

# Chapter 8

## Samenvatting

Endoplasmatisch reticulum-stress en eiwit aggregatie in de ziekte van Parkinson: de rol van weefsel transglutaminase

De ziekte van Parkinson (zvP) is een slopende neurodegeneratieve ziekte die voornamelijk voorkomt bij oudere mensen en ongeveer 1% van de mensen van 65 jaar en ouder treft. Enkele opvallende uiterlijke tekenen van de ziekte zijn rigiditeit, vertraagde bewegingen en ongewenste bewegingen en instabiliteit dat voor veel ongerief voor de patiënt zorgt. De stijgende levensverwachting van de bevolking zal naar verwachting tot een toename van het aantal patiënten met de zvP leiden, wat een grotere belasting van het zorgsysteem betekent. Een bijkomend probleem is dat er eigenlijk nog geen medicijn bestaat dat de progressieve aard van ziekte kan stoppen of kan voorkomen.

Een belangrijke karakteristiek van de zvP is het afsterven van dopamine producerende neuronen in de Substantie Nigra (SN; zwarte kern) in de hersenen. Daarnaast komen in de overblijvende (dopaminerge) neuronen in de SN bolvormige eiwitstructuren (Lewy-lichaampjes) voor, die voornamelijk uit geaggregeerde vormen van het eiwit  $\alpha$ -synucleïne bestaan. De cellulaire functie van dit eiwit is nog grotendeels onduidelijk, maar het heeft als vervelende eigenschap dat het onoplosbare fibrilstructuren kan vormen die niet goed door de neuronen verwijderd kunnen worden. Er zijn diverse oorzaken die ten grondslag liggen aan  $\alpha$ -synucleïne fibrillatie en aggregatie, variërend van genetische factoren die leiden tot over-expressie van  $\alpha$ -synucleïne tot enzymatische post translationele modificaties in het eiwit zelf, zoals fosforylering en transamidering. Daarnaast kan verstoring van eiwit afbraak processen leiden tot ophoping van  $\alpha$ -synucleïne.

Weefsel transglutaminase, in het Engels tissue Transglutaminase genaamd (tTG), is een enzym dat al enige tijd in verband wordt gebracht met de zvP. Het is een multi-functioneel enzym dat is betrokken bij diverse cellulaire processen, maar het dankt zijn naam voornamelijk aan zijn eigenschap om crosslinks in eiwitten aan te brengen. Dit kan leiden tot stabilisatie van bijvoorbeeld eiwitnetwerken, maar het kan bijvoorbeeld ook resulteren in een niet bedoelde aanpassing van eiwitten, met een veranderde functie van het aangepaste eiwit zoals aggregatie tot gevolg. Zoals de naam al suggereert komt tTG voor in veel lichaamsweefsels, waaronder ook in de hersenen. Sterker nog, er is een duidelijke verhoging geconstateerd van zowel tTG expressie als enzymatische activiteit in de SN van Parkinson patiënten. Ook zijn door tTG veroorzaakte crosslinks in de Lewy-lichaampjes van Parkinson patiënten aangetroffen. Deze waarnemingen wijzen op een belangrijke connectie tussen tTG activiteit en aggregatie van  $\alpha$ -synucleïne, maar een eenduidig antwoord aangaande de exacte rol van tTG in synucleïne aggregatie wordt nog belemmerd door een aantal onbekende factoren. Zo is het bijvoorbeeld nog niet duidelijk wat de cellulaire locatie van tTG in de (zieke) dopaminerge neuronen bij De zvP is en hoe activatie van het enzym tTG leidt tot eiwit aggregatie.

Om dit aspect nader te onderzoeken zijn daarom in dit proefschrift de volgende onderzoeksvragen geformuleerd:

- Wat is het effect van tTG inhibitors op de aggregatie van  $\alpha$ -synucleïne in een neuronaal model van de zVP?
- Wat is de (sub)cellulaire locatie van tTG in dopaminerge neuronen van Parkinson patiënten en in een neuronaal model van de zVP?

