



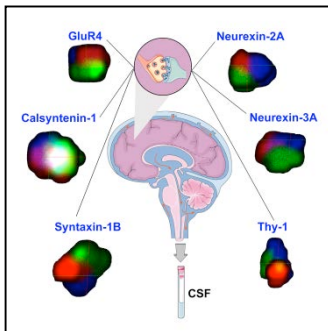
Fundació
La Marató de TV3

20^è SIMPOSIUM
Enfermedades neurodegenerativas

MARCADORES SINÁPTICOS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER PRECLÍNICA

Alberto Lleó Bisa

Hospital de la Santa Creu i Sant Pau



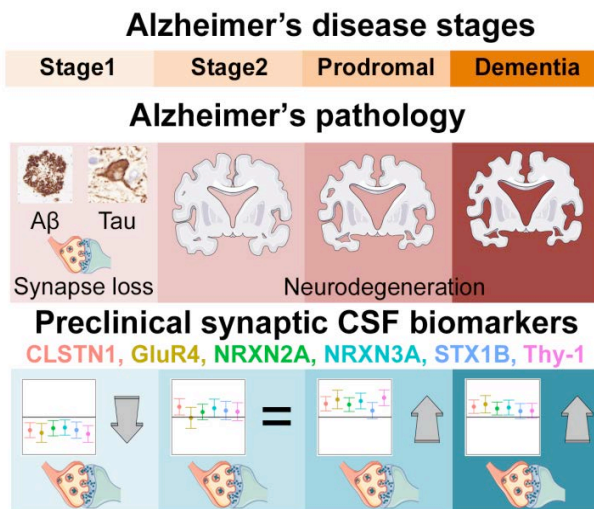
1. Resumen del proyecto

Este proyecto tiene como objetivo profundizar en el conocimiento del daño sináptico en la enfermedad de Alzheimer (EA). Los objetivos específicos se dividieron en dos grandes apartados: (1) caracterizar el proteoma sináptico en el líquido cefalorraquídeo (LCR) en la EA con la finalidad de descubrir proteínas sinápticas como potenciales biomarcadores precoces de la enfermedad y (2) caracterizar la composición molecular sináptica del córtex entorrinal humano e identificar los cambios más precoces inducidos por la EA. Para la consecución de estos objetivos se propusieron los diseños experimentales que se detallan a continuación.

Para alcanzar el objetivo 1, se seleccionaron los mejores candidatos a biomarcadores sinápticos en la EA a partir de datos generados por la bibliografía y de un estudio piloto. De las 251 proteínas candidatas se seleccionaron 22 para un estudio posterior mediante espectrometría de masas (MS). De estas 22, se evaluó la expresión de la proteína en el cerebro humano y su adecuada detección en el LCR humano. De este estudio se seleccionaron 9 proteínas (calsinténina-1, GluR2, GluR4, neurexina-2A, neurexina-3A, neuroligina-2, syntaxina-1B, Thy-1 y Vamp-2), que se midieron en tres cohortes de sujetos controles y en diversas fases del continuo Alzheimer. El estudio demostró que se produce un descenso global de estas proteínas en la fase preclínica de la EA (personas con signos biológicos pero sin síntomas), cambios que preceden a los marcadores de neurodegeneración. Hemos depositado una patente para proteger la explotación de estas proteínas como biomarcadores de la degeneración sináptica y hemos licenciado el desarrollo de ensayos para facilitar su detección en el entorno clínico.

Para alcanzar el objetivo 2, se comparó la composición molecular de fracciones del sinaptosoma aisladas de 18 muestras de sujetos controles y dos grupos que cursan con depósitos cerebrales de proteína tau (tauopatía): casos de tauopatía primaria relacionada con la edad (PART) y casos de EA. Observamos una mayor presencia de proteínas mitocondriales en la sinapsis en casos de PART y casos de EA en comparación con los controles. Sin embargo, no observamos diferencias en la composición de las sinapsis entre casos de PART y de EA. Concluimos que la patología tau asociada a la edad y a la EA están relacionadas con un reclutamiento de proteínas mitocondriales en la sinapsis. En resumen, el estudio proporciona información

importante sobre los cambios iniciales de una región crítica para la EA y puede facilitar la identificación de biomarcadores para detectar la degeneración sináptica, un evento precoz en la patogenia de la EA.



