



Fundació
La Marató de TV3

20è SIMPOSIUM
Malalties neurodegeneratives



ESTUDI DEL PAPER DE LES SOQUES D' α -SINUCLEÏNA EN LA INDUCCIÓ I DISSEMINACIÓ DE LES SINUCLEÏNOPATIES

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. Resum del projecte

La malaltia de Parkinson (MP) és el segon trastorn neurodegeneratiu més freqüent després de la malaltia d'Alzheimer, i afecta més de 7 milions de persones a tot el món. La seva aparició està lligada a l'envelliment, i afecta fins a un 2% de les persones de més de 65 anys, de manera que es preveu que la incidència creixi progressivament a la nostra societat, a causa de l'augment de l'esperança de vida. Malgrat els esforços de les institucions públiques i privades, l'MP continua sent incurable. Els tractaments actuals només són capaços de millorar els símptomes motors inicials de la malaltia. A més, aquests medicaments es tornen ineficaços a mesura que progressa la malaltia. Per aquest motiu hi ha una necessitat urgent de trobar una teràpia que modifiqui el curs de la patologia.

Una de les característiques histopatològiques de l'MP és la presència d'inclusions proteiques intraneuronals, els anomenats cossos de Lewy (LB), el component principal dels quals és una forma mal plegada i agregada d' α -sinucleïna (α -syn). Les mutacions en α -syn causen formes familiars de l'MP, són formes rares, però molt agressives, motiu pel qual provoquen un avançament significatiu en la manifestació de la malaltia. Tot i que se sap que les formes mal plegades d' α -syn poden propagar-se entre neurones i difondre la patologia d'LB al cervell d'una manera semblant a com ho fan els prions, aquest fenomen encara no s'entén completament. Un dels temes més interessants en aquest context és esbrinar quina és la naturalesa de les formes transmiseses d' α -syn. S'ha demostrat que α -syn pot autoassemblar-se en diferents tipus d'agregats que generen diferents soques que es creu que s'associen a diferents manifestacions clíniques de la malaltia.

El projecte tenia l'objectiu de proporcionar informació nova sobre la hipòtesi de la transmissió priònica per a l'MP i de caracteritzar les propietats funcionals i conformacionals dels agregats d' α -syn, tant *in vitro* com en models animals de la malaltia. Els resultats indiquen que tant les soques d' α -syn amiloide generades *in vitro* com els agregats presents en pacients que tenen diferents sinucleïnopaties es propaguen de manera diferent en el cervell dels animals model, la qual cosa suggereix fortament que les propietats estructurals dels agregats d' α -syn són un determinant clau de la seva propagació en el cervell i de la seva toxicitat neuronal. Les propietats

diferencials d'aquests agregats s'han de tenir en compte en tractar de desenvolupar tractaments per a aquests trastorns devastadors.

El nou coneixement mecanístic, estructural i tècnic generat durant l'execució d'aquest objectiu inicial ens ha permès dur a terme un nou objectiu més ambiciós: el desenvolupament de noves molècules capaces d'aturar l'agregació i especialment la propagació d'agregats d' α -syn. En aquest context, hem identificat un nou compost que és efectiu contra l'agregació de diferents soques d' α -syn, i és una molècula prometedora per a una futura teràpia capaç de modificar potencialment el curs de la patologia.

2. Resultats

1. Producció i purificació de variants recombinants d' α -sinucleïna (α -syn)

Durant aquest projecte, el grup ha establert amb èxit un protocol per a la producció i purificació semipreparativa de la proteïna α -syn de tipus salvatge (wt), els seus mutants i algunes variants redissenyades amb un grau de puresa i homogeneïtat que superen les de la proteïna disponible comercialment. La qualitat de la proteïna ha estat un actiu important per als passos posteriors del projecte. En particular, hem produït les variants familiars de PD següents: A30P, H50Q, A53E, A53T, G51D i E46K.

2. Generació de soques wt α -syn *in vitro*

Després de seleccionar diverses combinacions, hem establert les condicions per generar fibril·les amiloides d' α -synen tres condicions diferents: pH moderadament baix; pH neutre i baix contingut en sal, i pH neutre i alt contingut en sal.

3. Caracterització de les soques wt α -syn

Les tres espècies amiloides diferents generades corresponen a soques veritables, ja que difereixen en la morfologia, grandària, cinètica d'agregació, unió a colorants amiloides, quantitat d'agregats per unitat de proteïna i estructura secundària. Aquestes fibril·les amiloides estructuralment diferents i ben caracteritzades s'han generat en àmbits semipreparatius en lots únics i s'han utilitzat per inocular-les en models animals d'MP.

