



Fundació
La Marató de TV3

20^è SIMPOSIUM
Enfermedades neurodegenerativas



PAPEL DE LA PRPC COMO *CROSS-TALK PROTEIN* ENTRE ALFA-SINUCLEÍNA/LRRK2 Y P-TAU EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON DE TIPO ESPORÁDICO Y/O FAMILIAR

José Antonio del Río Fernández

Fundació Institut de Bioenginyeria de Catalunya (IBEC)

1. Resumen del proyecto

En las siguientes frases, describimos los principales objetivos de la propuesta.

Los **objetivos generales** del proyecto son los siguientes:

- i)** Nos gustaría determinar si la PrP^C está involucrada en la propagación celular de α -sinucleína y si esta propagación también desencadena la fosforilación de tau de una manera dependiente de PRNP según se determina para la enfermedad de Alzheimer. Esto se realizará tanto *in vivo* como *in vitro*.
- ii)** Queremos discriminar si la presencia de p-tau en PDD + AD está mediada por α -sinucleína o ADDL.
- iii)** Debido a eso, parece que la demencia no está completamente asociada con las mutaciones LRRK2. Nos gustaría explorar si LRRK2 desempeña un papel en paralelo a PrP^C en el control de la dinámica de p-tau y microtúbulos. Por lo tanto, utilizaremos modelos celulares (es decir, la modulación de la expresión de PrP^C en líneas celulares que expresan LRRK2 o el desarrollo de experimentos similares en células M17 que sobreexpresan α -sinucleína) y los analizaremos.
- iv)** Para comprender mejor estos roles en el "paciente" más cercano que nos gustaría desarrollar, se derivó una caracterización bioquímica y celular de la regulación y acumulación de p-tau en neuronas diferenciadas (tanto neuronas dopaminérgicas como no dopaminérgicas) derivadas a partir de iPSc de pacientes con EP (familiares e idiopáticos) y controles. En esta iPSc derivada de PD con aumento de α -sinucleína, la dosificación del gen de PRNP también se modula genéticamente.
- v)** Todos estos datos se correlacionarán con el análisis bioquímico e histológico de PrP^C, p-tau, α -sinucleína, LRRK2 en diferentes regiones (es decir, sustancia negra, corteza, estriado, amígdala) en PD, PDD y DLB (20 casos/grupo) y pacientes LRRK2 (G2019S).

Los objetivos específicos del proyecto son los siguientes:

Objetivo 1. Analizar el papel de la PrP^c en la propagación neural de α -sinucleína *in vitro* e *in vivo*.

Objetivo 2. Averiguar si p-Tau en PDD + AD es generada directamente por α -sinucleína o indirectamente por ADDL.

Objetivo 3. Explorar si LRRK2 desempeña un papel en paralelo a la PrP^c en el control de la dinámica de p-tau y microtúbulos en las alfa-sinucleopatías.

Objetivo 4. Analizar el papel de la dosificación de PRNP en la fosforilación de p-tau y la generación de α -sinucleína en pacientes derivados de PD (esporádicos y familiares) y LRRK2 (G2019S) derivados de IPSc.

Objetivo 5. Realizar estudios bioquímicos e histológicos en muestras humanas.

2. Resultados

Objetivo 1. Hemos determinado que PrP^c es un nuevo receptor para α -sinucleína (Urrea *et al.*, 2017a, 2017b; Del Río *et al.*, 2018). Esto se desarrolla *in vitro* e *in vivo* utilizando dos cepas de ratón diferentes. Hemos determinado que la región del PrP^c responsable de unirse a las protofibrillas de α -sinucleína (PFF) es la región cargada (CC) de la molécula. Esto es relevante ya que esta región también comparte su vinculación con A β .

Objetivo 2. Determinamos que el tratamiento con α -sinucleína (PFF) induce p-tau en las neuronas corticales primarias. Este tratamiento implica la activación de Fyn en contra de otros péptidos que muestran estructuras ricas como la PrP₁₀₆₋₁₂₆. Debido a que PrP₁₀₆₋₁₂₆ se une a 113-133 (HR) de PrP^c en contra de α -sinucleína y β -amiloide, la integridad del dominio HR es obligatoria para inducir la agregación de PrP^c en la membrana e incrementar p-tau. Por otro lado, la sobreexpresión de α -sinucleína aumenta la generación de p-tau después del tratamiento con ADDL.

