

Templát-vezérelt amiloid fibrillogenézis biofizikai vizsgálata

Doktori értekezés

Murvai Csilla Ünige

Semmelweis Egyetem

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kellermayer Miklós S. Z. egyetemi tanár, az MTA doktora

Hivatalos bírálók:

Dr. Röhlich Pál, professzor emeritus, az MTA doktora

Dr. Váró György tudományos tanácsadó, az MTA doktora

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Csermely Péter egyetemi tanár, az MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Káldi Krisztina egyetemi docens, PhD

Dr. Derényi Imre egyetemi docens, az MTA doktora

Budapest

2012

TARTALOMJEGYZÉK

I.	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
II.	BEVEZETÉS	4
II. 1.	Az Alzheimer-kór, mint fehérjeterjedési betegség	4
II. 2.	Az amiloid fibrillumok vizsgálómódszerei	6
II. 3.	Különböző A β -fibrillumok feltételezett szerkezete.....	6
II. 4.	Béta-lemez romboló peptidek.....	11
II. 5.	Peptid alapú nanovezeték hálózatok	13
II. 6.	Amiloid fibrillumok vizsgálata atomerő-mikroszkóppal	13
II. 6. 1.	Az atomerő-mikroszkóp működési elve és sajátosságai	14
II. 6. 2.	Erőspektroszkópia	16
II. 7.	Fourier transzformációs infravörös (FTIR) spektroszkópia	17
III.	CÉLKITŰZÉSEK.....	20
IV.	MÓDSZEREK	22
IV. 1.	A kísérletekhez felhasznált A β -peptidek szekvenciái	22
IV. 2.	Amiloid fibrillumok növesztése	22
IV. 3.	Alkalmazott szubsztrát felületek	23
IV. 4.	A minták kezelése	24
IV. 5.	Atomerő-mikroszkópia	25
IV. 5. 1.	Az MFP3D atomerő-mikroszkóp	25
IV. 5. 2.	Erőspektroszkópia	26
IV. 5. 3.	A képalkotáshoz használt rugólapkák	27
IV. 5. 4.	Az atomerő-mikroszkópos képek analízise	28
IV. 6.	FTIR spektroszkópia	30
V.	EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS	31
V. 1.	Csillámfelületen orientált amiloid β 25-35 modell-rendszer jellemzése	31
V. 1. 1.	A fibrillumok morfológiája és belső szerkezeti dinamikája	31
V. 1. 2.	A fibrillumok erőspektroszkópiás vizsgálata	35
V. 2.	Oldatban, közel egyensúlyi körülmények között összeállt valamint epitaxiálisan növesztett A β 25-35 amiloid fibrillumok összehasonlító vizsgálata.....	38
V. 2. 1.	A fibrillumok strukturális hierarchiája és orientációjuk csillámon.....	38

V. 2. 2. A fibrillumok nanomechanikája.....	44
V. 2. 3. A fibrillumok FTIR spektroszkópiája.....	46
V. 3. Az LPFFD béta-lemez romboló peptid hatása orientált A β 25-35 hálózatra	50
V. 3. 1. Az LPFFD hatása az a fibrillumok orientációjára, szerkezetére, a fibrillum-képződés dinamikájára	51
V. 3. 1. 1. Felületi orientáció	51
V. 3. 1. 2. A fibrillumok magassága	51
V. 3. 1. 3. A fibrillumok növekedési kinetikája	52
V. 3. 2. Az LPFFD hatása a fibrillumok szétesésére	54
V. 3. 3. Az LPFFD hatása a fibrillumok nanomechanikai tulajdonságára	56
V. 4. N27C mutáns A β 25-35 peptid epitaxiálisan orientált hálózatának jellemzése.....	58
V. 4. 1. A fibrillumok orientációja csillámfelszínen	58
V. 4. 2. Kationok hatása a mutáns fibrillumok epitaxiális növekedésére	60
V. 4. 3. A hálózat kialakulásának időtől való függése	61
V. 4. 4. A fibrillumok nanomechanikai vizsgálata.....	62
VI. KÖVETKEZTETÉSEK	65
VII. ÖSSZEFOGLALÁS	71
VIII. SUMMARY	72
IX. IRODALOMJEGYZÉK	74
X. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	82
XI. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	83

I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE:

A β – béta amiloid

A β 25-35 – a teljes hosszúságú béta amiloid peptid tizenegy aminosavnyi fragmentuma

A β 25-35_N27C – Glu27Cys mutáns A β 25-35 peptid

AFM – atomic force microscope (atomerő-mikroszkóp)

APP – amiloid prekursor protein

BSB – beta-sheet-breaker (béta-lemez romboló)

CD – cirkuláris dikroizmus

DMSO – dimethyl sulfoxide

EPR – electron paramagnetic resonance (elektron paramágneses rezonancia)

GOPS – 3-glycidiloxypropyl-trimethoxysilane

FTIR-Spectroscopy – Fourier Transformation Infrared Spectroscopy (Fourier transzformációs infravörös spektroszkópia)

IR – infrared (infravörös)

MIR – middle infrared (középső infravörös tartomány)

MFP – molecular force probe

PBS – phosphate buffered saline (foszfátpuffer)

PSD – position sensitive diode (helyzetérzékelő fotódióda)

SAXS – small angle X ray scattering (kisszögű röntgenszórás)

ssNMR – solid-state nuclear magnetic resonance (szilárd fázisú magmágneses rezonancia)

STEM – scanning transmission electron microscopy (pásztázó transzmissziós elektronmikroszkópia)

STM – scanning tunneling microscopy (pásztázó alagúteffektus-mikroszkópia)

TEM – transmission electron microscopy (transzmissziós elektronmikroszkópia)

II. BEVEZETÉS

II. 1. AZ ALZHEIMER KÓR, MINT FEHÉRJETEKEREDÉSI BETEGSÉG

Az Alzheimer-kór progresszív neurodegeneratív megbetegedés, melyet a kognitív funkciók, az ítélőképesség, felfogóképesség és a személyiség visszafordíthatatlan, gyors hanyatlása jellemez. Végül azon jellegzetes képességeit és értékeit is elveszti az egyén, melyek addigi életminőségét, létezését alapvetően meghatározták (Cummings 2004). Az Alzheimer-kórt Alois Alzheimer írta le 1907-ben. A kórkép elsődleges hisztopatológiai jellemzőiként említhetők a szenilis plakkok illetve neurofibrilláris kötegek kialakulása bizonyos agyterületeken, továbbá az agyszövet nagyfokú atrófiája (Hardy és mtsai 1991, Hardy és Selkoe 2002).

A bonyolult összetételű szenilis plakkok egy aggregálódott fibrilláris béta amidoid (A β) mag körül helyezkednek el; ezek a plakkok a központi amidoid magon kívül disztrófikus dentriteket és axonokat, valamint reaktív asztrocitákat és aktivált mikroglia sejteket tartalmaznak (Glenner és mtsai 1984; Wong és mtsai 1985). A neurofibrilláris kötegek "abnormálisan" foszforilált mikrotubulus kötő tau-fehérjékből álló intracelluláris zárványok a neuronok sejttesteiben (Grundke-Iqbal és mtsai 1986a; Grundke-Iqbal és mtsai 1986b; Kosik és mtsai 1986; Wood és mtsai 1986).

Az amidoid megnevezést Rudolf Virchow vezette be 1854-ben egy keményítőszerű, pozitív jód-reakciót mutató abnormális extracelluláris szöveti lerakódás leírására (Sipe és mtsai 2000). 1859-ben Nikolaus Friedreich és August Kekulé bebizonyították, hogy a lerakódások nem tartalmaznak keményítőt, ellenben fehérjetermészetűek, és az adott fehérje rendellenes tekeredése, gombolyodása (folding) révén jönnek létre. Ennek ellenére az eredeti Virchow-féle terminológia máig fennmaradt (Kyle 2001). Az amidoidózist rendellenes fehérjetekeredési betegségnek (protein misfolding disease) is nevezik (Dobson 2003; Selkoe 2003a, Selkoe 2003b). Az amidoidok biokémiai felépítésükben igen különbözőek lehetnek: számos különböző kémiai összetételű fehérje képes amidoidot formálni, mint például az α -synuclein, a β_2 -microglobulin, a transthyretin, az inzulin, stb. (Lashuel és mtsai 2006). Az A β peptidek az amidoid prekursor protein (APP) (Millucci és mtsai 2009) lebontásakor keletkeznek. Az APP transzmembrán fehérje lebontásában 3 enzim játszik kulcsszerepet: az α -, β - és

γ -szekretáz. Az α -szekretáz hasítási termékei vízben oldódó, nem toxikus peptidek. A β - és γ -szekretáz proteolitikus hasítási termékeiből viszont olyan 39-43 aminosav hosszúságú A β peptidek származnak, melyek aggregációja során oldhatatlan amiloid plakkok jönnek létre.

Mai napig vita tárgyát képezi a betegség elsődleges molekuláris háttere. A jelenlegi legelfogadottabb elmélet szerint a betegség az A β peptidek abnormális felhalmozódásával kezdődik, ami egy összetett patológiás láncreakciót (kaszkádot) vált ki. Az elmélet az „amiloid kaszkád hipotézis” nevet viseli, és támogatói közé számos olyan tekintélyes kutató tartozik, mint Dennis Selkoe, John Hardy, Colin Masters, Konrad Beyreuther, és Blas Frangione (Selkoe 2003; Hardy 2006).

A tudomány jelenlegi állása szerint nem létezik hatékony gyógymód az Alzheimer kór kezelésére. Mindazonáltal egyre reménytelibbé válik a probléma megoldása. Az Alzheimer kór terápiás lehetőségei közt megemlíthető a szekretáz-enzim gátlása, a β -amiloidok blokkolása funkcionális antagonistákkal, valamint az amiloid-aggregátum képződésének megakadályozása β -lemez rombolókkal (BSB).

Egy friss felmérés szerint a neurodegeneratív betegségben szenvedők száma az előregedő társadalmak miatt húszévente megduplázódik (*World Alzheimer Report 2010*). Fontos tény az is, hogy egyedül az Egyesült Államokban 2010-ben 604 milliárd US dollárt költöttek a demenciás betegek kezelésére és ápolására, mely összeg mellett szinte eltörpülnek a szívbetegségek és daganatos betegségek éves költségei (Abbott 2011). A jelenlegi potenciális gyógyszerek közül a bapineuzumab, a solanezumab, az IVIg és a latrepiridin jutott el a klinikai kutatási vizsgálatok III. fázisáig, de a kutatók szkeptikusak, ezidáig nem sok sikerélménnyel büszkélkedhet ez a terület (Gravitz 2011).

Az Alzheimer kór hosszú eseményláncolatok eredményeképpen jön létre, de egyes láncszemek mai napig ismeretlenek maradtak. Ezért is kiemelt fontosságú, hogy minél többet megtudjunk az Alzheimer kór biológiájáról.

II. 2. AZ AMILOID FIBRILLUMOK VIZSGÁLÓMÓDSZEREI

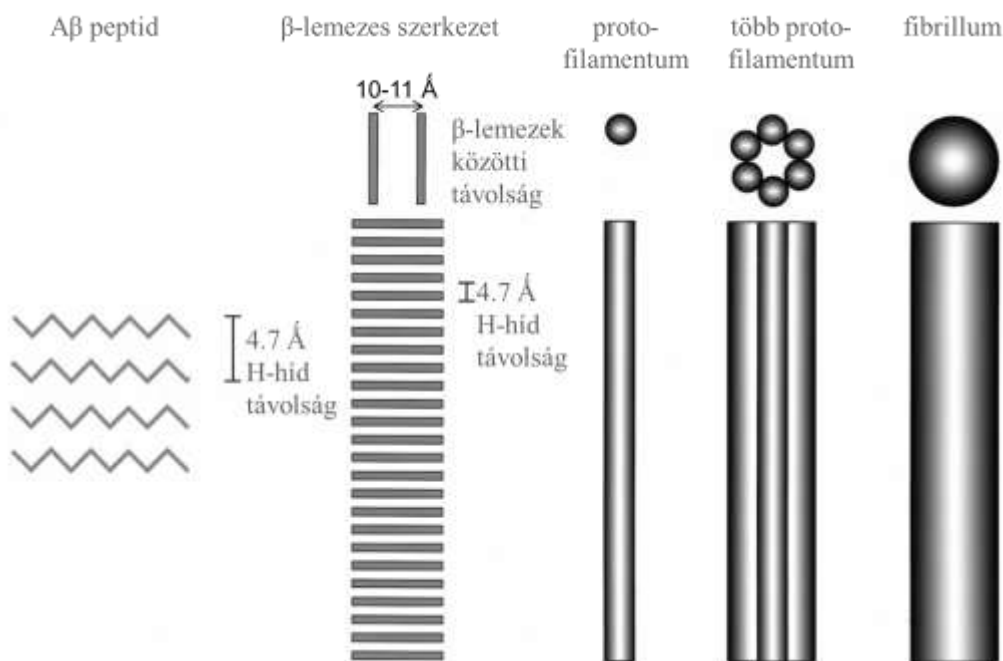
Mivel az amiloid fibrillumok és a belőlük kialakuló aggregátumok vízben oldhatatlanok, valamint az amiloid peptidek nem kristályosíthatók, szerkezetük felderítése komoly nehézségekbe ütközött. Az első szerkezeti információk röntgendiffrakciós mérésekből származnak (Eanes és Glenner 1968), melyek során bizonyítást nyert, hogy az amiloid fibrillumok az őket felépítő fehérje mibenlététől függetlenül szerkezeti alapon egy szupercsaládot alkotnak. A mágneses magrezonancia módszerek is ígéretes új amiloid-szerkezetvizsgáló technológiák. A szilárd fázisú mágneses magrezonancia (ssNMR) spektroszkópia és az elektron paramágneses rezonancia (EPR) spektroszkópia adatai alapján megbízható molekulászerkezeti modelleket állítottak fel (Petkova és mtsai 2002; Torok és mtsai 2002). Az elektronmikroszkópos (STEM, TEM), atomerő-mikroszkópos (AFM) és más pásztázó mikroszkópos (STM) vizsgálómódszerek a fibrillumok morfológiájáról szolgáltatnak értékes információkat (Goldsbury és mtsai 2005). A kémiai festési eljárások eredményeivel együtt ezek a vizsgálómódszerek fektették le az amiloid meghatározásának alapjait. A biokémiai összetételtől függetlenül, az összes amiloid rendelkezik néhány univerzális tulajdonsággal (Makin és Serpell 2005): jellemző rájuk egy sajátos röntgen-diffrakciós mintázat; nem elágazó fibrilláris struktúrákat alkotnak; pozitívan festődnek Thioflavin-T-vel (LeVine 1993) és Kongó-vörös festést követően jellegzetes kettőstörést mutatnak (Nilsson 2004).

II. 3. KÜLÖNBÖZŐ A β -FIBRILLUMOK FELTÉTELEZETT SZERKEZETE

Az amiloidok filamentumszerű aggregátumok, melyek fehérjelerakódás formájában jelennek meg számos betegségben. A **fibrillum/filamentum** elnevezést egymással felcserélhetően használják a szakirodalomban. A szerkezeti biológusok kiterjesztették az amiloid fogalmát a szintetikus és rekombináns polipeptidekből képződő kereszt-beta struktúrákra is (Goldsbury és mtsai 2011).

Az érett fibrillumok rendezett szerkezetű, el nem ágazó struktúrák. A röntgendiffrakciós mintázatukból két karakterisztikus távolság határozható meg: egy a fibrillum hossz tengelyével párhuzamos 10,7 Å ismétlődés valamint a fibrillum

hossztengelyére merőleges 4.7 \AA ismétlődés (kereszt- β struktúra). Az előbbi érték a fibrillum hossz tengelyére merőleges **β -szálak** (= β -redők, peptidek, monomerek) oldalláncai közti távolsággal egyezik meg, az utóbbi pedig a β -szálak közötti hidrogénhid kötések hosszával egyenlő (Kirschner és mtsai 1987; Makin és mtsai 2005; Makin és mtsai. 2006). A β -szálak hidrogén hidakkal kapcsolódnak össze, és ily módon létrehozzák a fibrillumok szerkezeti alapegységeit, a fibrillum hossz tengelyével párhuzamosan futó **protofilamentumokat**. A protofilamentumokat tehát β -redők sora alkotja, melyekben minden szál merőleges a fibrillum tengelyére (Serpell 2000; Makin és mtsai 2005; Makin és mtsai 2006) (**1. ábra**). A fibrillumok számos protofilamentumból állnak, és attól függően, hogy ezek a protofilamentumok egymással párhuzamosan vagy egymás köré csavarodva helyezkednek el, az érett fibrillumok egyenes lefutásúak vagy csavartak, helikálisak lehetnek.



1. Ábra. Az A β -fibrillumok szerkezetére jellemző hierarchikus szerveződés (Serpell 2000).

A **protofibrillum** elnevezés tágabb értelemben ugyancsak az érett amiloid fibrillumokat felépítő összefonódó szálakra vonatkozik, a protofibrillum illetve protofilamentum kifejezéseket a szakirodalomban gyakran egymással felcserélhetően, egyenértékűen használják. Azonban az amiloid béta polipeptid esetében, a

protofibrillum megnevezést azon metastabilis fibrillumok leírására használják, melyek az érett fibrillumok kialakulása előtt jelennek meg az A β polipeptid-oldatban a fibrillogenezis első szakaszában, in vitro körülmények között (Walsh és mtsai 1997). A rövid flexibilis szálaktól, pálcáktól a globuláris struktúrákig sokféle alakot felvehetnek. Nem rendelkeznek jól meghatározott tengelymenti periodicitással. Bár a protofibrillum elnevezés a fibrillumokat megelőző állapotra utal, a felgombolyodás ezen intermedierjei nem mindig vannak rajta a felgombolyodás útvonalán („on-pathway”), hanem lehetnek félstabil „off-pathway” aggregátumok is (Goldsbury és mtsai 2011).

Az Alzheimer-kórban az amiloid prekursor peptidből alapvetően kétféle típusú béta amiloid peptid képződik: **A β 1-40** és **A β 1-42**. Bár a két peptid közti eltérés csupán két aminosavnyi, a peptidek különböző fibrillum-képződési útvonalat járnak be és a belőlük kialakuló fibrillumok mind tulajdonságaikban, mind szerkezetükben eltérést mutatnak. Az A β 1-40 monomerek ugyanis gyors egyensúlyi folyamatban előbb dimerizálódnak, majd trimer és tetramer formákat alkotnak, ezzel ellentétben a A β 1-42 peptidek pentamer illetve hexamer alegységekbe csoportosulva gyöngysor-szerű, protofibrillumokhoz hasonló szuperstruktúrákat hoznak létre (Bitan és mtsai 2003).

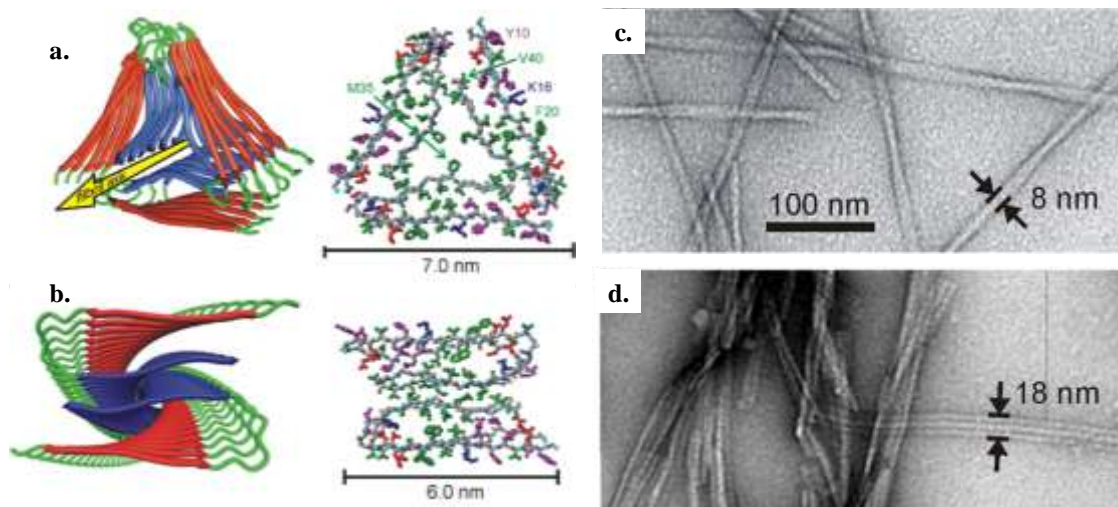
Az A β 1-40 peptidek β - β -ív (β -szál – kanyar – β -szál) szerkezetű monomerekből épülnek fel, melyek a fibrillum hossz tengelyére merőlegesen összekapcsolódva két β -lemezt alakítanak ki. A β - β -ív szerkezetet a D23 és K28 aminosavak oldalláncai közt kialakuló sóhíd stabilizálja. Egy protofilamentum két, helikálisan egymásba csavarodó β -lemez duplexből alakul ki. Az érett fibrillumot több, a fibrillum tengelyével párhuzamos lefutású protofilamentum alakítja ki (Petkova és mtsai 2002; Petkova és mtsai 2005; Petkova és mtsai 2006) (**2.b. ábra**).

Luhrs és munkatársai által közölt A β 1-42 fibrillumok modelljében a β - β -ívet nem intramolekuláris, hanem intermolekuláris kölcsönhatások stabilizálják, a protofilamentumot egyetlen β -lemez duplex alakítja ki. Az egymással párhuzamosan rendeződött protofilamentumok 4-8 nm vastag helikális fibrillumokat hoznak létre (Luhrs és mtsai 2005).

Azonban még az azonos amiloidogén építőegységekből (peptidekből) felépülő fibrillumok szerkezete sem egységes. Paravastu és munkatársai szerint az A β 1-40 protofilamentumok tengelyét trigonális elrendezésben három peptid zárja körül, és a peptidek a protofilamentum hosszanti tengelyére merőlegesen állnak össze (**2.a. ábra**).

Az A β 1-40 fibrillumok kísérleti alapú szerkezeti modellje (ssNMR, TEM és STEM adatok alapján) háromszoros szimmetriájú, csavart morfológiát ír le (**2.c. ábra**) (Paravastu és mtsai 2008). Ezzel szemben a Petkova és munkatársai által leírt A β 1-40 fibrillumok morfológiája nem csavart, hanem egyenes lefutású, kétszeres szimmetriájú, csíkozott szalag („striated ribbon”) alakú (**2.d. ábra**) (Petkova és mtsai 2006).

Más amiloidképző peptideknél, például az amylinnél is megfigyelték az alakzati sokszínűséget (**polimorfizmust**) (Goldsbury és mtsai 1997; Luca és mtsai 2007), és azt feltételezték, hogy a polimorfizmus általános jelenség lehet az amiloid fibrillumokra nézve.



2. Ábra. a. és b. A β 1-40 protofilamentumok szerkezeti modelljei. **a.** trigonális elrendeződésű peptidek. **b.** peptidek által kialakított duplex. **c. és d.** A β 1-40 fibrillumok negatív festésű TEM felvételei, a **c.** ábrán csavart morfológiájú, míg a **d.** ábrán egyenes lefutású, csíkozott szalag morfológiájú fibrillumok láthatóak.

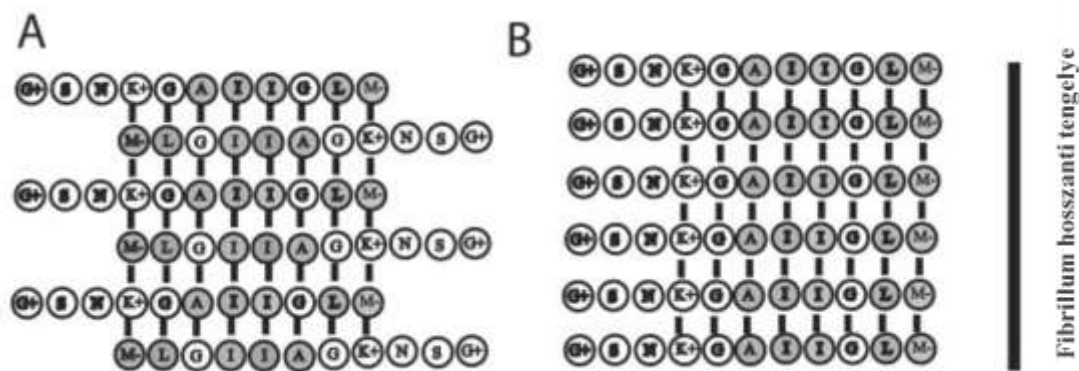
A β -lemezes szerkezetnek két fajtája van: a parallel és az antiparallel β -lemez. Ezekben a polipeptid szálak kinyújtott állapotban helyezkednek el. A parallel β -lemezben a láncok egymással párhuzamosan egy irányba futnak, míg a természetben gyakrabban előforduló antiparallel esetben a láncok párhuzamosak, de egymással ellentétes irányultságúak. Az aminosavak oldalláncai a lemez síkjára merőlegesen helyezkednek el.

A természetben előforduló teljes hosszúságú A β -peptidek legrövidebb biológiailag aktív szakaszát az **A β 25-35 peptid** képviseli. Ez a tizenegy aminosav hosszúságú peptid in vitro körülmények között gyors kinetikával képez fibrillumokat, és neurotoxikus tulajdonságai megegyeznek a teljes hosszúságú amiloid peptidével. Növeli a membrán permeabilitását és a neuronokra citotoxikus hatással van (Mirzabekov és mtsai 1994; Pike és mtsai 1995; Delobette és mtsai 1997; Lin és Kagan 2002).

Az A β 25-35 fragmentum liposzómákkal történő kölcsönhatását kisszögű röntgenszórással (SAXS) vizsgálva arra a következtetésre jutottak, hogy a peptid erősen lipofil és a membrán szénhidrogén láncai közé interkalálódik; ezt követően kölcsönhatásba tud lépni a membrán szabályzó fehérjéivel is (Mason és mtsai 1996).

A peptid szerkezetéről viszonylag kevés információ áll rendelkezésünkre, konformációja CD és FTIR vizsgálatok alapján oldószer- és szubsztrátfüggő (Shanmugam és Jayakumar 2004).

A peptid aminosav szekvenciája $^+H_3N-GSNK^+GAIIGLM-COO^-$, nettó töltése +1. Az N-terminális résznél levő első négy aminosav poláros, ide tartozik a pozitív töltésű lizin; a C-terminális rész irányában lévő hét aminosav pedig túlnyomóan hidrofób jellegű (Van Veen és O'Shea 1995).



3. Ábra. Az A β 25-35 fibrillumon belüli hidrogénhíd kötések elrendeződésének feltételezett, vázlatos modellje. Hidrofób oldalláncú aminosavak (szürke telített körök), hidrofil karakterű aminosavak (fehér körök). (A) Antiparallel elrendeződés. elektrosztatikus kölcsönhatás a 4. Lys és a C-terminális Met között. (B) Parallel elrendeződés. az erősen hidrofób aminosavak (Ala-6, Ile-7, és Ile 8) elrendeződése itt kedvezőbb, mint az antiparallel modell esetében, ellenben a Lys4 és a C-terminális Met közötti kölcsönhatás kedvezőtlen.

Az A β 25-35 fragmentum és egyes kémiai származékai vizes oldatban egyszerű kétállapotú átmenettel rendezetlen (random-coil) másodlagos szerkezetből béta lemezes szerkezetbe mennek át (Terzi és mtsai 1994). A β -lemez szerkezettel rendelkező peptidek a fibrillumok hossz tengelyére merőlegesen, parallel vagy antiparallel sorakoznak (**3. ábra**) (Ippel és mtsai 2002).

Az A β 25-35 fibrillumok alapvető szerkezeti tulajdonságai hasonlóak a más amiloid peptidekből képződött fibrillumok szerkezetéhez. Eképpen, a hidrogénhidakkal egymáshoz kapcsolt β -szálak a fibrillum tengelyére közel merőlegesen sorakoznak fel szabályos elrendeződésben, és β -redőzött rétegeket (β -lemezeket) alkotnak. A fibrillum számos β -lemezből áll, melyek aminosavaik oldalláncai révén kapcsolódnak össze, hogy a végső protofilamentáris szerkezetet létrehozzák (Jahn és mtsai 2009).