4. Generació i caracterització de soques mutants α -syn

Les tres condicions que van produir amb èxit soques per a la proteïna wt es van emprar per promoure l'agregació de les variants mutacionals d'aparició primerenca: A30P, H50Q, A53E, A53T, G51D i E46K. Així es va generar un nombre sense precedents de soques amiloides conformacionalment diferents. Una conclusió important d'aquests resultats, encara no publicats, és que en una condició donada cada mutant particular es comporta de manera diferent. Això té implicacions importants, ja que indica que les mutacions en si mateixes poden ser l'origen de diferents soques amb propietats tòxiques i propagatives diferencials en els pacients. A més, per a qualsevol mutació donada, les condicions d'agregació determinen les característiques dels agregats proteics finals, d'una manera impredecible. En general, aquests resultats convergeixen per indicar que el panorama conformacional d' α -syn podria ser molt més complex del que s'havia assumit anteriorment. Per al nou mutant H50Q, hem demostrat que aquest és el cas, ja que la combinació única del coure metàl·lic, relacionat amb neurodegeneració, i la mutació patològica d' α -syn indueixen una alteració en les propietats d'agregació de la proteïna que també en determinen les propietats propagatives i la toxicitat (Villar-Pique *et al.*, PNAS, 2016).

5. Generació i caracterització de soques α -syn en presència de membranes

S'ha suggerit que l'agregació d' α -syn està influenciada per la seva unió a les membranes neuronals. Per tant, per a la proteïna wt i els mutants A30P, H50Q, A53E, A53T, G51D i E46K, vam analitzar si la presència de mimètics de membrana amb diferents composicions lipídiques donava lloc a diferents soques amiloides. Efectivament, els lípids van influir en la cinètica d'agregació i en la morfologia dels agregats finals d'una manera que depenia de la mutació específica, la qual cosa, juntament amb les dades anteriors, suggereixia clarament que l'entorn en el qual s'inicia l'agregació és un determinant crucial de l'estructura dels amiloides α -syn.

6. Generació i caracterització d'una variant sintètica d' α -syn per provar les regions d' α -syn rellevants en la propagació amiloide

La naturalesa desordenada d' α -syn ha obstaculitzat l'ús d'enfocaments d'enginyeria de proteïnes basats en estructura per dilucidar els determinants moleculars de la formació i propagació d'amiloides. Mentre s'estava executant el projecte, es va publicar l'estructura 3D d'una soca de fibril·la α -syn patògena, la qual cosa va proporcionar un model per a aquests estudis, que complementava els dissenyats originalment en el

projecte. L'estructura suggeria que el domini NAC central era un element crític en la propagació de les fibril·les, ja que en constitueix el nucli, i delinea un motiu de clau grega. Vam generar una variant sintètica en la qual engrapàvem els extrems d'aquest motiu amb un enllaç disulfur i vam avaluar-ne l'impacte en la conformació, agregació i toxicitat d' α -syn en diferents entorns. El nostre estudi no va donar suport a la tesi que el motiu de clau grega estigués imprès en els primers assemblatges d' α -syn, així que el va descartar com una interfície terapèutica per prevenir l'inici de la fibril·lació i la seva propagació. En contrast, suggeria l'estabilització de conformacions natives i compactes com una estratègia terapèutica potencial per evitar la formació d'espècies tòxiques i atacar les etapes inicials de l'MP (Carija *et al.*, *Redox Biology*, 2019).

7. Desenvolupament d'un assaig de PMCA per a α -syn

Vam desenvolupar un protocol per implementar l'assaig de *protein misfolding amplification* clàssic utilitzat per a la proteïna PrP de mamífers en l'anàlisi de la propagació d' α -syn humana. Vam aconseguir condicions en les quals tant les fibril·les d'amiloides wt com mutants d' α -syn podrien propagar-se *in vitro* de forma priònica. No obstant això, les propietats estructurals específiques inicials de les soques d' α -syn es van perdre durant l'amplificació i, per tant, aquest protocol es va descartar per generar material per a estudis *in vivo* en models animals. Tot i això, com veurem en altres seccions, el protocol desenvolupat va resultar crucial per identificar molècules petites que poden interferir amb l'agregació i la propagació d'agregats d' α -syn.

