



Fundació

La Marató de TV3

20^è SIMPOSIUM

Enfermedades neurodegenerativas



**A LA BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES Y DIANAS
TERAPÉUTICAS RELACIONADAS CON LOS DÉFICITS
COGNITIVOS EN ESTADIOS PRIMERIZOS DE LA
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER: PAPEL DE AKAP79/150,
CPT1C Y SSAO/VAP-1 EN LA DISFUNCIÓN AMPAR
MEDIADA POR A β**

José Rodríguez Álvarez

Institut de Neurociències UAB

1. Resumen del proyecto

La plasticidad de las sinapsis glutamatérgicas, que implica cambios en la dinámica de los receptores de glutamato, se ha convertido en un mecanismo celular central involucrado en los procesos de plasticidad sináptica asociados al aprendizaje y la memoria. Hay evidencias que confirman que alteraciones en estas sinapsis podrían estar relacionadas con las deficiencias de aprendizaje y memoria observadas en el deterioro cognitivo leve (DCL) y las primeras etapas de la enfermedad de Alzheimer (EA). Nuestra propuesta es dilucidar los mecanismos moleculares subyacentes relacionados con la regulación de los receptores AMPA para el glutamato (AMPA) que pueden estar involucrados en la disfunción sináptica temprana y los déficits cognitivos asociados a las primeras etapas de la EA con el objeto de identificar nuevas dianas terapéuticas y biomarcadores que puedan promover la prevención y el diagnóstico temprano. En base a los datos obtenidos en este proyecto, creemos que la disfunción sináptica mediada por $\alpha\beta$ que está asociada a los déficits sinápticos y de aprendizaje tempranos se puede deber, entre otros factores, a una alteración en la presencia de GluA1-AMPA funcionales en la membrana sináptica como consecuencia de la combinación de diferentes procesos: (1) una regulación negativa de AKAP79/150 y carnitina palmitoiltransferasa I (CPT1C); (2) una disminución en la síntesis sináptica de estos receptores por la regulación alterada de los miRNA, y (3) la sobreexpresión de SSAO/VAP-1 que afecta la liberación de angioneurinas necesarias para la función adecuada de los AMPA sinápticos. Al utilizar diferentes modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* de AD, junto con muestras humanas de control y pacientes con MCI o AD inicial, nuestra propuesta ha podido identificar nuevos objetivos terapéuticos de futuro y una firma molecular utilizable como biomarcador temprano que puede permitir promover la prevención, el diagnóstico y las terapias de recuperación futuras en las primeras etapas de la enfermedad.

2. Resultados

La regulación de los niveles de los receptores AMPA (AMPA) en la membrana postsináptica es un mecanismo importante involucrado en el aprendizaje y la formación

de la memoria. Numerosas evidencias han sugerido que una alteración en los receptores sinápticos de AMPA está involucrada en los déficits cognitivos iniciales observados en la EA. El objetivo principal del proyecto fue probar si AKAP79/150, CPT1C, la regulación alterada de los miRNA o la alteración de la barrera hematoencefálica contribuyen a la disfunción del receptor AMPA en modelos experimentales de EA.

La transmisión sináptica excitatoria está estrechamente regulada por la cantidad y funcionalidad de los receptores AMPAR presentes en la sinapsis. Las evidencias actuales sugieren que los AMPAR se insertan en la membrana postsináptica durante la potenciación a largo plazo (PLP) y podrían eliminarse de la membrana durante la depresión a largo plazo (DLP). Además, se ha demostrado que los oligómeros del péptido A β (α A β) alteran la función y la estructura sináptica, inhiben la PLP y facilitan los procesos de DLP. La desfosforilación de GluA1 en los residuos Ser845 y un aumento en su endocitosis son eventos críticos en la modulación de la DLP. Además, los cambios en las proteínas del andamiaje situadas en la densidad postsináptica (DPS) también están relacionados con la regulación de AMPAR en la sinaptopatología mediada por α A β . En el presente estudio, hemos analizado el efecto de la inducción de la DLP química (cDLP) u α A β en los niveles de AKAP150, una proteína sináptica que se ha propuesto que funciona como andamio de señalización en la regulación de la fosforilación, actividad del canal y el tráfico endosomal de AMPAR. Determinando los niveles de AMPAR en neuronas cultivadas hemos podido observar cómo tanto los α A β como la cDLP inducen una degradación de los niveles de proteína AKAP150 que depende de la activación del proteosoma pero no de la actividad de la calcineurina (CaN). La reducción de AKAP150 es paralela a la desfosforilación en Ser845 y endocitosis sináptica de receptores AMPA conteniendo la subunidad GluA1 mediada por α A β (y cDLP). Una relación causal entre la disminución de los niveles de AKAP150 y la endocitosis de los AMPAR también está respaldada por la desfosforilación de GluA1 Ser845 y la endocitosis de los AMPAR de GluA1 observada cuando se silenció la expresión de AKAP150. Por otro lado, la sobreexpresión de AKAP150 restauró los niveles de AMPAR, reduciendo la endocitosis y la desfosforilación de GluA1. Como AKAP79/150 es una proteína sináptica que se ha propuesto que funciona como un andamio de señalización que regula la fosforilación de AMPAR, la actividad del canal y

