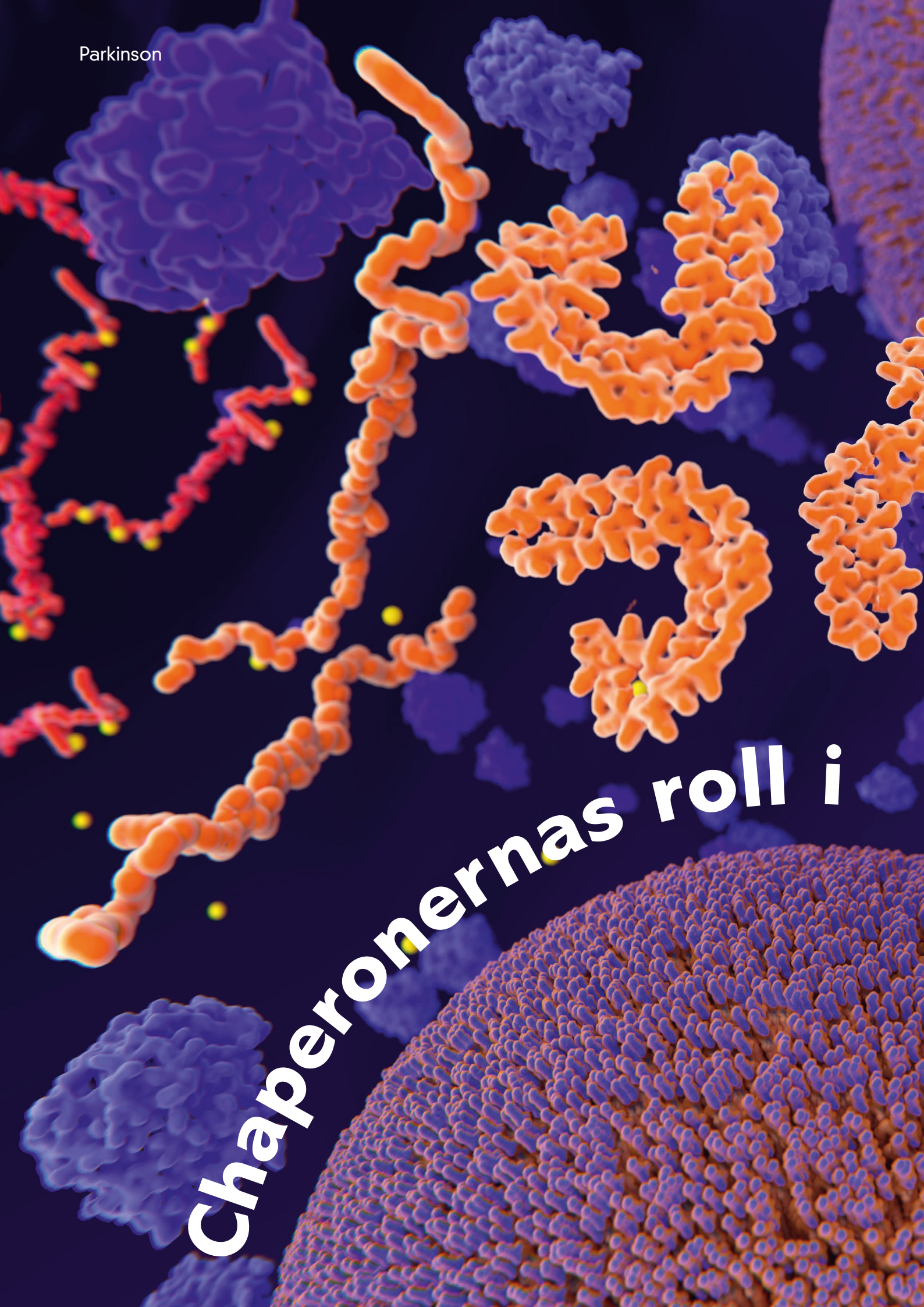


Parkinson

Chaperonernas roll i





Parkinsons

Sjukdom

Hos patienter med Parkinsons sjukdom finns ett samband mellan förekomsten av så kallade Lewykroppar och neurodegeneration. Lewykroppar uppstår inuti nervceller och består bland annat av aggregerat protein, såsom proteinet alfa-synuklein. Alfa-synuklein är ett så kallat ostrukturerat protein (från engelskans *intrinsically disordered protein*) som karaktäriseras av att proteinet inte har en fixerad tredimensionell struktur, utan växlar mellan flertalet olika konformationer. Hur alfa-synuklein kontrolleras inuti cellen och hindras från att aggregera är oklart, men tidigare forskning har visat att benägenheten med vilken alfa-synuklein aggregerar är beroende utav olika faktorer, bland annat interaktioner med chaperoner.

