

Title:

**Distribution of copper ions between amyloid- $\beta$  peptides and biomolecules present in the synaptic cleft in the context of neurotoxicity of Alzheimer's Disease**

Supervisor: Professor Wojciech Bal, Ph.D., D.Sc.

Ph.D. candidate: Ewelina Stefaniak, M.Sc.Eng.

**Abstract**

Alzheimer's Disease (AD) is the most prevalent progressive dementia, constituting one of the major causes of death of people over 65 years old in developed countries. AD epidemics spreads in an unstoppable fashion, eliciting gigantic economic and social costs. This neurodegenerative, progressive and irreversible brain disorder slowly destroys the sufferer's memory, cognitive skills and ability to carry out the simplest tasks of daily life. One of the hypotheses of the origin of AD is the amyloid cascade hypothesis, assuming that aggregation of A $\beta$  peptides is the main culprit. A $\beta$  (consisting of 39-42 amino acids) is formed by proteolysis of APP (Amyloid Precursor Protein) by  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretase, and then degraded and removed from the brain of healthy people, while in AD it forms neurotoxic oligomers, and later amyloid plaques. The second hypothesis concerns metal ions, among others Cu(II), which significantly change the aggregation process, and can modify the neurotoxicity of the peptides. Both of the above hypotheses are associated with the formation of oxidative stress caused by free radicals generated in the presence of metal ions, bound to A $\beta$  peptides, and natural reducing agents (ascorbic acid or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), which is the third hypothesis of AD.

Both healthy and AD human brains contain multiple forms of A $\beta$  peptides, differing largely by the varied length of the C-terminal tail of the molecule, however, in recent studies, it was shown that A $\beta$ <sub>4-42</sub> is dominant to the most commonly studied A $\beta$ <sub>1-42</sub> form, and is a major component of amyloid plaques. Moreover, A $\beta$ <sub>4-16</sub> (a model peptide of A $\beta$ <sub>4-42</sub>) binds Cu(II) ion 3000 times stronger than A $\beta$ <sub>1-x</sub>, with  $K_d$  of 30 fM at pH=7.4. This complexation is not accompanied by the generation of reactive oxygen species (ROS) such as hydroxyl radicals, responsible for oxidative damage of lipids, proteins and DNA, also for declining mitochondrial function, and ultimately leading to synaptic and neuronal death. Additionally, in agreement with the gradient of stability constants and the known kinetic liability of the Cu(II) complex of A $\beta$ <sub>1-16</sub>, A $\beta$ <sub>4-16</sub> instantly and completely adopts the Cu(II) ion from the A $\beta$ <sub>1-16</sub> complex, thus preventing ROS production. Based on these findings, especially considering the coordination properties of A $\beta$ <sub>4-x</sub> towards Cu(II) ions, their high-affinity metal-binding sites and the ability to quench CuA $\beta$ <sub>1-x</sub> toxicity by rapid Cu(II) sequestration, the proposal of potentially significant effect of A $\beta$ <sub>4-x</sub> peptides on copper homeostasis in the brains of AD patients was made.

These considerations gave rise to the hypothesis of this dissertation that treats about the physiological role of A $\beta$ <sub>4-x</sub> as a synaptic scavenger of Cu(II) during neurotransmission and aims to determine the properties of A $\beta$ <sub>4-x</sub> towards Cu distribution in the synaptic cleft. In addition, it elucidates the linkage between Cu(I/II), A $\beta$ <sub>4-x</sub>, neurotransmitters and other

