
Rapport nr. MA 20-01 | Jennifer Mildenberger

KARAKTERISERING AV MARINT PROTEIN TIL FOREBYGGING AV NEURODEGENERATIVE SYKDOMMER

Innhold av parvalbumin i fiskemel

TITTEL	Karakterisering av marint protein til forebygging av neurodegenerative sykdommer
FORFATTERE	Jennifer Mildenberger
PROSJEKTLEDER	Jennifer Mildenberger
RAPPORT NR.	MA 20-01
SIDER	14
PROSJEKT NR.	54997
PROSJEKTTITTEL	Bruk av marint protein i forebygging av neurodegenerative sykdommer
OPPDRAGSGIVER	Norges Parkinson Forskningsfond
ANSVARLIG UTGIVER	Møreforskning Ålesund AS
ISSN	0804-5380
DISTRIBUSJON	Åpen
NØKKEWORD	Parvalbumin, Parkinson, Neurodegenerasjon, Fiskemel, Aggregater, Restråstoff, Torsk

SAMMENDRAG

Mange alders-assosierte sykdommer som Parkinsons sykdom er forbundet med akkumulering av proteinaggregater som kan skyldes nedsatt funksjon av vedlikeholdsprosesser i cellen. Alfa-synuklein (α -Syn) er et protein knyttet til utviklingen av Parkinsons sykdom ved at det danner proteinaggregater, forstyrrer cellefunksjonen og ødelegger nevronene. Gjennom biokjemiske analyser er det nylig vist at det rensede proteinet beta-parvalbumin (β -PV) fra fisk kan hemme dannelsen av α -Syn aggregater. Dette funnet er interessant i forhold til om proteinet kan bidra til å forhindre neurodegenerative sykdommer, men først må proteinets virkemekanisme bekreftes i cellekultur og i mennesker.

I dette prosjektet er innholdet av β -PV i fiskemel undersøkt. Fiskemel er en lett tilgjengelig kilde til fiskeprotein. β -PV kan detekteres i fiskemel og foreligger trolig i en delvis denaturert form, noe som skyldes fremstillingsprosessen for fiskemel. Rundt 6% av β -PV i fiskemel er antatt til å foreligge som aggregater. Videre vil det være svært interessant å undersøke om β -PV fra fiskemel og andre kilder til fiskeprotein kan ha en biologisk funksjon og dermed bidra til forebygging av Parkinsons sykdom.

© FORFATTAR/MØREFORSKING

Føresegnene i åndsverklova gjeld for materialet i denne publikasjonen. Materialet er publisert for at du skal kunne lese det på skjermen eller framstille eksemplar til privat bruk. Utan særskild avtale med forfattar/Møreforskning er all anna eksemplarframstilling og tilgjengeleggjering berre tillate så langt det har heimel i lov eller avtale med Kopinor, interesseorgan for rettshavarar til åndsverk.

INNHOLD

1. Bakgrunn	6
2. Material og metode.....	8
2.1 Prøvene.....	8
2.2 Immunoblotting.....	8
3. Resultat og diskusjon	9
3.1 β -PV i fiskemel kan detekteres med polyklonalt, men ikke monoklonalt antistoff	9
3.2 β -PV i fiskemel etter pepsin fordøyelse og som aggregater.....	10
4. Konklusjon	12
6. Referanser	13

1. BAKGRUNN

Parkinsons sykdom er en neurodegenerativ sykdom som rammer 1-2% av befolkningen over 60 år. Sykdommen innebærer at motoriske nerveceller gradvis blir svekket og utskillelsen av signalstoffet dopamin minker. Dette begrenser alle muskelbevegelser og bevegeligheten i kroppen. Skjelving, samt en svak stemme er vanlige symptomer. I dag finnes det ingen helbredende behandling og etter hvert fører sykdommen til uførhet som er en stor belastning for pasienter og samfunnet¹. Effektiv forebygging av sykdommen eller behandlinger som hemmer sykdomsutviklingen uten tunge bivirkninger vil være til stor nytte i håndteringen av Parkinsons sykdom. Med hensyn til en aldrende befolkning og økende forekomst av aldersassosierte sykdommer vil det også bli spesielt viktig å identifisere forebyggende tiltak som er tilgjengelig for de fleste i samfunnet.

