



**Fundació**  
La Marató de TV3

20<sup>è</sup> SIMPOSIUM  
Enfermedades neurodegenerativas



## **ESTUDIO DEL PAPEL DE LAS CEPAS DE $\alpha$ -SINUCLEÍNA EN LA INDUCCIÓN Y DISEMINACIÓN DE LAS SINUCLEINOPATÍAS**

**Salvador Ventura Zamora**

Institut Biotecnologia i Biomedicina UAB

**Tiago Outeiro**

Max Planck Institute for Experimental Medicines Goettinguen

**Juan María Torres Trillo**

Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria /

Centro de Investigación en Sanidad Animal

## 1. Resumen

La enfermedad de Parkinson (EP) es el segundo trastorno neurodegenerativo más frecuente después de la enfermedad de Alzheimer y afecta a más de 7 millones de personas en todo el mundo. Su aparición está asociada al envejecimiento y afecta a hasta un 2% de las personas mayores de 65 años, de forma que se prevé que su incidencia se incrementará progresivamente en nuestra sociedad debido al aumento en la esperanza de vida. A pesar de los esfuerzos de las instituciones públicas y privadas, la EP continúa siendo incurable. Los tratamientos actuales solo son capaces de mejorar los síntomas motores iniciales de la dolencia. Además, estos medicamentos se vuelven ineficaces a medida que progresa la enfermedad. Por este motivo, hay una necesidad urgente de una terapia que modifique el curso de la patología.

Una de las características histopatológicas de la EP es la presencia de inclusiones proteicas intraneuronales, los llamados cuerpos de Lewy (LB), cuyo componente principal es una forma mal plegada y agregada de  $\alpha$ -sinucleína ( $\alpha$ -syn). Las mutaciones en  $\alpha$ -syn causan formas familiares de la EP; son formas raras, pero muy agresivas, por lo que provocan un adelanto significativo en la manifestación de la enfermedad. A pesar de que se sabe que las formas mal plegadas de  $\alpha$ -syn pueden propagarse entre neuronas y difundir la patología de LB al cerebro, de una manera parecida a como lo hacen los priones, este fenómeno todavía no se entiende completamente. Uno de los temas más interesantes en este contexto es averiguar cuál es la naturaleza de las formas transmitidas de  $\alpha$ -syn. Se ha demostrado que  $\alpha$ -syn puede autoensamblarse en diferentes tipos de agregados que corresponden a diferentes cepas, lo que se cree que puede estar detrás de las diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad.

El proyecto perseguía el objetivo de proporcionar información nueva sobre la hipótesis de la transmisión priónica para la EP, caracterizando las propiedades funcionales y estructurales de los agregados de  $\alpha$ -syn, tanto *in vitro* como en modelos animales de la enfermedad. Los resultados indican que tanto las cepas de  $\alpha$ -syn amiloide generadas *in vitro* como los agregados presentes en pacientes que sufren diferentes sinucleinopatías se propagan de manera diferente en el cerebro de los animales modelo, lo que sugiere fuertemente que las propiedades estructurales de los agregados de  $\alpha$ -syn son un determinante clave de su propagación en el cerebro y de su toxicidad neuronal. Las

propiedades diferenciales de estos agregados deben tenerse en cuenta al tratar de desarrollar tratamientos para estos trastornos devastadores.

El nuevo conocimiento mecanístico, estructural y técnico generado durante la ejecución de este objetivo inicial nos ha permitido alcanzar un nuevo objetivo más ambicioso: el desarrollo de nuevas moléculas capaces de parar la agregación y especialmente la propagación de agregados de  $\alpha$ -syn. En este contexto, hemos identificado un nuevo compuesto que es efectivo contra la agregación de diferentes cepas de  $\alpha$ -syn, siendo una molécula prometedora para una futura terapia capaz de modificar potencialmente el curso de la patología.

## 2. Resultados

### 1. Producción y purificación de variantes recombinantes de $\alpha$ -sinucleína ( $\alpha$ -syn)

Durante el presente proyecto, el grupo ha establecido con éxito un protocolo para la producción y purificación semipreparativa de la proteína  $\alpha$ -syn de tipo salvaje (wt), sus mutantes y algunas variantes rediseñadas con un grado de pureza y homogeneidad que superan las de la proteína disponible comercialmente. La calidad de la proteína ha sido un activo importante para los pasos posteriores del proyecto. En particular, hemos producido las siguientes variantes familiares de PD: A30P, H50Q, A53E, A53T, G51D y E46K.

