



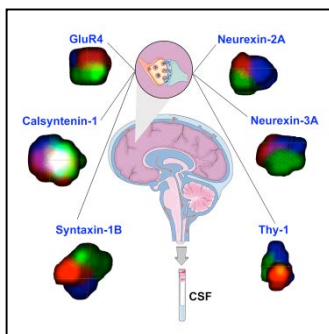
Fundació
La Marató de TV3

20è SIMPOSIUM
Malalties neurodegeneratives

MARCADORS SINÀPTICS A LA MALALTIA D'ALZHEIMER PRECLÍNICA

Alberto Lleó Bisa

Hospital de la Santa Creu i Sant Pau



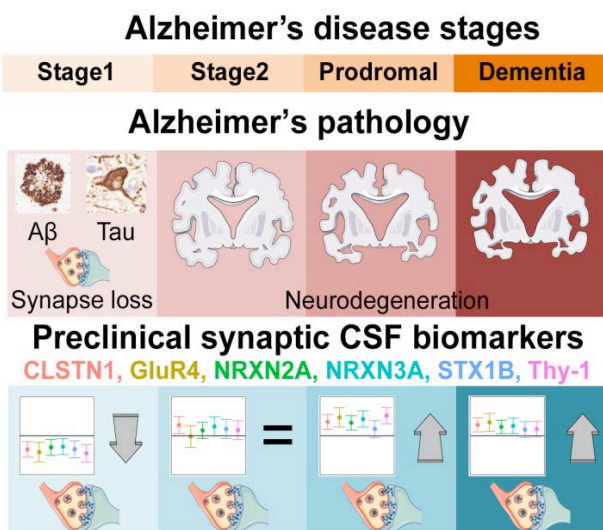
1. Resum del projecte

Aquest projecte té com a objectiu aprofundir en el coneixement del dany sinàptic en la malaltia d'Alzheimer (MA). Els objectius específics es van dividir en dos grans apartats: (1) caracteritzar el proteoma sinàptic al líquid cefalorraquidi (LCR) en la MA amb la finalitat de descobrir proteïnes sinàptiques com a potencials biomarcadors precoços de la malaltia i (2) caracteritzar la composició molecular sinàptica del còrtex entorínic humà i identificar els canvis més precoços induïts per la MA. Per a la consecució d'aquests objectius es van proposar els dissenys experimentals que s'expliquen a continuació.

Per assolir l'objectiu 1, es van seleccionar els millors candidats a biomarcadors sinàptics en la MA a partir de les dades generades per la bibliografia científica i d'un estudi pilot. De les 251 proteïnes candidates, se'n van seleccionar 22 per estudiar-les posteriorment mitjançant espectrometria de masses (MS). D'aquestes 22, es va avaluar l'expressió de la proteïna en el cervell humà i la seva detecció adequada en l'LCR humà. D'aquest estudi, es van seleccionar 9 proteïnes (calsintenina-1, GluR2, GluR4, neurexina-2A, neurexina-3A, neuroligina-2, syntaxina-1B, Thy-1 i Vamp-2), que es van mesurar en tres cohorts de subjectes control i en diverses fases del contínuum Alzheimer. L'estudi va demostrar que es produïa un descens global d'aquestes proteïnes en la fase preclínica de la MA (persones amb signes biològics però sense símptomes), canvis que precedeixen als marcadors de neurodegeneració. Hem dipositat una patent per protegir l'explotació d'aquestes proteïnes com a biomarcadors de la degeneració sinàptica i hem llicenciat el desenvolupament d'assajos per facilitar-ne la detecció en l'entorn clínic.

