

VU Research Portal

Amyloids: from molecular structure to mechanical properties

Gelderloos, C.C.

2014

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Gelderloos, C. C. (2014). *Amyloids: from molecular structure to mechanical properties*.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Samenvatting

Amyloïden: van moleculaire structuur tot mechanische eigenschappen

Ongeveer 15 tot 20% van het menselijk lichaam bestaat uit eiwitten, ongeveer gelijk aan het eiwitpercentage van bacteriën. In de natuur spelen eiwitten een belangrijke rol in veel verschillende functies, bijvoorbeeld in transport, opslag, beweging, stevigheid en stabiliteit, of als antilichamen, enzymen of hormonen. Een eiwit is opgebouwd uit een lint van aminozuren en kan zich opvouwen in een specifieke, driedimensionale structuur. Deze structuur, de moleculaire of secundaire structuur genoemd, is essentieel voor de functie van het eiwit. Een speciale driedimensionale structuur van eiwitten zijn amyloïden. Amyloïden zijn aggregaten die kunnen worden gevormd als eiwitten in elkaar vouwen. Dit vouwingsproces is onafhankelijk van de sequentie, structuur en functie van het eiwit; er wordt gedacht dat de amyloïde vouwing een wezenlijke eigenschap is van eiwitten in hun gedenateerde staat. Amyloïd fibrillen zijn meestal een paar nanometer in diameter en kunnen micrometers lang zijn. Ze zijn opvallend stijf en sterk, eigenschappen die waarschijnlijk worden veroorzaakt door de kern van β -sheets die gestabiliseerd worden door waterstofbruggen. Amyloïden komen veel voor in de natuur, zowel in bacteriën, schimmels, dieren en mensen. In veel gevallen vervullen ze een nuttige rol, onder andere bij het geven van stabiliteit of bescherming, en in celadhesie en cel aggregatie. Maar amyloïden spelen ook een rol in verschillende ziekten, bijvoorbeeld de ziekte van Alzheimer, de ziekte van Parkinson en type II diabetes mellitus. Oligomeren en/of amyloïd fibrillen kunnen ophopen in weefsels en organen en schade veroorzaken. Wanneer we vanuit een ander oogpunt naar amyloïden kijken, zijn (niet-schadelijke) amyloïden door hun speciale eigenschappen juist een aantrekkelijke kandidaat voor toepassingen in tissue engineering, materiaalkunde of de voedingsindustrie.

Het belangrijkste doel in dit proefschrift is de biofysische eigenschappen van amyloïden te onderzoeken over verschillende lengteschalen: van de moleculaire structuur tot de stijfheid van fibrillen en de mechanische eigenschappen van netwerken. Een beter inzicht in de relatie tussen de moleculaire structuur en de mechanische eigenschappen is essentieel om de vorming van amyloïden te kunnen begrijpen en controleren. Dit is aan de ene kant belangrijk om amyloïd-gerelateerde ziekten te kunnen bestrijden, en aan de andere kant voor potentiële toepassingen van amyloïden. In dit proefschrift beschrijf ik het onderzoek naar de moleculaire structuur van model amyloïd fibrillen gemeten met verschillende spectroscopische technieken. De morfologie en stijfheid van de amyloïd fibrillen werden bepaald door een combinatie van atomic force microscopy, fluorescentie microscopie en scanning transmission electron microscopy. De mechanische eigenschappen van netwerken van amyloïd fibrillen werd gemeten met

macroscopische reometrie. Op al deze lengteschalen werden verschillende typen amyloïd fibrillen onderzocht, met als doel beter te begrijpen wat de oorzaak is van polymorfisme. Ook heb ik het effect van het polyfenol epi-gallocatechin-3-gallate (EGCG), een potentieel medicijn voor de behandeling van amyloïd-gerelateerde ziekten, op de vorming en afbraak van amyloïden bestudeerd.

