



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Putting a spin on it: amyloid aggregation from oligomers to fibrils**

Zurlo, E.

### **Citation**

Zurlo, E. (2020, July 9). *Putting a spin on it: amyloid aggregation from oligomers to fibrils*. *Casimir PhD Series*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/123273>

Version: Publisher's Version

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/123273>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/123273> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Zurlo, E.

**Title:** Putting a spin on it: amyloid aggregation from oligomers to fibrils

**Issue Date:** 2020-07-09

# Samenvatting

Neurodegeneratieve ziekten, zoals de ziekte van Parkinson (PD) en de ziekte van Alzheimer (AD), zullen naar verwachting in de toekomst meer en meer voorkomen als gevolg van de vergrijzing van de bevolking, wat grote problemen zal veroorzaken voor de samenleving en de economie. Tot dusver is er nog geen geneesmiddel tegen de ziekte gevonden, vooral omdat het mechanisme van de ziekte nog niet goed begrepen is. De aandacht zal in dit proefschrift uitgaan naar de aggregatie van amyloïde. In de hersenen van patiënten met neurodegeneratieve ziekten worden plaques van  $\beta$ -sheet amyloïde aggregaten gevonden, maar het mechanisme van hun vorming en hun rol in het ziekteproces zijn onbekend. Aggregatie is moeilijk te bestuderen omdat amyloïden bestaan uit intrinsiek ongeordende eiwitten. Dat wil zeggen dat ze in oplossing geen geordende structuur aannemen. In ons onderzoek passen wij elektron paramagnetische resonantie (EPR) toe als een nieuwe techniek om de eigenschappen van amyloïde oligomeren en hun ontstaan beter te begrijpen. **Hoofdstuk 1** geeft een algemeen overzicht van amyloïdesystemen en beschrijft in het kort de EPR-methoden die in dit proefschrift worden toegepast.

De vorming van amyloïden komt tot stand tijdens een proces waarbij amyloïde eiwitten samenklonteren en toxisch worden. Het thermodynamische eindpunt van de aggregatie is de vorming van vezels (fibrillen). Inmiddels zijn er steeds meer aanwijzingen die erop duiden dat amyloïde oligomeren toxischer zijn dan fibrillen. Oligomeren zijn aggregaten van tientallen tot honderd monomeren. Oligomeren kunnen een tussenstadium vertegenwoordigen op de weg naar de vorming van fibrillen, maar ze kunnen ook op zichzelf bestaan. Oligomeren kunnen verschillen in grootte (aantal peptiden), structuur, stabiliteit en fysisch-chemische eigenschappen. Door hun instabiliteit en heterogeniteit zijn de oligomeren moeilijk te bestuderen.

De eerste stap in ons onderzoek was om vast te stellen of EPR een geschikte techniek is voor de detectie en karakterisering van amyloïde oligomeren. In **Hoofdstuk 2** laten we zien hoe EPR kan worden toegepast om de vorming van amyloïdaggregaten te detecteren. We hebben hiervoor het K11V-peptide als model gekozen omdat het stabielere oligomeren vormt en omdat het veel langzamer aggregeert dan de meeste andere amyloïde vormende varianten. Door middel van solid-phase peptidesynthese (SPPS) synthetiseren we drie varianten van het K11V-peptide, die het zgn TOAC-spinlabel op drie verschillende posities bevatten. We gebruiken “continuous wave” EPR (cw EPR) aan oplossingen bij kamertemperatuur om te bepalen of oligomeren met EPR kunnen worden gedetecteerd. Het EPR signaal is gevoelig voor de rotaties van het nitroxide spin label. We laten zien hoe veranderingen in de mobiliteit van het TOAC-spinlabel kunnen worden gedetecteerd met EPR en hoe dit ons in staat stelt de vorming van aggregaten waar te nemen.

