

Molecular Mechanism of Neurodegeneration in Molybdenum Cofactor Deficiency

Abstract

Molybdenum cofactor deficiency (MoCD) and sulfite oxidase (SO) deficiency (SOD) are rare inherited metabolic disorders characterized by a massive and progressive neurological damage leading to death in the neonatal period. Typical MoCD and SOD symptoms are manifested mainly due to the loss of SO activity, which is crucial in detoxifying endogenously generated sulfite into sulfate. At biochemical level, sulfite, S-sulfocysteine (SSC), thiosulfate, and taurine are accumulated in both diseases, while cystine and sulfate levels are below normal range. Until today, the molecular mechanism underlying the neuropathology and neurodegeneration in MoCD is poorly understood.

In this study we first investigated the toxicity of different deregulated metabolites of cysteine catabolism, which are substantially altered under MoCD and SOD. Among all the tested metabolites, sulfite and SSC demonstrated a strong toxicity in cultured murine cortical neurons, while in non-neuronal cells only sulfite induced toxicity. Furthermore, SSC toxicity was prevented when a specific N-methyl D-aspartate receptor (NMDAR) blocker was used, confirming that SSC toxicity is specific and mimics glutamate toxicity due to structural similarity. NMDAR-mediated Ca^{2+} overload in SSC-mediated neurotoxicity was shown using Ca^{2+} -chelators. Since Ca^{2+} is known to influence many cellular processes, we focused on calcium-dependent downstream processes. Amongst those, Ca^{2+} -dependent calpain-1 was found to degrade gephyrin, the major inhibitory postsynaptic scaffold protein. A loss of gephyrin directly impacts GABAergic synapses by reduced GABAR clustering, suggesting a severely altered balance between excitation (increased by SSC) and inhibition (decreased by SSC-mediated gephyrin cleavage) in MoCD/SOD patients. As a proof of concept, pharmacological blockade of NMDAR, calcium influx, and calpain activity abolished SSC-neurotoxicity in primary neurons. Morphologically we found that SSC induces neurite degeneration before neuronal cell death and that calpain cleavage of collapsing-mediated response protein 2 (CRMP-2) plays an important role in this process. CRMP-2 overexpression in neurons significantly reduced neurite degeneration suggesting that CRMP-2 is required to protect the neurons against SSC-mediated neurite degeneration. As further Ca-induced downstream pathways we identified caspase-dependent and independent apoptotic pathways as well as oxidative stress as mediators of SSC-induced neurotoxicity.

In order to investigate the *in vivo* relevance of the above identified pathways in neurodegeneration, MoCD was induced in mice by oral administration of tungstate. We demonstrated the accumulation of SSC, besides excretion in urine, in the brain of tungstate-treated mice for the first time. Calpain-mediated cleavage of gephyrin was also shown in the brain extracts of tungstate-treated mice, and histological studies revealed massive neuronal loss in the brain of these mice. Moreover, the administration of NMDAR antagonist memantine reduced the observed loss of body weight in MoCD mice and improved the motor performance

of tungstate-treated animals, providing a proof of concept for the key role of the NMDAR-dependent downstream pathways identified in this study.

Zusammenfassung

Molybdän-Cofaktor-Defizienz (MoCD) und SO-Defizienz (SOD) sind seltene, erbliche Stoffwechselkrankheiten, welche durch einen massiven und fortschreitenden neuronalen Verfall in der neonatalen Phase charakterisiert sind. Typische Symptome von MoCD/SOD werden hauptsächlich durch den Verlust der SO Aktivität hervorgerufen, die für eine Entgiftung von endogen entstehendem Sulfit zu Sulfat notwendig ist. Auf biochemischer Ebene sind Sulfit, Thiosulfat, S-Sulfocystein (SSC) und Taurin in beiden Krankheiten akkumuliert, während die Mengen an Sulfat und Cystein unterhalb der normalen Grenzen liegen. Der Mechanismus, der der Neuropathologie und des neuronalen Verfalls zu Grunde liegt, ist bis heute nicht umfassend bekannt.

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit zuerst die Toxizität verschiedener deregulierter Metaboliten des Cystein-Katabolismus untersucht, welcher im Falle von MoCD/SOD wesentlich verändert ist. Von allen getesteten Metaboliten zeigten SSC und Sulfit bei kortikalen Neuronen aus Mäusen die stärkste Toxizität, während in nichtkortikalen Zellen nur Sulfit einen toxischen Effekt hatte. Des Weiteren konnte die Toxizität von SSC durch einen spezifischen Inhibitor des N-Methyl D-Aspartat Rezeptors (NMDAR) unterbunden werden. Dies bestätigt, dass die Toxizität von SSC spezifisch ist und einer Glutamat-Toxizität entspricht, da SSC diesem strukturell ähnelt. Eine Rolle von NMDA-R-vermitteltem Ca^{2+} -Überschuss in der durch SSC hervorgerufenen neuronalen Toxizität wurde durch den Einsatz von Ca^{2+} -Chelator-Inhibitoren gezeigt. Es ist bekannt das Ca^{2+} viele zelluläre Prozesse beeinflusst, weswegen sich diese Arbeit auf Ca^{2+} -abhängige Prozesse fokussiert. Es konnte gezeigt werden, dass das – abhängige Protein Calpain das neuronale Strukturprotein Gephyrin spaltet. Daraufhin konnte demonstriert werden, dass die durch SSC hervorgerufene Excitotoxizität durch den Calpain-abhängigen Abbau des inhibitorischen, postsynaptischen Proteins Gephyrin weiter verschlimmert wurde. Dies führt möglicherweise zu einem Verlust von GABAergen Synapsen und einer fehlerhaften Komplexierung von GABAR, wodurch es naheliegt dass den schwer zu kontrollierenden Krämpfen von MoCD/SOD Patienten eine signifikant verändert inhibitorische Signalgebung zugrunde liegt. Die pharmakologische Blockade von NMDAR, von Calcium-Einstrom und von Calpain-Aktivität hob die Neurotoxizität von SSC in primären Neurone auf.

Es konnte zudem gezeigt werden, dass SSC eine Degeneration der Neurite induziert bevor es zum neuronalen Zelltod kommt und dass die Spaltung von collapsing-mediated response protein 2 (CRMP 2) durch Calpain eine wichtige Rolle bei der Neurit-Degeneration spielt, da eine CRMP 2-Überexpression in Neuronen die Neurit-Degeneration signifikant reduzierte. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl unabhängig aktivierte Caspase-abhängige und - unabhängige apoptotische Stoffwechselwege zur Neurotoxizität von SSC beitragen, als auch oxidativer Stress.

Um den in vivo Mechanismus der Neurodegeneration zu untersuchen wurde abschließend MoCD in Mäusen durch die orale Verabreichung von 8000 ppm Wolframat hervorgerufen. Es konnte so erstmalig eine Akkumulation von SSC in den Gehirnen von mit Wolframat behandelten Mäusen gezeigt werden, trotz der Ausscheidung von SSC über Urin. Die durch Calpain hervorgerufene Proteolyse von Gephyrin konnte ebenfalls in den Gehirnextrakten der mit Wolframat behandelten Mäuse gezeigt werden, deren Gehirne in histologischen Untersuchungen einen massiven Verlust von Neuronen aufwiesen. Des Weiteren konnte der Verlust von Körpergewicht der mit Wolframat behandelten Mäuse durch die Verabreichung des NMDAR-Antagonisten Memantin reduziert werden und deren Leistung im Rotarod-Test verbessert werden.