



Fundació
La Marató de TV3

20^è SIMPOSIUM
Enfermedades neurodegenerativas



MODULACIÓN DEL DÉFICIT DE LA PLASTICIDAD SINÁPTICA COMO ESTRATEGIA TERAPÉUTICA EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

Jordi Alberch Vié

Facultat de Medicina UB

Isabel Pérez Otaño

Universitat Miguel Hernández. Alacant

1. Resumen

La degeneración selectiva de neuronas espinosas medianas (MSN) ha sido considerada la principal causa de las alteraciones motoras en la enfermedad de Huntington (HD). Sin embargo, resultados recientes demuestran que la disfunción sináptica y neuronal corticoestriatal se produce mucho antes de la pérdida neuronal. Por lo tanto, la investigación para diseñar nuevas intervenciones terapéuticas para la HD se ha centrado en el estudio de los mecanismos moleculares subyacentes en la disfunción de la plasticidad neuronal. En este escenario, el objetivo del presente proyecto es identificar las vías intracelulares afectadas por la huntingtina mutada implicadas en la disfunción de la plasticidad neuronal para diseñar nuevas estrategias terapéuticas para prevenir o retrasar los trastornos motores y cognitivos en HD. Para alcanzar este objetivo, analizaremos si puede restaurarse la plasticidad neuronal mediante la modulación de: 1) señalización BDNF / TrkB / p75NTR y 2) el equilibrio de inhibición-excitación involucrado en los circuitos corticoestriatales y nigroestriatales.

Metodología. Se utilizarán modelos de ratón HD (ratones R6/1, HdhQ7/Q111 y YAC128) y modelos humanos HD (las neuronas MSN derivadas de células madre pluripotentes inducidas por HD (iPSC)). Estableceremos un nuevo protocolo para diferenciar las iPSC de las neuronas corticales, nigrales y estriatales para estudiar la interacción célula-célula afectada por la huntingtina mutada. Los cambios en la plasticidad se evaluarán analizando las espinas dendríticas utilizando el sistema Helios Gene Gun en iPSC y cultivos organotípicos. La actividad neuronal también se medirá mediante inmunohistoquímica y *Western blot* utilizando marcadores específicos sinápticos y de citoesqueleto. La electrofisiología se utilizará para analizar la actividad de los receptores NMDA y AMPA. Se utilizarán estímulos optogenéticos en modelos *in vivo* e *in vitro*. Se analizará la conectividad de redes neuronales utilizando imágenes de calcio de alta velocidad.

Resultados esperados. Nuestro proyecto busca nuevas moléculas similares a BDNF con potencial terapéutico para la HD y la comprensión de los mecanismos moleculares implicados en el desequilibrio inhibición-excitación de los ganglios basales para identificar nuevas dianas terapéuticas en HD. El uso de modelos humanos de HD puede ayudar a aproximarnos a la aplicación de los resultados en ensayos clínicos.

2. Resultados

Estudiar los mecanismos de formación de espinas dendríticas y la actividad sináptica afectados en modelos de HD en estado de reposo y después de estimulación neuronal

Pyk2 modula las sinapsis excitadoras del hipocampo y contribuye a los déficits cognitivos en un modelo de enfermedad de Huntington

Se estudia el papel de Pyk2, una proteína tirosina cinasa dependiente de calcio, altamente expresada en el hipocampo. El aprendizaje relacionado con el hipocampo y la potenciación a largo plazo de la CA1 se ven gravemente afectados en ratones deficientes en Pyk2 y están asociados con alteraciones en los receptores NMDA, PSD-95 y espinas dendríticas. En neuronas cultivadas del hipocampo, Pyk2 tiene actividad de autofosforilación dependiente e independiente que determinan el aumento de los niveles de PSD-95 y la densidad de las espinas dendríticas. Los niveles de Pyk2 se reducen en el hipocampo de pacientes con la HD y en el modelo de ratón R6/1. Normalizando los niveles de Pyk2 en el hipocampo se rescata el déficit de memoria en ratones R6/1, la patología de las espinas y la localización del PSD-95. Nuestros resultados revelan un papel para Pyk2 en la estructura de las espinas dendríticas y la función sináptica, sugiriendo que su déficit contribuye a las alteraciones cognitivas en la HD (*Nature Communications*, 30 de mayo de 2017; 8: 1559). Siguiendo con estos datos también observamos un posible papel de Pyk2 en la respuesta al estrés, y en la expresión de marcadores sinápticos y la regulación de la densidad de las espinas dendríticas en la amígdala, sugiriendo que Pyk2 contribuye a la respuesta al estrés a través de cambios microestructurales, y que su déficit pueda contribuir a la regulación del estrés crónico (*Translational Psychiatry*, 2019, 15 de enero; 9 (1): 3).

