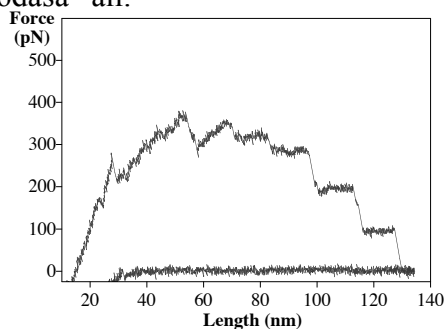


ZÁRÓBESZÁMOLÓ

Pályázatban amiloid béta ($A\beta$) fibrillumokat, és ehhez kapcsolódóan hasonló természetű amiloid fibrillumokat és egyéb fibrilláris biomolekuláris rendszereket (pl. dezmin, miozin) vizsgáltunk. A kísérletekben atomerőmikroszkóp segítségével vizsgáltuk a fibrillumok topográfiai szerkezetét és mechanikai erővezérelt szerkezeti átalakulásait. Különböző amiloid fibrillumok nanomechanikai ujjlenyomatát mértük meg. Felfedeztük, hogy az $A\beta$ peptid egy fragmentuma, az $A\beta_{25-35}$, trigonálisan orientált hálózatot hoz létre csillám felszínen. Ez nanotechnológiai alkalmazások lehetőségét veti fel, amellyel kapcsolatban szabadalmi bejelentést indítottunk el. Új mérési technológiákat fejlesztettünk ki: térben és időben szinkronizált TIRF/AFM, illetve pásztázó próba kimográfia. A nanomechanikai módszereinket sikerrel adaptáltuk intermedier filamentumokra és miozin vastag filamentumokra. Az egyes tematikus eredményeket alább részletezem:

1. Amyloid β_{1-40} és $A\beta_{25-35}$ fibrillumok nanomechanikája

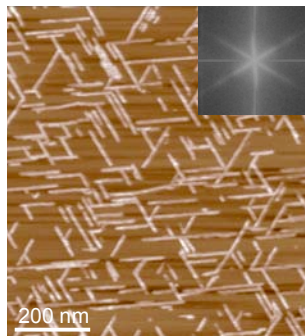
Az $A\beta$ -fibrillumok az amyloid precursor protein (APP)-ből enzimatikusan lehasított, 39-43 aminosav hosszúságú $A\beta$ -peptid aggregációjából keletkeznek. Az $A\beta$ -fibrillumok Alzheimer-kóros betegek központi idegrendszerében a fehérállományban felszaporodó amiloid plakkok fő alkotóelemei. A legfőbb komponens az $A\beta_{1-42}$, de emellett nagy mennyiségben megtalálható az $A\beta_{1-40}$. Az $A\beta_{25-35}$ az $A\beta$ -peptid 25-35-ös aminosavszakaszából áll és fibrillumképzésre képes. Munkánkban az $A\beta_{1-40}$ és $A\beta_{25-35}$ fibrillumok nanomechanikai tulajdonságait vizsgáltuk AFM segítségével. Az AFM tujét felszínadszorbeált fibrillumok felületére nyomtuk, majd onnan adott sebességgel elhúzva megmértük a fibrillum rugalmasságát és erővezérelt szerkezeti átmeneteit. Két alapvető mechanikai sajátosságot figyeltünk meg: 1) nem-lineáris rugalmas válasz és 2) erő plató. A nem-lineáris erőgörbére jól illeszthető volt a féregszerű láncmodell. Az erő platóra a konstans erő mellett növekedő molekulahossz volt jellemző. A plató végén az erő hirtelen, egy lépésben nullára esik. Gyakran megfigyelük az elemi mechanikai jelenségek hierarchikus egymásra épülését, például erőlépcső formájában (**1. ábra**). Az erő plató magyarázata az, hogy egy protofilamentumot vagy $A\beta$ -peptidekből álló lemezt fejtünk le a fibrillum felszínéről. A hierarchikus erő plató azzal magyarázható, hogy egyszerre több filamentumot fogunk és húzunk. Amint közülük egy végleg leszakad, az erő diszkrét módon csökken, és a folyamat mindaddig folytatódik, amíg az összes megfogott protofilamentumot le nem fejtjük a fibrillum felületéről. A folyamat hasonlítható egy zippzár kinyitásához (szétzippzározás). Az erő platók magassága ("plató erő") diszkrét eloszlást mutatott, melyben a csúcsok egy egységnyi plató erőnél és ennek egész számú többszöröseinél jelentkeznek. Az egységnyi plató erő megfeleltethető az egyetlen protofibrillum lezippzározásához. Az egységnyi plató erő különbözik $A\beta_{1-40}$ és $A\beta_{25-35}$ esetében, ami a protofilamentumokat összetartó erők különböző természetére utal. A plató-erő eloszlás az adott $A\beta$ -fibrillum egyfajta nanomechanikai ujjlenyomatát adja. A szétzippzározásról kimutattuk, hogy reverzibilis szerkezeti átmenet. Azaz a protofilamentumok képesek nagy sebességgel visszakapcsolódni, visszafeküdni a fibrillum felületére (összezippzározódás). Lehetséges hogy a kooperatív amyloid fibrillumképződés hátterében a protofilamentumok mechanikai "összezippzározódása" áll.