De associatie van tTG met de zVP (en andere neurodegeneratieve ziekten) heeft tot interesse geleid vanuit de farmaceutische industrie om remmers te ontwikkelen die de enzymatische activiteit van tTG kunnen blokkeren. Dit resulteerde in enkele nieuw ontwikkelde en veelbelovende remmers die irreversibel (niet-omkeerbaar) binden aan tTG. De werking van deze remmers was in neuronen nog niet goed onderzocht. In **hoofdstuk 2** werden daarom enkele remmers van tTG gekarakteriseerd in zowel reageerbuizen (in vitro) als in een neuronaal model dat uit gekweekte neuronen bestaat. Deze experimenten lieten zien dat er grote verschillen zitten in de effectiviteit van deze remmers met betrekking tot de remming van tTG in neuronen. Bepaalde remmers die de enzymatische activiteit tTG goed konden remmen in vitro, bleken bijvoorbeeld veel minder potent in neuronen, terwijl er ook remmers waren die in beide omgevingen tTG goed konden remmen. Deze experimenten laten zien dat het neuronale model zeer goed kan dienen om bijvoorbeeld een voorselectie te maken van tTG remmers, alvorens over te gaan tot testen in tijdrovende en vooral dure experimenten zoals dierproeven.

In **hoofdstuk 2** hebben wij ook de connectie tussen de enzymatische activiteit van tTG en  $\alpha$ -synucleïne aggregatie onderzocht in een neuronaal model van de zVP. In dit model werden gekweekte neuronen blootgesteld aan een giftige stof (MPP<sup>+</sup>) waarvan bekend is dat het de zowel in proefdieren als mensen een vorm van de zVP veroorzaakt. Na deze behandeling werden in deze neuronen door tTG veroorzaakte crosslinks gevonden in  $\alpha$ -synucleïne en er waren eiwit aggregaten ontstaan die positief waren voor  $\alpha$ -synucleïne. De vorming van deze crosslinks in  $\alpha$ -synucleïne en eiwit aggregaatvorming kon grotendeels worden gestopt door de zieke neuronen te behandelen met de tTG remmer Z006, welke zeer geschikt was bevonden om neuronale tTG activiteit te blokkeren in de karakterisatie studie van de remmer. Deze experimenten laten zien dat Z006 een zeer interessante kandidaat is om de rol van tTG in de pathogenese van de zVP nader te onderzoeken. Deze remmer is daarom ook gebruikt in de verscheidene experimenten beschreven in **hoofdstukken 4 en 5**.

Van tTG was al enigszins bekend dat het een mogelijke associatie kon hebben met een (sub) cellulair compartiment van neuronen in de SN van Parkinson patiënten, maar de precieze neuronale locatie was nog onbekend. Daarom hebben wij in **hoofdstuk 3** in detail gekeken naar tTG in de neuronen van Parkinson patiënten. In deze studie werd gebruik gemaakt van

post-mortem hersen materiaal van de zvp patiënten. Hiervan werden coupes (dunne plakjes) gemaakt die (immuno)histochemisch werden gekleurd om tTG en diverse (sub)cellulaire compartimenten te detecteren. De resultaten lieten zien dat in het merendeel van de getroffen neuronen tTG-positieve structuren voorkwamen die ook positief bleken voor een aantal eiwitten die indicatief zijn voor het endoplasmatisch reticulum (ER), namelijk proteïne disulphide isomerase, ERp57 en calreticulin. Een dergelijke connectie tussen tTG en het ER was nog niet eerder aangetoond in de zvp. In deze experimenten viel het ook op dat de associatie van tTG aan het ER altijd met een ER-stressreactie gepaard ging. Deze resultaten bevestigden de populaire hypothese dat een ER-stressreactie een belangrijke kenmerk is van de door de zvp getroffen neuronen. De door ons gevonden lokalisatie van tTG aan het ER suggereerde verder een nog onbekende functionele connectie tussen het ER en tTG.