II. 4. BÉTA-LEMEZ ROMBOLÓ PEPTIDEK

A béta-amiloid polipeptid láncához különböző típusú vegyületek kapcsolódhatnak ionos vagy egyéb másodlagos kötésekkel. Az ilyen vegyületek megakadályozzák a peptidlánc aggregációját, és elvileg alkalmasak lehetnek az Alzheimer-kór kezelésére (Soto 2001; Permanne és mtsai 2002). Ezeket az anyagokat összefoglaló néven β -lemez rombolóknak (BSB) nevezzük. Legismertebb ezek közül az azofestékek családjába tartozó Kongó-vörös. Nagy remény fűződik ahhoz, hogy a BSB peptidek esetleg a terápiában is alkalmazásra kerülhetnek.

1996-ban Tjernberg és mtsai felfedeztek egy olyan peptidet, amely megakadályozta, hogy az A β peptidek fibrillumokat alkossanak. Ez az öt aminosavból álló peptid: KLVFF, a teljes hosszúságú A β peptid egy fragmentuma (A β 16-20), amely hozzákötődik a teljes hosszúságú A β peptidhez, megakadályozván azok fibrillummá történő összekapcsolódását. Alanin-szubsztitúcióval bebizonyították, hogy a Lys16, Leu17 és Phe20 létfontosságú szerepet töltenek be a kötődésben (Tjernberg és mtsai 1996). Gazit szerint a gátlás egyrészt az aromás részek közti molekuláris felismerésen, másrészt a pozitívan töltött lizin elektrostatikus taszító hatásán alapul (Gazit 2005).

A KLVFF motívum képezte az alapját a peptid- és peptidomimetikus inhibitorok kifejlesztésének. Több száz származékot megvizsgáltak, és végeredményként azt a következtetést vonták le, hogy a központi fenilalanin kulcsfontosságú szerepet tölt be az

aggregáció gátlásának kiváltásában. A Soto és mtsai által tervezett 11 illetve 5 aminosav hosszúságú BSB peptidek (Soto és mtsai 1998; Sigurdsson és mtsai 2000), melyek az A β peptid központi hidrofób részének homológjai, hatékony β -lemezes rombolóknak bizonyultak. Ezek a peptidek gátolták az új aggregátumok képződését, valamint a már meglévő aggregátumokat feloldották (in vitro és kísérleti állat-modellekben egyaránt). Ezen kívül az 5 aminosavból álló molekula (LPFFD) kivédte az amiloid okozta neuronkárosodást. A szintetikus BSB peptidek tehát alkalmasak a β -lemezes szerkezet destabilizációjára, indukálva a normál formába (alfa) történő konverzióját.

Mind a KLVFF, mind az LPFFD peptid két fenilalanint és töltött aminosavat (lizin, aszparagin) tartalmaz, melyek kulcsszerepet töltenek be az aromatikusság kölcsönhatások és sóhidak létrejöttében a kis BSB peptidek (ligandum) és az A β (target) peptid között (Hetenyi és mtsai 2002).

Központi idegrendszeri betegségek kezelésére a rövid, szintetikus peptidek módosítás nélkül több szempontból sem alkalmasak: a vérplazmában gyors proteolitikus lebomlást szenvednek, valamint az vér-agy gáton nem képesek átjutni a csökkent permeabilitás miatt.

Poduslo és mtsai olyan BSB peptideket fejlesztettek ki, melyek prolint is tartalmaztak (Poduslo és mtsai 1999). Az iA β 11 (11 aminosavból álló) BSB peptidet egy putreszcein nevű poliaminnal kovalensen módosították, valamint az összes aminosavat kicserélték a D-enantiomer formára. Az ily módon nyert PUT-YiA β 11 jelentős mértékben rezisztens volt a vérplazma proteázaival szemben, valamint a vér-agy gáton való átjutást jellemző permeabilitási koefficiens hétszeresére nőtt. (Az agyba való bejutást radioaktívan jelölt BSB peptid segítségével mutatták ki).

A BSB peptidek tervezéséhez szükséges lenne az A β proteinek kötőszekvenciáinak pontos ismerete. Ezidáig nem létezik olyan nagy felbontású röntgendiffrakciós adat az amiloid szerkezetét illetően, melyet a molekulamodellzésben felhasználhatnának.

II. 5. PEPTID ALAPÚ NANOVEZETÉK HÁLÓZATOK

A béta-amiloidok vizsgálata nemcsak az Alzheimer kórban betöltött szerepük felderítése és a hatékony gyógymódok felkutatása miatt vált fontossá. Említésre méltó a potenciális nanobiotechnológiai alkalmazásuk is. Épp azon tulajdonságaik miatt váltak a nanotechnológia számára érdekessé, amely tulajdonságaik a neurodegeneratív betegségekben szenvedők helyzetét oly reménytelenné teszik. A peptidek kedvező fizikai-kémiai tulajdonságai lehetővé teszik, hogy építőegységei lehessenek nanoléptékű önszerveződő rendszereknek és szerkezeteknek (Reches és Gazit 2003; Gazit 2007), ugyanis könnyen kombinálhatók egyéb építőkövekkel, mint például cukrokkal, lipidekkel, nukleinsavakkal, fémnanokristályokkal, stb. Az „Eredmények és megbeszélés” fejezetben tárgyalt, csillámfelszínen A β 25-35_{N27C} peptidekből létrejött orientált hálózatnak fontos szerepe lehet a peptid-alapú nano-vezeték hálózatok kialakításában.

II. 6. AMILOID FIBRILLUMOK VIZSGÁLATA ATOMERŐ- MIKROSKÓPPAL

Az atomerő-mikroszkóppal (AFM) hatékonyan és precízen fel lehet deríteni az amiloid fibrillumok morfológiai és nanomechanikai tulajdonságait. A pásztázó tűszonda-mikroszkópok családjába tartozó műszer kiválóan alkalmas biológiai mintákról nagy felbontású képalkotásra, valamint a molekulákat összetartó erők mérésére. A rugalmas lapkán elhelyezkedő, néhány nanométer végátmérőjű tű pontról pontra letapogatja a mintát, és magasságinformációt is tartalmazó, topografikus felvételeket hoz létre a felületről.

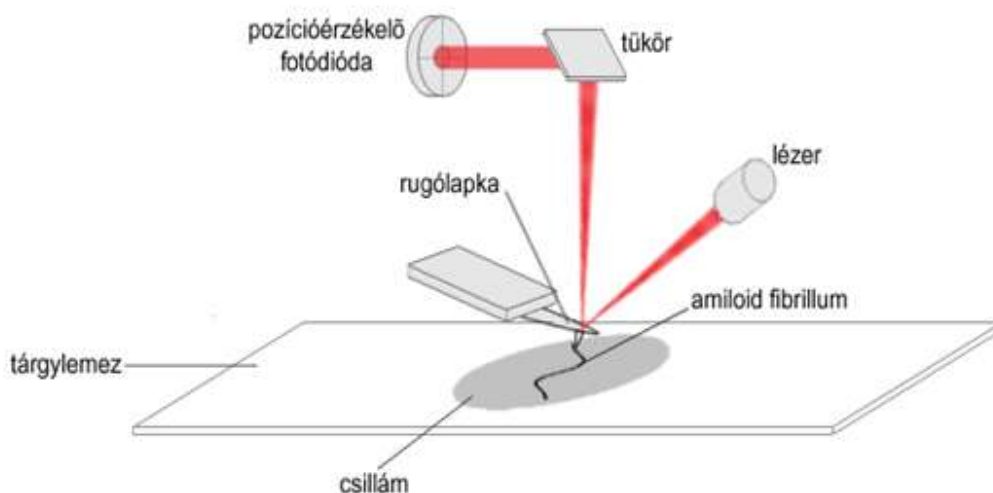
Az AFM számos előnnyel rendelkezik a hagyományos elektronmikroszkópos technikákkal szemben, ugyanis a minta előkészítése nem igényel invazív és szerkezetmódosító fixálási beavatkozásokat: nincs szükség kontrasztfokozásra, a minta fixálására, és a méréseket fiziológiás körülmények között, vizes közegben is el lehet végezni. Az ideálisan szubnanométeres, a valóságban tipikusan 1-5 nanométeres részletek elkülönítése is lehetővé válik, így a fibrillogenezis teljes folyamatát nyomon követhetjük, az oligomerizációtól az érett fibrillumok kialakulásáig. A fibrillumok

kialakulását egyszerű módon vizsgálhatjuk az idő függvényében, egymást követő pásztázások sorozatát készítve el (*time lapse imaging*). A pásztázási sebességtől függően 2-10 perc alatt rögzíthetünk egy képet, és a képsorozatokat választ adhatnak az időben lezajló morfológiai változások mikéntjére. A módszer további előnye, hogy a vizsgálatokat egyedi fibrillumokon is elvégezhetjük.

II. 6. 1. AZ ATOMERŐ-MIKROSKÓP MŰKÖDÉSI ELVE ÉS SAJÁTOSSÁGAI

A pásztázó tűszondás mikroszkópok családjába tartozó atomerő-mikroszkópot a pásztázó alagúteffektus-mikroszkóp (STM) továbbfejlesztésével hozták létre. Az AFM egy nem diffrakció-limitált, nagy felbontású képalkotó módszer. Mivel a kísérlet fiziológias körülmények között, vizes közegben is végezhető, biológiai makromolekulák vagy akár sejtek is vizsgálhatók vele. Valódi háromdimenziós felületi profilt biztosít speciális előkezelés és vákuum nélkül.

Bár az atomerő-mikroszkóp felbontását a letapogató tű hegyének görbületi sugara korlátozza, a feloldás így is ezerszer jobb (0,5 nm a maximális elérhető felbontás X-Y irányban), mint az optikai diffrakciós határ. Valódi háromdimenziós felületi profilt biztosít, tehát egyedi molekulákról nanométeres felbontású információkat nyerhetünk.



4. Ábra. Az atomerő-mikroszkóp sémás ábrája.

A mikroszkóp főbb részei a következők: egy laprugón lévő hegyes tű, a rugó

deformációját érzékelő detektor, a visszacsatoló-vezérlő rendszer, a piezoelektromos mozgató-rendszer és az adatfeldolgozó rendszer (**4. Ábra**).

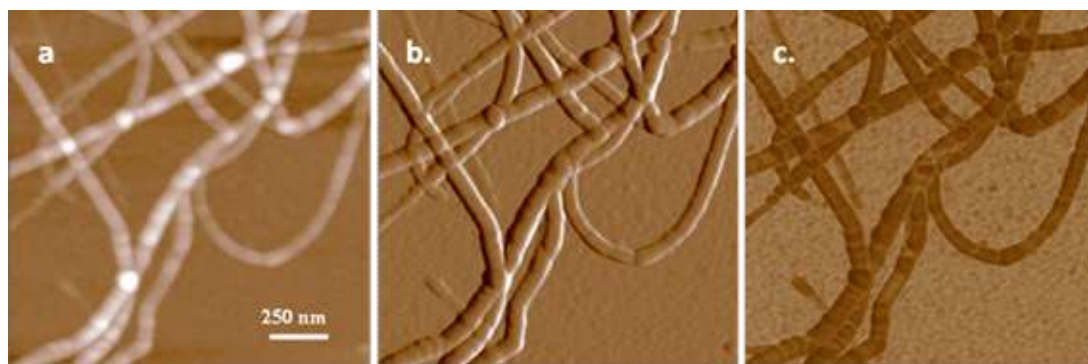
A minta felszíne és a vizsgálandó felületet pásztázó, rendkívül hegyes tű atomjai közötti vonzó- és taszítóerők miatt a tű elmozdul. A képalkotás a tű és a felület atomjai között fellépő erő mérésén alapul. A flexibilis rugólapka végén elhelyezkedő tű a mintával kölcsönhatásba kerül, így a pásztázás során a vonzó vagy taszító erő folyamatosan változik a minta felszíni magasságkülönbségei miatt.

Az atomerő-mikroszkóp a következő működési módokat teszi lehetővé:

(1) kontaktmód, (2) tapogató- (oszcillációs) mód és (3) erőmérőmód. A fibrillumok nanomechanikai tulajdonságainak vizsgálatához az erőmérőmódot használtuk, mely egy adott pontban a rugólapkára ható erőt méri a mintától való távolság függvényében. A fibrillumok morfológiai vizsgálatára a fent említett két pásztázási üzemmódot használtuk: a kontakt és az oszcillációs üzemmódot. Kontakt üzemmódban a rugólapka meghajlását, oszcillációs üzemmódban az oszcilláció amplitúdóját követjük nyomon a rugólap háttára fókuszált lézernyaláb segítségével (**4. ábra**). A rugólapka fényvisszaverő anyaggal van bevonva, így a lézernyaláb a rugólapkáról visszaverődik és egy helyzetérzékelő fotodiódára (PSD) vetül. A rugólapka meghajlásának illetve az oszcilláció amplitúdójának változása arányos a lézernyaláb helyzetének változásával. Megfelelő visszacsatolással elérhető, hogy a rugólap elmozdulásának egyik paraméterét (meghajlás vagy oszcillációs amplitúdó) állandó értéken tartjuk, miközben a tűt a mintához képest vertikálisan mozgatjuk. A felhasználó által megadott célértéktől való eltérést az atomerő-mikroszkóp egy, a pásztázás irányára merőleges irányú piezoelektromos kristály segítségével kompenzálja. A visszacsatoló rendszer a rugólapkát a felszínhez közelíti, vagy attól eltávolítja annak érdekében, hogy a visszacsatolt paraméter (meghajlás vagy oszcillációs amplitúdó) újra a célértékre álljon be. A műszer által regisztrált vertikális elmozdulások értékei szolgáltatják a minta felületi topográfiájához szükséges adatokat.

Puha mintafelületek esetén (mint például az amiloid fibrillumok) a kontakt üzemmód a minta megkarcolását vonhatja maga után, ezért célszerűbb oszcillációs üzemmódban dolgozni. Az **5. a. ábrán** látható magasságkontraszt kép úgy jön létre, hogy a pixelekre osztott pásztázási terület X és Y koordinátáihoz hozzárendelik a vertikális elmozdulások értékeit. Az oszcillációs üzemmódban, amelyben a rugólapka

rezgési amplitúdójának visszacsatolásával alkotunk képet, gyakran használt még az amplitúdó- és fáziskontraszt kép. A visszacsatoló rendszer véges sebességgel működik, és a visszacsatolási hibából nyert információ szolgáltatja az amplitúdó-kontraszt képet (**5. b. ábra**). Az amplitúdó-kontraszt alapja tehát a rugólapka valós oszcillációs amplitúdója és a célérték közötti eltérés. A pásztázási sebességgel egyenes arányban növekszik a visszacsatolási hiba és így a kontraszt is. Az **5. c. ábrán** látható fáziskontraszt azon alapul, hogy a rugólapka oszcillációjában fáziseltolódás lép fel. Amikor ugyanis a tű az oszcilláció során megérinti a felszínt, az oszcilláció fázisában zavar keletkezik, mely a tű és az őt meghajtó elektromos oszcillátor között fáziskülönbséget indukál. A fáziskép kontrasztja a minta rugalmasságával egyenesen arányos, ez a típusú felvétel a minta lokális viszko-elasztikuságát is jellemzi.



5. Ábra. Oldatban nőtt, érett A β 25-35 fibrillumok atomerő-mikroszkópiás felvétele csillámfelszínen. **a.** Magasságkontraszt felvétel. **b.** Amplitúdó-kontraszt felvétel.

II. 6. 2. ERŐSPEKTROSKÓPIA

Erőspektroszkópia során nem pásztázás történik az XY-síkban, hanem az AFM fejébe beépített Z-piezokristállyal a rugólapkát vertikális irányban mozgatjuk. A módszer egyedi molekulák erőválaszának pontos mérésére alkalmas, ugyanis a vertikális mozgatás nagy precizitással, piezoelektromos kristály segítségével történik. A rugólapka elhajlását erősen fókuszált lézernyaláb segítségével követjük. Eredményképpen nagy felbontású rugalmas erő–megnyúlás görbéket kapunk a vizsgált molekuláris rendszerről. Mechanikai hatásra előidézhetjük az intra- vagy

intermolekuláris kémiai kötések felszakadását és átrendeződését, és ezen eseménysorozatokat az erőspektrumban megjelenő erőátmenetek formájában rögzítjük. Az erőátmenetekből a molekulán, illetve jelen esetben az amiloid fibrillumokon belül lezajló szerkezeti változásokra lehet következtetni.

Ahhoz, hogy erőmérésre használhassuk, a rugólapkát előbb kalibrálni kell. Kísérleteinkben a termikus kalibrálási módszert használtuk (Hutter és Bechhoefer 1993). Eszerint a mechanikai energia (a rugólapka átlagos vertikális irányú elhajlásához szükséges munka) egyenlő a termodinamikai rendszer egy szabadsági fokára (a rugólapka vertikális elhajlási irányára) eső termikus energiával ($1/2k_B T$).

$$(1) \frac{1}{2} \kappa [x^2] = \frac{1}{2} k_B T,$$

ahol κ a rugóállandó, x a transzducer (rugólapka) elhajlási amplitúdója, k_B a Boltzman állandó, T az abszolút hőmérséklet. A mérőrugó függőleges kitérése a (2.) összefüggés szerint arányos a rá ható erővel. Ha ismerjük a rugóállandót (κ) és regisztráljuk a rugólapka függőleges irányú kitérését, meghatározható a rugólapkára ható erő (F):

$$(2) F = \kappa \Delta x.$$

II. 7. FOURIER TRANSZFORMÁCIÓS INFRAVÖRÖS (FTIR) SPEKTROSKÓPIA

Az amiloid fibrillumok másodlagos szerkezetének vizsgálatára kiválóan alkalmas módszer a Fourier transzformációs infravörös (FTIR) spektroszkópia. A Fourier transzformációs spektroszkópia számos előnnyel rendelkezik a hagyományos spektroszkópiához képest, ami főleg az infravörös tartományban jelentős (Griffiths és mtsai 2007).

Az infravörös (IR) sugárzás a $12.500 - 10 \text{ cm}^{-1}$ (800 nm és 1 mm) közötti hullámszámú (hullámhosszú) elektromágneses sugárzás. Spektroszkópiai szempontból az infravörös sugárzást közeli (NIR), közép (MIR) és távoli (FIR) infravörös tartományokra osztjuk. IR sugárzással elsősorban a molekulák rezgési és rotációs energianívói közti átmenetek gerjeszthetők. A MIR tartományban detektálhatók a molekularezgések, amelyek a szerkezetre és konformációra jellemzőek. A középső infravörös tartomány hullámszámban kifejezve a 4000 cm^{-1} és 400 cm^{-1} közé esik. Az

infravörös spektrumvonalak hozzávetőleges helyzetét a rezgő atomok és a kötések típusa (egyes, kettős, hármas kötés) határozzák meg, az abszorpciós csúcsok pontos helyzete az intra- és intermolekuláris környezet elektronelvonó vagy elektrondonor hatásától illetve más rezgésekhez való csatoltságától függ (Barth 2007). Az 1600 cm^{-1} és 1700 cm^{-1} közötti hullámszám-tartomány az amid I sávnak felel meg, ez a sáv a legérzékenyebb a fehérjék másodlagos szerkezetére, és az amid C=O kötésének nyújtási rezgése képezi a rezgési energia túlnyomó részét (Chirgadze és mtsai 1973; Byler és Susi 1986; Haris és Chapman 1988; Ismail és mtsai 1992; Arrondo és mtsai 1993; Middaugh és mtsai 1995; Barth 2007). Értékes információ nyerhető még a fehérjék esetén az amid II sávból, amely az N-H kötés hajlítási rezgésére jellemző. Ennek megfelelően a másodlagos szerkezet az amid I sáv alakjával áll összefüggésben, míg az amid II sáv a másodlagos szerkezet jelenlétére kevésbé érzékeny, viszont a H/D kicserélődés tanulmányozására ideális, ugyanis a kicserélődés esetén kb. 100 cm^{-1} -re eltolódik (izotóp-eltolódás).

Az **1. táblázat** összefoglalja az amid I sáv hullámszám szerinti komponenseit.

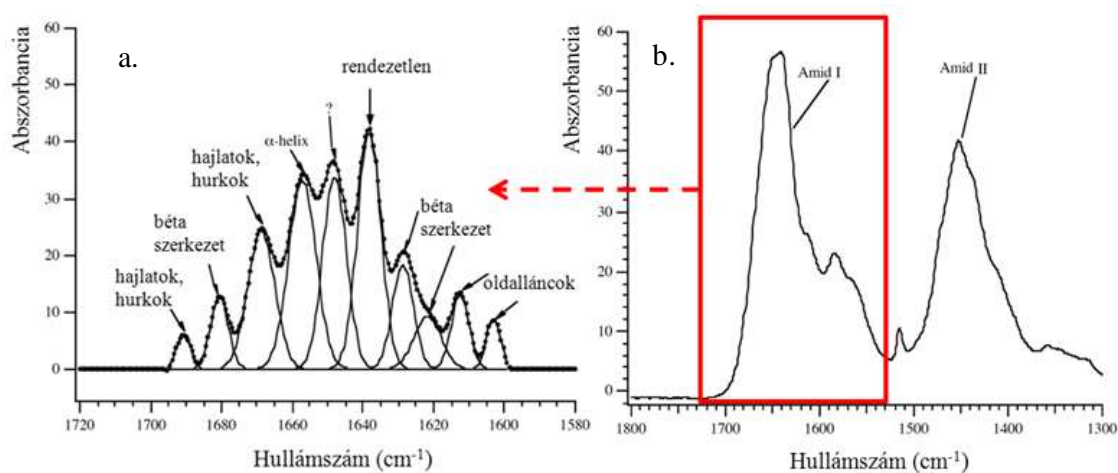
1. Táblázat. *Az amid I sáv komponenseinek hozzárendelése a másodlagos szerkezeti elemekhez* (Byler és mtsai 1986; Haris és mtsai 1988; Ismail és mtsai 1992).

Hullámszám (cm^{-1})	másodlagos szerkezet
1616	intermolekuláris béta szerkezet (Ismail és mtsai 1992)
1620-1640	kinyújtott láncok (béta szerkezet) (Byler és Susi 1986)
1645	rendezetlen (Byler és Susi 1986)
1655	alfa hélix (Byler és Susi 1986)
1662	3_{10} hélix (Haris és Chapman 1988)
1663-1670	hajlatok, hurkok (Byler és Susi 1986)
1675	kinyújtott láncok (béta szerkezet) (Byler és Susi 1986)
1683-1694	hajlatok, hurkok (Byler és Susi 1986)

Az amid I sáv analízisének általában elfogadott szabályként megemlíthető, hogy az 1645 cm^{-1} közeli spektrális csúcs rendezetlen szerkezetre utal, az 1655 cm^{-1} körüli csúcs α -hélixet jelöl, az 1620 -tól 1640 cm^{-1} -ig terjedő tartományban megjelenő csúcs

pedig a fehérje β -redőbe rendezett szerkezetéhez társítható (Chirgadze és mtsai. 1973; Byler és Susi 1986; Haris és Chapman 1988; Ismail és mtsai 1992; Arrondo és mtsai 1993; Middaugh és mtsai 1995; Barth 2007).

A **6. ábrán** látható egy tipikus, amid I és amid II sávokat ábrázoló infravörös spektrum valamint a Fourier-dekonvolúció analízis eredményét ábrázoló Amid I sáv. A Fourier-dekonvolúció célja az, hogy egymástól elválassza és felismerhetővé tegye a struktúra nélküli, széles spektrális sáv komponenseit, csökkentve a sáv komponenseinek vonalszélességét. A különböző spektrális csúcsokhoz hozzárendelték a megfelelő másodlagos szerkezetet. A kísérleteket borjú hasnyálmirigy tripszin-inhibitor fehérjén végezték (Kauppinen és mtsai 1981).



6. Ábra. a. Fourier-dekonvolúció analízis eredményét ábrázoló Amid I sáv. Az egyes spektrális csúcsok és a hozzájukrendelt megfelelő másodlagos szerkezeti elemek láthatók. **b.** Amid I és Amid II sávokat ábrázoló IR spektrum.

III. CÉLKITŰZÉSEK

Az amiloid plakkok keletkezésének és hatásmechanizmusának feltárása nagyban hozzájárulhat az Alzheimer kór molekuláris alapjainak megismeréséhez és hosszú távon a kezelés optimalizálásához, illetve gyógyításához, vagy esetleg korai stádiumban való felismeréséhez. Az A β 25-35 peptidből képződő fibrillumok számos tulajdonsága megismerhető szerkezeti vizsgálatok útján, mint pl. atomerő-mikroszkópia, erőspektroszkópia segítségével, vagy közvetett módon, pl. Fourier transzformációs infravörös spektroszkópiai módszerekkel. Az A β 25-35 peptid csillámfelzínén epitaxiális növekedéssel orientált hálózatot képez, ez a szabályos, könnyen és gyorsan létrehozható hálózat nanométeres skálán reprodukálható, magas rendezettségű stabil modell-rendszernek tekinthető.

Kísérleteinkben az alábbi célokat tűztük ki:

- I. A csillámfelzínén epitaxiális növekedéssel létrejött, orientált hálózat paramétereinek pontos feltérképezése szükséges ahhoz, hogy a hálózatot kísérleti modellrendszerként használhassuk. Célul tűztük ki ezért:
 1. a csillámfelzínén epitaxiálisan növesztett orientált amiloid hálózat morfológiájának és szerkezeti dinamikájának jellemzését atomerő-mikroszkóp segítségével.
 2. az orientált fibrillumok mechanikai stabilitásának, a fibrillumokat hierarchikusan felépítő és stabilizáló kölcsönhatások természetének valamint a fibrilláris alegységek (protofilamentumok) viselkedésének vizsgálatát molekula manipulációs technikákkal, erőspektroszkópiai méréseken keresztül.
- II. A kétféle módon (oldatban illetve epitaxiálisan) növesztett fibrillumok összehasonlító vizsgálatát terveztük, arra a kérdésre keresve választ, hogy a

csillámfelszínen kialakuló orientált hálózat felfogható-e jó amiloid fibrillum (vagy plakk) modellként?

1. Oldatban növesztett, csillámfelszínre adszorbeált érett amiloid fibrillumok alaki, nanomechanikai összehasonlítása az epitaxiálisan orientált fibrillumokkal.
2. Másodlagos szerkezet-vizsgálat FTIR spektroszkópiával.

III. LPFFD béta-lemez romboló peptid hatásának vizsgálata az amiloid hálózatra nézve. Van-e az LPFFD peptidnek általános béta-lemez romboló hatása?

IV. A módosított peptid cisztein szulfhidril csoportja számos molekula hozzákapsolását teszi lehetővé a mutáns amiloid peptidhez. A jövőbeli „nano-módszer” alkalmazások alapjainak lefektetése végett, célul tűztük ki a csillámon orientált mutáns A β 25-35 peptidből felépülő fibrilláris hálózat vizsgálatát, a hálózat paraméteinek (felületi befedettség, fibrillum-hossz) finomhangolását.

IV. MÓDSZEREK

IV. 1. A KÍSÉRLETEKHEZ FELHASZNÁLT A β -PEPTIDEK SZEKVENCIÁI

Az 99%-os tisztaságú amiloid illetve LPFFD peptideket liofilizált formában az MTA-SZTE Szupramolekuláris és Nanoszerkezetű Anyagok Kutatócsoportjában valamint a SZTE ÁOK Orvosi Vegytani Intézetében állították elő szilárd fázisú szintézis során (Zarandi és mtsai 2007).

A vad típusú **A β 25-35** aminosav-szekvenciája: ²⁵GSNKGAIIGLM³⁵-amid. Molekulatömege 1060,3 g/mol.

N27C mutáns A β 25-35 peptid, **A β 25-35_N27C** szekvenciája: ²⁵GSCKGAIIGLM³⁵-amid Molekulatömege 1007,3 g/mol.