Resumen gráfico: Hemos identificado y validado un panel de 6 proteínas sinápticas (calsinténina-1, GluR4, neurexina-2A, neurexina-3A, sintaxina-1B y Thy-1) que se reducen en el líquido cefalorraquídeo en la fase preclínica de la EA (Stage 1) caracterizada por amiloidosis cerebral (acúmulo de Aβ) en ausencia de síntomas. Además, las mismas proteínas aparecen aumentadas en las fases sintomáticas (prodrómica y demencia), lo que refleja una neurodegeneración más generalizada. Estos resultados muestran por primera vez que el descenso de proteínas sinápticas en el LCR es un fenómeno muy precoz que precede a los fenómenos de neurodegeneración.

2. Resultados

Las sinapsis son estructuras esenciales para el correcto funcionamiento neuronal. El daño sináptico en la EA juega un papel central, aunque se trata de un fenómeno poco estudiado en humanos. En este proyecto se plantearon dos grandes objetivos con el fin de profundizar en este mecanismo y su potencial aplicación en el diagnóstico temprano de la EA.

Objetivo 1: caracterizar el proteoma sináptico en el líquido cefalorraquídeo (LCR) con la finalidad de identificar proteínas sinápticas como potenciales biomarcadores precoces de la enfermedad

Para la consecución de este objetivo se inició el estudio con la selección de los mejores candidatos a biomarcadores sinápticos a partir de datos generados por la bibliografía científica y un estudio piloto obtenido en muestras de LCR de 60 personas. Este es el primer estudio sistemático del proteoma de LCR y además incluye la caracterización completa de su componente sináptico. Específicamente el estudio permitió conocer que el 6% del proteoma sináptico en el LCR está formado por proteínas sinápticas. De las 251 proteínas detectables en el LCR se seleccionaron 22 para un estudio posterior. Desarrollamos ensayos de espectrometría de masas (MS) dirigida (SRM, *selective*

monitoring reaction) utilizando 54 péptidos marcados con isótopos correspondientes a las 22 proteínas de interés. Eliminamos 12 proteínas del estudio debido a una detección insuficiente en 5 muestras de LCR. De las 10 proteínas restantes se evaluó su expresión sináptica en el cerebro humano mediante la técnica de la microscopía de tomografía por *array* disponible en nuestro grupo y detallada en dos publicaciones previas (Colom-Cadena *et al.*, *Brain*, 2017; Pickett *et al.*, *J Alzheimer Dis*, 2016).

La AT es particularmente adecuada para el estudio de las sinapsis humanas, ya que proporciona una resolución espacial mejorada en el plano axial en comparación con otras técnicas de microscopía de luz (como la microscopía confocal). Al obtener secciones de tejido ultrafino (70 nm), se pueden identificar sinapsis individuales. Las reconstrucciones en 3D de sinapsis individuales muestran claramente la expresión de 9 de las proteínas del panel directamente en la sinapsis, marcadas por marcadores presinápticos (sinaptofisina) y postsinápticos (PSD-95) (**figura 1A**). Sin embargo, la tenascina-R se encontró alrededor de la sinapsis sin contacto directo, lo que es consistente con los datos de la bibliografía que sugieren que la tenascina-R reside en redes perineuronales extracelulares. La especificidad de la expresión sináptica se evaluó adicionalmente cuantificando el enriquecimiento de las proteínas del panel en el sinaptosoma de 6 muestras de tejido cortical humano sin patología. La isoforma 2A de neurexina-2 no pudo analizarse debido a la falta de un anticuerpo específico disponible comercialmente adecuado para la transferencia Western. La **figura 1B** muestra que las 9 proteínas analizadas se enriquecieron en fracciones sinápticas en comparación con el homogeneizado ($p < 0,03$).

