



Fundació
La Marató de TV3

20è SIMPOSIUM
Malalties neurodegeneratives



FUNCIÓ DE LA FOSFORILACIÓ DELS RECEPTORS NMDA EN L'ETIOLOGIA DE LA MALALTIA D'ALZHEIMER: DE LA PROTEÒMICA A MODELS *IN VIVO*

Xavier Altafaj Tardio

IDIBELL Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge

1. Resum

El glutamat és el principal aminoàcid excitador del cervell i la neurotransmissió glutamatèrgica és fonamental en els processos neuronals (neurogènesi, sinaptogènesi, supervivència neuronal, plasticitat sinàptica) i de llurs funcions cerebrals subjacents (memòria, cognició, funcions motores). Funcionalment, l'alliberament del glutamat i unió als receptors de glutamat en permet l'activació i la transmissió sinàptica. L'activació dels receptors ionotròpics de glutamat (iGluR) permet l'entrada de ions necessària per als processos sinàptics i la seva alteració altera la comunicació sinàptica i provoca una disfunció cognitiva. En particular, els receptors de tipus N-metil-D-aspartat (NMDAR) representen un element clau en els processos de memòria i cognició, i actualment és l'única diana farmacològica per al tractament de la malaltia d'Alzheimer (AD), per a la qual es disposa d'un fàrmac (memantina) aprovat per l'FDA. A nivell funcional, la localització subsinàptica dels NMDAR, així com les seves propietats biofísiques estan modulades per mecanismes posttraduccional. Basant-nos en la rellevància d'aquests receptors en AD i llurs propietats bioquímiques i funcionals, la hipòtesi de treball d'aquest projecte es basava a estudiar el paper de la distribució subcel·lular dels NMDAR en el seu comportament dicotòmic, que pot promoure l'activació neuronal i la supervivència de les cèl·lules o, al contrari, induir l'activació de vies de senyalització proapoptòtiques. Per avaluar aquesta hipòtesi, el nostre projecte tenia com a objectiu identificar el patró de fosforilació dels NMDAR, a fi d'evidenciar noves dianes terapèutiques (fosforesidus, cinases, fosfatases) i escatir els mecanismes de sinaptopaties –mediats pels NMDAR– en AD.

Per abordar aquest objectiu, vam fer una anàlisi d'espectrometria de masses no dirigida (*untargeted*) dels compartiments subsinàptics, tant en biòpsies AD de regions cerebrals afectades en estadis inicials d'AD (hipocamp i còrtex entorínic), com en regions del cervell del model murí Ts65Dn. El model Ts65Dn és un model de ratolí trisòmic de la síndrome de Down (SD), un trastorn neurològic amb aparició precoç de trets histopatològics d'AD i dèficits cognitius que recapitulen alteracions de tipus AD. L'anàlisi mitjançant espectrometria de masses acoblada a fosfoenriquiment va revelar un patró de fosforilació dels iGluR dependent del compartiment subsinàptic i alhora del genotip (euploide vs. trisòmic), que es troben associats a una composició diferencial en proteïnes cinasa i fosfatasa al model de ratolí trisòmic. Posteriorment les dades

bioquímiques van ser emprades per construir una matriu integrant genotip-quinoma- iGluR fosfopatró en els diferents compartiments subsinàptics.

Conjuntament, els resultats obtinguts presenten un perfil específic d'alteracions del fosfopatró dels iGluR en la sinapsi glutamatèrgica del model de ratolí Ts65Dn i donen suport a la seva contribució a les condicions de sinaptopatia associades a l'SD i l'AD. L'alteració de fosforesidus concrets dels iGluR en l'hipocamp del model Ts65Dn, juntament amb la signatura de proteïnes cinasa/fosfatasa, han permès identificar noves dianes terapèutiques potencials per al tractament de les disfuncions glutamatèrgiques en SD i, potencialment, en AD.

