



Vrije Universiteit Brussel

Faculty of Science and Bio-engineering Sciences

Department of Bio-engineering Sciences

# Molecular effects of mutations on protein aggregation

Thesis submitted in partial fulfillment of the  
requirements for the degree of  
Doctor in Bio-engineering Sciences

---

## Aleksandra Siekierska

Promoter: Prof. Dr. Dominique Maes

Co-promoters: Prof. Dr. Joost Schymkowitz  
Prof. Dr. Frederic Rousseau



## Summary

Protein aggregation is mediated by short aggregation-prone amino acid sequences that assemble into intermolecular beta-structures forming the core of the aggregate. In native conditions, these stretches are buried inside the globular structure of the protein, however, due to mutations or environmental stress they can become exposed and nucleate aggregation events. Missense mutations that trigger protein aggregation have been shown to cause a number of protein misfolding diseases, including neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease, as well as cancer and metabolic diseases. Moreover, aggregation is often observed when proteins are overexpressed or recombinantly produced. One of the methods to prevent this aggregation process is to adapt a protein's primary sequence through carefully selected mutations.

In this doctoral thesis, using computational modeling, molecular biology techniques, and cell culture experiments, we analyzed several aggregating mutations of the lysosomal hydrolase  $\alpha$ -Galactosidase ( $\alpha$ -Gal) and their role in the treatment of Fabry disease (FD). Further, we investigated if introduction of point mutations that reduce the protein's intrinsic aggregation propensity can decrease the aggregation rate of several model proteins.

In the first part of this dissertation, we demonstrated that the aggregation propensity of mutant  $\alpha$ -Gal was a reliable determinant of the response to pharmacological chaperone treatment (DGJ). The aggregating  $\alpha$ -Gal mutants seemed not to be amenable to DGJ treatment, which worked well for the mutants that did not have an aggregating phenotype. We demonstrated that a scoring function combining thermodynamic stability and intrinsic aggregation propensity of mutants predicted well their aggregation behavior under overexpression in HeLa cells. Interestingly, the same classifier performed well in DGJ response studies using patient-derived cultured lymphoblasts, showing that protein aggregation is an important determinant of pharmacological chaperone efficiency also under endogenous expression levels. Finally, our data support the observation that combining pharmacological chaperone treatment with the suppression of mutant aggregation (e.g. via proteostatic regulator compounds) might be required to enhance the efficiency of pharmacological chaperones in the treatment of lysosomal storage disorders.

In the second part of this dissertation, we developed a minimal redesign method to abrogate aggregation through disrupting aggregation-nucleating sequences with mutations that maximally reduce their intrinsic aggregation propensity whilst preserving thermodynamic stability of the functional protein. We illustrated our method using three relevant proteins: human  $\alpha$ -Gal, and two important fluorescent molecules, Yellow Fluorescent Protein (YFP) and mCherry. In each case we identified single or double mutants that led to marked reduction in protein aggregation upon overexpression. Lastly, *in silico* analysis showed that 75 % of globular proteins

with a high aggregation propensity could be amenable to our redesign strategy, suggesting it could be universally applied.

In conclusion, in this thesis we investigated the effect of missense mutations on increasing and decreasing protein aggregation. In both of the cases we have shown that by manipulating the intrinsic aggregation propensity and the thermodynamic stability it was possible to modulate a protein's aggregation behaviour. While  $\alpha$ -Gal aggregating mutants were negatively determining the treatment with pharmacological chaperone, the SolubiS method allowed identifying mutants that successfully decreased aggregation in studied proteins.

## Samenvatting

Eiwitaggregatie wordt gedreven door korte aminozuursequenties met een intrinsieke aggregatie-tendens. Deze korte sequenties klitten dan samen om grotere intermoleculaire beta-structuren te vormen. Normaal bevinden deze korte potentiëel aggregerende stukjes eiwit zich in de kern van het gevouwen eiwit, maar onder speciale omstandigheden zoals stress en mutaties die eiwit ontvouwing veroorzaken, kunnen deze sequenties toch blootgesteld worden aan de omgeving zodat aggregatie kan optreden. Heel wat niet-conservatieve eiwit mutaties die op deze manier aggregatie veroorzaken, liggen aan de basis van eiwit misvouwingsziektes: neurodegeneratieve ziektes zoals Alzheimer en Parkinson, maar ook kanker en metabolische ziektes. Aggregatie treedt ook op wanneer eiwitten tot overexpressie worden gebracht of wanneer ze op recombinante wijze worden geproduceerd. Een methode om zulke aggregatie te voorkomen is om de primaire eiwit sequentie te gaan aanpassen door op een rationele manier mutaties in te voeren.

In deze doctoraatsthesis gebruiken we computationele modellering, moleculaire biologie technieken en celcultuur experimenten om verschillende aggregatie-inducerende mutaties te analyseren van het lyzosomaal hydrolase  $\alpha$ -Galactosidase eiwit. Ook de rol van deze mutaties in de ziekte van Fabry wordt onderzocht. Daarnaast onderzochten we ook het effect van puntmutaties die de intrinsieke aggregatie van eiwitten kunnen reduceren.

In het eerste deel van deze thesis vonden we dat de aggregatie-tendens van mutant  $\alpha$ -Galactosidase een betrouwbare determinant is van de respons op farmacologische chaperone behandeling (DGJ). De aggregerende  $\alpha$ -Galactosidase mutanten bleven bestand tegen DGJ behandeling, waar niet-aggregerende mutanten wel reageerden op de behandeling. Uiteindelijk konden we een score functie ontwikkelen waarbij de combinatie van intrinsieke aggregatie en thermostabiliteit van de mutanten heel goed het aggregatie profiel in HeLa cellen kan voorspellen. Tevens werkte deze score functie ook in DGJ studies met lymfoblasten uit patient stalen, wat erop wijst dat eiwit aggregatie ook een belangrijke determinant is onder endogene expressie niveaus. Uiteindelijk kunnen we stellen dat onze data erop wijst dat de combinatie van behandeling met farmacologische chaperones en het reduceren van aggregatie vereist kan zijn om de efficiëntie van zulke chaperones te verhogen in het geval van lyzosomale- compartiment ziektes.

In het tweede deel van deze thesis hebben we een nieuwe eiwit-ontwerp methode ontwikkeld waarbij minimale veranderingen (mutaties) de intrinsieke aggregatie verminderen terwijl de eiwitstabiliteit niet of nauwelijks wordt aangetast. Deze methode hebben we gevalideerd op drie model eiwitten:  $\alpha$ -Galactosidase, Yellow Fluorescent Protein (YFP) en mCherry. In elk van de drie gevallen konden we één of twee mutaties invoeren die de eiwitaggregatie sterk verminderten wanneer het eiwit tot overexpressie werd gebracht. In een bioinformatica studie

hebben we tevens aangetoond dat 75 procent van globulaire eiwitten met een hoge aggregatie-tendens door onze methode aangepast kunnen worden om zo hun aggregatie-tendens te verminderen.

Samengevat hebben we in deze thesis gedemonstreerd dat we de intrinsieke aggregatie-tendens en de eiwit thermostabiliteit kunnen manipuleren om zo de aggregatie van eiwitten te moduleren. Zo hebben we onze nieuwe eiwit-ontwerp methode, SolubiS, succesvol toegepast op het  $\alpha$ -Galactosidase eiwit waarbij we mutaties hebben ingevoerd die de aggregatie-tendens drastisch doen dalen.