Mange alders-assosierte sykdommer er forbundet med akkumulering av proteinaggregater som kan skyldes nedsatt funksjon av vedlikeholdsprosesser i cellen². Når skadde og feilfoldete proteiner ikke kan repareres blir de vanligvis fjernet. Denne egenskapen i cellene avtar derimot med aldring og kan gi opphopning av feilfoldete proteiner som bidrar til utvikling av neurodegenerative sykdommer som Parkinsons, Alzheimers og Huntingtons sykdom^{3,4}. Ved disse sykdommene hopper aggregerte proteiner seg opp i lewy-legemer i cellen og bidrar til å hindre den normale cellefunksjonen (Fig 1).

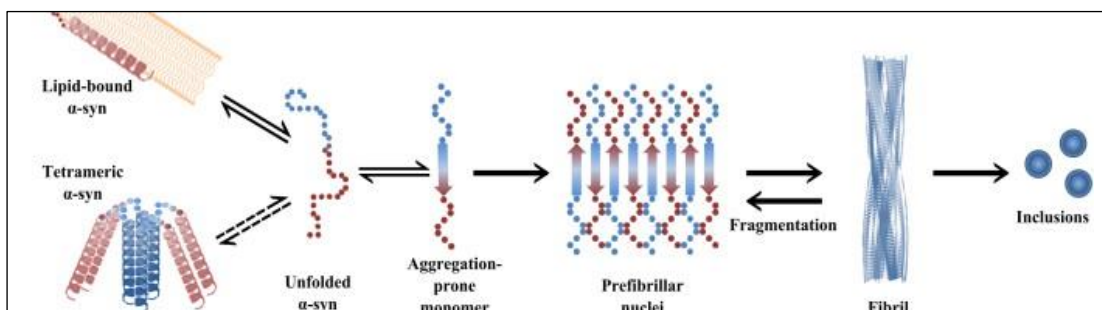


Fig1: Dannelse av alpha synuclein aggregater og lewy-legementer. Fra Cox, Carver and Ecroyd, *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Basis of Disease* 2014 vol: 1842 (9) pp: 1830-1843

Alfa-synuklein (α -Syn) er et av de hyppigst forekommende proteiner i lewy-legemer og spiller dermed en rolle i utviklingen av Parkinson sykdom⁵. α -Syn er et amyloid protein og kan danne aggregater laget av mange kopier av seg selv. Til slutt setter α -Syn aggregatene seg sammen til større fibriller. Fibriller av α -Syn forstyrrer nervesynapsene og transport av signalstoffet dopamin, og fører til ødelagte nevroner⁶. Nylig har Werner *et al.*⁷ vist at proteinet beta-parvalbumin (β -PV) fra fisk hindrer dannelsen av proteinaggregater av α -Syn *in vitro*. Dette åpner for muligheten at β -PV kan ha en preventiv effekt på utvikling av neurodegenerative sykdommer, inkludert Parkinsons.

β -PV er kanskje best kjent som årsaken til allergi mot fisk⁸. Siden også β -PV er et amyloid protein kan det danne svært stabile aggregatstrukturer på lik linje med α -Syn. Werner *et al.*⁷ har vist at β -PV aggregater fra fisk tiltrekker seg enkelte α -Syn proteiner, en mekanisme som