### 2. Generación de cepas wt $\alpha$ -syn *in vitro*

Después de seleccionar varias combinaciones, hemos establecido las condiciones para generar fibrillas amiloides de  $\alpha$ -syn en tres condiciones diferentes: pH moderadamente bajo; pH neutro y bajo contenido en sal, y pH neutro y alto contenido en sal.

### 3. Caracterización de las cepas wt $\alpha$ -syn

Las tres especies amiloides diferentes generadas corresponden a cepas verdaderas, ya que difieren en su morfología, tamaño, cinética de agregación, unión a colorantes amiloides, cantidad de agregados por unidad de proteína y estructura secundaria. Estas fibrillas amiloides estructuralmente diferentes y bien caracterizadas se han

generado a niveles semipreparativos en lotes únicos y se han utilizado para inocular modelos animales de EP.

#### **4. Generación y caracterización de cepas mutantes $\alpha$ -syn.**

Las tres condiciones que produjeron con éxito cepas para la proteína wt se emplearon para promover la agregación de las variantes mutacionales de aparición temprana: A30P, H50Q, A53E, A53T, G51D y E46K. Así se generó un número sin precedentes de cepas amiloides conformacionalmente diferentes. Una conclusión importante de estos resultados, aún no publicados, es que en una condición dada cada mutante particular se comporta de manera diferente. Esto tiene implicaciones importantes ya que indica que las mutaciones en sí mismas pueden ser el origen de diferentes cepas con propiedades tóxicas y propagativas diferenciales en los pacientes. Además, para cualquier mutación dada, las condiciones de agregación determinan las características de los agregados proteicos finales, de una manera impredecible. En general, estos resultados convergen para indicar que el panorama conformacional de  $\alpha$ -syn podría ser mucho más complejo de lo que se asumió anteriormente. Para el nuevo mutante H50Q, hemos demostrado que este es el caso, ya que la combinación única del cobre metálico, relacionado con neurodegeneración y la mutación patológica de  $\alpha$ -syn inducen una alteración en las propiedades de agregación de la proteína que también determinan sus propiedades propagativas y su toxicidad (Villar-Pique *et al.*, PNAS, 2016).

#### **5. Generación y caracterización de cepas $\alpha$ -syn en presencia de membranas**

Se ha sugerido que la agregación de  $\alpha$ -syn está influenciada por su unión a las membranas neuronales. Por lo tanto, para la proteína wt y los mutantes A30P, H50Q, A53E, A53T, G51D y E46K analizamos si la presencia de miméticos de membrana con diferentes composiciones lipídicas daba lugar a diferentes cepas amiloides.

Efectivamente, los lípidos influyeron en la cinética de agregación y en la morfología de los agregados finales de una manera que dependía de la mutación específica, lo que, junto con los datos anteriores, sugiere claramente que el entorno en el que se inicia la agregación es un determinante crucial de la estructura de los amiloides  $\alpha$ -syn.

## **6. Generación y caracterización de una variante sintética de $\alpha$ -syn para probar las regiones de $\alpha$ -syn relevantes en la propagación amiloide**

La naturaleza desordenada de  $\alpha$ -syn ha obstaculizado el uso de enfoques de ingeniería de proteínas basados en estructura para dilucidar los determinantes moleculares de la formación y propagación de amiloides. Mientras se estaba ejecutando el proyecto, se publicó la estructura 3D de una cepa de fibrilla  $\alpha$ -syn patógena, lo que proporcionó un modelo para estos estudios, que complementaba los diseñados originalmente en el proyecto. La estructura sugería que el dominio NAC central era un elemento crítico en la propagación de las fibrillas, ya que constituye su núcleo, delineando un motivo de clave griega. Generamos una variante sintética en la que grapamos los extremos de este motivo con un enlace disulfuro y evaluamos su impacto en la conformación, agregación y toxicidad de  $\alpha$ -syn en diferentes entornos. Nuestro estudio no respaldó que el motivo de clave griega estuviera impreso en los primeros ensamblajes de  $\alpha$ -syn y lo descartaba como interfaz terapéutica para prevenir el inicio de la fibrilación y su propagación. En contraste, sugería la estabilización de conformaciones nativas y compactas como una estrategia terapéutica potencial para evitar la formación de especies tóxicas y atacar las etapas iniciales de la EP (Carija *et al.*, *Redox Biology*, 2019).

