



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Intricacies of alpha-synuclein aggregation

Mucibabic, M.

Citation

Mucibabic, M. (2016, December 14). *Intricacies of alpha-synuclein aggregation*. *Casimir PhD Series*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/44785>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/44785>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/44785> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Mucibabic, M.

Title: Intricacies of alpha-synuclein aggregation

Issue Date: 2016-12-14

Samenvatting

Neurodegeneratieve ziekten zoals Alzheimer, Parkinson, Huntington, en de prion ziekten gaan gepaard met de aggregatie van amyloïde-vormende eiwitten wat leidt tot het afsterven van aangetaste neuronen in de hersenen. Recente inzichten wijzen op een belangrijke rol voor met name die aggregaten (oligomeren) welke worden gevormd in een vroeg stadium van oligomerisatie. Echter, de moleculaire architectuur en de plasticiteit van deze vroeg-gevormde aggregaten, de dynamiek van eiwitaggregatie in dit stadium, en de gedetailleerde mechanismen waardoor deze aggregaten celschade veroorzaken zijn tot dusver een mysterie. Verondersteld wordt dat dergelijke oligomeren leiden tot verstoring of tot permeabiliteit door porievorming (analoog aan bacteriële porievormende toxinen) van cellulaire membranen, wat leidt tot verstoring van calciumregulatie en celdood. Om deze redenen zijn de eigenschappen van amyloïde vormende eiwitten en de onderliggende mechanismen onderwerp van intensief onderzoek. In dit proefschrift wordt verslag gedaan van een onderzoek naar de vroege stadia van α -synucleïne (α -syn) aggregatie *in vitro*, het eiwit dat kenmerkend is voor de ziekte van Parkinson.

Aggregatie van α -syn wordt veelal onderzocht door de fluorescentie intensiteit te meten van Thioflavine T (ThT) dat aan de eiwitoplossing wordt toegevoegd. Dit is een kleurstof die specifiek bindt aan eiwitstructuren die bestaan uit β -sheets, wat leidt tot een sterke fluorescentietoename van ThT. Een typische aggregatiecurve heeft een sigmoïdale vorm waarin drie fasen zijn te onderscheiden: nucleatie of kiemvorming (aanlooptijd), groei (exponentiële fase) en verzadiging (plateau fase). De fase waarin kiemvorming optreedt wordt gevolgd door de groeifase die gepaard gaat met een exponentiële toename van de fluorescentie van ThT doordat de lengte van de fibrillen toeneemt en door secundaire kiemvorming. In de verzadigde fase bereikt de ThT fluorescentie een plateau omdat een evenwicht wordt bereikt in de reactie van α -syn monomeren met de uiteinden van de fibrillen. De tijdschaal voor de primaire nucleatie van α -syn aggregatie is zeer variabel, en dit is een proces dat nog steeds niet goed wordt begrepen. Onze kennis van het mechanisme van α -syn aggregatie, de snelheidsbeperkende stappen, en de rol en de aard van de tussenproducten is zeer onvolledig. De aanlooptijd, die geassocieerd is met primaire nucleatie, kan grotendeels worden geëlimineerd door vooraf gevormde fibrillen (zaden) aan de eiwitoplossing toe te

voegen. Dit biedt de mogelijkheid om specifiek de lengtetoeename van α -syn fibrillen te meten in de loop van de tijd.

In dit project hebben we ons gericht op de vorming van α -syn aggregaten in een vroeg stadium van het aggregatieproces. Modificaties van het eiwit, waaronder mutaties, inkorting, en fosforylatie, en interacties met metaalionen en andere cellulaire componenten beïnvloeden het (vrije) energielandschap van aggregatie. α -Syn heeft in oplossing geen specifieke secundaire of tertiaire structuur, en deze structurele flexibiliteit speelt ongetwijfeld een cruciale rol bij de eerste stappen van aggregatie, en is bepalend voor de structuur van de gevormde oligomeren en de interactie met membranen en andere cellulaire componenten.

Naast de ThT fluorescentie bepaling hebben we ook gebruik gemaakt van fluorescente labeling technieken om α -syn aggregatie bestuderen. Fluorescente labeling van biomoleculen maakt het vaak mogelijk om gedetailleerde waarnemingen te verrichten met hoge gevoeligheid van hun specifieke kenmerken en van hun rol en functie, zowel *in vitro* als *in vivo*. In principe kan fluorescente labeling van α -syn een zeer effectieve methode zijn om niet alleen het begin van eiwit aggregatie te volgen *in vitro*, bijvoorbeeld door “single-molecule” technieken toe te passen, maar ook de rol en het effect van het aggregatieproces in levende cellen. Deze benadering vereist specifiek aanpassingen van het eiwit, onder andere door het vervangen van één van de residuen van α -syn met cysteïne zodat maleïmide gefunctionaliseerde kleurstoffen kunnen worden gebruikt voor het labelen. Voorwaarde is dat de functionaliteit en de intrinsieke eigenschappen van α -syn na labeling met een fluorescente probe niet worden aangetast. De binding met de kleurstof zou met name de vorming van α -syn aggregaten kunnen beïnvloeden.