Nadat we hebben vastgesteld dat we met EPR aggregatie kunnen detecteren, laten we in **Hoofdstuk 3** zien hoe EPR kan worden gebruikt om meer te weten te komen over de structuur van de aggregaten. Uit de lijnvorm van de EPR-spectra kunnen we de grootte van de aggregaten als volgt inschatten. Grotere aggregaten bewegen langzamer dan kleinere aggregaten, d.w.z. hun beweeglijkheid weerspiegelt de grootte oftewel het volume van de oligomeren, dat op haar beurt weer is gerelateerd aan het aantal monomeren waaruit de aggregaten bestaan. Aangezien de EPR lijnvorm is gerelateerd aan beweeglijkheid kunnen we uit de lijnvorm dus de beweeglijkheid en daarmee de grootte van de oligomeren inschatten. Ook zien we met behulp van EPR dat er verscheidene soorten aggregaat in oplossing aanwezig zijn. Eén daarvan is waarschijnlijk het bekende oligomeer van het oorspronkelijke K11V-peptide dat in de literatuur wordt vermeld.

In **Hoofdstuk 4**, gebruiken we cw EPR om oligomeren in oplossing te detecteren en om de kinetiek van de aggregatie van  $\alpha$ -synucleïne te bestuderen.  $\alpha$ -Synucleïne is het eiwit dat het ameloïde vormt dat gerelateerd is aan de ziekte van Parkinson. Door middel van EPR kan de hoeveelheid tussenproducten, ontstaan tijdens de vorming van aggregaten, rechtstreeks in de oplossing worden gemeten zonder dat de verschillende aggregaten eerst van elkaar gescheiden hoeven te worden. We tonen aan dat primaire oligomeren eerder worden gedetecteerd in monomere soorten dan in secundaire producten. Deze oligomeren hebben een korte levensduur doordat de meerderheid van hen dissocieert in plaats van tot vezels te associëren.

Wetend dat EPR kan worden gebruikt om de aggregatie van amyloïde eiwitten te bestuderen, onderzoeken we of EPR ook kan worden gebruikt om de remming van het aggregatieproces te detecteren. In **Hoofdstuk 6** presenteren we een studie over de aggregatie van het amyloïde  $\beta$ -peptide ( $A\beta$ ), het peptide dat verband houdt met de ziekte van Alzheimer. We hebben twee varianten van  $A\beta$  gesynthetiseerd met het TOAC-spinlabel op verschillende posities en we hebben met behulp van cw EPR bij 9 GHz en 95 GHz hun aggregatie gemeten. We passen een kandidaat-geneesmiddel toe, een cyclisch D, L- $\alpha$ -peptide (CP-2), waarvan in eerdere studies werd aangetoond dat het de fibrilvorming van  $A\beta$  remt. Met behulp van EPR laten we zien dat de interactie van  $A\beta$  met CP-2 kan worden gedetecteerd en dat meerdere CP-2-peptiden bij de interactie betrokken moeten zijn.

EPR is een techniek met een breed scala aan toepassingen, vooral in biologische systemen. In **Hoofdstuk 5** tonen we aan dat EPR niet alleen in *in-vitro* studies van eiwitten kan worden toegepast, maar dat EPR ook kan worden gebruikt om eiwitten *in de cel* te bestuderen. We laten zien hoe dubbele elektronen-elektronen resonantie (DEER) spectroscopie kan worden toegepast *in de cel*. De DEER-techniek is een methode die gebruik maakt van microgolf pulsen en die afstanden tussen paramagnetische centra meet. Het voornaamste obstakel bij het uitvoeren van DEER *in de cel* is dat de meeste paramagnetische centra in het reducerende cel milieu worden

afgebroken. In **Hoofdstuk 6** presenteren we de eigenschappen van drie recent ontwikkelde Gd (III) labels, Gd-CLaNP<sub>13i</sub> (i = a, b, c) gekoppeld aan het Bacteriofaag T<sub>4</sub>-Lysozyme-eiwit. We laten zien dat deze labels bij uitstek geschikt zijn als nieuwe tags voor DEER-metingen *in de cel*. Er blijkt een stabiele koppeling van de labels aan het eiwit tot stand te komen die gepaard gaat met een hoge bindingsconstante van het Gd (III), zelfs onder *in-cel* omstandigheden, en met een hoge stijfheid van het construct, resulterend in nauwe afstandsverdelingen.

Dit proefschrift laat zien hoe EPR kan worden gebruikt om de aggregatie van amyloïde peptiden en van eiwitten beter te begrijpen en te karakteriseren. Het laatste hoofdstuk laat zien hoe EPR kan worden toegepast op eiwitten in cellen, waardoor we, naar we hopen, in de toekomst de mogelijkheid krijgen om het onderzoek naar amyloïden uit te breiden naar de natuurlijke omgeving van de cel.

