



Fundació
La Marató de TV3

20è SIMPOSIUM
Malalties neurodegeneratives



**A LA RECERCA DE BIOMARCADORS I DIANES
TERAPÈUTIQUES RELACIONADES AMB ELS DÈFICITS
COGNITIVUS EN ESTADIS PRIMERENCOS DE LA MALALTIA
D'ALZHEIMER: PAPER D'AKAP79/150, CPT1C I
SSAO/VAP-1 EN LA DISFUNCIO AMPAR MEDIADA
PER A β**

José Rodríguez Álvarez

Institut de Neurociències UAB

1. Resum del projecte

La plasticitat de les sinapsis glutamatèrgiques, amb canvis en la dinàmica dels receptors de glutamat, s'ha postulat com un mecanisme clau en el processament dels processos cognitius, i sembla evident que alteracions en aquestes sinapsis poden estar relacionades amb els dèficits primerencs en aprenentatge i memòria que s'observen en el deteriorament cognitiu lleu (DCL o MCI, per *mild cognitive impairment*) i en les primeres etapes de la malaltia d'Alzheimer (MA). El nostre projecte se centra a dilucidar els mecanismes moleculars subjacents a la disfunció dels receptors de glutamat AMPA (AMPA) que estiguin implicats en els dèficits d'aprenentatge i memòria associada a la MA. Basats en dades preliminars obtingudes en el nostre laboratori amb ratolins transgènics, creiem que la disfunció sinàptica mediada per $\alpha\beta$ associada a aquests dèficits en aprenentatge es deu a l'alteració en la presència de receptors AMPA funcionals a la membrana sinàptica com a conseqüència de la combinació de diversos processos: (1) una regulació a la baixa de l'AKAP79/150 o de la carnitina palmitoiltransferasa I (CPT1C); (2) una disminució en la síntesi sinàptica d'aquests receptors per regulació alterada de miRNA, i (3) la sobreexpressió de la SSAO/VAP-1, que afecta l'alliberament d'angioneurines requerides per a la funció sinàptica correcta dels AMPAR. Utilitzant diferents models experimentals d'AD, així com mostres humanes de controls i pacients d'MCI o estadis inicials de MA, el nostre projecte pretén identificar noves dianes terapèutiques i biomarcadors útils per promoure la prevenció, la diagnosi i teràpies de recuperació futures en els estadis primaris de la malaltia d'Alzheimer.

2. Resultats

La regulació dels nivells dels receptors AMPA (AMPA) a la membrana postsinàptica és un mecanisme important involucrat en l'aprenentatge i la formació de la memòria. Nombroses evidències han suggerit que una alteració en els receptors sinàptics AMPA està involucrada en els dèficits cognitius inicials observats en la MA. L'objectiu principal del projecte va ser provar si AKAP79/150, CPT1C, la regulació alterada dels miRNA o l'alteració de la barrera hematoencefàlica contribueixen a la disfunció del receptor AMPA en models experimentals de la MA.

La transmissió sinàptica excitadora està estretament regulada per la quantitat i funcionalitat dels AMPAR presents en la sinapsi. Les evidències actuals suggereixen que els AMPAR s'insereixen en la membrana postsinàptica durant la potenciació a llarg termini (PLT) i podrien eliminar-se de la membrana durant la depressió a llarg termini (DLT). A més, s'ha demostrat que els oligòmers del pèptid A β (oA β) alteren la funció i l'estructura sinàptica, inhibeixen la PLT i faciliten els processos de DLT. La desfosforilació de GluA1 en els residus Ser845 i un augment en la seva endocitosis són esdeveniments crítics en la modulació de la DLT. A més, els canvis en les proteïnes d'esquelet situades a la densitat postsinàptica (DPS) també estan relacionats amb la regulació per oA β dels AMPAR sinàptics. En el present estudi, hem analitzat l'efecte de la inducció de la DLT química (cDLP) o d'oA β en els nivells d'AKAP150, una proteïna sinàptica que s'ha proposat que funciona en la regulació de la fosforilació, l'activitat i el trànsit endosomal dels AMPAR. En determinar els nivells d'AMPAR en cultius neuronals, hem pogut observar com tant els oA β com la cDLT indueixen una degradació dels nivells de la proteïna AKAP150 que és dependent de l'activació del proteosoma, però no de l'activitat de la calcineurina. La reducció d'AKAP150 és paral·lela a la desfosforilació en Ser845 i l'endocitosis sinàptica dels AMPAR mediada per oA β (i cDLT). La relació causal entre la disminució dels nivells d'AKAP150 i l'endocitosis dels AMPAR també està reforçada per la desfosforilació de GluA1 i l'endocitosis dels AMPAR observada quan es va silenciar l'expressió d'AKAP79/150. D'altra banda, la sobreexpressió d'AKAP150 va restaurar els nivells d'AMPAR, amb una reducció de l'endocitosis i la desfosforilació de GluA1. Com que AKAP79/150 és una proteïna sinàptica que s'ha proposat que funciona com un esquelet de senyalització que regula la fosforilació dels AMPAR, la seva activitat i el trànsit endosomal associat a la plasticitat sinàptica, els canvis mediat per oA β en els nivells d'AKAP79/150 podrien estar relacionats amb una desregulació dels receptors sinàptics d'AMPA en les primeres etapes de la MA.