Las 9 proteínas con alta especificidad para la sinapsis (calsinténina-1, GluR2, GluR4, neurexina-2A, neurexina-3A, neuroligina-2, sintaxina-1B, Thy-1 y Vamp-2) fueron elegidas para su evaluación como marcadores de la pérdida sináptica en tres cohortes de sujetos control y en diversas fases del continuo Alzheimer procedentes del Hospital de Sant Pau de Barcelona, la Fundación CITA Alzheimer y el Hospital Clínic de Barcelona. El estudio global (**figura 2**) demostró un descenso global de estas proteínas en la fase preclínica (sin síntomas) de la EA (Stage 1) y un aumento posterior en las fases sintomáticas (prodrómica y demencia). De las 9 proteínas, 6 (calsinténina-1, GluR4, neurexina-2A, neurexina-3A, sintaxina-1B y Thy-1) registraron un descenso significativo en la fase preclínica ($p < 0,05$). Estos resultados muestran por primera vez que el descenso de proteínas sinápticas en el LCR es un fenómeno muy precoz en

la fase preclínica de la EA que precede a los fenómenos de neurodegeneración. Proponemos que los niveles reducidos en el primer estadio preclínico pueden reflejar una densidad sináptica reducida en estos individuos con amiloidosis cerebral, un efecto que se enmascara por la neurodegeneración generalizada en etapas posteriores de la enfermedad. Los resultados fueron publicados en la revista internacional más

importante del campo de la proteómica (Lleó *et al.*, *Mol Cell Prot*, 2019).

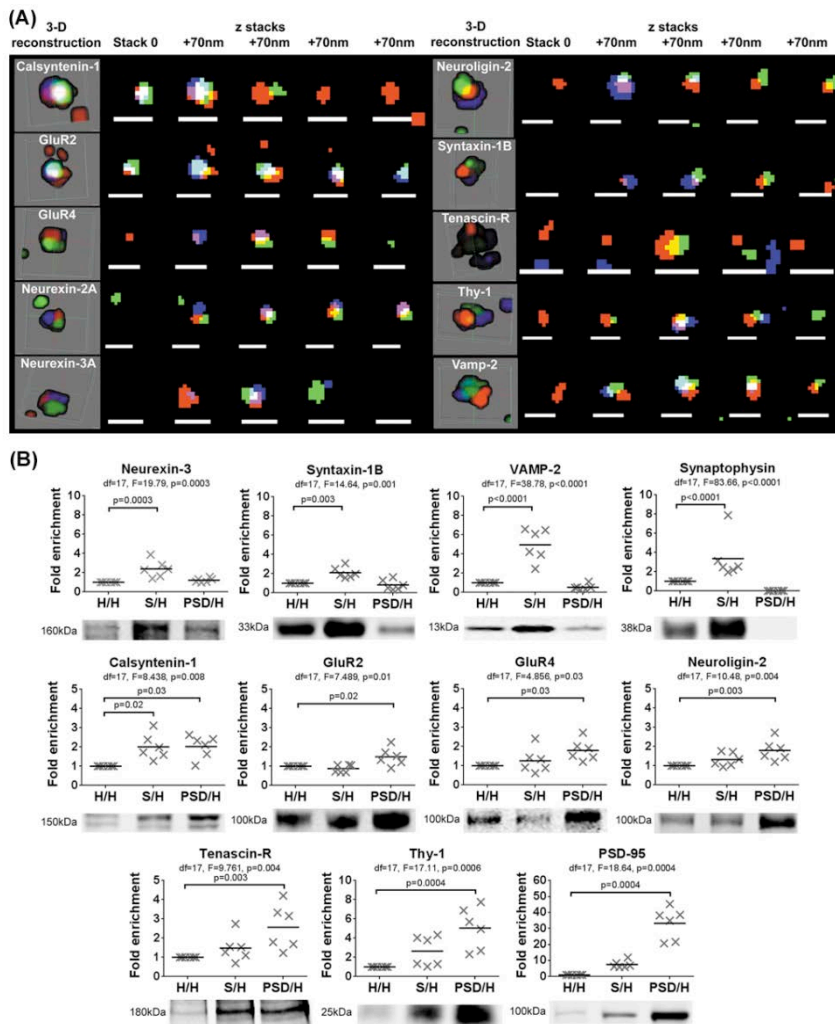


Figura 1. Expresión de las proteínas del panel en la sinapsis cortical humana. (A) Mediante microscopía AT, se tiñeron cortes ultrafinos (70 nm) de tejido cortical *post mortem* de un donante con anticuerpos