1. ábra. $A\beta_{1-40}$ fibrillumok nanomechanikai manipulálása során regisztrált erőlépcső.

2. Amyloid β 25-35 fibrillumok orientációja csillám felszínén

Az A β 25-35 önmagában is mutatja az A β toxikus hatásait, és léteznek feltételezések, miszerint az Alzheimer kórban előfordulhat az A β 25-35 mint proteolitikus termék. Munkánkban csillámfelszínhez adszorbeált A β 25-35 fibrillumok morfológiáját vizsgáltuk AFM segítségével. A fibrillumok nem random módon, hanem sajátos trigonális elrendeződésben orientálódtak a felszínen (**2. ábra**). A fő orientációk által bezárt szög 120° volt. Kimutattuk, hogy az A β 25-35 fibrillumok csillámhoz való kötődése erősen K-ion függő és kooperatív. A K^+ koncentráció kismértékű (15 mM) megnövelése is akadályozta a fibrillumok felületre való kitapadását, ugyanakkor a Na^+ koncentrációt akár 500 mM-is megemelhetjük a kötődés jelentős akadályozása nélkül. A már kitapadt fibrillumok esetében ugyanakkor a K^+ koncentrációt is jelentősen meg kellett emelnünk a disszociáció kiváltásához. Feltehetően az A β 25-35 fibrillumok mentén sorakozó, erősen töltött Lys28 oldalláncok határozzák meg a felszíni kötődési sajátosságokat, és a fibrillum egy pozitívan töltött molekulárúdként fogható fel. A pozitív oldalláncok feltehetően beleilleszkednek a csillám felszínén található, oxigén atomok által közrefogott, hexagonális felszíni elrendeződést mutató K^+ -t kötő zsebbe. K^+ hiányában az A β 25-35 fibrillumok a K-kötőzsebek orientációjának megfelelően kialakítják a trigonális felszíni elrendeződést. A megfigyelésnek fontos szerepe van az A β 25-35 fibrillumok sejtfelszíni kapcsolódási folyamataiban. A munkából számos konferencia prezentáció, referált folyóiratban (Biophysical Journal) megjelent absztrakt, illetve egy eredeti közlemény (Nanotechnology) született.



2. ábra. Trigonálisan orientált A β 25-35 fibrillumok csillám felszínén. AFM felvétel. Betétábra: Az AFM kép 2D FFT-je.

