



Fundació
La Marató de TV3

20è SIMPOSIUM
Malalties neurodegeneratives



IDENTIFICACIÓ DE SIGNATURES BIOLÒGIQUES ESPECÍFIQUES A PARTIR DE MOSTRES DE PLASMA PER AL DIAGNÒSTIC DIFERENCIAL DE LA DEMÈNCIA AMB COSSOS DE LEWY

Katrin Beyer

Hospital Universitari Germans Trias i Pujol

1. Resum del projecte

1.1 INTRODUCCIÓ

La demència amb cossos de Lewy (DCL) és, després de la malaltia d'Alzheimer (MA), el segon tipus més comú de demència degenerativa, que representa el 20-30% dels casos de demència. És una malaltia molt heterogènia i complexa, i pertany juntament amb la malaltia de Parkinson (MP) al grup de les malalties amb cossos de Lewy, que es caracteritzen per la presència d'inclusions positives d'alfa-sinucleïna al cervell.

La DCL mostra una superposició neuropatològica i clínica amb la MA que dificulta el diagnòstic precís i el maneig correcte de la DCL. Els símptomes psiquiàtrics no són fàcilment identificables i la presència de deteriorament cognitiu o símptomes motors pot portar a un diagnòstic erroni de MA o MP. El diagnòstic correcte de la DCL és de màxima importància, ja que aquesta condició es caracteritza per un curs clínic agressiu i una alta mortalitat general. La neurodegeneració irreversible característica comença molt abans que els símptomes clínics de la DCL o la MA es tornin evidents, fet que dificulta els tractaments efectius. Per tant, la identificació primerenca dels pacients és un objectiu important en la investigació de les demències degeneratives.

Mostres de sang perifèrica inclouen diferents fonts de material biològic per al descobriment de biomarcadors. D'aquestes, les plaquetes es caracteritzen pel seu contingut de diversos neurotransmissors, els seus transportadors i receptors, i addicionalment per una ruta completa de miRNA. Una altra font de material biològic procedent de sang són les vesícules extracel·lulars, incloent-hi els exosomes. Aquests últims es consideren cada vegada més com una font valuosa d'informació originada a les cèl·lules. Els exosomes són vesícules derivades d'endosomes de mida nanomètrica secretades per molts tipus cel·lulars i es troben en la majoria dels fluids corporals. Els exosomes contenen material citoplasmàtic específic de la cèl·lula d'origen, també àcids nucleics (especialment petites espècies d'RNA i miRNA), proteïnes i metabòlits, la qual cosa els fa atractius per al descobriment de biomarcadors.

1.2 OBJECTIUS

1. Recollir mostres de sang de pacients amb DCL i MA, i individus controls, i aïllar-ne DNA, plaquetes i vesícules extracel·lulars.
2. Realitzar l'anàlisi genètica, incloent-hi anàlisi mutacional i d'expressió, del gen GBA com a factor de més risc de la DCL.

3. Determinar mitjançant anàlisi de transcriptoma complet els canvis específics en l'expressió d'mRNA i miRNA en plaquetes i vesícules extracel·lulars de DCL, MA i controls.
4. Determinar els canvis en l'expressió del proteoma complet en plaquetes i vesícules extracel·lulars de DCL, MA i controls.
5. Analitzar els nivells d'expressió dels mRNA i miRNA que presenten canvis d'expressió específics en plaquetes o en vesícules extracel·lulars associats a la DCL.
6. Establir una signatura biològica de mRNA/miRNA específica per distingir pacients amb DCL de pacients amb MA i controls.

1.3 DISSENY DE L'ESTUDI

Estudi prospectiu transversal de pacients amb DCL i MA diagnosticats en dos hospitals terciaris a l'àrea metropolitana de Barcelona controlats per subjectes de control en el mateix rang d'edat: extracció de DNA, plaquetes, vesícules extracel·lulars, RNA i anàlisi d'expressió de miRNA.