GluN3A promueve la actividad de los receptores NMDA, aumentando la transmisión sináptica en los modelos de enfermedad de Huntington

Las subunidades de GluN3A han sido relacionadas con la pérdida de sinapsis y la muerte de las neuronas de proyección con espinas del núcleo estriado en la HD. Nuestros resultados muestran que la supresión de expresión de GluN3A impide un fenotipo de transmisión sináptica multivariante que precede a los signos morfológicos en las primeras etapas prodromales. Utilizando un método electrofisiológico altamente sensible en cortes corticoestriatales, hemos observado una mejoría en la respuesta sináptica como mecanismo que desencadena un tipo de excitabilidad eléctrica

dependiente de NMDAR en dendritas. Nuestros resultados destacan también un papel del glutamato activando los receptores NMDA extrasinápticos. Por lo tanto, estos datos implican la reactivación de las subunidades GluN3A en un amplio espectro de déficits de transmisión sináptica en fase temprana en los ratones YAC128; cuestionar el concepto actual que la deslocalización de NMDAR es el desencadenante patológico en HD; e introducir picos de NMDA como nuevo mecanismo candidato para acoplar los NMDAR a la neurodegeneración (*Neurobiology of Disease*, septiembre de 2016; 93: 47-56).

Aumento de los niveles de Rictor que impiden la degeneración neuronal inducida por la huntingtina mutada

Rictor se asocia con mTOR para formar el complejo mTORC2, que regula la función neuronal y la supervivencia. Aquí hemos analizado si la actividad de mTORC2 podría alterarse por la presencia de huntingtina mutada. Observamos que los niveles de Rictor se incrementan específicamente en el núcleo estriado de los modelos de ratón con HD, y en el putamen de los pacientes con HD. La interacción Rictor-mTOR y los niveles de fosforilación de Akt, una de las dianas del complejo mTORC2, se incrementaron en el núcleo estriado del modelo de ratón R6/1, sugiriendo un aumento de la señalización mTORC2. Es interesante destacar que la regulación aguda de Rictor en las neuronas estriatales *in vitro* reduce la actividad de mTORC2, tal como se muestra en niveles reducidos de fosfato-Akt y produce un aumento de la muerte celular inducida por huntingtina mutada. Así, la sobreexpresión de Rictor aumenta la actividad de mTORC2, evitando la muerte celular. Además, la normalización de los niveles endógenos de Rictor en el núcleo estriado de los ratones R6/1 empeora los síntomas motores, lo que sugiere una afectación de la disfunción neuronal. En conclusión, nuestros resultados sugieren que el aumento de los niveles estriatales de Rictor podría contrarrestar la disfunción neuronal inducida por la huntingtina mutada (*Molecular Neurobiology*, 2018 octubre; 55 (10): 7728-7742).

Estudio del equilibrio entre BDNF y TrkB / p75NTR en MSN derivadas de iPSC HD

Las neuronas derivadas de hPSC son funcionalmente maduras *in vitro* y se integran en el núcleo estriado de un ratón *in vivo*

Hemos desarrollado un nuevo protocolo para la diferenciación de hPSC para neuronas telencefálicas maduras y fisiológicamente activas en 37 días, que es útil para

aplicaciones de modelado de enfermedades humanas, test de medicamentos y terapia celular. En el presente estudio se utilizó una línea hPSC inducida (33Q # 1) y una línea embrionaria HPSC (Genea 19). Nuestros datos muestran que los cultivos neuronales derivados de hiPSC 33Qn1 poseen una actividad espontánea con características neuronales diferenciales DIV 37 (Comella *et al.*, manuscrito en preparación).