A béta-lemez romboló peptid szekvenciája: **LPFFD**. Molekulatömege 636 g/mol.

IV. 2. AMILOID FIBRILLUMOK NÖVESZTÉSE

Az oldatban történő növesztéskor a liofilizált A β 25-35 mintát első lépésben DMSO-ban oldottuk fel. A DMSO oldatot 10 mM PBS (10 mM Na₂HPO₄-NaH₂PO₄, pH 7,4, 140 mM NaCl, 0,02% NaN₃) pufferben hígítottuk tovább úgy, hogy a végső peptidkoncentráció $\geq 0,5$ mg/ml, és a DMSO koncentrációja $\leq 1,0$ % (v/v) legyen. A növesztés szobahőmérsékleten (T = 24 °C) történt 3-14 napig az oldat kevergetése nélkül.

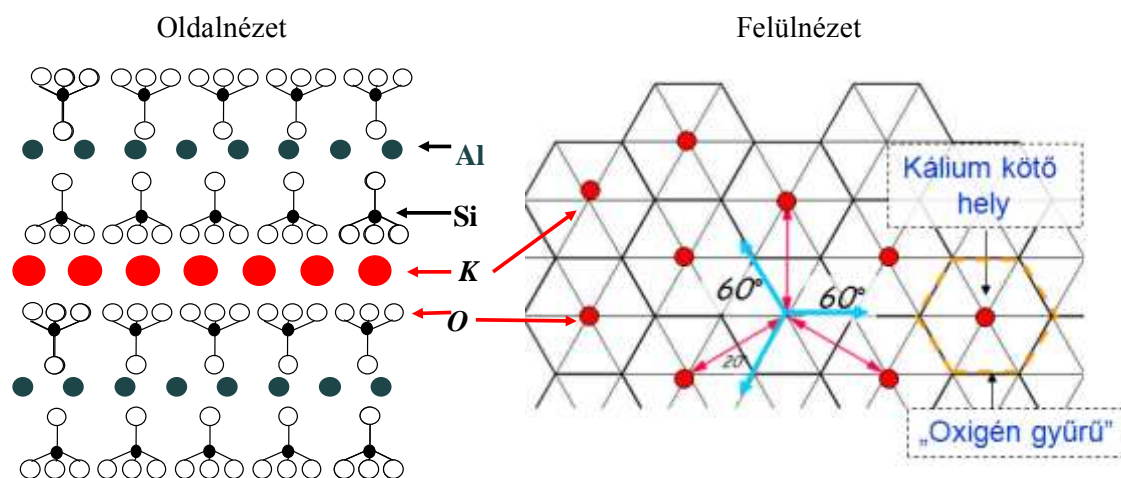
Polimerizációs gócoctól mentes (magnélküli, *seedless*) minták előállítása érdekében az A β 25-35 peptidek oldását követően az oldatban esetlegesen jelen lévő magokat, amelyek a szintézis és tisztítási procedúra során a liofilizálás előtt keletkezhetnek, ultracentrifugálással ülepítettük (Beckman Optima, 200.000 g, 2 óra, T = 4 °C). A felülúszót, mely csupán peptideket tartalmazott, folyékony nitrogénben gyorsan lefagyasztottuk, majd a mintákat felhasználásig -80°C-on tároltuk. Az így előállított mintákat a csillámfelületen végzett mérésekhez használtuk, mert az volt a célunk, hogy peptid monomerek ülepedjenek le a felületre.

A minták peptid koncentrációját nagy érzékenységű teszttel határoztuk meg (Bicinchoninic acid assay, SIGMA) (Smith és mtsai 1985).

IV. 3. ALKALMAZOTT SZUBSZTRÁT FELÜLETEK

Az epitaxiálisan növekedett fibrillumok atomerő-mikroszkópos képalkotásához frissen hasított csillámfelszínt (V2 grade, #52-6, Ted Pella, Inc., Redding, CA, USA) használtunk.

A káli csillám, más néven muszkovit ($KAl_2(Si_3Al)O_{10}(OH)_2$), néhány tíz mikrométeres vastagságú, tökéletesen átlátszó lemezekké hasítható. A frissen hasított muszkovit csillám negatív töltésű, hidrofil, felületi kristályszerkezete hexagonális. A csillám egy olyan kálium-alumínium hidroszilikát, mely SiO_4 -tetraéderek alkotta párhuzamos rétegekből áll, a réteggkomplexumokat réteggközi kálium ionok tartják össze elektrosztatikus kölcsönhatással. A tetraéder súlypontjában elhelyezkedő Si^{4+} kationt a sarkokon levő négy oxigénatom veszi körbe. A csillám hasítási felületén a hexagonális elrendezésű oxigén atomok kb. 0,5 nm átmérőjű K^+ kötő zsebeket hoznak létre. Két szomszédos K^+ kötőhely távolsága szintén kb. 0,5 nm (**7. ábra**) (Brigatti és mtsai 2003; Giese 1979).



7. Ábra. A muszkovit csillám szerkezete (oldal- és felülnézetből). A hexagonálisan elhelyezkedő oxigénatomok K^+ kötő zsebeket alkotnak.

A frissen hasított csillám felületéről vizes közegben gyengén kötött K^+ ionok diffundálnak el, lehetővé téve ezáltal pozitív felületi töltésű biomolekulák kitapadását. A minta illetve a puffer K^+ tartalmának függvényében dinamikus egyensúly alakul ki a szabad és a telített kötőhelyek között.

Egyes esetekben AFM-es képalkotáshoz 3-glycidiloxypropyl-trimethoxysilane (GOPS) keresztkötővel bevont üvegfelszín alkalmaztunk. A 96%-os alkoholba, majd 99%-os acetonba merített tárgylemezeken ultrahangos felülettisztítást végeztünk 20-20 percig. Az üveglemezeket a tisztítási fázisok között és a tisztítás végén ultratiszta (Milli-Q) vízzel mostuk le. A nagy tisztaságú nitrogén gázzal megszáritott tárgylemezeket felhasználásig pormentes, páramentes helyen tároltuk. Az alkoholos majd acetonos közegben, ultrahanggal megtisztított üveglemezeket 2 %-os (v/v) GOPS-t tartalmazó toluol oldat gőzében inkubáltuk egy éjszakán át. Az így nyert szilanizált felszínhez az amiloid aminocsoportok révén kovalensen kötődik.

IV. 4. MINTÁK KEZELÉSE

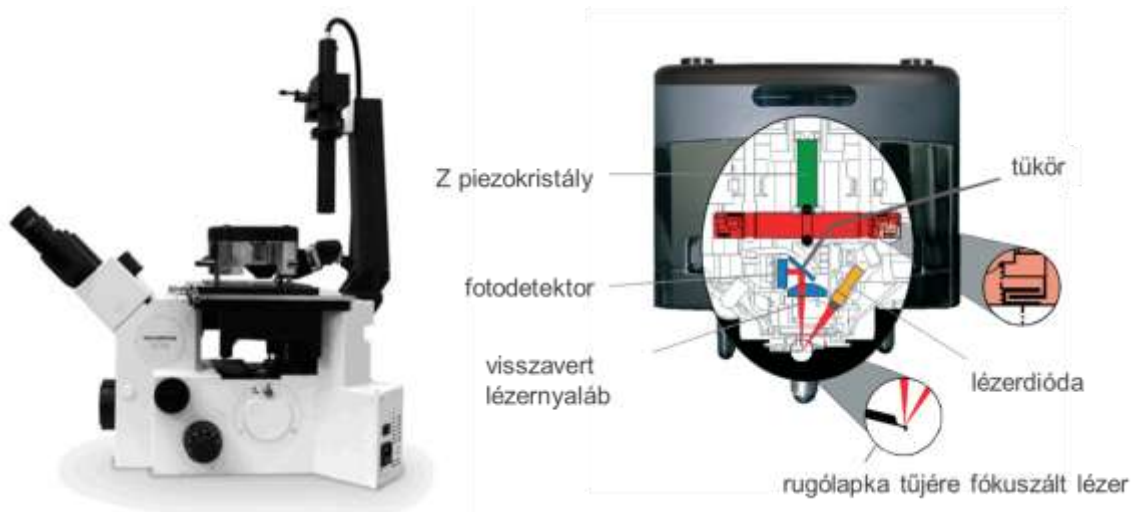
A mintákat az atomerő-mikroszkópia alkalmazhatósága céljából a megfelelően előkészített felszíneken inkubáltuk. GOPS aktivált felszínen 30 perces inkubációs időt használtunk. Frissen hasított csillámfelszínen, a fibrillum típusától és az oldat koncentrációjától függően különböző inkubációs időket alkalmaztunk. Oldatban nőtt fibrillumok esetén 20-30 percig inkubáltuk az oldatot a felszínen. Epitaxiálisan növekedő A β 25-35 peptidek esetén, hogyha az oldat koncentrációja magas volt (~50 μ M), 1-5 percre csökkentettük az inkubációs időt, mert a nagyszámú szabad peptidet tartalmazó oldat nem kívánt sűrűségű, túlzottan befedett csillámfelszín hozott volna létre hosszabb idő alatt, ami lehetlenné tette volna az egyedi fibrillumok vizsgálatát. Az inkubációs idő leteltével, pufferral történő mosással távolítottuk el a nem vagy csak gyengén kötődött fibrillumokat. Száritott preparátumok esetében ultratiszta (Milli-Q) vízzel mostuk le a felszín, majd tiszta N₂ gázzal száritottuk.

IV. 5. ATOMERŐ-MIKROSZKÓPIA

IV. 5. 1. AZ MFP3D ATOMERŐ-MIKROSZKÓP

A képalkotáshoz egy Molecular Force Probe 3D (MFP3D) típusú atomerő-mikroszkópot használtunk (Asylum Research, Santa Barbara, CA, USA) (**8. ábra**).

Az atomerő-mikroszkóp XY irányban vezérelhető piezoelektromos tárgyasztalon helyezkedik el, az atomerő-mikroszkóp fejébe Z-irányú (vertikális) mozgást végző piezoelektromos kristályt építettek be. A minta kezelése és megfigyelése érdekében a műszer egy inverz fénymikroszkóppal van egybeépítve. A pásztázást oszcillációs üzemmódban végeztük szárított mintákon, illetve fiziológiás körülményeket modellező körülmények mellett, natív szerkezetű mintákon, pufferben. Tipikusan 512x512 vagy 1024x1024 – pixel felbontású képeket rögzítettünk 0,6 – 1.5 Hz pásztázási frekvenciával, 0,5 – 0,8 V célérték beállításával. A célérték a rugólapka oszcillációjának nagyságával függ össze, az oszcilláció amplitúdóját a minta stabilitása függvényében változtathatjuk, de általában érdemes alacsony értéken tartani.

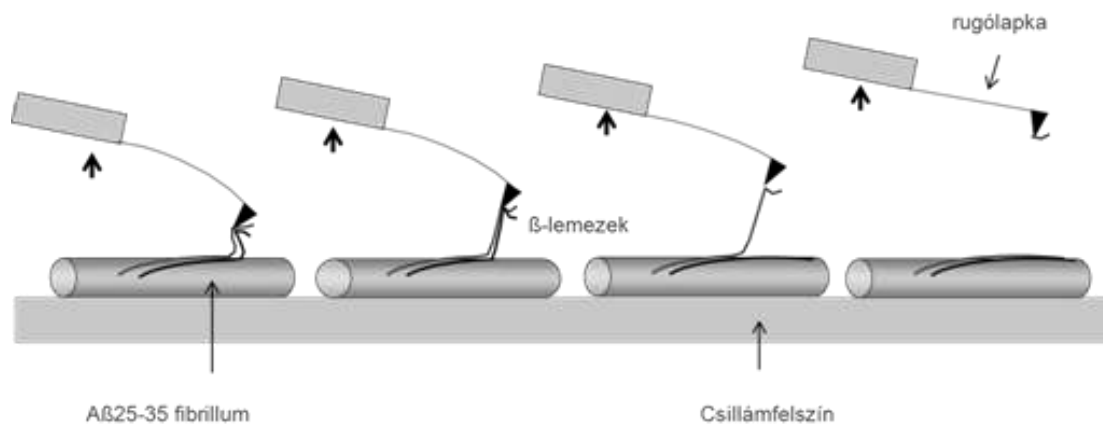


8. Ábra. MFP 3D BIO atomerő-mikroszkóp, Olympus IX81 motorizált inverz mikroszkóppal és XY irányban piezoelektromos transzlátorokkal mozgatható tárgyasztallal (bal oldali ábra). Az AFM fejének vázlatos felépítése, keresztmetszet (jobb oldali ábra).

Az atomerő-mikroszkóp Z-irányú felbontása angström nagyságrendű 0,25 nm. XY-irányban viszont a tûhegy sugarától illetve geometriájától függően 0,5-5 nm a felbontási határ. A képalkotási hiba abban az esetben elkerülhetetlen, hogyha a feloldani kívánt részlet kisebb a tû átmérőjénél. Képanalízis során ezt a jelenséget figyelembe kell venni. A tûhegy sugarának mérete a magasságinformációt nem torzítja, így ez egy igen megbízható mérhető paraméter.

IV. 5. 2. ERŐSPEKTROSKÓPIA

A felülethez kötött, adszorbeált fibrillumokat mechanikailag manipuláltuk egy felszínhez nyomott rugólap segítségével (Olympus BioleverA). A tû felülete és a fibrillum között másodlagos, nem specifikus kémiai kötés alakult ki. A rugólapot állandó sebességgel távolítottuk el a felszíntől, tipikus húzási sebességként 500 nm/s-ot használva. A fibrillum szerkezetét ily módon megbontottuk, a fibrillum felszínéről protofilamentumokat húztunk ki és az erőátmenetek alakjából, nagyságából a mechanikai hatásra bekövetkező szerkezeti változásokra nyertünk betekintést (**9. ábra**).



9. Ábra. Amiloid fibrillum atomerő-mikroszkóppal történő megnyújtásának kísérleti vázlata. A protofilamentum deszorpciójához szükséges erő a rugólapka elhajlásából számolható.

Erőspektroszkópiás mérések során a vizsgált molekula rákötődik a rugólapra, és a molekulán keresztül közvetített mechanikai erő okozza a rugólap elhajlását. Így tehát a fenti módszerrel mérhetővé tehetjük a vizsgált molekuláris rendszerben mechanikai perturbáció hatására ébredő erő nagyságát.

Az atomerő-mikroszkóppal akár pN nagyságrendű erőket is regisztrálni tudunk, a műszer alsó felbontási határa $\sim 5-10$ pN. Az erőspektroszkópiás kísérletek során átlagosan ezer - kétezer erőgörbét vettünk fel a minta több pontján, a kiértékelés során 500 - 600 értékelhető erőgörbét elemeztünk.

Lehetőség nyílik annak ellenőrzésére, hogy a mechanikai perturbáció megváltoztatta-e a fibrillumok morfológiáját vagy sem. Az eljárás neve *in situ* erőspektroszkópia, mely során előbb lépástázzuk a számunkra érdekes területet, majd ezen a területen levő fibrillumokon erőspektrumokat veszünk fel, végezetül ugyanezt a területet újból lépástázzuk. Az első és utolsó pásztázási képet összehasonlítva, észlelhetőek az esetlegesen bekövetkező szerkezeti változások.

IV. 5. 3. A KÉPALKOTÁSHOZ HASZNÁLT RUGÓLAPKÁK

A nagy érzékenység eléréséhez a rugóállandónak kicsinek kell lennie (100 N/m alatt), ami a tűt tartó rugólapka nagy flexibilitásával érhető el.

A környezetből érkező zavaró, általában viszonylag kis frekvenciájú rezgések és a visszacsatolási elektronika miatt fontos, hogy nagy legyen a rugó saját rezonanciafrekvenciája (kHz-tartomány).

Olympus AC160TS-C2 microcantilever

A szárított minták pásztázásához AC160TS-C2 típusú rugólapkát használtunk (**10. ábra**).

A rugólapka anyaga szilícium, rugóállandója 42 N/m. A levegőben mért rezonancia frekvencia 300kHz. A rugólapkán levő tű tetraéder alakú, a tűhegy sugara <10 nm. A rugólapka a hátoldalon (reflektív oldal) alumíniummal borított. Ez a típusú rugólapka oszcillációs üzemmódban, szárított mintákon való pásztázásra alkalmas.



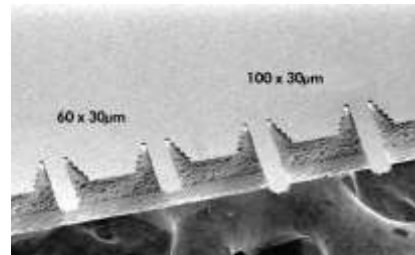
10. Ábra. Olympus AC160TS-C2 microcantilever.

Olympus BioLever (BL-RC150VB)

Pufferben végzett képalkotáshoz valamint erőspektroszkópiához Olympus BioLever rugólapkát használtunk (**11. ábra**). A chip négy darab rugólapkát tartalmaz, két rövidebbet (BioleverA) és két hosszabbat (BioleverB). A hosszúság a rugóállandót befolyásolja.

A szilícium nitridből készült rugólapkákat Au/Cr réteg borítja. Az általunk használt BioleverA rugólap rugóállandója 0,03 N/m.

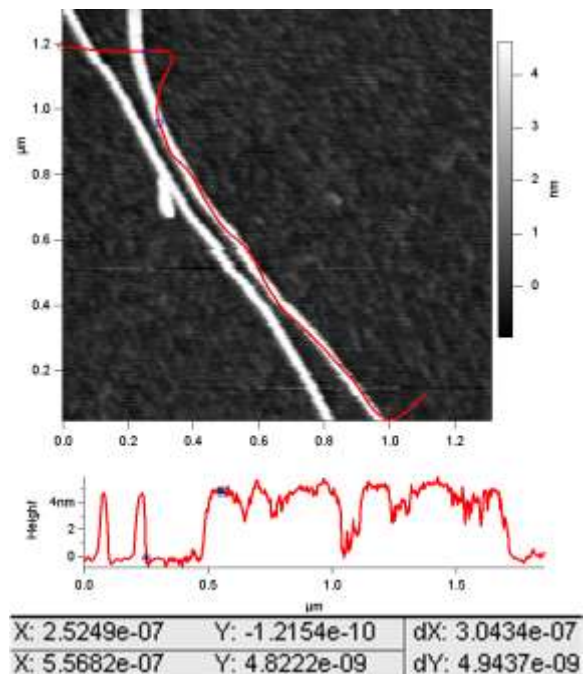
A pufferben mért rezonancia frekvencia 9,2 kHz. A π alakú. A tőhegy görbületi sugara <40 nm.



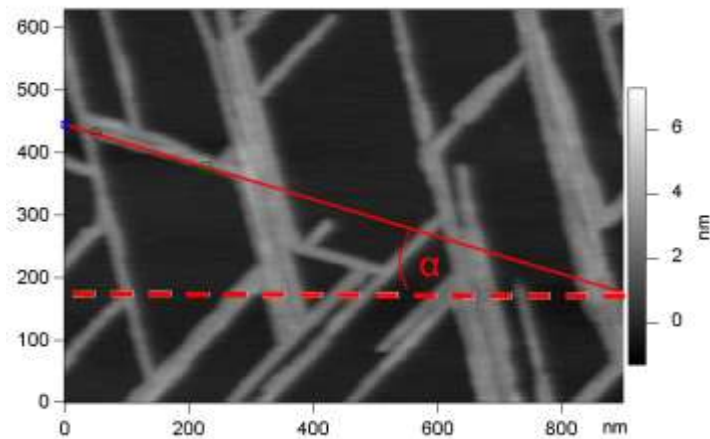
11. Ábra. Olympus Biolever BL-RC150VB

IV. 5. 4. ATOMERŐ-MIKROSZKÓPOS KÉPEK ANALÍZISE

A felvételeken szereplő amiloid struktúrák egyes morfológiai paramétereinek (fibrillumok magassága, hossza, az orientált fibrillumok szögeloszlása, felületi fedettség) mennyiségi meghatározására az MFP3D atomerő-mikroszkóp saját szoftverét (Igor Pro v6.03WaveMetrics Portland OR, USA) használtuk. A fibrillumok magasságát, hosszát egyenként mértük meg egy, a magasságképet meghatározott pontokban metsző egyenes segítségével (**12. ábra**). A szoftver kirajzolta az egyenes alatti szakasz magasságprofilját, és erről leolvashatóvá vált a fibrillumok magassága illetve hossza.

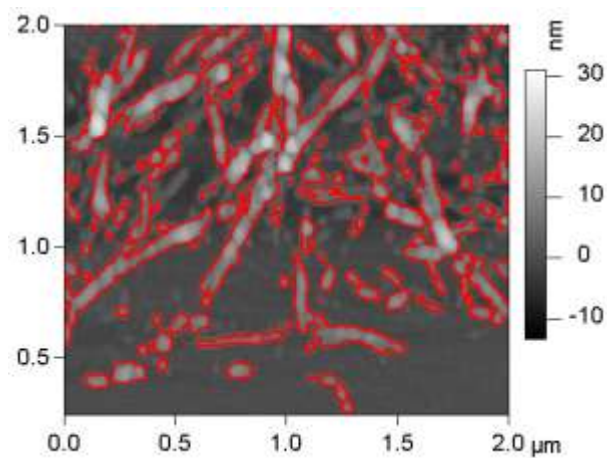


12. Ábra. Magasság- és hosszanalízis



13. Ábra. Szögeloszlás meghatározása.

A fibrillumok szögeloszlását úgy határoztuk meg, hogy a fibrillumok hossz tengelyére egy egyenest rajzoltunk, majd a megfelelő panelről leolvastuk az egyenes és egy vízszintes referenciavonal által bezárt szöget (**13. ábra.**).



14. Ábra. Az az atomerő-mikroszkópos felvételt maszkolása.

A felületi befedettség kiszámolásához az AFM-es felvételt maszkoltuk a fibrillumokra jellemző jól meghatározott magasság-küszöbérték beállításával, a szoftver ennek alapján kiszámolta a fibrillumok által befedett terület százalékos nagyságát (**13. ábra.**).

Az atomerő-mikroszkópos felvételek 2D Fourier transzformációit az NIH Image, Image J (1.32j verzió, NIH, USA) szabad forrású szoftverrel készítettük.

Az Igor Pro-val végzett statisztikai elemzés adatait a Microsoft Excel 2010-es programba exportáltuk. A spektrumokat és hisztogramokat szintén a Microsoft Excel 2010-es program segítségével ábráztuk.

IV. 6. FTIR SPEKTROSKÓPIA

A könnyűvízes (H_2O) puffer-oldatban összeállt $\text{A}\beta_{25-35}$ fibrillumokat (IV.2. fejezet) SpeedVac vákuum-centrifugán oldószermentesítettük koncentrációnövelés céljából. A víz elpárolgása után a mintát $4\ \mu\text{l}$ nehézvízben (D_2O) oldottuk fel. A fehérje-konformációra jellemző amid I sávval ($1700\text{-}1600\ \text{cm}^{-1}$) teljesen egybeesik a víz deformációs rezgése ($1650\ \text{cm}^{-1}$), ennek a zavaró hatásnak a kiküszöbölésére alkalmaztunk méréseinkben víz helyett nehézvizet, melynél az izotóp-eltolódás miatt a deformációs rezgési sáv $1215\ \text{cm}^{-1}$ -nél lép fel.

A csillámfelületen epitaxiálisan nőtt fibrillumok másodlagos szerkezetének megállapításához $8\ \mu\text{M}$ -os $100\ \mu\text{l}$ magnélküli $\text{A}\beta_{25-35}$ peptid oldatot inkubáltunk 10 percig egy frissen hasított csillámlemezre. A felszínre nem kötődő peptideket óvatosan lemostuk a felszínről, majd tiszta N_2 gáz árammal történő szárítást alkalmaztunk.

Az infravörös spektrumokat Bruker Vertex80v FTIR spektrométerrel mértük, amely nagy érzékenységgű, folyékony nitrogénnel hűtött higany-kadmium-tellur (MCT) detektorral rendelkezik. Az oldatban nőtt, érett amiloid fibrillumok FTIR spektrumának felvételéhez mintatartóként Diacell gyártmányú (Diacell, Leicester, UK) gyémánt cellát (Diamond Anvil Cell) használtunk, mely rendkívül kis térfogatú minták mérésére is alkalmas ($\sim 50\ \text{nl}$). A csillámlemezt meghajlítva helyeztük a fénypálya a zavaró interferencia lecsökkentése végett, a gyémánt cella estében pedig egy nyaláb-fókuszálóval (beam condenser, Bruker) irányítottuk a cellára az infravörös fényt.

A mért FTIR spektrumok felbontása $2\ \text{cm}^{-1}$ volt (hullámszám). A jel/zaj viszonyt 256 spektrum átlagolásával javítottuk. A spektrumok kiértékeléséhez ProteIR szoftvert használtunk (Smeller és mtsai 1995). Az epitaxiálisan nőtt amiloid fibrillumok spektrumánál korrigáltunk a párhuzamos csillámrétegekben reflexió miatt fellépő interferenciasávokra.

V. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

V. 1. CSILLÁMFELSZÍNEEN ORIENTÁLT AMILOID β 25-35 MODELL-RENDSZER JELLEMZÉSE

Ebben a fejezetben a csillámfelszínen növesztett orientált A β 25-35 hálózat morfológiai és nanomechanikai jellemzése kerül bemutatásra. A hálózatot reprodukálhatósága, paramétereinek homogenitása miatt a későbbiekben kísérleti modell-rendszerként használjuk.

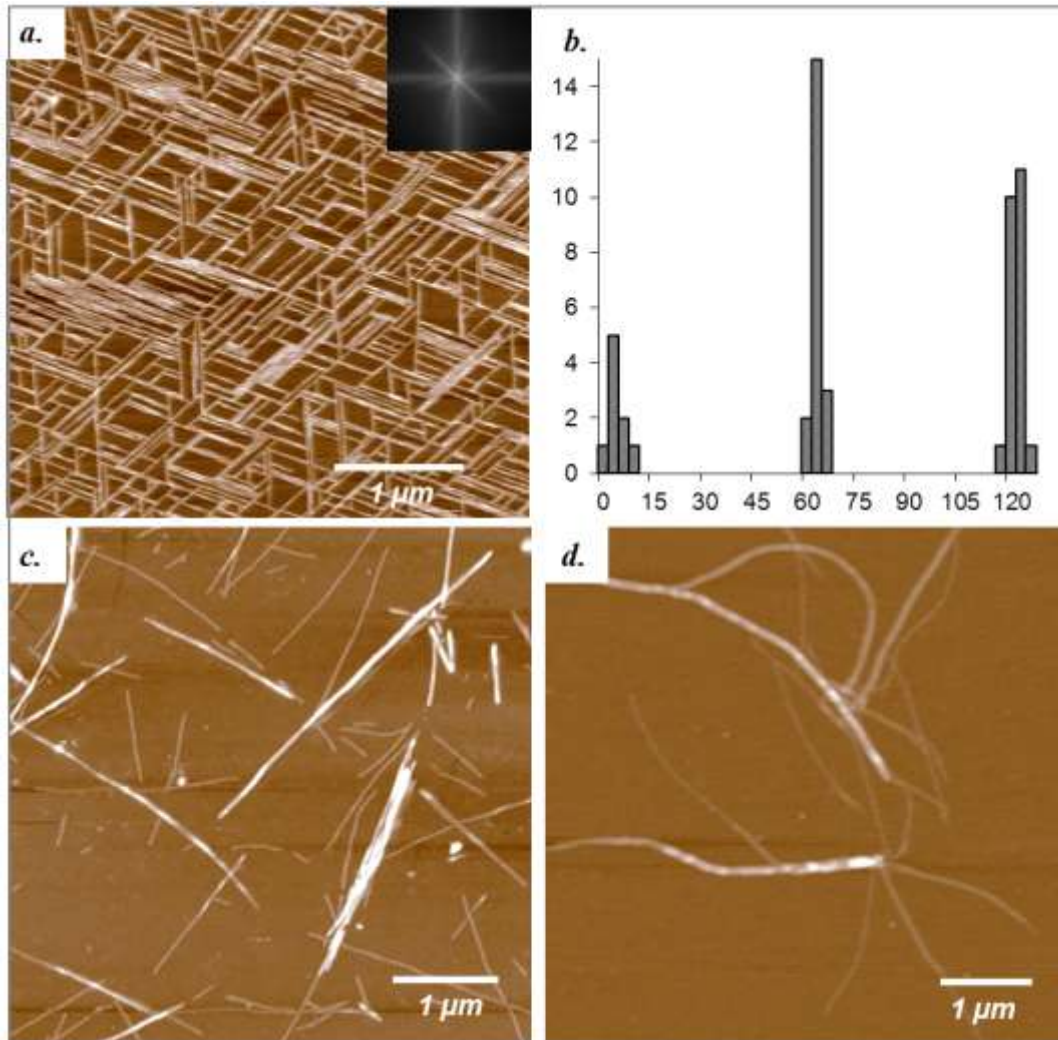
V. 1. 1. A FIBRILLUMOK MORFOLÓGIÁJA ÉS BELSŐ SZERKEZETI DINAMIKÁJA

Kísérleteinkben AFM segítségével vizsgáltunk szintetikus A β 25-35 peptidekből növesztett fibrillumokat. A csillámfelszínen adszorbeált fibrillumok a felszínen szabályos trigonális elrendeződésben orientálódtak (**15. a. ábra**). Lemértük egy referenciavonalhoz képest a fibrillumok irányának szögeloszlását. Három fő irányt kaptunk, a fibrillumok közti szög egyenként 60° volt (**15. b. ábra**). A fibrillumok akár több mikrométeren keresztül is megőrizték az orientációjukat. A csillámfelszín más peptidek elrendeződésére is orientáló hatással van, példa erre az α -synuclein szabályos trigonális mintázata (Hoyer és mtsai 2004). A csillám hasítási felületén a hexagonálisan elrendezett oxigén ionok K⁺-kötő zsebeket hoznak létre. A fibrillumok orientált elhelyezkedését az A β 25-35 peptid pozitív töltésű része valamint a K⁺ kötőhely közötti kölcsönhatás határozza meg. A fibrillumok elhelyezkedését a csillám rendezett kötőhelyei határozzák meg, erre utal a fibrillumok által kialakított hexagonális mintázat és a csillám kristályszerkezetének egyezése is.