Mostres i subjectes. El diagnòstic clínic de pacients amb DCL i MA es va realitzar al Departament de Neurologia dels hospitals Germans Trias i Pujol (Badalona) i Bellvitge (l'Hospitalet de Llobregat). Els mateixos departaments van reclutar subjectes controls emparellats per edat i gènere. Tots els participants van signar un consentiment informat, prèviament aprovat pel Comitè d'Ètica de l'Hospital Germans Trias i Pujol.

Obtenció de la mostra. Es van recollir 10 ml de sang: 1) en tubs de citrat de sodi per minimitzar l'activació de les plaquetes i 2) en tubs EDTA (tots dos: BD Vacutainer). L'extracció de DNA i plaquetes es va dur a terme seguint els procediments estàndards.

L'extracció de les vesícules extracel·lulars de sang es va realitzar enriquint el sobrenedant després d'obtenir plaquetes mitjançant cromatografia d'exclusió per grandària. Les fraccions que contenien vesícules extracel·lulars es van controlar per citometria de flux detectant l'expressió de marcadors associats a vesícules (CD9 i CD81). **L'extracció d'RNA/miRNA de plaquetes i vesícules extracel·lulars** es va dur a terme amb el paquet (*kit*) d'aïllament de miRNA mirVana™ basat en filtres de fibra de vidre (GFF). Mitjançant aquest mètode es va aïllar l'RNA total, incloent-hi RNA de mida gran de més de 200 nucleòtids (fracció d'mRNA) així com de mida petita de fins a 10 nucleòtids (fracció d'RNA petits). El **perfil d'expressió de miRNA de**

plaquetes i vesícules extracel·lulars es va analitzar amb el paquet TruSeq, basat en la lligació directa a dos adaptadors en cada molècula d'RNA i una reacció posterior d'RT per a l'obtenció de cDNA. El cDNA va ser amplificat per PCR i seqüenciat en un sistema MiSeq (*Illumina*). **Transcripció inversa i anàlisi d'expressió**

d'mRNA/miRNA per qPCR: els biomarcadors potencials d'mRNA es van validar mitjançant PCR a temps real i els biomarcadors potencials de miRNA mitjançant l'ús d'un panell d'expressió de miRNA predissenyat utilitzant la tecnologia LNA. En tots dos casos, els canvis d'expressió relatius van ser avaluats pel mètode $\Delta\Delta Ct$. **Anàlisi de dades d'expressió d'mRNA/miRNA:** l'anàlisi de dades terciàries es va realitzar aplicant un flux de treball estàndard per a aquest tipus de dades, que consisteix en: (i) control de qualitat de les seqüències obtingudes per descartar seqüències de baixa qualitat, (ii) alineació de la resta de seqüències contra el genoma de referència, (iii) recompte dels mRNA coneguts i també qualsevol nova variant d'empalmament (*splicing*), unions d'exons o altres variants disponibles, (iv) quantificació de l'expressió diferencial entre els diferents grups d'estudi, i (v) realització de l'anàlisi d'importància biològica dels elements trobats en verificar l'enriquiment en les bases de dades d'anotacions i després en diferents bases de dades (GO, KEGG, etc.) per facilitar la interpretació dels resultats. **Establiment de la signatura biològica:**

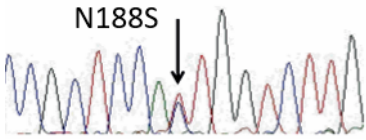
independentment de la metodologia utilitzada, els valors de p ajustats menors de 0,05 representaven un canvi d'expressió significatiu. El canvi significatiu en l'expressió d'almenys un mRNA o miRNA constantment present en totes les mostres analitzades en aquest estudi va ser acceptat com un marcador.

Basats en els biomarcadors seleccionats es va construir i va validar una signatura predictiva, mitjançant la validació creuada 5x seleccionant el millor model predictiu i les millors característiques incloses. La validació creuada de tot el procés va permetre evitar el biaix de selecció i així garantir les estimacions no esbiaixades de precisió predictiva que assegurin la reproductibilitat de la signatura derivada en nous conjunts de dades independents.

Durant els tres anys de durada del projecte, només vam poder proposar quins miRNA podrien constituir el perfil final de biomarcadors per al diagnòstic primerenc i diferencial de DLB. Els estudis de validació definitius es duran a terme a partir d'ara.