hindrer dannelsen av skadelige α -Syn aggregater. Man vet imidlertid ennå ikke hvilken klinisk relevans denne mekanismen har⁹. I forbindelse med studier av β -PV som allergen er det vist at β -PV kan detekteres i blodet etter inntak av fisk¹⁰ og det finnes indikasjoner på at det er den aggregerte (stabile) formen som foreligger i serum¹¹. Forsøk antyder også at β -PV kan bli transportert gjennom blod-hjerne barrieren¹² og dermed er det mulig at β -PV kan ha en funksjon i hjernen. En hypotese er at α -Syn aggregater først oppstår i endokrine celler i magen som også produserer α -Syn. Derfra kan aggregatene transporteres til hjernen via nerveceller som har direkte kontakt med cellene i magen¹³. I tillegg har det vært vist at α -Syn fibre kan transporteres og spres mellom nevronene¹⁴. Således kan man tenke seg at dannelsen av α -Syn aggregater allerede kan forebygges utenfor hjernen, avhengig av hvor i kroppen β -PV faktisk er tilgjengelig. Hvis videre forskning dokumenterer at β -PV kan forhindre dannelsen av α -Syn aggregater i mennesker, vil det være en fordel å allerede ha kartlagt gode og trygge kilder til β -PV protein. Fisk inneholder mye β -PV, men man kjenner ikke til hvor mye man vil trenge for å oppnå en eventuell effekt gjennom kosthold. Man kan tenke seg at fremstilling av næringstilskudd med oppkonsentrerte mengder av β -PV vil være relevant for preventiv eller terapeutisk bruk i aktuelle pasientgrupper. Dette vil gi en bedre kontroll på inntak av β -PV protein kontra et fiskemåltid med varierende innhold.

En fremtidig bærekraftig kilde for protein til humant konsum er restråstoff fra fiskerinæringen. I dag utnyttes slikt råstoff i liten grad, til tross for ernæringsmessige gode egenskaper på linje med for eksempel egg, melk og kjøtt. Restråstoff og avskjær fra denne industrien omdannes blant annet til proteinrikt fiskemel. Norge produserer fiskemel av høy kvalitet fra ett bærekraftig og godt forvaltet fiskeri. Fiskemel fra torsk, sei og hyse er også godkjent for humant konsum og er allerede et produkt med høy proteinkonsentrasjon sammenlignet med ren fiskefilet. Fiskemel produseres ved høy temperatur gjennom koke-, presse- og tørkeprosesser. β -PV aggregater er imidlertid robuste proteiner som ikke ødelegges av varmebehandling, pH eller enzymatisk nedbrytning. En studie viser at β -PV er relativt varmestabilt ved temperaturer opp mot 140°C, men mister noe av sin opprinnelige konformasjon lineært med stigende temperatur¹⁵. I en annen studie ble det vist at oppvarming til 95°C endrer antistoffgjenkjennelse av protein fra noen fiskearter men generelt kan β -PV og dimerer av β -PV fortsatt detekteres etter oppvarming¹⁶. Dannelsen av dimerer gjør noen typer parvalbumin resistente mot degradering under fordøyelsen, og er årsaken til en sterk allergen virkning¹⁷. β -PV fra forskjellige fiskearter oppfører seg ulikt ved prosessering, og det er ikke kjent om β -PV i fiskemel er intakt.

Potensialet for verdiskaping og bedre utnyttelse av marint protein fra fiskemel er stort og kan være en kilde til preventive eller terapeutiske næringstilskudd. En bedre dokumentasjon av positive eller negative effekter av fiskemelprotein vil også kunne bidra til økt verdiskaping fra havets ressurser og bli en viktig katalysator og motivasjonsfaktor for bedre utnyttelse av marint restråstoff.

Målet med dette prosjektet er å undersøke om fiskemel fra hvitfisk kan utnyttes som en lett tilgjengelig og interessant kilde til β -PV.

2. MATERIAL OG METODE

2.1 PRØVENE

Fiskemel fra torsk (2016, fryselagret) fra tråleren Granit ble brukt. Fiskemelet er godkjent til humant konsum. Fersk torskfilet (sjøfrosset, Ramoen) ble brukt som kontroll.