Az orientált elrendeződés jelentős mértékben függ az A β 25-35 minta életkorától. Friss (néhány órás) minta esetén szabályos trigonális orientációjú fibrillumokat figyelhettünk meg (**15. a. ábra**). Néhány napos minta esetében viszont fibrillum-kötegek jelentek meg és a trigonális orientáció eltűnt (**15. d. ábra**).

A GOPS kezelt üvegfelületre kötött A β 25-35 fibrillumok egyáltalán nem mutatnak orientációt és morfológiailag is heterogének (**15. c. ábra**). A fibrillumok

orientációja szabályos mintázatként jelenik meg a **15. a. ábra** 2D Fourier Transzformációján (**betétábra**). Az amiloid hálózat atomerő-mikroszkópos képe olyan pixelekből áll, melyek a hálózatot alkotó amiloid fibrillumok térbeli elrendeződését



15. Ábra. a. Csillámfelületre adszorbeált $A\beta_{25-35}$ fibrillumok jellegzetes trigonális elrendeződésben. **Betétábra:** Az AFM kép 2D Fourier Transzformációja.

b. Csillámfelületre abszorbeált fibrillumok három fő irányának szögeloszlása, egy referencia vonalhoz képest.

c. GOPS kezelt üvegfelületre kötött, oldatban növesztett $A\beta_{25-35}$ fibrillumok.

d. Oldatban növesztett, majd csillámfelületre vitt 7 napos $A\beta_{25-35}$ fibrillumok.

(Pásztázó atomerő-mikroszkópos magasságkontraszt felvételek, puffertben, oszcillációs üzemmódban.)

írják le. A 2D Fourier Transzformáció (2D-FT) módszer ezt a térbeli információt egy olyan, matematikailag meghatározott frekvenciatartományra alakítja, amely megadja a pixelenkénti intenzitás értékek változásának frekvenciáját. Ez a kimeneti 2D-FT kép mennyiségi információt is hordoz a képen levő struktúrák orientációjára nézve, jelen esetben három világosan elkülönülő orientációs irányt látunk a képen.

A fenti eredményekből arra következtethetünk, hogy az orientált hálózatok létrejötte a monomerek illetve oligomerek jelenlététől függ, mert a monomerek koncentrációja az oldatban az érett fibrillumok megjelenésével - az idő függvényében - csökken. Továbbá, a friss mintából létrejött szabályos trigonális orientációjú fibrillumok nem fedték át egymást, a növekedés általában megállt, amikor egyik fibrillum elérte a másikat. A fibrillumok növekedését szterikusan gátolták az útjukban fekvő, már előbb kialakult fibrillumok. A fibrillumok néha Z irányban is növekedtek (vastagodtak), de a fibrillumok vastagsága nem haladta meg az 5 nanométert. Ebből arra következtettünk, hogy az orientált A β 25-35 hálózat felszíni növekedés eredményeképpen jön létre.

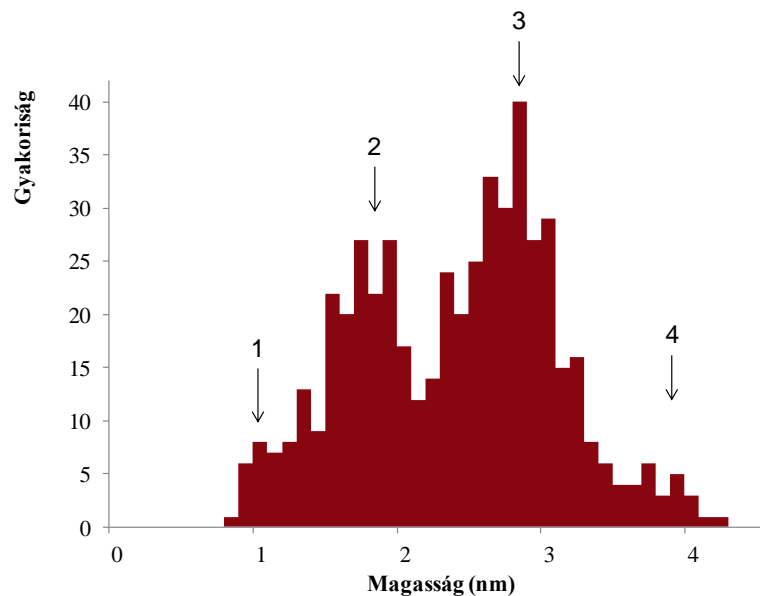
Az A β 25-35 peptidek rövid időn belül (másodpercek, percek) felépítik a fibrillumokból álló szabályos hálózatot. A hálózatképződés gyors kinetikával zajlik le, a sebesség a kezdeti peptidkoncentrációtól függ. Hogyha a peptidkoncentráció kellően magas, akkor alig egy-két perc alatt sűrűn borított hálózatos felszínre kapunk. Alacsonyabb peptidkoncentrációnál a hálózat kialakulása is lassabb, a fibrillumok közötti távolság – így a fibrillumok hossza is – nagyobb. A minimális peptidkoncentráció, amelynél már elindul az epitaxiális növekedés, 5 - 8 μ M.

Na-PBS-ben feloldott A β 25-35 peptidek időfüggő (*time lapse*) AFM felvételeivel kimutattuk, hogy előbb növekedési góccok, magok jelennek meg a csillám felszínén, és ezekből a magokból indul meg a fibrillumok növekedése a három fő orientációs irányban. A növekedés mindaddig folytatódik, míg egy már meglévő fibrillum oldalába nem ütközik a fibrillum. Az orientált fibrillumok mindkét végükön növekednek, bár az egyik végükön a növekedés jóval gyorsabb, mint a másikon (Kellermayer és mtsai 2008). Időfüggő AFM felvételek alapján arra következtettünk, hogy a szabályos orientációt mutató fibrillumok létrejötte két különböző kötődési lépéstől függ: (1) peptid egységek kitapadása a csillámfelszínre és (2) peptid egységek hozzákötődése már létező fibrillumok szabad végeihez. Az első lépésben kulcsszerepet játszik a csillámfelszín K⁺ - kötőhelye és az A β 25-35 peptid Lys28 csoportjának ϵ -amino csoportja közötti

elektrosztatikus kölcsönhatás. Ez a közvetlen peptid-csillám kölcsönhatás elengedhetetlen a további fibrillum-növekedéshez szükséges magok képződéséhez. A második lépésben, az elektrosztatikus kölcsönhatásokon kívül, hidrogénhid kötések is képződnek a β -lemez szomszédos peptidjei között. A hidrogénhid kötés stabilizáló hatása miatt, a fibrillumok végeihez történő peptid-kötődés folyamata sokkal kevésbé érzékeny az oldat K^+ - koncentrációjára, mint a peptid-csillám kölcsönhatás (Karsai és mtsai 2007).

Azt a növekedést, mely során egyik ásvány kristályai (jelen esetben peptid) egy másik ásvány kristályainak felszínén nőnek és mindkét kristály mintázata hasonló szerkezeti orientációval rendelkezik, epitaxiális növekedésnek nevezzük. Az orientált A β 25-35 fibrillumok létrejötte tehát csillámfelszín-vezérelt epitaxiális növekedés eredménye.

A peptidek rendkívül gyors kinetikával, másodpercek - percek alatt felépítették az orientált hálózatot. (Az átlagos növekedési sebesség 0,1 nm/s volt. Lásd V. 3. 1. 3. fejezet.)



16. Ábra. A fibrillumok magasságeloszlása multimodális ($n = 513$).

Az egyes fibrillumok magassága 0,8 - 4 nm között változott (**16. ábra**), a fibrillumok nem mutattak felszíni egyenetlenséget. A magasságeloszlás multimodális, a maximumoknál található értékek egy protofilamentum vastagságának illetve többszöröseinek felelnek meg. Mivelhogy egy β -lemez vastagsága $\sim 0,8 - 1$ nm (Bond

és mtsai 2003), a csillámfelületen képződött fibrillumok magasságából következik, hogy a fibrillumokat 1-5 β -lemez alkotja.

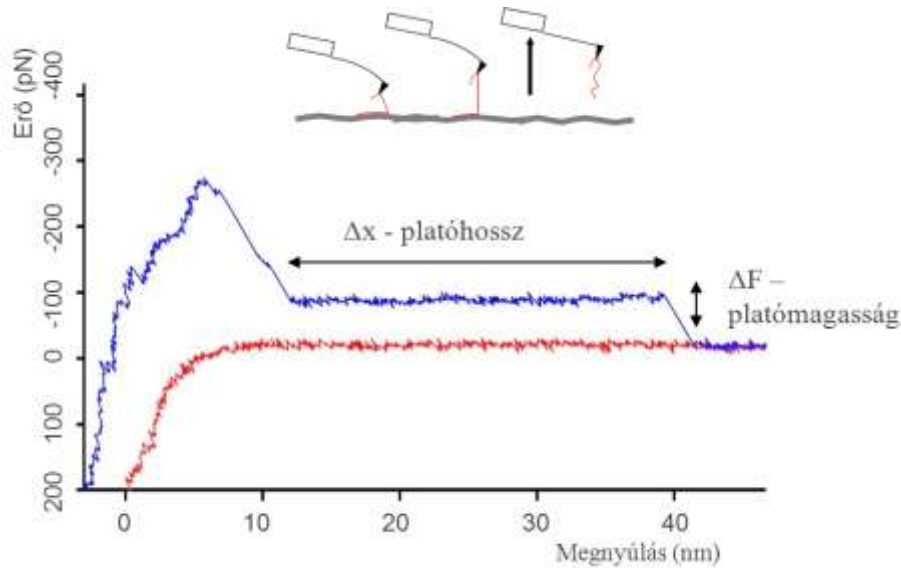
V. 1. 2. A FIBRILLUMOK ERŐSPEKTROSKÓPIÁJA

Az erőspektroszkópia a fibrillumok belső dinamikájába és szerveződésébe engednek betekintést. Az eddig vizsgált A β fibrillumokhoz hasonlóan (Kellermayer és mtsai. 2005) a méréseinkben szereplő epitaxiálisan nőtt A β 25-35 fibrillumokra is jellemző az erőplatók megjelenése. A mechanikai manipulációnak kitett A β 25-35 fibrillumok erőválasza az összes β -amiloidra nézve karakterisztikus, és a β -lemezes szerkezettel magyarázható meg. Az AFM rugólapka tuját a fibrillumhoz nyomtuk, majd konstans húzási sebességgel eltávolítottuk a felszíntől, ily módon megnyújtva a tühöz tapadt fibrillumot. A fibrillumokból mechanikai erővel fokozatosan protofilamentumokat fejtettünk le. A protofilamentumok deszorpciója reverzibilis folyamat, és a kötések szétszakítása hasonló egy cipzár működéséhez.

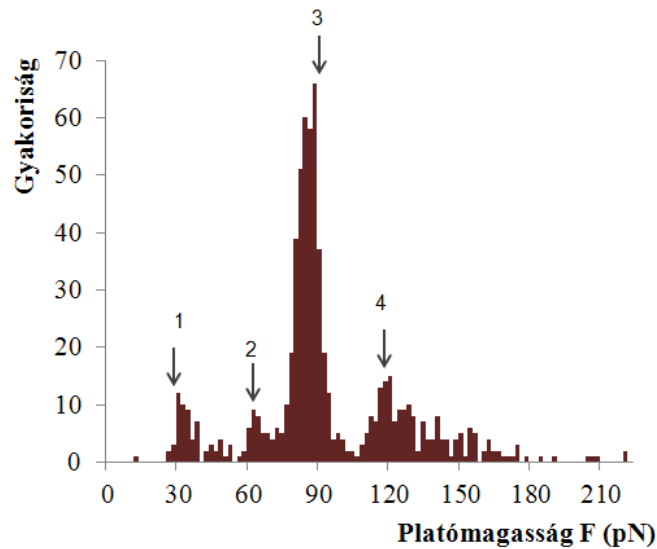
Munkacsoportunk korábbi kutatásai igazolták (Kellermayer és mtsai 2005), hogy a β -lemezek rugalmas struktúraként viselkednek, és konstans erő kifejtésével le lehet őket fejtetni a fibrillum felszínéről, mintegy szétcipzározva a fibrillumot. A lefejtett láncok képesek nagy sebességgel összekapcsolódni, visszafeküdni a fibrillum felületére (összecipzározódás).

A folyamat során felvett erő-megnyúlás görbék platóval rendelkeznek. A plató magassága (platóerő) megegyezik a szétcipzározáshoz szükséges erővel. Ez az érték a fibrillum mechanikai stabilitásának mércéje. A platóhossz a protofilamentumok hosszúságára utal. Konstans erő mellett a lefejtett protofilamentumok hossza a plató végéig növekedik, a plató végén egy lépésben hirtelen nullára csökken az erő (**17. ábra**), ilyenkor a protofilamentum vagy leszakad a tőről, vagy a fibrillumról leválva a tün marad. A húzási ciklus mindvégig azonos energiájú (azonos kémiai természetű) kötéseket terhelünk mechanikailag. Miközben a kötések egyenként, egymás után felszakadnak, a lefejtett protofilamentum hossza is lépésről lépésre nő. Egy kötés felszakadásakor annyival nő a szabad protofilamentum hossza, amekkora a távolság két egymás melletti, a protofilamentumot a szomszédos protofilamentumokhoz rögzítő

kötés között. Az AFM felbontása nem teszi lehetővé a két kötés felszakadása közötti időintervallumban történő erőcsökkenés rögzítését, így az erő konstansnak tűnik.

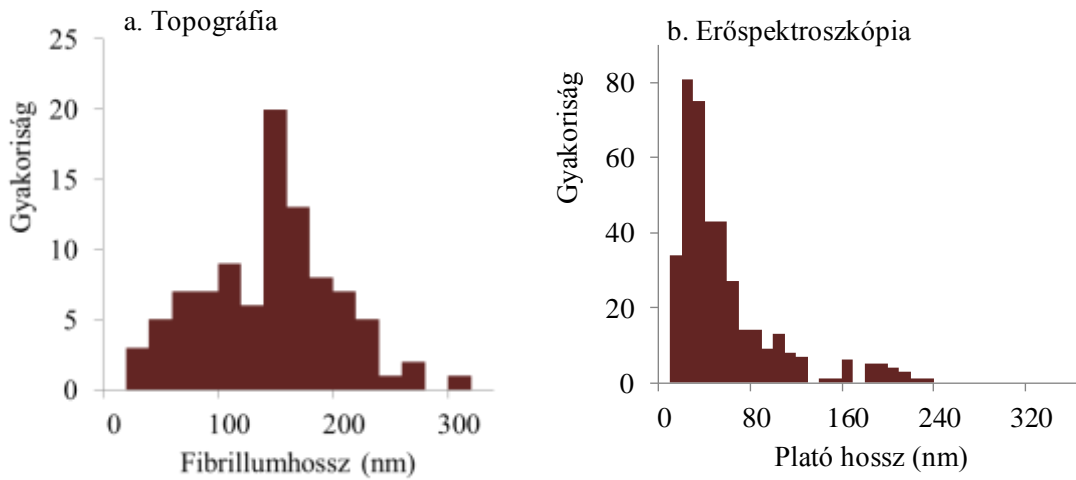


17. Ábra. Tipikus erő-megnyúlás görbe. A kék görbe a nyújtás, a piros a visszaengedés során felvett adatokat ábrázolja. A betétabra szemlélteti a tű meghajlásának változását egy protofilamentum megnyújtása és leszakítása közben.



18. Ábra. A platómagasság eloszlása csillámon orientált $A\beta_{25-35}$ fibrillumok esetén. A számok a platóhoz tartozó protofilamentumok feltételezett számát jelölik.

A fibrillumok magasságeloszlásából (**16. ábra**) és nanomechanikai vizsgálatából kiderült, hogy a csillámfelülethez adszorbeált fibrillumokat változó számú, maximum öt protofilamentum építi fel. A 0,8 - 1 nm vastag szerkezeti egység nagy valószínűséggel egy β -lemeznek felel meg. A platómagasság eloszlás is több karakterisztikus értéket mutat (**18. ábra**, nyilak), a maximumok egy egységnyi platóerőnél és ennek egész számú többszöröseinél jelentkeznek. Az egységnyi platóerő ~ 30 pN, és feltehetően megegyezik az egy β -lemez vastag protofilamentum lefejtéséhez szükséges erővel.



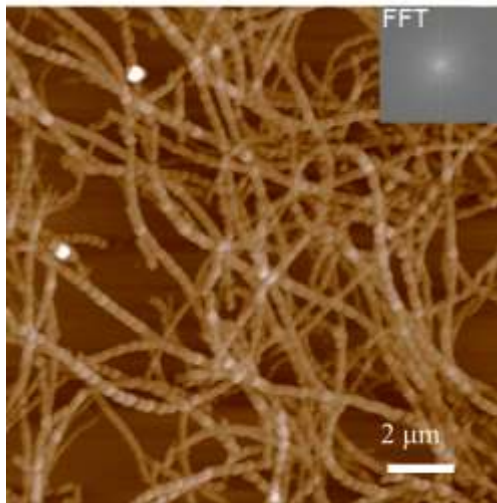
19. Ábra. Az orientált fibrillumok hosszeloszlása (**a**) illetve a platóhossz-eloszlás (**b**).

A platók hossza összhangban volt az orientált fibrillumok tényleges hosszával az adott kísérleti körülmények között. Az erőspektroszkópiai méréseket ugyanis egy olyan hálózaton végeztük el, amely átlagosan ~ 170 nm hosszú fibrillumokból épült fel (**19. a. ábra**), a leghosszabb fibrillumok 300 nm-esek voltak. A platók átlagos hossza 40 nm-nek adódott, a maximális hossz pedig nem lépte túl a 250 nm-t (**19. b. ábra**), tehát a fibrillumról lefejtett struktúrák jóval rövidebbek voltak a fibrillumok tényleges hosszánál.

V. 2. OLDATBAN, KÖZEL EGYENSÚLYI KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT ÖSSZEÁLLT VALAMINT EPITAXIÁLISAN NÖVESZTETT AMILOID FIBRILLUMOK ÖSSZEHASONLÍTÓ VIZSGÁLATA

A csillámfelületen epitaxiálisan növesztett A β 25-35 hálózat szabályos orientációt mutat, a magas rendezettségű stabil hálózatot homogén szerkezetű fibrillumok alkotják. Egyszerűsége és reprodukálhatósága miatt kísérleti modell-rendszerként használható fel. Az A β 25-35 peptid oldatban, közel egyensúlyi körülmények között is képez fibrillumokat. Az alábbiakban ezen két különböző útvonalon összeállt fibrillum összehasonlítását mutatom be atomerő-mikroszkópai, erőspektroszkópai és infravörös spektroszkópai módszereken keresztül.

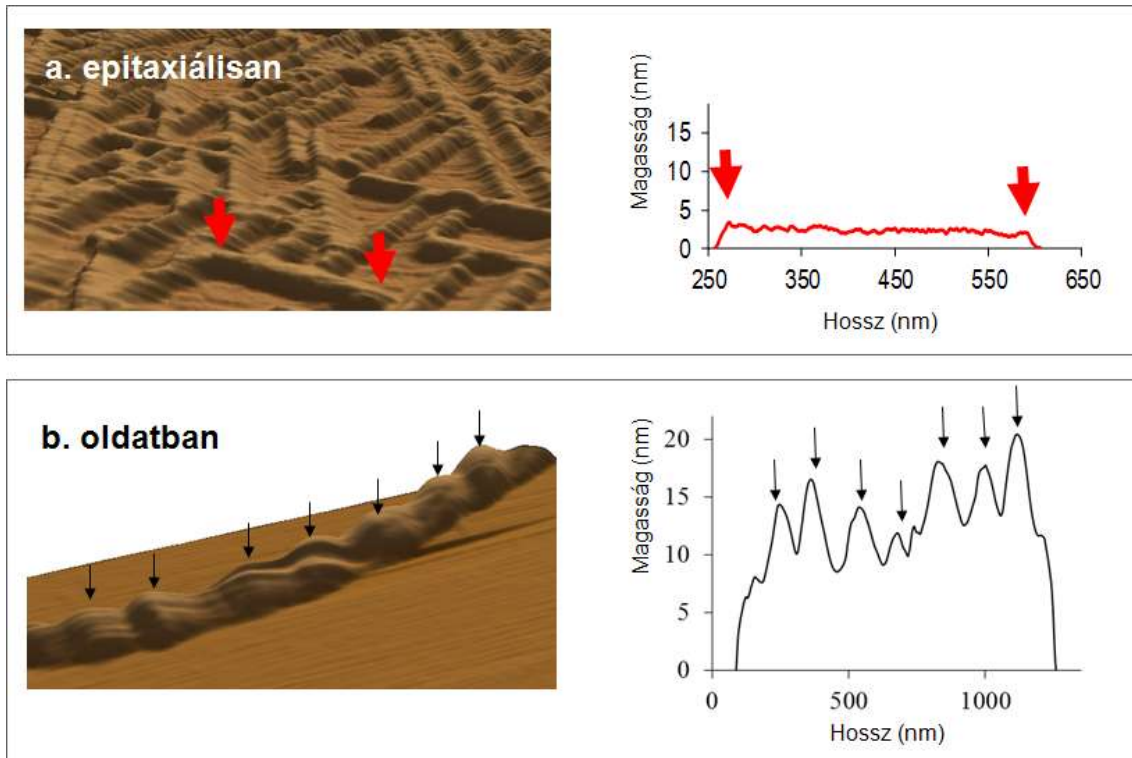
V. 2. 1. A FIBRILLUMOK STRUKTURÁLIS HIERARCHIÁJA ÉS ORIENTÁCIÓJUK CSILLÁMON



20. Ábra. Oldatban növesztett, majd csillámfelületre vitt 14 napos A β 25-35 minta morfológiája (pásztázó atomerő-mikroszkópos magasságkontraszt felvétel, pufferben, oszcillációs üzemmódban.). **Betétábra,** AFM kép 2D Fourier Transzformációja.

Az atomerő-mikroszkópos kísérleteink alapján az epitaxiálisan növesztett fibrillumok jelentős mértékben eltértek az oldatban, közel egyensúlyi körülmények között összeállt érett amiloid fibrillumoktól, és ez a különbség morfológiájukban és kialakulásuk kinetikájában is megmutatkozott. Az epitaxiálisan növesztett fibrillumok szabályos trigonális elrendeződésével ellentétben (**15. a. ábra**), az oldatban összeállt több napos fibrillumok szabálytalanul, rendszertelenül tapadtak ki a csillámra. (**20. ábra**), a fibrillumok felszínén gyöngysor-szerű periodikus kiemelkedések, ismétlődések figyelhetők meg. A **15. a. ábra betétábráján** látható

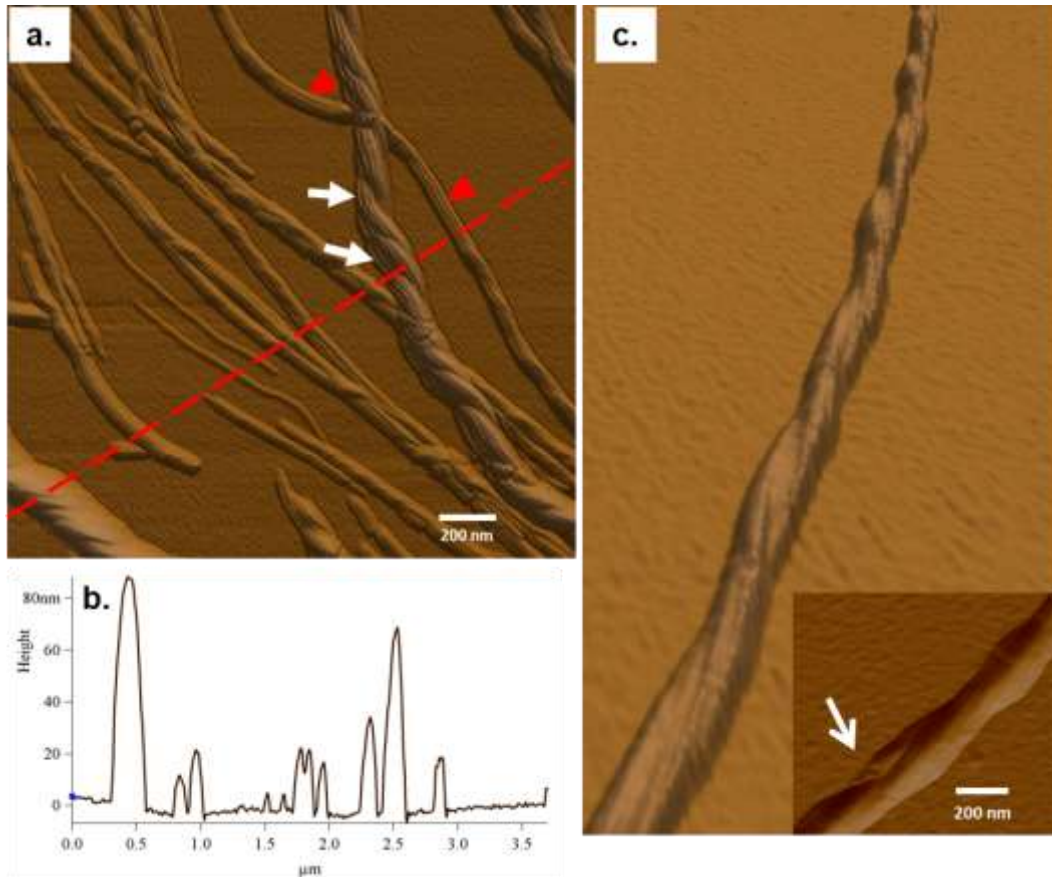
2D Fourier Transzformáció a fibrillumok szabályos orientációját hexagonális mintázatként jeleníti meg, ez a szabályos mintázat nem figyelhető meg a **20. ábra** betétábráján. Mint azt az V. 1. 1. fejezetben részletesen tárgyaltuk, az orientált hálózatok létrejötte a monomerek illetve oligomerek jelenlététől függ, ezek koncentrációja az érett fibrillumok megjelenésével az idő függvényében csökken.