2. Resultats

2.1 Les mutacions en el gen de la glucocerebrosidasa precipiten l'inici de la demència amb cossos de Lewy i prevalen en homes.



En aquest estudi es van analitzar seqüències d'mRNA de GBA en una cohort neuropatològica que incloïa mostres de cervell de 50 DCL, 44 MP i 34 controls i en una cohort clínica de 47 pacients amb DCL i 131 individus no afectats. Es van identificar 6 mutacions diferents de GBA en 16 pacients amb sobrerepresentació rellevant en cervells amb DCL pura (35,7%, $p = 0,001$). La mutació més comuna va ser E326K, que estava marcadament associada amb la DCL pura i amb l'MP amb demència. A més, es va comprovar que l'E326K no era un polimorfisme comú en la nostra població. Les anàlisis de correlació amb les dades clíniques van revelar que les mutacions de GBA s'associen amb un inici de la DCL més primerenc (64,7 vs. 72,4, $p = 0,014$) i són presents principalment en homes (90% en portadors de mutació *versus* 52,5% en portadors sense mutació, $p = 0,021$). **Conclusions:** els nostres resultats mostren que les mutacions de GBA confereixen risc per al desenvolupament de la DCL també en la població espanyola. S'associen amb una edat més primerenca d'inici i són més freqüents en els pacients masculins.

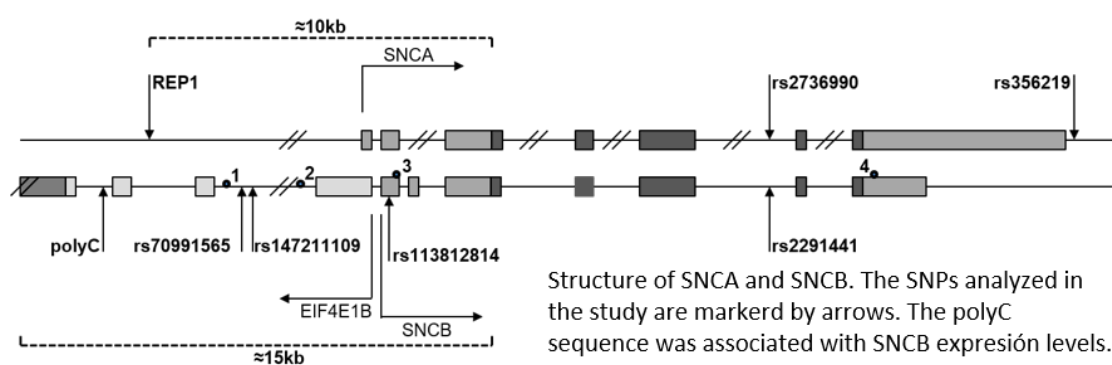
2.2 Les mutacions en el gen de la glucocerebrosidasa s'acumulen en el trastorn del comportament del son REM idiopàtic (TCSR).

Tots els exons codificants de GBA de 69 pacients amb TCSR confirmats per polisomnografia i 84 controls emparellats van ser seqüenciats pel mètode de Sanger. Com a resultat, es van identificar 7 mutacions (E326K, L444P, A446T, A318K, R329C, T369M, N370S) en 8 pacients (11,6%) amb IRBD i en 1 control (1,2%) ($p = 0,026$).

GBA-variant	cDNA change	aa change	MAF	SNP
A318G	c.1070C>G	p.A357G	n/a	n/a
E326K	c.1093G>A	p.E365K	0.011	rs2230288
R329C	c.1102C>T	p.R368C	1.22 e-5	rs374306700
T369M	c.1223C>T	p.T408M	0.0061	rs75548401
N370S	c.1226A>G	p.N409S	0.0022	rs76763715
N392N	c.1303A>G	p.N431N	2.52 e-5	rs777049786
L444P	c.1448T>C	p.L483P	0.0013	rs421016
A446T	c.1453G>A	p.A485T	2.53 e-5	rs759859002

