



Fundació

La Marató de TV3

20^è SIMPOSIUM

Enfermedades neurodegenerativas



FUNCIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DE LOS RECEPTORES NMDA EN LA ETIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER: DE LA PROTEÓMICA A MODELOS *IN VIVO*

Xavier Altafaj Tardio

IDIBELL Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge

1. Resumen

El glutamato, principal aminoácido excitador, y la neurotransmisión glutamatérgica ejercen una función fundamental en los procesos neuronales (neurogénesis, sinaptogénesis, supervivencia neuronal, plasticidad sináptica) y funciones cerebrales subyacentes (memoria, cognición, actividad motora). Funcionalmente, la liberación de glutamato activa los receptores de glutamato (metabotrópicos y/o ionotrópicos), permitiendo la transmisión sináptica. La activación de los receptores ionotrópicos de glutamato (iGluR) permite la entrada de iones necesaria para los procesos sinápticos y su perturbación perjudica la comunicación sináptica y causa disfunción cognitiva. En particular, los iGluR de tipo N-metil-D-aspartato (NMDAR) ejercen un papel fundamental en los procesos de memoria y cognición, y en la actualidad representan la única diana farmacológica –mediante tratamiento con memantina, un antagonista de los NMDAR aprobado por la FDA– para la enfermedad de Alzheimer (EA). Cabe destacar que tanto la localización como las propiedades biofísicas de los NMDAR están moduladas por mecanismos postraduccionales. En base a la relevancia de los NMDAR en la función sináptica (y su desregulación) en EA y la modulación de los mismos mediante mecanismos de fosforilación, nuestro proyecto tuvo como objetivo identificar el patrón de fosforilación de los NMDAR, tanto para identificar posibles dianas terapéuticas (fosforresiduos, cinasas, fosfatasas) como para dilucidar los mecanismos sinaptotóxicos mediados por los NMDAR en EA. La hipótesis de trabajo de nuestra propuesta se basó en un papel bien establecido de la distribución subcelular de NMDAR en su comportamiento dicotómico, que puede promover la activación neuronal y la supervivencia celular o, por el contrario, inducir la activación de vías de señalización que causan disfunción sináptica y conducir a procesos neurodegenerativos como la EA.

Para abordar esta hipótesis, realizamos un análisis mediante espectrometría de masas no dirigido (*untargeted*) de compartimentos subsinápticos, a partir de biopsias EA de regiones cerebrales (hipocampo y corteza entorrinal) afectadas en las etapas iniciales de esta condición, así como en muestras del modelo de ratón Ts65Dn. El estudio sobre este modelo murino trisómico de síndrome de Down (SD), se basa en la comorbilidad entre EA y SD. Efectivamente, el SD es una condición neurológica con inicio temprano de signos histopatológicos de la EA y déficits cognitivos que recapitulan alteraciones de tipo EA. El análisis mediante espectrometría de masas acoplado a fosfoenriquecimiento reveló un patrón de fosforilación de los iGluR asociado al compartimento subcelular y a

la trisomía. De forma concomitante, se determinó una composición proteica (cinasa y fosfatasa, más particularmente) diferencial entre los compartimientos subsinápticos del hipocampo Ts65Dn. A través de una estrategia de biología de sistemas, los datos bioquímicos se utilizaron para construir una matriz del fosfopatrón, asociando genotipo-quinoma-iGluR en los diferentes compartimientos subsinápticos.

Conjuntamente, los resultados obtenidos presentan un perfil específico de las alteraciones del patrón de fosforilación de los iGluR en la sinapsis glutamatérgica del modelo de ratón Ts65Dn, respaldando la hipótesis de trabajo, basada en la contribución de la desregulación de los iGluR y de su fosforilación en las sinaptopatías tales como la EA y el SD. La alteración de los fosforresiduos iGluR en el hipocampo Ts65Dn, junto con la firma cinasa/fosfatasa, han permitido identificar nuevas dianas para el tratamiento de las disfunciones glutamatérgicas en SD y, potencialmente, en EA.