Geïntrigeerd door deze mogelijke belangrijke vondst wendde wij ons tot het neuronale de zvp model beschreven in **hoofdstuk 2**, vanwege de flexibiliteit en manipuleerbaarheid van gekweekte neuronen. In dit model was namelijk al opgevallen dat behandeling met diverse de zvp veroorzakende toxinen resulteerde in de typische tTG-positieve structuren die ook waren aangetroffen in de hersenen van de zvp patiënten (**hoofdstuk 3**). Om er achter te komen of deze structuren inderdaad overeenkwamen, werd in **hoofdstuk 4** met diverse (immuno) histochemische kleuringen onderzocht wat de neuronale locatie van tTG was in relatie tot diverse neuronale (sub)compartimenten zoals het ER en mitochondria. Uit deze resultaten bleek dat tTG inderdaad op een vergelijkbare manier associeerde met het ER, zoals wij eerder al hadden aangetoond in de hersenen van Parkinson patiënten (**hoofdstuk 3**). Deze mogelijkheid gaf ons dan ook de unieke gelegenheid om de interactie tussen tTG en het ER op neuronaal niveau nader te onderzoeken na chemische inductie van de zvp. Dit ging ook gepaard met een ER-stressreactie, wat benadrukte dat het onderliggende proces nagenoeg identiek leek te zijn met wat was aangetoond in de zvp hersenen. Ook bleek uit neuronaal opgezuiverd ER dat (chemische) inductie van de zvp leidt tot een verhoogde associatie van tTG met het ER. Inductie van de zvp in het neuronale model activeert tTG (**hoofdstuk 2**). Dit resulteerde in crosslinking van eiwitten op het ER membraan zoals calnexine. Deze resultaten gaven dan ook het vermoeden dat tTG wel eens de functie van het ER zou kunnen beïnvloeden tijdens de zvp, bijvoorbeeld door de crosslinking van belangrijke ER regulerende eiwitten.

Een verstoring van het vermogen van neuronen om eiwit ophopingen van o.a.  $\alpha$ -synucleïne te verwijderen is een bekend probleem in neuronen die getroffen zijn door de zvp. Autofagie (of: jezelf opeten) is hierin een belangrijk opruim mechanisme dat verstoord raakt. Een verlaging, dat wil zeggen een verminderde eiwit afbraak, of juist een verhoging, dus teveel eiwitafbraak, kan desastreus zijn voor het voortbestaan van een neuron. Al enige tijd is bekend dat tTG is gekoppeld aan de regulatie van autofagie, al was deze interessante connectie nog niet onderzocht met betrekking tot de zvp. In **hoofdstuk 5** laten wij in het neuronale de zvp model zien dat beclin 1, een belangrijk eiwit dat autofagie reguleert middels lokalisatie naar het ER,

wordt gecrosslinkt door tTG. Uit onze experimenten bleek dat na chemische inductie van de zvp in de gekweekte neuronen, crosslinking van beclin 1 gepaard ging met een verminderde lokalisatie van beclin 1 naar het ER. Deze lokalisatie kon worden hersteld door de activiteit van tTG te remmen met het eerder genoemde Z006. Remming van tTG ging gepaard met een toename van LC3-II, een belangrijk eiwit betrokken bij autofagie. Deze resultaten bevestigden dat tTG een rol speelt bij de regulatie van autofagie.

Ons werk laat zien dat tTG lokaliseert naar het ER in de hersenen van Parkinson patiënten en gepaard gaat met een ER-stressreactie. Dit proces hebben wij kunnen nabootsen in een goed gekarakteriseerd neuronaal model voor de zvp. Met dit model hebben wij vervolgens aangetoond dat door chemische inductie van de zvp, tTG enzymatisch actief wordt, wat uiteindelijk resulteert in de crosslinking van diverse ER-specifieke eiwitten. Een functionele consequentie hiervan is dat de regulatie van autofagie wordt verstoord. Recentelijk is een belangrijke connectie gevonden tussen tTG activiteit en de crosslinking van een ER specifieke calcium pomp, resulterend in de verstoring van de cellulaire calcium huishouding. Een correcte regulatie van zowel autofagie als de calcium huishouding zijn cruciaal voor het verloop van de ER-stressreactie die plaatsvindt in de zvp neuronen. Verstoring van deze processen kan namelijk leiden tot een te lang durende ER-stressreactie en uiteindelijk celdood. Het is dus zeker aannemelijk dat tTG hierin een doorslaggevende rol zou kunnen spelen. De door ons gekarakteriseerde tTG remmer Z006 zou dan ook als een potentiële therapeutische kandidaat kunnen dienen in toekomstig onderzoek dat is gericht op preventie of het stopzetten van de progressie van de zvp.