y nanodiscos rHDL-rApoJ, así como la expresión de los principales receptores involucrados en el aclaramiento de A β (LRP1 y RAGE)³³. No se observaron diferencias en la expresión de dichos receptores ni en los niveles plasmáticos de A β , aunque sí se observó un aumento en los niveles de A β_{40} en LCR. Está descrita una reducción de los niveles de A β en LCR en enfermos de EA⁸⁷ y AAC⁶¹, así como en el modelo experimental APP23¹¹⁵, aunque los mecanismos que explicarían esta reducción no son completamente comprendidos²⁹³. Sin embargo, tras la inmunización pasiva con varios anticuerpos testados en ensayos clínicos de EA, se

observó un aumento de A β en LCR²⁹⁴, lo que parece estar relacionado con la capacidad del fármaco de movilizar el A β cerebral. En nuestro estudio, una vez más, solamente la administración de rApoJ libre fue capaz de inducir una alteración de los niveles A β en LCR, lo que refuerza la idea de que los nanodiscos rHDL-rApoJ no son capaces de activar las mismas vías que rApoJ libre.

Por otro lado, cuando se estudió el estado neuroinflamatorio tras los tratamientos en ratones APP23, no se observó un aumento en la activación astrocitaria. En cambio obtuvimos un incremento en la expresión del marcador lisosomal CD68 en aquellos ratones tratados con ApoJ libre. La expresión de CD68, el cual se ha utilizado para marcar microglía fagocítica²⁹⁵, se observó en la periferia de las placas neuríticas. Así, nuestros resultados propondrían que el tratamiento con ApoJ libre estaría promoviendo la fagocitosis de A β en células microgliales. Este mecanismo podría explicar la inferior acumulación cerebral de A β que se observó tras el tratamiento con rApoJ libre. De hecho, el rol de la microglía como vía de eliminación del péptido A β se ha documentado extensamente en anterioridad¹⁵. La estimulación de las rutas fagocíticas en microglía han demostrado eficacia previniendo la acumulación cerebral de A β en distintos modelos animales^{296–298} y se ha propuesto que la eficacia observada tras la inmunización pasiva en modelos experimentales de β -amiloidosis cerebral podría estar mediada por un aumento de la fagocitosis microglial²⁹⁹.

En nuestro modelo experimental se estudió también la expresión del receptor TREM2 en los diferentes grupos de tratamiento. En nuestros experimentos, observamos un aumento en la expresión cerebral de TREM2 en aquellos ratones APP23 tratados con rApoJ libre. Los niveles de TREM2 correlacionaron con la expresión de CD68, proponiendo que ambos marcadores estarían implicados en mecanismos relacionados. De hecho, se ha observado que ratones deficientes para *Trem2* presentaron un agravamiento de la β -amiloidosis cerebral afectando a la capacidad fagocítica³⁰⁰. Además, se ha propuesto que TREM2 puede interactuar con complejos ApoJ:A β y favorecer su internalización en células microgliales para su degradación¹⁴.

Por otra parte, es importante mencionar que en condiciones asociadas a EA se ha observado infiltración de monocitos³⁰¹ que muestran una elevada capacidad fagocítica²⁵. De hecho, este fenómeno se ha interpretado como un mecanismo protector, ya que la prevención de la infiltración de monocitos en el modelo transgénico APP/PS1 resultó en una aceleración de la acumulación de A β ²², mientras que promover la infiltración de monocitos en el mismo modelo transgénico condujo a una prevención de la carga de A β ³⁰². De hecho, en humanos se ha propuesto que TREM2 no se expresaría en microglía, sino que sólo lo haría en el sistema inmune innato periférico, por lo que TREM2 sería un marcador de infiltración de monocitos³⁰³. No obstante, los monocitos infiltrados se diferencian rápidamente para adoptar el fenotipo de microglía³⁰⁴. Por ello, no se puede descartar el origen periférico de las células que muestran una incrementada capacidad fagocítica tras el tratamiento con rApoJ libre.

Este cúmulo de evidencias, sustentaría la idea de que la estimulación de la respuesta inmune frente a la β -amiloidosis cerebral es protectora. Sin embargo, el rol de la respuesta inmune innata en general y el de la microglía en particular, no parece tan simple. Así, la infiltración de células inmunes periféricas se ha relacionado con exacerbamiento de la neuroinflamación conduciendo a graves consecuencias²⁴. Además, ratones APP/PS1 deficientes para *Nlrp3* (relacionada con activación del inflamósoma en microglía) mostraron menor acumulación β -amiloide³⁰⁵ y la eliminación de la microglía en el modelo transgénico 5xFAD resultó en una protección frente a la muerte neuronal³⁰⁶.

Por ello, en nuestro modelo, se evaluó el estado neuroinflamatorio general para determinar si la activación de rutas fagocíticas iba acompañada de una mayor liberación de moléculas inflamatorias al parénquima cerebral. Así, tras los tratamientos crónicos con rApoJ libre o nanodiscos rHDL-rApoJ, no solo no observamos un aumento generalizado de la neuroinflamación, sino que se observó una disminución en IL17 y KC tanto en los animales tratados con rApoJ libre como con nanodiscos, además de una disminución en los niveles de MIP-1 α en los animales tratados con nanodiscos rHDL-rApoJ. Esta mitigación del estado inflamatorio, así como la prevención de la acumulación de A β y la muerte neuronal,

proponen que rApoJ es capaz de promover un estado de activación microglial en el que se estimula la fagocitosis de forma específica. De hecho, la importancia de la respuesta inmune innata en relación a la EA ha irrumpido con fuerza en el escenario de la β -amiloidosis cerebral³⁰⁷. En este contexto y bajo los resultados obtenidos, ApoJ se presenta como un candidato prometedor para la modulación de la microglía hacia un fenotipo protector frente a la β -amiloidosis cerebral.

Finalmente, no se detectó rApoJ en cerebro, por lo que difícilmente estos resultados pueden ser explicados mediante actuación *in situ* de rApoJ. En este contexto, un gran número de estudios evidencian el hecho de que la periferia tiene un efecto tangible sobre la homeostasis cerebral³⁰⁸. Así, se ha demostrado que la inflamación periférica crónica tanto en modelos animales como en humanos se asocia con un mayor depósito β -amiloide^{309,310}. De la misma manera, algunas enfermedades identificadas como factor de riesgo para padecer EA como aterosclerosis presentan también signos de inflamación crónica³¹¹. Los mecanismos que conectan estos eventos patológicos son prácticamente desconocidos, aunque algunos estudios en modelos experimentales proponen que estímulos que provoquen una hiperreactividad de la respuesta inmune periférica pueden tener un impacto tangible sobre el estado inflamatorio cerebral contribuyendo a la patología³¹⁰. En este contexto, pensamos que las propiedades de rApoJ modulando la respuesta inmune que se han observado previamente en periferia³¹² pueden tener un impacto sobre los mecanismos involucrados en el aclaramiento de $A\beta$ de cerebro, especialmente aquellos que afectan a la digestión intracelular del péptido $A\beta$. Por ello, explorar los cambios periféricos que pueden conducir a una mayor capacidad fagocítica del péptido $A\beta$ podría ayudar a dilucidar los mecanismos concretos que dirigen la protección observada tras la administración intravenosa de rApoJ.

4.5- Perspectiva general del potencial terapéutico de ApoJ y ApoA-I-M dirigido a la β -amiloidosis cerebral

4.5.1- Perspectiva general del rol de ApoA-I y ApoJ en la β -amiloidosis

En base a los resultados presentados en esta Tesis Doctoral, tanto rApoA-I-M como rApoJ fueron capaces de prevenir la acumulación cerebral de A β en el modelo experimental APP23, así como disminuir la neuroinflamación. Sin embargo, aunque ambos tratamientos estimularon vías de aclaramiento de A β , el mecanismo de acción no parece ser compartido. Por un lado rApoA-I-M favoreció el aclaramiento del péptido A β a través de la BHE, mientras que el tratamiento con rApoJ provocó una estimulación de las vías fagocíticas en células microgliales (Figura 9). Pese a que ambos tratamientos no son comparables entre sí por la diferencia de dosis administrada (2 mg/kg vs 1 mg/kg), el número de dosis (18 dosis vs 8 dosis) y la edad de la cohorte de ratones APP23 utilizada (16 meses vs 14 meses), parece que ambos tratamientos son capaces de conducir a una prevención de la acumulación del péptido A β desde la periferia. Debido a que la protección observada para ambos tratamientos parece estar mediado a través de mecanismos distintos, estudiar los efectos de la administración conjunta de rApoA-I-M y rApoJ en el modelo experimental APP23, podría ser una estrategia interesante que permitiría evaluar el posible efecto sinérgico en términos de carga de A β , neuroinflamación, neuroprotección y prevención del déficit cognitivo.

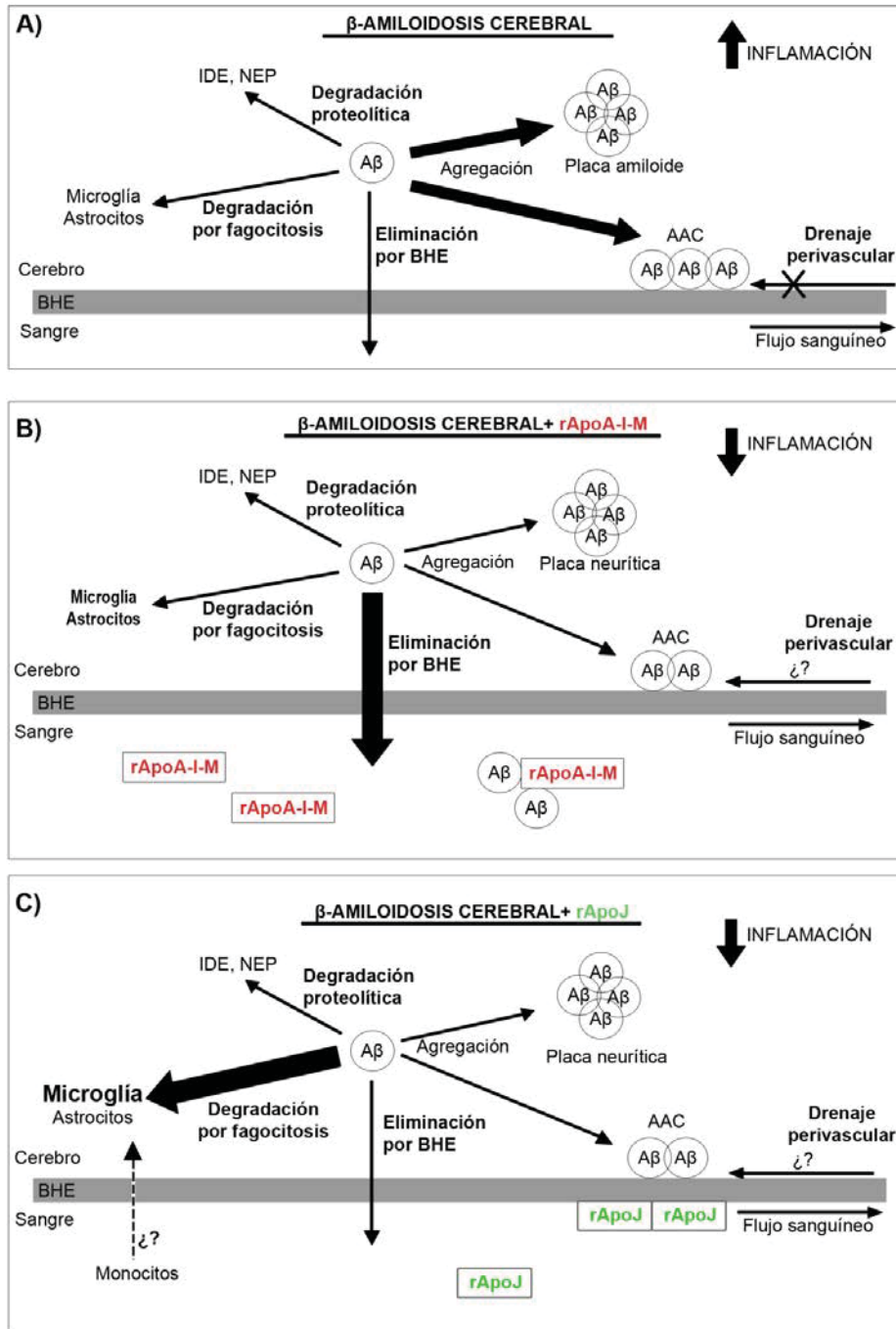


Figura 9: Esquema de los mecanismos de eliminación de A β propuestos en función del tratamiento intravenoso de rApoA-I-M o rApoJ en ratones APP23. A) Equilibrio de las vías de eliminación en condiciones patológicas de β -amiloidosis cerebral. B) Equilibrio de las vías de eliminación tras la administración IV crónica de rApoA-I-M. C) Equilibrio de los mecanismos tras la administración IV crónica de rApoJ. El grosor de las flechas indica qué mecanismo estaría estimulado.

4.5.2- Perspectivas futuras

Finalmente, todos los experimentos *in vivo* presentados en esta tesis doctoral se han realizado en el modelo murino de β -amiloidosis cerebral APP23 (*PPA* sueca *KM670/671NL*). Este modelo, a parte de una acumulación progresiva de $A\beta$ en el parénquima cerebral, también presenta una importante afección de la vasculatura cerebral con AAC, lo que nos permite estudiar de forma parcial ambas patologías¹¹⁶. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, resultados previos evaluando el impacto de ApoE y ApoJ sobre la β -amiloidosis cerebral han mostrado resultados diferentes en función del modelo animal utilizado. Así, ratones PDAPP deficientes para el gen *Clu* presentaron una disminución del $A\beta$ fibrilar sin afectar a la carga de $A\beta$ total²³². Sin embargo, la deficiencia de *Clu* en el modelo APP/PS1 provocó una disminución en el $A\beta$ total muy significativo, con ausencia casi total de depósitos parenquimales y un importante exacerbamiento del AAC²³⁴. El impacto de la deficiencia del gen *ApoE* también parece depender fuertemente del origen genético del animal. Así, mientras que la ausencia del gen *ApoE* en los modelos PDAPP ó Tg2576 provocó una disminución casi total de placas amiloides³¹³, su eliminación en el modelo APP/PS1 resultó en un aumento de los depósitos inmunopositivos para $A\beta$ ³¹⁴. Por otra parte, la progresiva y moderadamente lenta acumulación de $A\beta$ que presenta el modelo transgénico APP23, permite estudiar los mecanismos patológicos en diferentes estadios de la enfermedad. Sin embargo, este modelo también presenta algunas desventajas que impiden estudiar las características de EA/AAC en su totalidad.

En este sentido, el modelo transgénico APP23 no presenta una muerte neuronal abundante, pérdida sináptica, cambios en la plasticidad neuronal ni ovillos neurofibrilares, aunque sí presenta hiperfosforilación de TAU asociado a placas neuríticas^{114,315} (www.alzforum.org). Además, aunque previamente se han descrito déficit cognitivos espaciales y ejecutivos en el modelo de ratón APP23^{121,316}, otros modelos animales transgénicos como 3xTg-AD, APP/PS1 o 5xFAD entre otros, permitirían estudiar el efecto sobre déficits cognitivos a edades más tempranas; así como sobre los depósitos de TAU hiperfosforilado, muerte neuronal y pérdida

sináptica. De hecho, consideramos que investigar el efecto de dichos tratamientos sobre la neurodegeneración y el estado cognitivo en modelos transgénicos de β -amiloidosis cerebral es indispensable para seguir proponiendo su potencial uso terapéutico. Por ello, con el objetivo de aportar consistencia a los resultados presentados en esta Tesis Doctoral, los resultados deberían ser replicados en otros modelos experimentales.

Finalmente, la evaluación de la eficacia de rApoA-I, rApoJ y sus modificaciones estructurales en diferentes etapas de la enfermedad podría aportar información sobre la ventana temporal en la que el incremento circulante de rApoA-I-M o rApoJ podría tener un mayor impacto terapéutico.

5- CONCLUSIONES

Las principales conclusiones de esta Tesis Doctoral son las siguientes:

- 1- El proceso de producción de rApoA-I-wt, rApoA-I-M y rApoJ en la línea celular humana HEK293T y su posterior purificación, da lugar a proteínas recombinantes funcionales y de elevada pureza.

- 2- La administración crónica intravenosa de rApoA-I-M en el modelo experimental de β -amiloidosis cerebral APP23 mostró eficacia en términos de prevención de la acumulación parenquimal y cerebrovascular de $A\beta$, promoviendo su aclaramiento cerebral, además de disminuir la neuroinflamación. Estos resultados proponen el potencial de rApoA-I-M como estrategia terapéutica para la β -amiloidosis cerebral.

- 3- El método de formación basado en la estrategia *diálisis con colato* permite la preparación de nanodiscos rHDL-rApoJ de forma reproducible. La formulación de rApoJ en nanodiscos rHDL-rApoJ mejora su capacidad de promover el eflujo de colesterol y conserva sus propiedades de chaperona. Además, los nanodiscos rHDL-rApoJ mostraron capacidad de acumularse en la cerebrovasculatura afectada con AAC en ratones APP23.

- 4- Tras la administración crónica periférica de rApoJ libre o nanodiscos rHDL-rApoJ en el modelo experimental APP23, se observó que ambos tratamientos prevenían la acumulación de $A\beta$ en vasos cerebrales. En cambio, el tratamiento con rApoJ libre era más eficaz previniendo la acumulación total de $A\beta$ insoluble cerebral y la muerte neuronal en hipocampo que la administración de nanodiscos rHDL-rApoJ. Nuestros resultados sugieren que parte de los efectos beneficiosos del tratamiento con rApoJ libre vendrían dados por su capacidad de promover la activación de mecanismos fagocíticos en la microglía. Por todo ello, se propone el potencial de rApoJ como estrategia terapéutica para la β -amiloidosis cerebral.

6- BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Thathiah A, De Strooper B. The role of G protein-coupled receptors in the pathology of Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* 2011;12(2):73-87. doi:10.1038/nrn2977
2. Zhang Y, Thompson R, Zhang H, Xu H. APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain.* 2011;4:3. doi:10.1186/1756-6606-4-3
3. Caillé I, Allinquant B, Dupont E, et al. Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. *Development.* 2004;131(9):2173-2181. doi:10.1242/dev.01103
4. Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, et al. Decreased clearance of CNS A β -amyloid in Alzheimer's disease. *Science (80-).* 2010;330(6012):1774. doi:10.1126/science.1197623
5. Jha NK, Jha SK, Kumar D, et al. Impact of Insulin Degrading Enzyme and Neprilysin in Alzheimer's Disease Biology: Characterization of Putative Cognates for Therapeutic Applications. *J Alzheimer's Dis.* 2015;48(4):891-917. doi:10.3233/JAD-150379
6. Wang S, Wang R, Chen L, Bennett DA, Dickson DW, Wang D-S. Expression and functional profiling of neprilysin, insulin-degrading enzyme, and endothelin-converting enzyme in prospectively studied elderly and Alzheimer's brain. *J Neurochem.* 2010;115(1):47-57. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06899.x
7. Hernandez-Guillamon M, Mawhirt S, Blais S, et al. Sequential Amyloid- β Degradation by the Matrix Metalloproteases MMP-2 and MMP-9. *J Biol Chem.* 2015;290(24):15078-15091. doi:10.1074/jbc.M114.610931
8. Charidimou A, Gang Q, Werring DJ. Sporadic cerebral amyloid angiopathy revisited: recent insights into pathophysiology and clinical spectrum. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2012;83(2):124-137. doi:10.1136/jnnp-2011-301308
9. Yang C-N, Shiao Y-J, Shie F-S, et al. Mechanism mediating oligomeric A β clearance by naïve primary microglia. *Neurobiol Dis.* 2011;42(3):221-230. doi:10.1016/j.nbd.2011.01.005
10. Jones RS, Minogue AM, Connor TJ, Lynch MA. Amyloid- β -Induced Astrocytic Phagocytosis is Mediated by CD36, CD47 and RAGE. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2013;8(1):301-311. doi:10.1007/s11481-012-9427-3
11. Kanekiyo T, Xu H, Bu G. ApoE and A β in Alzheimer's Disease: Accidental Encounters or Partners? *Neuron.* 2014;81(4):740-754. doi:10.1016/j.neuron.2014.01.045
12. Liu Y, Walter S, Stagi M, et al. LPS receptor (CD14): a receptor for phagocytosis of Alzheimer's amyloid peptide. *Brain.* 2005;128(8):1778-1789. doi:10.1093/brain/awh531
13. Zlokovic B V, Martel CL, Matsubara E, et al. Glycoprotein 330/megalin: probable role in receptor-mediated transport of apolipoprotein J alone and in a complex with Alzheimer disease amyloid beta at the blood-brain and blood-

- cerebrospinal fluid barriers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(9):4229-4234. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8633046>. Accessed February 14, 2018.
14. Yeh FL, Wang Y, Tom I, Gonzalez LC, Sheng M. TREM2 Binds to Apolipoproteins, Including APOE and CLU/APOJ, and Thereby Facilitates Uptake of Amyloid-Beta by Microglia. *Neuron*. 2016;91(2):328-340. doi:10.1016/j.neuron.2016.06.015
 15. Ries M, Sastre M. Mechanisms of A β Clearance and Degradation by Glial Cells. *Front Aging Neurosci*. 2016;8:160. doi:10.3389/fnagi.2016.00160
 16. Hanisch U-K, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci*. 2007;10(11):1387-1394. doi:10.1038/nn1997
 17. Fiala M, Cribbs DH, Rosenthal M, Bernard G. Phagocytosis of amyloid-beta and inflammation: two faces of innate immunity in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2007;11(4):457-463. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17656824>.
 18. Iram T, Trudler D, Kain D, et al. Astrocytes from old Alzheimer's disease mice are impaired in A β uptake and in neuroprotection. *Neurobiol Dis*. 2016;96:84-94. doi:10.1016/j.nbd.2016.08.001
 19. Orre M, Kamphuis W, Osborn LM, et al. Isolation of glia from Alzheimer's mice reveals inflammation and dysfunction. *Neurobiol Aging*. 2014;35(12):2746-2760. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2014.06.004
 20. Shang DS, Yang YM, Zhang H, et al. Intracerebral GM-CSF contributes to transendothelial monocyte migration in APP/PS1 Alzheimer's disease mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2016;36(11):1978-1991. doi:10.1177/0271678X16660983
 21. Thériault P, ElAli A, Rivest S. The dynamics of monocytes and microglia in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*. 2015;7(1):41. doi:10.1186/s13195-015-0125-2
 22. Simard AR, Soulet D, Gowing G, Julien J-P, Rivest S. Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron*. 2006;49(4):489-502. doi:10.1016/j.neuron.2006.01.022
 23. Town T, Laouar Y, Pittenger C, et al. Blocking TGF-beta-Smad2/3 innate immune signaling mitigates Alzheimer-like pathology. *Nat Med*. 2008;14(6):681-687. doi:10.1038/nm1781
 24. Fiala M, Lin J, Ringman J, et al. Ineffective phagocytosis of amyloid-beta by macrophages of Alzheimer's disease patients. *J Alzheimers Dis*. 2005;7(3):221-32-62.
 25. Malm T, Koistinaho M, Muona A, Magga J, Koistinaho J. The role and therapeutic potential of monocytic cells in Alzheimer's disease. *Glia*. 2010;58(8):889-900. doi:10.1002/glia.20973
 26. Hawkes CA, Jayakody N, Johnston DA, Bechmann I, Carare RO. Failure of

- Perivascular Drainage of β -amyloid in Cerebral Amyloid Angiopathy. *Brain Pathol.* 2014;24(4):396-403. doi:10.1111/bpa.12159
27. Weller RO, Hawkes CA, Kalaria RN, Werring DJ, Carare RO. White Matter Changes in Dementia: Role of Impaired Drainage of Interstitial Fluid. *Brain Pathol.* 2015;25(1):63-78. doi:10.1111/bpa.12218
 28. Banerjee G, Kim HJ, Fox Z, et al. MRI-visible perivascular space location is associated with Alzheimer's disease independently of amyloid burden. *Brain.* 2017;140(4):1107-1116. doi:10.1093/brain/awx003
 29. Abbott NJ, Pizzo ME, Preston JE, Janigro D, Thorne RG. The role of brain barriers in fluid movement in the CNS: is there a "glymphatic" system? *Acta Neuropathologica.* 2018:1-21.
 30. Cecchelli R, Berezowski V, Lundquist S, et al. Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(8):650-661. doi:10.1038/nrd2368
 31. Deane R, Wu Z, Sagare A, et al. LRP/Amyloid β -Peptide Interaction Mediates Differential Brain Efflux of A β Isoforms. *Neuron.* 2004;43(3):333-344. doi:10.1016/j.neuron.2004.07.017
 32. Hammad SM, Ranganathan S, Loukinova E, Twal WO, Argraves WS. Interaction of apolipoprotein J-amyloid beta-peptide complex with low density lipoprotein receptor-related protein-2/megalin. A mechanism to prevent pathological accumulation of amyloid beta-peptide. *J Biol Chem.* 1997;272(30):18644-18649. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9228033>.
 33. Deane R, Bell RD, Sagare A, Zlokovic B V. Clearance of amyloid-beta peptide across the blood-brain barrier: implication for therapies in Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2009;8(1):16-30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19275634>. Accessed February 14, 2018.
 34. Wang W, Bodles-Brakhop AM, Barger SW. A Role for P-Glycoprotein in Clearance of Alzheimer Amyloid β -Peptide from the Brain. *Curr Alzheimer Res.* 2016;13(6):615-620. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26971931>. Accessed February 14, 2018.
 35. Wahrle SE, Jiang H, Parsadanian M, et al. Deletion of *Abca1* Increases A β Deposition in the PDAPP Transgenic Mouse Model of Alzheimer Disease. *J Biol Chem.* 2005;280(52):43236-43242. doi:10.1074/jbc.M508780200
 36. Mackic JB, Stins M, McComb JG, et al. Human blood-brain barrier receptors for Alzheimer's amyloid-beta 1- 40. Asymmetrical binding, endocytosis, and transcytosis at the apical side of brain microvascular endothelial cell monolayer. *J Clin Invest.* 1998;102(4):734-743. doi:10.1172/JCI2029
 37. Deane R, Du Yan S, Subramanian RK, et al. RAGE mediates amyloid- β peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat Med.* 2003;9(7):907-913. doi:10.1038/nm890
 38. Sagare A, Deane R, Bell RD, et al. Clearance of amyloid- β by circulating lipoprotein receptors. *Nat Med.* 2007;13(9):1029-1031. doi:10.1038/nm1635

39. DeMattos RB, Bales KR, Cummins DJ, Dodart JC, Paul SM, Holtzman DM. Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(15):8850-8855. doi:10.1073/pnas.151261398
40. Henderson SJ, Andersson C, Narwal R, et al. Sustained peripheral depletion of amyloid- β with a novel form of neprilysin does not affect central levels of amyloid- β . *Brain*. 2014;137(Pt 2):553-564. doi:10.1093/brain/awt308
41. Sinha S, Lieberburg I. Cellular mechanisms of beta -amyloid production and secretion. *Proc Natl Acad Sci*. 1999;96(20):11049-11053. doi:10.1073/pnas.96.20.11049
42. Fryer JD, Simmons K, Parsadanian M, et al. Human apolipoprotein E4 alters the amyloid-beta 40:42 ratio and promotes the formation of cerebral amyloid angiopathy in an amyloid precursor protein transgenic model. *J Neurosci*. 2005;25(11):2803-2810. doi:10.1523/JNEUROSCI.5170-04.2005
43. Thal DR, Griffin WST, de Vos RAI, Ghebremedhin E. Cerebral amyloid angiopathy and its relationship to Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 2008;115(6):599-609. doi:10.1007/s00401-008-0366-2
44. Greenberg SM. Cerebral Amyloid Angiopathy and Vessel Dysfunction. *Cerebrovasc Dis*. 2002;13(2):42-47. doi:10.1159/000049149
45. Ellis RJ, Olichney JM, Thal LJ, et al. Cerebral amyloid angiopathy in the brains of patients with Alzheimer's disease: the CERAD experience, Part XV. *Neurology*. 1996;46(6):1592-1596. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8649554>. Accessed February 11, 2018.
46. Tolppanen A-M, Lavikainen P, Solomon A, Kivipelto M, Soininen H, Hartikainen S. Incidence of stroke in people with Alzheimer disease: a national register-based approach. *Neurology*. 2013;80(4):353-358. doi:10.1212/WNL.0b013e31827f08c5
47. Wilson D, Charidimou A, Werring DJ. Advances in understanding spontaneous intracerebral hemorrhage: Insights from neuroimaging. *Expert Rev Neurother*. 2014;14(6):661-678. doi:10.1586/14737175.2014.918506
48. Keage HAD, Carare RO, Friedland RP, et al. Population studies of sporadic cerebral amyloid angiopathy and dementia: a systematic review. *BMC Neurol*. 2009;9(1):3. doi:10.1186/1471-2377-9-3
49. Revesz T, Holton JL, Lashley T, et al. Genetics and molecular pathogenesis of sporadic and hereditary cerebral amyloid angiopathies. *Acta Neuropathol*. 2009;118(1):115-130. doi:10.1007/s00401-009-0501-8
50. Neurologie SP-M fur P und, 1954 undefined. A particular type of senile angiopathy of the central nervous system: congophilic angiopathy, topography and frequency. *europemc.org*. <http://europemc.org/abstract/med/13235689>. Accessed February 11, 2018.
51. Attems J, Jellinger K, Thal DR, Van Nostrand W. Review: sporadic cerebral amyloid angiopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2011;37(1):75-93.