Paralelamente, el proyecto nos ha permitido asignar de forma dirigida (*targeted*), la contribución de una modificación postraducciona de los NMDAR en condiciones de sinaptopatía. De forma más precisa, hemos caracterizado las consecuencias moleculares, celulares y funcionales derivadas de la fosforilación de la subunidad GluN2A de los NDMAR (mediada por la cinasa DYRK1A) en el residuo serina 1048. Al inicio de este proyecto identificamos la marca de fosforilación de GluN2A(pS1048), mediada de forma específica por DYRK1A, una proteína cinasa cuya sobreexpresión está asociada a la EA y al SD. Tras identificar este fosforresiduo, hemos generado un anticuerpo policlona antifosfo GluN2A(pS1048) que, tras su validación, hemos aplicado para el análisis bioquímico e histológico en biopsias de EA y del modelo Ts65Dn. Así, hemos podido determinar un aumento de los niveles de la subunidad fosforilada de GluN2A(pS1048) en las fracciones postsinápticas de las muestras AD y Ts65Dn. Para evaluar su potencial impacto patogénico, hemos realizado estudios *in vitro* en los que hemos podido determinar que la sobreexpresión de GluN2A(pS1048) conduce a una disfunción sináptica. Conjuntamente, estos datos confirman la asociación entre un patrón de fosforilación aberrante de los NMDAR (en particular, un aumento de los niveles de GluN2ApS1048) y la disfunción sináptica. Actualmente, con el fin de evaluar *in vivo* la relevancia patológica de los cambios del fosfopatrón de los iGluR anteriormente descritos, hemos generado un modelo de ratón que expresa de forma constitutiva la subunidad fosfomimética GluN2A(S1048D). Este modelo de ratón, en la

actualidad sujeto a su fenotipado conductual, permitirá evaluar la contribución de la alteración del patrón de fosforilación de los NMDAR en la disfunción neuronal y en los déficits cognitivos asociados a la EA, así como en el futuro cribado farmacológico.

En resumen, este proyecto aporta una visión global y específica del patrón bioquímico de las moléculas asociadas a las sinaptopatías presentes en EA y SD. Ello ha permitido identificar los fosforresiduos de los NMDAR alterados, así como las cinasas y fosfatasas desreguladas para su posterior cribado farmacológico como dianas terapéuticas para la EA. En el siguiente apartado se describen de forma más detallada los principales logros científicos del proyecto.

2. Resultados

Objetivo específico 1. Caracterización del perfil fosfoproteómico sináptico de los receptores NMDA en etapas iniciales de la enfermedad de Alzheimer y en modelos murinos EA

- Hemos establecido un método robusto y altamente reproducible para el fraccionamiento subsináptico de regiones cerebrales, tanto a partir de muestras *post mortem* humanas como de ratón.
- Se ha completado el análisis proteómico semicuantitativo de las fracciones postsinápticas y extrasinápticas del hipocampo de ratones trisómicos y controles, que muestra una alteración del proteoma y de las funciones asociadas, con especial afectación de las proteínas implicadas en la transmisión sináptica (figura 1A).
- Caracterización del perfil fosfoproteómico, con especial atención a los receptores ionotrópicos de glutamato de ratones trisómicos, modelo de la EA. Este estudio permitió describir de forma exhaustiva el repertorio de fosforilaciones de los iGluR en el modelo Ts65Dn, así como la identificación de cinasas/fosfatasas desreguladas en este modelo, que representan potenciales dianas terapéuticas (figura 1B).

- Producción y validación de anticuerpos anti-GluN2ApSer1048, que muestran la presencia postsináptica de esta fosforilación en las sinapsis de neuronas piramidales (excitadoras) del hipocampo (figura 2A).
- Identificación de niveles significativamente aumentados de GluN2A(pSer1048) y DYRK1A en el hipocampo y la corteza entorrinal de biopsias de EA, de forma lineal en función del estadio de la EA (figura 2B).
- Identificación de alteraciones en la firma proteómica (quinasas, fosfatasas) y del patrón de fosforilación de los iGluR en el modelo Ts65Dn que cursa con sinaptopatía, como potenciales dianas terapéuticas (figura 2C).
- En la actualidad se realiza un análisis comparativo del fosfoproteoma Ts65Dn vs. EA, para la identificación de posibles alteraciones bioquímicas coincidentes y/o dispares del modelo Ts65Dn con la EA.