2.2 IMMUNOBLOTTING

Fiskemelet ble siktet gjennom et 250µm sikt for å fjerne beinrester. Fersk torskfilet ble kuttet i små biter og homogenisert. Fiskemel (100mg/ml) eller torskfilet (200mg/ml) ble løst i vann, Triton-X lysisbuffer (TX) (1.25% Triton X-100, 0.05M Tris-HCl, 0.15M NaCl, 0.001M EDTA, 1x proteinasehemmer (SRE0055)) eller 8M Urea buffer (8 M urea, 0.5% Triton X-100, 100mM DTT). Prøvene ble ristet på 4°C i 30min og sentrifugert for å fjerne uløselige rester (2000 g, 10min). Forskjellen i detergentresistens kan utnyttes til å skille monomert β-PV i en løselig fraksjon (TX) og aggregert β-PV i en uløselig fraksjon (8M Urea) av fiskemelet. For å separere aggregert β-PV ble TX fraksjonen sentrifugert ved 10.000 g i 10 minutter og pelleten løst i 8M Urea.

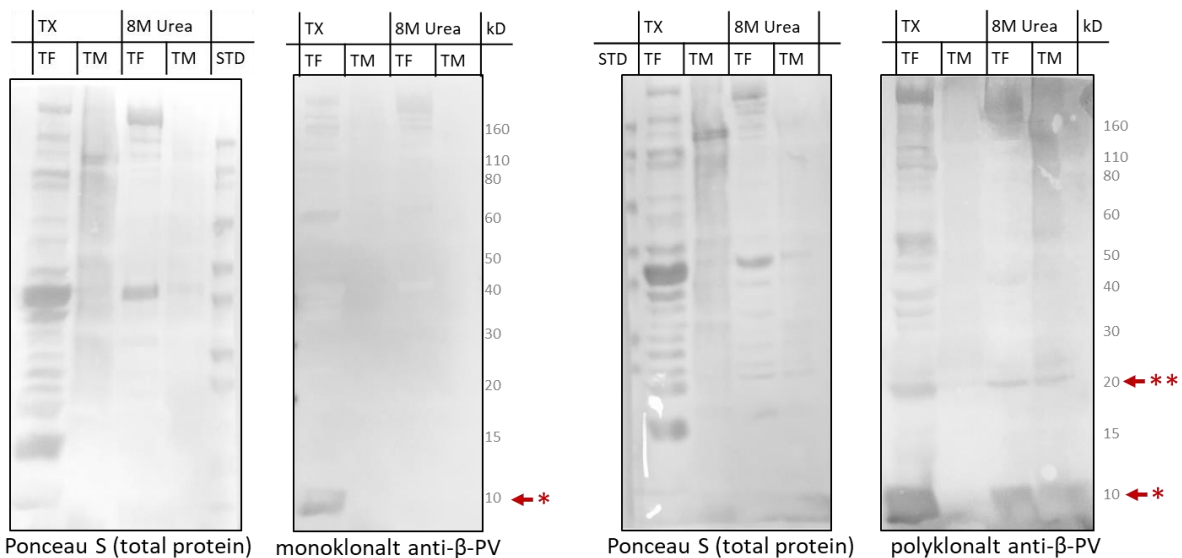
Til simulert fordøyelse med pepsin ble 100mg fiskemel eller 200mg torskfilet løst i 0,5ml «simulated saliva fluid» og blandet 1:1 med 0,5ml «simulated saliva fluid» (Infogest¹⁸) og justert til pH 3 før tilsetning av pepsin (Sigma-Aldrich, P7012, 2000U/ml). Prøvene ble så inkubert ved 37°C i 60min. Proteinase-hemmere (SRE0055) ble tilsatt for å stoppe reaksjonen og prøvene ble frosset og oppbevart ved -20°C inntil videre analyse.