21. Ábra. A fibrillumok magasságprofilja. **a.** Orientált hálózat AFM-es felvételének 3D rekonstrukciója (bal). Csillámon epitaxiálisan növesztett fibrillum magasságprofilja a hossz függvényében. A piros nyilak jelzik a fibrillum kezdetét és végét (jobb). **b.** Oldatban növesztett, érett amiloid fibrillum AFM-es képének 3D rekonstrukciója. A fibrillumok felszíni periodicitást mutatnak (bal). Oldatban növesztett többnapos fibrillum magasságprofilja a hossz függvényében. A fekete színű nyilak jelzik az átlagos magasságtól való eltérést (jobb).

Bár mindkét fibrillum-típus azonos monomerekből épült fel, felszíni topográfiájuk jelentősen különbözött egymástól. Az egyes epitaxiálisan növesztett fibrillumok esetében nem tapasztaltunk jelentős eltérést, a magasságuk a fibrillum teljes hosszában egyforma volt (**21. a.** és **b. ábrák**). Az oldatban összeállt fibrillumok felszíne azonban

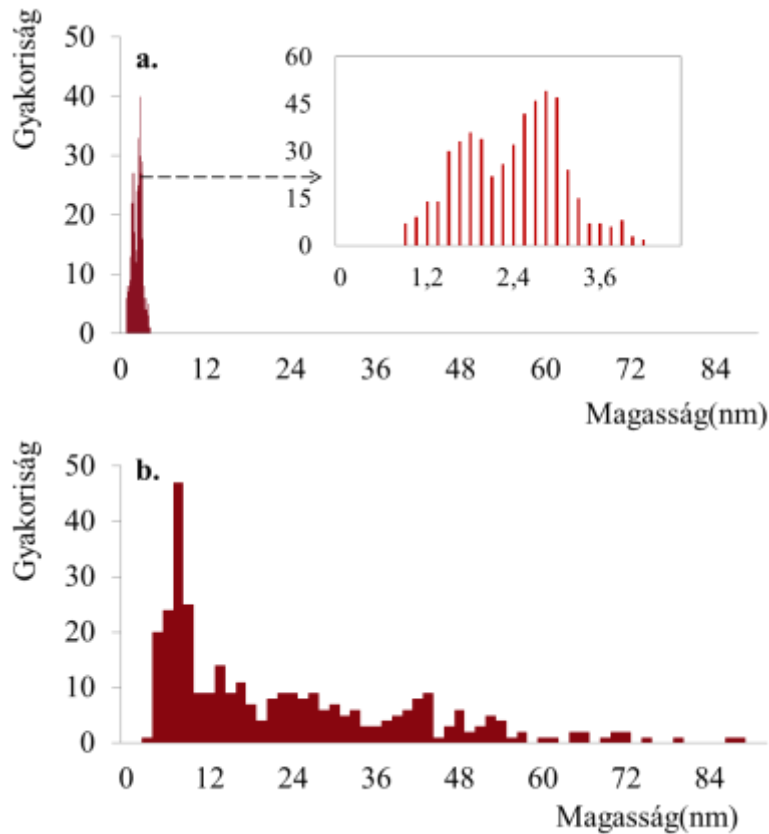
kifejezett magasságbeli egyenetlenséget mutatott (**21. c. és d. ábrák**). Az egyenetlenségeket 5-10 nanométeres magasságkülönbségek ismétlődése hozta létre. A fibrillumok életkorától függően változó periodicitást kaptunk, a kiemelkedések 30-200 nanométerenként ismétlődtek. (Az „idősebb” fibrillumok periodicitása nagyobb volt.)



22. Ábra. a. Érett $A\beta_{25-35}$ amiloid fibrillumok polimorfizmusa egyazon mintán belül: helikális (fehér nyilak) illetve csíkosított, lemezszerű fibrillumok (piros nyilak). **b.** Magasságprofil egy tetszőlegesen kiválasztott egyenes mentén (piros szaggatott vonal az **a.** ábrán). **c.** Oldatban összeállt, csavart fibrillumok. A betét ábrán a fehér nyíl az egyik protofibrillum szabad végét jelzi. Atomerő-mikroszkópos felvételek, oszcillációs üzemmódban, pufferben.

Egy vastag amiloid rost több szálból (protofilamentumból) állhat, a fibrillumok számos morfológiát felvehetnek (Wei és mtsai 2010; Paravastu és mtsai 2008). Az epitaxiálisan orientált fibrillumokkal ellentétben az oldatban összeállt fibrillumok atomerő-mikroszkópos felvételeinken nagy fokú polimorfizmust mutattak (**22. a. ábra**).

Az ábrán egyaránt láthatóak lapszerű, egyenes lefutású fibrillumok (piros nyíl) valamint helikális, csavarodott fibrillumok (fehér nyíl). A fibrillumok magassága egyazon mintán belül igen eltérő (**22. b. ábra**).



23. Ábra. A fibrillumok vastagságának eloszlása, topográfiai magasságmérés alapján. **a.** Epitaxiálisan orientált fibrillumok magasságeloszlása. A betét ábrán kinagyítva látható az epitaxiálisan nőtt fibrillumok magasságának multimodális eloszlása. ($n = 513$) **b.** Oldatban összeállt, érett amiloid fibrillumok magasságeloszlása. ($n = 325$)

A fibrillumok másik jellemzője a vastagságuk. Atomerő-mikroszkópos felvételek alapján lemértük az orientált fibrillumok illetve az oldatban összeállt amiloid fibrillumok topográfiai magasságát, ezen érték a fibrillum vastagságával egyenértékű.

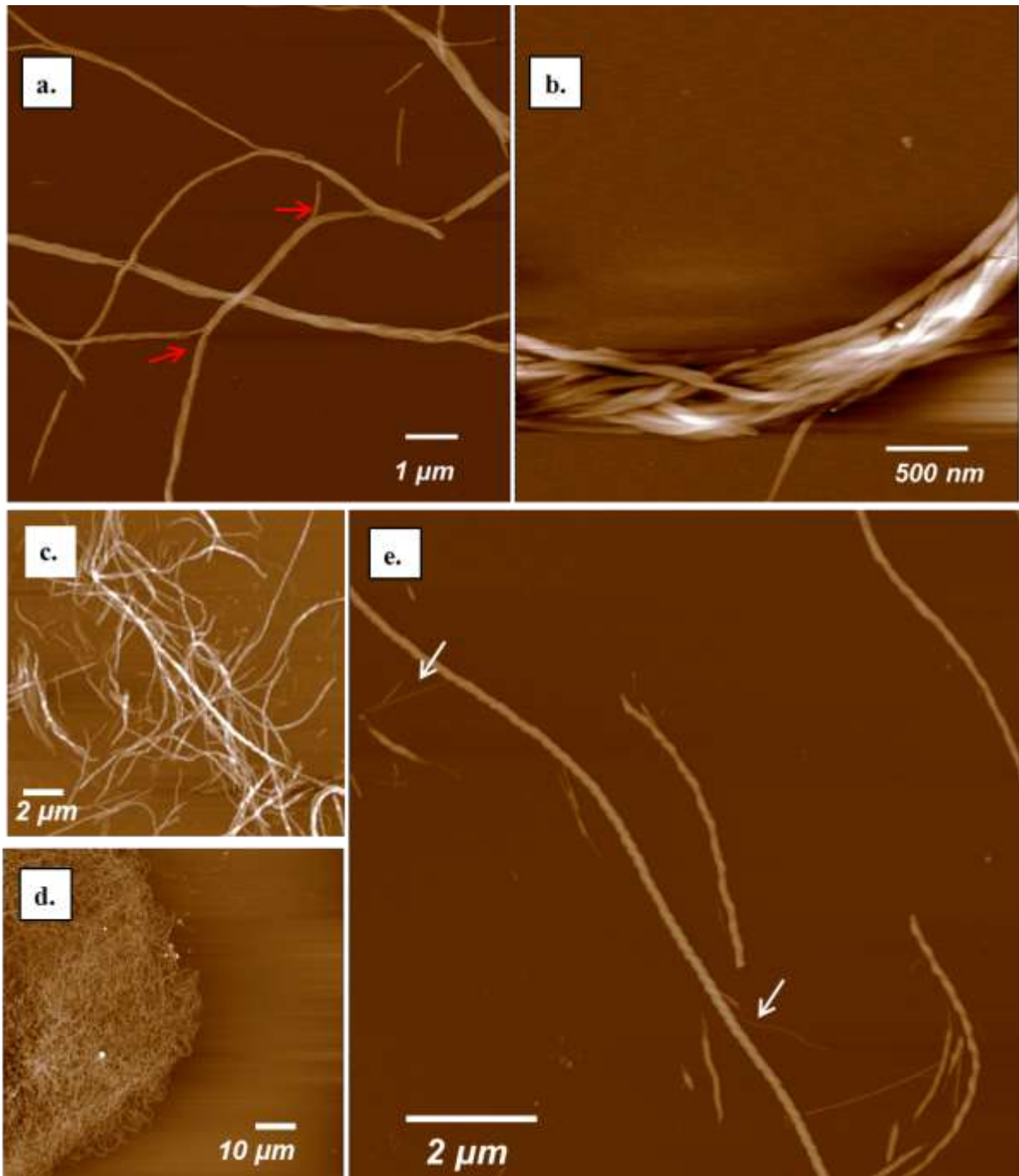
A fibrillum-magasság epitaxiálisan növesztett fibrillumok esetében 0,8 - 4 nm volt. Az oldatban összeállt, érett fibrillumok magassága nagyrészt 7 és 40 nm között változott, de előfordultak vékonyabb illetve vastagabb fibrillumok is.

Röntgendiffrakciós kísérleti adatok alapján, a $\sim 0,8 - 1$ nm vastag szerkezeti egység egyetlen β -lemez vastagságának felel meg (Bond és mtsai 2003). Tehát az oldatban összeállt fibrillumok sokkal vastagabban: tízszer vagy akár százszor több β -lemezből is állhatnak, mint az epitaxiálisan növesztett fibrillumok (**23. ábra**).

Az epitaxiálisan nőtt fibrillumok rövidebbek az oldatban összeállt fibrillumoknál: $0,1 - 2$ mikrométer hosszúak lehetnek a peptid-, Na^+ és K^+ koncentráció függvényében (Karsai és mtsai 2007). A csillámon orientált fibrillumok hosszúsága sztérikusan korlátozott. A fibrillumok végei közti hézagokat a monomerek rendre kitöltik, és a növekedés addig nem áll meg, míg a fibrillum vége „neki nem ütközik” az akadályként előtte levő szomszédos fibrillumnak. Ezzel ellentétben az oldatban összeálló fibrillumok számára nem létezik ilyen jellegű akadály, a monomerek szabadon diffundálnak az oldaton belül, és a monomerek koncentrációjától függően több tíz mikron hosszúságú, magas szerkezeti hierarchiájú fibrillumok alakulnak ki.

A **24. ábra** atomerő-mikroszkópos felvételei szemléltetik az oldatban nőtt A β 25-35 amiloid fibrillumok morfológiájának változatosságát. A **24. a. ábrán** különböző hierarchiájú (több vagy kevesebb protofilamentumból álló) amiloid fibrillumok láthatók, magasságuk 10 és 50 nm között változik. A protofilamentumok itt inkább egymással párhuzamosan haladnak, nem képeznek helikális szerkezetű fibrillumokat. A piros nyilak a vastagabb fibrillumokon belüli elágazásokra mutatnak, ezeken a helyeken szétcsavarodást figyelhetünk meg. A **24. b. ábra** kötegszerűen egymásba csavarodott fibrillumokat mutat be. A köteg átmérője helyenként eléri a 100 nm-t. A **24. c.** felvételen a szerkezeti hierarchia különböző fokozatain levő fibrillumok együttese látható. A fibrillumok felszínén periodikus kiemelkedések vannak. **24. d. ábra:** plakk-szerű filamentáris amiloid-aggregátum, a fibrillumok szorosan egymásba gabalyodnak, tekerednek, perzisztencia-hosszuk kicsi. Az aggregátum széléről kilógó fibrillumok $10-15$ nm vastagok. **24. e. ábra:** szabályos periodicitást mutató $20 \mu\text{m}$ hosszú, 60 nm vastag fibrillum egy részlete. A fehér nyilak 8 nm vastag protofibrillumokat jelölnek.

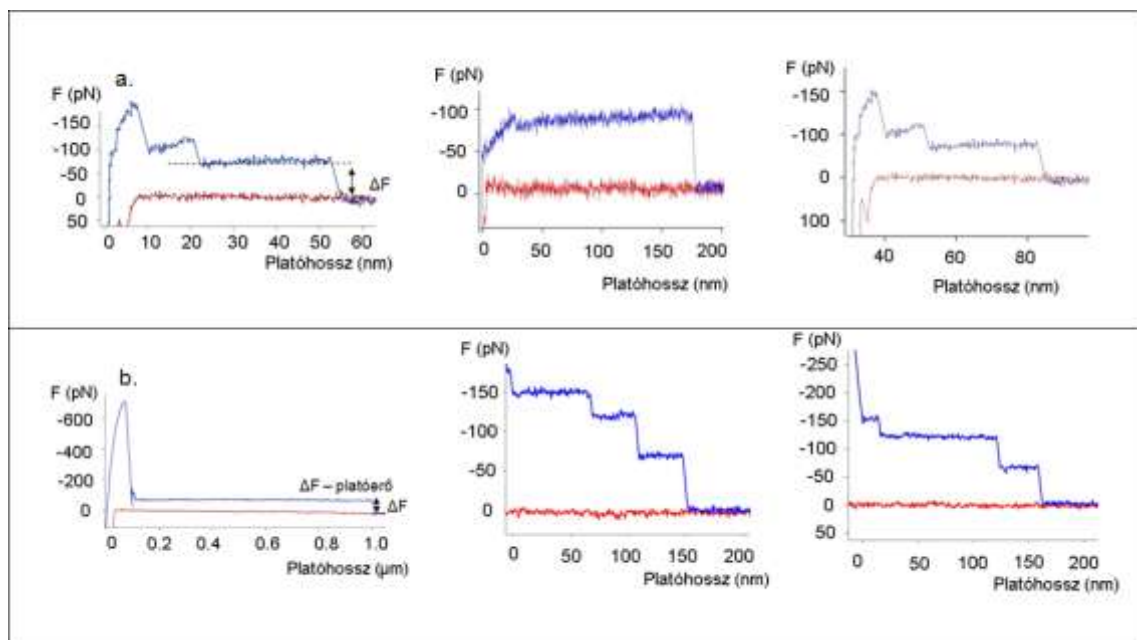
A fibrillum-képződés szempontjából a növekedési kinetikában is jelentős különbséget mutat a két különböző úton kialakuló fibrillum. Oldatban órák, napok alatt állnak össze a fibrillumok, de a csillám felszínén a folyamat másodpercek-percek alatt lezajlik. A fibrillum-képződés ilyen mértékű felgyorsulásáért a csillámfelszín katalizáló szerepe lehet felelős.



24. Ábra. *Aβ25-35* amiloid fibrillumok morfológiai variabilitása, AFM-felvételek. **a.** párhuzamos kötegek, szétcsavarodás, **b.** csavart kötegek, **c.** helikális fibrillumok sokasága, **d.** plakk-szerű aggregátum egyedi fibrillumokkal, **e.** periodikus kötegek

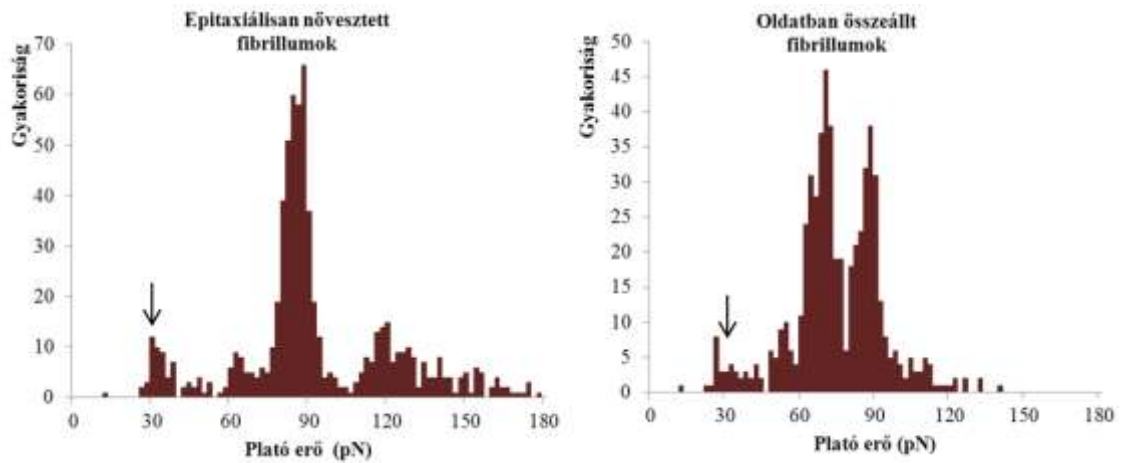
V. 2. 2. A β 25-35 FIBRILLUMOK NANOMECHANIKÁJA

Az A β 25-35 fibrillumok nanomechanikai viselkedését erőplatók megjelenése jellemzi, a fibrillum felszínéről egy vagy több protofilamentumot hámozunk le az atomerő-mikroszkóp tűjének segítségével. Az epitaxiálisan növesztett illetve oldatban összeállt fibrillumok jellegzetes erőválaszait a **25. számú ábrán** láthatjuk. Egylépcsős platók és hierarchikusan egymásra épülő, lépcsőt kialakító erő platók egyaránt megfigyelhetők. Ez utóbbiak esetében egyszerre több protofilamentum tapadt a tűhöz, de a húzás során nem egyszerre szakadtak le, hanem egyenként, és a leszakadásuk pillanatában az erő hirtelen lecsökkent, lépcsőzetes erő-megnyúlás görbét hozva létre.



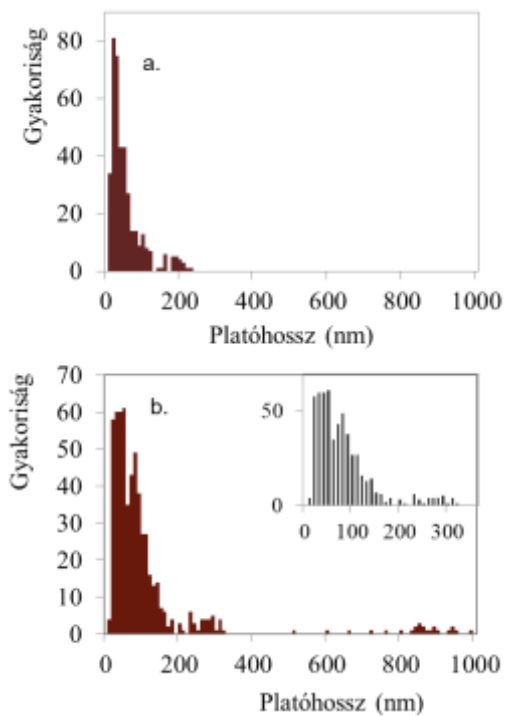
25. Ábra. Epitaxiálisan növesztett (a) valamint oldatban összeállt A β 25-35 fibrillumok (b) jellegzetes erő-megnyúlás görbéi.

Az erőválaszok alakja hasonló volt az epitaxiálisan növesztett és az oldatban összeállt A β 25-35 fibrillumok esetében: mindkét típusú fibrillum hasonló plató-szerű nanomechanikai válaszokat adott erőspektroszkópiás mérések során. Az adatok összesítéséből nyert hisztogramok is hasonló multimodális eloszlást mutatnak (**26. ábra**). A platóerőmagasság-eloszlásokban diszkrét maximumok figyelhetők meg: a csúcsok egész számú többszörösei jelzik, hogy adott erőnél hány darab protofilamentum tapadt a tűhöz. A legkisebb erőnél levő maximum, azaz az elemi platóerő azzal az erővel egyezik meg, amely egyetlen protofilamentum lefejtéséhez szükséges. Az elemi plató erő 30 pN-hoz közeli értéket vett fel.



26. Ábra. A plató erő eloszlása epitaxiálisan növesztett ($n = 690$) és oldatban összeállt ($n = 574$) A β 25-35 fibrillumok esetén. A nyilak az elemi plató erőt jelzik.

A plató hossza a lefejtett protofilamentumok hosszával egyezik meg. Minél hosszabb a plató, annál hosszabb protofilamentumot fejtettünk le a fibrillum



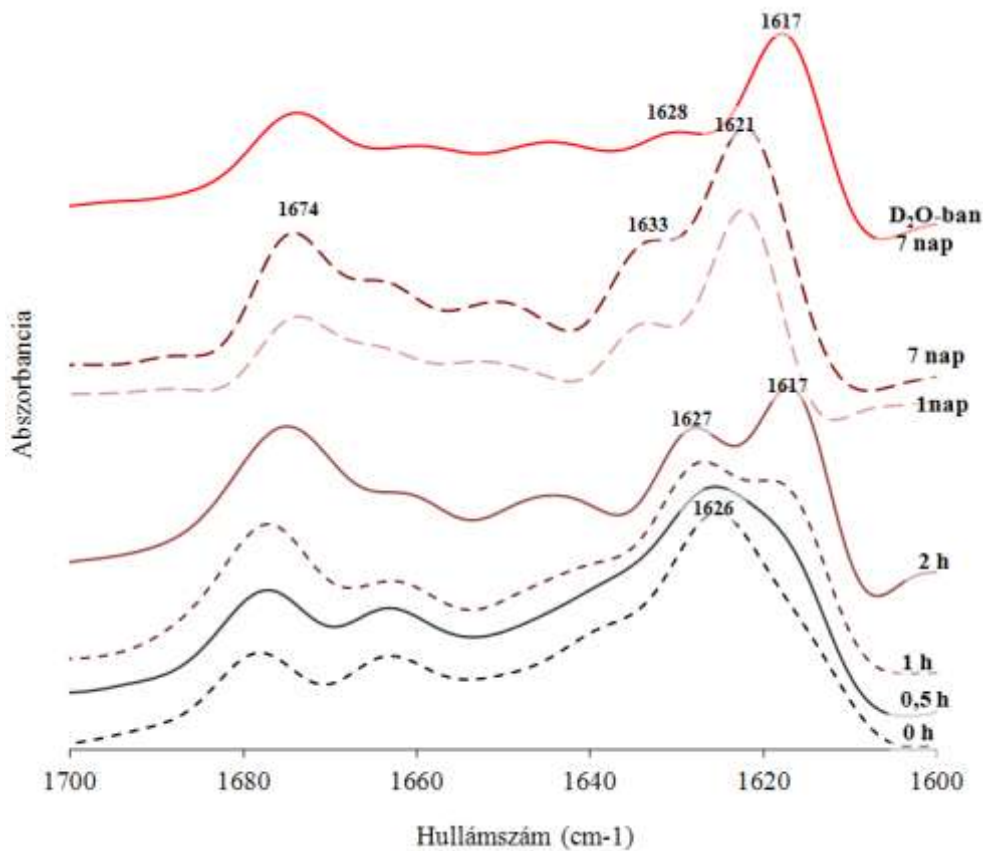
27. Ábra. A platóhossz eloszlása epitaxiálisan növesztett (a) illetve oldatban összeállt (b) A β 25-35 fibrillumok esetén.

felszínéről a mechanikai szétcipzározás során. A platóhossz tehát a fibrillum felszínéről lefejtett struktúrák hosszával korrelál. Az epitaxiálisan növesztett, orientált amiloid fibrillumok véges hossza összefügg platóhossz-eloszlásukkal (**27. a. ábra**), ugyanis a hisztogramban szereplő kísérleti adatok ~ 200 nm hosszú fibrillumokból felépült hálózat erőspektroszkópiájából származnak. Az oldatban összeállt fibrillumoknál ellenben mikronos hosszúságú platókat is találtunk (**27. b. ábra**). A hisztogramok egységessége érdekében ezeket a hosszú platókat a hisztogramon nem ábrázoltuk. Az 585 kiértékelt erőgörbéből 24 darab erőgörbe platóhossza haladta meg az 500 nm-t (4%).

V. 2. 3. A β 25-35 FIBRILLUMOK FTIR SPEKTROSKÓPIÁJA

A fibrillum másodlagos szerkezetének jellemzésére az infravörös spektroszkópiát választottuk. A Fourier transzformációs infravörös spektroszkópiát gyakran alkalmazzák béta lemezes másodlagos fehérjeszerkezet kimutatására és vizsgálatára.

A fehérjék másodlagos szerkezetére az amid I sávnak megfelelő, 1600 cm^{-1} és 1700 cm^{-1} közötti hullámszám-tartomány a legérzékenyebb. Az amid I rezgés energiájának nagy része (83%) a C=O nyújtási módból származik.



28. Ábra. Oldatban összeállt A β 25-35 fibrillumok különböző időközönként felvett FTIR spektruma.

Az oldatban összeállt A β 25-35 fibrillumok másodlagos szerkezetét az amid I sáv FTIR spektrumának megfigyelésével követtük időfüggő módon: a peptidek feloldásának pillanatától ($t \sim 0$ perc) több napos korukig ($t \sim 1$ hét). A **28. ábrán** látható, hogy rögtön a peptidek feloldása után a spektrum egy erős sávval rendelkezett 1626 cm^{-1} körül, ez az érték antiparallel β -lemezes szerkezetre utal (Chirgadze és mtsai

1973; Krimm és Bandekar 1986; Arrondo és mtsai 1993; Middaugh és mtsai 1995). 2 óras inkubáció elteltével a másodlagos szerkezetben változás lépett fel, az antiparallel β -lemezes szerkezetre utaló abszorpciós csúcs „kettévált”: létrejött két különálló csúcs 1627 cm^{-1} -nél illetve 1617 cm^{-1} -nél. Hosszabb inkubációs időknél is megfigyelhető a két csúcs, de az abszorpciós maximum $4\text{-}6\text{ cm}^{-1}$ -rel a nagyobb hullámszámok irányába tolódott el: a csúcsok 1633 cm^{-1} -nél valamint 1621 cm^{-1} -nél jelentek meg. A 1621 cm^{-1} -nek megfelelő frekvencia kinyújtott láncú β -szerkezetre és megerősödött intermolekuláris kölcsönhatásokra utal (Chirgadze és mtsai 1973; Krimm és Bandekar 1986; Arrondo és mtsai 1993; Middaugh és mtsai 1995).