específicos para los marcadores sinápticos de referencia de la presinapsis (sinaptofisina, rojo) y postsinapsis (PSD95, verde) y las proteínas del panel sináptico (azul). Se muestra una reconstrucción en 3D de una sinapsis representativa para cada proteína del panel. La inmunofluorescencia segmentada de las 3 proteínas en cada z individual (en incrementos de

70 nm) se muestra a la derecha de la reconstrucción. Las barras de escala, que representan 1 μm, se muestran en la parte inferior de cada z. **(B)** El grado de enriquecimiento (*fold-enrichment*) de cada proteína del panel en las fracciones de homogeneizado (H), sináptosoma (S) y PSD (PSD) aisladas de la corteza humana *post mortem* (n = 6). S / H y PSD / H: intensidad en las fracciones S o PSD relativa a H para la misma muestra. S:S: intensidad en la fracción H para cada muestra en relación con la intensidad media en la fracción H en todas las muestras. También se muestra el enriquecimiento de los marcadores de referencia de la presinapsis (sinaptofisina) y postsinapsis (PSD-95).

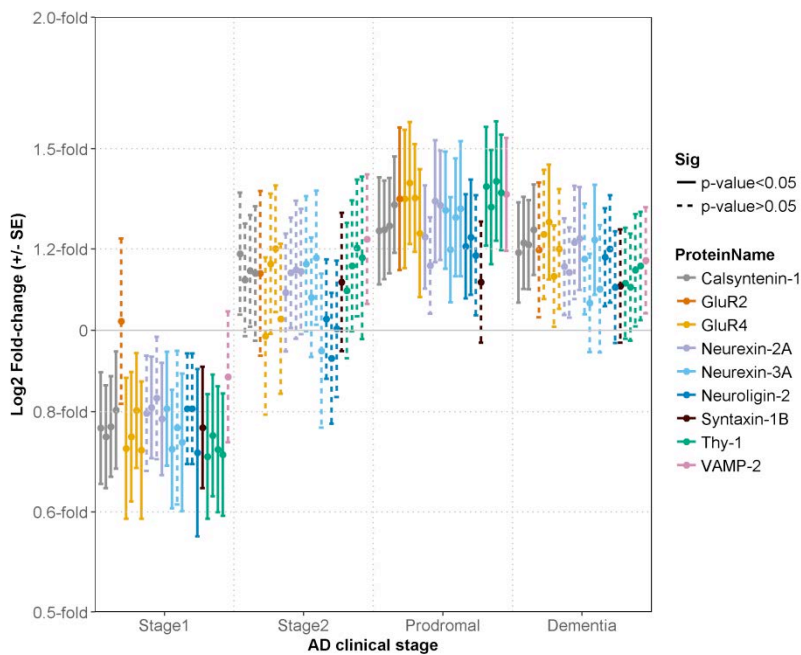


Figura 2. Niveles relativos en el LCR de péptidos sinápticos en el continuo de la EA. Se muestra la cantidad media relativa ($\text{Log}_2\text{-fold-change} \pm \text{error estándar; SE}$) de las proteínas del panel sináptico en el LCR de cada estadio de la EA comparado con controles cognitivamente normales (media de tres cohortes independientes). Para facilitar la interpretación, los valores naturales se etiquetan en el eje y en una escala log_2 . El estilo de línea de las barras de error se determinó mediante el corte de los valores p para comparaciones de grupos por pares utilizando un modelo de regresión lineal de efecto mixto (véase la leyenda). Stage 1: estadio preclínico 1; Stage 2: estadio preclínico 2; Prodromal: EA prodrómica; Dementia: demencia tipo EA.