- doi:10.1111/j.1365-2990.2010.01137.x
52. Love S, Chalmers K, Ince P, et al. Development, appraisal, validation and implementation of a consensus protocol for the assessment of cerebral amyloid angiopathy in post-mortem brain tissue. *Am J Neurodegener Dis*. 2014;3(1):19-32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24754000>. Accessed February 11, 2018.
 53. Thal DR, Papassotiropoulos A, Saïdo TC, et al. Capillary cerebral amyloid angiopathy identifies a distinct APOE epsilon4-associated subtype of sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 2010;120(2):169-183. doi:10.1007/s00401-010-0707-9
 54. Vinters H V. Cerebral amyloid angiopathy. A critical review. *Stroke*. 18(2):311-324. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3551211>.
 55. Van Nostrand WE, Melchor JP, Romanov G, Zeigler K, Davis J. Pathogenic effects of cerebral amyloid angiopathy mutations in the amyloid beta-protein precursor. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;977:258-265. doi:10.1111/j.1749-6632.2002.tb04824.x
 56. Calderon-Garcidueñas AL, Duyckaerts C. Alzheimer disease. In: *Handbook of Clinical Neurology*. Vol 145. ; 2017:325-337. doi:10.1016/B978-0-12-802395-2.00023-7
 57. Boyle PA, Yu L, Nag S, et al. Cerebral amyloid angiopathy and cognitive outcomes in community-based older persons. *Neurology*. 2015;85(22):1930-1936. doi:10.1212/WNL.0000000000002175
 58. Banerjee G, Wilson D, Ambler G, et al. Cognitive Impairment Before Intracerebral Hemorrhage Is Associated With Cerebral Amyloid Angiopathy. *Stroke*. 2018;49(1):40-45. doi:10.1161/STROKEAHA.117.019409
 59. Arvanitakis Z, Leurgans SE, Wang Z, Wilson RS, Bennett DA, Schneider JA. Cerebral amyloid angiopathy pathology and cognitive domains in older persons. *Ann Neurol*. 2011;69(2):320-327. doi:10.1002/ana.22112
 60. Knudsen KA, Rosand J, Karluk D, Greenberg SM. Clinical diagnosis of cerebral amyloid angiopathy: Validation of the Boston Criteria. *Neurology*. 2001;56(4):537-539. doi:10.1212/WNL.56.4.537
 61. Van Etten ES, Verbeek MM, Van Der Grond J, et al. β -Amyloid in CSF: Biomarker for preclinical cerebral amyloid angiopathy. *Neurology*. 2017;88(2):169-176. doi:10.1212/WNL.0000000000003486
 62. Charidimou A, Friedrich JO, Greenberg SM, Viswanathan A. Core cerebrospinal fluid biomarker profile in cerebral amyloid angiopathy: A meta-analysis. *Neurology*. 2018;90(9):e754-e762. doi:10.1212/WNL.0000000000005030
 63. Anderson CS. Medical management of acute intracerebral hemorrhage. *Curr Opin Crit Care*. 2009;15(2):93-98. doi:10.1097/MCC.0b013e328325d12c
 64. Yamada M. Cerebral amyloid angiopathy: emerging concepts. *J stroke*. 2015;17(1):17-30. doi:10.5853/jos.2015.17.1.17
 65. Hofmeijer J, Kappelle LJ, Klijn CJM. Antithrombotic treatment and

- intracerebral haemorrhage: between Scylla and Charybdis. *Pract Neurol*. 2015;15(4):250-256. doi:10.1136/practneurol-2015-001104
66. Arima H, Anderson CS, Wang JG, et al. Lower treatment blood pressure is associated with greatest reduction in hematoma growth after acute intracerebral hemorrhage. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)*. 2010;56(5):852-858. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.154328
 67. Bales KR, O'Neill SM, Pozdnyakov N, et al. Passive immunotherapy targeting amyloid- β reduces cerebral amyloid angiopathy and improves vascular reactivity. *Brain*. 2016;139(2):563-577. doi:10.1093/brain/awv313
 68. Reitz C, Mayeux R. Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem Pharmacol*. 2014;88(4):640-651. doi:10.1016/j.bcp.2013.12.024
 69. Ott A, Slioter AJ, Hofman A, et al. Smoking and risk of dementia and Alzheimer's disease in a population-based cohort study: the Rotterdam Study. *Lancet (London, England)*. 1998;351(9119):1840-1843. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9652667>. Accessed February 11, 2018.
 70. Villarejo Galende A, Eimil Ortiz M, Llamas Velasco S, Llanero Luque M, López de Silanes de Miguel C, Prieto Jurczynska C. Informe de la Fundación del Cerebro. Impacto social de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias. *Neurología*. December 2017. doi:10.1016/j.nrl.2017.10.005
 71. Reitz C, Brayne C, Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. 2011;7(3):137-152. doi:10.1038/nrneurol.2011.2
 72. Thal DR, Rüb U, Orantes M, Braak H. Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology*. 2002;58(12):1791-1800. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12084879>. Accessed February 11, 2018.
 73. Frost GR, Li Y-M. The role of astrocytes in amyloid production and Alzheimer's disease. *Open Biol*. 2017;7(12):170228. doi:10.1098/rsob.170228
 74. Vinters H V. Emerging concepts in Alzheimer's disease. *Annu Rev Pathol*. 2015;10(1):291-319. doi:10.1146/annurev-pathol-020712-163927
 75. Reddy P, Mani G, Park B, ... JJ-J of, 2005 undefined. Differential loss of synaptic proteins in Alzheimer's disease: implications for synaptic dysfunction. *content.iospress.com*. <https://content.iospress.com/articles/journal-of-alzheimers-disease/jad00402>. Accessed February 11, 2018.
 76. Terry RD, Masliah E, Salmon DP, et al. Physical basis of cognitive alterations in alzheimer's disease: Synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol*. 1991;30(4):572-580. doi:10.1002/ana.410300410
 77. Grignon Y, Duyckaerts C, Bennechib M, Hauw J-J. Cytoarchitectonic alterations in the supramarginal gyrus of late onset Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 1998;95(4):395-406. doi:10.1007/s004010050816
 78. Jack CR, Knopman DS, Jagust WJ, et al. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol*.

- 2010;9(1):119-128. doi:10.1016/S1474-4422(09)70299-6
79. Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, et al. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* 2011;7(3):280-292. doi:10.1016/j.jalz.2011.03.003
 80. Weintraub S, Wicklund AH, Salmon DP. The Neuropsychological Profile of Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(4):a006171-a006171. doi:10.1101/cshperspect.a006171
 81. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 1991;82(4):239-259. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1759558>. Accessed February 11, 2018.
 82. Morris J, Heyman A, Mohs R, Neurology JH-, 1989 undefined. The consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CERAD): I. Clinical and neuropsychological assessment of Alzheimer's disease. doi:apa.org. <http://doi.apa.org/psycinfo/1990-08892-001>. Accessed February 11, 2018.
 83. Mirra S, Heyman A, McKeel D, Sumi S, Neurology BC-, 1991 undefined. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD) Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *AAN Enterp.* <http://www.neurology.org/content/41/4/479.short>. Accessed February 11, 2018.
 84. Hyman BT, Phelps CH, Beach TG, et al. National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2012;8(1):1-13. doi:10.1016/j.jalz.2011.10.007
 85. Montine TJ, Phelps CH, Beach TG, et al. National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease: a practical approach. *Acta Neuropathol.* 2012;123(1):1-11. doi:10.1007/s00401-011-0910-3
 86. Nordberg A. Dementia in 2014. Towards early diagnosis in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.* 2015;11(2):69-70. doi:10.1038/nrneuro.2014.257
 87. Mattsson N, Lönneborg A, Boccardi M, Blennow K, Hansson O, Geneva Task Force for the Roadmap of Alzheimer's Biomarkers. Clinical validity of cerebrospinal fluid A β 42, tau, and phospho-tau as biomarkers for Alzheimer's disease in the context of a structured 5-phase development framework. *Neurobiol Aging.* 2017;52:196-213. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2016.02.034
 88. Birks JS. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. In: Birks JS, ed. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2006. doi:10.1002/14651858.CD005593
 89. McShane R, Areosa Sastre A, Minakaran N. Memantine for dementia. *Cochrane Database Syst Rev.* April 2006. doi:10.1002/14651858.CD003154.pub5
 90. Nygaard HB. Current and Emerging Therapies for Alzheimer's Disease. *Clin*

- Ther.* 2013;35(10):1480-1489. doi:10.1016/j.clinthera.2013.09.009
91. Nakanishi M, Endo K, Hirooka K, et al. Psychosocial behaviour management programme for home-dwelling people with dementia: A cluster-randomized controlled trial. *Int J Geriatr Psychiatry.* 2018;33(3):495-503. doi:10.1002/gps.4784
 92. Cummings J, Lee G, Mortsdorf T, Ritter A, Zhong K. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2017. *Alzheimer's Dement Transl Res Clin Interv.* 2017;3(3):367-384. doi:10.1016/j.trci.2017.05.002
 93. Holmes C, Boche D, Wilkinson D, et al. Long-term effects of A β 42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet.* 2008;372(9634):216-223. doi:10.1016/S0140-6736(08)61075-2
 94. Loeffler DA. Intravenous immunoglobulin and Alzheimer's disease: what now? *J Neuroinflammation.* 2013;10(1):853. doi:10.1186/1742-2094-10-70
 95. Dodel R, Rominger A, Bartenstein P, et al. Intravenous immunoglobulin for treatment of mild-to-moderate Alzheimer's disease: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-finding trial. *Lancet Neurol.* 2013;12(3):233-243. doi:10.1016/S1474-4422(13)70014-0
 96. Coric V, van Dyck CH, Salloway S, et al. Safety and Tolerability of the γ -Secretase Inhibitor Avagacestat in a Phase 2 Study of Mild to Moderate Alzheimer Disease. *Arch Neurol.* 2012;69(11):1430. doi:10.1001/archneurol.2012.2194
 97. Tariot PN. Chronic Divalproex Sodium to Attenuate Agitation and Clinical Progression of Alzheimer Disease. *Arch Gen Psychiatry.* 2011;68(8):853. doi:10.1001/archgenpsychiatry.2011.72
 98. Bulic B, Pickhardt M, Mandelkow E. Progress and developments in tau aggregation inhibitors for Alzheimer disease. *J Med Chem.* 2013;56(11):4135-4155. doi:10.1021/jm3017317
 99. Lozano AM, Fosdick L, Chakravarty MM, et al. A Phase II Study of Fornix Deep Brain Stimulation in Mild Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis.* 2016;54(2):777-787. doi:10.3233/JAD-160017
 100. Liu Y, Lee MK, James MM, et al. Passive (Amyloid- β Immunotherapy attenuates monoaminergic axonal degeneration in the A β PP^{swe}/PS1^{dE9} mice. *J Alzheimer's Dis.* 2011;23(2):271-279. doi:10.3233/JAD-2010-101602
 101. Camboni M, Wang CM, Miranda C, et al. Active and passive immunization strategies based on the SDPM1 peptide demonstrate pre-clinical efficacy in the APP^{swe}PSEN1^{dE9} mouse model for Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 2014;62:31-43. doi:10.1016/j.nbd.2013.09.001
 102. Kastanenka K V., Bussiere T, Shakerdige N, et al. Immunotherapy with Aducanumab Restores Calcium Homeostasis in Tg2576 Mice. *J Neurosci.* 2016;36(50):12549-12558. doi:10.1523/JNEUROSCI.2080-16.2016
 103. Rinne JO, Brooks DJ, Rossor MN, et al. 11C-PiB PET assessment of change in fibrillar amyloid-beta load in patients with Alzheimer's disease treated with

- bapineuzumab: a phase 2, double-blind, placebo-controlled, ascending-dose study. *Lancet Neurol.* 2010;9(4):363-372. doi:10.1016/S1474-4422(10)70043-0
104. Vandenberghe R, Rinne JO, Boada M, et al. Bapineuzumab for mild to moderate Alzheimer's disease in two global, randomized, phase 3 trials. *Alzheimers Res Ther.* 2016;8(1):18. doi:10.1186/s13195-016-0189-7
 105. Sevigny J, Chiao P, Bussière T, et al. The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature.* 2016;537(7618):50-56. doi:10.1038/nature19323
 106. Delrieu J, Ousset PJ, Caillaud C, Vellas B. "Clinical trials in Alzheimer's disease": immunotherapy approaches. *J Neurochem.* 2012;120:186-193. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07458.x
 107. Wen MM, El-Salamouni NS, El-Refaie WM, et al. Nanotechnology-based drug delivery systems for Alzheimer's disease management: Technical, industrial, and clinical challenges. *J Control Release.* 2017;245:95-107. doi:10.1016/j.jconrel.2016.11.025
 108. DiFrancesco JC, Longoni M, Piazza F. Anti-A β Autoantibodies in Amyloid Related Imaging Abnormalities (ARIA): Candidate Biomarker for Immunotherapy in Alzheimer's Disease and Cerebral Amyloid Angiopathy. *Front Neurol.* 2015;6:207. doi:10.3389/fneur.2015.00207
 109. Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, et al. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(24):13287-13292.
 110. Jankowsky JL, Fadale DJ, Anderson J, et al. Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Hum Mol Genet.* 2004;13(2):159-170. doi:10.1093/hmg/ddh019
 111. Herzog MC, Winkler DT, Burgermeister P, et al. Abeta is targeted to the vasculature in a mouse model of hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis. *Nat Neurosci.* 2004;7(9):954-960. doi:10.1038/nn1302
 112. Davis J, Xu F, Deane R, et al. Early-onset and Robust Cerebral Microvascular Accumulation of Amyloid β -Protein in Transgenic Mice Expressing Low Levels of a Vasculotropic Dutch/Iowa Mutant Form of Amyloid β -Protein Precursor. *J Biol Chem.* 2004;279(19):20296-20306. doi:10.1074/jbc.M312946200
 113. Xu F, Grande AM, Robinson JK, et al. Early-onset subicular microvascular amyloid and neuroinflammation correlate with behavioral deficits in vasculotropic mutant amyloid β -protein precursor transgenic mice. *Neuroscience.* 2007;146(1):98-107. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.01.043
 114. Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M. Pathogenic mechanisms of Alzheimer's disease analyzed in the APP23 transgenic mouse model. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;920:134-139. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11193142>. Accessed February 14, 2018.
 115. Maia LF, Kaeser SA, Reichwald J, et al. Changes in amyloid- β and Tau in the

- cerebrospinal fluid of transgenic mice overexpressing amyloid precursor protein. *Sci Transl Med*. 2013;5(194):194re2. doi:10.1126/scitranslmed.3006446
116. Van Dam D, Vloeberghs E, Abramowski D, Staufenbiel M, De Deyn PPP. APP23 mice as a model of Alzheimer's disease: an example of a transgenic approach to modeling a CNS disorder. *CNS Spectr*. 2005;10(3):207-222. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15744222>.
 117. López-Picón FR, Snellman A, Eskola O, et al. Neuroinflammation Appears Early on PET Imaging and Then Plateaus in a Mouse Model of Alzheimer Disease. *J Nucl Med*. 2018;59(3):509-515. doi:10.2967/jnumed.117.197608
 118. Djelti F, Braudeau J, Hudry E, et al. CYP46A1 inhibition, brain cholesterol accumulation and neurodegeneration pave the way for Alzheimer's disease. *Brain*. 2015;138(Pt 8):2383-2398. doi:10.1093/brain/awv166
 119. Beckmann N, Doelemeyer A, Zurbruegg S, et al. Longitudinal noninvasive magnetic resonance imaging of brain microhemorrhages in BACE inhibitor-treated APP transgenic mice. *Neurobiol Aging*. 2016;45:50-60. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2016.05.009
 120. Winkler DT, Bondolfi L, Herzig MC, et al. Spontaneous hemorrhagic stroke in a mouse model of cerebral amyloid angiopathy. *J Neurosci*. 2001;21(5):1619-1627.
 121. Webster SJ, Bachstetter AD, Nelson PT, Schmitt FA, Van Eldik LJ. Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Front Genet*. 2014;5:88. doi:10.3389/fgene.2014.00088
 122. Naj AC, Schellenberg GD, Alzheimer's Disease Genetics Consortium (ADGC). Genomic variants, genes, and pathways of Alzheimer's disease: An overview. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet*. 2017;174(1):5-26. doi:10.1002/ajmg.b.32499
 123. Bricarello DA, Smilowitz JT, Zivkovic AM, German JB, Parikh AN. Reconstituted lipoprotein: a versatile class of biologically-inspired nanostructures. *ACS Nano*. 2011;5(1):42-57. doi:10.1021/nn103098m
 124. Otvos JD, Jeyarajah EJ, Bennett DW, Krauss RM. Development of a proton nuclear magnetic resonance spectroscopic method for determining plasma lipoprotein concentrations and subspecies distributions from a single, rapid measurement. *Clin Chem*. 1992;38(9):1632-1638. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1326420>.
 125. Krauss RM, Lindgren FT, Ray RM. Interrelationships among subgroups of serum lipoproteins in normal human subjects. *Clin Chim Acta*. 1980;104(3):275-290. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7389138>.
 126. Duong PT, Weibel GL, Lund-Katz S, Rothblat GH, Phillips MC. Characterization and properties of pre beta-HDL particles formed by ABCA1-mediated cellular lipid efflux to apoA-I. *J Lipid Res*. 2008;49(5):1006-1014. doi:10.1194/jlr.M700506-JLR200
 127. Rye K-A. Biomarkers associated with high-density lipoproteins in

- atherosclerotic kidney disease. *Clin Exp Nephrol*. 2014;18(2):247-250. doi:10.1007/s10157-013-0865-x
128. Tall AR. Plasma cholesteryl ester transfer protein and high-density lipoproteins: new insights from molecular genetic studies. *J Intern Med*. 1995;237(1):5-12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7830031>.
 129. Zhang L, Reue K, Fong LG, Young SG, Tontonoz P. Feedback regulation of cholesterol uptake by the LXR-IDOL-LDLR axis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(11):2541-2546. doi:10.1161/ATVBAHA.112.250571
 130. Brundert M, Ewert A, Heeren J, et al. Scavenger receptor class B type I mediates the selective uptake of high-density lipoprotein-associated cholesteryl ester by the liver in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(1):143-148. doi:10.1161/01.ATV.0000149381.16166.c6
 131. Musunuru K, Orho-Melander M, Caulfield MP, et al. Ion mobility analysis of lipoprotein subfractions identifies three independent axes of cardiovascular risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(11):1975-1980. doi:10.1161/ATVBAHA.109.190405
 132. Lewis GF, Rader DJ. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res*. 2005;96(12):1221-1232. doi:10.1161/01.RES.0000170946.56981.5c
 133. Vergès B. Lipid modification in type 2 diabetes: the role of LDL and HDL. *Fundam Clin Pharmacol*. 2009;23(6):681-685. doi:10.1111/j.1472-8206.2009.00739.x
 134. Dietschy JM. Central nervous system: cholesterol turnover, brain development and neurodegeneration. *Biol Chem*. 2009;390(4):287-293. doi:10.1515/BC.2009.035
 135. Saher G, Stumpf SK. Cholesterol in myelin biogenesis and hypomyelinating disorders. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1851(8):1083-1094. doi:10.1016/j.bbailip.2015.02.010
 136. Jeske DJ, Dietschy JM. Regulation of rates of cholesterol synthesis in vivo in the liver and carcass of the rat measured using [3H]water. *J Lipid Res*. 1980;21(3):364-376. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7189770>.
 137. Fioravanti J, Medina-Echeverz J, Ardaiz N, et al. The fusion protein of IFN- α and apolipoprotein A-I crosses the blood-brain barrier by a saturable transport mechanism. *J Immunol*. 2012;188(8):3988-3992. doi:10.4049/jimmunol.1101598
 138. Ladu MJ, Reardon C, Van Eldik L, et al. Lipoproteins in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;903:167-175. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10818504>.
 139. Vitali C, Wellington CL, Calabresi L. HDL and cholesterol handling in the brain. *Cardiovasc Res*. 2014;103(3):405-413. doi:10.1093/cvr/cvu148
 140. Jain S, Yoon SY, Leung L, Knoferle J, Huang Y. Cellular source-specific effects of apolipoprotein (apo) E4 on dendrite arborization and dendritic spine development. *PLoS One*. 2013;8(3):e59478.

- doi:10.1371/journal.pone.0059478
141. Liu Q, Zhang J, Zerbinatti C, et al. Lipoprotein receptor LRP1 regulates leptin signaling and energy homeostasis in the adult central nervous system. *PLoS Biol.* 2011;9(1):e1000575. doi:10.1371/journal.pbio.1000575
 142. Wang H, Eckel RH. What are lipoproteins doing in the brain? *Trends Endocrinol Metab.* 2014;25(1):8-14. doi:10.1016/j.tem.2013.10.003
 143. Proudfoot JM, Barden AE, Loke WM, Croft KD, Puddey IB, Mori TA. HDL is the major lipoprotein carrier of plasma F2-isoprostanes. *J Lipid Res.* 2009;50(4):716-722. doi:10.1194/jlr.M800607-JLR200
 144. Seetharam D, Mineo C, Gormley AK, et al. High-density lipoprotein promotes endothelial cell migration and reendothelialization via scavenger receptor-B type I. *Circ Res.* 2006;98(1):63-72. doi:10.1161/01.RES.0000199272.59432.5b
 145. Nofer JR, Levkau B, Wolinska I, et al. Suppression of endothelial cell apoptosis by high density lipoproteins (HDL) and HDL-associated lysosphingolipids. *J Biol Chem.* 2001;276(37):34480-34485. doi:10.1074/jbc.M103782200
 146. Nam KN, Mounier A, Wolfe CM, et al. Effect of high fat diet on phenotype, brain transcriptome and lipidome in Alzheimer's model mice. *Sci Rep.* 2017;7(1):4307. doi:10.1038/s41598-017-04412-2
 147. Fitz NF, Cronican A, Pham T, et al. Liver X receptor agonist treatment ameliorates amyloid pathology and memory deficits caused by high-fat diet in APP23 mice. *J Neurosci.* 2010;30(20):6862-6872. doi:10.1523/JNEUROSCI.1051-10.2010
 148. Koldamova R, Staufenbiel M, Lefterov I. Lack of ABCA1 considerably decreases brain ApoE level and increases amyloid deposition in APP23 mice. *J Biol Chem.* 2005;280(52):43224-43235. doi:10.1074/jbc.M504513200
 149. Wahrle SE, Jiang H, Parsadanian M, et al. Overexpression of ABCA1 reduces amyloid deposition in the PDAPP mouse model of Alzheimer disease. *J Clin Invest.* 2008;118(2):671-682. doi:10.1172/JCI33622
 150. Sakae N, Liu C-C, Shinohara M, et al. ABCA7 Deficiency Accelerates Amyloid- β Generation and Alzheimer's Neuronal Pathology. *J Neurosci.* 2016;36(13):3848-3859. doi:10.1523/JNEUROSCI.3757-15.2016
 151. Rasmussen KL, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG, Frikke-Schmidt R. Plasma levels of apolipoprotein E and risk of dementia in the general population. *Ann Neurol.* 2015;77(2):301-311. doi:10.1002/ana.24326
 152. Reitz C, Tang M-X, Schupf N, Manly JJ, Mayeux R, Luchsinger JA. Association of higher levels of high-density lipoprotein cholesterol in elderly individuals and lower risk of late-onset Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2010;67(12):1491-1497. doi:10.1001/archneurol.2010.297
 153. Reed B, Villeneuve S, Mack W, DeCarli C, Chui HC, Jagust W. Associations between serum cholesterol levels and cerebral amyloidosis. *JAMA Neurol.* 2014;71(2):195-200. doi:10.1001/jamaneurol.2013.5390

154. Gardener H, Caunca MR, Dong C, et al. Ultrasound Markers of Carotid Atherosclerosis and Cognition: The Northern Manhattan Study. *Stroke*. 2017;48(7):1855-1861. doi:10.1161/STROKEAHA.117.016921
155. Gabin JM, Tambs K, Saltvedt I, Sund E, Holmen J. Association between blood pressure and Alzheimer disease measured up to 27 years prior to diagnosis: the HUNT Study. *Alzheimers Res Ther*. 2017;9(1):37. doi:10.1186/s13195-017-0262-x
156. Vagelatos NT, Eslick GD. Type 2 diabetes as a risk factor for Alzheimer's disease: the confounders, interactions, and neuropathology associated with this relationship. *Epidemiol Rev*. 2013;35:152-160. doi:10.1093/epirev/mxs012
157. Kim J, Basak JM, Holtzman DM. The Role of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease. *Neuron*. 2009;63(3):287-303. doi:10.1016/j.neuron.2009.06.026
158. Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, et al. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(5):1977-1981. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8446617>.
159. Falcone GJ, Radmanesh F, Brouwers HB, et al. APOE ε variants increase risk of warfarin-related intracerebral hemorrhage. *Neurology*. 2014;83(13):1139-1146. doi:10.1212/WNL.0000000000000816
160. Charidimou A, Martinez-Ramirez S, Shoamanesh A, et al. Cerebral amyloid angiopathy with and without hemorrhage: evidence for different disease phenotypes. *Neurology*. 2015;84(12):1206-1212. doi:10.1212/WNL.0000000000001398
161. Wisniewski T, Frangione B. Apolipoprotein E: a pathological chaperone protein in patients with cerebral and systemic amyloid. *Neurosci Lett*. 1992;135(2):235-238. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1625800>.
162. Alonzo NC, Hyman BT, Rebeck GW, Greenberg SM. Progression of cerebral amyloid angiopathy: accumulation of amyloid-beta40 in affected vessels. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1998;57(4):353-359. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9600229>.
163. Arold S, Sullivan P, Bilousova T, et al. Apolipoprotein E level and cholesterol are associated with reduced synaptic amyloid beta in Alzheimer's disease and apoE TR mouse cortex. *Acta Neuropathol*. 2012;123(1):39-52. doi:10.1007/s00401-011-0892-1
164. Irizarry MC, Cheung BS, Rebeck GW, Paul SM, Bales KR, Hyman BT. Apolipoprotein E affects the amount, form, and anatomical distribution of amyloid beta-peptide deposition in homozygous APP(V717F) transgenic mice. *Acta Neuropathol*. 2000;100(5):451-458. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11045665>.
165. DeMattos RB, Cirrito JR, Parsadanian M, et al. ApoE and clusterin cooperatively suppress Abeta levels and deposition: evidence that ApoE regulates extracellular Abeta metabolism in vivo. *Neuron*. 2004;41(2):193-202. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14741101>.