biomolecules coexisting in the synaptic cleft that can alter synaptic activity under pathophysiologically relevant conditions. Investigated here, competition of  $\text{CuA}\beta_{4-16}$  with  $\text{Zn}_7\text{MT-3}$  – brain protein orchestrating the Cu and Zn metabolism, showed that  $\text{CuA}\beta_{4-16}$  is resistant to the Cu(II) ion swap. While the Cu/Zn exchange was postulated as a key mechanism controlling the oxidative toxicity of  $\text{CuA}\beta_{1-x}$  complexes by  $\text{Zn}_7\text{MT-3}$ , the resistance of  $\text{CuA}\beta_{4-16}$  to this swap indicates that  $\text{A}\beta_{4-42}$  and MT-3 may play parallel roles in synaptic copper clearance. Interestingly, glutamate added to the equation of MT-3, Cu and  $\text{A}\beta_{4-42}$  empowered non-negligible, albeit very slow Cu transfer from  $\text{A}\beta_{4-16}$  to MT-3 *via* a transient ternary complex of Glu with  $\text{Cu(II)A}\beta_{4-16}$ . Despite the very small effect of glutamate on the kinetics of copper transfer in this case, its observation is essential due to presence of multitude different small molecules in a biological system, which may collectively be physiologically relevant as transfer facilitators. Despite the role which  $\text{A}\beta_{4-x}$  variants may play as Cu(II) chaperones by scavenging the potentially redox-active copper from the synaptic cleft, my study shows that it may struggle with delivering Cu(II) *via* the transmembrane copper transporter hCtr1 to the neurons and glial cells. In the interaction between the model peptide hCtr1<sub>1-14</sub> which apparently serves as an antenna for sequestering copper ions, with two  $\text{A}\beta$  peptides:  $\text{A}\beta_{1-16}$  and  $\text{A}\beta_{4-16}$ , I found that in case of Cu(I) both of them are able to exchange the ion with hCtr1<sub>1-14</sub>, however, Cu(II) is exchangeable rapidly and completely only with  $\text{A}\beta_{1-16}$ . The slow release of Cu(II) from the ATCUN  $\text{A}\beta_{4-16}$  site to hCtr1<sub>1-14</sub> resulted in a process that takes about 20 times slower than the transfer of Cu(II) from HSA to hCtr1<sub>1-14</sub> when tested under similar conditions within this thesis. The reason to test such interaction was the presence of the ATCUN motif in both HSA to hCtr1<sub>1-14</sub>, while HSA is strongly suspected to be a facilitator of direct shuttling of Cu(II) ions from extracellular ligands and delivering them to the cells. The re-evaluated here Cu(II) affinity of hCtr1<sub>1-14</sub> in the absence of interfering solution components made the transfer of Cu(II) even more feasible. This discovery potentially describes the first step of copper import to the cells as HSA carries a significant portion of exchangeable Cu(II) in the blood.

In order to confirm the  $\text{A}\beta_{4-x}$  participation in Cu(II) scavenging during neurotransmission, the evaluation of relevance of  $\text{Cu(II)A}\beta_{4-16}$  complexation *in vivo* was crucial, as the glutamatergic synapse activity occurs on a faster, millisecond scale. The investigation of the time scale of the  $\text{Cu(II)A}\beta_{4-16}$  complexation revealed the mechanism of the reaction of Cu(II) binding to the  $\text{A}\beta_{4-16}$  which follows a hierarchical fashion, going through two intermediate states (Species I and Species II) followed by the final tight complex formation. The studied here mechanisms of Cu(II) association with and dissociation from  $\text{A}\beta_{4-x}$  peptides, revealed the long lifetimes of the discovered intermediates, which is comparable to the intervals between pulses of neurotransmitter release in glutamatergic neuronal pathways. This finding has presented these complexes as highly probable contributors to the biological activity of  $\text{A}\beta_{4-42}$ . The previous discovery of short oligopeptides, such as  $\text{A}\beta_{4-9}$  and  $\text{A}\beta_{12-16}$ , their potential ability to cross the blood-brain barrier (BBB) due to their size and even higher affinity to Cu(II) than  $\text{A}\beta_{4-16}$ , suggested their roles in removing excess copper from the brain. To check such function, their exposition to GSH – the main reducing agent for Cu(II) ions entering the cell interior, was investigated. Kinetic studies have shown that  $\text{Cu(II)A}\beta_{4-16}$  and  $\text{Cu(II)A}\beta_{4-9}$  are sufficiently kinetically resistant to reduction by physiological concentration of GSH, hence their survival in the cell cytosol for many hours