Acompanyant aquests estudis no dirigits (*untargeted*), al llarg del projecte vam dur a terme un conjunt d'estudis dirigits. Concretament, basant-nos en resultats recents del nostre grup en què vam mostrar la capacitat de la proteïna cinasa DYRK1A (associada a AD i SD) de fosforilar la subunitat GluN2A dels NMDAR, vam estudiar una possible alteració dels nivells d'expressió d'aquest fosforesidu i la seva possible contribució en mecanismes patofisiològics. Així, vam generar un anticòs policlonal antifosfo GluN2A(pS1048) que ens va permetre caracteritzar –mitjançant estudis bioquímics i histològics– un increment dels nivells de la subunitat GluN2A (pS1048) fosforilada en les fraccions postsinàptiques de les mostres AD i Ts65Dn. Per avaluar el potencial impacte patogènic de la sobreexpressió de GluN2A(pS1048), vam sobreexpressar la forma fosfomimètica de GluN2A en models neuronals *in vitro*, i hi hem observat un conjunt de disfuncions sinàptiques. Conjuntament, aquestes dades abonen l'associació entre un patró aberrant de la fosforilació dels NMDAR (particularment un augment dels nivells de GluN2ApS1048) i la disfunció sinàptica. Actualment, per avaluar funcionalment la patogenicitat *in vivo* dels canvis del fosfopatró dels NMDAR, hem generat un model de ratolí que expressa de forma constitutiva la subunitat fosfomimètica GluN2A(S1048D). Aquest model de ratolí *knock-in*, actualment en fase de fenotipatge conductual, permetrà avaluar l'impacte i rellevància *in vivo* de l'alteració del fosfopatró dels NMDAR en la disfunció neuronal i dèficits cognitius associats a l'AD, i servirà alhora com a model *in vivo* per al cribratge farmacològic.

En resum, els resultats obtinguts al llarg d'aquest projecte aporten una visió única i exhaustiva del patró de fosforilació dels NMDAR, i de llur patogenicitat neuronal, en el context de les sinaptopaties associades a l'AD i l'SD, tot responent a l'objectiu principal

del projecte. Així, les dades moleculars han permès identificar els fosforesidus dels NMDAR i les cinases/fosfatases desregulades, que es presenten com a noves dianes terapèutiques per l'AD. A la secció següent es descriuen els principals èxits científics del projecte.

2. Resultats

Objectiu específic 1. Caracterització del perfil fosfoproteòmic sinàptic dels receptors NMDA en etapes primerenques de la malaltia d'Alzheimer i en models murins AD

- Hem establert un mètode consistent i altament reproduïble de fraccionament subsinàptic de les regions del cervell, tant en mostres *post mortem* humanes com de ratolí.
- S'ha completat l'anàlisi semiquantitativa de proteïnes de les fraccions postsinàptiques i extrasinàptiques de l'hipocamp de ratolins trisòmics i controls, que mostra una alteració del proteoma i de les funcions cel·lulars associades, relacionades amb la transmissió sinàptica (figura 1A).
- Caracterització del perfil fosfoproteòmic, amb especial atenció als receptors de glutamat ionotròpic de ratolins trisòmics, model d'AD. Aquest estudi ha permès descriure de forma exhaustiva el repertori de fosforilacions dels iGluR en el model Ts65Dn, així com la identificació de cinases/fosfatases desregulades en aquest model, que representen potencials dianes terapèutiques (figura 1B).
- Producció i validació d'anticossos anti-GluN2ApSer1048, que mostren la presència postsinàptica d'aquesta fosforilació en les sinapsis de neurones piramidals (excitadores) de l'hipocamp (figura 2A).
- Determinació de la presència de nivells significativament elevats de GluN2A(pSer1048) i de la cinasa DYRK1A a l'hipocamp i escorça entorínica de biòpsies d'AD, de forma lineal amb la progressió clínica d'AD (figura 2B).

- Identificació d'alteracions de la signatura proteòmica (cinases, fosfatases) i del patró de fosforilació dels iGluR en el model Ts65Dn que cursa amb sinaptopatia, com a potencials dianes terapèutiques (figura 2C).
- Actualment es fa una anàlisi comparativa del fosfoproteoma Ts65Dn vs. AD, per tal d'identificar possibles alteracions bioquímiques convergents i/o divergents del Ts65Dn amb AD.