166. Castellano JM, Kim J, Stewart FR, et al. Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid- β peptide clearance. *Sci Transl Med.* 2011;3(89):89ra57. doi:10.1126/scitranslmed.3002156
167. Verghese PB, Castellano JM, Garai K, et al. ApoE influences amyloid- β ($A\beta$) clearance despite minimal apoE/ $A\beta$ association in physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(19):E1807-16. doi:10.1073/pnas.1220484110
168. Bales KR, Verina T, Dodel RC, et al. Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid β -peptide deposition. *Nat Genet.* 1997;17(3):263-264. doi:10.1038/ng1197-263
169. Holtzman DM, Bales KR, Wu S, et al. Expression of human apolipoprotein E reduces amyloid- β deposition in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Clin Invest.* 1999;103(6). doi:10.1172/JCI6179
170. Schaefer EJ, Zech LA, Jenkins LL, et al. Human apolipoprotein A-I and A-II metabolism. *J Lipid Res.* 1982;23(6):850-862. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6813411>.
171. Ren K, Lu Y-J, Mo Z-C, et al. ApoA-I/SR-BI modulates S1P/S1PR2-mediated inflammation through the PI3K/Akt signaling pathway in HUVECs. *J Physiol Biochem.* 2017;73(2):287-296. doi:10.1007/s13105-017-0553-5
172. Daniil G, Phedonos AAP, Holleboom AG, et al. Characterization of antioxidant/anti-inflammatory properties and apoA-I-containing subpopulations of HDL from family subjects with monogenic low HDL disorders. *Clin Chim Acta.* 2011;412(13-14):1213-1220. doi:10.1016/j.cca.2011.03.011
173. Vollbach H, Heun R, Morris CM, et al. APOA1 polymorphism influences risk for early-onset nonfamiliar AD. *Ann Neurol.* 2005;58(3):436-441. doi:10.1002/ana.20593
174. Helbecque N, Codron V, Cotel D, Amouyel P. An apolipoprotein A-I gene promoter polymorphism associated with cognitive decline, but not with Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2008;25(2):97-102. doi:10.1159/000112176
175. Harr SD, Uint L, Hollister R, Hyman BT, Mendez AJ. Brain expression of apolipoproteins E, J, and A-I in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 1996;66(6):2429-2435. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8632166>.
176. Merched A, Xia Y, Visvikis S, Serot JM, Siest G. Decreased high-density lipoprotein cholesterol and serum apolipoprotein AI concentrations are highly correlated with the severity of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 21(1):27-30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10794845>.
177. Kitamura Y, Usami R, Ichihara S, et al. Plasma protein profiling for potential biomarkers in the early diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurol Res.* 2017;39(3):231-238. doi:10.1080/01616412.2017.1281195
178. Raygani AV, Rahimi Z, Kharazi H, Tavilani H, Pourmotabbed T. Association

- between apolipoprotein E polymorphism and serum lipid and apolipoprotein levels with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2006;408(1):68-72. doi:10.1016/j.neulet.2006.08.048
179. Slot RER, Van Harten AC, Kester MI, et al. Apolipoprotein A1 in Cerebrospinal Fluid and Plasma and Progression to Alzheimer's Disease in Non-Demented Elderly. *J Alzheimers Dis*. 2017;56(2):687-697. doi:10.3233/JAD-151068
 180. Montañola A, de Retana SF, López-Rueda A, et al. ApoA1, ApoJ and ApoE Plasma Levels and Genotype Frequencies in Cerebral Amyloid Angiopathy. *Neuromolecular Med*. 2016;18(1):99-108. doi:10.1007/s12017-015-8381-7
 181. Koldamova RP, Lefterov IM, Lefterova MI, Lazo JS. Apolipoprotein A-I directly interacts with amyloid precursor protein and inhibits A beta aggregation and toxicity. *Biochemistry*. 2001;40(12):3553-3560. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11297421>.
 182. Paula-Lima AC, Triccerri MA, Brito-Moreira J, et al. Human apolipoprotein A-I binds amyloid-beta and prevents Abeta-induced neurotoxicity. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41(6):1361-1370. doi:10.1016/j.biocel.2008.12.003
 183. Fagan AM, Christopher E, Taylor JW, et al. ApoAI deficiency results in marked reductions in plasma cholesterol but no alterations in amyloid-beta pathology in a mouse model of Alzheimer's disease-like cerebral amyloidosis. *Am J Pathol*. 2004;165(4):1413-1422. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15466405>.
 184. Handattu SP, Garber DW, Monroe CE, et al. Oral apolipoprotein A-I mimetic peptide improves cognitive function and reduces amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*. 2009;34(3):525-534. doi:10.1016/j.nbd.2009.03.007
 185. Lefterov I, Fitz NF, Cronican AA, et al. Apolipoprotein A-I deficiency increases cerebral amyloid angiopathy and cognitive deficits in APP/PS1DeltaE9 mice. *J Biol Chem*. 2010;285(47):36945-36957. doi:10.1074/jbc.M110.127738
 186. Lewis TL, Cao D, Lu H, et al. Overexpression of human apolipoprotein A-I preserves cognitive function and attenuates neuroinflammation and cerebral amyloid angiopathy in a mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem*. 2010;285(47):36958-36968. doi:10.1074/jbc.M110.127829
 187. Franceschini G, Sirtori CR, Capurso A, Weisgraber KH, Mahley RW. A-IMilano apoprotein. Decreased high density lipoprotein cholesterol levels with significant lipoprotein modifications and without clinical atherosclerosis in an Italian family. *J Clin Invest*. 1980;66(5):892-900. doi:10.1172/JCI109956
 188. Weisgraber KH, Rall SC, Bersot TP, Mahley RW, Franceschini G, Sirtori CR. Apolipoprotein A-IMilano. Detection of normal A-I in affected subjects and evidence for a cysteine for arginine substitution in the variant A-I. *J Biol Chem*. 1983;258(4):2508-2513. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6401735>.
 189. Sirtori CR, Calabresi L, Franceschini G, et al. Cardiovascular status of carriers of the apolipoprotein A-I(Milano) mutant: the Limone sul Garda study.

- Circulation*. 2001;103(15):1949-1954.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11306522>.
190. Shah PK, Nilsson J, Kaul S, et al. Effects of recombinant apolipoprotein A-I(Milano) on aortic atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 1998;97(8):780-785.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9498542>.
 191. Ibanez B, Vilahur G, Cimmino G, et al. Rapid change in plaque size, composition, and molecular footprint after recombinant apolipoprotein A-I Milano (ETC-216) administration: magnetic resonance imaging study in an experimental model of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51(11):1104-1109. doi:10.1016/j.jacc.2007.09.071
 192. Ibanez B, Giannarelli C, Cimmino G, et al. Recombinant HDL(Milano) exerts greater anti-inflammatory and plaque stabilizing properties than HDL(wild-type). *Atherosclerosis*. 2012;220(1):72-77.
doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.10.006
 193. Speidl WS, Cimmino G, Ibanez B, et al. Recombinant apolipoprotein A-I Milano rapidly reverses aortic valve stenosis and decreases leaflet inflammation in an experimental rabbit model. *Eur Heart J*. 2010;31(16):2049-2057. doi:10.1093/eurheartj/ehq064
 194. Kaul S, Coin B, Hedayiti A, et al. Rapid reversal of endothelial dysfunction in hypercholesterolemic apolipoprotein E-null mice by recombinant apolipoprotein A-I(Milano)-phospholipid complex. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44(6):1311-1319. doi:10.1016/j.jacc.2004.06.028
 195. Bielicki JK, Oda MN. Apolipoprotein A-I(Milano) and apolipoprotein A-I(Paris) exhibit an antioxidant activity distinct from that of wild-type apolipoprotein A-I. *Biochemistry*. 2002;41(6):2089-2096.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11827556>.
 196. Giudice R Del, Nilsson O, Domingo-Espín J, Lagerstedt JO. Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy reveals structural divergences in HDL-bound apoA-I variants. *Sci Rep*. 2017;7(1):13540. doi:10.1038/s41598-017-13878-z
 197. Calabresi L, Canavesi M, Bernini F, Franceschini G. Cell cholesterol efflux to reconstituted high-density lipoproteins containing the apolipoprotein A-IMilano dimer. *Biochemistry*. 1999;38(49):16307-16314.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10587455>.
 198. Alexander ET, Weibel GL, Joshi MR, et al. Macrophage reverse cholesterol transport in mice expressing ApoA-I Milano. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(10):1496-1501. doi:10.1161/ATVBAHA.109.191379
 199. Wang WQ, Moses AS, Francis GA. Cholesterol mobilization by free and lipid-bound apoAI(Milano) and apoAI(Milano)-apoAII heterodimers. *Biochemistry*. 2001;40(12):3666-3673.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11297434>.
 200. Lindahl M, Petrlova J, Dalla-Riva J, et al. ApoA-I Milano stimulates lipolysis in adipose cells independently of cAMP/PKA activation. *J Lipid Res*.

- 2015;56(12):2248-2259. doi:10.1194/jlr.M054767
201. Alexander ET, Tanaka M, Kono M, Saito H, Rader DJ, Phillips MC. Structural and functional consequences of the Milano mutation (R173C) in human apolipoprotein A-I. *J Lipid Res.* 2009;50(7):1409-1419. doi:10.1194/jlr.M800578-JLR200
 202. Gursky O, Jones MK, Mei X, Segrest JP, Atkinson D. Structural basis for distinct functions of the naturally occurring Cys mutants of human apolipoprotein A-I. *J Lipid Res.* 2013;54(12):3244-3257. doi:10.1194/jlr.R037911
 203. Favari E, Gomaschi M, Zanotti I, et al. A unique protease-sensitive high density lipoprotein particle containing the apolipoprotein A-I(Milano) dimer effectively promotes ATP-binding Cassette A1-mediated cell cholesterol efflux. *J Biol Chem.* 2007;282(8):5125-5132. doi:10.1074/jbc.M609336200
 204. Andrews J, Jansan A, Nguyen T, et al. Effect of serial infusions of reconstituted high-density lipoprotein (CER-001) on coronary atherosclerosis: rationale and design of the CARAT study. *Cardiovasc Diagn Ther.* 2017;7(1):45-51. doi:10.21037/cdt.2017.01.01
 205. Michael Gibson C, Korjian S, Tricoci P, et al. Safety and Tolerability of CSL112, a Reconstituted, Infusible, Plasma-Derived Apolipoprotein A-I, After Acute Myocardial Infarction: The AEGIS-I Trial (ApoA-I Event Reducing in Ischemic Syndromes I). *Circulation.* 2016;134(24):1918-1930. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.116.025687
 206. Tricoci P, D'Andrea DM, Gurbel PA, et al. Infusion of Reconstituted High-Density Lipoprotein, CSL112, in Patients With Atherosclerosis: Safety and Pharmacokinetic Results From a Phase 2a Randomized Clinical Trial. *J Am Heart Assoc.* 2015;4(8):e002171. doi:10.1161/JAHA.115.002171
 207. Kempen HJ, Gomaschi M, Simonelli S, et al. Persistent changes in lipoprotein lipids after a single infusion of ascending doses of MDCO-216 (apoA-1Milano/POPC) in healthy volunteers and stable coronary artery disease patients. *Atherosclerosis.* 2016;255:17-24. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.10.042
 208. Nissen SE, Tsunoda T, Tuzcu EM, et al. Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2003;290(17):2292-2300. doi:10.1001/jama.290.17.2292
 209. Kallend DG, Reijers JAA, Bellibas SE, et al. A single infusion of MDCO-216 (ApoA-1 Milano/POPC) increases ABCA1-mediated cholesterol efflux and pre-beta 1 HDL in healthy volunteers and patients with stable coronary artery disease. *Eur Hear journal Cardiovasc Pharmacother.* 2016;2(1):23-29. doi:10.1093/ehjcvp/pvv041
 210. Jung G-S, Kim M-K, Jung Y-A, et al. Clusterin attenuates the development of renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23(1):73-85. doi:10.1681/ASN.2011010048
 211. de Silva H V, Stuart WD, Duvic CR, et al. A 70-kDa apolipoprotein

- designated ApoJ is a marker for subclasses of human plasma high density lipoproteins. *J Biol Chem.* 1990;265(22):13240-13247. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2376594>.
212. Suzuki T, Tozuka M, Yamauchi K, et al. Predominant apolipoprotein J exists as lipid-poor mixtures in cerebrospinal fluid. *Ann Clin Lab Sci.* 2002;32(4):369-376.
 213. DeMattos RB, Brendza RP, Heuser JE, et al. Purification and characterization of astrocyte-secreted apolipoprotein E and J-containing lipoproteins from wild-type and human apoE transgenic mice. *Neurochem Int.* 2001;39(5-6):415-425. doi:10.1016/S0197-0186(01)00049-3
 214. Xu Q, Li Y, Cyras C, Sanan DA, Cordell B. Isolation and characterization of apolipoproteins from murine microglia. Identification of a low density lipoprotein-like apolipoprotein J-rich but E-poor spherical particle. *J Biol Chem.* 2000;275(41):31770-31777. doi:10.1074/jbc.M002796200
 215. McDonald JF, Nelsestuen GL. Potent inhibition of terminal complement assembly by clusterin: Characterization of its impact on C9 polymerization. *Biochemistry.* 1997;36(24):7464-7473. doi:10.1021/bi962895r
 216. Rohne P, Prochnow H, Koch-Brandt C. The CLU-files: disentanglement of a mystery. *Biomol Concepts.* 2016;7(1):1-15. doi:10.1515/bmc-2015-0026
 217. Matsubara E, Frangione B, Ghiso J. Characterization of apolipoprotein J-Alzheimer's A beta interaction. *J Biol Chem.* 1995;270(13):7563-7567. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7706304>.
 218. Howlett DR, Hortobágyi T, Francis PT. Clusterin associates specifically with A β 40 in Alzheimer's disease brain tissue. *Brain Pathol.* 2013;23(6):623-632. doi:10.1111/bpa.12057
 219. Koudinov A, Matsubara E, Frangione B, Ghiso J. The soluble form of Alzheimer's amyloid beta protein is complexed to high density lipoprotein 3 and very high density lipoprotein in normal human plasma. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;205(2):1164-1171. doi:10.1006/bbrc.1994.2788
 220. Koudinov AR, Berezov TT, Kumar A, Koudinova N V. Alzheimer's amyloid beta interaction with normal human plasma high density lipoprotein: association with apolipoprotein and lipids. *Clin Chim Acta.* 1998;270(2):75-84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9544446>.
 221. Schürmann B, Wiese B, Bickel H, et al. Association of the Alzheimer's disease clusterin risk allele with plasma clusterin concentration. *J Alzheimers Dis.* 2011;25(3):421-424. doi:10.3233/JAD-2011-110251
 222. Lambert J-C, Heath S, Even G, et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 2009;41(10):1094-1099. doi:10.1038/ng.439
 223. Roussotte FF, Gutman BA, Madsen SK, Colby JB, Thompson PM, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Combined effects of Alzheimer risk variants in the CLU and ApoE genes on ventricular expansion patterns in the elderly. *J Neurosci.* 2014;34(19):6537-6545.

- doi:10.1523/JNEUROSCI.5236-13.2014
224. Ling I-F, Bhongsatiern J, Simpson JF, Fardo DW, Estus S. Genetics of clusterin isoform expression and Alzheimer's disease risk. *PLoS One*. 2012;7(4):e33923. doi:10.1371/journal.pone.0033923
 225. Schrijvers EMC, Koudstaal PJ, Hofman A, Breteler MMB. Plasma clusterin and the risk of Alzheimer disease. *JAMA*. 2011;305(13):1322-1326. doi:10.1001/jama.2011.381
 226. Jongbloed W, van Dijk KD, Mulder SD, et al. Clusterin Levels in Plasma Predict Cognitive Decline and Progression to Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2015;46(4):1103-1110. doi:10.3233/JAD-150036
 227. Beeg M, Stravalaci M, Romeo M, et al. Clusterin Binds to A β 1-42 Oligomers with High Affinity and Interferes with Peptide Aggregation by Inhibiting Primary and Secondary Nucleation. *J Biol Chem*. 2016;291(13):6958-6966. doi:10.1074/jbc.M115.689539
 228. Narayan P, Orte A, Clarke RW, et al. The extracellular chaperone clusterin sequesters oligomeric forms of the amyloid- β 1-40 peptide. *Nat Struct Mol Biol*. 2012;19(1):79-84. doi:10.1038/nsmb.2191
 229. Yerbury JJ, Poon S, Meehan S, et al. The extracellular chaperone clusterin influences amyloid formation and toxicity by interacting with prefibrillar structures. *FASEB J*. 2007;21(10):2312-2322. doi:10.1096/fj.06-7986com
 230. Bell RD, Sagare AP, Friedman AE, et al. Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid beta-peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007;27(5):909-918. doi:10.1038/sj.jcbfm.9600419
 231. Mulder SD, Nielsen HM, Blankenstein MA, Eikelenboom P, Veerhuis R. Apolipoproteins E and J interfere with amyloid-beta uptake by primary human astrocytes and microglia in vitro. *Glia*. 2014;62(4):493-503. doi:10.1002/glia.22619
 232. DeMattos RB, O'dell MA, Parsadanian M, et al. Clusterin promotes amyloid plaque formation and is critical for neuritic toxicity in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(16):10843-10848. doi:10.1073/pnas.162228299
 233. Nelson AR, Sagare AP, Zlokovic B V. Role of clusterin in the brain vascular clearance of amyloid- β . *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(33):8681-8682. doi:10.1073/pnas.1711357114
 234. Wojtas AM, Kang SS, Olley BM, et al. Loss of clusterin shifts amyloid deposition to the cerebrovasculature via disruption of perivascular drainage pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(33):E6962-E6971. doi:10.1073/pnas.1701137114
 235. Bozzuto G, Molinari A. Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:975-999. doi:10.2147/IJN.S68861
 236. Scanu A. Binding of human serum high density lipoprotein apoprotein with aqueous dispersions of phospholipids. *J Biol Chem*. 1967;242(4):711-719.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6017739>.
237. Segrest JP, Jackson RL, Morrisett JD, Gotto AM. A molecular theory of lipid-protein interactions in the plasma lipoproteins. *FEBS Lett.* 1974;38(3):247-258. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4368333>.
 238. Katzen F. Cell-free protein expression of membrane proteins using nanolipoprotein particles. *Biotechniques.* 2008;45(2):190. doi:10.2144/000112951
 239. Graff RA, Swanson TM, Strano MS. Synthesis of Nickel–Nitrilotriacetic Acid Coupled Single-Walled Carbon Nanotubes for Directed Self-Assembly with Polyhistidine-Tagged Proteins. *Chem Mater.* 2008;20(5):1824-1829. doi:10.1021/cm702577h
 240. Shiflett AM, Bishop JR, Pahwa A, Hajduk SL. Human high density lipoproteins are platforms for the assembly of multi-component innate immune complexes. *J Biol Chem.* 2005;280(38):32578-32585. doi:10.1074/jbc.M503510200
 241. McConathy WJ, Nair MP, Paranjape S, Mooberry L, Lacko AG. Evaluation of synthetic/reconstituted high-density lipoproteins as delivery vehicles for paclitaxel. *Anticancer Drugs.* 2008;19(2):183-188. doi:10.1097/CAD.0b013e3282f1da86
 242. Liu H-L, Hua M-Y, Yang H-W, et al. Magnetic resonance monitoring of focused ultrasound/magnetic nanoparticle targeting delivery of therapeutic agents to the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(34):15205-15210. doi:10.1073/pnas.1003388107
 243. Nichols A V, Gong EL, Blanche PJ, Forte TM, Shore VG. Interaction of model discoidal complexes of phosphatidylcholine and apolipoprotein A-I with plasma components. Physical and chemical properties of the transformed complexes. *Biochim Biophys Acta.* 1984;793(3):325-337. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6424716>.
 244. Hauser H, Henry R, Leslie RB, Stubbs J. The interaction of apoprotein from porcine high-density lipoprotein with dimyristoyl phosphatidylcholine. *Eur J Biochem.* 1974;48(2):583-594. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4375042>.
 245. Zorich NL, Kézdy KE, Jonas A. Properties of discoidal complexes of human apolipoprotein A-I with phosphatidylcholines containing various fatty acid chains. *Biochim Biophys Acta.* 1987;919(2):181-189. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3107616>.
 246. Wald JH, Krul ES, Jonas A. Structure of apolipoprotein A-I in three homogeneous, reconstituted high density lipoprotein particles. *J Biol Chem.* 1990;265(32):20037-20043. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2123198>.
 247. Bergeron J, Frank PG, Scales D, Meng QH, Castro G, Marcel YL. Apolipoprotein A-I conformation in reconstituted discoidal lipoproteins varying in phospholipid and cholesterol content. *J Biol Chem.* 1995;270(46):27429-27438. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7499199>.

248. Jonas A, Wald JH, Toohill KL, Krul ES, Kézdy KE. Apolipoprotein A-I structure and lipid properties in homogeneous, reconstituted spherical and discoidal high density lipoproteins. *J Biol Chem*. 1990;265(36):22123-22129. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2125044>.
249. Massey JB, Gotto AM, Pownall HJ. Human plasma high density apolipoprotein A-I: effect of protein-protein interactions on the spontaneous formation of a lipid-protein recombinant. *Biochem Biophys Res Commun*. 1981;99(2):466-474. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6786293>.
250. Herscovitz H, Hadzopoulou-Cladaras M, Walsh MT, Cladaras C, Zannis VI, Small DM. Expression, secretion, and lipid-binding characterization of the N-terminal 17% of apolipoprotein B. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(16):7313-7317. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1871138>.
251. Jonas A, Sweeny SA, Herbert PN. Discoidal complexes of A and C apolipoproteins with lipids and their reactions with lecithin: cholesterol acyltransferase. *J Biol Chem*. 1984;259(10):6369-6375. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6427214>.
252. Narayanaswami V, Maiorano JN, Dhanasekaran P, et al. Helix orientation of the functional domains in apolipoprotein e in discoidal high density lipoprotein particles. *J Biol Chem*. 2004;279(14):14273-14279. doi:10.1074/jbc.M313318200
253. Calero M, Tokuda T, Rostagno A, et al. Functional and structural properties of lipid-associated apolipoprotein J (clusterin). *Biochem J*. 1999;344 Pt 2:375-383. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10567218>.
254. Robert J, Stukas S, Button E, et al. Reconstituted high-density lipoproteins acutely reduce soluble brain A β levels in symptomatic APP/PS1 mice. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1862(5):1027-1036. doi:10.1016/j.bbadis.2015.10.005
255. Song Q, Huang M, Yao L, et al. Lipoprotein-based nanoparticles rescue the memory loss of mice with Alzheimer's disease by accelerating the clearance of amyloid-beta. *ACS Nano*. 2014;8(3):2345-2359. doi:10.1021/nn4058215
256. Huang M, Hu M, Song Q, et al. GM1-Modified Lipoprotein-like Nanoparticle: Multifunctional Nanoplatfrom for the Combination Therapy of Alzheimer's Disease. *ACS Nano*. 2015;9(11):10801-10816. doi:10.1021/acsnano.5b03124
257. Song Q, Song H, Xu J, et al. Biomimetic ApoE-Reconstituted High Density Lipoprotein Nanocarrier for Blood-Brain Barrier Penetration and Amyloid Beta-Targeting Drug Delivery. *Mol Pharm*. 2016;13(11):3976-3987. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.6b00781
258. Tarasoff-Conway JM, Carare RO, Osorio RS, et al. Clearance systems in the brain-implications for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. 2015;11(8):457-470. doi:10.1038/nrneurol.2015.119
259. Demain AL, Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv*. 27(3):297-306. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.01.008

260. Wurm FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol.* 2004;22(11):1393-1398. doi:10.1038/nbt1026
261. Dabbs RA, Wilson MR. Expression and purification of chaperone-active recombinant clusterin. *PLoS One.* 2014;9(1):e86989. doi:10.1371/journal.pone.0086989
262. Merino-Zamorano C, Fernández-de Retana S, Montañola A, et al. Modulation of Amyloid- β 1–40 Transport by ApoA1 and ApoJ Across an in vitro Model of the Blood-Brain Barrier. *J Alzheimer's Dis.* 2016;53(2):677-691. doi:10.3233/JAD-150976
263. Stukas S, Robert J, Lee M, et al. Intravenously injected human apolipoprotein A-I rapidly enters the central nervous system via the choroid plexus. *J Am Heart Assoc.* 2014;3(6):e001156. doi:10.1161/JAHA.114.001156
264. Matsuoka Y, Saito M, LaFrancois J, et al. Novel therapeutic approach for the treatment of Alzheimer's disease by peripheral administration of agents with an affinity to beta-amyloid. *J Neurosci.* 2003;23(1):29-33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12514198>.
265. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science.* 1992;258(5081):468-471. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1411543>.
266. Panagotopoulos SE, Horace EM, Maiorano JN, Davidson WS. Apolipoprotein A-I adopts a belt-like orientation in reconstituted high density lipoproteins. *J Biol Chem.* 2001;276(46):42965-42970. doi:10.1074/jbc.M106462200
267. Curtiss LK, Valenta DT, Hime NJ, Rye K-A. What is so special about apolipoprotein AI in reverse cholesterol transport? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(1):12-19. doi:10.1161/01.ATV.0000194291.94269.5a
268. Rebeck GW. Cholesterol efflux as a critical component of Alzheimer's disease pathogenesis. *J Mol Neurosci.* 2004;23(3):219-224. doi:10.1385/JMN:23:3:219
269. Wang S, Smith JD. ABCA1 and nascent HDL biogenesis. *Biofactors.* 40(6):547-554. doi:10.1002/biof.1187
270. Ramasamy I. Recent advances in physiological lipoprotein metabolism. *Clin Chem Lab Med.* 2014;52(12):1695-1727. doi:10.1515/cclm-2013-0358
271. Thanopoulou K, Fragkouli A, Stylianopoulou F, Georgopoulos S. Scavenger receptor class B type I (SR-BI) regulates perivascular macrophages and modifies amyloid pathology in an Alzheimer mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(48):20816-20821. doi:10.1073/pnas.1005888107
272. Parikh M, Patel K, Soni S, Gandhi T. Liver X receptor: a cardinal target for atherosclerosis and beyond. *J Atheroscler Thromb.* 2014;21(6):519-531. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24695022>.
273. Jiang Q, Lee CYD, Mandrekar S, et al. ApoE promotes the proteolytic degradation of A β . *Neuron.* 2008;58(5):681-693. doi:10.1016/j.neuron.2008.04.010
274. Kuntz M, Candela P, Saint-Pol J, et al. Bexarotene Promotes Cholesterol

- Efflux and Restricts Apical-to-Basolateral Transport of Amyloid- β Peptides in an In Vitro Model of the Human Blood-Brain Barrier. *J Alzheimers Dis.* 2015;48(3):849-862. doi:10.3233/JAD-150469
275. Kim SM, Kim MJ, Rhee HY, et al. Regional cerebral perfusion in patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: effect of APOE epsilon4 allele. *Neuroradiology.* 2013;55(1):25-34. doi:10.1007/s00234-012-1077-x
 276. Iadecola C. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* 2004;5(5):347-360. doi:10.1038/nrn1387
 277. Zlokovic B V. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci.* 2011;12(12):723-738. doi:10.1038/nrn3114
 278. Chen B, Ren X, Neville T, et al. Apolipoprotein AI tertiary structures determine stability and phospholipid-binding activity of discoidal high-density lipoprotein particles of different sizes. *Protein Sci.* 2009;18(5):921-935. doi:10.1002/pro.101
 279. Mishra VK, Palgunachari MN, Hudson JS, et al. Structure and lipid interactions of an anti-inflammatory and anti-atherogenic 10-residue class G* apolipoprotein J peptide using solution NMR. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2011;1808(1):498-507. doi:10.1016/j.bbamem.2010.10.011
 280. Bailey RW, Dunker AK, Brown CJ, Garner EC, Griswold MD. Clusterin, a binding protein with a molten globule-like region. *Biochemistry.* 2001;40(39):11828-11840. doi:10.1021/bi010135x
 281. Mei X, Atkinson D. Lipid-free Apolipoprotein A-I Structure: Insights into HDL Formation and Atherosclerosis Development. *Arch Med Res.* 2015;46(5):351-360. doi:10.1016/j.arcmed.2015.05.012
 282. Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, et al. An oral apoJ peptide renders HDL antiinflammatory in mice and monkeys and dramatically reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(9):1932-1937. doi:10.1161/01.ATV.0000174589.70190.e2
 283. Burkey BF, Stuart WD, Harmony JA. Hepatic apolipoprotein J is secreted as a lipoprotein. *J Lipid Res.* 1992;33(10):1517-1526. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1431576>.
 284. Gelissen IC, Hochgrebe T, Wilson MR, et al. Apolipoprotein J (clusterin) induces cholesterol export from macrophage-foam cells: a potential anti-atherogenic function? *Biochem J.* 1998;331 (Pt 1):231-237. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9512484>.
 285. Riwanto M, Landmesser U. High density lipoproteins and endothelial functions: mechanistic insights and alterations in cardiovascular disease. *J Lipid Res.* 2013;54(12):3227-3243. doi:10.1194/jlr.R037762
 286. Zlokovic B V, Martel CL, Mackic JB, et al. Brain uptake of circulating apolipoproteins J and E complexed to Alzheimer's amyloid beta. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;205(2):1431-1437. doi:10.1006/bbrc.1994.2825

287. Oda T, Pasinetti GM, Osterburg HH, Anderson C, Johnson SA, Finch CE. Purification and characterization of brain clusterin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;204(3):1131-1136. doi:10.1006/bbrc.1994.2580
288. Danik M, Chabot JG, Hassan-Gonzalez D, Suh M, Quirion R. Localization of sulfated glycoprotein-2/clusterin mRNA in the rat brain by in situ hybridization. *J Comp Neurol.* 1993;334(2):209-227. doi:10.1002/cne.903340205
289. Kim J, Jiang H, Park S, et al. Haploinsufficiency of Human APOE Reduces Amyloid Deposition in a Mouse Model of Amyloid- Amyloidosis. *J Neurosci.* 2011;31(49):18007-18012. doi:10.1523/JNEUROSCI.3773-11.2011
290. Shang J, Yamashita T, Zhai Y, et al. Strong Impact of Chronic Cerebral Hypoperfusion on Neurovascular Unit, Cerebrovascular Remodeling, and Neurovascular Trophic Coupling in Alzheimer's Disease Model Mouse. *J Alzheimers Dis.* 2016;52(1):113-126. doi:10.3233/JAD-151126
291. Rull A, Martínez-Bujidos M, Pérez-Cuellar M, Pérez A, Ordóñez-Llanos J, Sánchez-Quesada JL. Increased concentration of clusterin/apolipoprotein J (apoJ) in hyperlipemic serum is paradoxically associated with decreased apoJ content in lipoproteins. *Atherosclerosis.* 2015;241(2):463-470. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.06.003
292. Simonsen JB. Evaluation of reconstituted high-density lipoprotein (rHDL) as a drug delivery platform - a detailed survey of rHDL particles ranging from biophysical properties to clinical implications. *Nanomedicine.* 2016;12(7):2161-2179. doi:10.1016/j.nano.2016.05.009
293. Spies PE, Verbeek MM, van Groen T, Claassen JAHR. Reviewing reasons for the decreased CSF Aβ42 concentration in Alzheimer disease. *Front Biosci (Landmark Ed.* 2012;17:2024-2034. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22652762>.
294. van Dyck CH. Anti-Amyloid-β Monoclonal Antibodies for Alzheimer's Disease: Pitfalls and Promise. *Biol Psychiatry.* 2018;83(4):311-319. doi:10.1016/j.biopsych.2017.08.010
295. Boddaert J, Bielen K, 's Jongers B, et al. CD8 signaling in microglia/macrophage M1 polarization in a rat model of cerebral ischemia. *PLoS One.* 2018;13(1):e0186937. doi:10.1371/journal.pone.0186937
296. Michaud J-P, Hallé M, Lampron A, et al. Toll-like receptor 4 stimulation with the detoxified ligand monophosphoryl lipid A improves Alzheimer's disease-related pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(5):1941-1946. doi:10.1073/pnas.1215165110
297. Xiang X, Werner G, Bohrmann B, et al. TREM2 deficiency reduces the efficacy of immunotherapeutic amyloid clearance. *EMBO Mol Med.* 2016;8(9):992-1004. doi:10.15252/emmm.201606370
298. Takata K, Kitamura Y, Yanagisawa D, et al. Microglial transplantation increases amyloid-beta clearance in Alzheimer model rats. *FEBS Lett.* 2007;581(3):475-478. doi:10.1016/j.febslet.2007.01.009