Objetivo específico 2. Generación de herramientas moleculares y de modelos *in vivo* para la expresión de subunidades GluN de los NMDAR fosfomodulados

- Generación de partículas lentivirales Lv::GFP-GluN2A de tipo silvestre (*wildtype*) y fosfomiméticas para la transducción *in vitro* e *in vivo* de constructos GluN2A.
- Validación de la infectividad *in vitro* de partículas virales Lv::GFP-GluN2A, en cultivos neuronales primarios.
- Generación de un modelo murino de tipo *knock-in* KI-GluN2A(S1048D) mediante tecnología CRISPR-Cas9. Obtención de ratones fundadores y análisis genómico de secuencias *off-target* en los distintos ratones fundadores. Amplificación de colonias animales en el estabulario de la Northwestern University (Chicago, EEUU).

Objetivo específico 3. Evaluación del impacto funcional de la modulación mediante fosforilación de los NMDAR en modelos murinos de la enfermedad de Alzheimer

- Caracterización de la activación glial (células GFAP- e Iba1-positivas) en el modelo de ratón adulto Ts65Dn (ratones de 4 y 9 meses de edad).

- Identificación de las consecuencias neuronales de la sobreexpresión de la forma fosfomimética GluN2A(S1048E), asociada a una alteración de la morfología y la función neuronales, con la presencia de una densidad aumentada de espinas inmaduras (espinas neuronales de tipo *thin*, figura 3A).
- La sobreexpresión de GluN2A (S1048E) en cultivos neuronales primarios provoca una desregulación de las corrientes EPSC mediadas por NMDAR, con posibles efectos adversos para la función neuronal (defectos en plasticidad sináptica, excitotoxicidad). Además, se ve afectado el proceso de plasticidad sináptica de LTP inducida químicamente por la glicina. En conjunto, estos datos indican un impacto patogénico del aumento de los niveles de GluN2A(pS1048), asociado a las condiciones de sinaptopatía, y definen los NMDAR (y sus mecanismos de fosforilación) como dianas para futuras intervenciones terapéuticas de la EA (figura 4C).
- En la actualidad hemos iniciado el fenotipado del modelo animal KI-GluN2A(S1048D), con particular interés en la caracterización de su fenotipo cognitivo. Este análisis se acompañará de una evaluación de los beneficios terapéuticos de fármacos dirigidos a modular los NMDAR.

3. Relevancia y posibles implicaciones futuras

El proyecto titulado *Función de la fosforilación de los receptores NMDA en la etiología de la enfermedad de Alzheimer: de la proteómica a modelos 'in vivo'* se llevó a cabo con el fin de determinar el impacto del fosfopatrón de los NMDAR en la fisiopatología de la EA. Al final de estos tres años más uno de trabajo experimental, se han generado múltiples datos relevantes que demuestran el impacto patogénico del fosfopatrón asociado a la EA en la disfunción. La fortaleza de estos datos preclínicos abre nuevas opciones terapéuticas y son objeto de líneas de investigación en curso y futuras investigaciones preclínicas con potencial de transferencia clínica. En los siguientes párrafos se resume la principal relevancia de los datos generados, así como las posibles aplicaciones clínicas derivadas de este proyecto.

