

Gelation, characterization and enhancement of Amyloid networks and modelling of Fibronectin binding towards Growth Factors

A dissertation submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

Mattia Usuelli

Laurea Magistrale in Ingegneria Chimica, Politecnico di Milano

born on 4th September 1991

citizen of Italy

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Raffaele Mezzenga, Examiner

Prof. Dr. Roberto Piazza, Co-Examiner

Dr. Gustav Nyström, Co-Examiner

Summary

Nature is a constant inspiration for us. The mechanisms on which life is based are, at the same time, incredibly complex and surprisingly harmonious; individual macromolecules interact in a seemingly chaotic dance, but which has an order and a melody.

Amyloid fibrils are a class of bio-macromolecules that is being increasingly brought under the spotlight. *In vivo*, amyloids can be both pathological and functional. In fact, they are responsible of severely debilitating diseases, such as Alzheimer's and Parkinson's, but they also assume pivotal roles in key biological functions. *In vitro*, amyloid fibrils synthesized from food sources are more and more used as building blocks of innovative materials, the applications of which range from filtration of water pollutants to drug delivery. Consequently, extensive studies on how amyloid fibrils interact and how they form gels are pivotal, both for finding novel therapeutic approaches for the above-mentioned diseases, and for optimizing the synthesis of materials that meet human needs, while preserving the resilience of our Planet.

Fibronectin is another important biomolecule, which is largely present in the extra-cellular matrix. The heparin-mediated conformational dance of fibronectin tunes its interactions with other key molecules, such as growth factors and, among these, the Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF, the role of which is crucial for angiogenesis). A deeper understanding of how fibronectin and VEGF interact would lead to the possibility of synthesizing more effective drugs, the target of which is angiogenesis in pathological conditions (like cancer).

This doctoral thesis contains studies on both the biomolecules mentioned above.

Regarding amyloid fibrils, the aim of the studies we present is to characterize amyloid fibril gels (both over the course of their formation and structurally, when already formed), and to strengthen them through inclusion of polysaccharides. More in details, we show that in amyloid gels, the preparation of which is based on the passage of ions through a semipermeable membrane, the dynamic of the ions is non-diffusive but, instead, advective. This suggests the presence of a force that acts on the ions, that we hypothesize being arising from the Donnan effect. We also show that the ionic strength of the gels has a key role in tuning the entity and the frequency of restructuring phenomena, the role of which is to release the stresses accumulated by the fibrils over the gelation process. From a structural characterisation perspective, we show that the mesh size of amyloid networks can be measured through Dynamic Light Scattering (DLS) experiments, combining the theory of scattering from semi-flexible polymers together with a rigorous approach that takes the nonergodicity of the studied materials into account. Finally, with a more applied focus, we show an approach to strengthen amyloid fibril hydrogels and aerogels through inclusion of polysaccharides. The sugar chains improve the compression resistance of the materials, without interfering with the surface properties of the amyloid fibrils.

In the case of fibronectin, we show how this molecule is able to bind not only with VEGF, but also with an important receptor of this growth factor (VEGFR2). More in detail, heparin has an important role in extending fibronectin molecules, exposing binding sites that can interact with both VEGF and VEGFR2. The interactions are favoured at acidic pH, due to modifications in the protonation state of the binding sites of the ligands: this piece of information deepens the understanding of how hypoxia and low extracellular pH are related to angiogenesis. Moreover, thanks to Surface Plasmon Resonance studies and their modeling, we show that not all the fibronectin molecules interact equally with VEGF and VEGFR2, and can instead be divided into two classes, with different kinetics and affinities.

To resume, the presented studies broaden the actual knowledge on amyloid fibrils and fibronectin, and pave the way for synthesizing new functional materials and for facing severe diseases with novel therapeutic approaches.

Riassunto

La Natura ci è di costante ispirazione. I meccanismi sui quali la vita si basa sono, allo stesso tempo, incredibilmente complessi e sorprendentemente armoniosi; singole macromolecole interagiscono in una danza che sembra caotica, ma che ha un ordine e una melodia.