299. Bard F, Cannon C, Barbour R, et al. Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med.* 2000;6(8):916-919. doi:10.1038/78682
300. Jiang T, Tan L, Zhu X-C, et al. Upregulation of TREM2 ameliorates neuropathology and rescues spatial cognitive impairment in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology.* 2014;39(13):2949-2962. doi:10.1038/npp.2014.164
301. Fiala M, Liu QN, Sayre J, et al. Cyclooxygenase-2-positive macrophages infiltrate the Alzheimer's disease brain and damage the blood-brain barrier. *Eur J Clin Invest.* 2002;32(5):360-371. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12027877>.
302. Butovsky O, Kunis G, Koronyo-Hamaoui M, Schwartz M. Selective ablation of bone marrow-derived dendritic cells increases amyloid plaques in a mouse Alzheimer's disease model. *Eur J Neurosci.* 2007;26(2):413-416. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05652.x
303. Fahrenhold M, Rakic S, Classey J, et al. TREM2 expression in the human brain: a marker of monocyte recruitment? *Brain Pathol.* October 2017. doi:10.1111/bpa.12564
304. Simard AR, Rivest S. Bone marrow stem cells have the ability to populate the entire central nervous system into fully differentiated parenchymal microglia. *FASEB J.* 2004;18(9):998-1000. doi:10.1096/fj.04-1517fje
305. Heneka MT, Kummer MP, Stutz A, et al. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature.* 2013;493(7434):674-678. doi:10.1038/nature11729
306. Spangenberg EE, Lee RJ, Najafi AR, et al. Eliminating microglia in Alzheimer's mice prevents neuronal loss without modulating amyloid- β pathology. *Brain.* 2016;139(Pt 4):1265-1281. doi:10.1093/brain/aww016
307. Salter MW, Stevens B. Microglia emerge as central players in brain disease. *Nat Med.* 2017;23(9):1018-1027. doi:10.1038/nm.4397
308. Hoogland ICM, Houbolt C, van Westerloo DJ, van Gool WA, van de Beek D. Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. *J Neuroinflammation.* 2015;12:114. doi:10.1186/s12974-015-0332-6
309. Kamer AR, Pirraglia E, Tsui W, et al. Periodontal disease associates with higher brain amyloid load in normal elderly. *Neurobiol Aging.* 2015;36(2):627-633. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2014.10.038
310. Wendeln A-C, Degenhardt K, Kaurani L, et al. Innate immune memory in the brain shapes neurological disease hallmarks. *Nature.* April 2018. doi:10.1038/s41586-018-0023-4
311. van Diepen JA, Berbée JFP, Havekes LM, Rensen PCN. Interactions between inflammation and lipid metabolism: relevance for efficacy of anti-inflammatory drugs in the treatment of atherosclerosis. *Atherosclerosis.*

- 2013;228(2):306-315. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2013.02.028
312. McLaughlin L, Zhu G, Mistry M, et al. Apolipoprotein J/clusterin limits the severity of murine autoimmune myocarditis. *J Clin Invest.* 2000;106(9):1105-1113. doi:10.1172/JCI9037
313. Bales KR, Verina T, Dodel RC, et al. Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition. *Nat Genet.* 1997;17(3):263-264. doi:10.1038/ng1197-263
314. Ulrich JD, Ulland TK, Mahan TE, et al. ApoE facilitates the microglial response to amyloid plaque pathology. *J Exp Med.* 2018;215(4):1047-1058. doi:10.1084/jem.20171265
315. Calhoun ME, Wiederhold KH, Abramowski D, et al. Neuron loss in APP transgenic mice. *Nature.* 1998;395(6704):755-756. doi:10.1038/27351
316. Van Dam D, D'Hooge R, Staufenbiel M, Van Ginneken C, Van Meir F, De Deyn PP. Age-dependent cognitive decline in the APP23 model precedes amyloid deposition. *Eur J Neurosci.* 2003;17(2):388-396. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12542676>.

7- ANEXO

7.1- MANUSCRITO 3

Peripheral administration of human recombinant ApoJ/clusterin in APP23 mice prevents cerebral β -amyloid accumulation and enhances the expression of phagocytic markers in microglial cells

Pendiente de publicación

Peripheral administration of human recombinant ApoJ/clusterin in APP23 mice prevents cerebral β -amyloid accumulation and enhances the expression of phagocytic markers in microglial cells

Soffía Fernández de Retana¹, Paula Marazuela¹, Montserrat Solé¹, Guillem Colell¹, Jose Luis Sánchez-Quesada², Joan Montaner¹, Daniel MasPOCH^{3,4}, Mary Cano-Sarabia^{3,4}, Mar Hernández-Guillamon^{1*}.

¹ Neurovascular Research Laboratory, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain; ² Cardiovascular Biochemistry Group, Research Institute of the Hospital de Sant Pau (IIB Sant Pau), Barcelona, Spain; ³ Catalan Institute of Nanoscience and Nanotechnology (ICN2), CSIC and the Barcelona Institute of Science and Technology, Campus UAB, Bellaterra, Barcelona, Spain; ⁴ Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), 08100 Barcelona, Spain.

* Corresponding author: Mar.hernandez.guillamon@vhir.org / marguillamon@gmail.com

ABSTRACT

Background: ApoJ/Clusterin is a multifunctional protein highly expressed in the brain. ApoJ has been extensively implicated in A β fibrilization and clearance in the context of Alzheimer's disease, although whether the increase in ApoJ levels is beneficial or detrimental is still under investigation. ApoJ is abundant in the plasma and can be lipidated to form HDL particles. Nevertheless, the impact of plasmatic ApoJ levels and its lipidation status in cerebral β -amyloidosis is still unknown. Hence, our main objective was to study the effect of a peripheral increase in unbound ApoJ or reconstituted HDL associated with ApoJ in an experimental model of cerebral β -amyloidosis (APP23 transgenic mice).

Methods: Fourteen-month-old APP23 mice were subjected to chronic intravenous rHDL-rApoJ nanodisc or free rApoJ treatment for 1 month. Total A β load, neuronal death, A β clearance and inflammation were evaluated after the end of the treatment period.

Results: Results obtained after the chronic administration of rApoJ or rHDL-rApoJ nanodiscs revealed that free rApoJ treatment prevented some of the features associated with A β pathology, showing a reduction in hippocampal neuronal loss, a decrease in A β insoluble accumulation and an elevation in A β in the CSF. These effects were accompanied by enhanced expression of phagocytic markers in microglial cells surrounding A β deposits without an exacerbation of the global neuroinflammatory status. In all endpoints studied, rHDL-rApoJ nanodisc treatment was less effective than free ApoJ administration.

Conclusions: In summary, our study shows the potential therapeutic benefits of an early increase in ApoJ levels in the prevention of cerebral β -amyloidosis.

Keywords: Clusterin, ApoJ, APP23, reconstituted HDL, beta-amyloid, cerebral β -amyloidosis, Alzheimer's disease.

1. BACKGROUND

Cerebral β -amyloidosis is characterized by an accumulation of Amyloid- β peptide ($A\beta$) in the brain parenchyma and cerebral vessels and is a major feature of Alzheimer's Disease (AD) and Cerebral Amyloid Angiopathy (CAA) [1, 2]. Both diseases are characterized by devastating clinical presentations and are highly prevalent in the elderly population. AD is the most common cause of dementia, affecting 24 million people worldwide [3, 4]. AD patients present severe β -amyloidosis characterized by parenchymal $A\beta$ deposits (neuritic plaques), together with intracellular accumulation of hyperphosphorylated tau protein (neurofibrillary tangles), triggering neuroinflammation, neurodegeneration and dementia [2]. On the other hand, CAA is characterized by $A\beta$ deposition in brain vessels causing intracerebral hemorrhage (ICH) and is the leading cause of lobar ICH in the elderly population [5]. The $A\beta$ peptide is the product of amyloid precursor protein (APP) processing by β - and γ -secretases, which gives rise to peptides of different lengths, with $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$ being the most interesting forms from a clinical point of view. Although both $A\beta$ peptides are prone to aggregate to form amyloid fibrils that deposit in the brain, $A\beta_{42}$ presents a preferential deposition in parenchyma (forming neuritic plaques), whereas $A\beta_{40}$ is more commonly associated with CAA-affected vessels [6, 7].

The underlying mechanisms explaining pathological $A\beta$ accumulation in the brain are not completely clear. Nevertheless, sporadic cerebral β -amyloidosis is widely accepted to occur due to an imbalance in the existing $A\beta$ elimination pathways [8]. The most relevant $A\beta$ clearance pathways described to date include (1) proteolytic degradation by extracellular proteases, such as insulin-degrading enzyme (IDE) and neprilysin (NEP), among others [9], (2) clearance across the blood-brain barrier (BBB) by binding to specific receptors, such as LRP-1, LRP-2, among others [10] and (3) through perivascular drainage [11], which promotes the mobilization of $A\beta$ material along the basement membrane of cerebral arteries and capillaries to the cervical lymph nodes for its elimination. Finally, (4) $A\beta$ can be eliminated through glial uptake by astrocytes and microglia followed by intracellular digestion [12, 13]. Microglial cells are resident innate immune cells that play an important role in mediating the neuroinflammatory process in the brain and the phagocytosis of toxic species such as $A\beta$ material. In this context, the importance of this dual role of microglia in cerebral β -amyloidosis is of increasing interest [14]. At this juncture, therapeutic strategies that stimulate these elimination pathways have been proposed in AD.

Certain apolipoproteins, beyond their role in lipid and cholesterol metabolism, have been described to be able to modulate $A\beta$ clearance. In particular, the *APOE* genotype is a strong risk factor for the development of sporadic cerebral β -amyloidosis [15, 16], and although its interaction with $A\beta$ is not well understood, apolipoprotein E (ApoE) has been proposed to

influence A β fibrillization [17], together with its clearance across the BBB [18]. On the other hand, apolipoprotein J (ApoJ, also known as clusterin) is the most expressed apolipoprotein in the brain after ApoE. The role of ApoJ in the context of cerebral β -amyloidosis is strongly underpinned by several studies, although, as with ApoE, its precise role has not been well elucidated. ApoJ is a heterodimeric multifunctional protein that has been described as an anti-inflammatory and anti-apoptotic protein [19, 20] and a regulator of complement activation [21]. In addition, ApoJ is a very effective chaperone that is able to bind partially misfolded proteins. In this context, ApoJ is able to bind A β and prevent its fibrillization [22] and toxicity *in vitro* [23]. In AD brains, ApoJ co-deposits with neuritic plaques and CAA-affected vessels, and ApoJ-A β complexes have been detected in cerebrospinal fluid (CSF) [24]. The role of ApoJ in AD was confirmed in a GWAS (genome-wide association study) that identified the *CLU* gene as a risk factor for developing this neurological disease [25]. More insightfully, the risk factor allele rs11136000^C was associated with a lower expression of ApoJ, whereas the protective allele rs11136000^T generated greater ApoJ expression [26]. On the other hand, higher circulating levels of ApoJ in the plasma have been related to the severity and prevalence of AD [27]. These last observations suggest that an increase in ApoJ levels occurs as a protective response against aberrant A β accumulation in the brain. However, there are conflicting results in the literature regarding the protective role of ApoJ. For example, a study showed that PDAPP mice lacking *Clu* (PDAPP/*Clu*^{-/-}) presented reduced fibrillary A β without alterations in the total levels of A β [28]. More recently, Wojtas and colleagues (2017) observed that knocking out *Clu* in APP/PS1 mice resulted in and exacerbated vascular A β deposition, whereas total A β and parenchymal A β deposition were remarkably reduced [29]. Overall, the exact impact of increasing ApoJ in circulation and/or in the brain still needs to be clarified.

From this background, our main objective was to understand the role of ApoJ in the development and progression of cerebral β -amyloidosis by determining the potential effect of ApoJ-based therapies in an experimental model of AD/CAA. Because ApoJ is present in the plasma in its free/non-lipidated form or associated with HDL (high-density lipoprotein) particles (20% of circulating ApoJ) [30], we also analyzed whether the effect of lipidation of ApoJ induced distinct functional modifications associated with A β deposition or distribution in the brain. For this purpose, we analyzed the effect of the peripheral administration of human recombinant ApoJ (h-rApoJ) in its non-lipidated (free rApoJ) and lipidated (reconstituted HDL nanodiscs formulated with rApoJ, rHDL-rApoJ nanodiscs) [31] structural states, on cerebral A β accumulation, neuronal loss and neuroinflammation in the APP23 transgenic mouse model.

2. METHODS

2.1. Human recombinant ApoJ

The production of functional human recombinant ApoJ (rApoJ) has been previously reported by our group [32]. Briefly, Human Embryonic Kidney 293T cells (HEK293T) were transfected with the pcDNA4.0TM vector containing the human *APOJ* cDNA (Abgent, Clairemont, San Diego, USA). Stable transfected cells were grown in HYPERFlask systems (Corning Inc., New York, USA) followed by the recollection of cell supernatants for protein purification with Ni-affinity chromatography with fast protein liquid chromatography (FLPC; AKTA Purifier 100 system, GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ, USA) in HiScreen Ni FF columns (GE Healthcare). The purified protein was dialyzed overnight (ON) at 4°C against Tris Buffer Saline (TBS) in 10 KDa Snake Skin Dialysis Tubing membranes (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA). For those batches intended to the preparation of reconstituted HDL particles, the resulting purified rApoJ was dialyzed against TBS (pH=6.4). Finally, the protein concentration was determined by BCA assay (Thermo Fisher) and diluted to a final rApoJ concentration of 200 μ g/ml in PBS. Aliquots were stored at -80°C until its usage. The purity of rApoJ was >75%.

2.2. Preparation and purification of rHDL-rApoJ nanodiscs

A detailed protocol for the preparation and purification of reconstituted HDL nanodiscs formulated with rApoJ (rHDL-rApoJ nanodiscs) has been previously published by our group [31]. Briefly, the process started with the preparation of a lipid mixture with 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC, Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) and free cholesterol (CHOL, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) in a chloroform solution (5:1 DMPC/CHOL molar ratio). The organic solvent was removed under vacuum and nitrogen to afford a dry lipid film, followed by rehydration with TBS 40 mM sodium deoxycholate (cholate, Sigma-Aldrich). This suspension was incubated for 30 minutes at 37°C until a clear solution containing DMPC/CHOL/cholate mixed micelles was achieved. For the preparation of rHDL-rApoJ nanodiscs, mixed micelles were incubated with free rApoJ at 550:110:1 DMPC/CHOL/rApoJ molar ratio, and three incubation cycles were performed at 4°C and 37°C to promote the lipid-protein interaction. After incubation, rHDL-rApoJ nanodisc self-assembly began with cholate removal through extensive dialysis against 1000-fold excess TBS at 4°C for 48 hours in 10 KDa Snake Skin Dialysis Tubing with two buffer changes (1×10^9 overall dilution factor). Finally, dialyzed samples were centrifuged at 16000 xg for 30 minutes at 4°C to eliminate the unbounded lipids. A purification step with potassium bromide (KBr; Sigma Aldrich) density gradient ultracentrifugation was needed to allow the elimination of unbound free rApoJ. This step (100,000 x g; 24 hours, 1,250 mg/ml density of KBr) allowed the

recollection of purified rHDL-rApoJ in the upper fractions (<1,250 mg/ml density). These samples were dialyzed against PBS-2% sucrose to eliminate KBr. The protein concentration was determined by BCA. rHDL-rApoJ-containing solutions were diluted in PBS to a final rApoJ concentration of 200 μ g/ml, and aliquots were stored at -80°C until further use.

2.3. In vivo chronic administration of rHDL-rApoJ nanodiscs and free rApoJ

The effect of the chronic administration of both rHDL-rApoJ nanodiscs and free rApoJ was studied in APP23 transgenic mice (Hemizyote B6, D2-TgN[Thy-APP^{SWE}]-23-Tg mice, Novartis, Basel, Switzerland) [33]. These animals overexpress the APP protein with the Swedish mutation (K670M/N671L) under the murine neuronal *Thy1* promoter (Thymocyte Antigen-1). Hemizyote APP23 mice were backcrossed with C57/BL6 mice (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France), and the APP genotype was tested in the offspring by Transnetyx (Cordova, TN, USA). Wild-type (wt) and APP23 mice were aged in the animal facility of our institution to obtain the final study cohort. Fourteen-month-old APP23 mice received 8 intravenous (IV) doses of rHDL-rApoJ, free rApoJ (1 mg/kg) or saline (n=7 animals/group) for 4 weeks (2 doses/ week). For the administration, mice were anesthetized with isoflurane (5%) in oxygen (2%) followed by retro-orbital sinus injection, selected as a reliable administration route for IV delivery [34]. All animals completed the treatment with no associated mortality or changes in body weight due to treatment.

2.4. Cerebrospinal fluid collection

Thirty minutes after the last administration, mice were anesthetized under isoflurane, and CSF was sampled as previously described [35]. Briefly, anesthetized mice were placed in the stereotaxic instrument, and a sagittal incision inferior to the occiput was made in the skin. Once the dura mater of the cistern magna was visualized under the microscope, it was penetrated with a glass capillary (inner diameter of 0.5 mm), and clear CSF ascended by capillarity. Only completely clear CSF was used for further experiments.

2.5. Blood and brain collection

Blood was collected through cardiac puncture and blood samples were centrifuged in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tubes to recollect the EDTA-plasma. Then, after transcardial perfusion with 25 ml of cold PBS (pH=7.4), brains were rapidly removed and divided in two hemispheres. One of the hemispheres was frozen at -80°C for homogenization, while the other was fixed in 10% formalin (Diapath, Martinengo, Italy) at room temperature (RT) for 48 hours before paraffin embedding.

2.6. Brain homogenates

One of the hemispheres of each mouse was homogenized to obtain soluble, membrane-associated and insoluble fractions through sequential centrifugations. First, brain tissue was homogenized in 4 ml of TBS (pH=7.4) supplemented with cOmplete EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany) and samples were centrifuged at 8000 xg during 30 minutes at 4°C. The supernatant was selected as the soluble fraction whereas the pellet was homogenized in TBS supplemented with TritonX-100 and protease inhibitors followed by centrifugation at 8000 xg during 30 minutes at 4°C. The supernatant was selected as the membrane-bound fraction whereas the pellet was homogenized in 5 M guanidine-HCl (pH=8, Sigma-Aldrich) supplemented with protease inhibitors. Samples were shaken during 3 hours at RT followed by centrifugation at 8000 xg during 30 minutes at 4°C and the supernatant was selected as the insoluble fraction. Soluble, membrane-bound and insoluble fractions were aliquoted and frozen at -80°C. The protein concentration of each fraction was quantified by BCA.

2.7. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

A β levels in plasma, CSF and soluble and insoluble brain fractions were quantified with commercial ELISA kits for both A β ₄₀ (KHB3481) and A β ₄₂ (KHB2442, Thermo Fisher). Levels of human ApoJ in plasma of treated mice were quantified with the commercial ELISA kit (3713-1HP, Mabtech, Nacka Strand, Sweden). Levels of the endogenous mouse ApoJ were quantified in plasma of 15 month old APP23 and age-matched wt animals (ab199079, Abcam, Cambridge, UK). Brain levels of mouse TREM2 (Triggering Receptor Expressed in Myeloid cells-2) of treated mice were quantified with a commercial ELISA kit (LS-F7884, Lifespan Bioscience, Seattle, Washington, USA). Final results were analyzed following manufacturer instructions with a conventional microplate reader (Sinergy Mx, Biotek, Winooski, VT, USA). Commercially available multiplexed ELISA was used to investigate the general inflammatory state in brain soluble fraction after treatments (Mouse cytokine magnetic 20-plex panel, LMC0006M, Invitrogen). Results were analyzed in duplicate with Luminex technology in a MAGPIXTM instrument and samples with a coefficient of variation (CV) > 35% were excluded. In all cases, data were corrected by the amount of total protein determined by BCA.

2.8. Immunohistochemistry

A series of three paraffin-embedded sagittal sections were selected 800 μ m apart, starting from the division of the hemispheres. For the detection of A β with conventional immunohistochemistry (IHC), all samples were deparaffinized 1 hour at 65 °C, rehydrated and treated with 2% H₂O₂ and 10% methanol in PBS for 15 minutes. Samples were incubated during

1 hour in blocking solution (PBS, 0.2% Triton-X, 10% Fetal bovine serum (FBS, Millipore, Darmstadt, Germany) followed by ON incubation with the anti-A β monoclonal antibody 4G8 (Biolegend, San Diego, CA, USA) diluted 1/10,000 in blocking solution. Next, slices were incubated with biotinylated anti-mouse IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) diluted 1/200 in blocking solution for 1 hour at RT and with streptavidin-HRP (Vector Laboratories) diluted 1/200 in blocking solution. Finally, diaminobenzidine (DAB; Dako, Denmark) was applied to the samples until a brown end-product was observed. Contrast staining was done by immersion of samples in Harris hematoxylin solution (Sigma-Aldrich). The number of A β deposits bigger than 50 px² and the area (px²) occupied per deposit were quantified with the Image J software in the three deep-sections. Data are expressed as a mean of the analyzed three deep-sections. Data were expressed as the number of A β positive deposits and the mean size of A β positive deposits.

The same protocol was performed for the quantification of NeuN positive cells in cortex and hippocampus (CA1, CA2/CA3 and polymorphic layer of dentate gyrus) of APP23 and age-matched wt mice in the first deep-section slice. Before the blocking step, an antigen retrieval step was performed by immersion of slices in citrate buffer (10 mM sodium citrate, 0.05% Tween20, pH=6) at 95°C during 30 minutes. The NeuN antibody (Millipore) was diluted 1/200 in blocking solution. The quantification of NeuN positive cells/mm² was done as previously described [36]. For each sample and brain region, three different images were taken at 40X magnification. NeuN positive cells were counted in three different squares of 150 x 150 μ m in cortical regions in every image, whereas in hippocampal regions squares of 100 x 100 μ m were used. Results are expressed as number of NeuN positive cells per mm². Images were taken with a LMD6500 microscope (Leica, Wetzlar, Germany).

2.9. Thioflavin S staining

Thioflavin S (ThS) staining was performed in order to detect fibrillar A β deposits in brain slices. After deparaffination and rehydration, series of 3 sagittal sections selected 800 μ m apart were immersed in ThS (Sigma-Aldrich) 1% solution in ethanol 75% during 30 seconds. The excess of ThS was drained followed by immersion in ThS 0.1% in 75% ethanol during 1 minute. Finally, slices were dehydrated and DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) was used as contrast staining before mounting the preparations. The number of ThS positive vessels was counted. On the other hand, the number of A β deposits bigger than 50 px² and the area (px²) occupied per deposit were quantified with the Image J software in the three sections. Data are represented as a mean of the three deep-sections. Images were obtained with a conventional fluorescence microscope (BX61, Olympus, Tokyo, Japan). Data were expressed as the number of A β positive deposits and mean size of A β positive deposits.

2.10. Immunofluorescence

Cluster of differentiation 68 (CD68) as marker of phagocytosis and Tomato lectin (TL) as vascular and microglia marker [37] were analyzed through immunofluorescence in paraffin-embedded brain sections. To this end, after deparaffination, rehydration and antigen retrieval with citrate buffer (10 mM sodium citrate, 0.05% Tween20, pH=6, 30 minutes at 95°C), slices were blocked in PBS pH= 7.4 supplemented with 10% FBS and 1% Tween 20 during 1 hour at RT. Rabbit anti-mouse CD68 antibody (Abcam) diluted 1/50 in blocking solution was incubated ON at 4°C. Next, secondary antibody anti-rabbit-AlexaFluor488 (Thermo Fisher) diluted 1/500 in blocking solution was incubated 1 hour at RT followed by incubation with Tomato lectin-DyLight564 (Vector Laboratories) diluted 1/100 in blocking solution 1 hour at RT. On the other hand, the localization of CD68 and A β was analyzed in paraffin-embedded brain sections. After the deparaffination and rehydration steps, brain slices were treated with 70% formic acid during 10 minutes followed by 3 washes of 5 minutes with PBS-1% Tween20. Then, samples were incubated in blocking solution during 1 hour at RT followed by ON incubation at 4°C with mouse anti-human A β monoclonal antibody (4G8, Biolegend) diluted 1/1000 and rabbit anti-mouse CD68 (Abcam) diluted 1/50 in blocking solution. Next, secondary antibodies anti-rabbit-AlexaFluor-488 and anti-mouse-AlexaFluor694 (Thermo Fisher) diluted 1/500 in blocking solution during 1h at RT. Finally, contrast staining was done with DAPI before mounting the preparations. Images were obtained with a conventional fluorescence microscope (BX61, Olympus). Finally, human ApoJ was analyzed in brain sections of treated animals. To this end, after the rehydration, antigen retrieval and blocking steps, brain slices were incubated ON with mouse-anti-human ApoJ (RD Systems) diluted 1/50 in blocking solution. AlexaFluor-594 was used as secondary antibody (1/500) and DAPI was used as contrast staining. Images were obtained with confocal spectral microscopy (FV1000, Olympus).

2.11. Western Blot

For the immunodetection of different protein profiles, 40 μ g of soluble or membrane-bound brain homogenates fractions were loaded in 10% acrylamide SDS-PAGE under reducing conditions (5% β -mercaptoethanol and sample heating at 95°C). Then, gel were transferred to nitrocellulose membranes with Trans-Blot Turbo transfer system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) at 1.3 amperes (A), 25 volts (V) during 10 minutes and blocking was done in 10% non-fatted milk during 1 hour at RT. Membranes were incubated in tested specific antibodies diluted in blocking solution at 4°C ON. Suitable secondary HRP-labelled antibodies diluted in blocking solution were incubated 1 hour at RT. The processing of membranes continued with its incubation with PierceECL Western Blotting Luminol/Enhancer and Stable Peroxidase

solutions (Thermo Fisher). The relative amount of the targeted protein was calculated from the quantification of the mean intensity with the ImageJ software. Immunoblotting of β -actin or glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase (GADPH) were used as loading controls. The primary antibodies used were: rabbit anti-CD68 (1/1000, Abcam), rabbit anti-GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein, 1/1000, Dako), Rabbit anti-Iba1 (Ionized calcium Binding Adapter molecule-1, 1/1000, Abcam), mouse anti-LRP1 (Lipoprotein Receptor Protein-1, 1/1000, Abcam), mouse anti-human APP (1/1000, Millipore), mouse anti-sAPP α (Soluble APP fraction- α , 1/1000, Clontech, Mountain view, CA, USA), mouse anti-sAPP β (Soluble APP fraction- β , 1/1000, Clontech), rabbit-anti RAGE (Receptor for Advanced Glycation End-products, 1/1000, Abcam), mouse anti- β -actin (1/10000, Sigma-Aldrich) or mouse anti-GADPH (1/10000, Invitrogen). The following HRP-labelled secondary antibodies were used: Anti-rabbit-HRP (1/2000, GE Healthcare Biosciences, Little Chalfont, UK), anti-mouse-HRP (1/2000, GE Healthcare Bioscience).

