

Systems Biology Analysis of Synucleinopathies

Citation for published version (APA):

Greally, S. (2024). *Systems Biology Analysis of Synucleinopathies: 'A Mass Spectrometry-based Proteomics Study of Parkinson's Disease, Dementia with Lewy Bodies, and Multiple System Atrophy'*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20241125sg>

Document status and date:

Published: 01/01/2024

DOI:

[10.26481/dis.20241125sg](https://doi.org/10.26481/dis.20241125sg)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary (English)

Neurodegenerative diseases present a significant challenge to global healthcare due to their rising prevalence and the lack of effective treatments and early diagnostic tools. Synucleinopathies, a group of disorders marked by the pathological aggregation of α -synuclein—a presynaptic protein critical to cellular processes—are incredibly complex. The three primary synucleinopathies—PD, DLB, and MSA—share this hallmark but exhibit distinct clinical presentations and disease trajectories. While α -synuclein aggregation plays a central role, additional disease-specific molecular mechanisms likely contribute to the heterogeneity of these conditions.

Characterizing the proteomic changes underpinning these mechanisms is essential for identifying therapeutic targets and diagnostic markers. MS-based proteomics offers a powerful, unbiased approach for analyzing large-scale protein alterations, enabling the identification of key proteins and pathways involved in the progression of PD, DLB, and MSA. Despite advances in this field, molecular distinctions between these disorders remain insufficiently understood. This thesis aimed to fill that gap by systematically comparing the proteomes of PD, DLB, and MSA using advanced MS techniques to uncover shared and disease-specific molecular profiles, providing insights into potential therapeutic targets. In addition, a detailed analysis of the DLB cohort was conducted to explore the proteomic characteristics of tau and α -synuclein in patients with elevated tau levels, highlighting the overlap between synucleinopathies and tauopathies. Furthermore, using insights from this comparative analysis, a novel cell-based model was developed to investigate the impact of inflammation on pathological α -synuclein derived from MSA brain tissues.

Chapter 2 presents a comprehensive comparative proteomic analysis of PD, DLB, and MSA using postmortem brain tissue. Global proteome alterations were identified by shifting the focus beyond α -synuclein, revealing both common dysregulated proteins and disease-specific pathways. In DLB, significant upregulation of proteins associated with AD (tau, amyloid- β , APOE, and clusterin) underscored the overlap between synucleinopathies and tauopathies. In PD, immune system dysregulation was evident, with increased classical complement proteins and the anti-inflammatory protein ICAM5. MSA exhibited extensive proteomic changes related to mitochondrial dysfunction and lipid dysregulation, with critical pathways such as VDAC and

SPART implicated in energy metabolism and α -synuclein aggregation. These findings provide new insights into the mechanisms driving α -synuclein pathology in each disorder.

This analysis also identified novel dysregulated proteins, such as the consistent downregulation of THOP1 across all synucleinopathies, which suggests a potential loss of neuroprotection against amyloid- β toxicity. The non-uniform expression of apolipoproteins—such as reduced APOA1 in PD and increased APOE in DLB—highlighted the differential involvement of lipid metabolism across these diseases. Furthermore, **Chapter 2** identified 37 proteins that could differentiate between the synucleinopathies, with NAGK in MSA and INA in PD providing deeper insights into disease-specific pathways. These proteins, along with their associated pathways, hold promise as therapeutic targets and potential biomarkers for distinguishing between synucleinopathies. While these findings lay the groundwork for future research, further validation is necessary to assess their therapeutic relevance and utility as biomarkers for early diagnosis and disease differentiation.

Chapter 3 builds on the findings from **Chapter 2** by focusing on tau in the DLB cohort, where it was found to be significantly upregulated. Patients were stratified into two subgroups—DLBTau⁺ (high tau) and DLBTau⁻ (low tau)—based on mass spectrometry measurements of insoluble tau abundance. The analysis revealed that DLBTau⁺ patients exhibited a significant upregulation of ubiquitin-related proteins, including ribosomal protein S27a (RPS27A), sequestosome, and ubiquitin itself, suggesting a critical role for the ubiquitination pathway in the co-occurrence of tau and α -synuclein pathologies. Additionally, proteins linked to dementia-related processes, such as amyloid- β , were also found to be elevated in DLBTau⁺ patients, further connecting tauopathy and synucleinopathy mechanisms.

PTMs of tau in DLBTau⁺ patients showed increased ubiquitination, acetylation, and phosphorylation at distinct sites compared to AD tau. This suggests that DLB patients with higher tau levels may represent a unique disease entity within the synucleinopathy-tauopathy spectrum. These proteomic differences between DLBTau⁺ and DLBTau⁻ patients emphasize the importance of stratifying patients in clinical trials, as those with co-pathologies, like in the DLBTau⁺ group, may respond differently to therapies targeting tau or α -synuclein alone. These findings underscore the potential need for personalized treatment approaches considering the co-occurrence of tau and α -synuclein pathologies in DLB and other neurodegenerative diseases.