In het eerste deel van mijn proefschrift focus ik op het onderzoek naar de moleculaire structuur van amyloïden en de relatie tot polymorfisme. In **Hoofdstuk 2** onderzocht ik de relatie tussen de moleculaire structuur, morfologie en stijfheid van amyloïd fibrillen. Het model-eiwit β -lactoglobuline (β -lg), een eiwit in melk, vormt twee verschillende typen fibrillen afhankelijk van de eiwitconcentratie tijdens incubatie bij een lage pH en hoge temperatuur. Bij lage β -lg concentraties worden lange, stijve fibrillen gevormd, terwijl bij een hoge β -lg concentratie de fibrillen kort en kronkelig zijn. De morfologie van de amyloïden werd onderzocht met atomic force microscopy (AFM). Voor beide typen fibrillen werd de persistentielengte, een maat voor de stijfheid, bepaald. Voor de lange fibrillen was de persistentielengte een paar micrometer, ongeveer gelijk aan hun lengte. Voor de korte fibrillen was de persistentielengte ongeveer 40 keer zo laag. Met vibrational sum-frequency generation (VSFG) spectroscopie lieten we zien dat lange, stijve fibrillen voor een groter deel bestaan uit β -sheets dan de korte, kronkelige fibrillen. In **Hoofdstuk 3** ga ik dieper in op de verschillen in moleculaire structuur en compositie van de twee typen fibrillen. De moleculaire structuur werd met verschillende bulk spectroscopie technieken onderzocht (circular dichroism, Fourier transform infrared en Raman spectroscopie). Alle drie technieken laten een grote bijdrage van de β -sheet kern van de fibrillen zien. Opvallend genoeg werden er geen verschillen gevonden tussen de twee verschillende typen fibrillen, zoals met VSFG wel het geval was. Een nadeel van deze bulktechnieken is dat er geen onderscheid gemaakt kan worden tussen verschillende polymorfe vormen van fibrillen in een sample, of tussen de kern en het oppervlak van de fibrillen. Daarom onderzochten we de moleculaire structuur van het oppervlak van de fibrillen met tip-enhanced Raman spectroscopy (TERS). In TERS wordt de hoge resolutie van AFM gecombineerd met Raman spectroscopie, wat het mogelijk maakt de moleculaire structuur van amyloïden met nanometer-resolutie te bepalen. Ik heb laten zien dat het oppervlak van beide typen amyloïden gevormd van β -lg voornamelijk bestaat uit random of α -helix structuren, in groot contrast met hun kern van β -sheets. Ondanks dat er met de verschillende bulktechnieken geen onderscheid kon worden gemaakt tussen de typen fibrillen, lieten TERS metingen zien dat het gehalte β -sheet structuur op het oppervlak van de fibrillen hoger was voor de lange, stijve dan voor de korte kronkelige fibrillen. Om de oorsprong van de verschillen in morfologie, stijfheid en structuur te begrijpen werd de kinetiek van fibrilvorming onderzocht met massaspectrometrie en AFM. Met

massaspectroscopie werd de hydrolyse van de monomeren gevolgd. De verhouding tussen intacte monomeren en peptidefragmenten nam sneller af voor samples bij een hoge dan bij een lage β -lg concentratie. Mogelijk wordt dit verschil veroorzaakt doordat intacte monomeren in de korte, kronkelige fibrillen worden ingebouwd, terwijl dit niet of minder gebeurt bij de lange, stijve fibrillen. AFM liet zien dat bij een hoge eiwitconcentratie de eerste fibrillen na kortere incubatietijd werden gevormd dan bij samples met een lage eiwitconcentratie. Samenvattend is de oorsprong van het verschil in morfologie en moleculaire structuur van amyloïd fibrillen waarschijnlijk gerelateerd aan de kinetiek van fibrilvorming.