Le fibrille amiloidi sono una classe di aggregati bio-molecolari che è sempre maggiormente sotto i riflettori. *In vivo*, le fibrille amiloidi possono essere sia patogene che funzionali. Infatti, sono responsabili di patologie gravemente impattanti, come quelle di Alzheimer e di Parkinson, ma possono anche assumere ruoli importanti in meccanismi biologici chiave. *In vitro*, fibrille amiloidi sintetizzate da fonti alimentari sono via via maggiormente utilizzate come elementi costitutivi di materiali funzionali, le cui applicazioni spaziano dalla filtrazione di inquinanti acquosi al trasporto di farmaci. Di conseguenza, studi approfonditi su come le fibrille amiloidi interagiscono e su come formino gel sono di fondamentale importanza, sia per trovare approcci terapeutici per le patologie menzionate sopra, sia per ottimizzare la sintesi di materiali che soddisfino i bisogni umani e che, nel contempo, salvaguardino la resilienza del nostro Pianeta.

Un'altra biomolecola importante è la fibronectina, ampiamente presente nella matrice extracellulare. La danza conformazionale della fibronectina, mediata dall'eparina, regola le sue interazioni con altre molecole chiave, come i fattori di crescita e, nello specifico, il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (di importanza cruciale per l'angiogenesi). Una maggiore comprensione dei meccanismi interattivi tra fibronectina e il fattore di crescita menzionato, renderebbe possibile la sintesi di farmaci più efficaci che agiscano sull'angiogenesi in condizioni patologiche (come i tumori).

Questa tesi di dottorato contiene studi su entrambe le biomolecole citate sopra.

Nel caso delle fibrille amiloidi, lo scopo degli studi che presentiamo è sia di caratterizzare i gel di fibre amiloidi (durante il corso della loro formazione e strutturalmente, una volta formati), che di rafforzarli mediante l'inclusione di polisaccaridi. Più nello specifico, mostriamo che in gel la cui preparazione è effettuata mediante il passaggio di ioni attraverso una membrana semi-permeabile, la dinamica degli ioni è non-diffusiva ma, piuttosto, avvertiva. Questo suggerisce la presenza di una forza che agisce sugli ioni, che ipotizziamo abbia origine dall'effetto Donnan. Inoltre, mostriamo come la forza ionica dei gel rivesta un contributo determinante nel definire l'entità e la frequenza dei fenomeni di ristrutturazione, il cui ruolo è quello di rilasciare lo stress accumulato dalle fibrille durante il processo di gelazione. Per quanto riguarda la caratterizzazione strutturale, mostriamo che la distanza caratteristica tra le fibrille amiloidi nei gel (in inglese, denominata «mesh size») può essere ricavata da esperimenti di Dynamic Light Scattering (DLS), combinando la teoria di scattering da polimeri semi-flessibili con un rigoroso protocollo per tenere in considerazione la non-ergodicità dei materiali analizzati. Infine, con un risvolto maggiormente applicativo, mostriamo una via per rafforzare i gel di fibrille amiloidi mediante l'inclusione di polisaccaridi. Le catene di zuccheri incrementano la resistenza a compressione del materiale, senza interferire con le proprietà superficiali delle fibrille amiloidi.

Nel campo della fibronectina, mostriamo come questa sia capace di interagire non solamente con il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (in inglese, VEGF), ma anche con un suo importante recettore (in inglese, VEGFR2). Maggiormente in dettaglio, l'eparina riveste l'importante ruolo di estendere le molecole di fibronectina, esponendo al contempo siti interattivi che possono interagire con i due ligandi menzionati. L'interazione è favorita a pH acido, che ha il ruolo di modificare la protonazione dei siti interattivi sui ligandi: questa informazione approfondisce come ipossia e basso pH extracellulare siano legate all'angiogenesi. Inoltre, mediante studi di Risonanza Plasmonica di Superficie e opportuna modellizzazione, mostriamo come non tutte le molecole di fibronectina interagiscano ugualmente con VEGF e VEGFR2, e possano invece essere divise in due classi con diverse cinetiche e affinità.

Riassumendo, gli studi presentati incrementano la conoscenza attuale sulle fibrille amiloidi e sulla fibronectina, e mostrano nuove possibilità per sintetizzare materiali funzionali e per fronteggiare malattie debilitanti con approcci terapeutici innovativi.