Per assolir l'objectiu 2, es va comparar la composició molecular de fraccions del sinaptosoma aïllades de 18 mostres de subjectes control i dos grups que cursen amb dipòsits cerebrals de proteïna tau (taupatia): casos de taupatia primària relacionada amb l'edat (PART) i casos de MA. Observem més presència de proteïnes mitocondrials en la sinapsi en casos de PART i casos de MA en comparació amb els controls. No obstant això, no observem diferències en la composició de les sinapsis entre casos de PART i de MA. Concloem que la patologia tau associada a l'edat i a la MA està relacionada amb un reclutament de proteïnes mitocondrials en la sinapsi.

En resum, l'estudi proporciona informació important sobre els canvis inicials d'una regió crítica per a la MA i pot facilitar la identificació de biomarcadors per a la detecció de la degeneració sinàptica, un esdeveniment precoç en la patogènia de la MA.



Resum gràfic: Hem identificat i validat un panel de 6 proteïnes sinàptiques (calsintenina-1, GluR4, neurexina-2A, neurexina-3A, syntaxina-1B i Thy-1) que es redueixen en el líquid cefalorraquidi en la fase preclínica de la MA (Stage 1) caracteritzada per amiloïdosi cerebral (acumulació d'Aβ) en absència de símptomes. A més, les mateixes proteïnes augmenten en las fases simptomàtiques (prodròmica i demència), cosa que reflecteix una neurodegeneració més generalitzada. Aquests resultats mostren per primera vegada que el descens de proteïnes sinàptiques en l'LCR és un fenomen molt precoç que precedeix els fenòmens de neurodegeneració.

2. Resultats

Les sinapsis són estructures essencials per al funcionament neuronal correcte. El dany sinàptic en la MA té un paper central, encara que es tracta d'un fenomen poc estudiat en humans. En aquest projecte es van plantejar dos grans objectius per aprofundir en aquest mecanisme i la seva potencial aplicació en el diagnòstic precoç de la MA.

Objectiu 1: caracteritzar el proteoma sinàptic en el líquid cefalorraquidi (LCR) amb la finalitat d'identificar proteïnes sinàptiques com a potencials biomarcadors precoços de la malaltia

Per a la consecució d'aquest objectiu es va iniciar l'estudi amb la selecció dels millors candidats a biomarcadors sinàptics a partir de dades generades per la bibliografia científica i un estudi pilot amb mostres d'LCR de 60 persones. Aquest és el primer estudi sistemàtic del proteoma d'LCR i, a més, inclou la caracterització completa del seu component sinàptic. Específicament, l'estudi va permetre conèixer que un 6% del proteoma sinàptic en l'LCR està format per proteïnes sinàptiques. De les 251 proteïnes detectables en l'LCR se'n van seleccionar 22 per a un estudi posterior. Vam desenvolupar assajos d'espectrometria de masses (MS) dirigida (SRM, *selective monitoring reaction*) utilitzant 54 pèptids marcats amb isòtops corresponents a les 22

proteïnes d'interès. Vam eliminar 12 proteïnes de l'estudi a causa d'una detecció insuficient en 5 mostres d'LCR. De les 10 proteïnes restants, en vam avaluar l'expressió sinàptica en el cervell humà mitjançant la tècnica de microscòpia de tomografia per *array* (AT), disponible al nostre grup i detallada en dues publicacions prèvies (Colom-Cadena *et al.*, *Brain* 2017; Pickett *et al.*, *J, Alzheimer*, desembre del 2016).

L'AT és particularment adequada per a l'estudi de les sinapsis humanes, ja que proporciona una resolució espacial millorada en el pla axial en comparació amb altres tècniques de microscòpia de llum (com la microscòpia confocal). En obtenir seccions de teixit ultrafí (70 nm), es poden identificar sinapsis individuals. Les reconstruccions en 3D de sinapsis individuals mostren clarament l'expressió de 9 de les proteïnes del panel directament a la sinapsi, marcades per marcadors presinàptics (sinaptofisina) i postsinàptics (PSD-95) (figura 1A). No obstant això, la tenascina-R es va trobar al voltant de la sinapsi sense contacte directe, una troballa consistent amb les dades de la bibliografia científica que suggereixen que tenascina-R resideix en xarxes perineuronals extracel·lulars. L'especificitat de l'expressió sinàptica es va avaluar addicionalment quantificant l'enriquiment de les proteïnes del panel en el sinaptosoma de 6 mostres de teixit cortical humà sense patologia. La isoforma 2A de neurexina-2 no es va poder analitzar per la manca d'un anticòs específic disponible comercialment adequat per a la transferència Western. La **figura 1B** mostra que les 9 proteïnes analitzades es van enriquir en fraccions sinàptiques en comparació amb l'homogeneïtzat ($p < 0,03$).