In **Hoofdstuk 4** werden amyloïd fibrillen gevormd van hIAPP, een peptide gerelateerd aan type 2 diabetes mellitus, onderzocht met TERS. Om de schadelijkheid van amyloïden beter te begrijpen is het belangrijk te weten wat de structuur van het oppervlak van amyloïden is. Met TERS werden de moleculaire structuur en de aminozuurcompositie van het oppervlak van hIAPP amyloïd fibrillen met nanometer-resolutie bepaald. Net zoals voor de β -lg amyloïden bestaat het oppervlak van hIAPP amyloïden voornamelijk uit random of α -helix structuren, terwijl de kern is opgebouwd uit β -sheets. Onder invloed van de pH-waarde tijdens vorming werden fibrillen met verschillende moleculaire structuur en aminozuurcompositie gevormd. Ook de moleculaire structuur van amyloïden gevormd in de aanwezigheid van een modelmembraan werd onderzocht, omdat *in vivo* hIAPP amyloïden waarschijnlijk vooral op het plasmamembraan van cellen worden gevormd.

In het tweede deel van mijn proefschrift focuste ik op het effect van het polyfenol EGCG, een bestandsdeel van groene thee, op amyloïd-vorming en op de morfologie en stijfheid van amyloïden. EGCG is een van de meest veelbelovende medicijnen om amyloïd-gerelateerde ziekten te behandelen. In **Hoofdstuk 5** werd het effect van EGCG op de vorming van hIAPP amyloïden in de aanwezigheid van een modelmembraan onderzocht. Ondanks dat EGCG de vorming van amyloïden in bulkoplossing efficiënt kan voorkomen, is het in aanwezigheid van een modelmembraan minder effectief. De vorming van amyloïden werd gevolgd door de moleculaire structuur te meten met VSFG en de morfologie te bepalen met AFM. EGCG breekt geen bestaande fibrillen af in de aanwezigheid van een modelmembraan, terwijl in bulkoplossing de amyloïd fibrillen wel afgebroken worden. In **Hoofdstuk 6** werd het effect van EGCG op amyloïd fibrillen bij verschillende pH-waarden bestudeerd. Amyloïden werden gevormd van het kippeneiwit lysozyme (hen egg white lysozyme, HEWL). In een zure omgeving kan EGCG de morfologie of stijfheid van fibrillen niet veranderen, maar bij een neutrale pH-waarde wordt een populatie van dikke fibrillen gevormd na incubatie met EGCG. AFM en elektronenmicroscopie lieten zien dat de dikke fibrillen grote aggregaten vormen. In het tweede deel van mijn proefschrift heb ik laten zien dat EGCG fibrillen kan afbreken

of bundelen, maar dat de efficiëntie erg afhankelijk is van de condities, zoals de pH-waarde en de aanwezigheid van een modelmembraan. Het is daarom essentieel om rekening te houden met de condities in het lichaam tijdens het onderzoek naar medicijnen voor amyloïd-gerelateerde ziekten.

Het derde deel van mijn thesis gaat over de mechanische eigenschappen van amyloïd fibrillen en netwerken. In **Hoofdstuk 7** onderzocht ik met verschillende methoden de stijfheid van amyloïd fibrillen gevormd van HEWL. De eerste aanpak was het bepalen van de persistentielengte van de fibrillen op basis van de conformatie van een groot aantal fibrillen dat werd bekeken met AFM. De gemiddelde persistentielengte lag tussen 2.5 en 4.4 μm , afhankelijk van de hydratatie van de fibrillen en of er glas of mica als substraat voor AFM werd gebruikt. Het nadeel van deze aanpak is dat de fibrillen op een oppervlak plakken en worden gedroogd, wat hun eigenschappen kan beïnvloeden. Daarom gebruikte ik ook een andere methode: fluorescent gelabelde fibrillen werden bekeken met fluorescentiemicroscopie. De thermische buiging van 8 vrij-bewegende fibrillen in water werd geanalyseerd. De persistentielengte van deze 8 fibrillen viel in een range tussen 0.7 en 6.7 μm . Twee fibrillen waren zo stijf dat de persistentielengte niet kon worden bepaald met videomicroscopie. In conclusie geven de twee verschillende methoden vergelijkbare gemiddelde waarden van de persistentielengte in de orde grootte van enkele micrometers, maar met fluorescentiemicroscopie is het mogelijk de grote variabiliteit tussen fibrillen in een sample te detecteren. Deze variabiliteit laat de polymorfologie van de fibrillen zien.