Dades recents suggereixen que un dels components del complex AMPAR és la carnitina palmitoiltransferasa 1 C (CPT1C), una isoforma específica present en el cervell i ubicada al reticle endoplasmàtic de les neurones. Resultats previs van demostrar que la deficiència de CPT1C interromp la maduració d'espines dendrítiques en les neurones de l'hipocamp i afecta l'aprenentatge espacial. No obstant això, el paper de CPT1C en la fisiologia dels AMPAR era desconegut. En aquest projecte hem demostrat que CPT1C s'uneix a les subunitats GluA1 i GluA2 i que les tres proteïnes tenen el mateix perfil d'expressió durant la maduració neuronal. A més, en les neurones de l'hipocamp de

ratolins *knock-out* per a CPT1C (CPT1C-KO), els corrents miniatura postsinàptics excitadors i els nivells sinàptics de les subunitats GluA1 i GluA2 d'AMPAR disminueixen significativament. Vam demostrar que l'expressió d'AMPAR depèn dels nivells de CPT1C. Hem constatat que els nivells totals de GluA1 i GluA2 estan disminuïts en l'hipocamp de ratolins CPT1C-KO i que aquests nivells poden tornar a la normalitat si sobreexpressem en les neurones CPT1C. CPT1C sembla afectar selectivament els AMPAR, ja que no observem variacions en els nivells d'altres proteïnes sinàptiques. Notablement, els nivells d'ARNm d'AMPAR es van mantenir sense canvis en aquests cultius, la qual cosa indica que CPT1C està involucrat en la regulació post-transcripcional d'aquests receptors i afecta principalment la síntesi *de novo* de GluA1 i no la seva degradació. A més, en les neurones CPT1C-KO la síntesi de GluA1 després de la cDLT va disminuir clarament. Aquestes dades identifiquen CPT1C com un nou regulador de l'eficiència de traducció d'AMPAR i, per tant, de la funció sinàptica en l'hipocamp. No obstant això, tot i que observem una disminució en els nivells de proteïna CPT1C en l'hipocamp de pacients amb MA en estadis Braak III/IV, no vam poder observar canvis significatius en els nivells de proteïna CPT1C en cultius de neurones d'hipocamp després del tractament amb $\alpha\beta$ o en els cultius hipocampals provinents de ratolins APP_{Sw, Ind}. Per tant, sembla que no hi ha una relació entre els nivells de CRT1C i la disminució en AMPAR sinàptics observada en els models experimentals de MA encara que CPT1C regula els nivells totals d'aquest receptor.

Diverses evidències indiquen que el deteriorament cognitiu observat en les primeres etapes de la MA podria explicar-se per alteracions en la funció sinàptica que precedirien la neurodegeneració. A més, alguns informes han demostrat que la desregulació dels nivells de proteïnes sinàptiques podria estar relacionada amb la disfunció cognitiva primerenca en models experimentals de MA. Per tant, els canvis en els mecanismes reguladors involucrats en l'expressió de proteïnes sinàptiques podrien ser valuosos per avaluar el pronòstic i la taxa de deteriorament cognitiu en la MA. Atès que els nivells de proteïnes sinàptiques estan modulats per miRNA i els miRNA podrien usar-se com a biomarcadors, analitzem en aquest projecte els canvis en els perfils de miRNA en pacients de MA i subjectes control en diferents àrees cerebrals. A partir dels resultats obtinguts, hem examinat els nivells plasmàtics de diversos miRNA associats amb proteïnes sinàptiques i hem explorat la utilitat d'un subconjunt d'aquests miRNA com un biomarcador selectiu potencial per a la MA. Per a aquests estudis exploratoris, hem utilitzat mostres de plasma d'una cohort espanyola formada per subjectes control i

pacients diagnosticats de deteriorament cognitiu lleu (DCL) o MA. Els resultats obtinguts van ser molt esperançadors, ja que trobem un augment significatiu en els nivells d'expressió dels miR-92-3p, miR-181c-5p i miR-210-3p en els subjectes amb DCL i MA. A més, trobem que el nivell d'expressió d'aquests miRNA podria ser un bon indicador de si els pacients amb DCL progressarien a MA, ja que el seguiment durant diversos anys d'aquests pacients va permetre descobrir que els pacients amb DCL que finalment van desenvolupar MA tenien nivells plasmàtics més alts d'aquests miRNA. També trobem que els nivells d'expressió d'aquests miRNA podrien usar-se de manera fiable com un biomarcador potencial per a la MA, atès que no es van observar canvis en els nivells plasmàtics en una cohort de pacients amb demència frontotemporal. Sobre la base d'aquests resultats, proposem que, en conjunt, els miRNA miR-92-3p, miR-181c-5p i miR210-3p probablement constitueixen una signatura molecular específica que pot ser potencialment desenvolupada com un biomarcador sensible i selectiu per a la detecció de la MA en etapa primerenca i un bon predictor de si és probable que hi hagi un progrés del DCL a la MA.