Generar nuevas moléculas que restauren la plasticidad neuronal y el equilibrio TrkB / p75NTR en modelos de HD

El 7,8-dihidroxiavona mejora los déficits cognitivos y motores en un modelo de ratón de la enfermedad de Huntington mediante la activación específica de la vía PLC γ 1

La administración crónica de 7,8-DHF retrasó los déficits motores de los ratones R6/1 y revirtió los déficits del test de reconocimiento de nuevos objetos (NORT) a las 17 semanas. Los análisis morfológicos y bioquímicos indicaban una mejora de los niveles estriatales de encefalina y la prevención de la pérdida del volumen estriatal. Se ha hallado una recuperación de fosforilación de TrkBY816, pero no de TrkBY515 en el núcleo estriado, conforme a los resultados *in vitro*. Además, el tratamiento con 7,8-DHF mejoró el desequilibrio de p75 / TrkB. Nuestros resultados proporcionan nuevos datos sobre el mecanismo de acción del 7,8-DHF, que sugiere que su efecto en el receptor de TrkB en el núcleo estriado es por la fosforilación selectiva del residuo Y816 y la activación de la vía PLC γ 1, y que los efectos pleiotrópicos de la 7,8-DHF también contribuyen a su potencial terapéutico (*Human Molecular Genetics*, 2017, 15 de agosto; 26 (16): 3144-3160).

El polipéptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria (PACAP) mejora la plasticidad sináptica del hipocampo y mejora el rendimiento de la memoria en la enfermedad de Huntington

El polipéptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria (PACAP) es un neuropéptido que ejerce un efecto neuroprotector, principalmente a través del receptor PAC1. Hemos investigado el efecto de la estimulación del receptor de PACAP para mejorar el desarrollo de la memoria en HD. Se observó una disminución en el hipocampo en la expresión de los tres receptores PACAP en diferentes modelos de ratón desde el inicio de la disfunción cognitiva. En el hipocampo de muestras humanas *post mortem*, hemos observado una disminución específica de PAC1, sin cambios en los receptores VPAC1 y

VPAC2. También hemos observado que el tratamiento con PACAP rescata el nivel de PAC1 en ratones R6/1, aumenta la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en el hipocampo y reduce la formación de agregados de huntingtina mutada. Además, la administración de PACAP contrarrestó los déficits de memoria de ratones R6/1 analizados con el NORT y la tarea de alternancia espontánea de T-maze. Es importante destacar el efecto del PACAP sobre el rendimiento cognitivo que se asoció con un aumento del inmunomarcado con VGlut-1 y PSD95 en el hipocampo de ratones R6/1. Estos resultados sugieren que el PACAP, actuando mediante la estimulación del receptor PAC1, puede tener un potencial terapéutico para contrarrestar los déficits cognitivos inducidos en HD (*Molecular Neurobiology*, 2018 noviembre; 55 (11): 8.263-8.277).

Desarrollar nuevas estrategias para controlar el equilibrio inhibición-excitación en circuitos corticoestriatales y nigroestriatales, *in vitro* e *in vivo*

NETCAL: una plataforma interactiva para el análisis a gran escala de NETWORK y dinámica de población a través de imágenes de CALcio

Hemos desarrollado NETCAL, una plataforma de *software* completa desarrollada con MATLAB para grabar, gestionar y analizar experimentos de imágenes de calcio de alta resolución y de alta velocidad. La facilidad de uso de la interfaz gráfica interactiva y una documentación exhaustiva se adaptan a los investigadores del laboratorio experimental, pero también a científicos experimentados de datos a través de su sistema de *plugins* y *scripts*. Hemos desarrollado un conjunto de herramientas e incorporamos algoritmos y cajas de herramientas de última generación para el análisis a gran escala de la dinámica de la red y de la población, como: la detección automatizada de células (estática y dinámica); diseño y selección de poblaciones mediante aprendizaje automático, agrupación y reconocimiento de patrones; dinámica de descargas (*burst*); detección de picos; inferencia de red (de redes funcionales en relaciones causales), y mucho más. Varias de estas herramientas también están disponibles en tiempo real; así, las células y los puntos pueden controlarse mientras se está grabando el experimento, dando al investigador una amplia información sobre el desarrollo de un experimento.