## **7. Configuración de un ensayo de PMCA para $\alpha$ -syn**

Desarrollamos un protocolo para implementar el ensayo de *protein misfolding amplification* clásico utilizado para la proteína PrP de mamíferos en el análisis de la propagación de  $\alpha$ -syn humana. Logramos condiciones en las que tanto las fibrillas de amiloides wt como mutantes de  $\alpha$ -syn podrían propagarse *in vitro* de forma priónica. Sin embargo, las propiedades estructurales específicas iniciales de las cepas de  $\alpha$ -syn se perdieron durante la amplificación y, por lo tanto, este protocolo se descartó para generar material para estudios *in vivo* en modelos animales. No obstante, como veremos en otras secciones, el protocolo desarrollado resultó crucial para identificar moléculas pequeñas que pueden interferir con la agregación y la propagación de agregados de  $\alpha$ -syn.

## **8. Propiedades de propagación *in vivo* de los polimorfos de $\alpha$ -syn generados *in vitro***

De la gran cantidad de cepas  $\alpha$ -syn generadas *in vitro*, las formadas por las variantes wt, A30P, H50Q y A53E se seleccionaron para estudios *in vivo* en un modelo de ratón

de la enfermedad. Representan un total de 12 cepas diferentes, un número significativamente mayor que el evaluado en cualquier estudio anterior.

Para los estudios *in vivo*, primero establecimos una colonia de ratones PAC-Tg (SNCAWT). En este animal, la  $\alpha$ -syn murina está desactivada y tiene un transgén que codifica para  $\alpha$ -syn humana. Este animal se utiliza como control en muchos estudios y no tiene un fenotipo histopatológico o de comportamiento de la EP, lo que nos permite atribuir cualquier cambio observado a la inyección de nuestras cepas amiloides generadas *in vitro*. Los animales se inocularon en el lóbulo parietal derecho o en el estriado izquierdo. Los ratones se monitorizaron diariamente y su estado neurológico se evaluó dos veces por semana. Los ratones fueron sometidos a eutanasia siguiendo una cinética de tiempo planificada o cuando mostraban evidencia de enfermedad. Durante la necropsia, se recolectó el cerebro de cada animal. Los cerebros se cortaron de forma sagital y el hemisferio izquierdo se utilizó para el análisis histopatológico, mientras que el hemisferio derecho restante se usó para el análisis bioquímico. Los resultados obtenidos hasta ahora muestran diferencias en el inicio de la aparición de  $\alpha$ -syn fosforilada y agregada, dependiendo de la mutación de la proteína recombinante inoculada, pero también del tampón donde se agregaron inicialmente esas proteínas. En la mayoría de los inóculos, la agregación de  $\alpha$ -syn fosforilada comenzó 2 meses después de la inoculación (pmi), luego desapareció a los 6 mpi y finalmente volvió a aumentar a los 13 mpi, lo que llevó a la presencia de dos curvas diferentes de agregación en el tiempo. Estas cinéticas no se han descrito anteriormente y pueden ser importantes para comprender el desarrollo de la enfermedad.

La proteína  $\alpha$ -syn comenzó a agregarse como neurita y también como una acumulación de pequeños cuerpos de inclusiones intraneuronales anómalos, que se propagan desde el punto de inoculación, el estriado izquierdo, caudalmente hasta el hipocampo y la corteza cerebral, donde presentan una gran acumulación. En general, los resultados confirman que, según lo previsto, las fibrillas inoculadas correspondían a cepas amiloides funcionalmente diferentes.

## **9. Propagación *in vivo* de agregados $\alpha$ -syn de pacientes con diferentes sinucleinopatías**

Además de la EP, existen otras enfermedades relacionadas, generadas también por la acumulación de agregados de  $\alpha$ -syn, globalmente conocidas como *sinucleinopatías*,