A més de les dues característiques patològiques principals de la MA, que inclouen plaques de β -amiloide (A β) extraneuronals i els cabdells neurofibril·lars, també hi ha altres característiques associades a la demència de la MA que prediuen una alteració en la barrera hematoencefàlica (BHE), com en el cas de l'angiopatia amiloide cerebral (CAA). La bibliografia científica defensa avui dia que la vasculatura cerebral contribueix de manera important a l'aparició i progressió de la MA, i postula l'existència d'un fort vincle entre el dany vascular i aquesta patologia. Per tant, l'estudi de la interferència neurovascular i les seves alteracions és important per comprendre les bases moleculars de la MA. Així, en aquest projecte hem dedicat atenció a aquest aspecte i hem estudiat la contribució de la SSAO/VAP-1 endotelial en relació amb la BHE en la MA. Els nostres resultats mostren que l'expressió de SSAO/VAP-1 s'associa a l'activació endotelial mitjançant l'alteració de l'alliberament de angioneurines proinflamàtiques i proangiogèniques com l'IL-6, IL8 o VEGF. També està relacionada amb una alteració de l'estructura de la BHE, amb una disminució de les proteïnes d'unió estreta, com la *zonula occludens* o claudina-5. A més, la BHE va revelar més permeabilitat i adhesió de leucòcits en cèl·lules que expressen SSAO/VAP-1, així com un augment de la deposició d'A β vascular induïda per mecanismes dependents i independents de l'activitat enzimàtica de SSAO/VAP-1. També hem observat una disminució en l'alliberament de BDNF en les cèl·lules endotelials que sobreexpressen hSSAO/VAP-1 que afecten la

maduració sinàptica. En aquestes condicions, hem observat una reducció en els nivells d'AMPA i una disminució significativa de PSD95 i AKAP79/150 en el terminal postsinàptic. Aquests resultats confirmen el paper de la SSAO/VAP-1 endotelial en la disfunció de la BHE relacionada amb la MA i suggereixen que l'alliberament diferencial d'angineurines podria afectar el desenvolupament i la funció sinàptica. En total, els nostres resultats obren una nova finestra en la recerca d'objectius terapèutics alternatius per combatre la MA.

3. Rellevància i implicacions futures

Els resultats obtinguts en aquest projecte han confirmat que les proteïnes postsinàptiques AKAP79/150 i SSAO endotelial podrien ser noves dianes potencials per a futures aproximacions terapèutiques. No obstant això, encara s'han de fer estudis per poder confirmar-ho. D'altra banda, els resultats d'aquest projecte que podrien tenir més impacte en menys temps són els relatius a la signatura molecular de miARN en plasma com a biomarcador primerenc de la malaltia d'Alzheimer (MA). El diagnòstic primerenc i, per tant, la intervenció primerenca abans no apareguin els símptomes de MA seria una de les millors opcions per alentir o aturar la progressió de la MA, de manera que ha esdevingut una qüestió d'interès general identificar biomarcadors eficients i econòmics. El diagnòstic primerenc de la MA permetrà: (1) que els pacients comencin a aplicar mesures de salut per preservar la funció cognitiva existent durant el màxim temps possible (per exemple, amb la minimització dels factors de risc vascular o amb un augment de l'activitat mental); (2) que es pugui iniciar el tractament dels símptomes amb medicaments o altres intervencions; (3) que es maximitzi la participació de persones en estadis inicials de la malaltia en els assajos clínics; 4) que s'ofereixi més temps per dissenyar equips mèdics i de cuidadors que puguin donar suport efectiu davant les inquietuds mèdiques que apareixen durant el desenvolupament de la malaltia; (5) que els pacients i els membres de la seva família tinguin més temps per conèixer a què s'enfronten en el futur i es puguin planificar en conseqüència mentre els pacients mantinguin la capacitat cognitiva per prendre decisions, i 6) que, en diagnosticar amb precisió les persones que tenen deteriorament cognitiu lleu (DCL), no evolucionin cap a MA. En els propers anys planegem validar la signatura molecular que hem identificat com un biomarcador selectiu i universalment sensible per a la MA en estendre la nostra anàlisi a cohorts de DCL i MA de països

diferents. Un cop obtinguem aquesta validació, el segon objectiu serà utilitzar les nostres troballes com a plataforma per explorar el desenvolupament d'una eina de diagnòstic assequible i basada en plasma per a l'examen clínic de rutina. El nostre biomarcador representaria un avenç significatiu, atès que actualment no hi ha cap biomarcador en plasma (o un altre fluid perifèric) aprovat o disponible per al diagnòstic de les etapes primerenques de la MA.

4. Bibliografia

Patents

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 juny de 2018).

Articles

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 (enviat).

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 (2a revisió).

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 (enviat).

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 (enviat).

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).