2.12. Statistical analysis

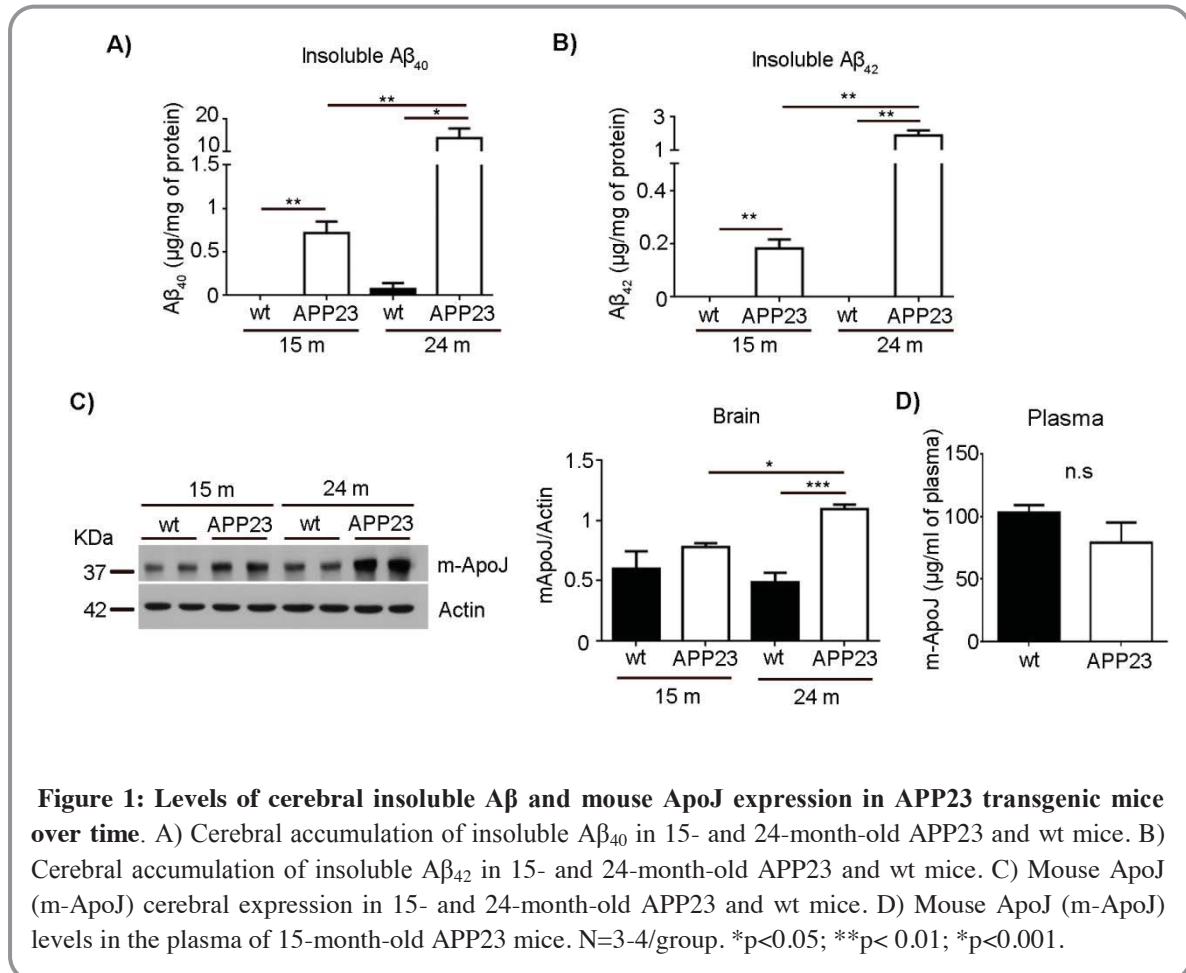
GraphPad Prism 6 and SPSS Statistic 17.0 software were used for the statistical analysis. Normality distribution was assessed by the Shapiro-Wilk normality test. The differences were assessed using t-test or ANOVA with LSD post-hoc test when appropriate. When data did not fit a normal distribution, Kruskal-Wallis test was used for multiple comparisons and Mann-Whitney test for one to one comparisons. For normal distributed data, correlations were detected using the Pearson coefficient test. A p-value < 0.05 was considered statistically significant. Data are represented as mean \pm SEM.

3. RESULTS

3.1. Expression of endogenous mouse ApoJ (m-ApoJ) in APP23 mice

APP23 mice are characterized by an increasing accumulation of both human A β ₄₀ and A β ₄₂ in the brain. This A β deposition became especially evident in very old APP23 mice (24 months old), where a 20-fold increase in insoluble A β ₄₀ and a 10-fold increase in insoluble A β ₄₂ were observed in comparison with the corresponding A β load in 15-month-old APP23 mice (Figure 1 A-B). Interestingly, this upward A β accumulation was accompanied by an increase in mouse ApoJ (m-ApoJ) levels in the brain (Figure 1C). Twenty-four-month-old APP23 mice presented significantly higher m-ApoJ brain levels than age-matched wt mice, whereas the difference between genotypes was non-significant in 15-month-old mice. In addition, as expected, this increase in brain m-ApoJ was exacerbated with age, as significant differences in m-ApoJ levels were detected between 15- and 24-month-old APP23 mice. On the other hand, no significant

differences in the plasma levels of endogenous m-ApoJ were found between genotypes in 15-month-old mice (Figure 1D).



3.2. Peripheral administration of free rApoJ and rHDL-rApoJ nanodiscs

The endogenous increase in m-ApoJ in APP23 mice in late pathological stages could be interpreted as a physiological protective mechanism to promote a reduction in A β and its clearance from the brain. In this regard, we examined whether prematurely increasing ApoJ levels could be a beneficial strategy to delay the A β deposition detected over time. Therefore, our main objective was to study the effect of peripheral administration of free rApoJ or lipidated rApoJ (rHDL-rApoJ nanodiscs) in APP23 mice. To this end, 14-month-old APP23 mice received 8 intravenous administrations of free rApoJ (1 mg/kg), rHDL-rApoJ (1 mg/kg) or saline with 2 infusions/ week (Figure 2A). The dose of 1 mg/kg of human rApoJ led to a theoretical mean increase in total circulating ApoJ levels of 20% considering the m-ApoJ levels determined in the plasma. An equal initial amount of infused rHDL-rApoJ and free rApoJ was confirmed by Western blot as shown in Figure 1B, where the α - and β - chains of rApoJ were

observed at ≈ 37 KDa. Next, the circulating concentration of human rApoJ (h-rApoJ) was quantified by ELISA. A significant increase in plasma levels of h-rApoJ was observed in both rHDL-rApoJ- and free rApoJ-treated mice, whereas human ApoJ was not detected in the saline group (Figure 2C), as expected. In addition, no significant differences in h-rApoJ between the rHDL-rApoJ- and free rApoJ-treated groups were found in the plasma 30 minutes after the last administration. On the other hand, levels of h-rApoJ in brain homogenates were undetectable by ELISA (< 70 pg/ml) (Figure 2D). Nevertheless, immunofluorescence analysis revealed specific staining for h-ApoJ in occasional vessels from the brains of both rHDL-rApoJ- and free rApoJ-treated mice. Indeed, h-ApoJ from the intravenous treatment was found to be attached to the luminal side of leptomenigeal arteries. In contrast, brains from saline-treated mice did not present human ApoJ staining (Figure 2E).

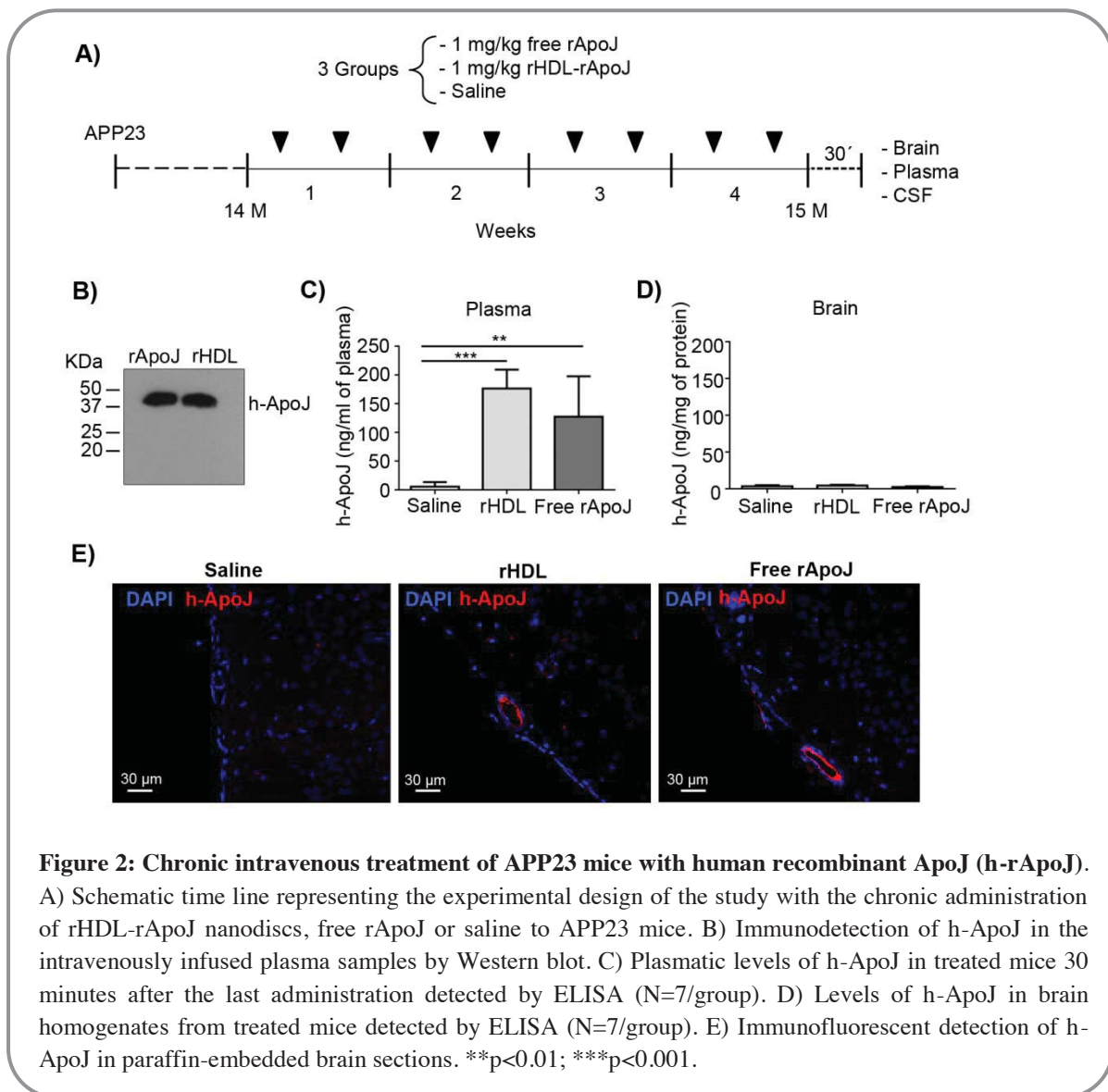
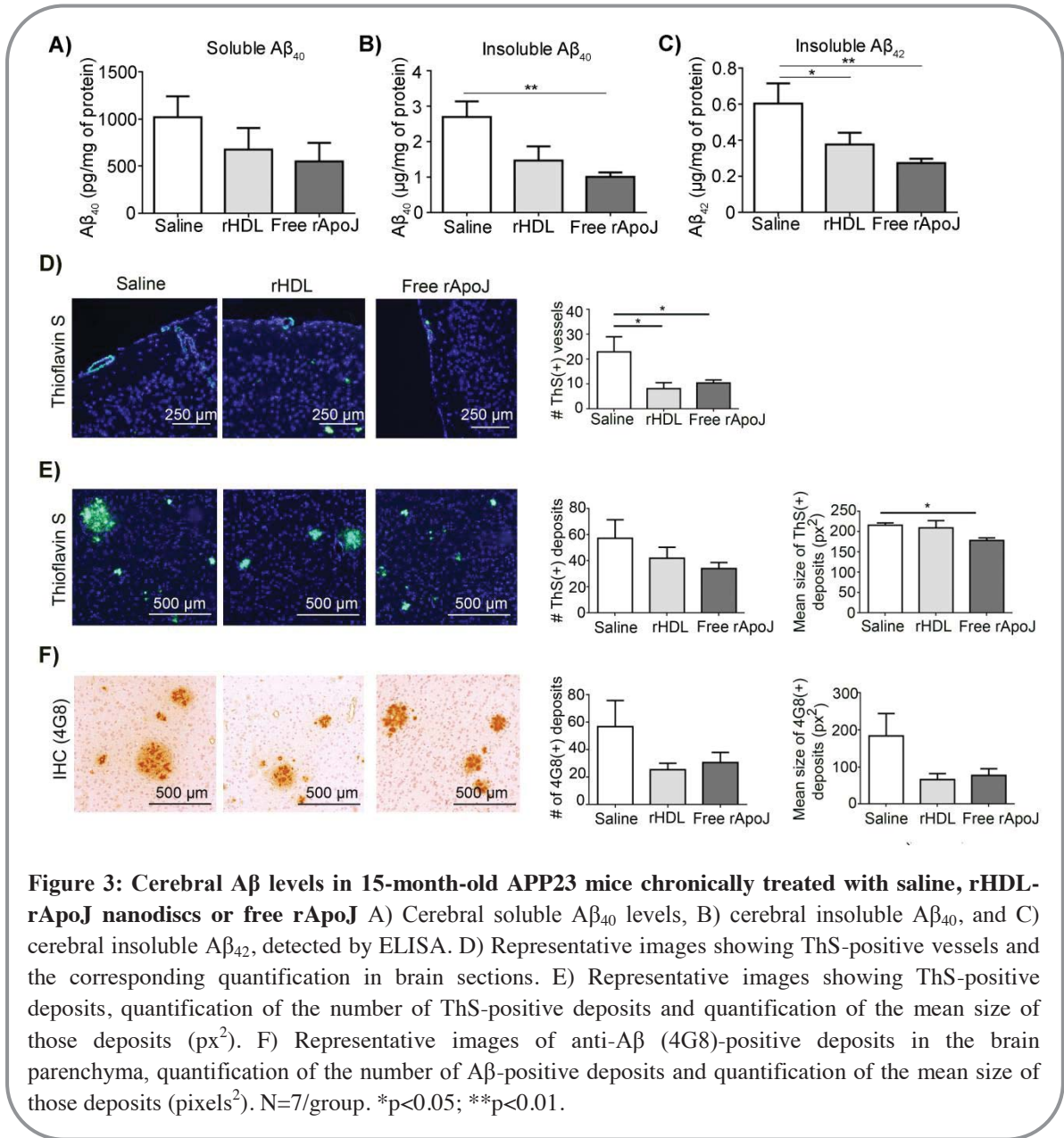


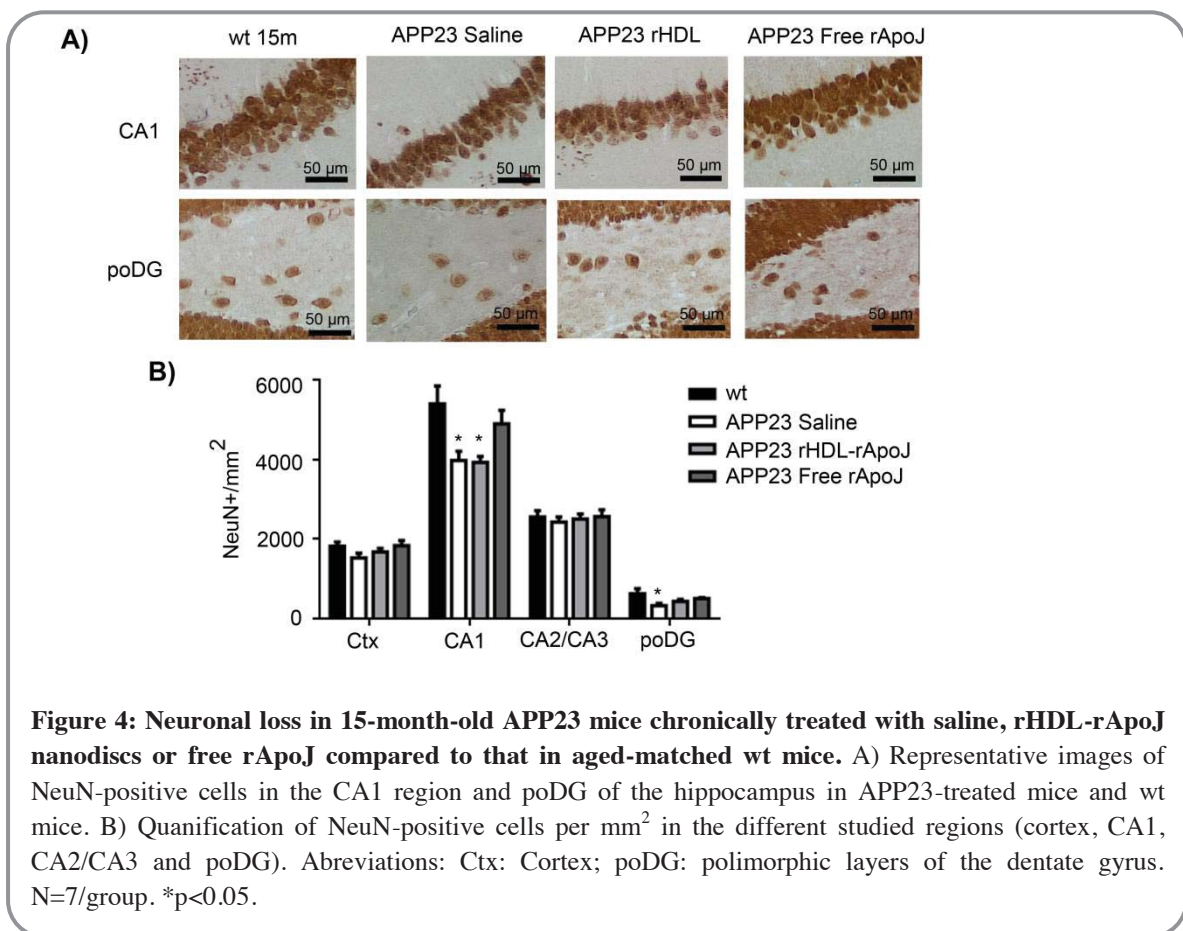
Figure 2: Chronic intravenous treatment of APP23 mice with human recombinant ApoJ (h-rApoJ). A) Schematic time line representing the experimental design of the study with the chronic administration of rHDL-rApoJ nanodiscs, free rApoJ or saline to APP23 mice. B) Immunodetection of h-ApoJ in the intravenously infused plasma samples by Western blot. C) Plasmatic levels of h-ApoJ in treated mice 30 minutes after the last administration detected by ELISA (N=7/group). D) Levels of h-ApoJ in brain homogenates from treated mice detected by ELISA (N=7/group). E) Immunofluorescent detection of h-ApoJ in paraffin-embedded brain sections. **p<0.01; ***p<0.001.

3.3. Cerebral A β levels and neuronal loss in APP23 mice



The efficacy of chronic rApoJ-based treatments in APP23 mice was first evaluated in terms of cerebral A β load. Levels of A β_{40} and A β_{42} in soluble and insoluble fractions of brain homogenates were quantified by ELISA after the treatments (Figure 3A-C). The levels of soluble A β_{40} were not significantly different among treatment groups, although a trend towards a reduction in soluble A β_{40} in free rApoJ-treated mice was observed (p=0.09). Soluble A β_{42} levels were under the detection limit (< 6 pg/ml). Interestingly, we observed lower levels of both insoluble A β_{40} and A β_{42} in those animals treated with free rApoJ in comparison with the levels in the saline-treated group (Figure 3B-C). However, after the rHDL-rApoJ nanodisc

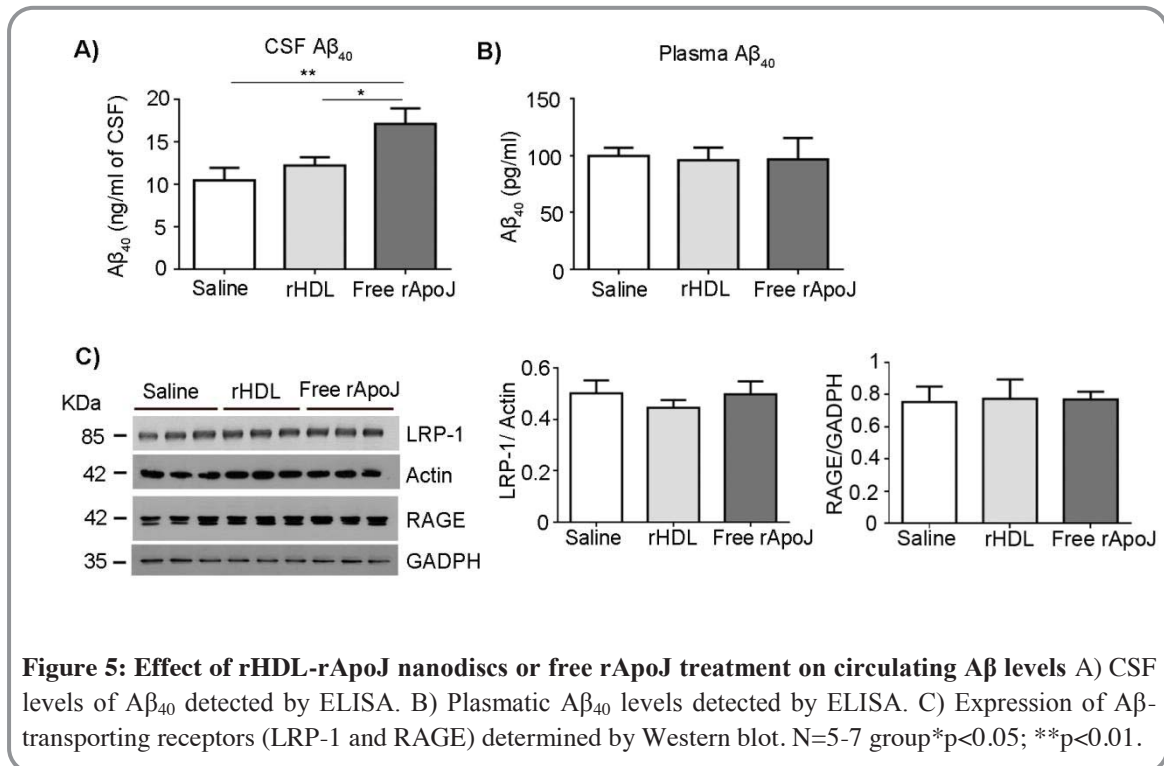
treatment, insoluble $A\beta_{40}$ levels remained unaltered, whereas brains from rHDL-rApoJ-treated mice also presented lower insoluble $A\beta_{42}$ brain levels than brains from the saline-treated group (Figure 3B-C). Regarding the cerebral $A\beta$ distribution, brains from mice treated with rHDL-rApoJ and free rApoJ presented significantly fewer CAA-affected arteries detected by ThS staining than those treated with saline (Figure 3D). Although no differences were observed in the number of parenchymal $A\beta$ deposits after rApoJ-based treatments (Figure 3E-F), the mean size of fibrillar $A\beta$ accumulations (ThS-positive deposits) was reduced in those mice treated with free rApoJ (Figure 3E). Finally, the number and size of parenchymal $A\beta$ deposits, as shown by specific immunostaining against $A\beta$, did not statistically differ among groups, although a clear tendency towards fewer and smaller deposits after both rApoJ-based treatments was observed (Figure 3F).



Neuronal loss is one of the neuropathological hallmarks in AD [38], and the APP23 mouse model has been described to show neuronal loss in the CA1 region of the hippocampus and in the polymorphic layers of the dentate gyrus (poDG) beginning at 12 month of age [36]. Thus, we measured the effect of rHDL-rApoJ and free rApoJ treatments on neurodegeneration in the cortex and hippocampus through NeuN immunostaining. In comparison with age-matched wild-

type (wt) mice, 15-month-old APP23 mice exhibited neuronal reduction in the CA1 and poDG (Figure 4B). Importantly, treatment with rHDL-rApoJ prevented the neuronal loss in the poDG, whereas treatment with free rApoJ was able to ameliorate the neuronal loss in both the CA1 and poDG (Figure 4).

3.4. Effect on A β production and clearance



To describe the underlying mechanism explaining the reduction in insoluble A β and the mitigation of neuronal loss after ApoJ-based treatments, we first explored some of the classical clearance mechanisms of cerebral A β . Because the increase in fibrillary A β in the brain is specifically associated with low A β species in the CSF of AD and CAA patients [39, 40], we analyzed the A β levels in the CSF 30 minutes after the last treatment administration in APP23 mice. We observed a significant increase in CSF A β_{40} levels in those mice treated with free rApoJ compared to the levels in the rest of the groups (Figure 5A). On the other hand, because the clearance across the BBB through specific receptors is one of the major A β elimination pathways [10], we measured the A β_{40} levels in the plasma; however, no differences were detected among the groups 30 minutes after the last infusion (Figure 5B). Circulating levels of A β_{42} were undetectable in APP23 mice in all cases. In addition, we explored the expression of different brain receptors previously described to mediate the transport of A β across the BBB [10]. The expression of neither LRP-1 nor RAGE changed among groups (Figure 5C). On the

other hand, we determined that the lower levels of insoluble A β in the brain obtained after peripheral rApoJ treatment could not be explained by altered APP transgene expression or the A β peptide production process. In this regard, we confirmed that the expression of APP was unaltered in the brains of mice that received the different treatments. The products of APP processing, mediated by α -secretase, β -secretase and γ -secretase, were also unchanged among the groups (Supplemental Figure 1).

3.5. Inflammatory response

The neuroinflammatory state of the mice that received ApoJ-based treatments was first analyzed by exploring the expression levels of specific cellular markers in brain homogenates. In this regard, we determined that the presence of the activated astrocytic protein GFAP did not differ after treatments (Figure 6A). On the other hand, we detected an increase in the levels of the CD68 lysosomal marker in the brains of mice treated with free ApoJ, whereas the expression of the resident microglial marker Iba-1 was not significantly different among groups (Figure 6B). The location of CD68 expression was determined by immunofluorescence with double-staining with anti-CD68 and anti-A β (4G8) antibodies. The CD68 signal was observed in the periphery of parenchymal A β -positive deposits, showing higher expression levels in those mice treated with free rApoJ (Figure 6C). Furthermore, double-staining of CD68 with tomato lectin (TL) confirmed the presence of this lysosomal marker in microglial cells [37]. Thus, CD68 staining was observed in TL-positive cells surrounding A β deposits (Figure 6D), suggesting that the increase in CD68 expression is a result of the upregulation of a phagocytic phenotype in innate immune cells around A β parenchymal accumulations. On the other hand, TREM-2 is also expressed in phagocytic cells and has been proposed to play an important role in AD pathology [41, 42]. In this context, TREM-2 levels were quantified in APP23 brain homogenates, and a significant increase in TREM-2 concentration was detected in free rApoJ treated-mice in comparison with the concentration in rHDL-rApoJ nanodisc-treated brains (Figure 6E). Moreover, TREM-2 levels positively correlated with CD68 expression (Figure 6F), highlighting the possible associations of both markers in the phagocytic mechanism activated in microglia by peripheral free rApoJ.

On the other hand, a multiplexed ELISA was performed to detect the global inflammatory state in the brain parenchyma (the complete list of molecules analyzed can be found in Supplemental Table 1). Despite the phagocytic phenotype in microglial cells found after the free rApoJ treatment, we did not observe an increase in the levels of prevalent brain cytokines or inflammatory molecules. In fact, we detected reduced levels of interleukin-4 (IL4), interleukin 17 (IL17) and KC (mouse homologue of CXCL1) in the brains of those mice treated with rApoJ. Additionally, the brains from rHDL-rApoJ-treated mice also presented reduced levels of

macrophage inflammatory protein (MIP-1 α) compared to the brains from saline-treated mice (Table 1).

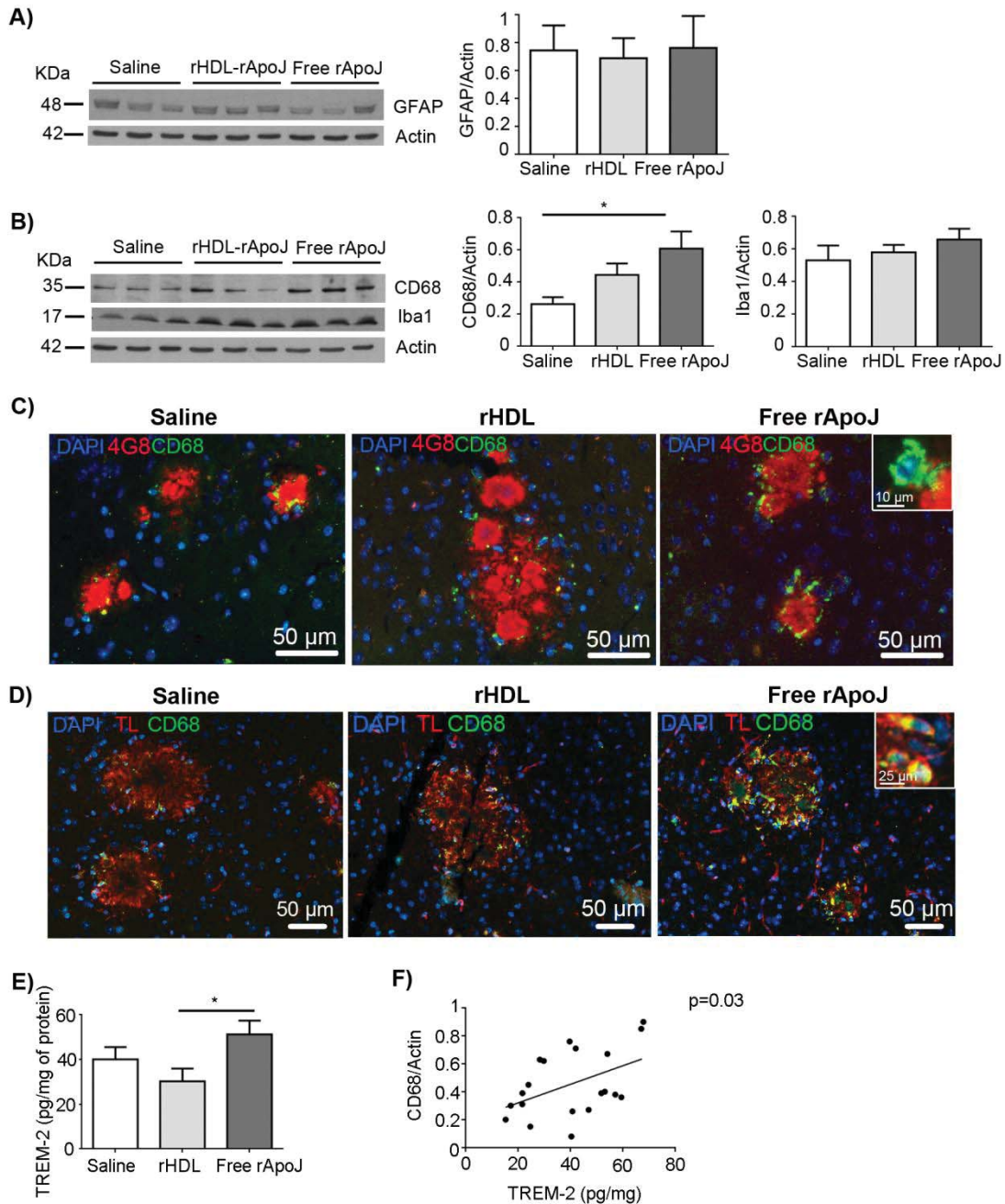


Figure 6: Levels of astrocytic and microglial markers in APP23 mice chronically treated with saline, rHDL-rApoJ nanodiscs or free rApoJ A) Expression of reactive astrocyte marker GFAP in APP23-brain homogenates after treatments. B) Expression of microglial markers (CD68 and Iba-1) in APP23-brain homogenates after treatments. N=7/group. C) Representative immunofluorescence images showing the localization of CD68 around anti- $A\beta$ (4G8) positive deposits in brain slices of APP23-treated mice. D) Representative immunofluorescence images showing the localization of CD68 with Tomato Lectin (TL, as microglial marker) positive cells in brain slices of APP23-treated mice. E) Levels of TREM-2 in brain homogenates detected by ELISA. F) Correlation of CD68 levels with the concentration of TREM-2 in brain homogenates of APP23-treated mice. N=7/group * $p < 0.05$.