entre ellas la demencia de cuerpos de Lewy (LBD) y la atrofia multisistémica (MSA). La LBD es un tipo de demencia progresiva que conduce a una disminución del razonamiento y de la capacidad de funcionar independientemente, mientras que la MSA se caracteriza por una combinación variable de síntomas y signos que incluyen el parkinsonismo, la ataxia de cerebelo y el funcionamiento deficiente del sistema nervioso autónomo. El hecho de que, a pesar de los síntomas dramáticamente diferentes, la EP, la DLB y la MSA son causadas en última instancia por la agregación de  $\alpha$ -syn en el cerebro, ha sugerido que estas enfermedades podrían originarse a partir de diferentes cepas de  $\alpha$ -syn. Para evaluar esta hipótesis, los extractos cerebrales de pacientes que murieron después de sufrir cualquiera de estas enfermedades se inocularon en ratones PAC-Tg (SNCAWT) como se describe para las cepas *in vitro* y la propagación de los agregados  $\alpha$ -syn presentes en estos extractos fueron analizados de la misma manera.

La distribución de  $\alpha$ -syn fosforilada parece seguir un camino similar en forma de prión, independientemente de la naturaleza del inóculo o su concentración, comenzando desde el punto de inoculación y extendiéndose hacia atrás a través de todo el cerebro, dando lugar a fenotipos similares de acumulación. De todos modos, se han encontrado varias diferencias entre los inóculos en la magnitud, dispersión y principalmente en el inicio de aparición de los primeros agregados de  $\alpha$ -syn fosforilada. Podemos diferenciar claramente entre un grupo conformado por todas las variantes de inóculos de EP y DLB, y otro grupo que incluía los inóculos de MSA. En los casos de MSA, los animales inoculados presentaron una aparición tardía de agregados y una menor magnitud y dispersión de esos agregados. Los datos nuevamente son consistentes con el papel de la conformación específica de  $\alpha$ -syn en la propagación de los fenotipos patológicos en el cerebro.

## **10. Un ensayo de alto rendimiento para identificar moduladores de la agregación $\alpha$ -syn**

El presente proyecto nos permitió: (i) producir una proteína  $\alpha$ -syn altamente pura, tanto wt como mutante, (ii) implementar un PMCA para la amplificación de  $\alpha$ -syn y (iii) obtener una cinética de agregación altamente reproducible. Con estos elementos en la mano, pensamos en implementar un nuevo y ambicioso objetivo, que no estaba presente en la propuesta inicial: el descubrimiento de moléculas capaces de prevenir la agregación y propagación de agregados de  $\alpha$ -syn. Para este objetivo, primero

implementamos una metodología muy robusta que nos permitió analizar una biblioteca de más de 14.000 pequeños compuestos que tuvieran estas actividades (Pujols *et al.*, *Int J Mol Sci*, 2017).

### **11. Identificación de una nueva molécula pequeña que inhibe la agregación de $\alpha$ -syn y su propagación**

Como resultado de la campaña de selección, identificamos SynuClean-D (SC-D). Es una pequeña molécula que interrumpe la agregación de  $\alpha$ -syn, desmonta las fibrillas maduras y, además, dificulta la propagación de la  $\alpha$ -syn agregada. Cabe destacar que SC-D es la única molécula descrita hasta ahora que aglutina todas estas propiedades sinérgicas y beneficiosas en una estructura química pequeña. Ya hemos demostrado el efecto de SC-D *in vivo*, donde puede reducir la presencia de agregados amiloides y proteger las neuronas dopaminérgicas de la degeneración en un modelo de DP de *Caenorhabditis elegans* (Pujol *et al.*, PNAS, 2018). Es importante destacar que SC-D inhibe la agregación de todas las cepas de  $\alpha$ -syn probadas hasta el momento, tanto si son variantes secuenciales como si son generadas en diferentes condiciones. Por lo tanto, la SC-D merece un estudio posterior como una posible nueva vía para tratar la EP y las otras sinucleinopatías.

### **3. Relevancia e implicaciones futuras**

Las implicaciones de los resultados del presente proyecto son múltiples y abarcan desde cuestiones metodológicas hasta el desarrollo de una posible terapia para las sinucleinopatías.

En particular, hemos hecho lo siguiente:

1) Hemos desarrollado un sistema para la producción preparativa de variantes de  $\alpha$ -syn altamente puras y con un excelente comportamiento *in vitro*. Un número significativo de laboratorios y compañías se beneficiarán de él, ya que el presente estudio y otros relacionados no habrían sido posibles con la proteína disponible comercialmente.

2) Hemos desarrollado una metodología de selección de alto rendimiento muy robusta, que permitiría identificar nuevos candidatos para la intervención terapéutica a partir del análisis de bibliotecas químicas de moléculas naturales o de fármacos reposicionados.