Los estudios bioquímicos y funcionales del proyecto proporcionan una integración exhaustiva de las alteraciones fosfoproteómicas y proteómicas en un modelo murino de

síndrome de Down, una condición genética asociada a la EA con inicio prematuro. Estos datos representan, a día de hoy, el repertorio más completo de descripción de las alteraciones fosfoproteómicas de los receptores ionotrópicos de glutamato, y en la actualidad estamos ampliando estos hallazgos al fosfoproteoma sináptico global de las sinapsis excitadoras. Adicionalmente, el enfoque de biología de sistemas combinado con los hallazgos proteómicos ha permitido la identificación de potenciales dianas terapéuticas (proteínas cinasas y fosfatasas), para su futura evaluación como posibles intervenciones terapéuticas.

Junto con el análisis fosfoproteómico no dirigido, anteriormente mencionado, hemos desarrollado una aproximación experimental para evaluar el impacto de los fosforresiduos discretos de los receptores NMDA en la disfunción sináptica. En esta línea, hemos caracterizado el papel fisiológico de la fosforilación del residuo de serina en la posición 1048 de la subunidad GluN2A de los receptores de tipo NMDA. Más importante aún, en el contexto de las condiciones de sinaptopatía, hemos demostrado que el aumento de los niveles de subunidades GluN2A(pSer1048) fosforiladas, resultantes de la sobreexpresión de DYRK1A (una proteína cinasa asociada a la enfermedad de Alzheimer y al síndrome de Down) es suficiente para afectar la transmisión glutamatérgica, alterando tanto la morfología sináptica como los mecanismos de plasticidad sináptica, presentes ambas alteraciones en la EA. De forma conjunta, estos hallazgos proporcionan evidencias sólidas de la implicación de la alteración de la neurotransmisión glutamatérgica en la condición de la EA y definen estas sinapsis excitadoras como una diana farmacológica para el tratamiento de la EA.

En relación con las alteraciones de las sinapsis glutamatérgicas presentes en sinaptopatías (EA, SD), a lo largo del proyecto hemos generado herramientas moleculares y biológicas para la evaluación funcional de estrategias farmacológicas (mediante cribado de fármacos aprobados por la FDA) dirigidas a corregir y/o modular la sinapsis glutamatérgica. Estas herramientas son en la actualidad objeto de evaluación en nuestro laboratorio y, junto con las líneas de investigación actuales, completarán la caracterización de las alteraciones fenotípicas del modelo de ratón KI-Grin2A(S1048D), acompañada de la evaluación *in vivo* del potencial beneficio terapéutico de intervenciones farmacológicas.

En resumen, los resultados obtenidos a lo largo del presente proyecto sitúan la sinapsis glutamatérgica como un elemento central en las condiciones de sinaptopatía, además de evidenciar la relevancia de esta estructura/sistema neuronal en las estrategias terapéuticas actuales y futuras para el tratamiento de la EA.

4. Bibliografía científica generada

Publicaciones (en negrita, miembros del equipo investigador directamente beneficiarios de la acción financiada por la Fundació La Marató TV3):

- **Gómez de Salazar M., Grau C., Locubiche S.** (...) and **Altafaj X.**
Increased phosphorylation of GluN2A subunit at serine residue 1048 is associated with synaptopathy conditions.
En preparació per a The Journal of Neuroscience.
- Soto D., Olivella M., **Grau C.** (...) **Gómez de Salazar M.** (...) and **Altafaj X.**
GRIN2B loss-of-function variant triggering NMDA receptor hypofunctionality in pediatric encephalopathy is attenuated by L-serine diet.
Science Signaling (en segona revisió).
- **Gómez de Salazar M., Grau C.,** Francisco Ciruela, **Altafaj X.**
Phosphoproteomic alterations of ionotropic glutamate receptors in the hippocampus of the Ts65Dn mouse model of Down syndrome.
Front Mol Neurosci. 2018 Jul 25;11:226.
- Fernández-Dueñas V, Pérez-Arévalo A, **Altafaj X,** Ferré S, Ciruela F.
Adenosine A(1)-A(2A) Receptor Heteromer as a Possible Target for Early-Onset Parkinson's Disease. Front Neurosci. 2017 Nov 22;11:652.
- Valls-Comamala V., (...), **Altafaj X., et al.**
The antigen-binding fragment of human gamma immunoglobulin prevents amyloid b-peptide folding into b-sheet to form oligomers.
Oncotarget. 2017 (acceptat per ser publicat)

- Ramos-Fernández E, (...), **Grau C**, (...), **Altafaj X**, Ozaita A, Alvarez A, Vicente R, Valverde MA, Muñoz FJ.