The final experimental chapter, **Chapter 4**, presents the development of a novel cell-based model for MSA, drawing from the discoveries in **Chapter 2**. Proteins such as STAT1 and STAT3, upregulated in MSA patients, were targeted to replicate the inflammatory environment observed in MSA brain tissues. Pathological α -synuclein was transfected into the cells, and upon inducing inflammation, the exacerbated α -synuclein aggregates exhibited increased ubiquitination and phosphorylation at S129, mimicking the GCIs seen in human MSA tissue. This model enabled a detailed investigation of how inflammation amplifies α -synuclein aggregation and accelerates disease progression.

The results demonstrated that inflammation significantly worsened α -synuclein pathology, with proteomic analysis revealing disruptions in immune responses, energy metabolism, and cytoskeletal dynamics. The PTMs induced by inflammation closely mirrored those observed in patient tissues, further validating the model for studying disease mechanisms. This model could be further applied to other synucleinopathies, including PD and DLB, to investigate the influence of specific molecular pathways on the aggregation of pathological α -synuclein in these diseases. Additionally, it provides a valuable platform for screening therapeutic agents to reduce α -synuclein aggregation, advancing potential treatments for synucleinopathies.

In conclusion, this thesis contributes to understanding proteomic alterations in PD, DLB, and MSA, offering new insights into the molecular mechanisms driving each synucleinopathy. Identifying disease-specific pathways and potential therapeutic targets provides a foundation for future research, including validation in larger cohorts and exploration of therapeutic strategies targeting inflammation and protein aggregation.

Summary (Dutch)

Neurodegeneratieve ziekten vormen een aanzienlijke uitdaging voor de wereldwijde gezondheidszorg vanwege de toenemende prevalentie, het gebrek aan effectieve behandelingen en vroege diagnostische hulpmiddelen. Synucleinopathieën, een groep aandoeningen die worden gekenmerkt door de pathologische aggregatie van α -synucleïne—een presynaptisch eiwit dat cruciaal is voor cellulaire processen—zijn uiterst complex. De drie belangrijkste synucleinopathieën—PD, DLB en MSA—delen dit kenmerk, maar vertonen verschillende ziektebeelden en ziekteverlopen. Hoewel α -synucleïne-aggregatie een centrale rol speelt, dragen aanvullende ziektespecifieke moleculaire mechanismen waarschijnlijk bij aan de heterogeniteit van deze aandoeningen.

Het karakteriseren van de proteomische veranderingen die ten grondslag liggen aan deze mechanismen, is essentieel voor het identificeren van therapeutische doelen en diagnostische markers. MS-gebaseerde proteomics biedt een krachtige, onbevooroordeelde benadering voor het analyseren van grootschalige eiwitveranderingen, waardoor essentiële eiwitten en biologische pathways kunnen worden geïdentificeerd die betrokken zijn bij de progressie van PD, DLB en MSA. Ondanks vooruitgang op dit gebied, zijn de moleculaire verschillen tussen deze aandoeningen nog onvoldoende begrepen.

Het doel van dit proefschrift is het dichten van deze kloof door systematisch de proteomen van PD, DLB en MSA te vergelijken met behulp van geavanceerde MS-technieken om gedeelde en ziektespecifieke moleculaire profielen te ontdekken, wat inzichten geeft in mogelijke therapeutische doelen. Bovendien is een gedetailleerde analyse van de DLB-cohort uitgevoerd om de proteomische kenmerken van tau en α -synucleïne bij patiënten met verhoogde tau-niveaus te onderzoeken, waarbij de overlap tussen synucleinopathieën en tauopathieën wordt benadrukt. Daarnaast is, op basis van de inzichten uit deze vergelijkende analyse, een nieuw celmodel ontwikkeld om de impact van ontsteking op pathologische α -synucleïne, afkomstig van MSA-hersensnijvlak, te onderzoeken.

Hoofdstuk 2 presenteert een uitgebreide vergelijkende proteomische analyse van PD, DLB en MSA met gebruik van postmortaal hersensnijvlak. Globale proteoomveranderingen werden geïdentificeerd door de focus te verleggen buiten α -synucleïne, waarbij zowel gemeenschappelijke ontregelde eiwitten als ziektespecifieke pathways zijn onthuld. In DLB is

een significante opregulatie van eiwitten geassocieerd met AD (tau, amyloïde- β , APOE en clusterine) waargenomen, wat de overlap tussen synucleinopathieën en tauopathieën onderstreept. In PD is er sprake van immuunsysteemontregeling, met een toename van klassieke complementeiwitten en het ontstekingsremmende eiwit ICAM5. MSA vertoonde uitgebreide proteomische veranderingen gerelateerd aan mitochondriale disfunctie en lipidenontregeling, waarbij cruciale biologische pathways zoals VDAC en SPART, betrokken zijn bij energiemetabolisme en α -synucleïne-aggregatie. Deze bevindingen bieden nieuwe inzichten in de mechanismen die α -synucleïneopathie in PD, DLB en MSA aandrijven.