Objetivo 2: caracterizar la composición molecular sináptica del córtex entorrinal humano e identificar cambios más precoces inducidos por la EA

Para la consecución de este objetivo se procedió a la extracción, mediante un protocolo publicado, de sinaptosomas de 18 muestras cerebrales de córtex entorrinal de sujetos controles sanos y de dos grupos que presentan depósitos anómalos de proteína tau en el cerebro (tauopatía): tauopatía primaria relacionada con la edad (PART) y EA. Las fracciones se analizaron mediante espectrometría de masas (LC-MS/MS) en el Centro de Regulación Genómica. Previamente comprobamos mediante transferencia Western que las fracciones obtenidas estaban enriquecidas para la fracción presináptica. Posteriormente, se compararon las proteínas encontradas en los tres grupos. Utilizando PANTHER, una herramienta en línea para el análisis de vías biológicas (www.pantherdb.org), anotamos las proteínas a un proceso biológico y comparamos el cambio medio en la expresión de cada proceso en los sinaptosomas de los casos de

EA en comparación con los controles. Observamos niveles más bajos de proteínas asociadas con la secreción de vesículas y señalización sináptica, lo que refleja la degeneración de sinapsis asociada con la EA (**figura 3**). Además, observamos una expresión elevada de proteínas mitocondriales en la sinapsis (**figura 3**). Los casos PART demostraron los mismos cambios en comparación con los controles. Concluimos que la patología tau asociada a la edad y a la EA está relacionada con un reclutamiento de proteínas mitocondriales en la sinapsis. Este estudio proporciona información importante sobre los cambios iniciales de una región crítica para la EA y proponemos que las proteínas asociadas a las vías mitocondriales que demostraron la mayor significancia podrían ser nuevos marcadores de los procesos iniciales en enfermedades que se presentan con tauopatía. El manuscrito se encuentra en este momento en fase de redacción.

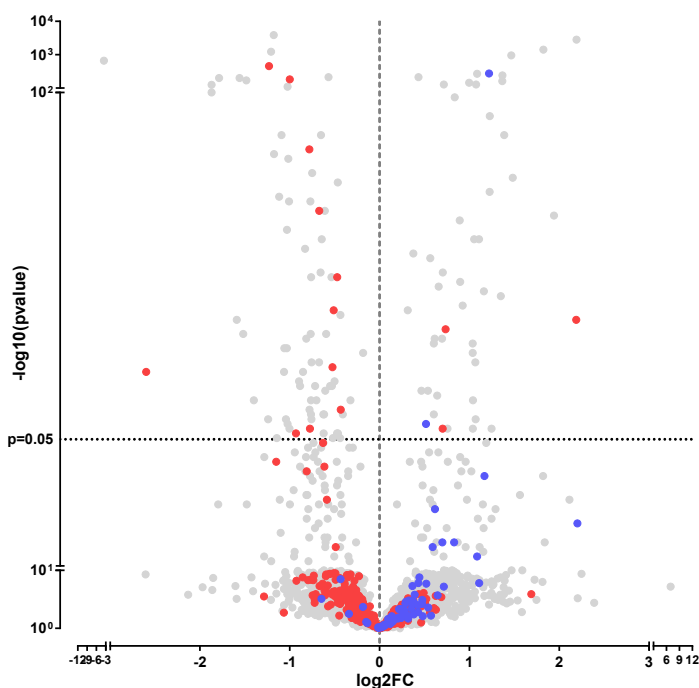


Figura 3. Expresión relativa de proteínas sinápticas en el córtex entorrinal de la EA frente a controles. Expresión relativa (\log_2FC) de las 3.130 proteínas cuantificadas en fracciones del sinaptosoma aisladas de casos con la EA frente a fracciones del sinaptosoma aisladas de controles. Las proteínas asociadas a la secreción de vesículas sinápticas o a la señalización sináptica están marcadas en rojo. Las proteínas asociadas a funciones de la mitocondria están marcadas en azul.

En resumen, este proyecto ha proporcionado información novedosa sobre los cambios iniciales de una región crítica para la EA y ha permitido la identificación de nuevos biomarcadores que podrían servir para la detección de la degeneración sináptica, un

evento precoz en la patogénesis de la EA. Los marcadores nuevos tienen potencial para ser útiles en una variedad de enfermedades neurológicas y psiquiátricas, y abren la vía para una investigación más amplia en el futuro (véase nuestra publicación Lleó *et al.*, *Clinica Chimica Acta*, 2019).