3. A Lys28 acetiláció hatása az A β 25-35 fibrillumok nanomechanikájára.

Korábbi munkánkban kimutattuk, hogy az A β fibrillumok szétzippzározásához szükséges erő (plató erő) különbözik A β 1-40 és A β 25-35 esetén. A feltételezésünk az, hogy a plató erő nagyságát a protofilamentumokat összetartó kölcsönhatások, és emiatt a peptid aminosav oldalláncainak kémiai tulajdonságai határozzák meg. Az A β 25-35 fibrillumok nagy plató erejének (42 pN) háttérében a Lys28 és a szomszédos peptid Met35 aminosavak közötti elektrostatikus kölcsönhatás állhat. A feltételezés tesztelésére megvizsgáltuk a lys28 ϵ -amino acetilálásának hatását a fibrillum nanomechanikai ujjlenyomatára. Az acetiláció hatására a plató erő felére (21 pN) csökkent, arra utalva, hogy a módosítás hatására meggyengült a protofilamentumokat összetartó kölcsönhatás. Feltehetően az acetil csoport szerikus hatása vezetett a fibrillumok mechanikai stabilitásának csökkenéséhez. Kísérleti eredményeinket számítógépes szimulációval reprodukálni tudtuk.

4. Amyloid β 1-42 fibrillumok mechanikai manipulálása

Az A β 1-42 fibrillumok a teljes A β peptidből kialakuló, az Alzheimer-kór patogenezisében nagy szerepet játszó fibrillumok. Kísérleteinkben az A β 1-42 peptidből növesztett fibrillumok nanomechanikai tulajdonságait vizsgáltuk, és hasonlítottuk össze más, korábban már vizsgált fibrillumok mechanikai paramétereivel. AFM méréseink alapján balmenetes helikális elrendeződést írtunk le A β 1-42 fibrillumokban. A helikális elrendeződés

modulálta a nanomechanikai erő-platók megjelenését. A plató erő eloszlás alapján az elemi plató erő A β 1-42 fibrillumok esetén 23 pN volt, ami szignifikánsan alacsonyabb, mint A β 1-40 esetén. Jóllehet az A β 1-42 fibrillumok termodinamikai stabilitása nagyobb, mint az A β 1-40 fibrillumoké, eredményeink arra utalnak, hogy az A β 1-42 fibrillumok alacsonyabb mechanikai stabilitással rendelkeznek. A megfigyelés hátterében a mechanikai erő fibrillumokhoz viszonyított irányának problémája állhat.

5. Nanomechanikai technikák adaptálása intermedier filamentumokra

Kísérleteinkben dezmin filamentumok nanomechanikai tulajdonságait vizsgáltuk egyedi filamentumok manipulálásával. A regisztrált komplex, hierarchikus erőgörbékben visszatérő motívumokat azonosítottunk, melyek a dezmin rugalmasságával és szerkezetével állhatnak kapcsolatban. Mechanikai modellünkben a dezmin filamentumok viszkózus tulajdonságait a domén kitekeredés és domén szétesésű folyamatok határozzák meg, míg a rugalmas tulajdonságok a filamentumok nem-lineáris elaszticitására vezethetők vissza.

6. Térben és időben szinkronizált teljes belső visszaverődés fluoreszcencia és atomerőmikroszkópia fejlesztése

Kifejlesztettünk egy különleges képalkotó módszert, melyben a fluoreszcencia és atomerőmikroszkópia ötvöződik. A módszer a szinkronizált teljes belső visszaverődés fluoreszcencia és atomerőmikroszkópia (STIRF-AFM). A STIRF-AFM segítségével térben és időben szinkronizált módon lehet egyedi molekulák fluoreszcenciáját és mechanikai tulajdonságait vizsgálni (**3. ábra**). A módszerrel sikerrel vizsgáltunk fluoreszcensen megjelölt amiloid fibrillumokat.