8. Propietats de propagació *in vivo* dels polimorfs d' α -syn generats *in vitro*

De la gran quantitat de soques α -syn generades *in vitro*, les formades per les variants wt, A30P, H50Q i A53E es van seleccionar per a estudis *in vivo* en un model de ratolí de la malaltia. Representen un total de 12 soques diferents, un nombre significativament superior a l'avaluat en qualsevol estudi anterior.

Per als estudis *in vivo*, primer vam establir una colònia de ratolins PAC-Tg (SNCAWT). En aquest animal, l' α -syn murina està desactivada i té un transgèn que codifica per a α -syn humana. Aquest animal s'utilitza com a control en molts estudis i no té un fenotip histopatològic o de comportament de l'MP, la qual cosa ens permet atribuir qualsevol canvi observat a la injecció de les nostres soques amiloides generades *in vitro*. Els animals es van inocular en el lòbul parietal dret o en l'estriat esquerre. Els ratolins es van monitoritzar diàriament i el seu estat neurològic es va avaluar dues

vegades per setmana. Els ratolins van ser sotmesos a eutanàsia seguint una cinètica de temps planificada o quan mostraven evidència de malaltia. Durant la necròpsia, es va recol·lectar el cervell de cada animal. Els cervells es van tallar de forma sagital i l'hemisferi esquerre es va utilitzar per a l'anàlisi histopatològica, mentre que l'hemisferi dret restant es va usar per a l'anàlisi bioquímica.

Els resultats obtinguts fins ara mostren diferències en l'inici de l'aparició d' α -syn fosforilada i agregada, depenent de la mutació de la proteïna recombinant inoculada, però també del tampó on es van agregar inicialment aquestes proteïnes. En la majoria dels inòculs, l'agregació d' α -syn fosforilada va començar 2 mesos després de la inoculació (pmi), després va desaparèixer al cap de 6 mpi i finalment va tornar a augmentar al cap de 13 mpi, la qual cosa implica la presència de dues corbes diferents d'agregació en el temps. Aquestes cinètiques no s'han descrit anteriorment i poden ser importants per comprendre el desenvolupament de la malaltia.

La proteïna α -syn va començar a agregar-se com a neurita i també com una acumulació de petits cossos d'inclusions intraneuronals anòmals, que es propaguen des del punt d'inoculació, l'estriat esquerre, caudalment fins a l'hipocamp i l'escorça cerebral, on presenten una gran acumulació. En general, els resultats confirmen que, segons el que es preveia, les fibril·les inoculades corresponien a soques amiloides funcionalment diferents.

9. Propagació *in vivo* d'agregats α -syn de pacients que tenen diferents sinucleïnopaties

A més de l'MP, existeixen altres malalties relacionades, generades també per l'acumulació d'agregats d' α -syn, globalment conegudes com a *sinucleïnopaties*, entre elles la demència de cossos de Lewy (LBD) i l'atròfia multisistemàtica (MSA). L'LBD és un tipus de demència progressiva que condueix a una disminució del raonament i de la capacitat de funcionar independentment, mentre que l'MSA es caracteritza per una combinació variable de símptomes i signes que inclouen el parkinsonisme, l'atàxia de cerebel i el funcionament deficient del sistema nerviós autònom. El fet que, malgrat els símptomes dramàticament diferents, l'MP, la DLB i l'MSA són causades en últim terme per l'agregació d' α -syn en el cervell, ha suggerit que aquestes malalties podrien originar-se a partir de diferents soques d' α -syn. Per avaluar aquesta hipòtesi, els extractes cerebrals de pacients que van morir després de tenir qualsevol d'aquestes

malalties es van inocular en ratolins PAC-Tg (SNCAWT) com es descriu per a les soques *in vitro* i la propagació dels agregats α -syn presents en aquests extractes es van analitzar de la mateixa manera.

La distribució d' α -syn fosforilada sembla seguir un camí similar en forma de prió, independentment de la naturalesa de l'inòcul o la seva concentració, començant des del punt d'inoculació i estenent-se cap enrere a través de tot el cervell, de manera que dona lloc a fenotips similars d'acumulació. De totes maneres, s'han trobat diverses diferències entre els inòculs en la magnitud, dispersió i principalment en l'inici d'aparició dels primers agregats d' α -syn fosforilada. Podem diferenciar clarament entre un grup conformat per totes les variants d'inòculs d'MP i DLB, i un altre grup que incloïa els inòculs d'MSA. En els casos d'MSA, els animals inoculats van presentar una aparició tardana d'agregats i una menor magnitud i dispersió d'aquests agregats. Les dades novament són consistents amb el paper de la conformació específica d' α -syn en la propagació dels fenotips patològics en el cervell.