Les 9 proteïnes amb alta especificitat per a la sinapsi (calsinténina-1, GluR2, GluR4, neurexina-2A, neurexina-3A, neuroligina-2, syntaxina-1B, Thy-1 i Vamp-2) es van escollir per avaluar-les com a marcadors de la pèrdua sinàptica en tres cohorts de subjectes control i en diverses fases del contínuum de l'Alzheimer procedents de l'Hospital de Sant Pau de Barcelona, la Fundació CITA Alzheimer i l'Hospital Clínic de Barcelona. L'estudi global (**figura 2**) va demostrar que es produïa un descens global d'aquestes proteïnes en la fase preclínica (sense símptomes) de la MA (Stage 1) i un augment posterior a les fases simptomàtiques (prodròmica i demència). De les 9 proteïnes, 6 (calsinténina-1, GluR4, neurexina-2A, neurexina-3A, syntaxina-1B i Thy-1) van registrar un descens significatiu en la fase preclínica ($p < 0,05$). Aquests resultats mostren per primera vegada que el descens de proteïnes sinàptiques en l'LCR és un fenomen molt precoç en la fase preclínica de la MA que precedeix els fenòmens de

neurodegeneració. Proposem que els nivells reduïts en el primer estadi preclínic poden reflectir una densitat sinàptica reduïda en aquests individus amb amiloidosi cerebral, un efecte que s'emmarca per la neurodegeneració generalitzada en etapes posteriors de la malaltia. Els resultats es van publicar a la revista internacional més important del camp de la proteòmica (Lleó *et al.*, *Mol Cell Prot*, 2019).