el tráfico endosomal asociado a la plasticidad sináptica, los cambios mediados por $\alpha\beta$ en los niveles de AKAP79/150 podrían estar relacionados con una desregulación de los receptores sinápticos de AMPA en las primeras etapas de la EA.

Datos recientes sugieren que uno de los componentes del complejo AMPAR es la carnitina palmitoiltransferasa 1 C (CPT1C), una isoforma específica presente en el cerebro y ubicada en el retículo endoplásmico de las neuronas. Resultados previos demostraron que la deficiencia de CPT1C interrumpe la maduración de espinas dendríticas en las neuronas del hipocampo y afecta el aprendizaje espacial. Sin embargo, el papel de CPT1C en la fisiología de AMPAR era desconocido. En el presente proyecto, hemos demostrado que CPT1C se une a GluA1 y GluA2 y que las tres proteínas tienen el mismo perfil de expresión durante la maduración neuronal. Además, en las neuronas del hipocampo de ratones *knock-out* para CPT1C (KO), las corrientes postsinápticas excitadoras en miniatura mediadas por AMPAR y los niveles sinápticos de las subunidades GluA1 y GluA2 de AMPAR disminuyen significativamente. Demostramos que la expresión de AMPAR depende de los niveles de CPT1C. Hemos constatado que los niveles totales de GluA1 y GluA2 están disminuidos en el hipocampo de ratones CPT1C KO y que esos niveles pueden regresar a la normalidad si sobreexpresamos en las neuronas CPT1C. CPT1C parece afectar selectivamente a los AMPAR, ya que no observamos variaciones en los niveles de otras proteínas sinápticas. Notablemente, los niveles de ARNm de AMPAR se mantuvieron sin cambios en esos cultivos, lo que indica que CPT1C está involucrado en la regulación postranscripcional de dichos receptores, y afecta principalmente la síntesis *de novo* de GluA1 y no su degradación. Además, en las neuronas CPT1C KO, la síntesis de GluA1 después de la cDLP disminuyó claramente. Estos datos identifican CPT1C como un nuevo regulador de la eficiencia de traducción de AMPAR y, por lo tanto, de la función sináptica en el hipocampo. Sin embargo, aunque observamos una disminución en los niveles de proteína CPT1C en el hipocampo de pacientes con EA en estadios Braak III/IV, no pudimos observar cambios significativos en los niveles de proteína CPT1C en cultivos de neuronas de hipocampo después del tratamiento con $\alpha\beta$ o en los cultivos hipocámpales provenientes de ratones APP_{Sw, Ind}. Por lo tanto, no parece existir una relación entre los niveles de CRT1C y la disminución en AMPAR sinápticos observada en

los modelos experimentales de EA, aunque sí que CPT1C regula los niveles totales de dicho receptor.