In **Hoofdstuk 2** worden de effecten beschreven van fluorescerende probes op de morfologie van α -syn aggregaten zoals waargenomen door middel van atomaire krachtmicroscopie. De kenmerken van hoogte, lengte en draaiing rond de lengte-as van de α -syn fibrillen werden gemeten als functie van de fractie van gelabeld eiwit in de oplossing van α -syn monomeren waarmee het experiment aanving. De effecten die verschillende fluoroforen teweegbrachten werden met elkaar vergeleken. In alle gevallen was hun effect op de morfologie van de α -syn fibrillen niet significant verschillend, alhoewel de lading van de fluoroforen en hun chemische structuur aanzienlijk variëerden. Een verhoging van de fractie van gelabeld α -syn in oplossing leidde tot steeds kortere fibrillen in vergelijking met die welke werden gevormd

met alleen wild type (WT) α -syn, terwijl de hoogte van de fibrillen onveranderd bleef. Dit effect wordt toegeschreven aan een verandering van de reactiviteit van de fibrillen, waarschijnlijk veroorzaakt door een verminderde affiniteit van gelabelde α -syn monomeren voor binding aan het uiteinde van de α -syn fibrillen. De draaiing van de fibrillen rond de lengte-as, zowel voor WT α -syn als voor de A140C α -syn mutant, werd niet waargenomen in het geval dat het eiwit voor 100% was gelabeld.

De in dit onderzoek verkregen resultaten bevestigen dat binding van fluorescente kleurstoffen een uitgesproken effect heeft op de morfologie van α syn aggregaten. Labeling van de C-terminus - zoals hier uitgevoerd – is waarschijnlijk minimaal storend, maar onze resultaten laten zien dat zelfs in dit geval ernstig rekening moet worden gehouden met een beperkte toepasbaarheid van fluorescente labelingtechnieken in de studie van α -syn aggregatie, zowel *in vivo* als *in vitro*. Alleen bij lage fracties van gelabeld α syn is het effect daarvan op de morfologie van de aggregaten verwaarloosbaar. Deze beperking is onder andere relevant voor de toepassing van superresolutiemethoden voor fluorescentie microscopie van α syn aggregaten vanwege de hoge label-dichtheden die nodig zijn om afbeeldingen met een hoge resolutie te kunnen reconstrueren.

Alhoewel α -syn monomeren en uitgegroeide fibrillen in toenemend detail worden beschreven in de literatuur vormen de aard, de eigenschappen, en het ontstaan van oligomere tussenvormen nog steeds een mysterie. Het is bekend dat juist deze oplosbare, oligomere tussenvormen van α -syn het meest toxisch zijn voor neuronale cellen. In **hoofdstuk 3** documenteren we de beginfase van α -syn aggregatie met behulp van gel-elektroforese, massa-spectrometrie en fluorescentie correlatie spectroscopie (FCS). Hierbij ontdekten we de vorming van stabiele dimeren en tetrameren van α -syn door gebruik te maken van hooggevoelige fluorescentie detectie van gelabelde α -syn componenten in de gel. De aanwezigheid en de stoichiometrie van deze vroege multimeren werden bevestigd door FCS en massaspectrometrie (MS). Bovendien konden de vorming van deze multimeren en het concentratieverloop in de tijd worden gemeten. Het tijdsprofiel van dit verloop suggereert een sequentieel proces, zeker in het geval van WT, waarbij eerst de dimeren worden gevormd en daarna de tetrameren. Blijkbaar zijn de dimeren een precursor voor de vorming van de tetrameren. We concluderen verder uit deze tijdprofielen dat de dimeren en tetrameren worden opgenomen in - of zelfs leiden tot de vorming van - grotere oligomeren en fibrillen.

Als deze multimeren inderdaad precursors zijn in het dominante pad in de vorming van α -syn fibrillen, dan is dimeervorming zeker de snelheidsbepalende stap in dit proces.