3. Relevancia e implicaciones futuras

El presente proyecto ha dado lugar a resultados muy relevantes para la comunidad científica y con posibles aplicaciones prácticas para los pacientes con Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas. En concreto las proteínas sinápticas descubiertas en el LCR en este proyecto (objetivo 1) pueden representar marcadores de progresión en la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos relacionados o bien marcadores de diagnóstico precoz en sujetos con un riesgo elevado (por ejemplo, en casos con historia familiar) de desarrollar enfermedad de Alzheimer.

Además, como consecuencia directa de este proyecto, se ha presentado una patente de 10 proteínas sinápticas para proteger su explotación como biomarcadores de la degeneración sináptica y se ha licenciado una compañía belga, ADx Neurosciences, para el desarrollo de inmunoensayos de 4 proteínas para su aplicación a gran escala en pacientes con enfermedades neurológicas. El desarrollo de ensayos más robustos que permitan un uso clínico más amplio es un paso clave para la aplicación en la práctica clínica. Esperamos que algunos de estos marcadores se puedan aplicar en el futuro próximo en la rutina clínica o bien en ensayos clínicos con fármacos modificadores de la enfermedad.

4. Bibliografía científica

Artículos científicos

Lleó A, Parnetti L, Belbin O, Wiltfang J.

Has the time arrived for cerebrospinal fluid biomarkers in psychiatric disorders?

Clinica Chimica Acta 2019 Jan 22;491:81-84

Lleó A, Núñez-Llaves R, Alcolea D, Balateu-Paños, Colom-Cadena M, Muñoz L, Querol-Vilaseca M, Pegueroles J, Rami L, Lladó A, Molinuevo JL, Tainta M, Clarimón J, Spires-Jones T, Blesa R, Fortea J, Martínez-Lage, Sánchez-Valle R, Bayés A, Belbin O.

Non-linear cerebrospinal fluid profile of synaptic proteins in the Alzheimer's disease continuum.

Molecular Cellular Proteomics 2019 Jan 3. pii: mcp.RA118.001290. doi:

10.1074/mcp.RA118.001290.

Colom-Cadena M, Pegueroles J, Herrmann AG, Henstridge CM, Muñoz L, Querol-Vilaseca M, San Martín-Paniello C, Luque-Cabecerans J, Clarimón J, Belbin O, Nuñez R, Blesa R, Smith C, McKenzie AC, Frosch MP, Roe A, Fortea J, Andilla J, Loza-Álvarez P, Gelpi E, Hyman BT, Spires-Jones T, Lleó A.

Synaptic phosphorylated α -synuclein in dementia with Lewy bodies.

Brain 2017; 140: 3204-14.

Pickett EK, Koffie RM, Wegmann S, Henstridge CM; Herrmann AG, Colom-Cadena M, Lleó A, Kay KR, Vaught M, Soberman R, Walsh DM, Hyman BT, Spires-Jones TL.

Non-fibrillar oligomeric Amyloid-beta within synapses.

J Alzheimer's Dis 2016;53:787-800.

Lleó A, *et al.*

Proteomic alterations at the entorhinal synapse in brains with Tau pathology.

En fase de redacción.

Patentes

Patente europea

Inventores: Olivia Belbin, Alberto Lleó, Alejandro Bayés, Juan Fortea, Daniel Alcolea.

Fecha de prioridad: 16 de marzo de 2018.

Número de solicitud: EP18382175.0.

Título: Markers of synaptopathy in neurodegenerative disease.

Licencias

Entidades: IIB-SantPau, Barcelona; ADx Neurosciences, Bélgica.

Motivo de la licencia: Desarrollo de anticuerpos e inmunoensayos adecuados para el mercado del diagnóstico *in vitro* para 4 biomarcadores sinápticos identificados por el equipo en el IIB-Sant Pau.

Duración: 2018-2025.