3) Hemos generado una metodología para producir cepas a nivel semipreparativo que muy probablemente se explotará en el área para estudios estructurales y funcionales adicionales.

4) Hemos proporcionado información que confirma el fenómeno del comportamiento priónico de  $\alpha$ -syn y hemos demostrado cómo diferentes cepas exhiben diferentes propiedades de propagación en el cerebro. Esta observación tiene profundas implicaciones para el tratamiento de las enfermedades asociadas a la agregación de  $\alpha$ -syn, ya que podría implicar que serían necesarios diferentes tratamientos según el tipo de agregado que inicie la enfermedad. Las divergencias en las propiedades conformacionales de los agregados pueden originarse por mutaciones puntuales, pero también por otros factores genéticos en pacientes o por el microentorno celular en el que se produce la agregación. En este contexto, de acuerdo con nuestros datos, la MSA parece ser una sinucleinopatía que se diferencia claramente en términos de propagación de PD y LBD. Esto implica que lo que puede dar buenos resultados en el tratamiento de una sinucleinopatía no necesariamente funcionaría para otra.

5) A pesar de todos los condicionantes mencionados anteriormente, hemos encontrado una pequeña molécula que parece inhibir genéricamente la agregación y propagación de  $\alpha$ -syn, desmontando cualquier agregado preexistente. Las propiedades neuroprotectoras de este compuesto sugieren que su investigación podría cristalizar en una primera molécula capaz de tratar este grupo de trastornos devastadores. En futuros proyectos perseguiremos llevarla a fases clínicas.

#### 4. Bibliografía

1. Carija A, Pinheiro F, Pujols J, Brás IC, Lázaro DF, Santambrogio C, Grandori R, Outeiro TF, Navarro S, Ventura S.

***Biasing the native  $\alpha$ -synuclein conformational ensemble towards compact states abolishes aggregation and neurotoxicity.***

Redox Biol. 22:101135. 2019.

2. Pujols J, Peña-Díaz S, Lázaro DF, Peccati F, Pinheiro F, González D, Carija A, Navarro S, Conde-Giménez M, García J, Guardiola S, Giralt E, Salvatella X, Sancho J, Sodupe M, Outeiro TF, Dalfo E, Ventura S.

***Small molecule inhibits  $\alpha$ -synuclein aggregation, disrupts amyloid fibrils, and prevents degeneration of dopaminergic neurons.***

Proc Natl Acad Sci U S A. 115(41):10481-10486. 2018.

3. Masaracchia C, Hnida M, Gerhardt E, Lopes da Fonseca T, Villar-Pique A, Branco T, Stahlberg MA, Dean C, Fernández CO, Milosevic I, Outeiro TF.

***Membrane binding, internalization, and sorting of alpha-synuclein in the cell.***

Acta Neuropathol Commun. 6(1):79. 2018.

4. Pujols J, Peña S, Conde-Giménez M, Pinheiro F, Navarro S, Sancho J, Ventura S.

***High-throughput screening methodology to identify alpha-synuclein aggregation inhibitors.*** Int J Mol Sci. 18(3). pii: E478. 2017.

5. Villar-Piqué A, Rossetti G, Ventura S, Carloni P, Fernández CO, Outeiro TF.

***Copper(II) and the pathological H50Q  $\alpha$ -synuclein mutant: Environment meets genetics.***

Communicative & Integrative Biology. 10(1): e1270484. 2017.

6. Villar-Piqué A, Lopes da Fonseca T, Sant'Anna R, Szegő ÉM, Fonseca-Ornelas L, Pinho R, Carija A, Gerhardt E, Masaracchia C, Abad González E, Rossetti G, Carloni P, Fernández CO, Foguel D, Milosevic I, Zweckstetter M, Ventura S, Outeiro TF.

***Environmental and genetic factors support the dissociation between  $\alpha$ -synuclein aggregation and toxicity.***

Proc Natl Acad Sci U S A. 113(42):E6506-E6515. 2016.

7. Lázaro DF, Dias MC, Carija A, Navarro S, Madaleno CS, Tenreiro S, Ventura S, Outeiro TF.

***The effects of the novel A53E alpha-synuclein mutation on its oligomerization and aggregation.***

Acta Neuropathol Commun. 9;4(1):128. 2016.