without eliciting oxidative damage is very probable. However,  $\text{Cu(II)A}\beta_{12-16}$  and  $\text{Cu(II)A}\beta_{1-16}$  did not have such ability. These results further support the notion that  $\text{Cu(II)A}\beta_{4-x}$  complexes are good candidates to shuffle  $\text{Cu(II)}$  across the BBB and between intra- and extracellular environment in the brain. All these facts, taken together, strongly support the postulate of the physiological role of  $\text{A}\beta_{4-42}$ , the major  $\text{A}\beta_{4-x}$  species, as a  $\text{Cu(II)}$  scavenger in the synaptic cleft, which by purging in the glutamatergic synaptic cleft of excess  $\text{Cu(II)}$  ions, enables rapid restoration of its basal conditions thereby allowing the release of another portion of neurotransmitter.

## Streszczenie

Choroba Alzheimera (AD) jest najczęściej występującą demencją postępującą, stanowiącą jedną z głównych przyczyn śmierci osób powyżej 65 roku życia w krajach rozwiniętych. Rozprzestrzenianie się epidemii choroby Alzheimera jest niepowstrzymane, generując gigantyczne koszty ekonomiczne i społeczne. AD to neurodegeneracyjne, postępujące i nieodwracalne zaburzenie mózgu, które powoli niszczy pamięć, funkcje poznawcze, a także zdolność do wykonywania najprostszych codziennych czynności. Jedną z hipotez dotyczących pochodzenia AD jest hipoteza kaskady amyloidowej, zakładająca, że głównym sprawcą AD jest agregacja peptydów  $\text{A}\beta$ . Peptydy  $\text{A}\beta$  (składające się z 39-42 aminokwasów) powstają w wyniku proteolizy APP (białka prekursorowego amyloidu) przez  $\beta$ - i  $\gamma$ -sekretazę, a następnie ulegają degradacji i usunięciu z mózgu u zdrowych ludzi, podczas gdy w AD tworzą neurotoksyczne oligomery, a później płytki amyloidowe. Druga hipoteza dotyczy jonów metali, m.in.  $\text{Cu(II)}$ , które w istotny sposób zmieniają proces agregacji i mogą modyfikować neurotoksyczność peptydów. Obie powyższe hipotezy są związane z powstawaniem stresu oksydacyjnego wywołanego przez wolne rodniki, powstające w obecności jonów metali związanych z peptydami  $\text{A}\beta$  oraz naturalnie występujących związków redukujących (kwas askorbinowy lub  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), co stanowi trzecią hipotezę AD.

Zarówno mózgi ludzi zdrowych, jak i tych z chorobą Alzheimera zawierają wiele form peptydów  $\text{A}\beta$ , różniących się znacznie długością C-końcowego fragmentu cząsteczki, jednak w ostatnich badaniach wykazano, że  $\text{A}\beta_{4-42}$  dominuje nad najczęściej badaną formą  $\text{A}\beta_{1-42}$ , będąc głównym składnikiem płytek amyloidowych. Ponadto  $\text{A}\beta_{4-16}$  (modelowy peptyd dla  $\text{A}\beta_{4-42}$ ) wiąże jon  $\text{Cu(II)}$  3000 razy silniej niż  $\text{A}\beta_{1-x}$ , z  $K^d = 30 \text{ fM}$  przy  $\text{pH} = 7,4$ . Co ważne, temu kompleksowaniu nie towarzyszy wytwarzanie reaktywnych form tlenu (RFT), takich jak rodniki hydroksylowe, odpowiedzialnych za oksydacyjne uszkodzenie lipidów, białek i DNA, a także za upośledzenie funkcji mitochondriów, co ostatecznie prowadzi do degradacji synaps i śmierci neuronów. Dodatkowo, zgodnie z gradientem stałych stabilności i znanymi właściwościami kinetycznymi kompleksu  $\text{Cu(II)A}\beta_{1-16}$ ,  $\text{A}\beta_{4-16}$  natychmiast i całkowicie przejmuje jon  $\text{Cu(II)}$  z kompleksu  $\text{A}\beta_{1-16}$ , zapobiegając w ten sposób produkcji RFT. Na podstawie tych odkryć, szczególnie biorąc pod uwagę właściwości koordynacyjne peptydów  $\text{A}\beta_{4-x}$  względem jonów  $\text{Cu(II)}$ , miejsca wiązania metali o wysokim powinowactwie oraz zdolność do tłumienia toksyczności  $\text{CuA}\beta_{1-x}$  przez szybką sekwestrację  $\text{Cu(II)}$ ,

zapropozowano, że peptydy  $A\beta_{4-x}$  potencjalnie mają wpływ na homeostazę miedzi w mózgach pacjentów z AD.