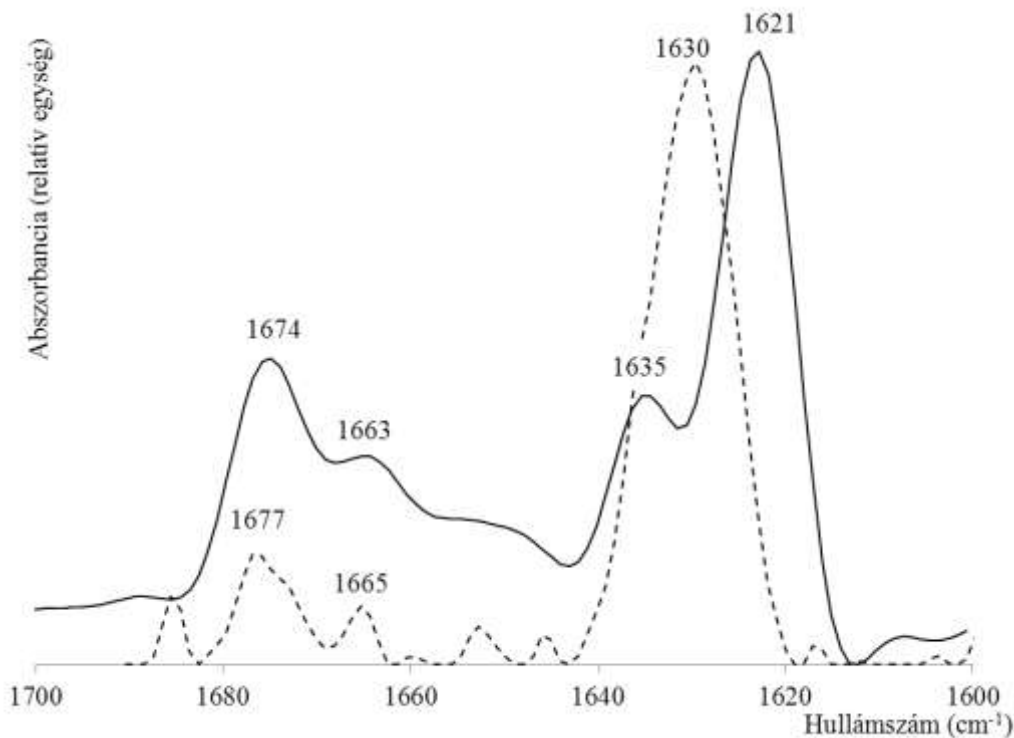
A hosszabb inkubációs időknél tapasztalt $4\text{-}6\text{ cm}^{-1}$ -es hullámszám-különbség az izotóp-eltolódással magyarázható meg: kis inkubációs időknél a fibrillumok szerkezete még elég laza ahhoz, hogy az oldószerként használt D_2O deutérium atomjai helyet cserélhessenek a fibrillumon belüli H-atomokkal. A deutérium a hidrogén nehezebb izotópjá, ennek következtében a rezgési frekvenciája is kisebb lesz, tehát a deutériumot tartalmazó fibrillumok abszorpciós maximuma a rövidebb hullámszámok irányába tolódik el. Hosszabb inkubációs időknél (1 nap után) leállított fibrillum-növekedésnél a hidrogén atomok deutériumra való kicserélődése a fibrillumok kompaktabb szerkezete miatt alig vagy egyáltalán nem játszódik le. Az elméletünk helyességét támasztja alá az a kontroll kísérlet, mely során az A β 25-35 peptideket nehézvízben oldottuk fel, tehát a fibrillum-képződés nehézvízben játszódott le. A nehézvízben összeállt egyhetes fibrillumok FTIR spektruma két jellegzetes csúcsot mutatott: 1628 cm^{-1} -nél illetve 1617 cm^{-1} -nél. (**28. ábra** felső piros színű görbéje: „D $_2$ O-ban 7 nap”). Ezek az értékek egybeesnek a könnyűvízben összeállt, két óras fibrillumok csúcsainak maximumával.

Az 1621 cm^{-1} -nél fellépő abszorpciós maximum mellett egy kisebb intenzitású csúcs is megfigyelhető 1633 cm^{-1} -nél. A két csúcs együttes jelenléte egyazon mintában az atomerő-mikroszkópos felvételeken megfigyelt amiloid fibrillumok polimorfizmusához kapcsolható (**22. a. ábra**). Mindkét abszorpciós csúcs beta-redős szerkezetre utal, de a rövidebb hullámszámhoz kompaktabb szerkezet társul.

Csillámfelületen epitaxiálisan növesztett amiloid fibrillumok másodlagos szerkezetét is megvizsgáltuk FTIR spektroszkópiával. Az epitaxiálisan növesztett és az oldatban összeállt érett (14 napos) amiloid fibrillumok IR spektrumának összehasonlítása során kiderült, hogy mindkét típusú fibrillum IR spektrumát egy nagy

intenzitású, β -szerkezetre utaló csúcs dominálta, a csúcsok maximuma 1630 cm^{-1} illetve 1621 cm^{-1} volt epitaxiálisan növesztett illetve oldatban összeállt fibrillumok esetében (**29. ábra**). Egy gyengébb intenzitású 1675 cm^{-1} körüli sáv is jelen volt mindkét fibrillumtípus spektrumában, irodalmi adatok szerint ennek a csúcsnak a jelenléte anti-parallel β -szerkezetre utal. (Moore és Krimm 1975).

Bár mindkét típusú fibrillum β -lemezes másodlagos szerkezettel rendelkezik, mégis különböznek egymástól. A spektrális csúcsok eltolódása fontos információt közvetíthet arról a molekuláris szerkezetről, amelyhez a spektrumvonal rendelhető. Az amid I sávban 1630 cm^{-1} felől 1621 cm^{-1} felé történő eltolódás arra utal, hogy az oldatban összeálló amiloid sokkal kompaktabb szerkezettel rendelkezik.



29 Ábra. Epitaxiálisan növesztett (---) illetve oldatban összeállt (—) A β 25-35 fibrillumok FTIR spektruma. A spektrális maximumok (1630 cm^{-1} illetve 1621 cm^{-1}) béta-lemezes szerkezetre jellemzőek. A spektrumok dekonvolváltak.

Ahhoz, hogy ezt az eltolódást meg tudjuk érteni, bepillantást kell nyernünk a kétfajta fibrillum képződését befolyásoló különböző körülményekbe. A csillám hasítását

követően, hexagonális felszíni elrendeződést mutató K^+ kötő helyek jelennek meg. Az A β 25-35 peptidek hexagonális orientációt vesznek fel a csillámfelszínen, mintegy felismerve a K^+ kation kötőhely-mintázatot a felszínen (Akutagawa és mtsai 2002, Brigatti és mtsai 2003). A csillámfelszín „kétarcúsága” abban mutatkozik meg, hogy nemcsak katalizálja, felgyorsítja a fibrillum képződés kinetikáját, hanem egyszersmind sztérikus gátként viselkedik a fibrillum összeállása során: mihelyt kikötődnek a felszínhez, a fibrillumot alkotó peptidek már nem tudnak szabadon mozogni. Az eredmények teljesebb magyarázata érdekében fontosnak tartom újra megemlíteni a következőket: a peptidek a 28-as lizin aminosav pozitívan töltött oldalláncának köszönhetően a negatív töltésű csillám felszínére lehorgonyozódnak, és a peptidek közötti távolságot a K^+ kötő helyek közötti távolság fogja meghatározni. Két szomszédos K^+ kötőhely távolsága egy jól meghatározott, állandó érték (0,52 nm) (Brigatti és mtsai 2003). Tehát a szomszédos peptidek ezen sztérikus megszorítás miatt nem tudnak egymáshoz tetszőlegesen közel kerülni. Az oldatban összeálló fibrillumok építőelemei azonban jóval nagyobb mozgástérnek örvendenek, és képesek megtalálni azt a távolságot, amely a fibrillumok számára optimális. Minél közelebb kerülnek az amiloid peptidek egymáshoz, annál erősebb hidrogénhid kötések fogják összetartani a fibrillumot; az erősebb hidrogénhid kötések eredményeképpen az infravörös spektrum csúcsa a rövidebb hullámszámok irányába tolódik el. Az oldatban összeálló amiloid fibrillumok időfüggő FTIR mérései is hasonló jellegű változást mutatnak: az inkubációs idő előrehaladtával a kisebb hullámszámhoz tartozó csúcs növekszik, a peptidek egyre kompaktabb, szorosabb szerkezetbe rendeződnek.

Az infravörös spektrumokból tehát arra következtettünk, hogy az epitaxiálisan növesztett és oldatban összeállt fibrillumok szerkezete alapvetően béta-lemezes, azonban az oldatban összeállt fibrillumok belső szerkezete kompaktabb, mint a csillámfelszínen kialakult fibrillumoké.

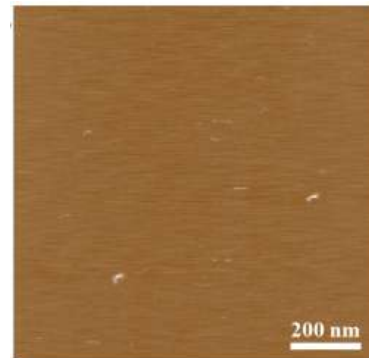
V. 3. AZ LPFFD BÉTA-LEMEZ ROMBOLÓ PEPTID HATÁSA ORIENTÁLT A β 25-35 HÁLÓZATRA

Korábban már kimutatták, hogy az úgynevezett béta-lemez romboló (BSB) peptidek gátolják az amiloid képződést. Bár a BSB peptideknek a jövőben ígéretes terápiás szerepük lehet, hatásmechanizmusuk nem egészen tisztázott.

A BSB peptidek közül az LPFFD peptidet választottuk, kísérleteinkben a peptidnek az A β 25-35 hálózat képződésére, morfológiájára és nanomechanikai tulajdonságaira kifejtett hatását vizsgáltuk atomerő-mikroszkóppal. A fibrillumok mechanikai stabilitását erőspektroszkópiával határoztuk meg. Feltételezhető, hogy az LPFFD peptid fellazítja az amiloid protofilamentumok közötti kölcsönhatásokat, amit az alább ismertetett eredmények támasztanak alá.

Az V. 1. fejezetben bemutatott, csillámfelzínén létrejött A β 25-35 orientált hálózatot használtuk kísérleti modell-rendszerként (**15. a. ábra**). Az LPFFD peptid jelenlétében növesztett hálózat paramétereit információkat szolgáltatnak a BSB peptid asszociáció-gátló hatásáról, a peptid utólagos hozzáadása már létrejött hálózathoz az LPFFD fibrillum-disszociációt kiváltó képességét hivatott vizsgálni. Kontroll kísérletekben a csillámon orientált A β 25-35 hálózathoz nem adtunk LPFFD-t.

Ahhoz, hogy a kísérletekben vizsgált hatásokat egyértelműen a BSB peptidnek tulajdoníthassuk, ki kellett zárni azt a lehetőséget, hogy az LPFFD peptid önmagában is képez fibrillumokat a csillámfelzínén. Ennek ellenőrzésére 1 mM LPDDF oldatot inkubáltunk 45 percig frissen hasított csillámfelzínén, szobahőmérsékleten. Ezt követően a felzínét pufferrel lemostuk, hogy eltávolítsuk a nem kötődött peptideket. A minta atomerő-mikroszkópos felvételén (**30. ábra**) aggregátumoktól és fibrillumoktól mentes, üres csillámfelzínét láttunk, tehát igazoltuk, hogy az LPFFD önmagában nem alkot aggregátumokat vagy fibrillumokat a csillám felzínén.

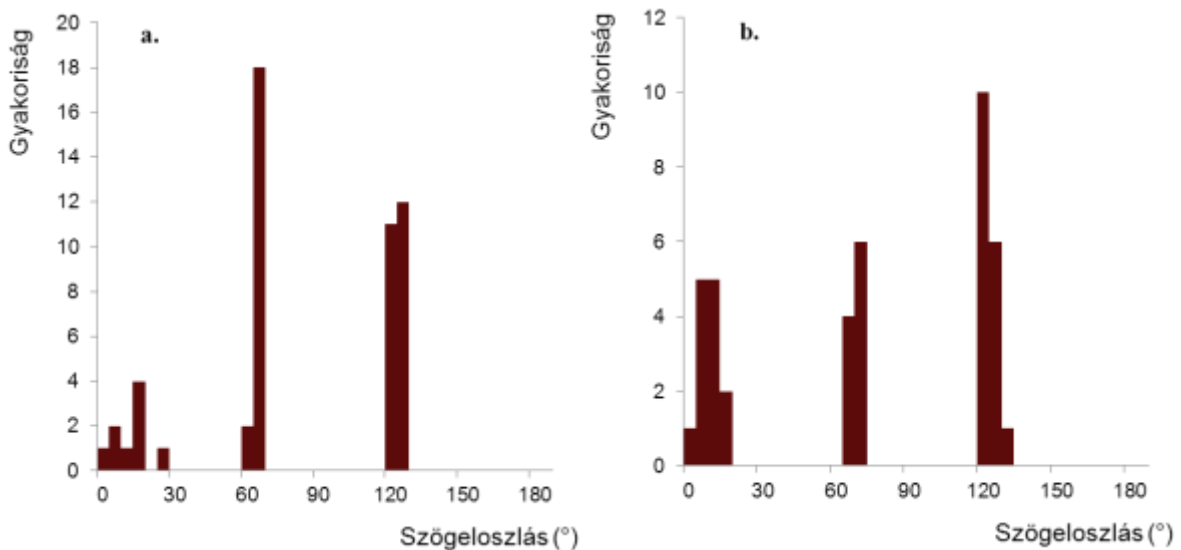


30. Ábra. Kontroll kísérlet (1 mM-os LPFFD) oldat atomerő-mikroszkópos képe.

V. 3. 1. AZ LPFFD PEPTIDEK HATÁSA A FIBRILLUMOK ORIENTÁCIÓJÁRA, SZERKEZETÉRE, A FIBRILLUMKÉPZŐDÉS DINAMIKÁJÁRA

V. 3. 1. 1. FELÜLETI ORIENTÁCIÓ

Az LPFFD peptiddel kezelt minták esetében is orientált hálózatot kaptunk (**33. c és d. ábrák**). Megmértük az orientált fibrillumok szögeloszlását és összehasonlítottuk a kontroll hálózat szögeloszlásával. A **31. ábra** mutatja az eredményeket. A kontroll minta orientációs szögei keskeny eloszlást mutatnak 0, 60 és 120° környékén (**31. a. ábra**), tehát diszkrét 60°-nyi különbség van az egyedi fibrillumok között. A 600 μM LPFFD jelenlétében képződött hálózat orientációs szögeinek eloszlása a kontrolléhoz hasonló (**31. b. ábra**). Az LPFFD tehát nem változtatta meg a fibrillumok orientációját csillámfelszínen.

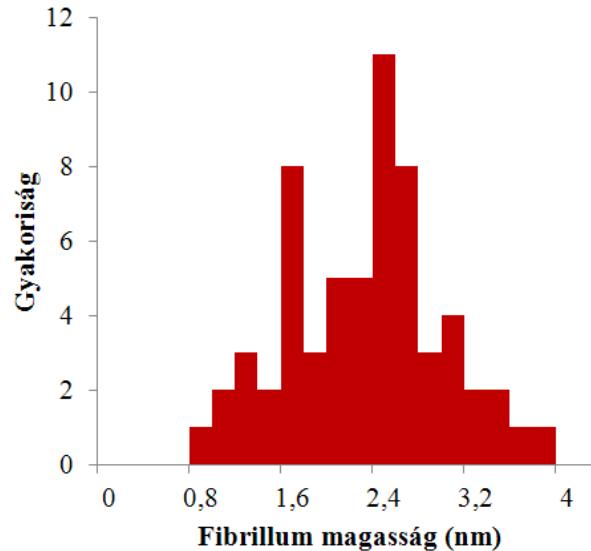


31. Ábra. A fibrillumok irányának szögeloszlása egy referencia vonalhoz képest
a. Kontroll **b.** LPFFD jelenlétében.

V. 3. 1. 2. A FIBRILLUMOK MAGASSÁGA:

Megmértük az LPFFD peptid jelenlétében illetve hiányában képződött fibrillumok magasságát, a **32. ábra** mutatják az LPFFD-kezelt minták magasság-eloszlását. Az

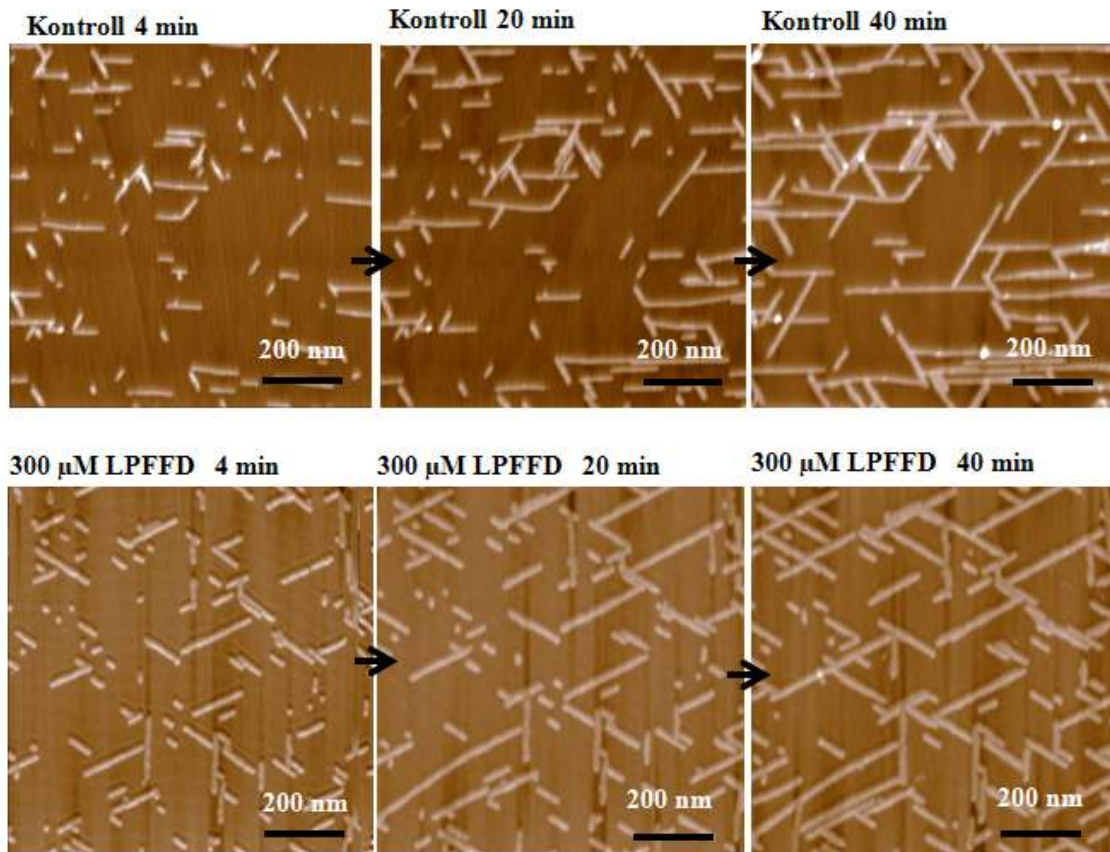
átlagos fibrillum magasság 2,41 nm ($\pm 0,09$ nm SEM, $n=513$) volt a kontroll esetében (16. ábra alapján) és 2,64 nm ($\pm 0,14$ nm SEM, $n = 60$) az LPFFD-kezelt hálózatnál. A fibrillumok átlagos magasságában tehát nem volt jelentős különbség.



32. Ábra. Az A β 25-35 fibrillumok magasságeloszlása. LPFFD jelenlétében. ($n = 60$)

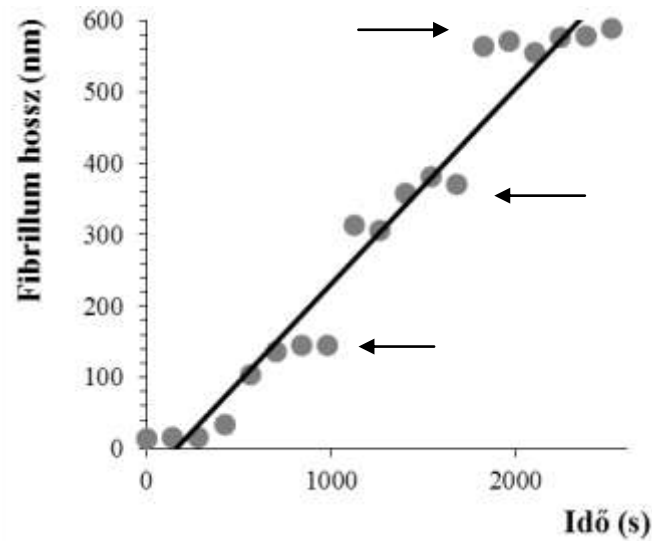
V. 3. 1. 3. A FIBRILLUMOK NÖVEKEDÉSI KINETIKÁJA

Az LPFFD peptidnek A β 25-35 fibrillumok növekedési kinetikájára kifejtett hatását időfüggő (*time lapse in situ AFM*) kísérletek segítségével vizsgáltuk. Egyedi fibrillumok hossznövekedését követtük az idő függvényében. 300 μ M LPFFD-t és 8 μ M A β 25-35 peptidet tartalmazó oldatból 100 μ l mintát vittünk fel frissen hasított csillám felszínére, majd folyamatosan rögzítettük ugyanannak a területnek az atomerő-mikroszkópos képét. Egy kép felvétele 100 másodpercig tartott. Állandó pásztázási sebességgel egymás után 10-15 képet vettünk fel, majd lemértük a fibrillum hosszát az adott időpontokban (33. ábra). A hosszakat idő függvényében ábrázolva, a kapott görbékre illesztett egyenesekből megkaptuk a fibrillumok átlagos növekedési sebességét. A fibrilláris hálózat kialakulása hasonló volt a kontroll és LPFFD-kezelt minták esetében.



33. Ábra. Az *in situ* atomerő-mikroszkópos kísérlet időfüggő felvételei a kontroll minta (a., b. és c.) illetve az LPFFD-vel kezelt minta (d., e. és f.) esetében. ($8 \mu\text{M}$ $A\beta_{25-35}$ és $300 \mu\text{M}$ LPFFD). Az összes kép pufferben felvett magasságkontraszt felvétel.

Mindkét esetben sikerült végigkövetni egyedi fibrillumok növekedését. A fibrillumok hossza mindaddig nőtt, míg el nem érték egy másik, útjukban fekvő fibrillumot. A sebességet az egyedi fibrillumoknál egyenként mértük. A **34. ábra** egyetlen fibrillum pillanatnyi hosszát ábrázolja az idő függvényében. Habár növekedési lépcsők és szünetek különböztethetők meg a növekedési útvonal során (nyilak), az átlagos növekedési sebesség az adatokra illesztett lineáris függvény segítségével meghatározható. Az átlagos fibrillum növekedési sebesség $0,1 \text{ nm/s}$ illetve $0,08 \text{ nm/s}$ volt a kontroll illetve LPFFD-kezelt minták esetében. A BSB peptid tehát a fibrillumok növekedésére nem volt szignifikáns hatással.



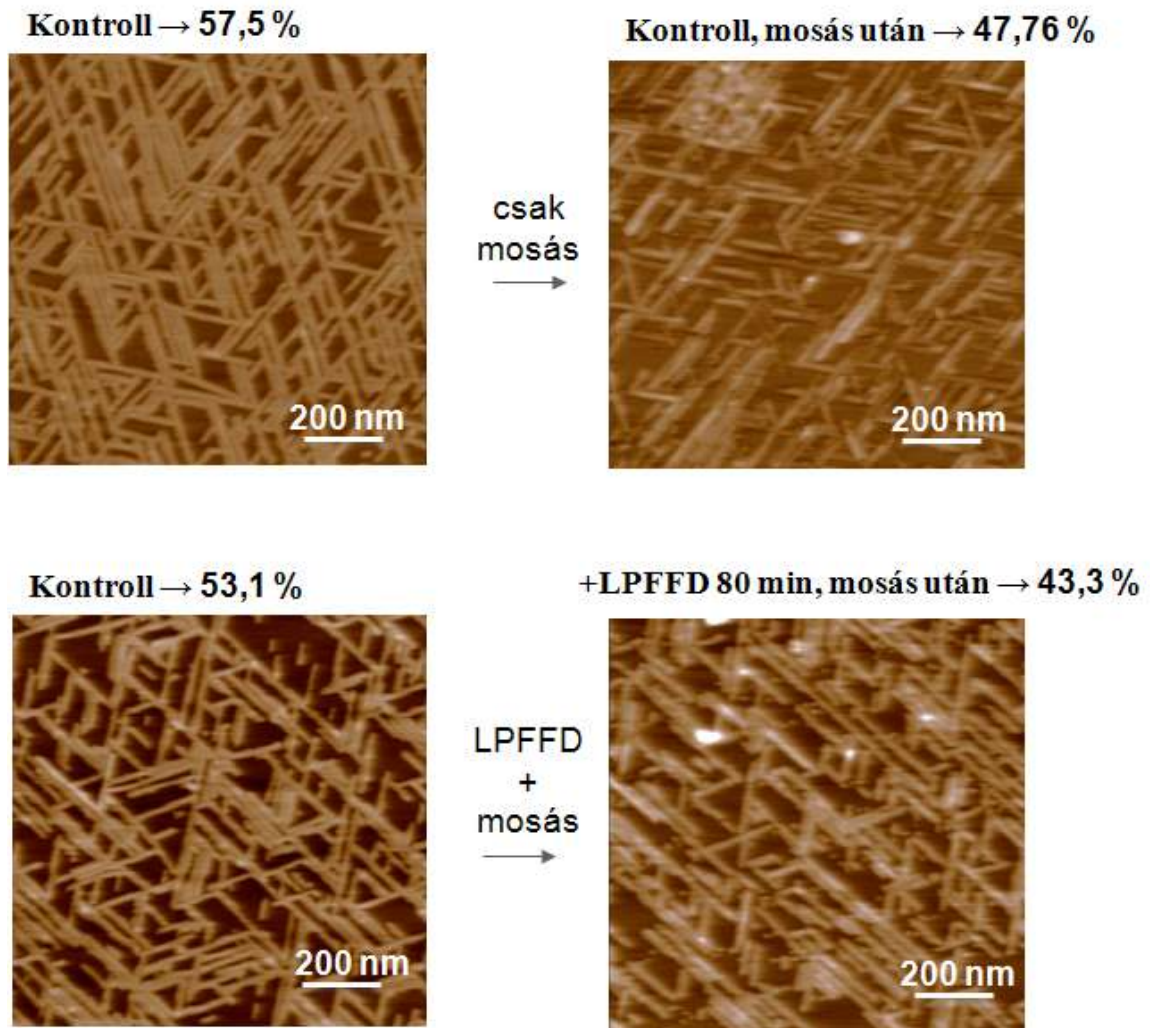
34. ábra. Egyetlen A β 25-35 fibrillum hossznövekedése az időfüggvényében, ugrásokat mutat. A nyilak a növekedési lépcsőket jelölik.

V.3. 2. AZ LPFFD HATÁSA A β 25-35 FIBRILLUMOK SZÉTESÉSÉRE

Az LPFFD peptid fibrillum-szétszedő hatását (Sigurdsson és mtsai 2000) egy előzőleg létrehozott, „érett” A β 25-35 hálózaton vizsgáltuk.

Először egy sűrű, orientált fibrillumokból felépülő amiloid hálózatot hoztunk létre (**35. c. ábra**), majd a felszín óvatosan lemostuk PBS pufferrel, hogy a ki nem kötődött peptideket, fibrillumokat eltávolítsuk. Végül a hálózatot 1.58 mM LPFFD oldattal inkubáltuk szobahőmérsékleten 80 percig (**35. d. ábra**). A kontroll kísérlet esetében is létrehoztunk egy orientált amiloid hálózatot (**35. a. ábra**), majd LPFFD hozzáadása nélkül óvatosan lemostuk a felszín PBS pufferrel, és elkészítettük a lemosott felszín atomerő-mikroszkópos felvételét (**35. b. ábra**).

Az atomerő-mikroszkópos felvételek alapján kiszámoltuk a relatív felszíni befedettséget. Igaz ugyan, hogy az LPFFD hozzáadásával 10 %-os csökkenést tapasztaltunk a felszíni befedettségben, de ugyanekkora csökkenést idézett elő a szimpla felszínlemosás is PBS pufferrel. A felszíni befedettség változása tehát nem az LPFFD fellazító hatásának tulajdonítható, hanem a mosás okozta mechanikai hatásnak.

