

Abstract

Abstract

The doctoral work presented here deals with amyloid fiber stability. The 42 residues amyloid beta-peptide, A β 42, which forms fibers in the brains of Alzheimer's disease patients, was chosen as a preferred model system for amyloidosis due to the clear biomedical implications and the wealth of literature available on its amyloid formation. Other fiber forming peptides, such as the 37 amino acids Human Islet Amyloid Polypeptide (involved in type II diabetes) and the hexapeptides STVIIE (synthetic), KVQIIE (from Tau protein sequence) and ISFLF (from a prion protein sequence) were also studied.

All peptides used are highly amyloidogenic and are stable as fibers in aqueous solution under near physiologic conditions (neutral pH, low salt). Nevertheless, biophysical assays revealed that the amyloid fibers generated from these peptides could be disassembled into protofibrils and smaller oligomers by exposure to phospholipidic vesicles. Since lipid induced fiber disassembly occurred with several different amyloid sequences, this phenomenon might be a general property of lipid-amyloid interactions and bear general importance to amyloid-related disease.

A β 42 fibers interaction with lipid vesicles was studied in detail. Initial results

indicated that lipid induced protofibrils were cytotoxic. This finding led to a collaboration with Prof. Bart De Strooper's laboratory (KUL, Leuven, Belgium), where the toxicity of lipid-exposed fibre samples was confirmed both *in vivo* and *in vitro*. Given the relevance of these findings, the effect of the lipid vesicle composition on the A β 42 fiber stability was studied. It was found that vesicles enriched in brain phospholipids, such as sphingomyelin and monoganglioside, induced more fiber disassembly and neurotoxicity, suggesting a possible link with the cognitive decline and neurodegeneration that is typical of Alzheimer's disease.

Since A β 42 amyloid fibers may not be as stable as anticipated, additional experiments on their stability were conducted. More specifically, as the amyloid plaques typical of Alzheimer's disease are mostly constituted of A β 40 and A β 42 peptides (respectively, 40 and 42 residues long), fiber structure in co-incubation experiments of both species was analyzed. It was found that, while a physiological ratio of 9/1 A β 40/A β 42 produces typical amyloid fibers, a pathological ratio of 7/3 A β 40/A β 42 results in the presence of protofibrils, possibly explaining the earlier disease onset associated to this ratio.

As it became evident that fiber stability is a clear issue in A β 42 toxicity, the key regions were mapped through a combined computational and experimental approach. It was found that the 18-24, the 30-35 and the 40-42 regions are key for fiber stability. These are therefore optimal target areas for research aiming at the inhibition of A β toxicity in Alzheimer's disease.

In summary, it is clear that the role of amyloid fiber stability in disease should be considered with care. These original findings are of general impact for the field of protein aggregation and amyloidosis, paving the way to further research on the details of fiber stability in Alzheimer's Disease and in other related amyloid diseases

Samenvatting (Dutch Language Abstract)

Het hier voorgestelde Doctoraat focust op de stabiliteit van amyloïde vezels. A β 42, het amyloïde beta-peptide dat bestaat uit 42 aminozuren en berucht is omwille van de vorming van fibrillen in de hersenen van patiënten met de ziekte van Alzheimer, werd als modelsysteem voor amyloïdose gekozen omwille van zijn biomedische impact en de overvloed aan beschikbare literatuur. Ook van andere peptides die aanleiding geven tot amyloïde vezels, zoals de hexapeptiden STVIIE (syntetisch), KVQIIE (Tau protein sequentie) and ISFLIF (prion protein sequentie) en het *Human Islet Amyloid Polypeptide* (betrokken in type II diabetes), werd de fibrillaire stabiliteit onderzocht.

Al de geselecteerde sequenties hebben een karakteristieke en spontane neiging tot het vormen van amyloïde afzettingen en komen als stabiele fibrillaire structuren voor in waterige oplossing onder fysiologische condities (neutrale pH en lage saliniteit). Desalniettemin werd met behulp van diverse biofysische technieken aangetoond dat stabiele fibrillen kunnen worden afgebroken tot zogenaamde profibrillaire structuren en kleinere oligomeren door toevoeging van fosfolipiden. Tot op heden blijken fosfolipide vesikels de meest efficiënte destabiliserende werking te hebben op de fibrilintegriteit. Aangezien de lipiden de demontage van amyloid vezels van verschillende peptides veroorzaakten, zou dit fenomeen een generisch aspect van lipide-amyloid interactie en daarom van

groot belang voor amyloidosisstudies kunnen zijn.