Objectiu específic 2. Generació d'eines moleculars i de models *in vivo* per a l'expressió de subunitats GluN dels NMDAR fosfomodulats

- Generació de partícules lentivirals Lv::GFP-GluN2A de tipus silvestre (*wildtype*) i fosfomimètiques per a la transducció *in vitro* i *in vivo* de construccions GluN2A.
- Validació de la infectivitat *in vitro* de partícules virals Lv::GFP-GluN2A, en cultius neuronals primaris.
- Generació del model murí *knock-in* KI-GluN2A(S1048D) mitjançant tecnologia CRISPR-Cas9. Obtenció de ratolins fundadors i anàlisi genòmica de seqüències *off-target* a l'ADN genòmic dels ratolins fundadors. Amplificació de colònies animals a les instal·lacions de la Northwestern University (Chicago, EUA).

Objectiu específic 3. Avaluació de l'impacte funcional de la modulació per fosforilació dels NMDAR en models murins de la malaltia d'Alzheimer

- Caracterització de l'activació glial (cèl·lules GFAP- i Iba1-positives) en el model de ratolí Ts65Dn adult (ratolins de 4 i 9 mesos).
- Identificació de les conseqüències neuronals de la sobreexpressió de la forma fosfomimètica GluN2A(S1048E), on s'observa una alteració de la morfologia i la funció neuronals, amb una densitat augmentada de les espines immadures (espines neuronals de tipus *thin*, figura 3A).
- La sobreexpressió de GluN2A(S1048E) en cultius neuronals primaris produeix una desregulació dels corrents EPSC mediat per NMDAR, amb efectes adversos per a la funció neuronal (defectes de plasticitat sinàptica, excitotoxicitat). A més, es produeix

un deteriorament del procés de plasticitat sinàptica LTP induït químicament per glicina. En conjunt, aquestes dades donen suport a l'impacte patogènic de l'augment de nivells de GluN2A(pS1048), associat a condicions de sinaptopatia, i defineixen els NMDAR com a diana per a futures intervencions terapèutiques en AD (figura 4C).

- Actualment hem iniciat el fenotipatge del model animal KI-GluN2A(S1048D), amb especial interès en la caracterització del fenotip cognitiu. Aquesta anàlisi anirà acompanyada de l'avaluació dels beneficis terapèutics de fàrmacs dirigits a modular els NMDAR.

3. Rellevància i possibles implicacions futures

El projecte que du per títol *Funció de la fosforilació dels receptors NMDA en l'etiologia de la malaltia d'Alzheimer: de la proteòmica a models 'in vivo'* va ser ideat amb l'objectiu general de desxifrar l'impacte del fosfopatró dels NMDAR en la fisiopatologia de la malaltia d'Alzheimer. Al final d'aquests tres més un anys de treball intensiu, s'han generat dades de marcada rellevància que donen suport a l'impacte patogènic del fosfopatró aberrant dels NMDAR en la disfunció sinàptica. Aquestes dades preclíniques sòlides obren noves vies terapèutiques i són objecte de línies de recerca (en curs) o de futura aplicació (a curt termini), amb potencial aplicabilitat clínica. Als paràgrafs següents es resumeix la rellevància principal i les possibles aplicacions clíniques derivades d'aquest projecte.

Hem realitzat una extensa i completa integració de les alteracions fosfoproteòmiques i proteòmiques en un model de ratolí de la síndrome de Down, una malaltia genètica amb AD d'inici precoç. Aquestes dades representen, ara com ara, el catàleg més extens i complet de les alteracions fosfoproteòmiques dels receptors ionotròpics de glutamat. Actualment aquest repertori s'està estenent al conjunt de modificacions del fosfoproteoma global. A més, l'enfocament de la biologia de sistemes combinat amb els resultats proteòmics ha permès identificar dianes terapèutiques potencials (proteïnes cinases i fosfatases) per a futures intervencions terapèutiques.