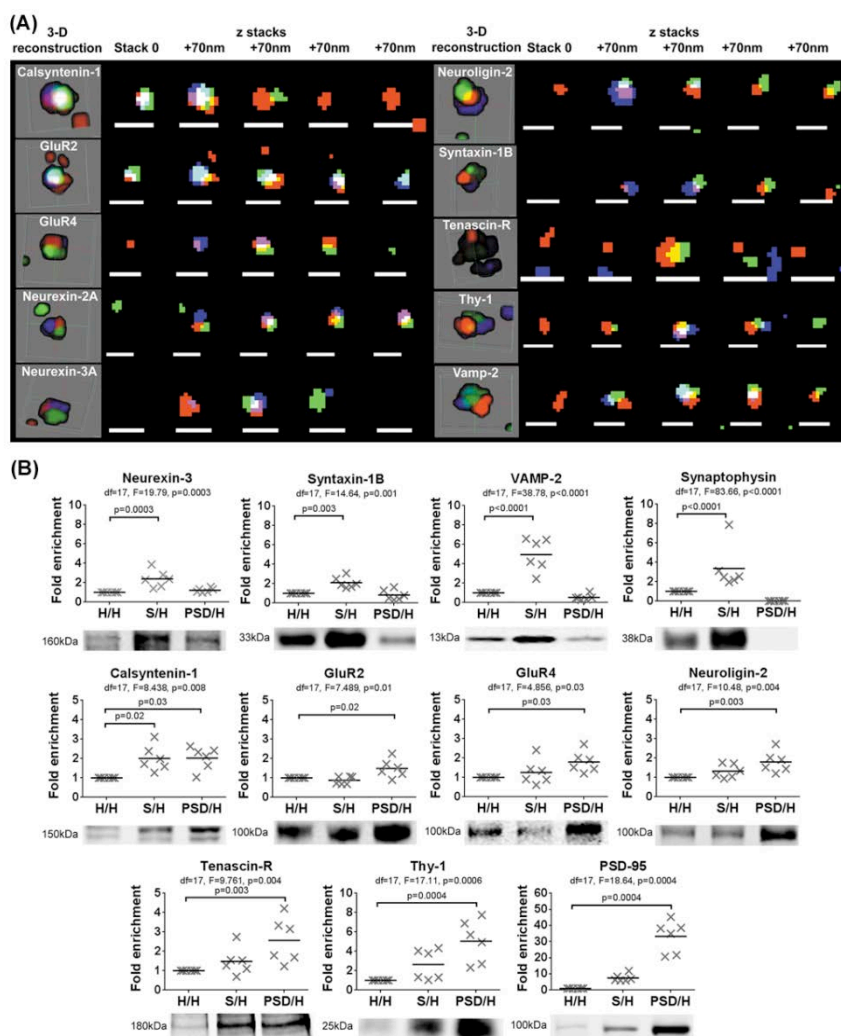


Figura 1. Expressió de las proteïnes del panel a la sinapsi cortical humana. (A) Mitjançant microscòpia AT, es van tenir talls ultrafins (70 nm) de teixit cortical *post mortem* d'un donant amb anticossos específics per als marcadors sinàptics de referència de la presinapsi (sinaptofisina, vermell) i postsinapsi (PSD95, verd) i les proteïnes del panel sinàptic (blau). Es mostra una reconstrucció en 3D d'una sinapsi representativa per a cada proteïna del panel. La immunofluorescència segmentada de les 3 proteïnes a cada z individual (en increments de 70 nm) es mostra a la dreta de la reconstrucció. Les barres d'escala, que representen 1 μm, es mostren a la part inferior de cada z. **(B)** El grau d'enriquiment

(*fold-enrichment*) de cada proteïna del panel a les fraccions d'homogeneïtzat (H), sinaptosoma (S) i PSD (PSD) aïllades de l'escorça humana *post mortem* ($n = 6$). S / H i PSD / H: intensitat a les fraccions S o PSD relativa a H per a la mateixa mostra. S.S: intensitat a la fracció H per a cada mostra amb relació a la intensitat mesurada a la fracció H en totes las mostres. També es mostra l'enriquiment dels marcadors de referència de la presinapsi (sinaptofisina) i postsinapsi (PSD-95).