Chaperoner är det gemensamma namnet för proteiner med funktionen att bidra till att proteiner veckas på ett korrekt sätt. Chaperoner har olika klienter och utför olika uppgifter, vilka kan vara mycket specifika beroende på vilken slags chaperon det är, men överlag kan chaperonerna beskrivas som viktiga proteiner som verkar genom att stabilisera klientproteiner, vilket förhindrar felveckning och bildandet av toxiska proteinaggregat inuti cellerna. Vissa chaperoner kan till och med lösa upp proteinaggregat och guida felaktigt veckade proteiner till de system i cellen som ansvarar för nedbrytning av proteiner. Eftersom chaperoner har dessa viktiga egenskaper och då tidigare forskning har visat att chaperoner har ett gemensamt sätt att känna igen klientproteiner, valde vi ut flera mänskliga och bakteriella chaperoner som alla fungerar på olika sätt, och testade hur dessa chaperoner inverkar på och interagerar med alfa-synuklein.

CHAPERONER BINDER TILL ALFA-SYNUKLEIN I CELLEN

Tekniken vi primärt använde oss av för att undersöka hur alfa-synuklein och chaperoner interagerar med varandra kallas NMR-spektroskopi, även kallat kärnmagnetisk resonansspektroskopi. Tekniken är baserad på kärnspinnresonans och är grunden i den teknik som används i magnetisk resonanstomografi. Kort sammanfattat kan vår metod beskrivas som att vi har studerat interaktionen mellan alfa-synuklein och chaperoner genom att jämföra ett spektrum från ett prov med enbart alfa-synuklein med ett spektrum där vi adderat exempelvis ett chaperon till alfa-synuklein i NMR-röret. Resultatet kallas här för enkelhets skull för en intensitetsprofil. Genom ett förarbete där vi kartlägger vilken NMR-signal i spektrumet som härrör från vilken aminosyra i alfa-synuklein, kan vi identifiera exakt vilka aminosyror som är involverade i interaktionen mellan alfa-synuklein och ett chaperon.

När vi började titta på hur chaperoner interagerar med alfa-synuklein lade vi mycket riktigt märke till att samtliga chaperoner vi testade känner igen specifika regioner hos alfa-synuklein. Dessa regioner är den N-terminala delen hos alfa-synuklein och en kort region på sex aminosyror runt Tyr39. Dessa regioner utgör intressant nog också de mest hydrofobiska regionerna hos alfa-synuklein. Hittills hade vi testat hur interaktionerna mellan chaperoner och alfa-synuklein såg ut om vi titrerade samman rena proteinlösningar, men naturligtvis var vi intresserade av om vi kunde observera samma slags interaktion inuti levande mammalieceller.

Genom att titta på tidigare publicerade data som visar NMR-profilen för alfa-synuklein i levande celler kunde vi se att intensitetsprofilen för alfa-synuklein såg i stort sett likadan ut både i levande celler och i våra titreringsexperiment. Den rådande modellen var dock att denna profil i levande celler uppkommer eftersom att alfa-synuklein interagerar med cellulära membran, men vi hade observerat samma profil när alfa-synuklein interagerar med chaperoner. För att klargöra vilken modell som stämde bestämde vi oss för att konstruera ett experiment som kan särskilja på dessa båda interaktioner. Dels tittade vi på profilen som uppkom då alfa-synuklein titrerades mot cellextrakt utan membrandelar, och dels på profilen som uppkom då alfa-synuklein titrerades mot membranvesiklar. Intressant nog såg vi att intensitetsprofilen för alfa-synuklein som vi observerade när vi titrerade ned chaperoner också observeras när vi titrerar ned cellextrakt utan membranvesiklar, medan vi ser en helt annan typ av intensitetsprofil när vi titrerar ned membranvesiklar. När alfa-synuklein interagerade med membranvesiklarna, vilket vi observerade att proteinet gjorde, så noterades istället en global signalreduktion genom nästan hela alfa-synukleinet, istället för enbart runt N-terminalen och runt Tyr39. Därmed visade våra experiment att alfa-synuklein kan interagera både med chaperoner och med membran. Hur stabila är då dessa typer av interaktioner? Vi testade detta genom att tillsätta ett chaperon till en lösning med alfa-synuklein och membranvesiklar och såg då att intensitetsprofilen ändrades tillbaka till den som observeras under interaktion mellan alfa-synuklein och ett chaperon. Även det motsatta experimentet (tillsats av membranvesiklar till en lösning med alfa-synuklein och cha-