Varias evidencias indican que el deterioro cognitivo observado en las primeras etapas de la EA podría explicarse por alteraciones en la función sináptica que precederían a la neurodegeneración. Además, algunos informes han demostrado que la desregulación de los niveles de proteínas sinápticas podría estar relacionada con la disfunción cognitiva temprana en modelos experimentales de EA. Por lo tanto, los cambios en los mecanismos reguladores involucrados en la expresión de proteínas sinápticas podrían ser valiosos para evaluar el pronóstico y la tasa de deterioro cognitivo en la EA. Dado que los niveles de proteínas sinápticas están modulados por miRNA y los miRNA podrían usarse como biomarcadores, analizamos en este proyecto los cambios en los perfiles de miRNA en pacientes de EA y sujetos control en diferentes áreas cerebrales. A partir de los resultados obtenidos, hemos examinado los niveles plasmáticos de varios miRNA asociados con proteínas sinápticas, y hemos explorado la utilidad de un subconjunto de estos miRNA como un potencial biomarcador selectivo para EA. Para estos estudios exploratorios, utilizamos muestras de plasma de una cohorte española compuesta por sujetos de control y diagnosticados con deterioro cognitivo leve (DCL) o EA. Los resultados obtenidos fueron muy esperanzadores, ya que encontramos un aumento significativo en los niveles de expresión de los miR-92a-3p, miR-181c-5p y miR-210-3p en los sujetos con DCL y EA. Además, encontramos que el nivel de expresión de estos miRNA podría ser un buen indicador de si los pacientes con DCL progresarían a EA, puesto que el seguimiento durante varios años de estos pacientes permitió descubrir que los pacientes con DCL que finalmente desarrollaron EA tenían niveles plasmáticos más altos de estos miRNA. También hallamos que los niveles de expresión de estos miRNA podrían usarse de manera confiable como un biomarcador potencial para la EA, ya que no se observaron cambios en sus niveles plasmáticos en una cohorte de pacientes con demencia frontotemporal. Sobre la base de estos resultados, proponemos que, en conjunto, los miRNA miR-92a-3p, miR-181c-5p y miR210-3p probablemente constituyen una firma molecular específica que puede ser potencialmente desarrollada como un biomarcador sensible y selectivo para la detección de la EA en etapa temprana y un buen predictor de si es probable que exista un progreso de DCL a EA.

Además de las dos principales características patológicas de la EA, que incluyen placas de β -amiloide ($A\beta$) extraneuronales y los ovillos neurofibrilares, también existen otras características asociadas a la demencia de la EA que predicen una alteración en la barrera hematoencefálica (BHE), como en el caso de la angiopatía amiloide cerebral (CAA). La bibliografía científica sostiene hoy en día que la vasculatura cerebral contribuye de manera importante a la aparición y progresión de la EA, y postula la existencia de un fuerte vínculo entre el daño vascular y esta patología. Por lo tanto, el estudio de la interferencia neurovascular y sus alteraciones es importante para comprender las bases moleculares de la EA. Así, en este proyecto hemos dedicado atención este aspecto y hemos estudiado la contribución de la SSAO/VAP-1 endotelial en relación con la BHE en la EA. Nuestros resultados muestran que la expresión de SSAO/VAP-1 se asocia a la activación endotelial mediante la alteración de la liberación de angioneurinas proinflamatorias y proangiogénicas como la IL-6, IL8 o VEGF. También está relacionada con una alteración de la estructura de la BHE, con una disminución de las proteínas de unión estrecha, como la *zonula occludens* o claudina-5. Además, la BHE reveló una mayor permeabilidad y adhesión de leucocitos en células que expresan SSAO/VAP-1, así como un aumento de la deposición de $A\beta$ vascular inducida por mecanismos dependientes e independientes de la actividad enzimática de SSAO/VAP-1. Además, hemos observado una disminución en la liberación de BDNF en las células endoteliales que sobreexpresan hSSAO/VAP-1 que afectan la maduración sináptica. En estas condiciones, hemos observado una reducción en los niveles de AMPAR y una disminución significativa de PSD95 y AKAP79/150 en el terminal postsináptico. Estos resultados confirman el papel de la SSAO/VAP-1 endotelial en la disfunción de la BHE relacionada con la EA y sugieren que la liberación diferencial de angioneurinas podría afectar el desarrollo y la función sináptica. En total, nuestros resultados abren una nueva ventana en la búsqueda de objetivos terapéuticos alternativos para combatir la EA.