Rozważania te dały początek hipotezie niniejszej rozprawy, która traktuje o fizjologicznej roli  $A\beta_{4-x}$  jako „zmiataczy” synaptycznych jonów  $Cu(II)$  podczas neurotransmisji i ma na celu określenie właściwości  $A\beta_{4-x}$  względem dystrybucji  $Cu$  w szczeliny synaptycznej. Ponadto wyjaśnia ona powiązania między  $Cu(I/II)$ ,  $A\beta_{4-x}$ , neuroprzekaznikami i innymi biomolekułami współistniejącymi w szczeliny synaptycznej, które mogą wpływać na aktywność synaptyczną w warunkach istotnych patofizjologicznie. Badane tutaj współzawodnictwo  $CuA\beta_{4-16}$  z  $Zn_7MT-3$  – białkiem mózgowym koordynującym metabolizm  $Cu$  i  $Zn$ , wykazało, że  $CuA\beta_{4-16}$  jest kompleksem odpornym na zamianę jonów  $Cu/Zn$  w  $MT-3$ . Jako że wymiana  $Cu/Zn$  była postulowana jako kluczowy mechanizm kontrolujący toksyczność oksydacyjną kompleksów  $CuA\beta_{1-x}$  przez  $Zn_7MT-3$ , oporność  $CuA\beta_{4-16}$  na tę zamianę wskazuje, że  $A\beta_{4-42}$  i  $MT-3$  mogą odgrywać równoległe, lecz niezależne role w wiązaniu miedzi. Co ciekawe, glutaminian dodany do układu  $MT-3$ ,  $Cu$  i  $A\beta_{4-42}$  umożliwił bardzo powolny, ale mierzalny transfer  $Cu$  z  $A\beta_{4-16}$  do  $MT-3$  poprzez przejściowy trójskładnikowy kompleks  $Glu$  z  $Cu(II)A\beta_{4-16}$ . Pomimo bardzo małego wpływu glutaminianu na kinetykę przenoszenia miedzi w tym przypadku, obserwacja ta jest istotna ze względu na obecność wielu innych małych cząsteczek w układzie biologicznym, które łącznie mogą mieć znaczenie fizjologiczne w umożliwianiu transferu  $Cu(II)$ . Mimo roli szaperonów  $Cu(II)$ , jaką mogą odgrywać peptydy  $A\beta_{4-x}$ , usuwając przy tym potencjalnie aktywną redoksowo miedź ze szczeliny synaptycznej, moja praca pokazuje, że nie one są w stanie dostarczać  $Cu(II)$  do neuronów i komórek glijowych przez transbłonowy transporter miedzi  $hCtr1$ . W interakcji między peptydem modelowym  $hCtr1_{1-14}$ , który służy jako antena do wyłapywania jonów miedzi, z dwoma peptydami  $A\beta$ :  $A\beta_{1-16}$  i  $A\beta_{4-16}$ , wykazano, że w przypadku  $Cu(I)$  oba są w stanie wymieniać ten jon z  $hCtr1_{1-14}$ , jednakże jon  $Cu(II)$  jest wymienialny szybko i całkowicie tylko z  $A\beta_{1-16}$ . Powolne uwalnianie  $Cu(II)$  z miejsca wiązania  $ATCUN$  w  $A\beta_{4-16}$  do  $hCtr1_{1-14}$  spowodowało, że proces trwa około 20 razy wolniej niż transfer  $Cu(II)$  z  $HSA$  do  $hCtr1_{1-14}$ , badany w niniejszej rozprawie w podobnych warunkach. Powodem dla którego przetestowano te interakcje była obecność motywu  $ATCUN$  zarówno w  $HSA$ , jak i  $hCtr1_{1-14}$ , a także pogląd, iż  $HSA$  ułatwia bezpośrednie dostarczanie jonów  $Cu(II)$  z zewnątrzkomórkowych ligandów do komórek. Ponowne wyznaczenie w tej pracy powinowactwo  $hCtr1_{1-14}$  do  $Cu(II)$ , pod nieobecność interferujących składników roztworu umożliwiło stwierdzenie, że przenoszenie  $Cu(II)$  od  $HSA$  do  $hCtr1$  jest tym bardziej możliwe. Z uwagi na fakt, iż  $HSA$  przenosi znaczną część wymienialnych jonów  $Cu(II)$  we krwi, odkrycie to opisuje pierwszy etap potencjalnego importu miedzi do komórek.