Proteinkonsentrasjonen ble målt ved hjelp av BCA protein assay (Sigma-Aldrich, BCA1) i henhold til produktinstruksjonen. Det var ikke mulig å måle proteinkonsentrasjonen for prøvene løst i 8M Urea buffer pga. for høy bakgrunn. 40µg protein ble så separert på 4-20% ClearPAGE™ gradientgeler (VWR 10098-698) og overført på nitrocellulose membraner på DCX-700 elektroforese systemet. MagicMark™ XP og/eller Novex™ Sharp (Thermo Fisher Scientific) ble brukt som protein standard. Membranen ble farget i Ponceau fargeløsning (0.1%(w/v) Ponceau S (Sigma-Aldrich) i 5%(v/v) eddiksyre), skylt i dH₂O og fotografert for å vurdere den totale proteinmengden. Membranen ble så blokkert i 3% BSA i PBST (PBS med 0,01% Tween-20) og inkubert med 1:1000 monoklonalt anti-β PV antistoff (Sigma-Aldrich, MAB1572) eller polyklonalt anti-β PV antistoff (gave fra C. Fæste/ Veterinærinstituttet, Oslo) overnatt ved 4°C. Membranen ble vasket i PBST og inkubert med anti-mus eller anti-kanin HRP-antistoff og fremkalt med Pierce™ CN/DAB Substrate Kit (Thermo Fisher Scientific 34000).