Aunque la generación de p-tau es muy baja después del tratamiento con fibrillas de α -sinucleína, generamos un doble mutante de ratones que sobreexpresa tres mutaciones diferentes de tau (ratones VLW) en ausencia de PrP^c (ratones ZH3). Los datos actuales sugieren que los cambios observados tanto en PrP^c como en tau están

relacionados con un control epigenético de tau en el promotor PRNP y cambios en microRNA (mi132p). De hecho, p-tau es capaz de inducir la activación del promotor y solo las PPF de p-tau pueden ser internalizadas por neuronas cultivadas. Su acción sobre el promotor está modulada por los factores de transcripción Sp1 y AP1.

Objetivo 3. LRRK2 se ha implicado en la unión de microtúbulos, pero desafortunadamente LRRK2 no se une a PrP^c. Sin embargo, compite por la regulación de la fosforilación de Thr188 por GSK3. Hemos confirmado estos datos negativos durante los dos últimos años utilizando Biacore y Co-IP sin resultados positivos.

Objetivo 4. Comenzamos a diferenciar el IPSc usando dos protocolos diferentes, formación de SNM o diferenciación directa. Hasta la fecha, no podemos reproducir el transporte de α -sinucleína utilizando IPSc en dispositivos microfluídicos debido al bajo número de neuronas TH + generadas a partir de nuestras IPSc. Como alternativa, estamos desarrollando nuevos cultivos utilizando poblaciones directas de neuronas TH+ seleccionadas por FACS y sobreexpresando formas mutadas de sinucleína en estas células para verificar si el transporte de las formas patógenas tiene lugar en estas células. Estos experimentos están en proceso como una continuación directa del proyecto financiado.

Objetivo 5. Durante el proyecto, recolectamos más de 300 muestras de PD y controles de cuatro biobancos diferentes (Hospital Clínic, Navarra, HUB-Bellvitge y DZNE-Alemania). Comenzamos a determinar los niveles de p-tau en estas muestras. Utilizamos dos epítomos diferentes, AT8 y PFH1. Las muestras indicaron que la p-tau está aumentada en el neocórtex de los pacientes con EP. Incluimos PDD (muestras de enfermedad de Parkinson en el estudio). Los resultados preliminares demostraron que las moléculas que modulan la fosforilación de tau (es decir, la reelina) no se modifican en las áreas de la PD en contra de AD. Datos similares también afectan a PrP^c. Los datos analizados se incluyen en una versión preliminar de un artículo. Se emplearon más de 200 muestras de pacientes, incluidas muestras de LCR de Alemania, Navarra, CIMA, Hospital Clínic y Mútua de Terrassa.

3. Relevancia e implicaciones futuras

En este proyecto, hemos podido describir por primera vez que la proteína priónica celular es un receptor para α -sinucleína. Además, hemos podido determinar la región de unión entre ambas proteínas, por lo que creemos que se abren nuevas vías terapéuticas para tratar de bloquear esta unión y la diseminación de la sinucleinopatía en el cerebro de los pacientes. En este sentido, es importante mencionar que la región o área de acoplamiento entre la α -sinucleína y la PrP^c es la misma que para las ADDL en la enfermedad de Alzheimer. Esto abre aún más las estrategias terapéuticas putativas centradas en la región CC (región de unión) del PrP^c para la neurodegeneración. Estas estrategias se centran actualmente en la inmunoterapia y la orientación farmacológica dirigida al sitio.