A més de l'anàlisi no orientada (*untargeted*) de les alteracions fosfoproteòmiques, hem desenvolupat una metodologia experimental per avaluar l'impacte de fosforesidus

discrets dels receptors NMDA en la disfunció sinàptica. En aquesta línia, hem caracteritzat el paper fisiològic de la fosforilació del residu serina en posició 1048 de la subunitat GluN2A dels NMDAR. Més important encara, en el context de condicions sinaptopàtiques, hem demostrat que els nivells augmentats de subunitats GluN2A(pSer1048) fosforilades, resultants de la sobreexpressió de DYRK1A, una proteïna cinasa associada a la malaltia d'Alzheimer i la síndrome de Down, són suficients per afectar la transmissió glutamatèrgica i afecten tant la morfologia com la plasticitat sinàptiques. Conjuntament, aquestes dades proporcionen evidències substancials sobre la implicació de l'alteració de la neurotransmissió glutamatèrgica en la condició d'AD i defineixen aquestes sinapsis excitadores com a diana terapèutica per al tractament de la malaltia d'Alzheimer.

En relació amb les alteracions de les sinapsis glutamatèrgiques observades en condicions de sinaptopatia, al llarg del projecte hem generat eines moleculars i biològiques per al cribratge farmacològic de drogues aprovades (FDA) dirigides a modular la sinapsi glutamatèrgica. Aquestes eines s'analitzen actualment al nostre laboratori i, juntament amb les línies de recerca actuals, aniran acompanyades de la caracterització del fenotipatge del model de ratolí KI-Grin2A (S1048D) i l'avaluació de diverses intervencions terapèutiques.

En conjunt, els avenços assolits al llarg d'aquest projecte situen la sinapsi glutamatèrgica com a element fonamental de les condicions de sinaptopatia, alhora que defineixen la rellevància d'aquesta estructura/sistema neuronal com a diana terapèutica.

4. Bibliografia científica generada

Publicacions (en negreta, membres de l'equip investigador directament beneficiaris de l'acció finançada per 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.

Pòsters presentats (en negreta, membres de l'equip investigador directament beneficiaris de l'acció finançada per 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, Milà. Desembre 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, Gratacòs-Batlle E, Ramos-Vicente D, Ciruela F, Bayés À, Sindreu C, López-Sala A, Armstrong J, García-Cazorla À, 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. Arat̃, 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., Alc̃n C., Grau C., G̃mez de Salazar M., Gratacc̃s-Batlle E., Marcos D., Bayis ĩ., Sindreu C., Armstrong J., Garcva-Cazorla ĩ.
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 G̃mez de Salazar, C Grau, K Arat̃, 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 G̃mez de Salazar, C Grau, K Arat̃, 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 G̃mez de Salazar, C Grau, K Arat̃, 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. 1st IN PhD Student & Postdoc Meeting. Alicante, Spain. February 2016.
- M G̃mez de Salazar, C Grau, K Arat̃, 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. Federation of European Societies of Neuroscience (FENS) Meeting. Copenhagen, Denmark. July 2016.

Tesis doctorals i formació d'estudiants

Macarena Gómez de Salazar va obtenir el seu doctorat el setembre del 2018 amb una tesi doctoral centrada en l'estudi d'aquest projecte. La Dra. Gómez de Salazar va ser contractada amb l'ajut concedit per la Fundació La Marató de TV3.

Aquest projecte també es va beneficiar de la contribució dels estudiants en formació, principalment del Màster en Neurociències (UB), que han continuat les seves carreres investigadores com a estudiants de doctorat, ja sigui dins del nostre grup de recerca o en altres universitats. Els estudiants que van rebre formació i van participar en aquest projecte han estat: A. Santos (2017), actualment al seu segon any de doctorat (IDIBELL); S. Locubiche (2018), sol·licitant de beques de doctorat (IDIBELL); A. Amelianchik (2016), estudiant de doctorat a la Universitat de Cornell (NY, EUA); P. Sanchís (2015), estudiant de doctorat a la UAB.