3. RESULTAT OG DISKUSJON

3.1 β -PV I FISKEMEL KAN DETEKTERES MED POLYKLONALT, MEN IKKE MONOKLONALT ANTISTOFF

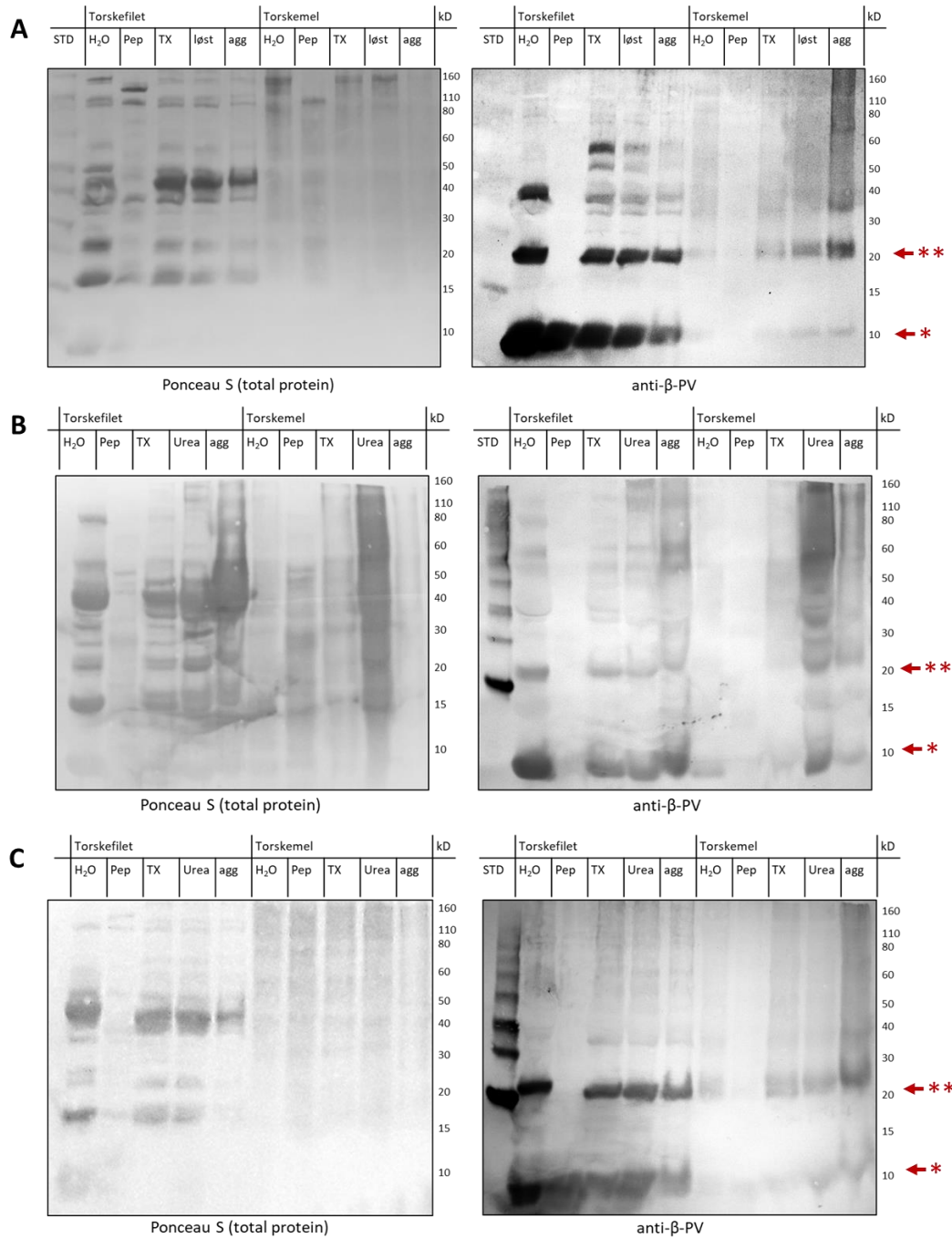
Deteksjon av β -PV i torskemel og fersk torskfilet som kontroll ble testet med et kommersielt tilgjengelig monoklonalt β -PV antistoff og et polyklonalt β -PV antistoff (gave fra C. Fæste/Veterinærinstituttet, Oslo). Prøvene ble løst i TX buffer eller 8M Urea buffer for å se om bufferne har forskjellig evne til å gjøre β -PV tilgjengelig for deteksjon. Monoklonale antistoffer består bare av antistoff som gjenkjenner nøyaktig samme delen av proteinet, mens polyklonale antistoffer består av flere antistoffer som alle er rettet mot det samme proteinet, men som kan gjenkjenne litt ulike deler av proteinet. Dette fører til at monoklonale antistoffer er veldig spesifikke, mens polyklonale antistoffer er bedre egnet til å detektere denaturert protein. Det har tidligere vært publisert at β -PV ikke lenger kunne detekteres av det monoklonale antistoffet etter varmebehandling (100°C i 20 min eller 140°C i 5 min). Det samme inntreffer for fiskemel, hvor β -PV bare kunne detekteres av det polyklonale β -PV antistoffet (Fig.2). I tillegg gjenkjenner det polyklonale β -PV antistoffet også et bånd ved 20kD, som er den dobbelte størrelsen til β -PV. Disse båndene antas å være dimerer av β -PV. Det ser videre ut som 8M Urea fører til bedre deteksjon av β -PV fra fiskemel. β -PV løst i 8M Urea kan ikke detekteres av det monoklonale β -PV antistoffet.



Figur 2. β -PV detektert med monoklonalt eller polyklonalt anti- β -PV antistoff i torskfilet (TF) eller torskemel (TM). 40 μ g lysat i TX buffer eller 8M Urea buffer ble separert på en 4-20% gel og farget med Ponceau S og deretter monoklonalt eller polyklonalt antistoff mot β -PV, (STD = proteinstandart). Polyklonalt anti- β -PV antistoff gjenkjenner β -PV som monomer (*) og dimer (**) i både torskfilet og torskemel.

3.2 B-PV I FISKEMEL ETTER PEPSIN FORDØYELSE OG SOM AGGREGATER

Deteksjonen av β -PV i fiskemel med polyklonalt antistoff ble gjentatt i tre uavhengige forsøk (Fig.3 A-C) og det ble bekreftet at β -PV kan detekteres i fiskemel. Det er vanskelig å sammenligne innholdet av β -PV i ferskt filet og mel på grunn av ulik sammensetning, prosessering (ikke varmebehandlet filet) og ulik løselighet. Ubehandlet filet ble brukt som best mulig positiv kontroll.