Després d'un seguiment mitjà de $8,9 \pm 3,8$ anys a partir del diagnòstic de TCSR, 5 subjectes amb mutacions de GBA van desenvolupar una malaltia amb cossos de Lewy (3 DCL i 2 MP) i 3 van romandre lliures de malaltia. El risc de desenvolupar una malaltia amb cossos de Lewy va ser similar en subjectes amb TCSR amb mutacions de GBA que en aquells sense mutacions (prova de *log rank*, $p = 0,935$). En conclusió, en TCSR, les mutacions de GBA són: 1) freqüents, 2) associades amb MP i DCL imminents, però 3) no són indicatives d'un risc a curt termini de malaltia amb cossos de Lewy després del diagnòstic de TCSR. Els pacients amb TCSR portadors de mutacions de GBA podrien estudiar-se amb intervencions modificadores de la malaltia amb l'objectiu de restablir la via metabòlica de GBA.

2.3 La longitud d'INDEL i haplotips en el gen de la beta-sinucleïna poden ser una clau per diferenciar la demència amb cossos de Lewy. En aquest estudi ens vam proposar analitzar la distribució de genotips d'SNP potencialment funcionals en els gens d'alfa- i beta-sinucleïna (SNCA i SNCB), realitzar anàlisi d'haplotips per a SNCB i identificar variacions d'inserció i eliminació funcional (INDEL) dins de la regió reguladora d'SNCB, que podrien ser responsables dels nivells dràsticament disminuïts d'SNCB trobats en DCL pura. Per tant, es van genotipar mostres cerebrals de MA, DCL, MP i controls sans per a 2 SNP en SNCA i 4 en SNCB. A més es van analitzar 4 variacions INDEL en sentit ascendent d'SNCB, es van determinar els nivells d'expressió d'SNCB i es van correlacionar les longituds d'INDEL amb els nivells d'expressió.



Després d'aplicar els tests estadístics ANOVA i khi quadrat i el mètode delta-delta Ct, es van identificar genotips d'SNCA i SNCB específics que segregaven amb la DCL o amb la MP. A més, es van identificar tres variacions dels INDEL al promotor d'SNCB. Les longituds dels seus al·lels estaven associades amb els nivells d'expressió d'SNCB. Els

al·lels INDEL associats amb una baixa expressió d'SNCB estaven acumulats en DCL pura. Finalment, es van identificar haplotips en SNCB específics per a la DCL. En resum, aquest estudi va demostrar que l'enriquiment diferencial de genotips en SNCA i SNCB contribueix al desenvolupament d'MP o DCL, i que els genotips associats amb una baixa expressió d'SNCB s'acumulen en DCL.

2.4 Caracterització del perfil proteòmic d'exosomes derivats de plasma de pacients amb DCL.

Es van identificar 220 proteïnes diferents mitjançant l'ús de dos mètodes de tractament de mostra abans de l'anàlisi: 1)

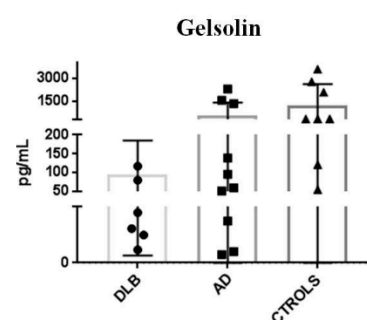
digestió en solució amb LysC i tripsina i 2) digestió amb tripsina en gel. La comparació d'ambdós mètodes

proteòmics suggereix que la digestió en gel és un mètode més sensible. A més, es van trobar nivells disminuïts de

gelsolina i butirilcolinesterasa DCL en comparació amb els controls. La validació addicional per ELISA, on a més

es va incloure un grup de pacients amb MA, va reafirmar que els nivells de gelsolina estan disminuïts en exosomes de plasma de DCL en comparació amb controls i MA. La

detecció de la gelsolina com a biomarcador putatiu en plasma mitjançant un assaig ELISA convencional s'ha d'explorar més en futurs estudis.