10. Un assaig d'alt rendiment per identificar moduladors de l'agregació α -syn

El present projecte ens va permetre: (i) produir una proteïna α -syn altament pura, tant wt com mutant, (ii) implementar un PMCA per a l'amplificació d' α -syn i (iii) obtenir una cinètica d'agregació altament reproduïble. Amb aquests elements a la mà, vàrem pensar a implementar un nou i ambiciós objectiu, que no estava present en la proposta inicial: el descobriment de molècules capaces de prevenir l'agregació i propagació d'agregats d' α -syn. Per a aquest objectiu, primer vam implementar una metodologia molt robusta que ens va permetre analitzar una biblioteca de més de 14.000 petits compostos que tinguessin aquestes activitats (Pujols *et al.*, *Int J Mol Sci*, 2017).

11. Identificació d'una nova molècula petita que inhibeix l'agregació d' α -syn i la seva propagació

Com a resultat de la campanya de selecció, identifiquem SynuClean-D (SC-D). És una petita molècula que interromp l'agregació d' α -syn, desmunta les fibril·les madures i, a més, dificulta la propagació de l' α -syn agregada. Cal destacar que SC-D és l'única molècula descrita fins ara que aglutina totes aquestes propietats sinèrgiques i beneficioses en una estructura química petita. Ja hem demostrat l'efecte d'SC-D *in vivo*, on pot reduir la presència d'agregats amiloides i protegir les neurones dopaminèrgiques de la degeneració en un model de DP de *Caenorhabditis elegans*

(Pujol *et al.*, PNAS, 2018). És important destacar que SC-D inhibeix l'agregació de totes les soques d' α -syn provades fins al moment, tant si són variants seqüencials com si són generades en diferents condicions. Per tant, l'SC-D mereix un estudi posterior com una possible via nova per tractar l'MP i les altres sinucleïnopaties.

3. Rellevància i implicacions futures

Les implicacions dels resultats d'aquest projecte són múltiples i abasten des de qüestions metodològiques fins al desenvolupament d'una possible teràpia per a les sinucleïnopaties.

En particular, hem fet el següent:

- 1) Hem desenvolupat un sistema per a la producció preparativa de variants d' α -syn altament pures i amb un comportament excel·lent *in vitro*. Un nombre significatiu de laboratoris i companyies se'n beneficiaran, ja que el present estudi i d'altres de relacionats no haurien estat possibles amb la proteïna disponible comercialment.
- 2) Hem desenvolupat una metodologia de selecció d'alt rendiment molt robusta, que permetria identificar nous candidats per a la intervenció terapèutica a partir de l'anàlisi de biblioteques químiques de molècules naturals o de fàrmacs reposicionats.
- 3) Hem generat una metodologia per produir soques en l'àmbit semipreparatiu que molt probablement s'explotarà en l'àrea per a estudis estructurals i funcionals addicionals.
- 4) Hem proporcionat informació que confirma el fenomen del comportament priònic d' α -syn, i hem demostrat com diferents soques exhibeixen diferents propietats de propagació en el cervell. Aquesta observació té implicacions profundes per al tractament de les malalties associades a l'agregació d' α -syn, ja que podria implicar que serien necessaris diferents tractaments segons el tipus d'agregat que iniciï la malaltia.

Les divergències en les propietats conformacionals dels agregats poden originar-se per mutacions puntuals, però també per altres factors genètics en pacients o pel

microentorn cel·lular en el qual es produeix l'agregació. En aquest context, d'acord amb les nostres dades, l'MSA sembla una sinucleïnopatia que es diferencia clarament en termes de propagació d'MP i LBD. Això implica que el que pot donar bons resultats en el tractament d'una sinucleïnopatia concreta no necessàriament funcionaria en una altra.

5) Malgrat tots els condicionants esmentats anteriorment, hem trobat una petita molècula que sembla inhibir genèricament l'agregació i propagació d' α -syn, i desmunta qualsevol agregat preexistent. Les propietats neuroprotectores d'aquest compost suggereixen que la seva recerca podria cristal·litzar en una primera molècula capaç de tractar aquest grup de trastorns devastadors. En futurs projectes perseguirem portar-la a fases clíniques.

4. Bibliografia

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

Biasing the native α -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 α -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 α -synuclein mutant: Environment meets genetics
Communicative & Integrative Biology. 10(1): e1270484. 2017.
6. Villar-Piqué A, Lopes da Fonseca T, Sant'Anna R, Szegö 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 α -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.