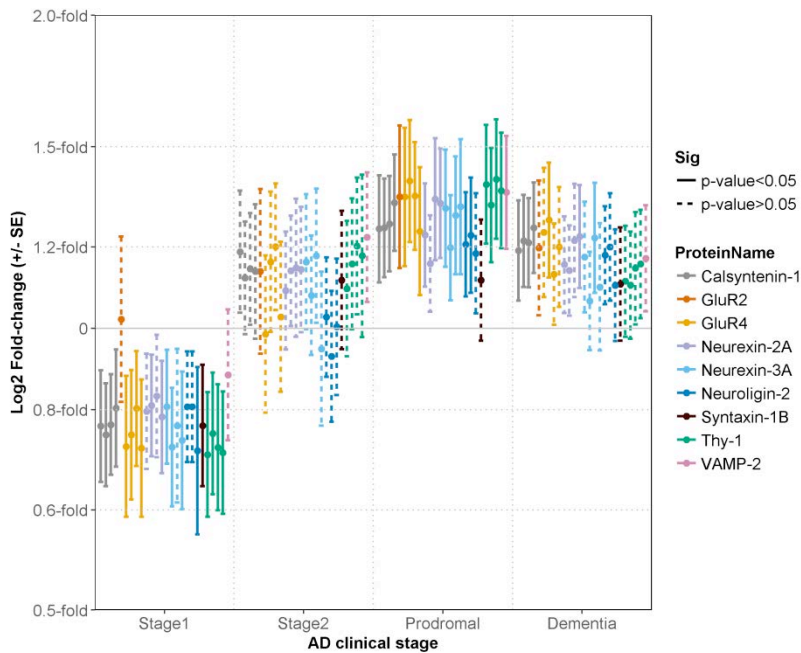


Figura 2. Nivells relatius en l'LCR de pèptids sinàptics en el contínuum de la MA. Es mostra la quantitat mitjana relativa ($\text{Log}_2\text{-fold-change} \pm \text{error estàndard, SE}$) de les proteïnes del panel sinàptic en l'LCR de cada estadi de la MA en comparació amb controls cognitivament normals (mitjana de 3 cohorts independents). Per facilitar-ne la interpretació, els valors naturals s'etiqueten a l'eix y en una escala log_2 . L'estil de línia de les barres d'error es va determinar mitjançant el tall del valor p per comparacions de grups per parells, utilitzant un model de regressió lineal d'efecte mixt (vegeu la llegenda). Stage 1: estadi preclínic 1; Stage 2: estadi preclínic 2; Prodromal: MA prodromàtica; Dementia: demència tipus MA.

Objectiu 2: caracteritzar la composició molecular sinàptica del còrtex entorrinal humà i identificar canvis més precoços induïts per la MA

Per a la consecució d'aquest objectiu es va procedir a extreure, mitjançant un protocol publicat de sinaptosomes, 18 mostres cerebrals de còrtex entorrínic de subjectes control sans i dos grups que presentaven dipòsits anòmals de proteïna tau al cervell (taupatia): taupatia primària relacionada amb l'edat (PART) i MA. Les fraccions es van analitzar mitjançant espectrometria de masses (LC-MS/MS) al Centre de Regulació Genòmica. Prèviament vam comprovar mitjançant transferència Western que les fraccions obtingudes estaven enriquides per a la fracció presinàptica. Posteriorment, es van comparar les proteïnes trobades en els tres grups. Utilitzant PANTHER, una eina en línia per analitzar vies biològiques (www.pantherdb.org), vam anotar les proteïnes a un procés biològic i vam comparar el canvi mitjà en l'expressió de cada procés als sinaptosomes dels casos de MA en comparació amb controls. Vam observar nivells més baixos de proteïnes associades amb la secreció de vesícules i senyalització sinàptica, cosa que reflecteix la degeneració de sinapsi associada amb la MA (**figura 3**). A més,

vam observar una expressió elevada de proteïnes mitocondrials a la sinapsi (**figura 3**). Els casos de PART van mostrar els mateixos canvis en comparació amb els controls. Vam concloure que la patologia tau associada a l'edat i a la MA està relacionada amb un reclutament de proteïnes mitocondrials a la sinapsi. Aquest estudi proporciona informació important sobre els canvis inicials d'una regió crítica per a la MA i proposem que les proteïnes associades a les vies mitocondrials que van mostrar més significació podrien ser nous marcadors dels processos inicials en malalties que es presenten amb taupatia. El manuscrit es troba en fase de redacció.