3. Relevancia e implicaciones futuras

Los resultados obtenidos en este proyecto han confirmado que las proteínas postsinápticas AKAP79/150 y la SSAO endotelial podrían ser nuevas dianas potenciales

para futuras aproximaciones terapéuticas. Sin embargo, todavía quedan estudios por realizar para poder confirmarlo. Por otro lado, los resultados de este proyecto que podrían tener un mayor impacto en menos tiempo son los relativos a la firma molecular de miRNA en plasma como biomarcador temprano de la enfermedad de Alzheimer (EA). El diagnóstico temprano y, por lo tanto, la intervención temprana antes de que aparezcan los síntomas de EA sería una de las mejores opciones para ralentizar o detener la progresión de la EA, por lo que identificar biomarcadores eficientes y económicos es de interés general. El diagnóstico temprano de EA permitirá: (1) que los pacientes tomen medidas de salud para preservar la función cognitiva existente durante el mayor tiempo posible (por ejemplo, minimizando los factores de riesgo vascular o aumentando la actividad mental); (2) que se pueda iniciar el tratamiento de los síntomas con medicamentos u otras intervenciones; (3) que se maximice la participación de personas en estadios iniciales de la enfermedad en los ensayos clínicos; (4) que se ofrezca más tiempo para diseñar equipos médicos y de cuidadores que puedan brindar apoyo efectivo frente a las inquietudes médicas que aparecen durante el desarrollo de la enfermedad; (5) que los pacientes y los miembros de su familia tengan más tiempo para conocer a lo que se enfrentan en el futuro y para planificarse en consecuencia mientras los pacientes mantengan la capacidad cognitiva para tomar decisiones, y (6) que, al diagnosticar con precisión a las personas que tienen deterioro cognitivo leve (DCL), no evolucionaran a EA. En los próximos años planeamos validar la firma molecular que hemos identificado como un biomarcador selectivo y universalmente sensible para la EA al extender nuestro análisis a las cohortes de DCL y EA de diferentes países. Una vez conseguida esta validación, el segundo objetivo sería utilizar nuestros hallazgos como plataforma para explorar el desarrollo de una herramienta de diagnóstico asequible y basada en plasma para el examen clínico de rutina. Nuestro biomarcador representaría un avance significativo dado que actualmente no hay ningún biomarcador en plasma (u otro fluido periférico) aprobado o disponible para el diagnóstico de las etapas tempranas de la enfermedad de Alzheimer.

4. Bibliografía

Patentes

Rodríguez-Álvarez J, Miñano-Molina AJ, Siedlecki-Wüllich D.

Circulating miRNAs as biomarkers for diagnosis of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease.

Patent EP18382427 (15 de junio de 2018).

Artículos

Siedlecki-Wullich D, Català-Solsona J, Fàbregas C, Hernández I, Clarimon J, Lleó A, Boada M, Saura CA, Rodríguez-Álvarez J, Miñano-Molina AJ.

Alteration of microRNAs related to synaptic function as potential plasma biomarkers for early stages of Alzheimer disease.

Alzheimer Res & Ther (enviado).

Solé M, Esteban M, Taltavull, B, Fàbregas C, Rodríguez-Álvarez J, Miñano-Molina AJ, Unzeta M.

Blood-brain barrier dysfunction underlying Alzheimer's disease is induced by and SSAO/VAP-1-dependent cerebrovascular activation with enhanced A β deposition.

BBA-Molecular Basis of Disease (2.^a revisión).

Miñano-Molina A, Cheng W, Siedlecki-Wullich D, Calvet, E., Fadó R., Fàbregas, C., Quiroz-Báez R, Casals N, Aguilera J, Saura CA, Rodríguez-Álvarez J.

AKAP150 degradation is associated to LTD-mediated endocytosis of synaptic AMPA receptors in cultured neurons.

Science Advances (enviado).

Enríquez-Barreto L, del Ser A, Català-Solsona J, Prius-Mengual J, Brito V, Ussía O, Acosta S, Parra-Damas, A, Rodríguez-Álvarez J, Ginés S, Rodríguez-Moreno A, Saura CA.

Synapse-to-nucleus signaling regulates synaptic plasticity and memory by modulating postsynaptic glutamate receptors.

Cell Rep (enviado).

Fado R, Soto D, Miñano-Molina A, Pozo M, Carrasco P, Yefimenko N, Rodríguez-Álvarez J, Casals N.

Specific regulation of GluA subunit synthesis and AMPA receptor-mediated synaptic function by CPT1C in the hippocampus.

J Biol Chem 290:25548-25560 (2015).