Glutamatergic stimulation induces GluN2B translation by the nitric oxide-Heme-Regulated eIF2 α kinase in cortical neurons.

Oncotarget. 2016 Sep 13;7(37):58876-58892.

Presentación de pósteres (en negrita, miembros del equipo investigador directamente beneficiarios de la acción financiada por la Fundació La Marató TV3):

- Gómez de Salazar M., (...), and Altafaj X.

Altered NMDA receptor phosphopattern in synaptopathy conditions.

Federation of European Neurosciences Societies Meeting (FENS 2018)

- Soto D, Olivella M, Grau C, Armstrong J, Alcón C, Gómez de Salazar M, Gratacòs-Batlle E, Ramos-Vicente D, Gasull X, Fernández-Dueñas V, Ciruela F, Bayés À, Sindreu C, López-Sala A, García-Cazorla À, Altafaj X.

Rett-like severe encephalopathy caused by a de novo GRIN2B mutation is attenuated by D-serine dietary supplement.

European Synapse Meeting, Milán. Diciembre 2017

- Soto D, Olivella M, Grau C, Armstrong J, Alcón C, Gómez de Salazar M, Gratacòs-Batlle E, Ramos-Vicente D, Gasull X, Fernández-Dueñas V, Ciruela F, Bayés À, Sindreu C, López-Sala A, García-Cazorla À, Altafaj X.

Rett-like severe encephalopathy caused by a de novo GRIN2B mutation is attenuated by D-serine dietary supplement.

Spanish Pharmacology Society Meeting, Barcelona. June 2017. Presentació oral. Primer premi Oral Communication.

- Soto D, Olivella M, Grau C, Armstrong J, Alcón C, Gómez de Salazar M, Gratacòs-Batlle E, Ramos-Vicente D, Gasull X, Fernández-Dueñas V, Ciruela F, Bayés À, Sindreu C, López-Sala A, García-Cazorla À, Altafaj X.

Rett-like severe encephalopathy caused by a de novo GRIN2B mutation is attenuated by D-serine dietary supplement.

Gordon Research Conference "Excitatory synapses and brain function". Les Diablerets, Switzerland, June 2017. Poster.

- Valls-Comamala V, Guivernau B, Bonet J, Puig M, Perálvarez-Marín A, Palomer E, Fernández-Busquets X, Altafaj X, Tajés M, Costa M, Puig A, Roquer J, Paez A, Vicente R, Oliva B, Muñoz F.-J.

The Fab region of Immunoglobulins prevent amyloid β -Peptide fibrillation.

ADPD2017 meeting, Wien, Austria. Poster.

- Soto D, Olivella M, Alcón C, Grau C, Gómez de Salazar M, Gratacós-Batlle E, Ramos-Vicente D, Ciruela F, Bayis İ, Sindreu C, López-Sala A, Armstrong J, Garcva-Cazorla İ, Altafaj X.

Rett-like severe encephalopathy caused by a de novo GRIN2B mutation is attenuated by D-serine dietary supplement.

International Workshop of the SICI Excellence Network Consolider (2016). Segovia, Spain. Oral presentation.

- M. Gómez de Salazar Honrubia, C. Grau, I. Ferrer, K. Aratç, S. de la Luna, F. Ciruela, X. Altafaj.

DYRK1A, a novel regulator of NMDARs: implications for Down syndrome and Alzheimer's disease. Federation of European Neurosciences Societies Meeting (FENS 2016), Copenhagen, Denmark. Poster.

- Altafaj X., Soto D., Olivella M., Alcón C., Grau C., Gómez de Salazar M., Gratacçs-Batlle E., Marcos D., Bayis İ., Sindreu C., Armstrong J., Garcva-Cazorla İ.