Vervolgens werd de celtoxiciteit van de lipide-geïnduceerde A β 42 protofibrillen geanalyseerd. Daar de initiële resultaten het cytotoxisch karakter van deze protofibrillen onderschreven, werd een intensieve samenwerking opgestart met het laboratorium van Prof. Bart De Strooper (KUL, Leuven, België), waarbij de lipide-geïnduceerde protofibrillen werden aangeduid als de meest cytotoxische vorm via *in vivo* en *in vitro* experimenten. Gezien het biologisch belang van deze vinding werd de invloed van de lipidesamenstelling op de fibrillaire stabiliteit precies opgetekend. De lipide-geïnduceerde disruptie van de amyloïde fibrillen blijkt doeltreffender wanneer de vesikels aangerijkt werden met lipiden die typisch in de hersenen voorkomen, zoals sphingomyelin en monoganglioside. Dit doet sterk vermoeden dat voor het aan de ziekte van Alzheimer gerelateerde amyloïde β -peptide, een fysiologisch relevant mechanisme van cytotoxiciteit in het neurodegeneratieproces direct verbonden is aan de fibrilstabiliteit en de invloed van fosfolipiden hierop.

Bijgevolg werd duidelijk dat amyloïde fibrillen niet zo stabiel zijn als oorspronkelijk werd vermoed. Met deze voorkennis en de verworven expertise met A β 42 peptide, werden nieuwe experimenten uitgevoerd. Daar de voor de ziekte van Alzheimer karakteristieke amyloïde plaques naast A β 42 ook A β 40 peptides bevatten (resp. 42 en 40 aminozuren), werd door co-incubatie experimenten van beide peptides de resulterende fibrilstabiliteit geanalyseerd. Op die manier werd ontdekt dat de fysiologische verhouding van 9:1 A β 40/42 de typische amyloïde fibrillen opleverde, terwijl de pathologische verhouding van 7:3 A β 40/42 resulteerde in de aanwezigheid van protofibrillen. Dit verklaart mogelijk de ernst van het ziektebeeld die geassocieerd is met deze pathologische verhouding.

Omdat fibrillaire stabiliteit een duidelijke factor is in A β 42 toxiciteit, werden de opeenvolgende aminozuren die een cruciale rol spelen in de fibrilstabiliteit in kaart gebracht via een experimentele en een computationele aanpak. De regio's 18-24, 30-35 en 40-42 konden worden aangeduid als cruciaal voor de globale fibrilstabiliteit. Bijgevolg zijn deze regio's de meest aangewezen kandidaten om de fibrillen te stabiliseren en bieden ze zo een veelbelovend perspectief op de inhibitie van de A β toxiciteit in de ziekte van Alzheimer.

Tot slot kan gesteld worden dat het concept van de stabiliteit van mature

amyloïde fibrillen met de nodige omzichtigheid moet herzien worden. De bevindingen uit deze doctoraatsthesis leveren een belangrijke bijdrage aan het veld van eiwitaggregatie en amyloïdose en bieden een solide basis voor verder onderzoek teneinde een gedetailleerd inzicht te verwerven in de fibrilstabiliteit bij de ziekte van Alzheimer in het bijzonder, maar ook bij gerelateerde amyloïde ziektebeelden.

Résumé (French Language Abstract)

Le travail doctoral présenté ici traite de la stabilité des fibres amyloïdes. L'amyloïd beta-peptide de 42 résidus, A β 42, qui forme des fibres dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, a été choisi comme principal modèle d'amyloïdosis en raison des implications biomédicales évidentes et de la richesse de la littérature sur son comportement amyloïde. D'autres peptides formant des fibres, comme le *Human Islet Amyloid Polypeptide* (impliqué dans le diabète de type II) et les hexapeptides STVIIE, KVQIIE et ISFLIF, ont également été évalués.

Les peptides choisis sont amyloïdogéniques et normalement stables comme fibres en solution aqueuse. Cependant, diverses études biophysiques ont démontré que, en présence de vésicules phospholipidiques, les fibres amyloïdes peuvent être désassemblées en protofibrilles et en plus petits oligomères. Comme ce désassemblage des fibres a lieu avec différents types de fibres (différents peptides), ce phénomène pourrait être une propriété générale des interactions entre lipides et amyloïdes et d'importance générale pour la recherche sur l'amyloïdosis.

La cytotoxicité des protofibrilles A β 42 induite par l'interaction avec les lipides a été évaluée plus en détail. Les résultats préliminaires ont confirmé ses propriétés toxiques et une collaboration a été menée avec le laboratoire du Prof. Bart de

Strooper's (KUL, Louvain, Belgique), qui a entièrement confirmé ces résultats in vivo et in vitro. En raison de la pertinence de ces résultats, la stabilité des fibres après interaction avec les vésicules a été étudiée, afin d'identifier l'influence de la composition lipidique des vésicules sur celle-ci. Le désassemblage des fibres induit par les vésicules lipidiques était plus important quand ces dernières ont été enrichies en lipides normalement trouvés dans le cerveau (comme le sphingomyélin et le monoganglioside) suggérant un possible mécanisme physiologique de toxicité dépendant de la stabilité des fibres.

