

**Martina Zandl-Lang, PhD**

**Interactions of simvastatin and apoJ with APP processing and amyloid- $\beta$  clearance in blood-brain barrier endothelial cells**

## **KURZFASSUNG**

---

Da sich Amyloid- $\beta$ -Peptide (A $\beta$ ) in zerebralen Kapillaren ansammeln und festsetzen können, spiegeln diese die zentrale Rolle der Blut-Hirn Schranke (BHS) im Zusammenhang mit der Entstehung der Alzheimer Krankheit wieder. Es wurde eine Beziehung zwischen Apolipoprotein-, Cholesterin- und A $\beta$  Metabolismus festgestellt, jedoch sind die Wechselwirkungen, welche in kapillaren Hirnendothelzellen (BCEC) stattfinden, unzulänglich untersucht. Das Apolipoprotein (Apo)J, auch bekannt als "Clusterin", welches auch mit Lipoproteinpartikeln assoziiert ist, hilft bei der Regulation des Cholesterin- und Lipidstoffwechsels im Gehirn, wobei dieser Prozess bei einer Alzheimer Erkrankung gestört ist. In der Literatur wird auch eine erhöhte Ansammlung an ApoJ im Gehirn von an Alzheimer erkrankten Patienten beschrieben. Zusätzlich wurde gezeigt, dass apoJ A $\beta$ -Proteine binden kann, wobei deren Fibrillisierung verhindert wird und auch die Endozytose von A $\beta$  gefördert werden kann.

Ziel dieser Arbeit war es sowohl die Rolle von apoJ als auch des zellulären Cholesterinmetabolismus in der Prozessierung vom amyloiden Vorläuferprotein (APP) bzw. im A $\beta$  Stoffwechsel an der BHS zu untersuchen. Dafür wurden primäre Schweinehirnendothelzellen (pBCEC) mit apoJ, welches aus humanem Plasma isoliert wurde, und Modulatoren des Cholesterinstoffwechsels inkubiert. Anschließend wurden diese Zellen einer Analyse von APP/A $\beta$  und apoJ unterzogen. In zusätzlichen *in vivo* Versuchen mit gealterten 3xTg AD und Nicht-Tg Mäusen (64 $\pm$ 4 Wochen) und apoJ ko Mäusen, wurde versucht die Zusammenhänge zwischen Änderungen im zellulären Cholesterinstoffwechsel mit der apoJ Expression und dem APP/A $\beta$  Metabolismus an der BHS zu verstehen. Dafür wurden Mäuse für die Dauer von 21 Tagen mit dem

HMGCoA-Reduktase Inhibitor Simvastatin [40 mg/kg] gavagiert, anschließend die Gehirne entnommen und murine primäre (m) BCEC isoliert.

In apoJ Silencing Versuchen in pBCEC konnten wir eine reduzierte Ansammlung von intrazellulärem APP (59%) und A $\beta$  Oligomeren (56%) feststellen. Inkubation von pBCEC mit isoliertem apoJ (2 und 20  $\mu$ g/ml) hingegen, führte zu einer Erhöhung des intrazellulärem APP (3,3-fach und 2,4-fach) und zu einem gesteigertem Transport von A $\beta$  über ein *in vitro* Modell der BHS. In isolierten zerebromikrovaskulären Endothelzellen von 3xTg Alzheimer Modellmäusen konnte eine um 3,4-fach erhöhte Expression von apoJ im Vergleich zu den nicht-transgenen Kontrollmäusen festgestellt werden. In pBCEC führte eine Behandlung mit Simvastatin zu einer deutlichen Erhöhung von intrazellulären und sekretiertem apoJ. Durch diese Behandlung kam es auch zu erhöhten Levels an sekretierten A $\beta$  Oligomeren und zu einer Reduktion von zell-assoziierten A $\beta$  Oligomeren und deren Aufnahme in die Zellen. Zusätzlich erhöhte Simvastatin die Menge an apoJ-Protein (73%) in mBCEC in nicht-transgenen Mäusen. In mBCEC von apoJ ko Mäusen hingegen, konnten wir eine erhöhte Ansammlung an C-terminalen Fragmenten (CTFs)-Prozessierungsprodukte von APP- beobachten, welche durch Simvastatin Verabreichung weiter gesteigert wurde.

Zusammenfassend schlagen wir eine enge und komplexe Interaktion vom zellulären Cholesterinstoffwechsel, apoJ Expression und der APP bzw. A $\beta$  Prozessierung und Eliminierung an der BHS vor.

# ABSTRACT

---

**Background:** Amyloid- $\beta$  peptides ( $A\beta$ ) may accumulate in cerebral capillaries indicating a central role of the blood-brain barrier (BBB) in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD). Although a relationship between apolipoprotein-, cholesterol- and  $A\beta$  metabolism is evident, the interconnecting mechanisms operating in brain capillary endothelial cells (BCEC) are poorly understood. Apolipoprotein (apo)J, also known as clusterin, is present in lipoprotein particles and regulates cholesterol and lipid metabolism of brain which is disturbed in AD. ApoJ expression is increased in AD brains and apoJ binds, prevents fibrillization, and enhances endocytosis of  $A\beta$ .

**Aims:** Our aim was to define the involvement of apoJ and cellular cholesterol homeostasis in amyloid precursor protein (APP) processing/ $A\beta$  metabolism at the BBB. Primary porcine (p)BCEC were incubated in the presence and absence of plasma-derived apoJ and modulators of cholesterol metabolism prior to analyses of APP/ $A\beta$  and apoJ mRNA and protein expression levels. *In vivo* studies with aged 3xTg AD and Non-Tg mice (64 $\pm$ 4 weeks) and apoJ ko mice treated for 21 days with the HMGCoA-reductase inhibitor simvastatin [40 mg/kg] by oral gavage were aiming to elucidate the role of cellular cholesterol homeostasis and apoJ in APP metabolism at the BBB in greater detail.

**Results:** RNA interference-mediated silencing of apoJ in pBCEC decreased intracellular APP and  $A\beta$  oligomer levels by 59% and 56%, respectively, while the addition of 2 or 20  $\mu$ g/ml of purified apoJ to pBCEC increased intracellular APP (by 3.3 and 2.4-fold, respectively) and enhanced  $A\beta$  clearance across the *in vitro* model of the BBB. Cerebromicrovascular endothelial cells isolated from 3xTg AD mice revealed 3.4-fold higher expression levels of apoJ as compared to Non-Tg animals. Treatment with simvastatin markedly increased intracellular and secreted apoJ levels in pBCEC, and, in parallel, increased secreted  $A\beta$  oligomers, and reduced  $A\beta$  uptake and cell-associated  $A\beta$  oligomers. In accordance, simvastatin increased protein levels of apoJ in primary murine (m)BCEC of Non-Tg mice by 73%. In mBCEC of apoJ ko mice, on the other hand, we detected enhanced levels of C-terminal fragments (CTFs) -

cleavage products of APP-, which were further increased in response to simvastatin treatment.

**Conclusion:** Our results, so far, suggest a close and complex interaction of cellular cholesterol homeostasis, apoJ, and APP/A $\beta$  processing and clearance at the BBB.