Rett-like severe encephalopathy caused by a de novo GRIN2B missense mutation is attenuated by D-Serine dietary supplement.

7th ISN Special Neurochemistry Conference. June 2016. Coimbra, Portugal. Oral presentation.

- M Gómez de Salazar, C Grau, K Aratç, JM Fernandez-Fernandez, P Sanchvs, D Soto, A Valderrama, C Sindreu, C Fillat, I Ferrer, S de la Luna, X Altafaj.

DYRK1A, a novel regulator of NMDA receptors: implications for Down syndrome and Alzheimer's disease. Spanish Neuroscience Society Congress (SENC) 2015. Granada, Spain. September 2015.

- M Gómez de Salazar, C Grau, K Aratç, JM Fernandez-Fernandez, P Sanchvs, D Soto, A Valderrama, C Sindreu, C Fillat, I Ferrer, S de la Luna, X Altafaj.

DYRK1A, a novel regulator of NMDA receptors: implications for Down syndrome and Alzheimer's disease. Spanish Network for the Study of Ion Channels, International Meeting. Barcelona, Spain. October 2015.

- M Gómez de Salazar, C Grau, K Arató, JM Fernandez-Fernandez, P Sanchis, D Soto, A Valderrama, C Sindreu, C Fillat, I Ferrer, S de la Luna, X Altafaj.

DYRK1A, a novel regulator of NMDA receptors: implications for Down syndrome and Alzheimer's disease. 1st IN PhD Student & Postdoc Meeting. Alicante, Spain. February 2016.

- M Gómez de Salazar, C Grau, K Arató, JM Fernandez-Fernandez, P Sanchis, D Soto, A Valderrama, C Sindreu, C Fillat, I Ferrer, S de la Luna, X Altafaj.

DYRK1A, a novel regulator of NMDA receptors: implications for Down syndrome and Alzheimer's disease. Federation of European Societies of Neuroscience (FENS) Meeting. Copenhagen, Denmark. July 2016.

Tesis doctorales y formación de estudiantes

Macarena Gómez de Salazar obtuvo su doctorado en septiembre de 2018 gracias a la financiación exclusiva del presente proyecto. La Dra. Gómez de Salazar fue contratada mediante la financiación de la Fundació La Marató TV3, y su tesis doctoral estuvo totalmente enfocada al abordaje de los objetivos de este proyecto.

Este proyecto también se benefició de la contribución de los estudiantes visitantes en formación, en su mayoría pertenecientes al Máster en Neurociencias (UB). Estos estudiantes posteriormente han proseguido su carrera investigadora como estudiantes de doctorado, ya sea en nuestro grupo de investigación o en otras universidades. Los estudiantes que recibieron formación y participaron en este proyecto, fueron los siguientes: A. Santos (2017), en la actualidad en su segundo año de doctorado (IDIBELL); S. Locubiche (2018), solicitante de becas de doctorado (IDIBELL); A. Amelianchik (2016), estudiante de doctorado en la Universidad de Cornell (NY, EEUU); P. Sanchís (2015), estudiante de doctorado en la UAB.