L'étude de la stabilité des fibres d'A β 42 a été approfondie. En effet, puisque les plaques amyloïdes typiques de la maladie d'Alzheimer sont constituées des peptides A β 40 et A β 42 (avec respectivement, 40 et 42 résidus), la structure des fibres produites par co-incubation de ces espèces a été étudiée. On a constaté que, alors qu'un taux physiologique de 9/1 A β 40/A β 42 produit les fibres amyloïdes typiques, un taux pathologique de 7/3 A β 40/A β 42 a pour conséquence la présence de protofibrilles, expliquant probablement le début précoce de la maladie associé à ce taux.

Car il est devenu évident que la stabilité des fibres peut-être liée à la toxicité A β 42, les régions importantes y contribuant ont été identifiées. Une approche expérimentale et des simulations théoriques ont permis de constater que les régions 18-24, 30-35 et 40-42 sont d'importance capitale pour la stabilité des fibres.

Comme résumé et en conséquence de ce qui précède, il est clair que le rôle de la stabilité des fibres amyloïdes peut être de grande importance. Ces résultats pionniers sont de grande importance pour l'étude de l'agrégation et de l'amyloidosis de protéines et de peptides et ouvrent certainement la voie à de futurs travaux sur les détails de la stabilité des fibres aussi bien dans le cas de la maladie d'Alzheimer que dans le cas d'autres maladies amyloïdes similaires.

Auszug (German Language Abstract)

Die vorliegende Doktorarbeit behandelt amyloide Faserstabilität. Das amyloide beta-Peptid A β 42, welches Fibrillen im Gehirn von Alzheimer Patienten formt, wurde aufgrund seiner klaren medizinischen Auswirkungen und der reichhaltigen Literatur zu seinem amyloiden Verhalten ausgewählt. Andere Fibrillen bildende Peptide, wie z. B. das *Human Islet Amyloid Polypeptide*, welches an Typ II Diabetes beteiligt ist, sowie die Hexapeptide STVIIE (synthetisch), KVQIIE (basiert in Tau Protein) und ISFLF (basiert in Prion Protein), wurden ebenfalls untersucht.

Diese Peptide sind in hohem Grade fibrillogen und als Fasern in der wässrigen Lösung normalerweise stabil. Dennoch haben biophysikalische Untersuchungen gezeigt, dass aus diesen Peptiden gebildete Fibrillen unter Beteiligung von Phospholipid-Vesikeln in Protofibrillen und kleinere Oligomere zerlegt werden können. Da durch Lipid verursachter Faserabbau mit einigen verschiedenen amyloiden Peptiden auftrat, könnte dieses Phänomen von allgemeiner Bedeutung für Lipid-amyloide Interaktionen und das Arbeitsgebiet Proteinaggregation und Faserbildung sein.

Die Interaktion der A β 42 Fibrillen mit Lipid-Vesikeln wurde im Detail untersucht. Erste Ergebnisse deuteten an, dass durch Lipide entstandene Protofibrillen cytotoxisch waren. Diese Ergebnisse führten zu einer Kollaboration mit Prof. Bart

de Stroopers Labor (KU Leuven, Belgien), in welcher die Toxizität dieser Fibrillen *in vitro* und *in vivo* bestätigt wurde. Aufgrund der Relevanz dieser Ergebnisse wurde der Effekt der Lipidzusammensetzung auf die Stabilität der A β 42 Fasern untersucht. Es wurde gefunden, dass Vesikel, die reich an im Gehirn vorkommenden Phospholipiden, wie z. B. Sphingomyelin und Monogangliosiden, sind, einen stärkeren Faserabbau und höhere Toxizität verursachen. Hier könnte eine Verbindung zum Abbau der geistigen Kapazität und der für Alzheimer typischen Neurodegeneration bestehen.

Da A β 42 amyloide Fasern vielleicht nicht so stabil sind wie vermutet, wurden sie weiter auf ihre Stabilität untersucht. Die für Alzheimer typischen Plaques bestehen zum grössten Teil aus A β 40 und A β 42 Peptiden (40 bzw. 42 Aminosäuren lang). Ihre Faserstruktur wurde daher in Co-Inkubationsexperimenten von beiden Formen untersucht. Es wurde festgestellt, dass bei einem physiologischen Verhältnis von 9/1 A β 40/A β 42 typische amyloide Fasern entstehen, bei einem Verhältnis von 7/3 A β 40/A β 42 aber Protofibrillen gebildet werden, was das frühere Auftreten der Krankheit bei diesem Verhältnis erklären könnte.