Deze analyse identificeerde ook nieuwe ontregelde eiwitten, zoals de consistente downregulatie van THOP1 in alle synucleinopathieën, wat wijst op een mogelijk verlies van neuroprotectie tegen amyloïde- β -toxiciteit. De niet-uniforme expressie van apolipoeiwitten—zoals verminderde APOA1 in PD en verhoogde APOE in DLB—benadrukt de variërende betrokkenheid van lipidenmetabolisme in deze ziekten. Hoofdstuk 2 identificeerde 37 eiwitten die onderscheid kunnen maken tussen de synucleinopathieën, waarbij NAGK in MSA en INA in PD diepere inzichten geven in ziektespecifieke biologische pathways. Deze eiwitten, samen met hun bijbehorende pathways, zijn veelbelovend als therapeutische doelen en potentiële biomarkers voor het onderscheiden van synucleinopathieën.

Hoewel deze bevindingen de basis leggen voor toekomstig onderzoek, is verdere validatie noodzakelijk om de therapeutische relevantie en bruikbaarheid als biomarkers voor vroege diagnose en ziektedifferentiatie te beoordelen.

Hoofdstuk 3 bouwt voort op de bevindingen uit Hoofdstuk 2, door zich te concentreren op tau in de DLB-cohort, waar tau significant opgereguleerd bleek te zijn. Patiënten werden gestratificeerd in twee subgroepen—DLBTau⁺ (hoog tau) en DLBTau⁻ (laag tau)—op basis van massaspectrometriemetingen van de hoeveelheid onoplosbaar tau. De analyse onthulde dat DLBTau⁺ patiënten een significante opregulatie van ubiquitine-gerelateerde eiwitten vertonen, waaronder ribosomaal eiwit S27a (RPS27A), sequestosoom en ubiquitine zelf, wat wijst op een cruciale rol voor het ubiquitinatiepathway bij het samengaan van tau- en α -synucleïneopathieën. Bovendien werden eiwitten die gelinkt zijn aan dementiegerelateerde processen, zoals amyloïde- β , ook verhoogd gevonden bij DLBTau⁺ patiënten, wat de verbinding tussen tauopathie- en synucleinopathiemechanismen verder aantoont.

PTM's van tau in DLBTau+ patiënten, toonden verhoogde ubiquitinatie, acetylatie en fosforylering op specifieke locaties in vergelijking met AD tau. Dit suggereert dat DLB-patiënten met hogere tau-niveaus een unieke ziekte-entiteit kunnen vertegenwoordigen binnen het synucleinopathie-tauopathiespectrum. Deze proteomische verschillen tussen DLBTau+ en DLBTau- patiënten, benadrukken het belang van stratificatie van patiënten in klinische onderzoeken, omdat patiënten met co-pathologieën, zoals in de DLBTau+ groep, mogelijk anders reageren op therapieën die gericht zijn op tau of α -synucleïne alleen. Deze bevindingen ondersteunen de potentiële noodzaak van gepersonaliseerde behandelingsbenaderingen die rekening houden met het gelijktijdig voorkomen van tau- en α -synucleïneopathieën in DLB en andere neurodegeneratieve ziekten.

Het laatste experimentele hoofdstuk, Hoofdstuk 4, beschrijft de ontwikkeling van een nieuw celmodel voor MSA, gebaseerd op de ontdekkingen in Hoofdstuk 2. Eiwitten zoals STAT1 en STAT3, die opgereguleerd zijn in MSA-patiënten, werden doelgericht ingezet om de ontstekingsomgeving te repliceren, die werd waargenomen in MSA-hersenweefsel. Pathologische α -synucleïne werd getransfecteerd in de cellen, en na het induceren van een ontsteking, vertoonden de verergerde α -synucleïne-aggregaten verhoogde ubiquitinatie en fosforylering op S129, wat de GCIs in menselijk MSA-weefsel nabootste. Dit model maakt een gedetailleerd onderzoek mogelijk naar hoe ontsteking α -synucleïne-aggregatie versterkt en de ziekteprogressie versnelt.

De resultaten tonen aan dat ontsteking α -synucleïneopathie aanzienlijk verergert, waarbij proteomische analyse verstoringen in immuunreacties, energiemetabolisme en cytoskeletdynamiek onthulde. De door de ontsteking geïnduceerde PTMs kwamen sterk overeen met de PTMs waargenomen in patientweefsel, wat het model verder valideerde voor het bestuderen van ziektemechanismen. Dit model kan verder worden toegepast op andere synucleinopathieën, waaronder PD en DLB, om de invloed van specifieke moleculaire pathways op de aggregatie van pathologisch α -synucleïne in deze ziekten te onderzoeken. Bovendien biedt het een waardevol platform voor het screenen van therapeutische middelen om α -synucleïne-aggregatie te verminderen, wat de ontwikkeling van potentiële behandelingen voor synucleinopathieën bevordert.

Concluderend draagt dit proefschrift bij aan het begrip van proteomische veranderingen in PD, DLB en MSA, en biedt het nieuwe inzichten in de moleculaire mechanismen die elke synucleinopathie aandrijven. Het identificeren van ziektespecifieke pathways en potentiële therapeutische doelwitten biedt een basis voor toekomstig onderzoek, inclusief validatie in grotere cohorten en verkenning van therapeutische strategieën gericht op ontsteking en eiwitaggregatie.