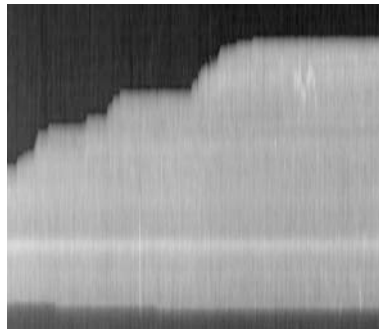


3. ábra. Szinkronizált TIRF/AFM segítségével regisztrált kép sejt felületről

7. A β -fibrillumok nagyfelbontású növekedési dinamikája pásztázó próba kimográfiával.

Egyedi amiloid fibrillumok növekedési dinamikájának nagy tér- és időfelbontású követése érdekében nemrégiben egy új, egyszerű AFM alkalmazást vezettünk be, melyet pásztázó próba kimográfiának nevezünk el (**4. ábra**). A módszerben felhasználtuk az A β 25-35 fibrillumok csillámfelszíni orientációját. Az A β 25-35 fibrillumok pásztázó próba kimogramjai alapján számos megfigyelést tettünk. A fibrillumok mindkét végükön nőnek, de az egyik végen (gyors vég) a növekedés jóval gyorsabb mint a másikon (lassú vég). A fibrillumok nem csupán a csillám felületen növekednek, hanem egy már meglévő fibrillum felületén is. Az ilyen fibrillum növekedési dinamikája hasonló a csillám felületén növekedőéhez. A legszembeötlőbb jelenség azonban a diszkontinuus, ugrásszerű növekedés. Hirtelen, gyors, lépésszerű növekedési periódusok váltakoznak növekedési szünetekkel vagy pauzákkal. Az alkalmazott pásztázó próba kimográfia eddig soha nem tapasztalt részletességű bepillantást enged egyedi A β -fibrillumok polimerizációs dinamikájába. Kimutattuk, hogy a diszkontinuus növekedési

dinamika nem csupán az A β 25-35 fibrillumok esetében tapasztalható, hanem grafit felszínen növekedő A β 1-42 fibrillumok esetében is. A munkából számos konferencia prezentáció, referált folyóiratban megjelent absztrakt, illetve egy eredeti közlemény (PNAS) született.



4. ábra. Pásztázó próba kimogram.
A poláris, diszkontinuus fibrillumnövekedés jól látható.

8. Mutáns, A β 25-35_N27C fibrillumok vizsgálata

A csillámfelszínen kialakuló orientált A β 25-35 fibrillaris hálózat elvben felhasználható nanotechnológiai alkalmazásokra. Az orientált fibrillumok ugyanis nanoelektronikai hálózat alapját képezhetik, továbbá szenzorikai chipekben is alkalmazásra lelhetnek. Ahhoz, hogy az amiloid hálózatot alkalmazhassuk, kémiaiilag megcímezhetővé kell tennünk a peptidet. Ennek érdekében elkészítettük az A β 25-35 peptid mutáns formáját, amelyben az Asn27 aminosavat ciszteinre cseréltük. Kimutattuk, hogy a mutáns, A β 25-35_N27C peptid is képes orientált hálózatot kialakítani csillám felszínen. Azt is kimutattuk, hogy a kialakult fibrillumok cisztein oldalláncai kémiaiilag hozzáférhetőek. A munkából egy konferencia absztrakt és egy eredeti közleményt jelent meg (Eur J Biophys).

9. Hőmérséklet hatása A β 25-35 fibrillaris hálózatra

Ahhoz, hogy a csillám felületen kialakított orientált A β 25-35 hálózat valóban alkalmazásra leljen nanotechnológiai felhasználásokban, részletesen meg kell ismernünk fizikai és kémiai tulajdonságait. Egyik legfontosabb tulajdonság a termikus stabilitás. A fibrillumok megtartották preferált orientációjukat a vizsgált hőmérséklet tartományon (30-70 fok), jelezve, hogy az orientációs újrendeződés gátolt folyamat. A fibrillumok hossza rövidült a hőmérséklet emelésével, ami arra utal, hogy a peptidek közötti intermolekuláris kölcsönhatások fokozatosan felszakadtak. 40-50 fok között a fibrillumok számában jelentős csökkenést figyeltünk meg, ami arra utal, hogy belső szerkezeti átmenet hatására a felszínhez való affinitásuk gyengült. A fibrillum vastagság eloszlása érdekes változást mutatott a vizsgált hőmérséklet tartományban: 30-45 fok között az átlagos fibrillum vastagság csökkent, de egyúttal multimodális eloszlást tapasztaltunk. 45-70 fok között a multimodalitás eltűnt, és az átlagos fibrillum vastagság fokozatosan nőtt. A hő-indukált vastagodás hátrébbben szerkezeti változás, vagy felgyorsult intrafibrillaris fluktuációk állhatnak. A munkából egy eredeti jelent meg (Prog Coll Polymer Sci).