Table 1: Effect of rHDL-rApoJ nanodiscs or free rApoJ treatment in brain inflammatory status analyzed by multiplexed ELISA. N=4-7/group. *p<0.05, **p<0.01 represent statistically significant differences compared to the saline treated-group. \$\$p<0.01 represents significant differences between rHDL-rApoJ and free rApoJ treated-groups.

Inflammatory Markers (pg/mg)	Saline	rHDL-rApoJ	Free rApoJ	p value
FGF-Basic	984.4±154.6	895.6±113.3	560.2±151.4	p=0.108
IL-1β	85.28±12.17	50.86±3.75	72.91±11.43	p=0.080
IL2	151.0±13.09	116.7±14.22	125.2±14.49	p=0.222
IL4	161.0±24.05	105.3±9.68	85.42±19.02*	p=0.043
IL5	141.7±26.35	130.61±27.54	148.0±21.31	p=0.893
IL6	203.1±22.15	177.7±28.82	176.3±19.5	p=0.656
IL13	21.31±3.40	17.68±2.34	12.63±3.22	p=0.171
IL17	20.01±2.33	13.9±1.37*	10.23±1.08**	p=0.004
IFN-γ	127.8±15.53	89.81±13.28	94.08±10.68	p=0.123
IP10	54.4±4.34	44.48±5.11	46.71±5.05	p=0.330
KC	1558±115.5	1206±112.0*	1043±104.6**	p=0.012
MIG	81.65±8.21	57.81±6.91	61.48±8.72	p=0.090
TNF-α	127.2±13.46	125.2±9.43	144.7±17.79	p=0.620
VEGF	17.67±2.36	14.27±2.35	10.72±1.22	p=0.080
MCP-1	36.1±3.93	24.31±2.84	28.19±3.12	p=0.060
MIP	102.3±38.01	30.85±17.39**	103.4±30.02\$\$	p=0.002

4. DISCUSSION

Despite the high socio-economic impact of AD and CAA, these diseases lack an effective disease-modifying therapy. The principal aim of our study was to test the potential protective role of ApoJ in an experimental model of AD/CAA. To this end, we first considered the need to evaluate the effect of progressive A β deposition on cerebral endogenous mouse ApoJ levels. Indeed, we confirmed that, in the APP23 mouse model, the accumulation of both insoluble A β_{40} and A β_{42} was accompanied by an increase in m-ApoJ expression in the brain. This increase in ApoJ has also been described in AD and CAA patients [43, 44], indicating the suitability of the APP23 mouse model for the study of the molecular mechanisms implicated in cerebral β -amyloidosis. Currently, whether this increase in the brain promotes or prevents A β

accumulation and toxicity is unclear. Nevertheless, the elevated circulating levels of plasma ApoJ observed in AD patients has been proposed to be a protective response against pathologic A β deposition [26]. To test this hypothesis, we treated 14-month-old (middle-age) APP23 mice with human recombinant ApoJ (rApoJ), when mouse ApoJ levels elevation is not yet significant. This approach allowed us to study the effect of an early increase in peripheral ApoJ on A β deposition, neuronal loss and neuroinflammation. Indeed, we promoted an elevation in circulating levels of ApoJ in mice following two different strategies: intravenous administration of free rApoJ and rHDL-rApoJ nanodiscs. Several studies support the relevance of cholesterol and HDL metabolism in AD [45], and we previously observed a greater ability of rHDL-rApoJ nanodiscs than of free rApoJ to promote the efflux of cholesterol esters *in vitro* [31]. Therefore, we considered that the peripheral administration of rHDL-rApoJ could shed light on the effect of lipidation in the functionality of ApoJ in cerebral β -amyloidosis.

After one month of chronic administration of rApoJ-based treatments, we confirmed the presence of h-rApoJ in the plasma. However, we were not able to detect the human protein in mouse brains 30 minutes after the last administration in any case. ApoJ has been previously described to be able to cross the BBB [46]. Based on this, we expected that the infused rApoJ would enter the brain parenchyma; however, the human protein was only detected by immunofluorescence in the luminal side of occasional leptomeningeal vessels in both ApoJ-based treatment groups. In fact, we previously observed specific vascular accumulation of rHDL-rApoJ nanodiscs in very old (28 month) APP23 mice [31]. After the corresponding peripheral chronic treatment in transgenic mice, the cerebral A β load was evaluated. Free rApoJ-treated mice showed a significant prevention of both insoluble A β ₄₀ and A β ₄₂ accumulation in comparison with the saline-treated group. In contrast, treatment with rHDL-rApoJ nanodiscs resulted in the prevention of insoluble A β ₄₂ accumulation. When we analyzed the distribution of A β , we observed a reduced number of CAA-affected vessels in both rApoJ-based treatment groups. This result was in accordance with a previously published study [29], where authors described a marked exacerbation of CAA in APP/PS1/*Clu*^{-/-} mutant mice. However, this same report showed a clear reduction in parenchymal A β accumulation and total A β in APP/PS1 mice lacking *Clu* [29]. In this regard, our results obtained after the infusion of human rApoJ in APP23 mice are in opposition to the effect observed by Wojtas et al., since we observed a significant reduction in total insoluble A β accompanied by a decrease in the size of the fibrillar A β deposits. In addition, intravenous infusion of free ApoJ induced an increase in A β levels in the CSF, which might be considered to be an indicator of A β mobilization from the brain parenchyma. Therefore, no obvious conclusions can be drawn from experiments promoting the elevation or lack of ApoJ in APP transgenic models. Indeed, results from other studies further complicate the issue; for example, deletion of both *ApoE* and *Clu* in the PDAPP

mouse model (PDAPP/*ApoE*^{-/-}/*Clu*^{-/-}) was described to result in earlier onset and markedly increased A β deposition, whereas the individual deficiency of *ApoE* or *Clu* alone led to lower levels of fibrillary deposits [17]. Alternatively, in agreement with our study, intraventricular administration of an ApoJ mimetic peptide was recently proposed to promote the amelioration of both parenchymal and vascular A β accumulation and improve cognitive function in the Tg6799 mouse model [47]. At this juncture, the role of ApoJ in A β -associated pathologies seems consistent, although whether its implication is beneficial or detrimental referring to parenchymal A β deposition still needs further investigation. In fact, the role of apolipoproteins in cerebral β -amyloidosis is characterized by its high complexity, and the unclear participation of ApoE in such pathologies is a good example of this. Although *APOE* is the strongest genetic risk for developing sporadic AD and CAA [15, 16], the mechanism underlying the modulation of A β deposition is still an enigma [18]. Several efforts have been made to unravel the complex puzzle of the role of ApoE in cerebral β -amyloidosis, although there is no consensus whether the modulation of ApoE levels might be a promising treatment option for AD to date. In this context, lack of murine *ApoE* in cerebral β -amyloidosis mouse models resulted in a significant delay in A β deposition [48]. In contrast, expression of human *APOE* culminated in the prevention of A β accumulation [7], although this effect was dependent on the expressed *APOE* isoform [49]. On the other hand, intravenous chronic administration of an ApoE mimetic peptide in APP/PS1 mice generated a reduction in A β deposits and amelioration of cognitive deficits [50]. Moreover, intravenous chronic administration of human ApoE3 formulated in rHDL nanodiscs resulted in a reduction in A β accumulation and a rescue of cognitive impairment in the aging mouse model SAMP8 [51]. Thus, as with the role of ApoE, the role of ApoJ in the deposition of A β is complex and seems to be dependent on the origin of ApoJ (mouse or human) and the distribution of the apolipoprotein in the brain parenchyma, cerebrovasculature and periphery.

Another beneficial effect of chronic IV treatment with free rApoJ in APP23 mice was the prevention of neuronal loss in the CA1 and poDG areas of the hippocampus. Free rApoJ was more effective than rHDL-rApoJ nanodiscs, as the treatment with rHDL-rApoJ was only able to prevent neurodegeneration in the poDG of the hippocampus. Due to the high correlation between A β deposits and neurodegeneration [52], the reduced A β levels observed in free rApoJ-treated mice may explain the amelioration of neuronal death. Once again, as with the effect on A β load after treatments, rHDL-rApoJ was less effective than treatment with the free protein, suggesting that the structural modification in ApoJ due to its lipidation alters its ability to activate protective pathways within the brain. Then, the effect of the infusion rHDL-rApoJ would be mainly confined to its beneficial role in attenuating CAA.

The inflammatory state of mouse brains after ApoJ-based treatments was also determined. Treatment with free rApoJ or rHDL-ApoJ did not induce changes in the expression of the reactive astrocytic marker (GFAP). Likewise, the expression of microglial marker Iba-1 was not altered among groups, but a significant increase in the expression of brain CD68 in free rApoJ-treated mice was observed. CD68 was localized surrounding A β parenchymal deposits in cells positive for the TL, which stains microglial cells among other innate immune cells [37, 53]. In this context, CD68 is a lysosomal protein that has been widely used as a marker of activated microglia [54]. Accordingly, ApoJ has been described to activate microglia both under *in vitro* and *in vivo* conditions [55].

Microglia have been extensively demonstrated to participate in A β elimination through phagocytosis, and the stimulation of the immune response in the CNS ameliorates A β deposition [56, 57]. Therefore, on one hand, promoting the phagocytic ability of microglia could be a potential strategy to prevent cerebral A β deposition. However, the exact role of microglia in cerebral β -amyloidosis is under discussion, since cultured microglia have been described to produce high levels of neurotoxic cytokines in response to A β stimulation [58] and elimination of microglia results in a reduction in neuronal loss *in vivo* [59]. On the other hand, TREM2 is a receptor known to be expressed in innate immune cells implicated in phagocytosis mechanisms [41]. Genetic variations in *TREM2* have been identified as a strong risk factor for developing AD [41]. In addition, ApoJ/A β complexes have been shown to be able to be phagocytosed by microglia in a TREM2-dependent manner [60]. Hence, we examined whether an increase in ApoJ levels could modify the expression of brain TREM2 in our model. We observed higher TREM2 levels in the brains of free ApoJ-treated mice and a positive correlation between TREM2 and CD68 expression, proposing a linked mechanism between these two phagocytic markers. Indeed, overexpression of TREM2 in cerebral β -amyloidosis mouse models prevented cerebral A β deposition [42, 61]. On the other hand, although TREM2 has been assumed to be expressed in microglia [60], recent evidence suggests that TREM2 in the human brain is expressed by infiltrated peripheral monocytes [62]. In fact, the importance of bone marrow-derived macrophages in A β elimination is acquiring increasing interest [63]. In this context, in our study, we were not able to discriminate between microglia and bone marrow-derived macrophages; thus, we cannot rule out the peripheral origin of phagocytic cells enhanced by peripheral rApoJ.

To test if the stimulation of phagocytic pathways in microglia was accompanied by an increased release of inflammatory molecules, we analyzed the overall inflammatory state of brains after treatments. In fact, lower neuroinflammation was observed in brains from rApoJ-treated mice than in saline treated-APP23 mouse brains, as detected by the reduced expression of IL4, IL17,

and KC (mouse homologue of CXCL1) in both free rApoJ- and rHDL-rApoJ-treated mice. In this context, higher expression of IL17 has been related to BBB disruption and neurotoxicity [64, 65], and the KC chemokine has been related to granulocyte adhesion to brain capillaries [66, 67]. On the other hand, IL4 has been described as an anti-inflammatory cytokine that seems to play a compensatory role in cerebral β -amyloidosis pathology, although its brain regulation is still under debate [68, 69]. These results are in agreement with previous studies that demonstrated anti-inflammatory and anti-apoptotic properties of ApoJ/clusterin [70]. The fact that increased levels of circulating ApoJ leads to beneficial effects in the brain is also in accordance with growing evidence supporting the direct impact of peripheral metabolic and inflammatory alterations in brain homeostasis and neurodegenerative diseases [71–73].

5. CONCLUSIONS

In summary, an early increase in circulating rApoJ levels in APP23 mice induced a significant prevention of CAA and cerebral A β deposition, especially affecting the insoluble pool of both A β ₄₀ and A β ₄₂. Chronic administration of ApoJ-based treatments did not alter APP expression or its processing. Likewise, no differences were observed in the expression of classical A β receptors at the BBB. Thus, we suggest that peripheral rApoJ promotes the amelioration of cerebral β -amyloidosis by an upregulation of specific phagocytic pathways in microglial cells without promoting a release of neurotoxic molecules. Nevertheless, the precise molecular mechanism activated by peripheral ApoJ that mediate the stimulation of the phagocytic phenotype in microglia needs to be elucidated in future studies.

6. LIST OF ABBREVIATIONS

A β : Amyloid- β ; **AD**: Alzheimer's Disease; **ApoE**: Apolipoprotein E; **ApoJ**: Apolipoprotein J; **APP**: Amyloid Precursor Protein; **BBB**: Blood Brain Barrier; **BCA**: Biocinchoninic Acid Assay; **CA**: Cornu Ammonis; **CAA**: Cerebral Amyloid Angiopathy; **CHOL**: Cholesterol; **CD68**: Cluster of differentiation 68; **CLU**: Clusterin (Also known as ApoJ); **CSF**: Cerebrospinal Fluid; **CTF-APP**: C-Terminal Fraction of Amyloid Precursor Protein; **DAPI**: 4',6-Diamino-2-phenylindole; **DMPC**: 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; **EDTA**: Ethylenediaminetetraacetic acid; **ELISA**: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; **FBF-Basic**: Basic Fibroblast Growth Factor; **FBS**: Fetal Bovine Serum; **GADPH**: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; **GFAP**: Glial Fibrillary Acidic Protein; **GM-CSF**: Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor; **GWAS**: Genome Wide Association Study; **h-ApoJ**: Human ApoJ; **HEK-293T**: Human Embryonic Kidney cells-293T; **HDL**: High Density Lipoprotein; **HRP**: Horseradish Peroxidase; **Iba-1**: Ionized calcium Binding Adaptor-1; **ICH**: Intracerebral Hemorrhage; **IDE**: Insulin Degrading Enzyme; **IFN- γ** : Interferon- γ ; **IHC**: Immunohistochemistry; **IL**: Interleukin; **IP-10**: Interferon- γ induced Protein-10; **IV**: Intravenous; **KC**: Keratinocyte Chemoattractant; **LRP-1**: Lipoprotein Receptor Protein-1; **LRP-2**: Lipoprotein Receptor Protein-2; **m-ApoJ**: Mouse endogenous ApoJ; **MCP-1**: Monocyte Chemoattractant Protein-1; **MIG**: Monokine Induced by Interferon- γ ; **MIP-1 α** : Macrophage Inflammatory Protein-1 α ; **NEP**: Neprilysin; **NeuN**: Neuron Nuclei; **ON**: Overnight; **poDG**: Polymorphic layer of Dentate Gyrus; **RAGE**: Receptor for Advanced Glycation End-products; **RT**: Room Temperature; **rApoJ**: Recombinant ApoJ; **rHDL**: Reconstituted HDL; **rHDL-rApoJ**: Reconstituted HDLs formulated with recombinant ApoJ; **sAPP α** : Soluble fraction of Amyloid Precursor Protein- α ; **sAPP β** : Soluble fraction of Amyloid Precursor Protein- β ; **SDS-PAGE**: Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis; **TBS**: Tris Buffer Saline; **ThS**: Thioflavin S; **TL**: Tomato Lectin; **TNF- α** : Tumor Necrosis Factor- α ; **TREM-2**: Triggering Receptor Expressed Myeloid cells-2; **VEGF**: Vascular Endothelial Growth Factor; **Wt**: Wild type.

7. DECLARATIONS

7.1. Ethics approval and consent to participate

All procedures were approved by the Ethics Committee for animal Experimentation of Vall d'Hebron Research Institute (CEEA 78/13) and conducted in compliance with the Spanish legislation and in accordance with the Directives of the European Union. Animals were grown in a climate-controlled environment on a 12-hour light/dark cycles with food and water available *ad libitum*.

7.2. Consent of publication

Not applicable

7.3. Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

7.4. Competing interest

The authors declare that they have no competing interest.

7.5. Funding

This work has been funded by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) [PI14/01134 and PI13/00364], co-financed by the European Regional Development Fund, (FEDER) and Fundació La Marató de TV3 [40/U/2014]. The Neurovascular Research Laboratory is part of the *INVICTUS+* network, ISCIII, Spain [RD16/0019/0021]. M.H-G is supported by the Miguel Servet programme, ISCIII, Spain [CP12/03259]. ICN2 acknowledges the support of the Spanish MINECO through the Severo Ochoa Centres of Excellence Programme, under Grant SEV-2013-0295.

7.6. Author's contributions

MHG designed and coordinated the study. JM, DM, MCS and SFR participated in the design of the study. SFR and PM performed most of experiments, collected and analyzed data and wrote the manuscript. MS actively participated in the experiments and GC was responsible of mice colony care and participated in data acquisition. MCS and JLSQ participated in the preparation of rHDL-rApoJ nanodiscs. All authors read and approved the final manuscript.

7.7- Acknowledgements

Not applicable

8. BIBLIOGRAPHY

1. Revesz T, Holton JL, Lashley T, Plant G, Frangione B, Rostagno A, et al. Genetics and molecular pathogenesis of sporadic and hereditary cerebral amyloid angiopathies. *Acta Neuropathol.* 2009;118:115–30. doi:10.1007/s00401-009-0501-8.
2. Thal DR, Rüb U, Orantes M, Braak H. Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology.* 2002;58:1791–800. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12084879>. Accessed 11 Feb 2018.
3. Wilson D, Charidimou A, Werring DJ. Advances in understanding spontaneous intracerebral hemorrhage: Insights from neuroimaging. *Expert Review of Neurotherapeutics.* 2014;14:661–78.
4. Reitz C, Brayne C, Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.* 2011;7:137–52. doi:10.1038/nrneurol.2011.2.
5. Attems J, Jellinger K, Thal DR, Van Nostrand W. Review: sporadic cerebral amyloid angiopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2011;37:75–93. doi:10.1111/j.1365-2990.2010.01137.x.
6. Sinha S, Lieberburg I. Cellular mechanisms of beta -amyloid production and secretion. *Proc Natl Acad Sci.* 1999;96:11049–53. doi:10.1073/pnas.96.20.11049.
7. Fryer JD, Simmons K, Parsadanian M, Bales KR, Paul SM, Sullivan PM, et al. Human apolipoprotein E4 alters the amyloid-beta 40:42 ratio and promotes the formation of cerebral amyloid angiopathy in an amyloid precursor protein transgenic model. *J Neurosci.* 2005;25:2803–10. doi:10.1523/JNEUROSCI.5170-04.2005.
8. Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, Munsell L, Kasten T, Morris JC, et al. Decreased clearance of CNS β -amyloid in Alzheimer's disease. *Science (80-).* 2010;330:1774.
9. Jha NK, Jha SK, Kumar D, Kejriwal N, Sharma R, Ambasta RK, et al. Impact of Insulin Degrading Enzyme and Neprilysin in Alzheimer's Disease Biology: Characterization of Putative Cognates for Therapeutic Applications. *J Alzheimer's Dis.* 2015;48:891–917. doi:10.3233/JAD-150379.
10. Deane R, Bell RD, Sagare A, Zlokovic B V. Clearance of amyloid-beta peptide across the blood-brain barrier: implication for therapies in Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2009;8:16–30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19275634>. Accessed 14 Feb 2018.
11. Hawkes CA, Jayakody N, Johnston DA, Bechmann I, Carare RO. Failure of Perivascular Drainage of β -amyloid in Cerebral Amyloid Angiopathy. *Brain Pathol.* 2014;24:396–403. doi:10.1111/bpa.12159.
12. Yang C-N, Shiao Y-J, Shie F-S, Guo B-S, Chen P-H, Cho C-Y, et al. Mechanism mediating oligomeric A β clearance by naïve primary microglia. *Neurobiol Dis.* 2011;42:221–30. doi:10.1016/j.nbd.2011.01.005.
13. Jones RS, Minogue AM, Connor TJ, Lynch MA. Amyloid- β -Induced Astrocytic Phagocytosis is

- Mediated by CD36, CD47 and RAGE. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2013;8:301–11. doi:10.1007/s11481-012-9427-3.
14. Salter MW, Stevens B. Microglia emerge as central players in brain disease. *Nat Med.* 2017;23:1018–27. doi:10.1038/nm.4397.
15. Nicoll JAR, McCarron MO. APOE gene polymorphism as a risk factor for cerebral amyloid angiopathy-related hemorrhage. *Amyloid.* 2001;8 Suppl 1:51–5.
16. Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, et al. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:1977–81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8446617>.
17. DeMattos RB, Cirrito JR, Parsadanian M, May PC, O'Dell MA, Taylor JW, et al. ApoE and clusterin cooperatively suppress A β levels and deposition: evidence that ApoE regulates extracellular A β metabolism in vivo. *Neuron.* 2004;41:193–202. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14741101>.
18. Kim J, Basak JM, Holtzman DM. The Role of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease. *Neuron.* 2009;63:287–303.
19. Schwarz M, Spath L, Lux CA, Paprotka K, Torzewski M, Dersch K, et al. Potential protective role of apoprotein J (clusterin) in atherogenesis: binding to enzymatically modified low-density lipoprotein reduces fatty acid-mediated cytotoxicity. *Thromb Haemost.* 2008;100:110–8. doi:10.1160/TH07-12-0737.
20. Song HB, Jun HO, Kim JH, Yu YS, Kim KW, Min BH, et al. Anti-apoptotic effect of clusterin on cisplatin-induced cell death of retinoblastoma cells. *Oncol Rep.* 2013;30:2713–8.
21. McDonald JF, Nelsestuen GL. Potent inhibition of terminal complement assembly by clusterin: Characterization of its impact on C9 polymerization. *Biochemistry.* 1997;36:7464–73.
22. Beeg M, Stravalaci M, Romeo M, Carrá AD, Cagnotto A, Rossi A, et al. Clusterin Binds to A β 1-42 Oligomers with High Affinity and Interferes with Peptide Aggregation by Inhibiting Primary and Secondary Nucleation. *J Biol Chem.* 2016;291:6958–66. doi:10.1074/jbc.M115.689539.
23. Yerbury JJ, Poon S, Meehan S, Thompson B, Kumita JR, Dobson CM, et al. The extracellular chaperone clusterin influences amyloid formation and toxicity by interacting with prefibrillar structures. *FASEB J.* 2007;21:2312–22.
24. Howlett DR, Hortobágyi T, Francis PT. Clusterin associates specifically with A β 40 in Alzheimer's disease brain tissue. *Brain Pathol.* 2013;23:623–32. doi:10.1111/bpa.12057.
25. Lambert J-C, Heath S, Even G, Campion D, Sleegers K, Hiltunen M, et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 2009;41:1094–9. doi:10.1038/ng.439.
26. Nelson AR, Sagare AP, Zlokovic B V. Role of clusterin in the brain vascular clearance of amyloid- β . *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114:8681–2. doi:10.1073/pnas.1711357114.
27. Schrijvers EMC, Koudstaal PJ, Hofman A, Breteler MMB. Plasma clusterin and the risk of Alzheimer disease. *JAMA.* 2011;305:1322–6. doi:10.1001/jama.2011.381.
28. DeMattos RB, O'dell MA, Parsadanian M, Taylor JW, Harmony JAK, Bales KR, et al. Clusterin promotes amyloid plaque formation and is critical for neuritic toxicity in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:10843–8. doi:10.1073/pnas.162228299.
29. Wojtas AM, Kang SS, Olley BM, Gatherer M, Shinohara M, Lozano PA, et al. Loss of clusterin shifts amyloid deposition to the cerebrovasculature via disruption of perivascular drainage pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114:E6962–71. doi:10.1073/pnas.1701137114.
30. de Silva H V, Stuart WD, Duvic CR, Wetterau JR, Ray MJ, Ferguson DG, et al. A 70-kDa apolipoprotein designated ApoJ is a marker for subclasses of human plasma high density lipoproteins. *J*

Biol Chem. 1990;265:13240–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2376594>.

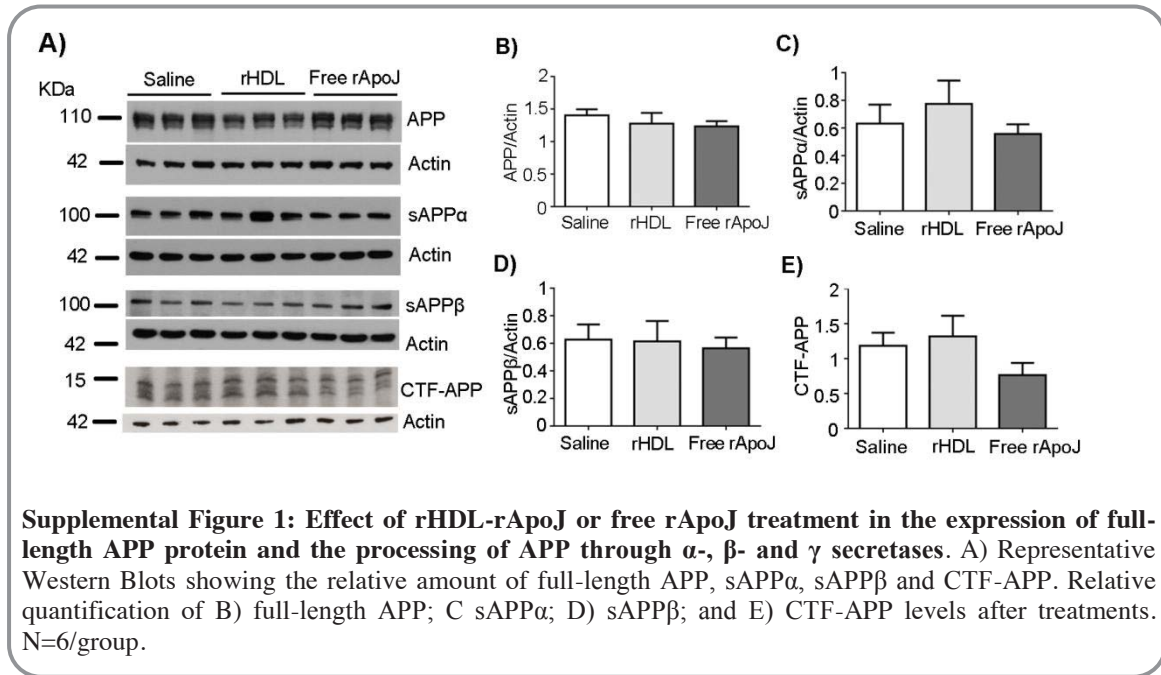
31. Fernández-De-Retana S, Cano-Sarabia M, Marazuela P, Sánchez-Quesada JL, Garcia-Leon A, Montañola A, et al. Characterization of ApoJ-reconstituted high-density lipoprotein (rHDL) nanodisc for the potential treatment of cerebral β -amyloidosis. *Sci Rep*. 2017;7.
32. Merino-Zamorano C, Fernández-de Retana S, Montañola A, Batlle A, Saint-Pol J, Mysiorek C, et al. Modulation of Amyloid- β 1–40 Transport by ApoA1 and ApoJ Across an in vitro Model of the Blood-Brain Barrier. *J Alzheimer's Dis*. 2016;53:677–91. doi:10.3233/JAD-150976.
33. Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M. Pathogenic mechanisms of Alzheimer's disease analyzed in the APP23 transgenic mouse model. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;920:134–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11193142>. Accessed 14 Feb 2018.
34. Yardeni T, Eckhaus M, Morris HD, Huizing M, Hoogstraten-Miller S. Retro-orbital injections in mice. *Lab Anim (NY)*. 2011;40:155–60. doi:10.1038/labon0511-155.
35. Liu L, Duff K. A technique for serial collection of cerebrospinal fluid from the cisterna magna in mouse. *J Vis Exp*. 2008. doi:10.3791/960.
36. Shang J, Yamashita T, Zhai Y, Nakano Y, Morihara R, Fukui Y, et al. Strong Impact of Chronic Cerebral Hypoperfusion on Neurovascular Unit, Cerebrovascular Remodeling, and Neurovascular Trophic Coupling in Alzheimer's Disease Model Mouse. *J Alzheimers Dis*. 2016;52:113–26. doi:10.3233/JAD-151126.
37. Villacampa N, Almolda B, González B, Castellano B. Tomato lectin histochemistry for microglial visualization. *Methods Mol Biol*. 2013;1041:261–79. doi:10.1007/978-1-62703-520-0_23.
38. Grignon Y, Duyckaerts C, Bennechib M, Hauw J-J. Cytoarchitectonic alterations in the supramarginal gyrus of late onset Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 1998;95:395–406. doi:10.1007/s004010050816.
39. Mattsson N, Lönneborg A, Boccardi M, Blennow K, Hansson O, Geneva Task Force for the Roadmap of Alzheimer's Biomarkers. Clinical validity of cerebrospinal fluid A β 42, tau, and phospho-tau as biomarkers for Alzheimer's disease in the context of a structured 5-phase development framework. *Neurobiol Aging*. 2017;52:196–213. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2016.02.034.
40. Van Etten ES, Verbeek MM, Van Der Grond J, Zielman R, Van Rooden S, Van Zwet EW, et al. β -Amyloid in CSF: Biomarker for preclinical cerebral amyloid angiopathy. *Neurology*. 2017;88:169–76.
41. Jonsson T, Stefansson H, Steinberg S, Jonsdottir I, Jonsson P V, Snaedal J, et al. Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2013;368:107–16. doi:10.1056/NEJMoa1211103.
42. Wang Y, Cella M, Mallinson K, Ulrich JD, Young KL, Robinette ML, et al. TREM2 lipid sensing sustains the microglial response in an Alzheimer's disease model. *Cell*. 2015;160:1061–71. doi:10.1016/j.cell.2015.01.049.
43. Oda T, Pasinetti GM, Osterburg HH, Anderson C, Johnson SA, Finch CE. Purification and characterization of brain clusterin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;204:1131–6. doi:10.1006/bbrc.1994.2580.
44. Miners JS, Clarke P, Love S. Clusterin levels are increased in Alzheimer's disease and influence the regional distribution of A β . *Brain Pathol*. 2017;27:305–13. doi:10.1111/bpa.12392.
45. Reitz C, Tang M-X, Schupf N, Manly JJ, Mayeux R, Luchsinger JA. Association of higher levels of high-density lipoprotein cholesterol in elderly individuals and lower risk of late-onset Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2010;67:1491–7. doi:10.1001/archneurol.2010.297.
46. Zlokovic B V, Martel CL, Mackic JB, Matsubara E, Wisniewski T, McComb JG, et al. Brain uptake of circulating apolipoproteins J and E complexed to Alzheimer's amyloid beta. *Biochem Biophys Res*

Commun. 1994;205:1431–7. doi:10.1006/bbrc.1994.2825.