Hemos probado y utilizado el software en diferentes preparaciones experimentales y equipos de laboratorio. NETCAL ya se ha empleado para probar la viabilidad y

rendimiento de los protocolos de diferenciación de células madre pluripotentes inducidas de humanos (hISPC); para caracterizar el comportamiento individual y colectivo de cultivos corticales y estriatales disociados a partir de los modelos de ratón de HD; para revelar la comunicación entre neuronas y astrocitos en los cultivos del hipocampo de rata; y para detectar patrones de actividad de propagación en cultivos corticales. Aunque ha sido desarrollado para grabaciones de calcio en cultivos, hemos probado y utilizado con éxito grabaciones *in vivo* para analizar datos de matrices de múltiples electrodos.

NETCAL ha sido desarrollado por científicos para que otros científicos promuevan y fomenten el desarrollo de herramientas para la replicación y validación de resultados experimentales. El software es altamente modular y su aplicación disfruta de una fácil extensibilidad para adaptarse a las necesidades específicas de cualquier grupo de investigación. Orlandi *et al.* Zenodo. <http://doi.org/10.5281/zenodo.1119026>
www.itsnetcal.com

JG. Orlandi; S Fernández-García; A Comella-Bolla; M Masana; G García-Díaz Barriga; M Yaghoubi; Un Kipp; JM. canales; MA. colicos; J Davidsen; J Alberch; J Soriano. (2017). *NETCAL: una plataforma interactiva para el análisis de dinámica poblacional a gran escala de NETWORK y grabaciones de imágenes de CALcium* (versión 7.0.0 Open Beta). Zenodo. <http://doi.org/10.5281/zenodo.1119026> www.itsnetcal.com

Conectividad de la red neuronal y disfunción dinámica en los cultivos estriatales de la enfermedad de Huntington

Utilizando imágenes de calcio de alta resolución, mostramos que los cultivos estriatales R6/1 presentaban menos neuronas activas que los WT. Además, los dos cultivos estriatales son capaces de autoorganizarse y producir eventos colectivos de actividades casi sincrónicas, indicando la presencia de una red funcional. Las ráfagas de red presentan una duración y amplitud similares entre los genotipos, mientras que el intervalo entre las ráfagas se reduce significativamente en los cultivos estriatales HD R6/1 respecto a los WT. El bloqueo de los receptores GABAA por Bicuculline (BIC) aumentó el número de neuronas activas e impulsó una actividad coherente a lo largo del cultivo, llegando a niveles similares tanto en WT como en R6/1 HD, lo que sugiere una reducción de la inhibición estriatal GABAérgica en HD. Además, los análisis de conectividad funcional revelaron una disminución del grado de entrada en la red

estriatal R6/1, así como un menor número de módulos conectados de neuronas, identificando una comunicación defectuosa en la red neuronal estriada R6/1. Sin embargo, la disfunción de la red estriatal en HD no solo puede surgir de inhibición local, sino que probablemente se conseguiría de una actividad aferente aberrante. La modulación de la actividad estriatal con NMDA restauró parcialmente la dinámica de la red. La eficiencia global se incrementó y la estadística comunitaria disminuyó de forma específica en cultivos estriatales R6/1, alcanzando ambos parámetros niveles similares a la red estriatal basal WT. Además, el número de conectores aumentó ligeramente después de la adición de NMDA en las redes estriatales WT y R6/1. Estos resultados sugieren que el aumento de la unidad excitadora de la red es capaz de restaurar parcialmente el flujo de información a través de la red estriatal R6 / 1 (Fernández-García *et al.*, manuscrito en preparación).