2.5 Perfils de miRNA de vesícules extracel·lulars derivades de plasma

difereixen entre la malaltia d'Alzheimer i la demència amb cossos de Lewy. En aquest estudi es van aïllar i

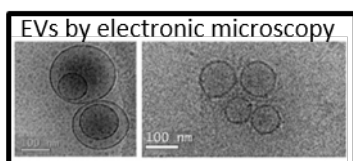
caracteritzar els miRNA de les vesícules extracel·lulars derivades de plasma de pacients amb DCL i MA, i de controls

sans de la mateixa edat. Els resultats van revelar un conjunt de 5 miRNA (miR-21-5p, let-7I-5p, miR-126-3p, miR-451 i miR-26a-5p) significativament disminuïts en mostres

de MA respecte de pacients amb DCL i controls; i un grup de 4 miRNA (miR-24-3p, miR-183-5p, miR-143-3p i miR-423-5p) sobreexpressats en MA en comparació amb

DCL i controls. Les corbes ROC obtingudes per als miR-21-5p, let-7I-5p, miR-126-3p i miR-451 amb AUC d'aproximadament 0,9 van demostrar que aquests miRNA podrien

ser possibles biomarcadors per distingir la DCL de la MA, i que podrien formar part de la signatura biològica per identificar en aquest projecte. Encara que es requereix la validació d'aquests resultats en cohorts més grans, les nostres dades suggereixen que



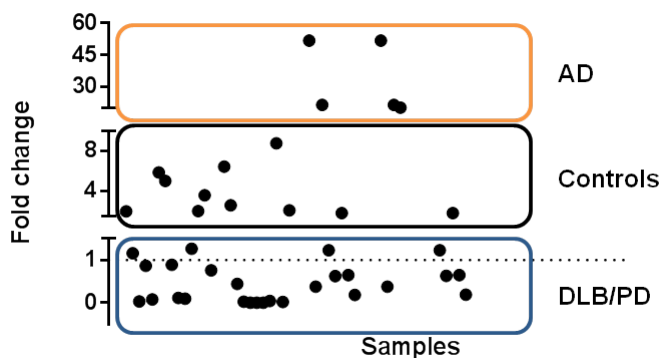
el contingut de miRNA de les vesícules extracel·lulars derivades de plasma pot reflectir la patogènesi de trastorns neurodegeneratius.

2.6 Els nivells d'HSA-miR-150-5p derivat de plaquetes discriminen entre les sinucleïnopaties i la malaltia d'Alzheimer.

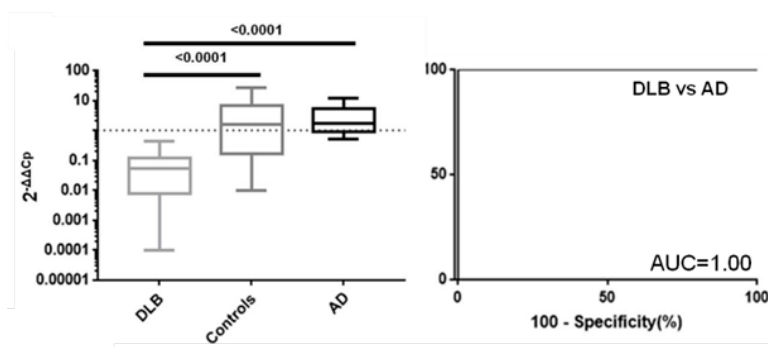
Aquest estudi es va realitzar en dues fases, una fase de descobriment i una fase de validació. Per assegurar un material d'origen vàlid, el sediment (*pellet*) ric en plaquetes es va caracteritzar per citometria de flux i es va poder descartar la contaminació amb leucòcits. Durant la fase de descobriment, es va analitzar el transcriptoma de miRNA complet de plaquetes mitjançant NGS en 22 pacients amb DCL i 24 controls, i es van identificar 22 miRNA com a possibles biomarcadors. Després d'un primer estudi de validació amb 14 DCL i 15 controls, 12 miRNA van complir els criteris per ser investigats en estudis addicionals.