47. Qi XM, Wang C, Chu XK, Li G, Ma JF. Intraventricular infusion of clusterin ameliorated cognition and pathology in Tg6799 model of Alzheimer's disease. *BMC Neurosci.* 2018;19.
48. Bales KR, Verina T, Dodel RC, Du Y, Altstiel L, Bender M, et al. Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition. *Nat Genet.* 1997;17:263–4. doi:10.1038/ng1197-263.
49. Castellano JM, Kim J, Stewart FR, Jiang H, DeMattos RB, Patterson BW, et al. Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid- β peptide clearance. *Sci Transl Med.* 2011;3:89ra57. doi:10.1126/scitranslmed.3002156.
50. Handattu SP, Monroe CE, Nayyar G, Palgunachari MN, Kadish I, Van Groen T, et al. In vivo and in vitro effects of an apolipoprotein E mimetic peptide on amyloid- β pathology. *J Alzheimer's Dis.* 2013;36:335–47.
51. Song Q, Huang M, Yao L, Wang X, Gu X, Chen J, et al. Lipoprotein-based nanoparticles rescue the memory loss of mice with Alzheimer's disease by accelerating the clearance of amyloid-beta. *ACS Nano.* 2014;8:2345–59. doi:10.1021/nn4058215.
52. Calhoun ME, Wiederhold KH, Abramowski D, Phinney AL, Probst A, Sturchler-Pierrat C, et al. Neuron loss in APP transgenic mice. *Nature.* 1998;395:755–6.
53. Andjelkovic A V, Nikolic B, Pachter JS, Zecevic N. Macrophages/microglial cells in human central nervous system during development: an immunohistochemical study. *Brain Res.* 1998;814:13–25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9838024>.
54. Hoogland ICM, Houbolt C, van Westerloo DJ, van Gool WA, van de Beek D. Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. *J Neuroinflammation.* 2015;12:114.
55. Xie Z, Harris-White ME, Wals PA, Frautschy SA, Finch CE, Morgan TE. Apolipoprotein J (clusterin) activates rodent microglia in vivo and in vitro. *J Neurochem.* 2005;93:1038–46. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03065.x.
56. Michaud J-P, Hallé M, Lampron A, Thériault P, Préfontaine P, Filali M, et al. Toll-like receptor 4 stimulation with the detoxified ligand monophosphoryl lipid A improves Alzheimer's disease-related pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110:1941–6.
57. Yamanaka M, Ishikawa T, Griep A, Axt D, Kummer MP, Heneka MT. PPAR γ /RXR α -induced and CD36-mediated microglial amyloid- β phagocytosis results in cognitive improvement in amyloid precursor protein/presenilin 1 mice. *J Neurosci.* 2012;32:17321–31. doi:10.1523/JNEUROSCI.1569-12.2012.
58. Kim SU, de Vellis J. Microglia in health and disease. *J Neurosci Res.* 2005;81:302–13.
59. Spangenberg EE, Lee RJ, Najafi AR, Rice RA, Elmore MRP, Blurton-Jones M, et al. Eliminating microglia in Alzheimer's mice prevents neuronal loss without modulating amyloid- β pathology. *Brain.* 2016;139 Pt 4:1265–81. doi:10.1093/brain/aww016.
60. Yeh FL, Wang Y, Tom I, Gonzalez LC, Sheng M. TREM2 Binds to Apolipoproteins, Including APOE and CLU/APOJ, and Thereby Facilitates Uptake of Amyloid-Beta by Microglia. *Neuron.* 2016;91:328–40. doi:10.1016/j.neuron.2016.06.015.
61. Jiang T, Tan L, Zhu X-C, Zhang Q-Q, Cao L, Tan M-S, et al. Upregulation of TREM2 ameliorates neuropathology and rescues spatial cognitive impairment in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology.* 2014;39:2949–62. doi:10.1038/npp.2014.164.
62. Fahrenhold M, Rakic S, Classey J, Brayne C, Ince PG, Nicoll JAR, et al. TREM2 expression in the human brain: a marker of monocyte recruitment? *Brain Pathol.* 2017. doi:10.1111/bpa.12564.
63. Simard AR, Soulet D, Gowing G, Julien J-P, Rivest S. Bone marrow-derived microglia play a critical

- role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron*. 2006;49:489–502. doi:10.1016/j.neuron.2006.01.022.
64. Zenaro E, Pietronigro E, Della Bianca V, Piacentino G, Marongiu L, Budui S, et al. Neutrophils promote Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline via LFA-1 integrin. *Nat Med*. 2015;21:880–6.
65. Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Bernard M, et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med*. 2007;13:1173–5.
66. Roy M, Richard J-F, Dumas A, Vallières L. CXCL1 can be regulated by IL-6 and promotes granulocyte adhesion to brain capillaries during bacterial toxin exposure and encephalomyelitis. *J Neuroinflammation*. 2012;9:18.
67. Faleiros BE, Miranda AS, Campos AC, Gomides LF, Kangussu LM, Guatimosim C, et al. Up-regulation of brain cytokines and chemokines mediates neurotoxicity in early acute liver failure by a mechanism independent of microglial activation. *Brain Res*. 2014;1578:49–59.
68. Kiyota T, Okuyama S, Swan RJ, Jacobsen MT, Gendelman HE, Ikezu T. CNS expression of anti-inflammatory cytokine interleukin-4 attenuates Alzheimer's disease-like pathogenesis in APP+PS1 bigenic mice. *FASEB J*. 2010;24:3093–102.
69. Chakrabarty P, Tianbai L, Herring A, Ceballos-Diaz C, Das P, Golde TE. Hippocampal expression of murine IL-4 results in exacerbation of amyloid deposition. *Mol Neurodegener*. 2012;7:36.
70. Cunin P, Beauvillain C, Miot C, Augusto J-F, Preisser L, Blanchard S, et al. Clusterin facilitates apoptotic cell clearance and prevents apoptotic cell-induced autoimmune responses. *Cell Death Dis*. 2016;7:e2215. doi:10.1038/cddis.2016.113.
71. Krstic D, Madhusudan A, Doehner J, Vogel P, Notter T, Imhof C, et al. Systemic immune challenges trigger and drive Alzheimer-like neuropathology in mice. *J Neuroinflammation*. 2012;9:151.
72. Walker KA, Hoogeveen RC, Folsom AR, Ballantyne CM, Knopman DS, Windham BG, et al. Midlife systemic inflammatory markers are associated with late-life brain volume: The ARIC study. *Neurology*. 2017;89:2262–70.
73. Roubaud-Baudron C, Krolak-Salmon P, Quadrio I, Mégraud F, Salles N. Impact of chronic *Helicobacter pylori* infection on Alzheimer's disease: preliminary results. *Neurobiol Aging*. 2012;33:1009.e11-9.

9. SUPPLEMENTARY INFORMATION



Supplementary Table 1: List of abbreviation of tested inflammatory molecules by multiplexed ELISA.

Target protein	Abbreviation	Detection in brain
Basic Fibroblast Growth Factor	FBF-Basic	Yes
Interleukin-1 β	IL-1 β	Yes
Interleukin-10	IL-10	No
Interleukin-13	IL-13	Yes
Interleukin-6	IL-6	Yes
Interleukin-12	IL-12	No
Interleukin-17	IL-17	Yes
Macrophage Inflammatory Protein-1 α	MIP-1 α	Yes
Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor	GM-CSF	No
Monocyte chemoattractant Protein-1	MCP-1	Yes
Interleukin 5	IL-5	Yes
Vascular Endothelial Growth Factor	VEGF	Yes
Interleukin-1 α	IL-1 α	No
Interferon- γ	IFN- γ	Yes
Tumor Necrosis Factor- α	TNF- α	Yes
Interleukin-2	IL2	Yes
Interferon- γ Induced Protein-10	IP-10	Yes
Monokine Induced by Gamma-IFN	MIG	Yes
Keratinocyte Chemoattractant	KC (mouse CXCL1)	Yes
Interleukin-4	IL-4	Yes

7. 2-ANEXO 1

Optimización de la formación de nanodiscos HDL reconstituidos con ApoJ recombinante human (nanodiscos rHDL-rApoJ)

OPTIMIZACIÓN DE LA FORMACIÓN DE NANODISCOS HDL RECONSTITUÍDOS CON APOJ RECOMBINANTE HUMANA (NANODISCOS rHDL-rApoJ)

1- INTRODUCCIÓN

Los nanodiscos de HDL reconstituidos (nanodiscos rHDL) son nanopartículas lipoproteicas discoidales de escasos nanómetros de diámetro (9-40 nm) y de aproximadamente 5 nm de altura¹. Su formación se basa en la propiedad única que presentan las apolipoproteínas de solubilizar fosfolípidos en forma de nanopartículas permitiendo su movimiento en fases acuosas. En este contexto, los nanodiscos reconstituidos con ApoA-I, la apolipoproteína mayoritaria en plasma, están extensamente estudiados y su formación está detalladamente descrita en la bibliografía². Sin embargo, nanodiscos rHDL con otras apolipoproteínas son poco comunes y su formación requiere una optimización previa^{3,4}. En este contexto, nuestro objetivo era producir nanodiscos rHDL asociados a ApoJ recombinante humana (nanodiscos rHDL-rApoJ). Bajo nuestro conocimiento, solo existe una publicación previa atendiendo a la formación de nanodiscos rHDL asociados a ApoJ y en ella no se utilizó ApoJ recombinante⁵. Por ello, el proceso de producción requería ser bien diseñado y optimizado. Con este objetivo, primero se formaron nanodiscos rHDL asociados a ApoA-I recombinante (nanodiscos rHDL-rApoA-I), como control positivo del buen manejo de la técnica, de acuerdo a los protocolos de formación descritos en la bibliografía. Una vez puesto a punto el método de preparación de los nanodiscos rHDL-rApoA-I, dicha metodología fue tomada como punto de partida para llevar a cabo la síntesis de nanodiscos rHDL asociados a ApoJ recombinante humana (nanodiscos rHDL-rApoJ). En concreto, se diseñaron dos estrategias de formación de rHDL-rApoJ (método de *solubilización espontánea* y método de *diálisis con colato*). En ambas estrategias se trabajaron a diferentes relaciones molares entre los lípidos (1,2-Dimistiril-*sn*-3-glicero-fosfatidilcolina, DMPC) y rApoJ, a diferentes concentración total de lípido y diferentes tiempos de incubación.

2- MATERIALES

Para la producción de nanodiscos HDL reconstituidos asociados a ApoA-I y ApoJ se utilizaron proteínas recombinantes humanas producidas en células humanas HEK293T (rApoA-I y rApoJ). Las especificaciones para la producción y

purificación de estas proteínas recombinantes están disponible en la bibliografía⁶. En la Tabla 1 se muestran los materiales utilizados para la optimización de la formación de nanodiscos rHDL.

Tabla 1: Materiales utilizados para la optimización de la formación de nanodiscos HDL reconstituidos.

PRODUCTO	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
14:0 DMPC (1,2-Dimistiril-sn-3-glicero- fosfatidilcolina)	Avanti Polar Lipids (Alavaster, AL, EEUU)	850345P
Colesterol	Sigma-Aldrich (Sant Louis, MO, EEUU)	H6167
TBS (Tabletas)	Sigma Aldrich	T5030
KBr	Sigma Aldrich	104905
Deoxicolato de Sodio	Sigma-Aldrich	S1827
Membranas de diálisis 10 KDa Snake Skin Dialysis Tubing	Thermo Fisher (Waltham, MA, EEUU)	88243
Membranas de extrusion	Millipore (Burlington, MA, EEUU)	JHWPO1300
BCA	Thermo Fisher	23225

3- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

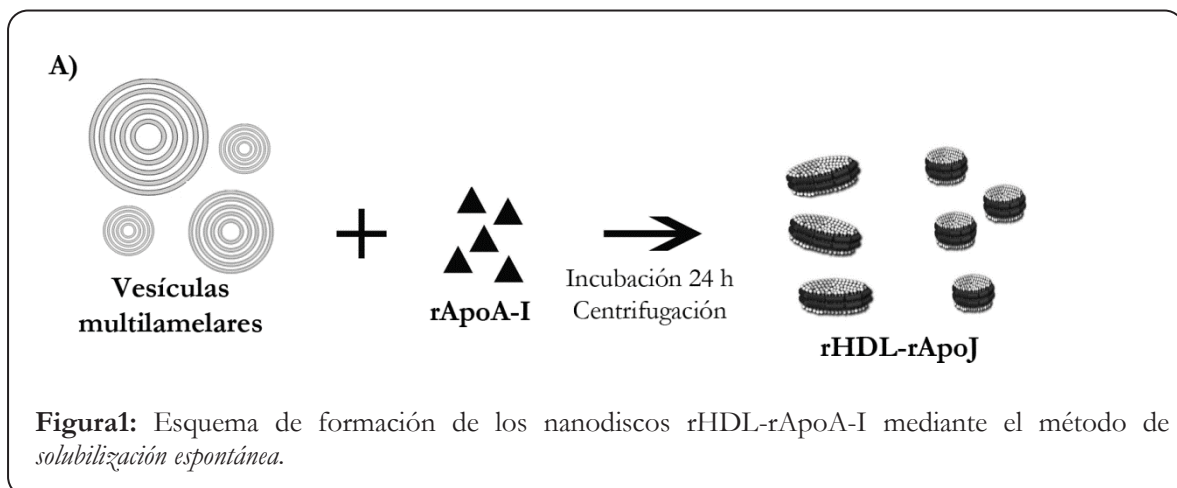
3.1. Formación de nanodiscos rHDL-rApoA-I mediante el método de solubilización espontánea.

Los nanodiscos rHDL-rApoA-I se sintetizaron mediante el método de *solubilización espontánea* utilizando un protocolo descrito en la bibliografía². En la Tabla 2 se indican los parámetros utilizados para la formación de nanodiscos rHDL-rApoA-I. Brevemente, se realizó una mezcla lipídica a partir de soluciones de DMPC y Colesterol no esterificado (COL) en cloroformo a una relación molar de DMPC/COL de 90:10. Tras la evaporación del cloroformo en el rotavapor, se formó un film lipídico que posteriormente se hidrató con 1 ml de tampón salino Tris (*Tris Buffer Saline*, TBS, pH=7.4), dando lugar a la formación espontánea de vesículas multilamelares (*Multilamellar vesicles*, MLV). A continuación, se procedió a la extrusión de los MLV a través de membranas de 400 nm con ayuda del extrusor de liposomas con el objetivo de homogenizar el tamaño de las MLV. Posteriormente, se llevó a cabo el paso de incubación de las MLV con rApoA-I humana para dar lugar a la formación espontánea de nanodiscos rHDL-rApoA-I. Para ello, en un vial se mezclaron las MLV con rApoA-I a una relación molar de DMPC/COL/rApoA-I de 89:10:1 para un volumen final de 1 ml. La concentración de ApoA-I en la

muestra final fue de 0,3 mg/ml. Esta mezcla se incubó a 24 °C durante 24 horas bajo agitación magnética, permitiendo la solubilización de las MLV por rApoA-I en forma de nanodiscos. Este fenómeno de solubilización es posible por la presencia de dominios específicos en la estructura de rApoA-I; las cuales son capaces de unirse a las colas hidrófobas del fosfolípido (DMPC) que forman las MLV y solubilizarlos en forma de nanodiscos⁷. Tras la incubación, se realizó una etapa de centrifugación a 16.000 xg durante 30 minutos a 4°C con el objetivo de eliminar las MLV libres que no interaccionaron con la rApoA-I (Figura 1).

Tabla 2: Parámetros de formación utilizados para la formación de nanodiscos rHDL-rApoA-I.

Muestra	Método	Relación molar DMPC:COL	Extrusión (nm)	Relación molar DMPC:COL: rApoA-I	[rApoA-I]f (mg/ml)
rHDL-rApoA-I	Sol. espontánea	90:10	400	89:10:1	0.3



Tras la formación, los nanodiscos resultantes se caracterizaron en términos de tamaño de partícula hidrodinámico mediante técnicas de dispersión dinámica de luz (*Dynamic Light Scattering, DLS*) acoplado a tecnología de retrodispersión no invasiva (Malvern Zetasizer, Malvern Instruments, Reino Unido). Por otra parte, la morfología y dispersión de los nanodiscos se estudió mediante microscopía electrónica de transmisión (*Transmission Electron Microscopy, TEM*) con tinción negativa con acetato de uranilo en un microscopio JEM-1400 (JEOL, Tokio, Japón) (Figura 2). El tamaño hidrodinámico de los MLV también se midió mediante DLS, confirmando su tamaño homogéneo (Figura 2A). Tal y como se ha descrito previamente en bibliografía², los nanodiscos rHDL-rApoA-I mostraron un tamaño

de partícula comprendido entre 13-18 nm de diámetro (Figura 2B). Además, por TEM se observó que su morfología era discoidal con una altura de disco de 5 nm. Por otra parte, también se observó la distribución apilada que caracteriza a los nanodiscos rHDL-rApoA-I, lo cual demostró la reproducibilidad de resultados previamente publicados (Figura 2C).

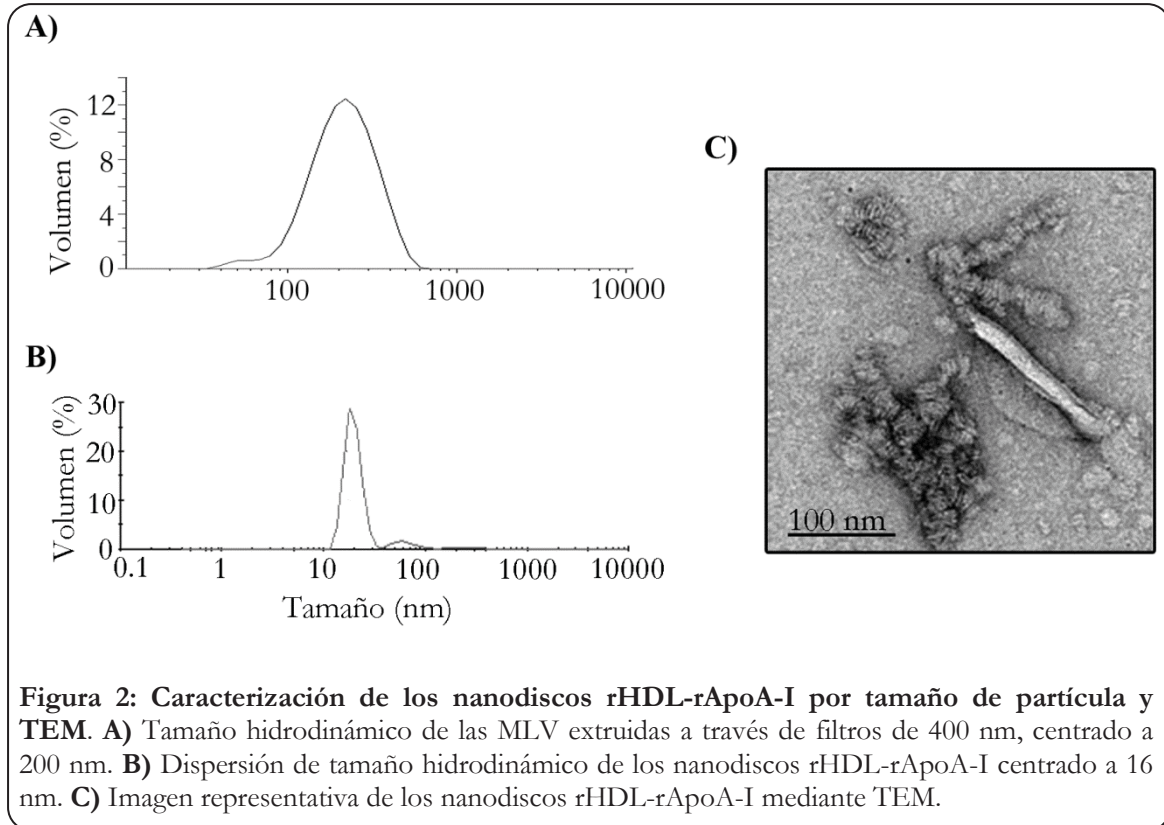


Figura 2: Caracterización de los nanodiscos rHDL-rApoA-I por tamaño de partícula y TEM. A) Tamaño hidrodinámico de las MLV extruidas a través de filtros de 400 nm, centrado a 200 nm. **B)** Dispersión de tamaño hidrodinámico de los nanodiscos rHDL-rApoA-I centrado a 16 nm. **C)** Imagen representativa de los nanodiscos rHDL-rApoA-I mediante TEM.

3.2. Formación de nanodiscos rHDL-rApoJ mediante *solubilización espontánea*

En base a los buenos resultados obtenidos en la preparación de los nanodiscos rHDL-rApoA-I mediante la metodología de *solubilización espontánea*, se decidió tomar dicha metodología como punto de partida para llevar a cabo la formación de nanodiscos rHDL asociados a rApoJ humana (nanodiscos rHDL-rApoJ). En la Tabla 3 se resumen los diferentes parámetros de formación testados mediante el método de *solubilización espontánea*. El protocolo de formación se realizó siguiendo el esquema de la Figura 1.

Para poder evaluar el efecto de los distintos parámetros estudiados sin que influyera la concentración final de rApoJ, los experimentos se diseñaron de tal forma que la concentración de rApoJ final en la mezcla fuera del 0.33 mg/ml. Por una parte, se partió de una mezcla lipídica de DMPC/COL a la relación molar de 90:10 (prototipos 1-10). En estos prototipos el tamaño de extrusión de las MLV se

mantuvo en 400 nm. Por otra parte, se testaron diferentes relaciones molares DMPC/COL/rApoJ. Los ratios lípido:proteína se han descrito anteriormente como un parámetro crítico para la correcta formación de los nanodiscos¹. Además, para cada relación molar, se estudió el efecto del tiempo de incubación (24 y 48 horas) a 24 °C, con el objetivo de estudiar si más tiempo de interacción entre el lípido y la proteína conducía a un mayor rendimiento en la producción de los nanodiscos.

Tabla 3: Parámetros de formación estudiados para la formación de nanodiscos rHDL-rApoJ mediante el método de *solubilización espontánea*.

Prototipo	Relación molar DMPC:COL	Extrusión (nm)	Relación molar DMPC:COL:rApoJ	Tiempo de incubación (horas)	[rApoJ] _f (mg/ml)
1	90:10	400	860:100:40	24	0.33
2	90:10	400	860:100:40	48	0.33
3	90:10	400	880:100:20	24	0.33
4	90:10	400	880:100:20	48	0.33
5	90:10	400	890:100:10	24	0.33
6	90:10	400	890:100:10	48	0.33
7	90:10	400	895:100:5	24	0.33
8	90:10	400	895:100:5	48	0.33
9	90:10	400	898:100:2	24	0.33
10	90:10	400	898:100:2	48	0.33
11	100:0	400	890:100:10	24	0.33
12	90:10	100	890:100:10	24	0.33

Por otra parte, en el prototipo 11 se evaluó el efecto de la presencia o no de colesterol en la mezcla lipídica a una relación molar de DMPC:COL:ApoJ de 890:100:10 y extruyendo la muestra de MLV con una membrana de 400 nm. Asimismo, en el prototipo 12, se testó el efecto de una extrusión de las vesículas MLV preformados a través de una membrana con un tamaño de poro menor de 100 nm, ya que basados en publicaciones anteriores, se pensó que unas vesículas de menor tamaño podrían facilitar la solubilización del liposoma por parte de la apolipoproteína⁸. Todos los prototipos fueron centrifugados a 16000 xg durante 30 minutos a 4°C para eliminar los lípidos que no interaccionaron con la apolipoproteína.

Los sobrenadantes fruto de la centrifugación se caracterizaron por tamaño de partícula mediante DLS y TEM. En la Tabla 4 se muestran los tamaños de partícula hidrodinámicos de los nanodiscos expresados en % volumen obtenidos de los prototipos 1-12, la concentración final de rApoJ medida por BCA y el rendimiento

de recuperación de rApoJ en el sobrenadante de la muestra final. Por otra parte, a modo de control negativo (C-), la rApoJ se sometió al mismo procedimiento de *solubilización espontánea* utilizado para la formación de nanodiscos, pero en ausencia de DMPC y COL en la muestra. Esta muestra también se caracterizó en términos de tamaño hidrodinámico y TEM (Tabla 4, rApoJ libre (C-)). Por otra parte, imágenes representativas obtenidas por TEM de algunos de los prototipos estudiados se muestran en la Figura 3.

Tabla 4: Caracterización de los distintos prototipos de nanodiscos rHDL-rApoJ mediante el método de solubilización espontánea.

Prototipo	Diámetro de partícula (nm) ^a	[rApoJ] _f (mg/ml) ^b	Rendimiento (%) ^c
1	17.04±7.42	0.252	76.30
2	17.07±2.94	0.184	55.75
3	18.33±4.61	0.201	60.90
4	17.20±3.29	0.026	7.80
5	17.06±3.25	0.163	49.39
6	18.48±3.56	0.219	66.36
7	18.25±7.42	0.194	58.18
8	26.56±7.86	0.239	72.74
9	29.29±3.50	0.189	57.27
10	35.5±10.00	0.223	67.57
11	17.56±3.50	0.167	50.60
12	18.37±6.24	0.203	61.51
rApoJ libre (C-)	17.70±4.30	-	-

a) Tamaño medio de partícula y desviación estándar expresado en % en volumen. **b)** Concentración de rApoJ en la muestra final medido por BCA. **c)** Rendimiento de la formación, medido como % de ApoJ recuperado en la muestra final.

Tal y como se puede observar en los resultados de la Tabla 4, todos los prototipos de rHDL-rApoJ obtenidos mostraron un tamaño medio de partícula uniforme comprendido entre 17 y 35 nm. Dichos tamaños están en acuerdo con los observados en otros nanodiscos formados con distintas apolipoproteínas^{1,2}. Además, se observó que el tiempo de incubación, la ausencia de colesterol y el tamaño de extrusión de MLV aparentemente no afectaba el tamaño de partícula, mientras que se observó que el aumento de la relación molar DMPC/rApoJ generaba un incremento en el tamaño hidrodinámico.