La estimulación optogenética de la vía corticoestriatal mejora el comportamiento motor en la enfermedad de Huntington

Utilizando matrices de multielectrodos *in vivo*, RMN, optogenética y microdiálisis, caracterizamos la disfunción corticoestriatal en HD. Aplicamos a continuación la estimulación optogenética repetida en ratones sintomáticos R6/1 HD y se evaluó el aprendizaje y la coordinación motores. La RMN estructural y funcional muestra la pérdida de la función corticoestriatal en ratones R6/1 HD. Además, se observó una reducción de los niveles de glutamato estriatal (GluCEST y MRS) y de la liberación corticoestriatal (optogenética acoplada a la microdiálisis). La respuesta electrofisiológica de las neuronas estriatales a la función corticoestriatal inducida ópticamente también se redujo en los ratones HD (MEA). Finalmente, la estimulación optogenética corticoestriatal repetida en ratones HD sintomáticos (R6/1-ChR2) mejoró el aprendizaje motor (*accelerating rotarod*), la coordinación, la actividad exploratoria y el comportamiento estereotipado, comparado con ratones R6/1-YFP controles, casi llegando a los niveles de WT. Esta mejoría se acompañó de un aumento de la densidad de las espinas dendríticas con medición a partir de la tinción de Golgi. Por lo tanto, nuestros resultados demuestran por primera vez una recuperación efectiva inducida por optogenética de los síntomas motores HD *in vivo* (Fernández-García *et al.*, manuscrito en preparación).

El silenciamiento GluN3A con RNAi impide y revierte los fenotipos de la enfermedad inducidos por huntingtina mutada.

Hemos estudiado el potencial terapéutico de silenciar la expresión de GluN3A en ratones YAC128, un modelo HD bien establecido. Se generaron virus adenoasociados recombinantes que codifican un ARN contra GluN3A (rAAV-shGluN3A) y se comparó la capacidad de los diferentes serotipos en MSN. Una única inyección de rAAV9-shGluN3A en el núcleo estriado de ratones de 1 mes (> 90%) reduce la expresión de GluN3A en MSN, previniendo la pérdida de las espinas dendríticas y la mejora del rendimiento de la actividad motora en ratones YAC128. Tratamientos posteriores, cuando la patología en las espinas es detectada, también fue eficaz.

Nuestros datos proporcionan una prueba de concepto para el silenciamiento de GluN3A como estrategia beneficiosa para prevenir o revertir la desconectividad corticostriatal y la discapacidad motora en HD, y apoyan el uso de métodos basados en ARNi o pequeñas moléculas para aprovechar este potencial terapéutico (*Molecular Therapy*, 2018 1 de agosto; 26 (8): 1965-1972).

3. Relevancia y posibles implicaciones clínicas de los resultados obtenidos

Este proyecto es un estudio preclínico que proporciona datos para diseñar nuevos tratamientos contra la enfermedad de Huntington: (1) para la señalización del sistema BDNF / TrkB / p75, Pyk2 y PACAP, y (2) para una nueva diana terapéutica, la subunidad GluN3A los receptores NMDA, que se encontró recientemente elevada en HD. Estos resultados proporcionan información importante para el desarrollo de terapias dirigidas no solo a la enfermedad de Huntington, sino a otros trastornos cognitivos neurodegenerativos, tales como la enfermedad de Alzheimer. La falta de tratamientos efectivos para estas enfermedades supone un gran impacto social y económico, así como problemas psicológicos no solo para los pacientes, sino también para sus familias. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar terapias efectivas para los trastornos neurodegenerativos y, en este escenario, nuestros resultados proporcionan información para desarrollar nuevos tratamientos para la mejora de la calidad de vida de la comunidad de la enfermedad de Huntington.

4. Bibliografía científica generada

Publicaciones

1. Montalban E, Al-Massadi O, Sancho-Balsells A, Brito V, De Pins B, Alberch J, Ginés S, Girault JA, Giralt A.

Pyk2 in the amygdala modulates chronic stress sequelae via PSD-95-related micro-structural changes.

Transl Psychiatry. 2019 Jan 15;9(1):3.

2. De Pins B, Cifuentes-Díaz C, Farah AT, López-Molina L, Montalban E, Sancho-Balsells A, López A, Ginés S, Delgado-García JM, Alberch J, Gruart A, Girault JA, Giralt A.