In het laatste hoofdstuk, **Hoofdstuk 8**, heb ik suspensies van amyloïd fibrillen op de grootste lengteschaal onderzocht. De reologische eigenschappen van fibrilsuspensies zijn met name relevant voor toepassingen van amyloïden, bijvoorbeeld in de materiaalkunde of de voedingsindustrie. Ik heb de visco-elastische eigenschappen van suspensies van de verschillende typen amyloïden beschreven in hoofdstuk 2 en 3 vergeleken. Beide typen gedragen zich als soft solids met een yield stress. De viscositeit van de fibrilsuspensies neemt af bij een stijgende shear rate, ook wel shear-thinning gedrag genoemd. Door een combinatie van reologie en small-angle neutron scattering (rheo-SANS) te gebruiken kon ik laten zien dat lange, stijve fibrillen uitlijnen onder shear, maar korte, kronkelige fibrillen niet. Dit wekt de suggestie van het sterke shear-thinning gedrag van korte fibrillen wordt veroorzaakt door zwakke attractieve krachten tussen de fibrillen. Samenvattend heb ik laten zien dat suspensies van β -Ig amyloïd fibrillen zich reologisch gedragen als suspensies van zwak-attractieve, semi-flexibele staven.

Het onderzoek in dit proefschrift is een klein stapje vooruit in een beter begrip van de structuur en mechanische eigenschappen van amyloïd fibrillen. Ondanks dat zijn er nog

veel open vragen. Het is belangrijk om in al het onderzoek naar amyloïd fibrillen hun polymorfe natuur in gedachte te houden, omdat dit de resultaten van onderzoek in bulk naar de structuur en mechanische eigenschappen erg kan beïnvloeden. Om dit probleem te omzeilen kan gebruik worden gemaakt van een aantal veelbelovende technieken waarbij enkele fibrillen in plaats van bulk samples kunnen worden onderzocht. Om de structuur van amyloïden te onderzoeken zou bijvoorbeeld gebruik kunnen worden gemaakt van TERS. Wanneer amyloïden gevormd van korte peptiden met een bekende sequentie met een hoge resolutie zouden worden onderzocht met TERS, is het misschien mogelijk een model van de structuur te ontwikkelen, dat kan worden vergeleken met modellen gebaseerd op nuclear magnetic resonance (NMR) experimenten. In dit proefschrift heb ik laten zien dat het mogelijk is de stijfheid van amyloïd fibrillen te bepalen door filmpjes gemaakt met fluorescentiemicroscopie te analyseren. Dit kan in de toekomst gebruikt worden om verschillende typen amyloïden in detail te onderzoeken, om amyloïden gevormd van verschillende eiwitten te vergelijken, of om het effect van moleculen die een interactie aangaan met amyloïden te testen. Door fluorescentiemicroscopie te combineren met AFM, bijvoorbeeld door het gebruik van microfluidics, zou het mogelijk worden de mechanische eigenschappen van fibrillen te relateren aan hun morfologie.

Er is nog een lange weg te gaan voor de behandeling van amyloïd-gerelateerde ziekten. Ondanks dat recente resultaten met natuurlijke moleculen zoals polyfenolen veelbelovend lijken, is er nog weinig duidelijkheid over de interacties tussen EGCG met oligomeren, fibrillen en het effect op de vorming van amyloïden. Tenslotte, zolang de oorsprong en het mechanisme van amyloïd-gerelateerde ziekten niet opgehelderd is, zal de zoektocht naar medicijnen die schade door amyloïden kunnen voorkomen een grote uitdaging blijven.