Figur 3. β -PV detektert med polyklonalt anti- β -PV antistoff i torskefilet (TF) eller torskemel (TM). Prøvene ble fordøyet med pepsin (Pep) eller løst i TX buffer (TX), sentrifugert og pelleten løst i 8M Urea buffer (agg, 100x konsentrert), (løst = løselig del uten aggregater). Tre uavhengige forsøk er vist (A-C). β -PV som monomer (*) og dimer (**) i både torskefilet og torskemel.

Det ble videre testet om β -PV foreligger som aggregater gjennom motstand mot enzymatisk fordøyelse og løseligheten i ulike detergenter (Fig.3 A-C).

Det ble testet om β -PV i fiskemel kan fordøyas med pepsin (pep), fordøyelsesenzymet i magen som klipper opp proteinene vi spiser. Det har blitt vist tidligere at β -PV aggregater overlever fordøyelsen¹¹. I forsøk A og C (Fig.3) er det en del monomert β -PV fra torskefilet igjen etter pepsinfordøyelse, mens di- eller trimert β -PV forsvinner. I forsøk B ble også mesteparten av monomert β -PV fordøyet. I torskemel blir nok β -PV fordøyet med pepsin til det ikke lenger eller bare så vidt kan detekteres. Generelt blir en god del av β -PV, både i torskefilet og torskemel fordøyet av pepsin, noe som tyder på at majoriteten av β -PV i torskefilet og torskemel ikke foreligger som fordøyelses-resistente aggregater.

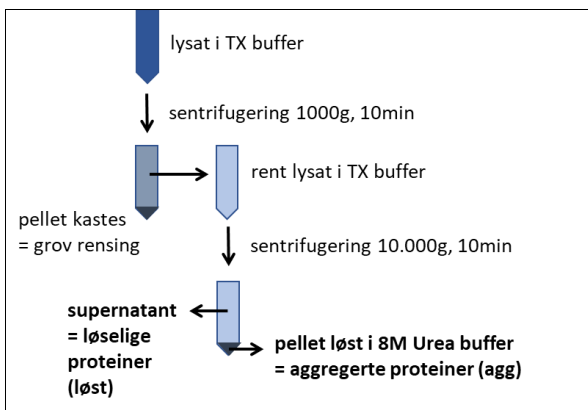
For å se nærmere på fordelingen mellom løselig og aggregert β -PV, ble prøvene løst i TX buffer. De ikke-løselige, aggregerte proteinene ble sentrifugert ned og løst i Urea buffer (agg), mens supernatanten inneholder bare den løselige fraksjonen av β -PV (løst) (Fig.4).

β -PV kan detekteres i den uløselige aggregatfraksjonen. Samtidig er det ingen synlig forskjell mellom den fullstendige (TX) og den bare løselige delen (løst) (Fig.3 A). Hvis en kvantifiserer signalstyrken i forsøkene A-C (Fig.3) og regner på forholdet mellom β -PV i

den løselige og uløselige fraksjonen med hensyn til ulik konsentrasjon, så foreligger $1,6 \pm 1,1\%$ av β -PV i torskefilet og $6,4 \pm 1,2\%$ av β -PV i torskemel som TX uløselige aggregater. β -PV aggregater i torskemel kan muligens ha oppstått under prosesseringen (varmebehandling).

Kubota et al. viser at β -PV fort mister sin opprinnelige form ved varmebehandling, noe som fører til minkende deteksjon med et monoklonalt β -PV antistoff og mindre allergisk reaktivitet mot IgE, mens proteinet fortsatt er tilstede og kan gjenkjennes av et polyklonalt antistoff¹⁵. De viser også at varmebehandlet β -PV mister evnen til å binde kalsium. På den andre siden er det kalsium-fattig β -PV som Werner et al. finner til å være i stand å danne aggregater og hemme aggregat dannelsen av α -Syn.

Dermed vil det være veldig spennende å undersøke om β -PV og β -PV aggregater fra fiskemel kan ha en biologisk funksjon ved å hemme dannelsen av α -Syn aggregater og dermed være til nytte i forebygging av Parkinsons sykdom.