4. Bibliografía

- (1) Franco R, Aguinaga D, Reyes I, Canela EI, Lillo J, Tarutani A, Hasegawa M, Del Ser A, **Del Río JA**, Kreutz MR, Saura C, Navarro G.
N-Methyl-D-Aspartate receptor link to the MAP kinase pathway in cortical and hippocampal neurons and microglia is dependent on calcium sensors and is blocked by α -synuclein, Tau and phospho-Tau in non-transgenic and in the transgenic APP_{Sw,Ind} mice.
Frontiers in Molecular Neuroscience. 11:273, 2018.
- (2) Mata A, Gil V, Pérez-Clausell J, Dasilva M, González-Calixto MC, Soriano E, García-Verdugo JM, Sánchez-Vives MV, **del Río JA**.
New functions of semaphorin 3E and its receptor PlexinD1 during developing and adult hippocampal formation.
Scientific Reports. 8:1381, 2018.
- (3) **Del Río JA**, Ferrer I, Gavín R.
Role of cellular prion protein in interneuronal amyloid transmission.
Progress in Neurobiology. 165-167:87-102, 2018.

- (4) Urrea L, Segura-Feliu M, Masuda-Suzukake M, Hervera A, Pedraz L, García Aznar JM, Vila M, Samitier J, Torrents E, Ferrer I, Gavín R, Hagesawa M, **del Río JA**. *Involvement of cellular prion protein in α -synuclein transport in neurons*. *Molecular Neurobiology*. 55:1847-1860, 2018.
- (5) Matamoros-Angles A, Gayosso LM, Richaud-Patin Y, Di Domenico A, Vergara C, Hervera A, Sousa A, Fernández-Borges N, Consiglio A, Gavín R, López de Maturana R, Ferrer I, López de Munain A, Raya A, Castilla J, Sánchez-Pernaute R, **del Río JA**. *iPS cell cultures from a Gerstmann-Sträussler-Scheinker patient with the Y218N PRNP mutation recapitulate tau pathology*. *Molecular Neurobiology*. 55:3033-3048, 2018.
- (6) Llorens F, Thüne K, Martí E, Kanata E, Dafou D, Díaz-Lucena D, Vivancos A, Shomroni O, Zafar S, Schmitz M, Michel U, Fernández-Borges N, Andréoletti O, **del Río JA**, Díez J, Fischer A, Bonn S, Sklaviadis T, Torres JM, Ferrer I, Zerr I. *Regional and subtype-dependent miRNA signatures in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease are accompanied by alterations in miRNA silencing machinery and biogenesis*. *PLoS Pathogens*. 14(1): e1006802, 2018.
- (7) Urrea L, Ferrer I, Gavín R, **del Río JA**. *The cellular prion protein (PrP^c) as neuronal receptor for α -synuclein*. *Prion*. 11:226-233, 2017.
- (8) Mata A, Urrea L, Vilches S, Llorens F, Thüne K, Espinosa JC, Andréoletti O, Sevillano AM, Torres JM, Requena JR, Zerr I, Ferrer I, Gavín R, **Del Río JA**. *Reelin Expression in Creutzfeldt-Jakob Disease and Experimental Models of Transmissible Spongiform Encephalopathies*. *Molecular Neurobiology*. 54:6412-6425, 2017.
- (9) Gutiérrez-Franco A, Eixarch H, Costa C, Gil V, Castillo M, Calvo-Barreiro L, Montalban X, **Del Río JA**, Espejo C. *Semaphorin 7A as a Potential Therapeutic Target for Multiple Sclerosis*. *Molecular Neurobiology*. 54:4820-4831, 2017.

- (10) Vilches S, Vergara C, Nicolás O, Mata A, **Del Río JA**, Gavín R.
Domain-specific activation of death-associated intracellular signalling cascades by the cellular prion protein in neuroblastoma cells.
Molecular Neurobiology. 53:4438-4448, 2016.
- (11) **Del Río JA**, Gavín R.
Functions of the cellular prion protein, the end of Moore's law, and Ockham's razor theory.
Prion. 10(1):25-40, 2016.
- (12) Carulla P, Llorens F, Matamoros-Angles A, Aguilar-Calvo P, Espinosa JC, Gavín R, Ferrer I, Legname G, Torres JM, **Del Río JA**.
Involvement of PrP(c) in kainite-induced excitotoxicity in several mouse strains.
Scientific Reports. 5:11971, 2015.
- (13) Tong Z, Segura-Feliu M, Seira O, Homs-Corbera A, **Del Río JA**, Samitier J.
A microfluidic neuronal platform for neuron axotomy and controlled regenerative studies.
RSC Advances. 5:73457-73466, 2015.