Conditional BDNF Delivery from Astrocytes Rescues Memory Deficits, Spine Density, and Synaptic Properties in the 5xFAD Mouse Model of Alzheimer Disease.

J Neurosci. 2019 Mar 27;39(13):2441-2458.

3. Creus-Muncunill J, Rué L, Alcalá-Vida R, Badillos-Rodríguez R, Romaní-Aumedes J, Marco S, Alberch J, Perez-Otaño I, Malagelada C, Pérez-Navarro E.

Increased Levels of Rictor Prevent Mutant Huntingtin-Induced Neuronal Degeneration.

Mol Neurobiol. 2018 Oct;55(10):7728-7742.

4. Marco S, Murillo A, Pérez-Otaño I.

RNAi-Based GluN3A Silencing Prevents and Reverses Disease Phenotypes Induced by Mutant huntingtin.

Mol Ther. 2018 Aug 1;26(8):1965-1972.

5. Cabezas-Llobet N, Camprubí S, García B, Alberch J, Xifró X.

Human alpha 1-antitrypsin protects neurons and glial cells against oxygen and glucose deprivation through inhibition of interleukins expression.

Biochim Biophys Acta Gen Subj. 2018 Sep;1862(9):1852-1861.

6. Saavedra A, García-Díaz Barriga G, Pérez-Navarro E, Alberch J.

Huntington's disease: novel therapeutic perspectives hanging in the balance.

Expert Opin Ther Targets. 2018 May;22(5):385-399.

7. Cabezas-Llobet N, Vidal-Sancho L, Masana M, Fournier A, Alberch J, Vaudry D, Xifró X.

Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) Enhances Hippocampal Synaptic Plasticity and Improves Memory Performance in Huntington's Disease.

Mol Neurobiol. 2018 Nov;55(11):8263-8277.

8. Giralt A, Brito V, Chevy Q, Simonnet C, Otsu Y, Cifuentes-Díaz C, De Pins B, Coura R, Alberch J, Ginés S, Poncer JC, Girault JA.

Pyk2 modulates hippocampal excitatory synapses and contributes to cognitive deficits in a Huntington's disease model.

Nat Commun. 2017 May 30;8:15592.

9. García-Díaz Barriga G, Giralt A, Anglada-Huguet M, Gaja-Capdevila N, Orlandi JG, Soriano J, Canals JM, Alberch J.

7,8-dihydroxyflavone ameliorates cognitive and motor deficits in a Huntington's disease mouse model through specific activation of the PLC γ 1 pathway.

Hum Mol Genet. 2017 Aug 15;26(16):3144-3160.

10. Martín-Ibáñez R, Pardo M, Giralt A, Miguez A, Guardia I, Marion-Poll L, Herranz C, Esgleas M, Garcia- Díaz Barriga G, Edel MJ, Vicario-Abejón C, Alberch J, Girault JA, Chan S, Kastner P, Canals JM.

Helios expression coordinates the development of a subset of striatopallidal medium spiny neurons. **Development.** 2017 Apr 15;144(8):1566-1577.

11. Mahfooz K, Marco S, Martínez-Turrillas R, Raja MK, Pérez-Otaño I, Wesseling JF. *GluN3A promotes NMDA spiking by enhancing synaptic transmission in Huntington's disease models.*

Neurobiol Dis. 2016 Sep;93:47-56.

12. Pérez-Otaño I, Larsen RS, Wesseling JF.

Emerging roles of GluN3-containing NMDA receptors in the CNS.

Nat Rev Neurosci.

Comunicaciones a congresos

28 en congresos nacionales y 19 en internacionales

Formación a investigadores

Tesis doctorales:

Alvaro Murillo (2019)

Sara Elena Fernandez García (2019)

Alfonso Gerardo Garcia Díaz-Barriga (2018)

Andrea Comella (2018)

Rafael Alcalá Vida (2017)

Marta Cherubini (2017)

Trabajos de Máster:

Sara Conde Berriozábal (2018)

Esther Garcia-García (2018)

Ened Rodriguez Urgellés (2017)

Ekhine Arrieta (2015)