W celu potwierdzenia udziału  $A\beta_{4-x}$  w sekwestracji  $Cu(II)$  podczas neurotransmisję kluczowe znaczenie ma ocena istotności tworzenia kompleksu  $Cu(II)A\beta_{4-16}$  *in vivo* pod kątem czasu ich tworzenia, ponieważ procesy w synapsach glutaminergicznych zachodzą bardzo szybko, w skali milisekundowej. Wykonano zatem badanie skali czasowej kompleksowania  $Cu(II)A\beta_{4-16}$ , które ujawniło hierarchiczność mechanizmu reakcji wiązania  $Cu(II)$  z  $A\beta_{4-16}$ , przechodzącego przez dwa stany pośrednie (Forma I i Forma II), poprzedzające tworzenie się ostatecznego trwałego kompleksu. Badane mechanizmy asocjacji i dysocjacji  $Cu(II)$  z peptydami  $A\beta_{4-x}$  pokazały, iż odkryte stany pośrednie mają długie czasy życia, porównywalne z odstępami między impulsami uwalniania neuroprzekazników w glutaminergicznych

szlakach neuronalnych. Odkrycie to przedstawia te kompleksy pośrednie jako wysoce prawdopodobne czynniki przyczyniające się do biologicznej aktywności  $A\beta_{4-42}$ . Wcześniejsze odkrycie krótkich oligopeptydów, takich jak  $A\beta_{4-9}$  i  $A\beta_{12-16}$ , ich potencjalnej zdolności do przekraczania bariery krew-mózg (BBB) z uwagi na rozmiar i jeszcze większego powinowactwa do  $Cu(II)$  niż  $A\beta_{4-16}$ , zasugerowało ich rolę w usuwaniu nadmiaru miedzi z mózgu. Aby sprawdzić tę właściwość, zbadano ich ekspozycję na GSH - główny czynnik redukujący jony  $Cu(II)$  wchodzące do wnętrza komórki. Badania kinetyczne wykazały, że  $Cu(II)A\beta_{4-16}$  i  $Cu(II)A\beta_{4-9}$  są dostatecznie odporne kinetycznie na redukcję przez GSH w fizjologicznym stężeniu, stąd ich przeżycie w cytozolu komórkowym przez wiele godzin bez wywołania uszkodzeń oksydacyjnych jest bardzo prawdopodobne. Natomiast  $Cu(II)A\beta_{12-16}$  i  $Cu(II)A\beta_{1-16}$  nie wykazały takiej zdolności. Wyniki te dodatkowo potwierdzają sformułowany w tej rozprawie pogląd, że kompleksy  $Cu(II)A\beta_{4-x}$  są dobrymi kandydatami do przenoszenia  $Cu(II)$  przez BBB oraz między środowiskiem wewnątrz- i zewnątrzkomórkowym w mózgu. Suma tych faktów silnie potwierdza postulat fizjologicznej roli  $A\beta_{4-42}$ , głównego przedstawiciela rodziny  $A\beta_{4-x}$ , jako „zmiatacza”  $Cu(II)$  w szczelinie synaptycznej, który przez to działanie umożliwia szybkie przywrócenie warunków wyjściowych, umożliwiając tym samym uwolnienie kolejnej porcji neuroprzekaźnika.

*Ewelina Skłaniak*