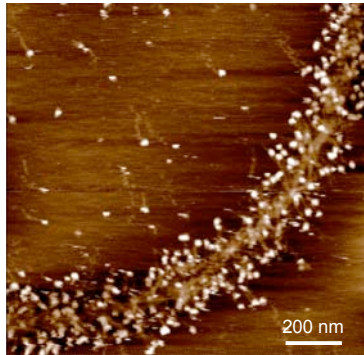
10. Nanomechanikai technikák adaptálása miozin vastag filamentumokra

Kísérleteinkben szintetikus miozin filamentumok nanomechanikai tulajdonságait vizsgáltuk egyedi filamentumok manipulálásával (**5. ábra**). A regisztrált erőgörbékben periódikusan megjelentő átmeneteket azonosítottunk. A periodicitás összefüggésbe hozható a miozin rúd mentén korábban leírt alternáló töltött molekulaszakaszokkal. Kísérleti eredményeink az első direkt bizonyíték arra, hogy a miozin vastag filamentum valóban az alternáló, periódikus töltések közötti kölcsönhatások segítségével stabilizálódik. Egyúttal azt is kimutattuk, hogy a mechanikailag vezérelt folyamat majdnem reverzibilis, és emiatt a vastag filamentumok a miozin molekulák összezipzározódásával alakulhatnak ki. A jelenség nagyon hasonlít az amiloid fibrillumok esetében megfigyelt folyamattal. A munkából több konferencia

OTKA nyilvántartási szám: **OTKA T049591**

Ifj. Kellermayer: Amyloid β -fibrillumok nanomechanikája

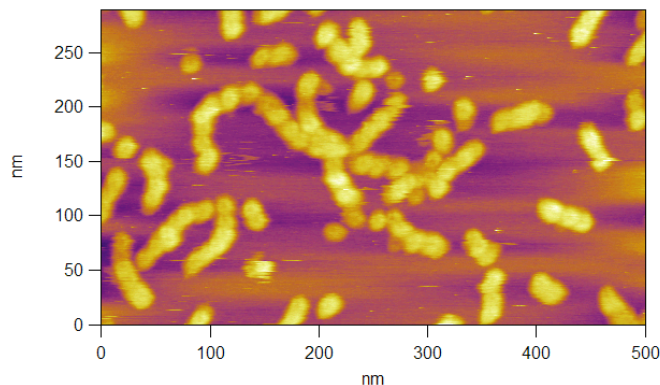
prezentáció, referált folyóiratban megjelent absztrakt, illetve egy eredeti közlemény (J Mol Biol) született.



5. ábra. Miozin vastag filamentum csillám felületen. Natív készítmény vizes pufferközegben. A filamentum kitüntetett pontjain végeztünk nanomechanikai manipulációt.

11. Transthyretin amyloid fibrillumok molekuláris biofizikája

Nemzetközi együttműködés keretében, Ana Damas professzor munkacsoportjával (University of Porto, Portugália) közösen elkezdődött a transthyretin amiloid fibrillumok nanobiofizikai vizsgálata. Az együttműködést részben a jelen OTKA pályázatot kiegészítő IN 70320 számú Nemzetközi Kiegészítő OTKA pályázatból finanszíroztuk. Több kölcsönös rövid tanulmányút és felkért tudományos előadás, illetve három hosszabb, egy hónapos tanulmányút történt. Sikeresen követtük AFM segítségével a transthyretin aggregációs folyamatát, illetve befejeztünk nanomechanikai méréseket a különböző transthyretin oligomér és fibrilláris formákon (**6. ábra**). A munkából több konferencia prezentáció született, és egy kézirat van előkészületben.



6. ábra. Transthyretin amiloid protofilamentumok AFM képe. Natív készítmény vizes pufferközegben.

2009. február 26.

Dr. Kellermayer Miklós