De informatie over de groeifase van α -syn fibrillen in de literatuur is nog onvolledig, met name wat betreft het effect van de pH en de zoutconcentratie van de oplossing. In **Hoofdstuk 4** worden daarom resultaten beschreven van het effect van pH en ionsterkte op de groei en ontwikkeling van α -syn fibrillen met behulp van de ThT fluorescentie assay. De reactiesnelheden werden geanalyseerd in termen van een kinetisch model. De snelheid van de lengtetoeename van voorgevormde α -syn fibrillen werd gemeten als functie, respectievelijk, van de pH en de zoutconcentratie. De reactiesnelheden blijken aanzienlijk af te wijken van vergelijkbare metingen in de nucleatiefase, wat suggereert dat de mechanismen voor α -syn nucleatie en de lengtetoeename van fibrillen verschillend zijn. Een verklaring kan zijn dat de α -syn fibrillen worden gestabiliseerd door een verandering van de eiwitconformatie nadat het desbetreffende α -syn molecuul zich heeft gehecht aan het uiteinde van de fibril, waarbij dit α -syn molecuul zich aanpast aan de structurele mal van de fibril. Een dergelijke conformatieverandering kan leiden tot een andere reactiviteit voor binding van α -syn monomeren aan het fibril uiteinde dan voor primaire nucleatie. Anders gezegd, de binding van een α -syn monomeer aan het fibril uiteinde betreft een andere moleculaire conformatie dan die welke kiemvorming bevordert.

Hoofdstuk 5 is gericht op het verloop van de lengtetoeename van voorgevormde α -syn fibrillen, gemeten met behulp van totale interne reflectie fluorescentiemicroscopie. Uit de lengteverdeling van de fibrillen en de gemiddelde snelheid waarmee de lengte toeneemt in de tijd kan worden geconcludeerd dat dit proces een discontinu verloop kent. Deze waarneming werd bevestigd door metingen aan individuele fibrillen die afwisselende periodes lieten zien waarin de groei stopte. Bovendien tonen onze resultaten aan dat de toename van de gemiddelde lengte van de fibrillen vertraagde in de tijd, ondanks de aanwezigheid van voldoende α -syn monomeren in de oplossing. Een redelijke aanname is dat de fibrillen in lengte toenemen door de binding van een α -syn molecuul in een min of meer specifieke conformatie. Het discontinue verloop van dit proces betekent vermoedelijk dat α -syn monomeren kunnen binden in een niet-passende conformatie, waardoor verdere groei tijdelijk of zelfs permanent wordt geblokkeerd. De mogelijkheid voor groei wordt hersteld als het niet-passende eiwit dissocieert of alsnog de juiste conformatie aanneemt.

In **hoofdstuk 6** wordt de invloed onderzocht van een substraatoppervlak op α -syn aggregatie waarvan het tijdverloop werd gevolgd middels twee-kleuren totale interne reflectie fluorescentiemicroscopie (TIRF). De effecten van de interactie van α -syn met het oppervlak op het aggregatieproces zijn belangrijk om een mogelijk functionele of pathologische rol te kunnen vaststellen. Onze resultaten tonen aan dat α -syn aggregaten meerdere vormen kunnen aannemen, afhankelijk van het soort oppervlak. Op negatief geladen, glazen oppervlakken werd de vorming waargenomen op een tijdschaal van uren van grote, driedimensionale structuren, bestaande uit micrometer-lange α -syn fibrillen. Op een oppervlak bestaande uit een lipide-dubbellaag en in oplossing zagen we alleen de groei van lineaire amyloïde fibrillen. Opmerkelijk is dat deze structuren zich kunnen vormen op een tijdschaal van uren, veel korter dan gewoonlijk wordt geassocieerd met de pathologie van de ziekte van Parkinson. Deze bevindingen suggereren een significant effect van oppervlakeigenschappen op de groei en morfologie van α -syn aggregaten.

Op basis van onze conclusies en de laatste ontwikkelingen in het veld kunnen enkele vooruitzichten voor toekomstige onderzoek als volgt worden geschetst:

- De fysiologische relevantie van relatief kleine α -syn oligomeren, waaronder dimeren en tetrameren, voor het begrijpen van het mechanisme van de ziekte van Parkinson is hoog. Het mechanisme van hun cytotoxiciteit is een belangrijk thema voor verder onderzoek.
- Veroudering gaat gepaard met een verandering in de samenstelling van celmembranen. Het is daarom van belang om de invloed te onderzoeken die de samenstelling van een lipide-dubbellaag heeft op de vorming van α -syn aggregaten en het mechanisme daarvan. Twee-kleuren totale interne reflectie fluorescentiemicroscopie (TIRF) is hiervoor een geschikte methode.
- Een belangrijk aspect bij het beter begrijpen van de complexiteit van α -syn aggregatie en de rol daarvan in de ontwikkeling van de ziekte van Parkinson is het onderzoek van α -syn mutanten. Het is daarom zinvol om de aggregatie-eigenschappen van deze mutanten nader te bestuderen en de effecten die verschillende substraatoppervlakken daarop hebben.
- Fibrillen van α -syn zijn sterk geordende nanostructuren die een relatief hoge stabiliteit combineren met elasticiteit, zelf-assemblage en zelf-reparatie. Daardoor ontstaan mogelijkheden voor toepassingen in de bio- en nanotechnologie. Verder onderzoek van stabiliserende factoren in de vorming van deze aggregaten is van belang, niet alleen voor het

begrijpen van hun pathologische functie en voor biomedische toepassingen, maar ook voor mogelijke toepassing in de materiaalwetenschap.