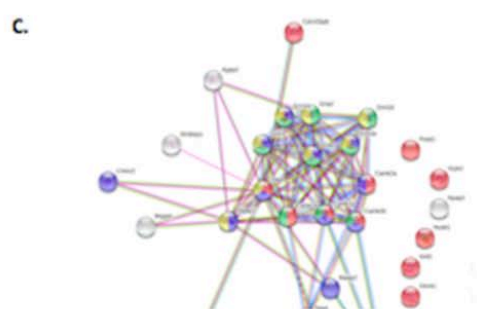
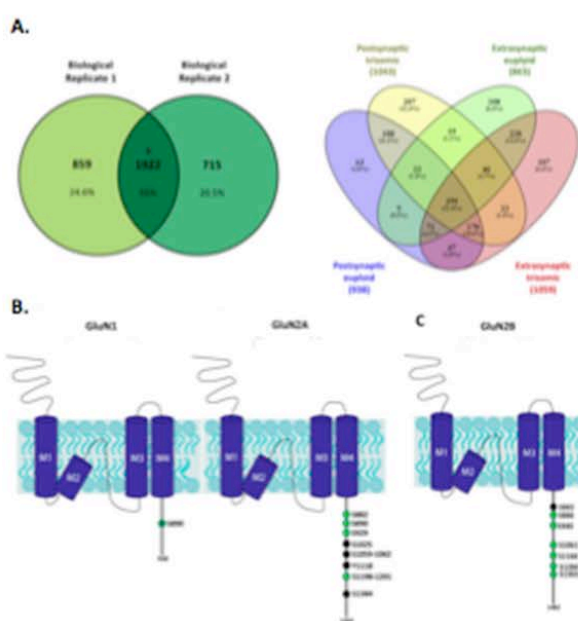


Figura 1. Alteracions proteòmiques bipolarnals (A) en rates adultes T565DN s'associen amb un perfil fosfoproteòmic aberrant NMDAR (B) i canvis relacionats del quòm (C).

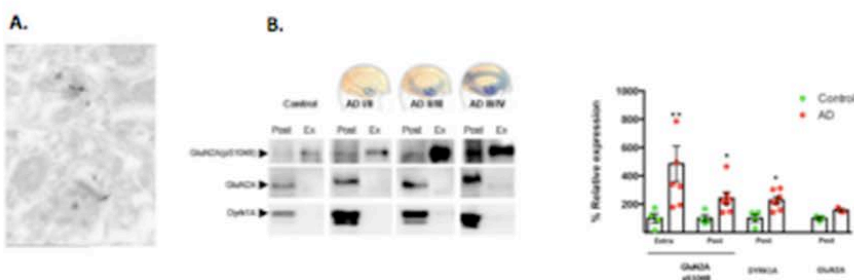


Figura 2. La fosforilació de GluN2A(pS1048) es localitza a les sinapsis glutamatèriques, els seus nivells s'incrementen amb la progressió de l'AD i són localitzats al compartiment extrasinàptic.

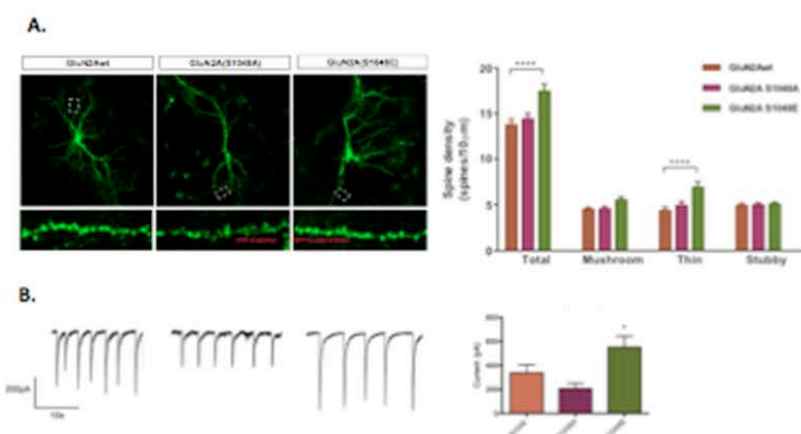


Figura 3. La fosforilació de GluN2A(pS1048) associada a l'AD altera la morfologia neuronal (A) i afecta la neurotransmissió mediada per NMDAR (B), tot conduint potencialment a disfunció neuronal.