Es van dur a terme dos estudis de validació posteriors, incloent-hi un estudi cec final:

- Segon estudi independent: DCL (n = 12), MA (n = 10), controls (n = 10)
- Estudi cec: DCL (n = 18), MA (n = 6), MP (n = 5), controls (n = 14)



L'estudi cec va demostrar que l'expressió del miRNA amb les majors propietats de discriminació, el miR-150-5p, es podia definir en tres nivells: expressió baixa, intermèdia i alta (figura de l'esquerra, a dalt). Un total de 5 de les 6 mostres de MA es van



situar dins el grup d'expressió alta i 10 de les 14 mostres de control dins del grup d'expressió intermèdia. Totes les mostres de DCL i MP es van agrupar com mostres d'expressió baixa. Les anàlisis de corba ROC van revelar que

el miR-150-5p diferencia la DCL de la MA amb una especificitat i sensibilitat molt altes (figura de l'esquerra inferior).

Aquestes dades suggereixen que el panell de miRNA pot ser un biomarcador per al diagnòstic diferencial de la DCL *versus* la MA. Aquests miRNA podrien ser, d'una banda, una eina útil per a la pràctica clínica, i, d'una altra banda, per ser utilitzada a l'hora d'incloure pacients en assajos clínics.

3. Rellevància i possibles implicacions futures

Un dels resultats principals del projecte és d'elevada rellevància clínica, ja que hem identificat un biomarcador perifèric per distingir entre la demència amb cossos de Lewy (DCL) i la malaltia d'Alzheimer (MA). Aquest biomarcador s'ha caracteritzat en tres estudis independents, l'inicial i dos de validació, i és de sensibilitat i especificitat superiors al 95%. Les troballes s'han patentat (EP18382540.5; data de la sol·licitud: 2018.07.19) i s'espera poder validar-les en estudis de prova de concepte al llarg d'aquest any. L'objectiu final és poder oferir una eina de diagnòstic diferencial de la DCL per ser utilitzada en la pràctica clínica.

El biomarcador identificat gràcies a aquest projecte és el primer biomarcador molecular per al diagnòstic diferencial de la DCL, i si bé havíem identificat un biomarcador per a la identificació d'un dels subgrups d'aquesta, aquest és vàlid per a la identificació de tots els pacients.

La DCL és, després de la MA, la segona causa més freqüent de les demències. Per raó de la superposició neuropatològica d'ambdues malalties, el diagnòstic clínic de la DCL és molt difícil i fins a un 80% dels pacients rep un diagnòstic erroni, ja que la majoria de les vegades és de MA. El tractament que reben els pacients mal diagnosticats correspon al de la MA, la qual cosa causa reaccions adverses en el 50%. En aquest context, el descobriment del biomarcador representa un avenç important per garantir un diagnòstic correcte de la DCL i evitar tractaments erronis millorarà considerablement la qualitat de vida dels pacients amb DCL i també dels seus familiars i cuidadors. La seva utilització en la pràctica clínica contribuirà a disminuir despeses del sistema de salut.

Un altre punt molt important que cal tenir en compte és que l'aplicació del nostre biomarcador contribuirà més directament a la millora del desenvolupament de fàrmacs per al tractament de la MA, així com la DCL. Molts dels assaigs clínics recents han fracassat, ja que el reclutament de grups de pacients homogenis no sempre està garantit. Amb el nostre marcador pretenem oferir una eina que permet identificar tots els pacients amb DCL erròniament classificats com a MA i així contribuir a l'execució reeixida d'assajos clínics relacionats amb MA o DCL.

4. Bibliografia científica generada

4.1 PUBLICACIONS

1. Gámez-Valero A, Prada-Dacasa P, Santos C, Adame-Castillo C, Campdelacreu J, Reñé R, Gascón-Bayarri J, Ispuerto L, Álvarez R, Ariza A, Beyer K.

GBA Mutations Are Associated With Earlier Onset and Male Sex in Dementia With Lewy Bodies. **Mov Disord.** 2016, 31, 1066-70; doi: 10.1002/mds.26593. **IF: 6.01,**

Quartil: 1

2. Gámez-Valero A, Monguió-Tortajada M, Carreras-Planella L, Franquesa MI, Beyer K, Borràs FE.

Size-Exclusion Chromatography-based isolation minimally alters Extracellular Vesicles' characteristics compared to precipitating agents.