Figur 4. Skjema for bruk av ulik detergent løselighet og sentrifugering for å skille aggregerte fra løselige proteiner.

4. KONKLUSJON

I prosjektet har fiskemel fra torsk blitt undersøkt som en lett tilgjengelig og interessant kilde til β -PV. β -PV kan detekteres i en vannløselig fraksjon av fiskemel til tross for høy varme under produksjonsprosessen. En god del av β -PV ser ut til å foreligge som aggregater. Større aggregater kan sedimenteres ved sentrifugering. I videre arbeid vil det være interessant å sammenligne flere kilder av fiskeråstoff og isolere fraksjoner med høyt innhold av β -PV. Det vil være viktig å undersøke β -PV fra fiskemel med hensyn på en eventuell biologisk funksjon i cellemodeller. Dette for å kunne vurdere en mulig funksjon i kroppen og i forebygging av Parkinsons sykdom.

6. REFERANSER

1. Beitz. Parkinson's disease: a review. *Front. Biosci.* **6**, 65–74 (2014).
2. Goldberg. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* **426**, 895–899 (2003).
3. Yamamoto & Simonsen. The elimination of accumulated and aggregated proteins: A role for autophagy in neurodegeneration. *Neurobiology of Disease* **43**, 17–28 (2011).
4. Kopito. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends in Cell Biology* **10**, 524–530 (2000).
5. Wan & Chung. The role of alpha-synuclein oligomerization and aggregation in cellular and animal models of Parkinson's disease. *PLoS One* **7**, e38545 (2012).
6. Nemani *et al.* Increased Expression of α -Synuclein Reduces Neurotransmitter Release by Inhibiting Synaptic Vesicle Reclustering after Endocytosis. *Neuron* **65**, 66–79 (2010).
7. Werner *et al.* Abundant fish protein inhibits α -synuclein amyloid formation. *Sci. Rep.* **8**, 5465 (2018).
8. Kuehn *et al.* Fish allergens at a glance: Variable allergenicity of parvalbumins, the major fish allergens. *Frontiers in Immunology* **5**, (2014).
9. Worth & Bodell. Eating fish could prevent Parkinson's disease. *chalmers.se* (2018). Available at: <https://www.chalmers.se/en/departments/bio/news/Pages/Eating-fish-could-prevent-Parkinsons-disease.aspx>. (Accessed: 21st August 2018)
10. Scheers *et al.* Vitamin B12 as a potential compliance marker for fish intake. *Eur. J. Nutr.* **53**, 1327–1333 (2014).
11. Martínez *et al.* Fish β -parvalbumin acquires allergenic properties by amyloid assembly. *Swiss Med. Wkly.* **145**, (2015).
12. Rodriguez *et al.* Import and export of misfolded α -synuclein. *Frontiers in Neuroscience* **12**, 344 (2018).
13. Chandra *et al.* α -Synuclein in gut endocrine cells and its implications for Parkinson's disease. *JCI Insight* **2**, (2017).
14. Luk *et al.* Pathological α -synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science (80-.)*. **338**, 949–953 (2012).
15. Kubota *et al.* Reduction in IgE reactivity of Pacific mackerel parvalbumin by heat treatment. *Food Chem.* **206**, 78–84 (2016).
16. Saptarshi *et al.* Antibody reactivity to the major fish allergen parvalbumin is determined by isoforms and impact of thermal processing. *Food Chem.* **148**, 321–328 (2014).
17. Griesmeier *et al.* Physicochemical properties and thermal stability of Lep w 1, the major allergen of whiff. *Mol Nutr Food Res* **54**, 861–869 (2010).
18. Minekus *et al.* A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct. Food Funct* **5**, 1113–1124 (2014).



MØREFORSKING AS
Postboks 5075
6021 Ålesund
TEL +47 70 11 16 00
www.moreforsk.no
NO 991 436 502