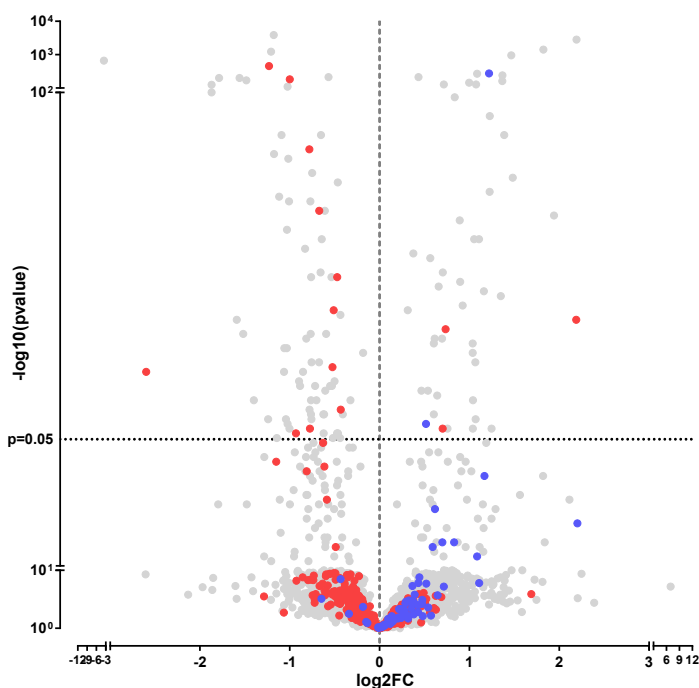


Figura 3. Expressió relativa de proteïnes sinàptiques al còrtex entorínic de la MA davant de controls. Expressió relativa (\log_2FC) de les 3.130 proteïnes quantificades en fraccions del sinaptosoma aïllades de casos amb la MA davant de fraccions del sinaptosoma aïllades de controls. Les proteïnes associades amb la secreció de vesícules sinàptiques o la senyalització sinàptica estan marcades en vermell. Les proteïnes associades amb funcions de la mitocondria estan marcades en blau.

En resum, aquest projecte ha proporcionat informació innovadora sobre els canvis inicials d'una regió crítica per a la MA i ha permès identificar nous biomarcadors que podrien servir per detectar la degeneració sinàptica, un esdeveniment precoç en la patogènesi de la MA. Els nous marcadors tenen potencial per ser útils en una varietat de malalties neurològiques i psiquiàtriques, i obren la via a una investigació més àmplia en el futur (vegeu la nostra publicació: Lleó *et al.*, *Clinica Chimica Acta*, 2019).

3. Rellevància i implicacions futures

Aquest projecte ha obtingut resultats molt rellevants per a la comunitat científica i amb possibles aplicacions pràctiques per als pacients amb Alzheimer i altres malalties neurodegeneratives. En concret, les proteïnes sinàptiques descobertes en l'LCR en aquest projecte (objectiu 1) poden ser marcadors de progressió en la malaltia d'Alzheimer i altres trastorns relacionats, o bé marcadors de diagnòstic precoç en subjectes amb risc elevat (per exemple, en casos amb història familiar) de desenvolupar la malaltia d'Alzheimer.

A més, com a conseqüència directa d'aquest projecte, s'ha presentat una patent de 10 proteïnes sinàptiques per protegir-ne l'explotació com a biomarcadors de la degeneració sinàptica i s'ha llicenciat una companyia belga, ADX Neurosciences, perquè desenvolupi immunoassajos de 4 proteïnes per aplicar-les a gran escala en pacients amb malalties neurològiques. El desenvolupament d'assajos més robustos que permetin un ús clínic més ampli és un pas clau per a l'aplicació a la pràctica clínica. Esperem que alguns d'aquests marcadors es puguin aplicar en un futur pròxim en la rutina clínica o bé en assajos clínics amb fàrmacs modificadors de la malaltia.

4. Bibliografia

Articles científics

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 redacció.

Patents

Patent europea

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

Data de prioritat: 16 de març de 2018.

Número de sol·licitud: EP18382175.0.

Títol: Markers of synaptopathy in neurodegenerative disease.

Llicències

Entitats: IIB-SantPau, Barcelona; ADx Neurosciences, Bèlgica.

Motiu de la llicència: Desenvolupament d'anticossos i immunoassajos adequats per al mercat del diagnòstic *in vitro* per a 4 biomarcadors sinàptics identificats per l'equip a l'IIB-Sant Pau.

Durada: 2018-2025.