Da es sich herausstellte, dass die Faserstabilität eine klare Rolle bei der Giftigkeit spielt, wurden die Schlüsselregionen mittels kombinierter experimenteller und rechnerischer Ansätze analysiert. Dabei wurde entdeckt, dass die Regionen 18-24, 30-35 und 40-42 Schlüsselregionen für die Stabilität sind. Sie sind somit optimale Ansatzstellen für Untersuchungen zu einer möglichen Verhinderung der A β Toxizität bei Alzheimer.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Rolle der Faserstabilität bei Krankheiten mit Vorsicht bedacht werden sollte. Die hier vorgestellten einzigartigen Entdeckungen sind von genereller Bedeutung für das Forschungsfeld Proteinaggregation und Amyloidose und könnten neue Fenster auf diesem Forschungsgebiet öffnen.

Sumário (Portuguese Language Abstract)

O trabalho doutoral aqui apresentado relaciona-se com o estudo da estabilidade de fibras amiloides. O *amyloid beta-peptide* com 42 resíduos, A β 42, presente no cérebro de pacientes da doença de Alzheimer, foi escolhido como sistema modelo preferencial de amiloidose devido às implicações biomédicas e à abundância de literatura relativa às suas propriedades amiloides. Outros péptidos que formam fibras amiloides, nomeadamente o *Human Islet Amyloid Polypeptide* (envolvido no diabetes de tipo II) e os hexapeptídeos STVIIE (sintético), KVQIIE (baseado numa sequência da proteína Tau) e ISFLF (baseado numa sequência de um prião), foram também estudados.

Estes péptidos são altamente amiloidogénicos e estáveis como fibras em solução aquosa. Não obstante, ensaios biofísicos mostraram que fibras geradas a partir destes péptidos poderiam ser divididas em protofibras e em oligómeros menores quando na presença de vesículas fosfolípídicas. Dado que a divisão das fibras por ação dos lípidos é observável com diversas péptidos amiloides, este fenómeno poderá ser uma propriedade geral da interação de lípidos com fibras amiloides e, conseqüentemente, de importância geral para a investigação em agregação proteica e amiloidose.

A interação das fibras de A β 42 com vesículas lipídicas foi estudada em maior detalhe. Resultados preliminares no laboratório hospedeiro indicaram que as protofibras de A β 42 (geradas pela interação fibra-lípido) têm potencial neurotóxico. Esta descoberta conduziu a uma colaboração com o grupo do Prof. Bart De Strooper (KUL, Leuven, Bélgica), onde este potencial neurotóxico foi confirmado, quer estudos *in*

vivo, quer *in vitro*. Dada a relevância desta descoberta, o efeito da composição lipídica das vesículas na estabilidade das fibras de A β 42 foi também analisado. Foi descoberto que vesículas enriquecidas em fosfolípidos normalmente encontrados no cérebro (tais como esfingomiélin e monogangliosídeos), eram mais eficazes na divisão de fibras amiloides resultando em maior neurotoxicidade, o que sugere uma possível ligação com a diminuição cognitiva e a neurodegeneração típica da doença de Alzheimer.

Tendo em conta que as fibras amiloides de A β 42 não seriam tão estáveis como antecipado e que os depósitos amiloides típicos de Alzheimer são constituídos maioritariamente por A β 40 além de A β 42 (sendo o A β 40 um péptido semelhante ao A β 42 mas com apenas 40 resíduos), a estrutura de fibras amiloides produzidas por co-incubações de ambos os péptidos foi observada. Foi descoberto que, quando A β 40 e A β 42 são co-incubados num rácio fisiológico de A β 40/A β 42 de 9/1 são formadas fibras amiloides típicas, enquanto que co-incubação num rácio patológico de A β 40/A β 42 de 7/3 resulta na presença de protofibras, o que poderá explicar o início antecipado da doença associado a depósitos amiloides onde este rácio é observado.

Dado que a estabilidade das fibras amiloides é claramente de grande relevância em termos de toxicidade, as regiões da sequência do péptido A β 42 importantes para a estabilidade foram mapeadas. Foi seguida uma abordagem experimental biofísica combinada com simulações computacionais teóricas da estabilidade das fibras, a qual demonstrou que as regiões chave para a estabilidade são os aminoácidos 18 a 24, 30 a 35 e 40 a 42. Estas áreas constituem portanto ótimas regiões para futuras pesquisas destinadas à inibição da neurotoxicidade do péptido A β e possíveis tratamentos da doença de Alzheimer.

Como sumário do acima descrito, o papel da estabilidade de fibras amiloides deve ser estudado em detalhe. Os resultados originais aqui expostos são de importância geral para a pesquisa em agregação protéica e amiloidose, abrindo caminho a futuras investigações sobre a estabilidade das fibras quer na doença de Alzheimer, quer em outras doenças amiloides semelhantes.