peroner) visade att profilen skiftar till den intensitetsprofil som är typisk för en interaktion mellan alfa-synuklein och membran. Därmed pekar resultaten på att både chaperoner och membranvesiklarna tävlar om att binda till alfa-synuklein, vilket leder till att alfa-synuklein befinner sig i ett jämviktstillstånd mellan sin fria form, sin membranbundna form och sin chaperonbundna form, där våra experiment indikerar att de två senare stadierna inte kan ske samtidigt.

Vi märkte även att om vi inhiberade båda dessa chaperoner verkar jämviktstillståndet hos alfa-synuklein störas och mer alfa-synuklein binder till membran istället för till chaperoner.

MODIFIKATIONER AV ALFA-SYNUKLEIN KAN STÖRA DESS INTERAKTION MED CHAPERONER

Med hjälp utav masspektrometri undersökte vi vad alfa-synuklein främst binder till inuti levande celler, och fann att alfa-synuklein återfinns bundet till flertalet olika chaperoner, bland annat olika varianter av chaperonerna HSC70 och HSP90. Vi lade märke till att om vi inhiberade både HSC70 och HSP90B påverkades intensitetsprofilen för alfa-synuklein, vilket vi inte observerade om enbart HSC70 inhiberades. Eftersom celler innehåller flertalet olika chaperoner, tyder detta på att HSC70 och andra chaperoner har en överlappande funktion. Vi märkte även att om vi inhiberade båda dessa chaperoner verkar jämviktstillståndet hos alfa-synuklein störas och mer alfa-synuklein binder till membran istället för till chaperoner. Detta resulterar intressant nog i att vi ser en uppkomst utav stabila aggregat som innehåller alfa-synuklein. Vidare undersökte vi vilken membranorganell som alfa-synuklein interagerar med i detta chaperoninhiberade tillstånd med hjälp utav immunofluorescensmikroskopi och fann att alfa-synuklein omlokaliseras till mitokondrierna.

Slutligen tittade vi närmare på hur posttranslationella modifieringar utav alfa-synuklein påverkar dess interaktion med chaperoner. Vi gjorde flera modifieringar utav alfa-synuklein: acetylering, fosforylering, oxidering och en mutant där vi tog bort den N-terminala delen utav alfa-synuklein. Acetylering utav den N-terminala delen av alfa-synuklein, vilket är den huvudsakliga varianten som hittas i mammalieceller, hade inte en negativ inverkan på interaktionen mellan chaperoner och alfa-synuklein. Däremot hade alfa-synuklein som saknade sin N-terminala del en starkt reducerad interaktion med chaperonerna, som förväntat. Oxidativ stress och uppreglering utav kinaset c-Abl med fosforylering utav Tyr39 är kända riskfaktorer för Parkinsons sjukdom.¹ Vi undersökte därför effekten av oxidering av Met1 och Met5, samt

olika fosforyleringsmönster av tyrosiner hos alfa-synuklein. Vi kunde se att oxidering hade en negativ inverkan på interaktionen mellan alfa-synuklein och chaperoner. För fosforylering såg vi att de fosforyleringar som involverade Tyr39, antingen enskilt eller tillsammans med Tyr125, Tyr133 och Tyr136 hade en negativ effekt på interaktionen mellan alfa-synuklein och chaperoner. Däremot hade fosforylering som inte innefattade Tyr39 ingen negativ påverkan på chaperon-alfa-synuklein-interaktionen.

VAD INNEBÄR VÅRA RESULTAT?