Por otro lado, todas las muestras formadas mediante la mezcla de lípidos y la rApoJ (Prototipos 1-12) fueron observadas por microscopía TEM con tinción negativa (acetato de uranilo). En base a las imágenes de la Figura 3 A-D, se observa que los prototipos 1, 3, 5 y 7 son poco uniformes, estando formados por escasos nanodiscos dispuestos de perfil y algunos liposomas aislados.

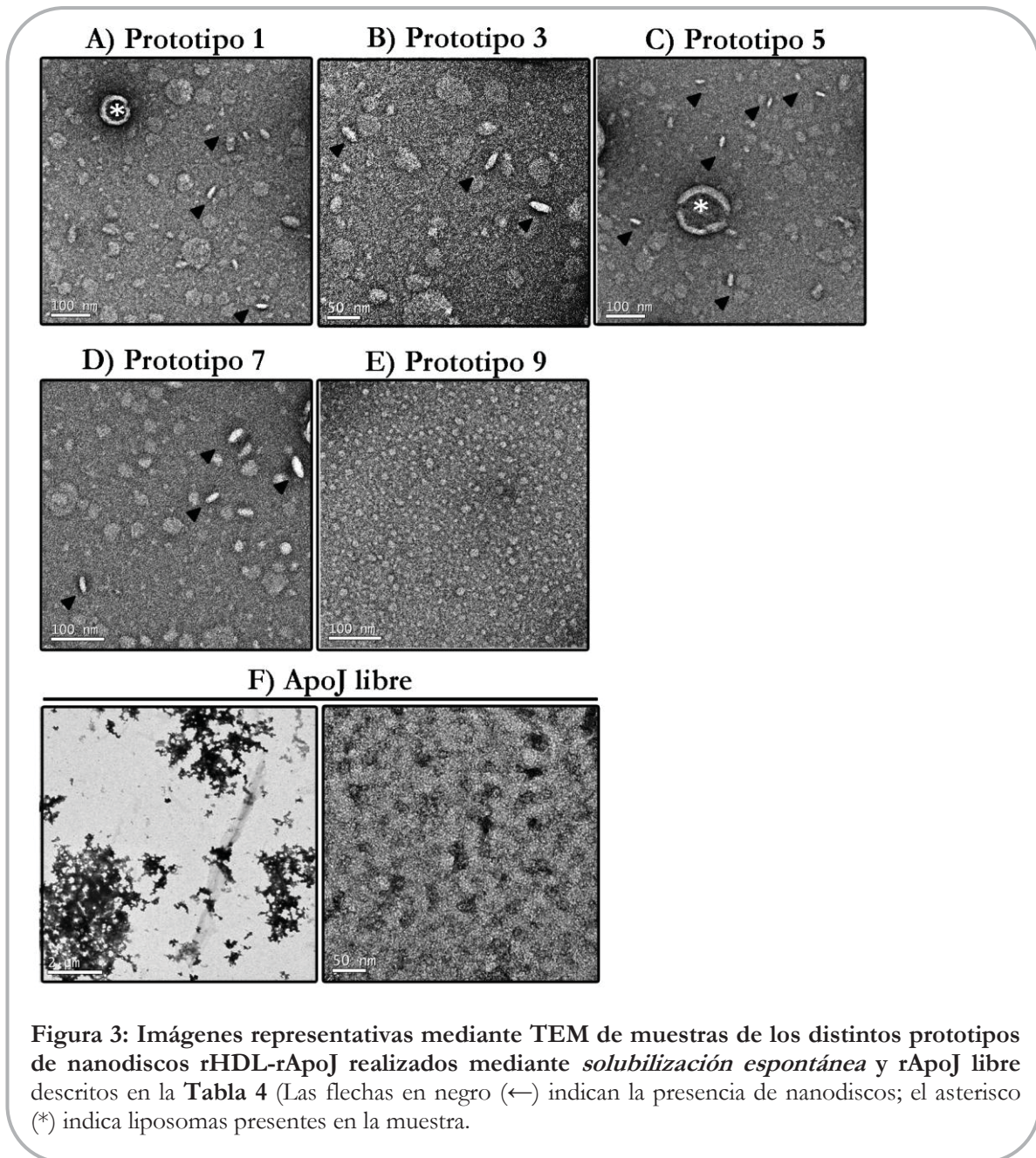


Figura 3: Imágenes representativas mediante TEM de muestras de los distintos prototipos de nanodiscos rHDL-rApoJ realizados mediante *solubilización espontánea* y rApoJ libre descritos en la **Tabla 4** (Las flechas en negro (←) indican la presencia de nanodiscos; el asterisco (*) indica liposomas presentes en la muestra).

Por otra parte, en los prototipos 9 y 10 no se detectó ningún nanodisco, pese a que dicha muestra era rica en liposomas de pequeño tamaño. Este hecho nos llevó a pensar que una elevada concentración de lípidos presente en la muestra da lugar a la formación espontánea de liposomas de diferentes tamaños, lo cual puede dificultar de alguna manera su auto-ensamblaje con la apolipoproteína rApoJ (Figura 3E).

Asimismo, también se observó que el control negativo de rApoJ libre (C-) en ausencia de lípidos presentaba un tamaño medio de partícula muy similar (≈ 17 nm) al observado en los nanodiscos rHDL-rApoJ (Tabla 4), lo cual nos llevó a pensar

que rApoJ en disolución se reorganizaba en forma de agregados. Esta hipótesis quedó confirmada mediante su observación por TEM, donde se detectaron grandes y pequeños agregados de proteína con una morfología irregular (ver Figura 2F). En esta muestra, no se observó en ningún caso la presencia de nanodiscos. En este contexto, rApoJ es una proteína que funciona como una chaperona natural y es muy propensa a formar agregados de elevado peso molecular⁹ que pueden ser detectables mediante DLS.

Así, en base a los resultados de tamaño de partícula y microscopía electrónica, se dedujo que mediante el método de *solubilización espontánea* es posible la formación de nanodiscos rHDL-rApoJ (Figura 3A-D). Sin embargo, se detectaron escasos nanodiscos por microscopía, la muestra mostró gran heterogeneidad y el tamaño hidrodinámico de los nanodiscos rHDL-rApoJ no pudo distinguirse de la proteína libre. Por tanto, en este estudio se concluyó que el método de *solubilización espontánea* no permite la formación de nanodiscos rHDL-rApoJ con los rendimientos aceptables para cumplir nuestros objetivos.

Los diferentes rendimientos observados entre rApoA-I y rApoJ formando nanodiscos rHDL, pueden ser fácilmente explicados por las diferencias estructurales existentes entre ambas apolipoproteínas. Mientras que la estructura de ApoA-I es muy eficaz mediando la solubilización de bicapas lipídicas, debido a que es la principal encargada de la biogénesis de HDL *in vivo*¹⁰, ApoJ es una proteína multifuncional que interactúa en un amplio abanico de procesos biológicos^{11,12}. Por lo tanto, la capacidad de solubilizar directamente MLV puede ser menor que la de ApoA-I, dando lugar a rendimientos más pobres a la hora de obtener nanodiscos rHDL mediante el método de *solubilización espontánea*.

Sin embargo, ApoJ es una proteína con regiones parcialmente desordenadas (*molten-globule regions*) que tienen la capacidad para formar hélices- α anfífilicas. Estas características estructurales han sido muy relacionadas con la capacidad de unirse a fosfolípidos en estructuras lipoprotéicas¹³. Además, se ha descrito la capacidad de ApoJ de formar HDLs *in vivo*¹⁴. Así, consideramos que bajo otras condiciones y metodología de preparación se podría incrementar el rendimiento de formación de nanodiscos rHDL-rApoJ. En este contexto, se decidió abordar la formación de nanodiscos rHDL-rApoJ mediante otra estrategia denominada *diálisis con colato*.

3.3. Formación de nanodiscos rHDL-rApoJ mediante el método de *diálisis con colato*

Los parámetros de preparación de los nanodiscos de rHDL-rApoJ mediante el método de *diálisis con colato* se basaron en un trabajo previamente publicado por Zeno *et al*, 2015¹⁵ con algunas modificaciones. Así, el procedimiento comenzó con la generación de una mezcla lipídica basada en soluciones de DMPC y COL en

cloroformo a una relación molar 5:1. Tras la evaporación del cloroformo en el rotavapor, el film lipídico resultante se hidrató con una solución de TBS suplementado con 40 mM de deoxicolato de sodio (Colato) para dar lugar a la formación de micelas mixtas de DMPC, COL y el detergente colato. El deoxicolato de sodio es un detergente derivado del colesterol que es capaz de solubilizar los fosfolípidos formando micelas mixtas. Para la correcta formación de estas micelas mixtas, la solución se incubó durante 30 minutos a 37 °C bajo agitación. Posteriormente, se añadió la rApoJ sobre las micelas mixtas a una relación molar DMPC/COL/rApoJ de 550:150:1. Esta mezcla fue sometida a 3 ciclos de incubación de 20 minutos alternando temperaturas de 4 y 37°C en agitación para favorecer la interacción de la proteína con los fosfolípidos. Finalmente, la muestra se dializó extensamente con TBS (pH=7.4) durante 48 horas a 4°C intercalando dos cambios de medio. El esquema de las condiciones utilizadas se puede ver en la Figura 4 y en la Tabla 5.

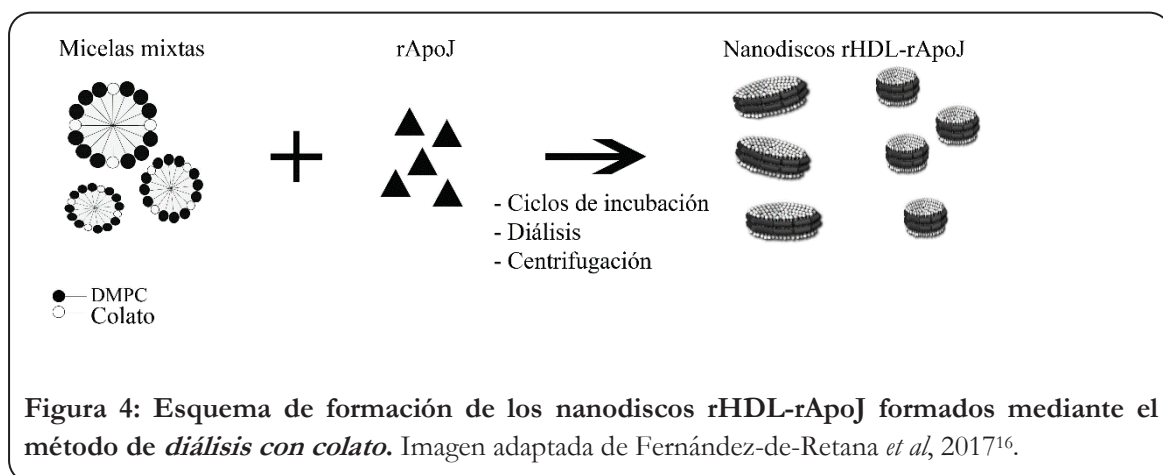


Figura 4: Esquema de formación de los nanodiscos rHDL-rApoJ formados mediante el método de *diálisis con colato*. Imagen adaptada de Fernández-de-Retana *et al*, 2017¹⁶.

Tabla 5: Condiciones utilizadas para la formación de nanodiscos rHDL-rApoJ mediante el método de *diálisis con colato*.

Muestra	Método	Relación molar DMPC:COL	Relación molar DMPC:COL:rApoJ	[rApoJ]f (mg/ml)
Nanodisco rHDL-rApoJ	<i>Diálisis colato</i>	5:1	550:150:1	0.415

3.4. Purificación de nanodiscos rHDL-rApoJ mediante ultracentrifugación en gradiente de KBr y caracterización de la muestra

Los nanodiscos se midieron mediante DLS una vez terminado el procedimiento de preparación. Así, se observó que mediante el método de *diálisis con colato*, se obtenían dos poblaciones centradas a 26 y 75 nm. Estos resultados indican que este método permite desplazar la señal que se observaba con la proteína rApoJ no lipídada (≈ 17 nm). No obstante, pese a que el cambio de tamaño indicó la presencia de nanopartículas, para que la caracterización de los nanodiscos rHDL-rApoJ formados por el método de *diálisis con colato*, no se viera afectada por la presencia de proteína rApoJ no lipídada, los nanodiscos resultantes se purificaron por ultracentrifugación en gradiente de densidad de bromuro de potasio (KBr). Esta técnica es rutinariamente utilizada para la separación de lipoproteínas de diferente densidad¹⁷. Así, debido a que los nanodiscos tienen una densidad menor (< 1250 mg/ml) que la proteína libre (> 1300 mg/ml), un corte de densidad a 1250 mg/ml permitió separar exitosamente los nanodiscos rHDL-rApoJ de la proteína rApoJ libre y de los MLV no asociados a la rApoJ. Así, una vez purificados los nanodiscos, éstos fueron caracterizados en términos de tamaño de partícula por DLS y morfología por microscopía TEM (Figura 5).

Las muestras de rHDL-rApoJ fueron analizadas por DLS, observándose que la muestra está formada por dos poblaciones de partículas con tamaños medios de partícula centrados en 32 nm y 68 nm (Figura 5A). Por otra parte, el TEM nos permitió confirmar la morfología discoidal de dichas partículas (Figura 5B). Asimismo, la muestra resultante mostró un aspecto muy homogéneo y una mayor densidad de nanodiscos en comparación a las escasas poblaciones obtenidas mediante el método de *solubilización espontánea*. Asimismo, por TEM también se pudo observar las dos poblaciones de diferentes tamaños de nanodiscos de rHDL-rApoJ, de 30 nm (C1) y de 68 nm (C2), que fueron detectadas por DLS. Por último, por TEM se determinó que los nanodiscos tenían una altura de 5 nm. Estos resultados están actualmente publicados como parte del **Artículo 2**¹⁶.

En resumen, se concluye que el método de *diálisis con colato* permite la formación de nanodiscos rHDL-rApoJ a una relación molar de DMPC:COL:rApoJ de 550:150:1. Dichas muestras están formadas por dos poblaciones de nanodiscos con tamaños medios de 32 nm y 68 nm de diámetro, y 5 nm de alto. El método de formación seleccionado mostró gran reproducibilidad. Por último, la purificación mediante ultracentrifugación en gradiente de KBr permitió eliminar exitosamente la proteína rApoJ no lipídada de la muestra final. El protocolo aquí descrito fue el utilizado durante los experimentos de esta tesis doctoral para la formación y caracterización de nanodiscos rHDL-rApoJ.

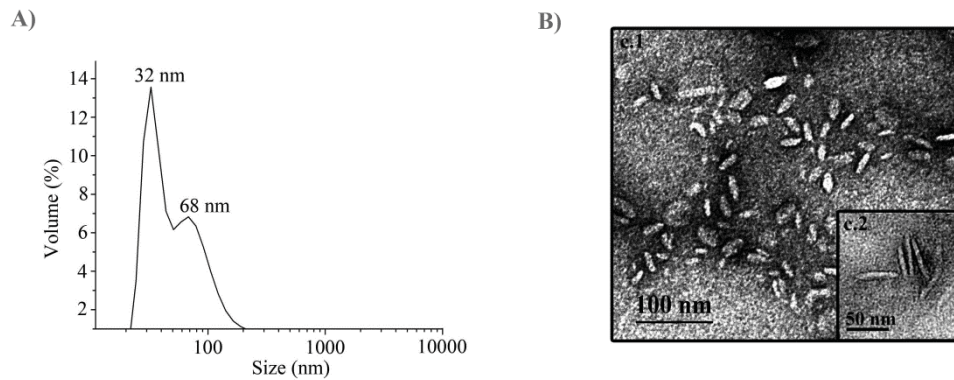


Figura 5: Caracterización de los nanodiscos rHDL-rApoJ formados mediante el método de diálisis con colato. **A)** Distribución de tamaños de partícula de los nanodiscos rHDL-rApoJ purificados, donde se puede distinguir dos poblaciones de nanodiscos con un tamaño medio de partícula 32 y 68 nm. **B)** Imágenes de representativa TEM de la dos poblaciones de nanodiscos de rHDL-rApoJ (30 nm (C1) y 68 nm (C2)), y de su morfología discoidal. Imagen adaptada de Fernández-de-Retana *et al*, 2017¹⁶.

4- ABREVIACIONES

ApoA-I: Apolipoproteína A-I; **ApoJ:** Apolipoproteína J (también conocida como clusterin); **COL:** Colesterol; **Colato:** Deoxicolato de sodio; **DLS:** Dispersión Dinámica de Luz (*Dynamic Light Scattering*); **DMPC:** 1,2-dimistoil-sn-3-glicero-fosfatidilcolina; **Ensayo BCA:** Ensayo de ácido bicinonínico (*BCA assay*); **HDL:** Lipoproteína de Alta Densidad (*High Density Lipoprotein*); **KBr:** Bromuro de potasio; **MLV:** Vesículas Multilamelares (*Multilamellar Vesicles*); **rHDL:** HDL reconstituida (*reconstituted HDL*); **TBS:** Tampón Salino Tris (*Tris Buffer Saline*); **TEM:** microscopio electrónico de transmisión (*Transmission Electron Microscopy*)

5- BIBLIOGRAFÍA

1. Bricarello DA, Smilowitz JT, Zivkovic AM, German JB, Parikh AN. Reconstituted lipoprotein: a versatile class of biologically-inspired nanostructures. *ACS Nano*. 2011;5(1):42-57. doi:10.1021/nn103098m
2. Massey JB, Pownall HJ. Cholesterol is a determinant of the structures of discoidal high density lipoproteins formed by the solubilization of phospholipid membranes by apolipoprotein A-I. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2008;1781(5):245-253. doi:10.1016/j.bbalip.2008.03.003
3. Jonas A, Sweeny SA, Herbert PN. Discoidal complexes of A and C apolipoproteins with lipids and their reactions with lecithin: cholesterol acyltransferase. *J Biol Chem*. 1984;259(10):6369-6375. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6427214>.
4. Song Q, Huang M, Yao L, et al. Lipoprotein-based nanoparticles rescue the memory loss of mice with Alzheimer's disease by accelerating the clearance of amyloid-beta. *ACS Nano*. 2014;8(3):2345-2359. doi:10.1021/nn4058215

5. Calero M, Tokuda T, Rostagno A, et al. Functional and structural properties of lipid-associated apolipoprotein J (clusterin). *Biochem J*. 1999;344 Pt 2:375-383. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10567218>.
6. Merino-Zamorano C, Fernández-de Retana S, Montañola A, et al. Modulation of Amyloid- β 1–40 Transport by ApoA1 and ApoJ Across an in vitro Model of the Blood-Brain Barrier. *J Alzheimer's Dis*. 2016;53(2):677-691. doi:10.3233/JAD-150976
7. Mei X, Atkinson D. Lipid-free Apolipoprotein A-I Structure: Insights into HDL Formation and Atherosclerosis Development. *Arch Med Res*. 2015;46(5):351-360. doi:10.1016/j.arcmed.2015.05.012
8. Suurkuusk M, Singh SK. Formation of HDL-like complexes from apolipoprotein A-I(M) and DMPC. *Int J Pharm*. 2000;194(1):21-38. doi:10.1016/S0378-5173(99)00312-9
9. Dabbs RA, Wilson MR. Expression and purification of chaperone-active recombinant clusterin. *PLoS One*. 2014;9(1). doi:10.1371/journal.pone.0086989
10. Zannis VI, Fotakis P, Koukos G, et al. Hdl biogenesis, remodeling, and catabolism. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*. Vol 224. ; 2015:53-111. doi:10.1007/978-3-319-09665-0_2
11. Rohne P, Prochnow H, Koch-Brandt C. The CLU-files: disentanglement of a mystery. *Biomol Concepts*. 2016;7(1):1-15. doi:10.1515/bmc-2015-0026
12. de Silva H V, Stuart WD, Duvic CR, et al. A 70-kDa apolipoprotein designated ApoJ is a marker for subclasses of human plasma high density lipoproteins. *J Biol Chem*. 1990;265(22):13240-13247. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2376594>.
13. Bailey RW, Dunker AK, Brown CJ, Garner EC, Griswold MD. Clusterin, a binding protein with a molten globule-like region. *Biochemistry*. 2001;40(39):11828-11840. doi:10.1021/bi010135x
14. DeMattos RB, Brendza RP, Heuser JE, et al. Purification and characterization of astrocyte-secreted apolipoprotein E and J-containing lipoproteins from wild-type and human apoE transgenic mice. *Neurochem Int*. 2001;39(5-6):415-425. doi:10.1016/S0197-0186(01)00049-3
15. Zeno WF, Hilt S, Risbud SH, Voss JC, Longo ML. Spectroscopic Characterization of Structural Changes in Membrane Scaffold Proteins Entrapped within Mesoporous Silica Gel Monoliths. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7(16):8640-8649. doi:10.1021/acsami.5b00898
16. Fernández-De-Retana S, Cano-Sarabia M, Marazuela P, et al. Characterization of ApoJ-reconstituted high-density lipoprotein (rHDL) nanodisc for the potential treatment of cerebral β -amyloidosis. *Sci Rep*. 2017;7(1). doi:10.1038/s41598-017-15215-w
17. HAVEL RJ, EDER HA, BRAGDON JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest*. 1955;34(9):1345-1353. doi:10.1172/JCI103182

7.3- Abreviaciones

AAC: Angiopatía Amiloide Cerebral

A β : Péptido β -amiloide; *β -amyloid peptide*

ABC-X: *ATP-binding Cassette* (X= A1, A7, A8, B1, G1)

AJ: *Adherens Junction*, uniones adherentes

Apo: Apolipoprotein (A-I, A-I-Milano, B-100, C, E, J)

ARIA: Anomalías de Imagen Asociadas a Amiloide; *Amyloid Related Imaging Abnormalities*

BHE: Barrera Hematoencefálica

BIN1: *Bridging Integrator-1*

CA-1: *Cornu Ammonis-1*

CD2AP: *CD2 associated protein*

CERAD: Consorcio para establecer un registro de Enfermedad de Alzheimer; *Consortium to establish a registry for Alzheimer's Disease*

CETP: Proteína de transferencia de colesterol; *Cholesterylester Transfer Protein*

CD: Cluster de diferenciación; *Cluster of Differentiation*

Clu: Clusterin (Sinónimo de Apolipoproteína J)

CR1: Receptor del complemento 1; *Complement Receptor 1*

cSS: Siderosis superficial cortical

DICP: Dominio Intracelular de la Proteína Precursora Amiloide

DMPC: *1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine*

DMT2: Diabetes Mellitus Tipo 2

DSPC: *1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine*

EA: Enfermedad de Alzheimer

EDC: Evaluación de Demencia Clínica

ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

EPHA1: *Ephrin type-A receptor 1*

FDA: *Food and Drug Administration*

GFAP: *Glial fibrillary acidic protein*

GWAS: Estudios de Asociación del Genoma Completo; *Genome Wide Association Studies*

HDL: Lipoproteína de Alta Densidad; *High Density Lipoprotein*

HEK293T: Células embrionarias renales-293T; *Human Embryonic Kidney cells-293T*

HIC: Hemorragia Intracraneal

HCHWA: Hemorragia intracraneal hereditaria con amiloidosis; *Hereditary Cerebral Hemorrhage With Amyloidosis*

HLA-DRB1: *HLA class II histocompatibility antigen, DRB1 beta chain*

hp-TAU: Proteína TAU hiperfosforilada

Iba1: *Ionized calcium binding adaptor molecule 1*

IDE: Enzima Degradadora de Insulina; *Insuline Degrading Enzyme*

IL: *Interleukin*

KC: *Keratinocyte chemoattractant*

KDa: Kilo Dalton

KO: Ratones deficientes, *Knock Out*

LCAT: Lecitin Colesterol Acil-Transferasa

LCR: Líquido Cefalorraquídeo

LDL: Lipoproteína de Baja Densidad; *Low Density Lipoprotein*

LRP-1/2: Receptor de lipoproteínas de baja densidad-1 y 2; *Low-density-lipoprotein Receptor Protein-1 and 2*

LXR: *Liver X Receptor*

MIP-1 α : *Macrophage Inflammatory Protein-1 α*

MLV: *Multilamellar Vesicles*, Vesículas Multilamelares

MMP-2/9: Metaloproteinasas 2 y 9

MMSE: Examinación del Estado MiniMental; *MiniMental State Examination*

NCTxxxxxxx: Número de Ensayo clínico; *Number of Clinical Trial*

NLRP3: *NLR Family Pyrin Domain Containing 3*

NMDA: N-metil-D-aspartato

NEP: Neprilisina

PC: *Phosphatidylcholine*

PEG: Polietilenglicol

PET: Tomografía de Emisión de Positrones, *Positron Emission Tomograph*

PiB: Compuesto de Pittsburgh-B; *Pittsburgh Compound-B*

PICALM: *Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein*

poDG: *Polymorphic layer of Dentate Gyrus*

POPC: *1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*

PPA: Proteína Precursora Amiloide

PPA-FCT-83/99: Fragmentos C-terminales de la Proteína Precursora Amiloide de 83 y 99 aminoácidos.

PrP: Proteína priónica

PSEN1/2: Presenilina 1 y 2

PTAM: Proteína TAU Asociada a Microtúbulos

RAGE: Receptor de productos de glicosilación avanzada; *Receptor for Advances Glycation End-products*

rHDL: Lipoproteínas de Alta Densidad reconstituídas; *reconstituted High Density Lipoprotein*

RM: Resonancia Magnética

rt-PA: **Activador tisular del plasminógeno;** *recombinant tissue Plasminogen Activator*

sPPA α / β : Fragmentos solubles de la Proteína Precursora Amiloide α - $\gamma\beta$ -

SNC: Sistema Nervioso Central

SORL1: *Sortilin Related Receptor 1*

SRB-I: *Scavenger Receptor B-I*

t-TAU/hp-TAU: TAU total/ TAU hiperfosforilada

TJ: *Tight Junction*, Uniones estrechas

TRC: Transporte Reverso de Colesterol

TREM-2: Receptor desencadenante expresado en células mieloides-s; *Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-2*

TRIP4: *Thyroid Hormone Receptor Interactor 4*

VLDL: Lipoproteína de Muy Baja Densidad; *Very Low Density Lipoprotein*

Carrera investigadora de la doctoranda

Publicaciones

Fernández-de-Retana S, Cano-Sarabia M, Marazuela P, Sánchez-Quesada JL, García-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 β -amyloidosis. *Sci Rep.* 2017 Nov 7;7(1):14637. doi: 10.1038/s41598-017-15215-w

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. Epub 2017 Sep 5.

Merino-Zamorano C, **Fernández-de Retana S**, Montañola A, Batlle A, Saint-Pol J, Mysiorek C, Gosset F, Montaner J, Hernández-Guillamon M. Modulation of Amyloid- β 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

Merino-Zamorano C, Delgado P, **Fernández de Retana S**, Fernández-Cadenas I, Rodríguez-Luna D, Montaner J, Hernández-Guillamon M. Identification of Plasma Biomarkers of Human Intracerebral Hemorrhage Subtypes through Microarray Technology. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2016 Mar; 25(3):665-71. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2015.11.032. Epub 2015 Dec 29.

Montañola A, **de Retana SF**, López-Rueda A, Merino-Zamorano C, Penalba A, Fernández-Álvarez P, Rodríguez-Luna D, Malagelada A, Pujadas F, Montaner J, Hernández-Guillamon M. ApoA1, ApoJ and ApoE Plasma Levels and Genotype Frequencies in Cerebral Amyloid Angiopathy. *Neuromolecular Med.* 2016 Mar;18(1):99-108. doi: 10.1007/s12017-015-8381-7. Epub 2015 Dec 14.

Congresos

First European PhD and Postdoc Symposium (ENABLE). Presentación oral del trabajo “ Characterization of ApoJ-reconstituted high-density lipoprotein (rHDL) nanodisc for the potential treatment of cerebral β -amyloidosis”. Barcelona (2017).

10a Jornadas científicas del Institut de Recerca Vall d'Hebron. Barcelona. Dic. 2016

5th International CAA Conference. Boston, MA, EEUU. Sept. 2016

2nd European Stroke Organization Conference. Barcelona. Mayo 2016

Cursos

Certificado acreditativo de Competencia de Personal que lleva a cabo procedimientos con animales: Categoría .B. Animalaria Formación y Gestión S.L. Madrid 2015.

Participación en proyectos

Therapeutic impact of ApoJ/Clusterin-coupled liposomes on Alzheimer's disease experimental models Marató TV3. Mar Hernández Guillamón. (Fundació Institut de Recerca de l'hospital Univ. Vall d'Hebron). 02/02/2015-02/02/2018.

PI: Mar Hernández-Guillamon

Interplay of amyloid and ischemia and their influence on blood-brain barrier, amyloid transportation systems and neurodegeneration in cerebral amyloid angiopathy (CAA) Neurodegenerative Disease Research (JPND). Mar Hernández Guillamon. (Fundació Institut de Recerca de l'hospital Univ. Vall d'Hebron). 01/01/2016- 01/01/2018.

PI: Mar Hernández-Guillamon

Estudio de la implicación de la distribución de la apolipoproteína J (ApoJ/Clusterin) en lipoproteínas circulantes en la Angiopatía Amiloide Cerebral Mar Hernández-Guillamón. (Fundació Institut de Recerca de l'hospital Univ. Vall d'Hebron). Desde 02/01/2018.

PI: Mar Hernández-Guillamon