Sci Rep. 2016, 6, 33641; doi: 10.1038/srep33641. **IF: 5.228, Quartil: 1**

3. Gámez-Valero A, Beyer K.

Alternative splicing of alpha- and beta-synuclein genes plays differential roles in synucleinopathies.

Genes 2018, 9, 63; doi:10.3390/genes9020063. **IF: 3.600, Quartil: 1**

4. Gámez-Valero A, Iranzo A, Serradell M, Vilas D, Santamaria J, Gaig C, Álvarez R, Ariza A, Tolosa E, Beyer K.

Glucocerebrosidase gene variants are accumulated in idiopathic REM sleep behavior disorder.

Parkinsonism Relat Dis 2018, 50:94-98;
<https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2018.02.034>.

IF: 4.721, Quartil: 1

5. Gámez-Valero A, Canet-Pons J, Urbizu A, Anillo A, Santos C, Ariza A, Beyer K.
INDEL length and haplotypes in the b-synuclein gene: A key to differentiate dementia with Lewy bodies?

JAD 2018, 65:207-219; doi: 10.3233/JAD-180074. **IF: 3.731, Quartil: 2**

Dos manuscrits addicionals s'han enviat per publicar:

6. Gámez-Valero A, Campdelacreu J, Vilas D, Ispierto L, Reñé R, Álvarez R, Armengol MP, Borràs FE, Beyer K.

microRNA profiles from plasma-derived Extracellular Vesicles differ between Alzheimer's disease and Dementia with Lewy bodies.

Enviat a: *Journal of Extracellular Vesicles*

7. Gámez-Valero A, Campdelacreu J, Reñé R, Beyer K, Borràs FE.

Comprehensive proteomic profiling of plasma-derived EVs from dementia patients points to gelsolin as differential biomarker.

Un tercer manuscrit s'enviarà després d'incrementar el nombre de mostres:

8. Gámez-Valero A, Campdelacreu J, Vilas D, Ispierto L, Gascón-Bayarri J, Reñé R, Álvarez R, Armengol MP, Borràs FE, Beyer K.

Can opposite platelet-derived hsa-miR-150-5p expression levels distinguish between dementia with Lewy bodies and Alzheimer disease?

4.2 CONGRESSOS

1. Gámez-Valero A, Borràs FE, Beyer K.

MicroRNA signature from plasma-derived EVs for Lewy body dementia as promising non-invasive biomarker source.

7th Annual Meeting of the International Society for Extracellular vesicles; Barcelona (Spain), May **2018: PÒSTER**

2. Gámez-Valero A, Borràs FE, Beyer K.

Specific platelet microRNA signature for Dementia with Lewy bodies as promising biomarker.

Molecular Neurodegeneration Course Wellcome Genome Campus; Hinxton-Cambridge (UK), January **2018: PÒSTER**

3. Gámez-Valero A, Borràs FE, Beyer K.

Specific platelet microRNA signature for Dementia with Lewy bodies as promising biomarker.

Brain Disorders Conference; Madrid (Spain), November **2017: ORAL**

4. Gámez-Valero A, Carreras L, Monguió-Tortajada M, La Franquesa M, Beyer K, Borràs FE.

Isolation and characterization of Extracellular Vesicles isolated by SEC, PEG and PROSPR: A Comparative Study.

International Society for Extracellular Vesicles (ISEV) Congress, Rotterdam (Netherlands), May **2016: PÒSTER**

5. Gámez-Valero A, Pérez-Roca L, Canet Pons J, Campdelacreu J, Reñé R, Ispierto L, Katrin Beyer.

Beta-synuclein genotypes indicate increased risk to develop Lewy body pathology in the brain.

Genomics of Brain disorders Conference. Wellcome Genome Campus; Hinxton-Cambridge (UK), April **2016: PÒSTER**

6. Gámez-Valero A, Adame C, Beyer K.

Glucocerebrosidase Gene in Lewy Body Diseases.

16th Congress Spanish Society Neuroscience, Granada (Spain), September **2015: PÒSTER.**