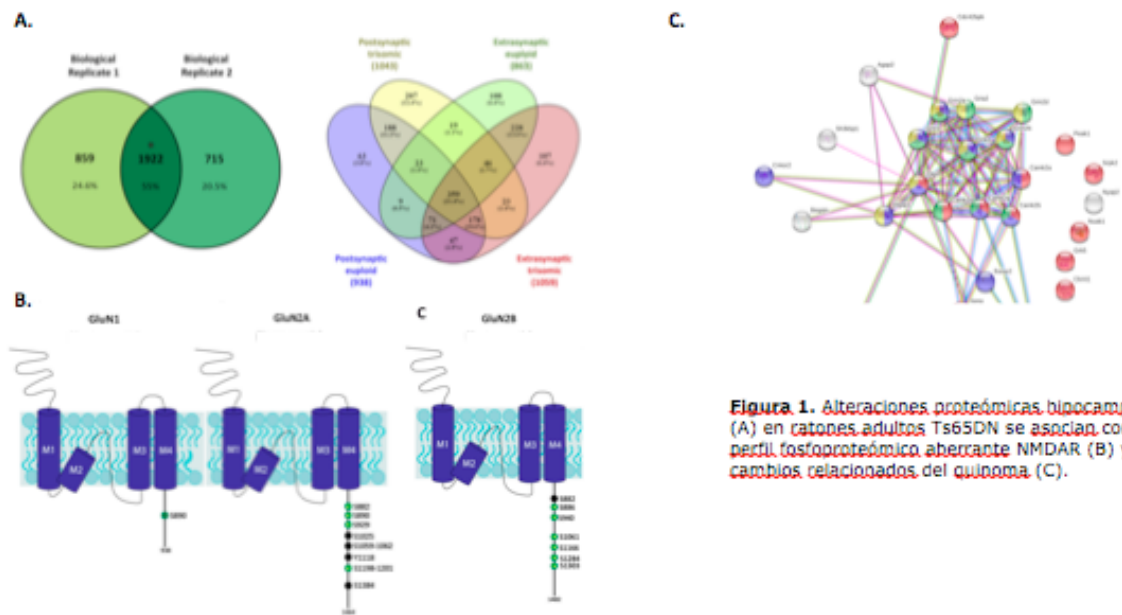


Figura 1. Alteraciones proteómicas sinápticas (A) en ratones adultos Ts65Dn se asocian con un perfil fosfoproteómico aberrante NMDAR (B) y cambios relacionados del quipoma (C).

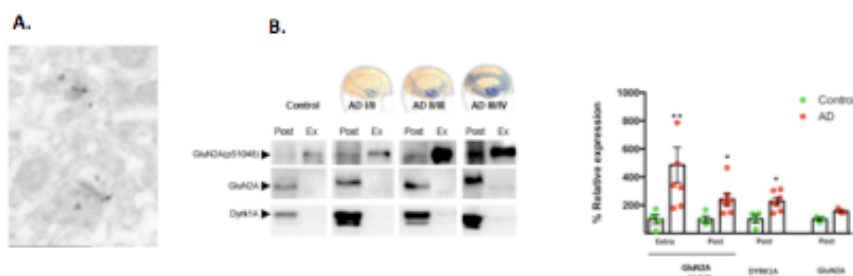


Figura 2. La fosforilación de GluN2A(pS1048) se localiza en las sinapsis glutamatergicas, sus niveles se incrementan a lo largo de la progresión de la EA y son localizados en el compartimento extrasináptico.

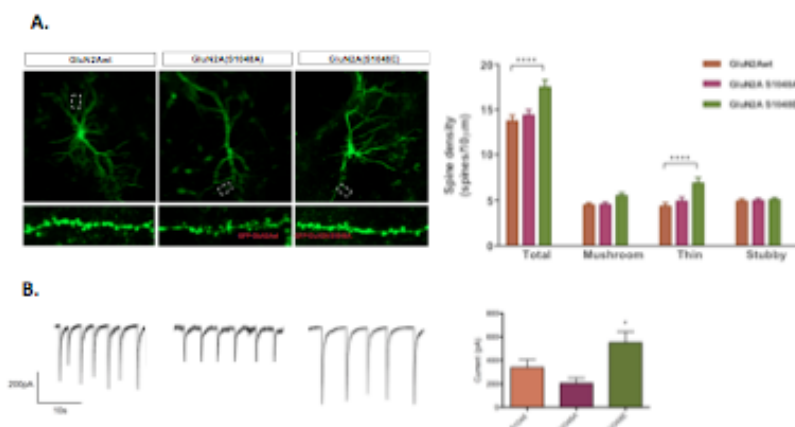


Figura 3. Fosforilación de GluN2A(pS1048) asociada a la EA altera la morfología neuronal (A) y afecta a la neurotransmisión mediada por NMDAR (B), conduciendo potencialmente a distorsión neuronal.