Summerat tyder resultaten på att alfa-synuklein har en särskild igenkänningssekvens som känns igen utav flera olika chaperoner, och att chaperoner reglerar alfa-synuklein via denna interaktion. I vår modell är majoriteten av alfa-synuklein bundet till chaperoner då cellerna fungerar normalt och är friska. Baserat på data kring koncentrationen av alfa-synuklein och chaperonerna HSP70 och HSP90 i nervsynapser, beräknar vi att cirka 90 procent av alfa-synuklein kan binda till chaperoner.² När balansen mellan alfa-synuklein och chaperoner däremot störs ut, interagerar alfa-synuklein i högre grad med cellulära membran, omlokaliseras till mitokondrierna och bildar proteinaggregat. Det är sedan tidigare känt att Lewykroppar till stor del utgörs utav bland annat alfa-synuklein och mitokondriefragment, och försämrade mitokondriell funktion har föreslagits som en bidragande faktor bakom Parkinsons sjukdom, vilket skulle kunna förklaras utav vår modell.³⁻⁶

Det är möjligt att det i framtiden kan utvecklas nya typer av mediciner eller terapier som baseras på chaperonernas roll i att reglera alfa-synuklein.

I våra experiment har vi använt oss utav specifika inhibitorer för HSC70 och HSP90B-chaperonerna, men en naturlig följdfråga är naturligtvis hur en obalans uppstår naturligt i cellen. Enligt vår modell skulle både ändrade mängder och ändrad aktivitet hos både chaperoner och alfa-synuklein kunna störa jämviktsbalansen, men som vi visade kan även post-translationella modifieringar påverka interaktionen mellan chaperoner och alfa-synuklein. Tidigare forskning inom området har visat att inom ärftlig Parkinsons sjukdom är ration mellan alfa-synuklein och chaperoner försämrade. Det har även visats att oxidativ stress har ett samband med ökad fosforylering utav Tyr39 hos alfa-synuklein, vilket vi med vår forskning har visat har en inhiberande verkan på interaktionen mellan alfa-synuklein och chaperoner. Det kallas vi använde oss av för monofosforylering utav Tyr39, så kallat

c-Abl, är också intressant utifrån det perspektiv att uppreglering utav c-Abl korrelerar starkt med just fosforylering av Tyr39 och Parkinsons sjukdom.^{7,8}

Samlat bildar våra resultat en modell för hur alfa-synuklein regleras inuti cellen med hjälp utav chaperoner, och visar hur en icke-fungerande interaktion mellan chaperoner och alfa-synuklein kan resultera i att alfa-synuklein bildar aggregat. Detta skulle kunna vara en inledande process som på sikt leder till neurodegenerativ sjukdom. Det är möjligt att det i framtiden kan utvecklas nya typer av mediciner eller terapier som baseras på chaperonernas roll i att reglera alfa-synuklein.



EMELIE ASPHOLM

Doktorand, Institutionen för kemi och molekyllärobiologi, Göteborgs universitet
emelie.aspholm@gu.se

REFERENSER

1. Barnham KJ, Masters CL & Bush AI. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3:205–214.
2. Wilhelm BG, et al. Composition of isolated synaptic boutons reveals the amounts of vesicle trafficking proteins. *Science* 2014; 344:1023–1029.
3. Shahmoradian SH, et al. Lewy pathology in Parkinson's disease consists of crowded organelles and lipid membranes. *Nat Neurosci* 2019; 22:1099–1109.
4. Guardia-Laguarta C, Area-Gomez E, Schon EA & Przedborski S. Novel subcellular localization for α -synuclein: possible functional consequences. *Front Neuroanat* 2015; 9:1–7.
5. Reeve AK, et al. Mitochondrial dysfunction within the synapses of substantia nigra neurons in Parkinson's disease. *NPJ Park Dis* 2018; 4:1–10.
6. Park J, Davis RL & Sue CM. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: new mechanistic insights and therapeutic perspectives. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2018; 18:1–11.
7. Mahul-Mellier A-L, et al. c-Abl phosphorylates α -synuclein and regulates its degradation: implication for α -synuclein clearance and contribution to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2014; 23:2858–2879.
8. Brahmachari S, et al. Activation of tyrosine kinase c-Abl contributes to α -synuclein-induced neurodegeneration. *J Clin Invest* 2016; 126:2970–2988.