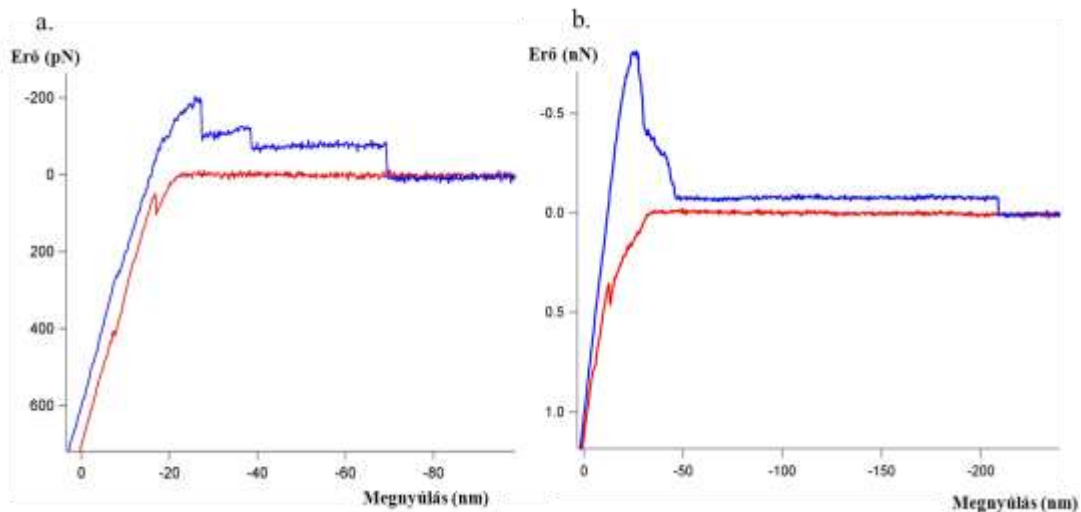


35. Ábra. LPFFD hatása egy előre létrehozott orientált Aβ₂₅₋₃₅ hálózat stabilitására. Mosás hatása: csillámfelületen orientált Aβ₂₅₋₃₅ hálózat atomerő-mikroszkópos felvétele mosás előtt (**a**) illetve mosás után (**b**).

1.58 mM LPFFD oldattal kezelt kontroll Aβ₂₅₋₃₅ hálózat (**c**) atomerő-mikroszkópos felvétele 80 perc inkubáció után (**d**). K = kontroll minta. A képeken százalékban feltüntetett számok a minták felületi befedettségének értékei.

V.3. 3. AZ LPFFD HATÁSA A β 25-35 FIBRILLUMOK NANOMECHANIKAI TULAJDONSÁGÁRA

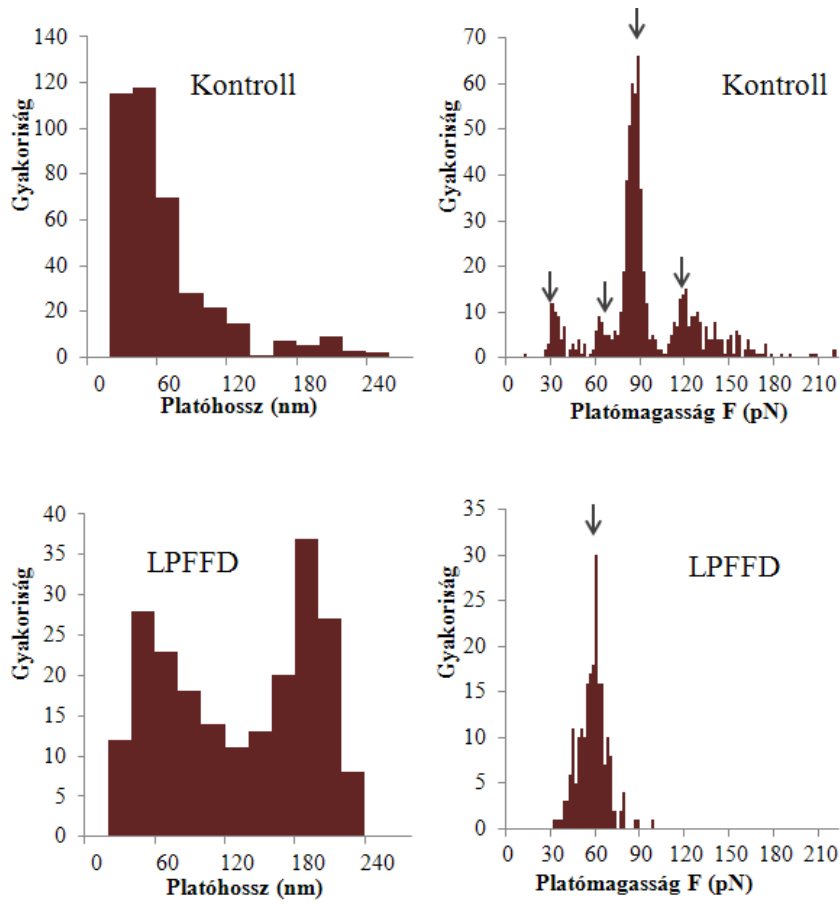
Az LPFFD peptid A β 25-35 fibrillumok mechanikai stabilitására gyakorolt hatását a fibrillumok ezen peptid jelenlétében történő mechanikai manipulációja során vizsgáltuk. Az A β 25-35 fibrillumok nanomechanikai viselkedésére az erőplatók megjelenése jellemző (**36. ábra**). 196 μ M LPFFD jelenlétében felvett erőgörbék globális megjelenése (alakja) hasonló volt a kontroll minta erőgörbéihez, de csökkent az erő-lépcsők száma és megnőtt a platóhossz.



36. Ábra. Epitaxiálisan nőtt A β 2535-fibrillumok molekuláris erőspektroszkópiája, jellegzetes erőplatók. **a.** a kontroll minta tipikus erőválasza. **b.** 196 μ M LPFFD jelenlétében felvett erőgörbe.

A **37. ábra** bal oldali oszlopa a platóhosszak eloszlását mutatja. LPFFD jelenlétében a platóhossz-eloszlás kiszélesedett, a hisztogrammban két csúcs jelent meg (bimodalitás).

A **37. ábra** jobb oldali oszlopán a platómagasság eloszlása látható. A kontroll esetében egyértelműen multimodális az eloszlás, de az LPFFD jelenlétében felvett erőgörbénél a platóerő eloszlása viszonylag keskeny; egyetlen, \sim 60 pN-nál található maximummal.



37. Ábra. A platóhosszak illetve platómagasság eloszlása a kontroll mintánál illetve LPFFD jelenlétében.

A nanomechanikai mérések eredményei alapján tehát feltételezhető, hogy az LPFFD peptid moduláló hatással van az A β 25-35 fibrillumok tulajdonságaira nézve. Az erőplatók protofilamentumok lefejtése, „szétcipzározása” során jelennek meg. A platók magassága megadja a szétcipzározáshoz szükséges erőt, így a platóerő szoros kapcsolatban áll a fibrillumok mechanikai stabilitásával. Minél kisebb erőnél következik be a protofilamentumok lefejtése, annál kisebb a fibrillum mechanikai stabilitása. A kontroll mintában az erőplatók eloszlása ~ 30 - 60 - 90 - 120 pN-os multimodális eloszlást mutatott, az értékek ~ 70%-a ~ 90 pN köré esik. A BSB peptiddel kezelt mintában egy markáns csúcs van ~ 60 pN környékén, ez az érték jelentősen alacsonyabb, mint a kontroll minta 90 pN körüli maximuma. Az átlagos platóerő lecsökkent az LPFFD jelenlétében, ez feltehetően arra utal, hogy a béta-lemez-romboló peptid a protofilamentumok közötti kölcsönhatásokat gyengíti.

V. 4. N27C MUTÁNS A β 25-35 PEPTID EPITAXIÁLISAN ORIENTÁLT HÁLÓZATÁNAK JELLEMZÉSE

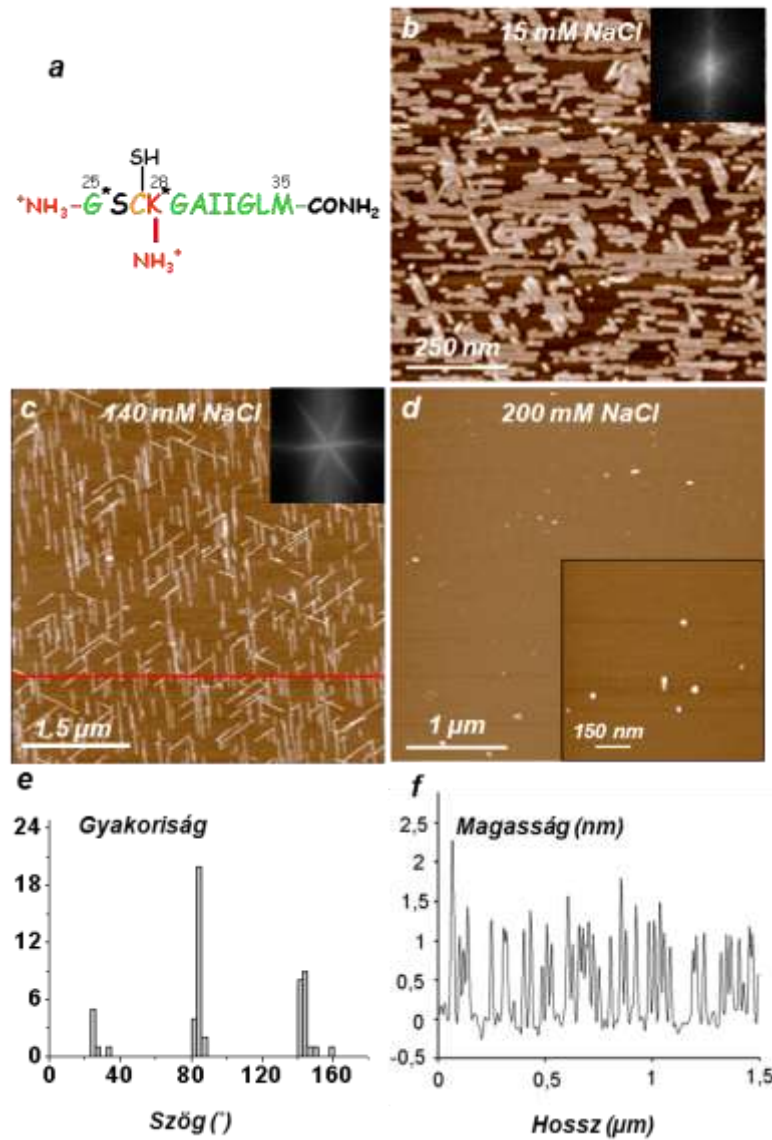
A csillámfelületen létrejövő orientált A β 25-35 amiloid hálózat már önmagában felveti a gyakorlati, nanobiotechnológiai alkalmazhatóság lehetőségét. De annak érdekében, hogy a hálózatot - a rendezett és szabályozható szerveződésen túl -, specifikusan, a felhasználás igényeinek megfelelően ruházzuk fel tulajdonságokkal, létrehoztuk az A β 25-35 egy módosított változatát oly módon, hogy a 27. pozícióban elhelyezkedő aszparagin aminosavat egy ciszteinre cseréltük. Az így létrehozott A β 25-35_N27C peptidek szabad SH csoportja reakcióképessége révén a peptidekből képződő fibrillumokat kémiai jelölhetővé teszi. A megfelelő keresztkötők alkalmazásával ugyanis elvileg bármilyen fehérje hozzákapcsolható a hálózat szabad -SH csoportjaihoz, melyek a csillámfelületen nanométeres sűrűség mellett alakíthatók ki. Az így létrehozott nano-skálájú módszer lehetőségeinek tesztelése intenzív kutatás tárgyát képezi jelenleg is munkacsoportunkban.

A csillámfelületen epitaxiális növesztéssel létrejött A β 25-35_N27C fibrillumok a vad típusú A β 25-35 fibrillumokhoz nagyon hasonlóan viselkedtek, ezt az alábbi kísérletek bizonyítják.

V. 4. 1. A FIBRILLUMOK ORIENTÁCIÓJA CSILLÁMFELFELÜLETEN

Az A β 25-35_N27C peptid várható szerkezetét szemlélteti az **38. a. ábra**: a Lys28 aminosav pozitívan töltött oldallánca a csillámfelület K⁺-kötő helye felé mutat, ezáltal rögzítve a peptidet a felülethez. Ennek megfelelően a Cys27 aminosav oldallánca feltehetően a felületől elfele irányul.

A vad típusú peptidből képződő fibrillumokhoz hasonlóan, az A β 25-35_N27C peptidből létrejött fibrillumok is magas fokú orientációt mutattak csillámfelületen. (**38. e. ábra**), a referenciavonalhoz képest a fibrillumok közötti szög egyenként 60° volt. Ez az eloszlás a fibrillumok három fő orientációs iránya közötti szögnek, 120°-nak felelt meg. A fibrillumok szabályos elrendeződését az atomerő-mikroszkópos felvételek 2D Fourier Transzformációja is visszatükrözte. (**38. b. és c., betétábrák**).



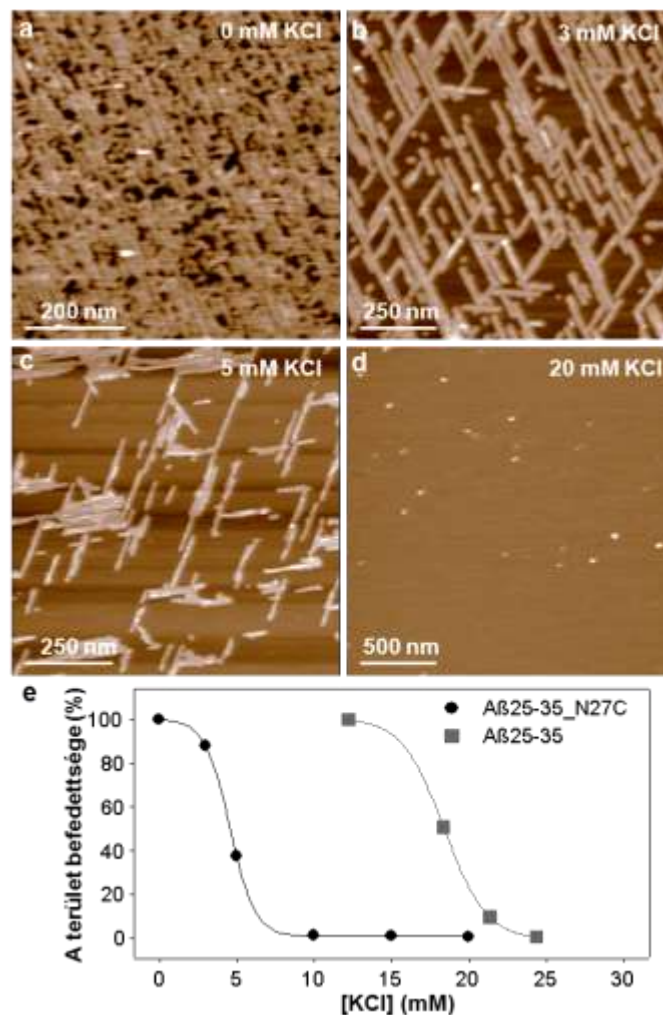
38. Ábra. *a.* Az A β 25-35_N27C peptid feltételezett szerkezete. *b., c., d.*: A β 25-35_N26C fibrillumok Na⁺ függő trigonális orientációja csillámfelületen különböző NaCl koncentráció jelenlétben. (Pufferben, oszcillációs üzemmódban készült magasságkontraszt felvételek.) Betétábrák: atomerő-mikroszkópos kép 2D Fourier Transzformációja. *e.* 140 mM Na⁺ jelenlétében megfigyelt hálózat szögeloszlása. *f.* a fibrillumok magasságeloszlása a *c. ábrán* látható piros egyenes mentén

Tehát a 27-es pozícióban levő arginin ciszteinre cserélése nem okozott zavart a fibrillumok szabályos elrendeződésében. Ha az orientáció jelentősen megváltozna, a mutáns fibrillumok nem lennének többé alkalmasak nanotechnológiai felhasználásra. A **38. f. ábra** atomerő-mikroszkópos felvétele a fibrillumok magasságeloszlását mutatja be a *c. ábrán* látható piros egyenes mentén. A fibrillumok átlagos magassága 0,8 – 1 nm

volt, ez az érték nagy valószínűséggel egyetlen, A β 25-35_N27C peptidekből létrejött β -lemez vastagságának felel meg (Bond és mtsai 2003, Karsai és mtsai 2007).

V. 4. 2. KATIONOK HATÁSA A MUTÁNS FIBRILLUMOK EPITAXIÁLIS NÖVEKEDÉSÉRE

Az A β 25-35_N27C peptidek csillámhoz kötődése kation-koncentráció függőnek bizonyult. Kísérleteinkben kétféle ionnak: a NaCl illetve a KCl jelenlétének hatását vizsgáltuk. Állandó peptid-koncentráció mellett változtattuk az oldat kation-koncentrációját, majd az így nyert elegyet csillámfelszínen inkubáltuk 15 percig.



39. *Ábra.* A β 25-35_N26C fibrillumok K^+ -függő kötődése, AFM-felvételek (a-d.) illetve a felszín relatív befedettsége a K^+ -koncentráció függvényében (e.)

NaCl hatásának vizsgálata során kiderült, hogy 140 mM feletti NaCl koncentráció csökkentette a kötődést (**38. c. ábra**), 200 mM NaCl jelenlétében pedig csak néhány rövid fibrillumot és oligomereket figyeltünk meg a csillámfelületen (**38. d. ábra**). A KCl jelenléte már alacsonyabb koncentrációnál is képes volt befolyásolni a fibrillumképződést: 3 mM KCl bizonyos fokú gátló hatást fejtett ki, és 20 mM KCl jelenléte teljesen meggátolta a peptidok csillámhoz kötődését (**39. ábra**). Ezen eredményekkel ellentétben, a vad típusú peptidból létrejött fibrillumok kevésbé voltak érzékenyek a NaCl-koncentrációra, és akár 640 mM NaCl jelenlétében is képesek voltak hálózatot kialakítani a csillámfelületen (Karsai és mtsai 2007). Az N27C mutáció nem módosította ugyan a fibrillumok orientációját, de a csillámfelülettel való kölcsönhatást gyengítette.

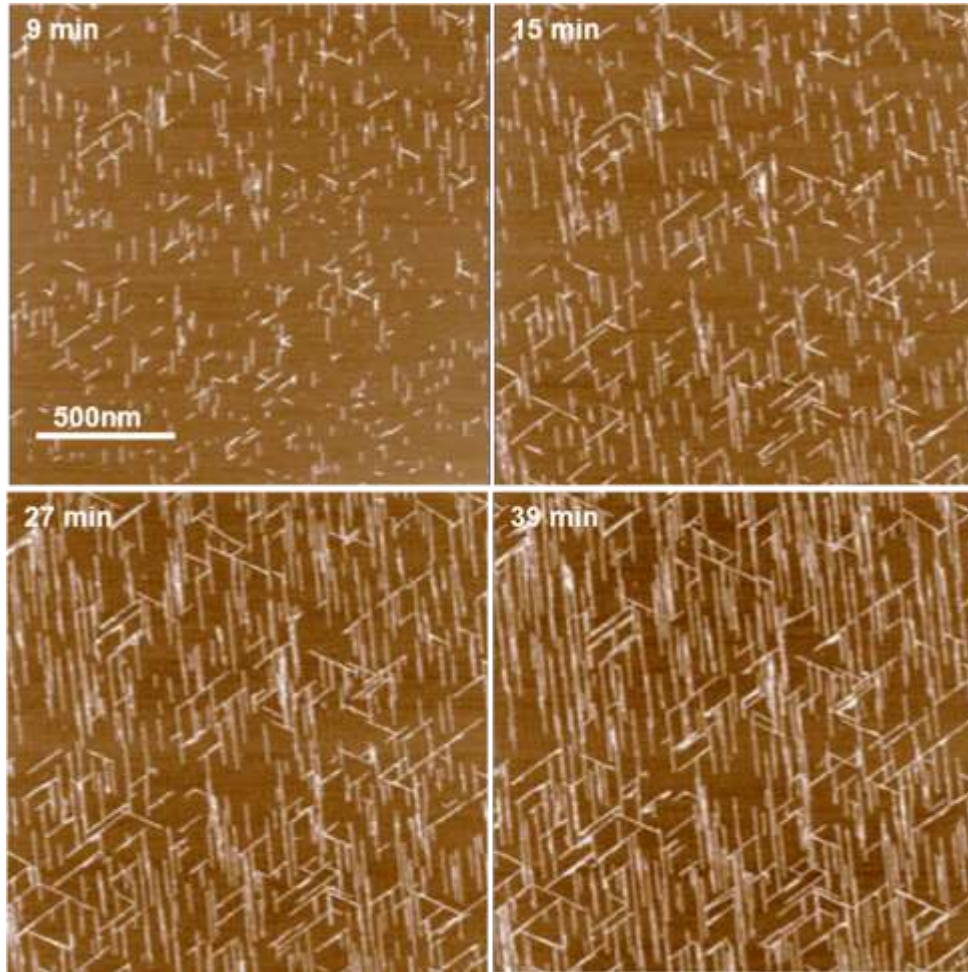
V. 4. 3. A HÁLÓZAT KIALAKULÁSÁNAK IDŐTŐL VALÓ FÜGGÉSE

Időfüggő atomerő-mikroszkópos felvételek segítségével nyomon követhettük a mutáns amiloid peptidból képződő hálózat kialakulását. Ezen felvételek kimutatták, hogy előbb magok jelennek meg a csillámfelületen, majd ezekből a magokból indul meg a fibrillumok növekedése a három fő orientációs irányba (**40. ábra**).

Amint egy növekedésben levő fibrillum nekiütközik egy már kialakult fibrillum oldalába, növekedése leáll. A növekvő fibrillumok útjába kerülő szomszédos fibrillumok útelzáró akadályként viselkednek.

Nem figyeltünk meg egymáson keresztül növekedő fibrillumokat és az akadályokat kikerülő, eltérülő fibrillumokat sem. Ez utóbbi valószínűsége nagyon alacsony, mert az epitaxiális növekedés a csillám hexagonális mintázatának következménye.

Az Aβ25-35_N27C peptidokból felépülő hálózat gyakran előnyben részesíti az egyik orientációs irányt. Amint a **40. ábrán** megfigyelhető, a fibrillumok zöme az atomerő-mikroszkópos felvétel függőleges tengelyéhez közeli irányába mutat. A jelenség okára még nem született kielégítő magyarázat, a kedvezőbb orientációs irány kiválasztásának oka molekuláris szinten keresendő.



40. Ábra. *Aβ25-35_N27C orientált fibrillumok növekedéséről készült időfüggő atomerő-mikroszkópos felvételek 140 mM NaCl jelenlétében.*

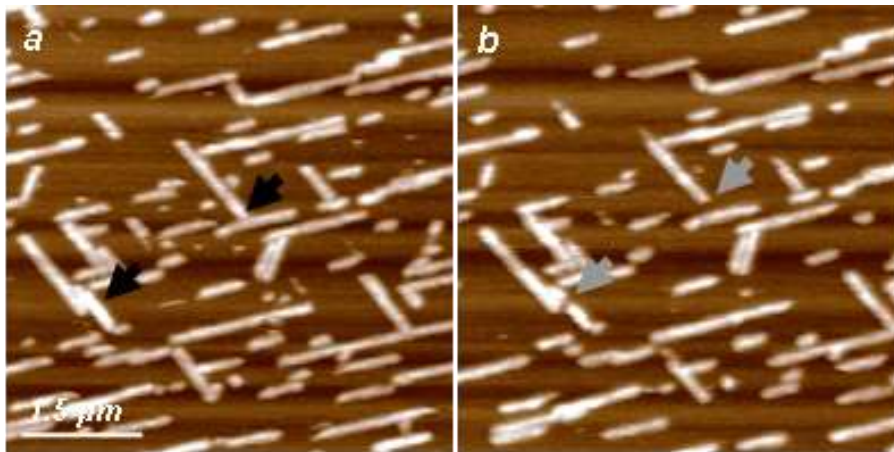
V. 4. 4. A FIBRILLUMOK NANOMECHANIKAI VIZSGÁLATA

Az Aβ25-35_N27C peptid feltételezett szerkezete (**38. ábra**), a fibrillumok kiterjedése (**38. f. ábra**) valamint a csillámhoz való kötődésért felelős kölcsönhatások természete miatt azt feltételezzük, hogy a Cys27 aminosav szulfhidril csoportja a puffer oldat irányába mutat. Hogy a feltevés helyességét bebizonyítsuk, a fibrillumok felszínét egy arannyal bevont rugólapkával vizsgáltuk oxidáló körülmények között. A szulfhidril csoport kovalens kötést képez a tú arany bevonatával (Crumbly és mtsai 1992; Parker és mtsai 1996).

A pásztázás során nyert atomerő-mikroszkópos felvétel alapján, előre meghatározott helyeken, a rugólapka tűjének hegyét a fibrillumokhoz nyomtuk, majd

500 nm/s sebességgel visszahúztuk. Ezután a felszínét újból végigpásztáztuk, hogy a mechanikai manipuláció hatását megvizsgálhassuk.

A fent leírt módszert „*in situ*” nanomechanikai manipulációnak is nevezik. Az eredmények a **41. ábrán** láthatók. Az A β 25-35_N27C fibrillumok lokális nanomechanikai manipulációja során rövid fibrillum-részeket távolítottunk el azokon a pontokon, ahol a tűt a fibrillumhoz nyomtuk.



41. Ábra. Csillámhoz kötött A β 25-35_N27C fibrillumok „*in situ*” nanomechanikai manipulálása. Atomerő-mikroszkópos felvétel a nanomechanikai manipuláció előtt (a.) illetve után (b.). A fekete nyílhegyek a manipuláció célpontjait mutatják, a szürke nyílhegyek a nanomechanikai manipuláció helyén keletkező hézagokat jelölik, itt a fibrillumok már nem folytonosak.

Ez a felfedezés az A β 1-40, A β 1-42 illetve A β 25-35 fibrillumok nanomechanikai manipulációjával szöges ellentétben áll, ugyanis ezen fibrillumoknál a nanomechanikai manipuláció után a fibrillumok épek maradtak (Kellermayer és mtsai 2005, Karsai és mtsai 2006, Karsai és mtsai 2007). Az A β 25-35_N27C fibrillumok esetében a fibrillumot összetartó erők energiája feltehetően kisebb volt a peptid-tű közötti kötés energiájánál. A leghíhettebb magyarázat a tű Au atomjai és a Cys27 aminosav S atomja közti kovalens kötés kialakulása.

Korábban bizonyítást nyert, hogy mind a cisztein, mind a methionin aminosavak kén atomjai képesek kolloidális arannyal kölcsönhatásba lépni (Podstawka és mtsai

2005). Így a peptid 35-ös pozíciójában lévő methionin aminosava is hozzájárulhatna a megfigyelt jelenség létrejöttéhez. A Cys27 tiol csoportja viszont sokkal erősebb kötést tud létesíteni az Au atomokkal, mint a methionin $-S-CH_3$ csoportja (Podstawka és mtsai 2005). Továbbá, a Met35 a vad típusú peptidben is jelen van, viszont ezen fibrillum esetében nem figyeltünk meg fibrillum-deszorpciót a nanomechanikai manipuláció következtében. Tehát sokkal valószínűbbnek tűnik, hogy a fibrillum-részek eltávolításáért az Au-Cys27 kölcsönhatás a felelős. Az megfigyeléseink alapján a Cys27 csoport valóban felszíntől az oldat irányába mutat, így hozzáférhetővé válik nemcsak a rugólapka tűje számára, hanem bármilyen olyan kémiai csoport számára, amellyel a fibrillumot jelölni szeretnénk. Amint azt a **41. ábra** bemutatja, a fibrillum végei illetve a fibrillum középső része hasonló affinitással lép kölcsönhatásba a rugólapka arannyal bevont tűjével.

VI. KÖVETKEZTETÉSEK

I. Az A β 25-35 peptid a teljes hosszúságú A β peptid biológiailag aktív, toxikus fragmentuma. Kimutattuk, hogy az A β 25-35 peptidek **csillámfelszínen szabályosan orientált hálózatot** képeznek a csillám geometriai adottságait követve (**15. a. ábra**). A fibrillumok növekedése epitaxiálisan, a csillámfelszín által vezérelt és az orientált hálózat az oldatban összeálló fibrillumokhoz képest jelentősen rövidebb idő alatt alakul ki. Mivel az előállított orientált A β 25-35 hálózat percek alatt létrehozható és morfológiája nanométeres skálán reprodukálható, ez a hálózat magas rendezettségű stabil modell-rendszernek tekinthető és lehetővé teszi különböző mechanikai és kémiai faktorok amiloid fibrillumokra gyakorolt hatásának vizsgálatát.

II. Arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az epitaxiálisan növesztett fibrillumok felfoghatók-e jó amiloid fibrillum modellként? Mivel az A β 25-35 peptid oldatban, közel egyensúlyi körülmények között érett amiloid fibrillumokat hoz létre, elvégeztük a **két különböző fibrillogenetikus úton létrejött amiloid fibrillum szerkezet-összehasonlító vizsgálatát** atomerő-mikroszkópia, erőspektroszkópia és FTIR spektroszkópia segítségével.

II. 1. Az amiloidokra jellemző alapvető fibrilláris morfológia mindkét esetben megfigyelhető volt. A fibrillumokat orientációjuk, vastagságuk, hosszuk, felszíni topográfiájuk, periodicitásuk illetve alaki variabilitásuk alapján lehet jellemezni.

II. 1. 1. Mivel az orientált hálózat kialakulása epitaxiális (felszín-vezérelt) növekedés eredménye, az oldatban nőtt, érett fibrillumok nem orientálódtak csillámfelszínen. A csillámfelszínen létrejött fibrillumok trigonális orientációt mutatnak, a fibrillumok egyenesek, iránytartóak.

II. 1. 2. Az epitaxiálisan növesztett fibrillumok átlagos vastagsága 1-4 nm volt, az oldatban összeállt fibrillumok 3-30 nm vastagok voltak. Röntgendiffrakciós mérések alapján egyetlen β -lemez vastagságának 0,8 - 1 nm felel meg (Bond és mtsai 2003). Tehát, míg egy epitaxiálisan nőtt amiloid fibrillumot maximum öt β -

lemez épít fel, az oldatban összeállt fibrillumok tízszer annyi β -lemezből is állhatnak, szerkezeti hierarchiájuk jóval magasabb fokú.

II. 1. 3. Az oldatban összeállt fibrillumok hossza elérte olykor a több tíz mikrométert is, az epitaxiálisan növesztett fibrillumok hosszát (0,1 - 2 μm) ellenben szterikusan korlátozták a szomszédos fibrillumok.

II. 1. 4. Az epitaxiálisan növesztett fibrillumok morfológiailag homogének voltak, az oldatban összeállt fibrillumok esetében polimorfizmust tapasztaltunk (**22. ábra**). Az epitaxiálisan növekedett fibrillumokkal ellentétben, az oldatban összeállt fibrillumok szerkezete gyakran 30-200 nm-es tengelymenti periodicitást mutatott (**21. ábra**).

II. 2. A fibrillum-képződés szempontjából a növekedési kinetikában jelentős különbséget mutat a két különböző úton kialakuló fibrillum. Oldatban órák, napok alatt állnak össze a fibrillumok, de a csillám felszínén a folyamat másodpercek-percek alatt lezajlik. A fibrillum-képződés ilyen mértékű felgyorsulásáért a csillámfelszín katalizáló szerepe felelős. Az amiloidok epitaxiális növekedése valamint az extracelluláris mátrix, mint templát által vezérelt, asszisztált fibrillum növekedés közötti hasonlóság szembetűnő.

II. 3. Az amiloid fibrillumok nanomechanikájára jellemző az erőplatók megjelenése, melyek a protofilamentumok erő hatására történő disszociációjának felelnek meg. Az erőválaszok alakja (erőplatók) hasonló volt az epitaxiálisan növesztett és az oldatban összeállt A β 25-35 fibrillumok esetében. A platóerő-eloszlásban diszkrét maximumok figyelhetők meg: a csúcsok egész számú többszörösei jelzik, hogy adott erőnél hány darab protofilamentum tapadt a tühöz. A (két protofilamentum szétcipzározásához szükséges) elemi plató erő mindkét esetben ~ 30 pN volt (**26. ábra**).

II. 4. A fehérje másodlagos szerkezetének jellemzésére a Fourier transzformációs infravörös spektroszkópiát választottunk. Az 1600 cm^{-1} és 1700 cm^{-1} közötti hullámszám-tartomány (amid I sáv) a legérzékenyebb a fehérjék másodlagos szerkezetére. A fibrillumok IR spektrumának összehasonlítása során kiderült, hogy mindkét fibrillum-típus spektrumát egy nagy intenzitású, béta-lemezre utaló csúcs

dominálta (29. ábra). A csúcsok maximuma 1630 cm^{-1} illetve 1621cm^{-1} volt epitaxiálisan növesztett illetve oldatban összeállt fibrillumok esetében. A spektrális csúcsoknak az amid I sávban 1630 cm^{-1} felől 1621 cm^{-1} felé történő eltolódása egy sokkal kompaktabb szerkezet kialakulására utal az oldatban összeállt fibrillumok esetében. Az eltolódás a fibrillumok képződését befolyásoló csillámfelszín jelenlétével magyarázható. A csillámfelszín nemcsak katalizálja, felgyorsítja a fibrillum képződés kinetikáját, hanem egyszer s mind sztérikus gátként viselkedik: meggátolja a fibrillumot alkotó kikötődött peptideket a szabad mozgásban. A 28-as lizin aminosav pozitívan töltött oldalláncával lehorgonyozódott peptidek közötti távolságot a K^+ kötő helyek közötti állandó távolság (0,52 nm) szabályozza. Tehát a szomszédos peptidek ezen térbeli megszorítás miatt nem tudnak egymáshoz tetszőlegesen közel kerülni. Az oldatban összeálló fibrillumok építőelemei azonban jóval szabadabban mozoghatnak, és meg tudják találni azt a távolságot, amely a fibrillumok számára optimális. Az oldatban összeállt fibrillumok peptidjeit rövidebb, azaz erősebb hidrogénhid kötések fogják összetartani, és az erősebb hidrogénhid kötések rezgéseikhez rövidebb hullámszámok tartoznak az infravörös spektrumban. Az oldatban összeálló amiloid fibrillumok időfüggő FTIR mérései is rövidebb hullámszámok irányában történő eltolódást mutatnak: az inkubációs idő előrehaladtával a peptidek egyre kompaktabb, szorosabb szerkezetbe rendeződnek.

II. 5. Eredményeink alapján elmondható, hogy a csillámfelszínen kialakuló, orientált hálózat jó amiloid fibrillum modellnek bizonyult. Az oldatban nőtt fibrillumokkal szemben a hálózat gyorsan, egyszerűen kialakítható, kevésbé időigényes és jól reprodukálható. A fibrillumokra jellemző paraméterek (orientációjuk, vastagságuk, hosszuk, felszíni topográfiájuk, periodicitásuk, alakvariabilitásuk, stabilitásuk) és azok változásai külső faktorok hatására precízen meghatározhatók atomerő-mikroszkóp segítségével.

III. A béta-lemez romboló hatású **LPFFD** peptidnek (Soto és mtsai 1998) az **A β 25-35** modellrendszer növekedési kinetikájára, morfológiai és mechanikai tulajdonságaira kifejtett hatását vizsgáltuk atomerő-mikroszkóppal. Bár ezeket a BSB peptideket az amiloid peptid bizonyos aminosav szekvenciái szerint célzottan

tervezik (Tjernberg és mtsai 1996; Soto és mtsai 1998; Estrada és Soto 2007), várhatóan generalizált béta-lemez romboló hatással is rendelkeznek, különösen amiatt, mert az amiloid fibrillumokat elsődlegesen a peptidgerinc kölcsönhatások tartják össze (Tycko 2004). Ilyen megfontolásból az LPFFD általános amiloid-szerkezet romboló hatásának vizsgálata a kísérleti modellben jól indokolt. Az LPFFD peptidet a teljes hosszúságú A β 1-40 peptid hidrofób központi régiója alapján tervezték (17-21 aminosavak) (Soto és mtsai 1998). Bár a target aminosav szekvencia nem található meg az A β 25-35 modell peptidben, a BSB peptidek általános hatását figyelembe véve az LPFFD befolyásolhatná az A β 25-35 hálózat globális morfológiáját, a fibrillumképződés és disszociáció dinamikáját.

III. 1. Számos kísérlet eredményeképpen azt a következtetést vontuk le, hogy az A β 25-35 fibrilláris hálózat globális morfológiája, a felépülés dinamikája, a hálózat stabilitása nem változott számottevően még magas koncentrációjú LPFFD hozzáadása esetén sem. Az orientáció szögét sem befolyásolta a BSB peptid hozzáadása, tehát a csillám és A β 25-35 peptidek közötti kölcsönhatással (mely az epitaxiális orientáció elsődleges alapja) az LPFFD nem interferált (**31. ábra**). A fibrillumok átlagos magassága sem változott LPFFD kezelés hatására (**32. ábra**). A fibrillumok összeállása ugyanolyan kinetikával zajlott le függetlenül attól, hogy a kísérlet során hozzáadtunk a rendszerhez LPFFD-t vagy sem (**34. ábra**). Ez a megfigyelés arra enged következtetni, hogy az LPFFD nem zavarja meg a peptidek asszociációját a fibrillum hossz tengelye mentén. A már kialakult, érett hálózatra magas koncentrációban hozzáadott LPFFD-nek nem volt jelentős hatása (**35. ábra**).

III. 2. Az egyedüli LPFFD hatás a nanomechanikai kísérletek eredményeiből következik. LPFFD jelenlétében hosszabb platókat figyeltünk meg kevesebb erőlépcsővel. Az amiloid fibrillumok nanomechanikai válaszként fellépő platók protofilamentumok erő hatására történő disszociációjának felelnek meg (Karsai és mtsai 2005; Kellermayer és mtsai 2005; Karsai és mtsai 2006). A platók magassága a protofilamentumok szétcipzározásához szükséges erővel egyenértékű. Tehát, a platóerők a fibrillumok mechanikai stabilitását tükrözik. Az a megfigyelés, hogy az átlagos platóerő LPFFD hatására lecsökkent (**37. ábra**), arra utal, hogy a BSB peptid

fellazíthatta a protofilamentumok közötti kölcsönhatást. Az erőplatók hossza a két egymást követő protofilamentum-leszakadás közti távolságot jelöli. Minél hosszabb a plató, annál hosszabb protofilamentumot sikerül lefejteni a fibrillum felszínéről a nanomechanikai manipuláció során. Csak találgathatunk az LPFFD jelenlétében regisztrált hosszabb platók kapcsán. Feltehetően, az inter-protofilamentáris kölcsönhatás erősségének csökkenése a protofilamentum axiális stabilitásának növekedésével járt együtt.

III. 3. Eredményeink alapján az általunk használt amiloid-rendszerre az LPFFD peptidnek **nem sikerült kifejtenie jelentős szerkezet-romboló hatást.**

III. 4. Az orientált A β 25-35 fibrilláris hálózat ennek ellenére a jövőben is megállja a helyét kísérleti modell-rendszerként gyorsasága, stabilitása és reprodukálhatósága miatt. Érdekesnek tartom a fibrillogenezissel specifikusabban interferáló anyagok tesztelését, melyek markánsabb fizikai és kémiai változásokat hozhatnak létre a hálózaton. A kísérleti modell-rendszerünkben pártázó atomerő-mikroszkópiával nagyszámú, a fibrillumokat jellemző paramétert nyerhetünk ki, és egyedül ez a tény is alátámasztja a modell-rendszer alkalmazhatóságát.

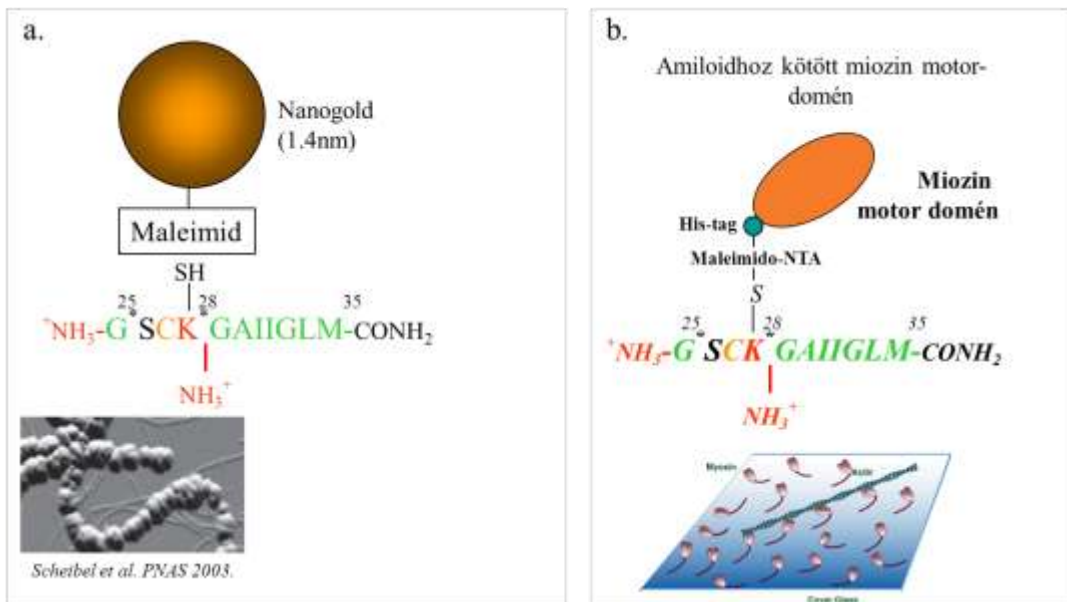
IV. Annak érdekében, hogy az orientált A β 25-35 hálózatot további alkalmazásokra fel lehessen használni, létrehoztunk egy **mutáns A β 25-35 peptidet**, kicserélve a 27-es pozícióban levő arginin aminosavat ciszteinre. A vad típusú A β 25-35 peptidhez hasonlóan, az N27C mutáns is stabil, szabályos elrendeződésű hálózatot hoz létre a csillámfelszínen. A Cys²⁷ szulfhidril csoportjának különlegessége, hogy – megfelelő keresztkötőket használva – különféle biomolekulákkal illetve nano-arannyal való jelölést tesz lehetővé.

IV. 1. A peptidek kötődése, a fibrillumok növekedése, így a hálózat létrejötte is a kation-koncentrációtól függ. Az a tény, hogy az amiloid fibrillumok növekedése kation-függő, felhasználható a **hálózatok létrehozásának finomhangolására**. Így a K⁺ illetve Na⁺ koncentráció változtatásával tetszőlegesen sűrű hálózatok hozhatók létre, valamint az elágazódási pontok száma is szabályozható (**38. ill. 39. ábra**). A

peptid-koncentráció hangolásával a hálózatokat alkotó fibrillumok hossza szabályozható.

IV. 2. Nanomechanikai manipuláció során bebizonyítottuk, hogy a fibrillumok hossz tengelye mentén a 27-es cisztein szulfhidril csoportja a felszínre merőlegesen, attól elfele helyezkedik el, így kémiai elérhető és reakcióképes.

IV. 3. A mutáns hálózat tulajdonságai teljesítették a nano-módszerekben való felhasználhatóság feltételeit.



42. Ábra. Tervek és elképzelések: Aβ₂₅₋₃₅ fibrillumok nanotechnológiai alkalmazása. **a.** Elektromos dróthálózat építése. **b.** Orientált, funkcionális felszín motorfehérjéknek.

A közeljövőben az Aβ₂₅₋₃₅ fibrillumok nanotechnológiai alkalmazását tervezzük megvalósítani (**42. ábra**). A cisztein oldallánc specifikus jelölése révén az Aβ₂₅₋₃₅_N27C szabályos elrendeződése biomolekuláris nanoszerkezetek építésére (pl. irányított nanoskálájú transzport technikai megoldásainak kidolgozása céljából a fibrillumokhoz kapcsolt motorfehérjék nanomechanikai rendszerének létrehozására); fibrillumokhoz kötött enzimek révén nanoszenzorok létesítésére; vagy - a fibrillumokhoz nanogold részecskéket kötve -, nanoeletronikai hálózatok létrehozására használható fel.

VII. ÖSSZEFOGLALÁS

A béta amiloid peptidek önszerveződő fibrilláris struktúrákat képeznek Alzheimer kórban. Az A β 25-35 peptid a teljes hosszúságú A β peptid biológiailag aktív, toxikus töredéke. Epitaxiális mechanizmussal A β 25-35 peptidekből egy stabil, orientált hálózatot hoztunk létre csillámfelszínen. Ugyanezen peptid egyensúlyi körülmények között, oldatban is kialakít amiloid fibrillumokat. Feltérképeztük a továbbiakban kísérleti modellrendszerként használt orientált hálózat alaki és nanomechanikai tulajdonságait.

Elsőként hasonlítottuk össze a két különböző fibrillogenetikus úton létrejött amiloid fibrillum szerkezetét atomerő-mikroszkópia, erőspektroszkópia és FTIR spektroszkópia segítségével. Az amiloidokra karakterisztikus fibrilláris morfológia mindkét esetben jellemző volt ugyan, de az oldatban összeállt fibrillumok magasabb fokú szerkezeti hierarchiát mutattak, morfológiai polimorfizmussal rendelkeztek és gyakran helikálisak voltak. Ezzel ellentétben az epitaxiális fibrillumok lineáris, lapszerű szerkezetet hoztak létre. Míg az epitaxiális növekedés csillámfelszínen percek alatt lezajlott, a fibrillumok oldatban órák-napok alatt álltak össze. A fibrillum-képződés ilyen mértékű felgyorsulásáért a csillámfelszín katalizáló szerepe felelős. A fibrillumok nanomechanikáját mindkét esetben a karakterisztikus erőplatók jellemezték, az elemi platóerő ~30 pN volt. Mindkét fibrillum béta-lemezes másodlagos szerkezetet mutatott. Az oldatban összeállt fibrillumok kompaktabb szerkezettel rendelkeztek, mint a csillámfelszínen kialakult fibrillumok. Eredményeink alapján arra következtettünk, a csillámfelszínen kialakuló orientált hálózat jó amiloid fibrillum modellként fogható fel.

Ezen egyszerű, reprodukálható, gyors modell-rendszer, lehetővé teszi különböző faktorok amiloid fibrillumokra gyakorolt hatásának vizsgálatát. A szakirodalomban elsőként vizsgáltuk az LPFFD béta-lemez romboló peptid hatását A β 25-35 modellrendszerre. Az erőspektroszkópiai méréseink eredménye alapján feltételezhető, hogy az LPFFD peptid fellazítja az amiloid protofilamentumok közötti oldalirányú kölcsönhatásokat. Az általunk használt amiloid-rendszerre az LPFFD peptidnek nem sikerült kifejtenie jelentős béta-lemez-romboló hatást.

Létrehoztunk egy mutáns A β 25-35 peptidet, melynek ciszteines szulfhidril csoportja különféle biomolekulákkal illetve nano-arannyal való jelölést tesz lehetővé. Atomerő-mikroszkópot használva megvizsgáltuk az A β 25-35_N27C orientált hálózat biomolekuláris nanoszerkezetek létrehozására való alkalmasságát. Új eredményünk, hogy a mutáns hálózat a kation- illetve peptid-koncentráció változtatásával finomhangolható. Bebizonyítottuk, hogy a mutáns peptid cisztein csoportja a felszíntől az oldat irányába mutat, így hozzáférhetővé válik kémiai csoportok, jelölő molekulák számára. Bebizonyítottuk, hogy a mutáns A β 25-35 hálózat paraméterei, tulajdonságai teljesítették a nano-módszerben történő felhasználás feltételeit.

VIII. SUMMARY

The A β peptides form self-assembled fibrillar structures in Alzheimer's disease. The A β 25-35 peptide used in our experiments is the biologically active, toxic fragment of the full-length A β peptide. We constructed a highly ordered, stable network from A β 25-35 peptides showing trigonal orientation on mica. The same peptide can assemble itself into amyloid fibrils in solution as well. We mapped the morphological and nanomechanical features of the oriented network used later as an experimental model system.

We were the first to compare the properties (morphology, nanomechanics and secondary structure) of epitaxially-grown and solution-grown amyloid fibrils by means of AFM, force spectroscopy and FTIR spectroscopy. Both types of fibrils displayed underlying fibrillar morphology. Nevertheless, in contrast to the homogeneity structure of epitaxially-grown fibrils, solution-grown fibrils showed higher structural hierarchy, polymorphism and topographical periodicity. Epitaxially grown fibrils formed linear, sheet-like structures. The fibrils differed in their growth kinetics: while fibril assembly in solution occurred on a time scale of hours to days, on mica surface fibrils appeared within a few minutes. The mica surface might act as a catalyzer accelerating the process of fibrillogenesis. Because of the accelerated fibrillogenesis, the effect of physical and chemical parameters on amyloid fibrillogenesis can be easily explored. Both types of fibrils displayed identical nanomechanical responses in form of force plateaus; the elementary force plateau was ~30 pN. Both types of fibrils displayed an underlying β -sheet structure. The FTIR spectra also showed that fibrils assembled in solution have a more compact structure. We demonstrated that the epitaxially grown oriented network be considered as a good amyloid-fibril model.

The stable, ordered network of A β 25-35 fibrils on mica is a simple, reproducible system on the nanoscale. Studying on this model the effect of different factors interfering with fibrillogenesis, the changes of structural, nanomechanical properties of the A β 25-35 fibril network can be easily monitored by AFM. The effect of the BSB peptide LPFFD was investigated in an amyloid model system of oriented A β 25-35 fibrils on mica. From force spectroscopy measurements we concluded that the LPFFD peptide may weaken the interaction between protofilaments. Our results indicate that the LPFFD peptide does not have a generalized beta-sheet-breaking effect in the amyloid assembly system utilized in the present experiment.

By using mutant A β 25-35 peptides containing amino acid residues with specific chemical reactivity the labeling of the oriented network with various biomolecules or conducting metals can be accomplished. For future applications the fine-tuning of the network's properties (e.g.,

average fibril length, number of branching points) was needed. We succeeded in fine-tuning the properties of the mutant network by varying the cation-concentration. We demonstrated that the sulfhydryl group of Cys27 within the oriented fibril network is indeed exposed to the solution and is chemically accessible and reactive. We therefore demonstrated that the properties of the mutant A β 25-35 network may provide important tools for future nanotechnological applications.

IX. IRODALOMJEGYZÉK

- Abbott A. 2011. Dementia: a problem for our age. *Nature* 475(7355):S2-4.
- Akutagawa T, Ohta T, Hasegawa T, Nakamura T, Christensen CA, Becher J. 2002. Formation of oriented molecular nanowires on mica surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(8):5028-33.
- Arrondo JL, Muga A, Castresana J, Goni FM. 1993. Quantitative studies of the structure of proteins in solution by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Prog Biophys Mol Biol.* 59(1):23-56.
- Barth A. 2007. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1767(9):1073-101.
- Bitan G, Kirkitadze MD, Lomakin A, Vollers SS, Benedek GB, Teplow DB. 2003. Amyloid beta -protein (A β) assembly: A β 40 and A β 42 oligomerize through distinct pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(1):330-5.
- Bond JP, Deverin SP, Inouye H, el-Agnaf OM, Teeter MM, Kirschner DA. 2003. Assemblies of Alzheimer's peptides A β 25-35 and A β 31-35: reverse-turn conformation and side-chain interactions revealed by X-ray diffraction. *J Struct Biol.* 141(2):156-70.
- Brigatti MF, Guggenheim S, Poppi M. 2003. Crystal chemistry of the 1M mica polytype: the octahedral sheet. *Am Mineral* 88:667–675
- Byler DM, Susi H. 1986. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers* 25(3):469-87.
- Chirgadze YN, Shestopalov BV, Venyaminov SY. 1973. Intensities and other spectral parameters of infrared amide bands of polypeptides in the beta- and random forms. *Biopolymers* 12(6):1337-51.
- Crumbliss AL, Perine SC, Stonehuerner J, Tubergen KR, Zhao J, Henkens RW, O'Daly JP. 1992. Colloidal gold as a biocompatible immobilization matrix suitable for the fabrication of enzyme electrodes by electrodeposition. *Biotechnol Bioeng.* 40(4):483-90.
- Cummings JL. 2004. Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 351(1):56-67.

Del Mar Martinez-Senac M, Villalain J, Gomez-Fernandez JC. 1999. Structure of the Alzheimer beta-amyloid peptide (25-35) and its interaction with negatively charged phospholipid vesicles. *Eur J Biochem. / FEBS* 265(2):744-53.

Delobette S, Privat A, Maurice T. 1997. In vitro aggregation facilitates beta-amyloid peptide-(25-35)-induced amnesia in the rat. *Eur J Pharmacol.* 319(1):1-4.

Dobson CM. 2003. Protein folding and misfolding. *Nature* 426(6968):884-90.

Eanes ED, Glenner GG. 1968. X-ray diffraction studies on amyloid filaments. *J Histochem Cytochem* 16(11):673-7.

Estrada LD, Soto C. 2007. Disrupting beta-amyloid aggregation for Alzheimer disease treatment. *Curr Top Med Chem.* 7(1):115-26.

Gazit E. 2005. Mechanisms of amyloid fibril self-assembly and inhibition. Model short peptides as a key research tool. *FEBS J* 272(23):5971-8.

Gazit E. 2007. Use of biomolecular templates for the fabrication of metal nanowires. *FEBS J* 274(2):317-22.

Glenner GG, Wong CW. 1984. Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 122(3):1131-5.

Goldsbury C, Frey P, Olivieri V, Aebi U, Muller SA. 2005. Multiple assembly pathways underlie amyloid-beta fibril polymorphisms. *J Mol Biol.* 352(2):282-98.

Goldsbury C, Baxa U, Simon MN, Steven AC, Engel A, Wall JS, Aebi U, Muller SA. Amyloid structure and assembly: insights from scanning transmission electron microscopy. *J Struct Biol.* 173(1):1-13.

Goldsbury CS, Cooper GJ, Goldie KN, Muller SA, Saafi EL, Gruijters WT, Misur MP, Engel A, Aebi U, Kistler J. 1997. Polymorphic fibrillar assembly of human amylin. *J Struct Biol.* 119(1):17-27.

Gravitz L. 2011. Drugs: a tangled web of targets. *Nature* 475(7355):S9-11.

Griffiths, P. R., Haseth, J. A. 2007. Fourier transform infrared spectrometry, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM. 1986a. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem.* 261(13):6084-9.

Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. 1986b. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83(13):4913-7.

Hamada D, Yanagihara I, Tsumoto K. 2004. Engineering amyloidogenicity towards the development of nanofibrillar materials. *Trends Biotechnol*. 22(2):93-7.

Hardy J. 2006. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis: an update and reappraisal. *J Alzheimers Dis* 9(3 Suppl):151-3.

Hardy J, Allsop D. 1991. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci*. 12(10):383-8.

Hardy J, Selkoe DJ. 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science (New York, N.Y)* 297(5580):353-6.

Haris PI, Chapman D. 1988. Fourier transform infrared spectra of the polypeptide alamethicin and a possible structural similarity with bacteriorhodopsin. *Biochim Biophys Acta*. 943(2):375-80.

Hetenyi C, Kortvelyesi T, Penke B. 2002. Mapping of possible binding sequences of two beta-sheet breaker peptides on beta amyloid peptide of Alzheimer's disease. *Bioorg. Medicinal Chem*. 10(5):1587-93.

Hoyer W, Cherny D, Subramaniam V, Jovin TM. 2004. Rapid self-assembly of alpha-synuclein observed by in situ atomic force microscopy. *J Mol Biol*. 340(1):127-39.

Hutter and Bechhoefer. 1993. Calibration of atomic force microscope tips. *Rev. Sci. Instrum*. 64, 1868.

Ippel JH, Olofsson A, Schleucher J, Lundgren E, Wijmenga SS. 2002. Probing solvent accessibility of amyloid fibrils by solution NMR spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(13):8648-53.

Ismail AA, Mantsch HH, Wong PT. 1992. Aggregation of chymotrypsinogen: portrait by infrared spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*. 1121(1-2):183-8.

Jahn TR, Makin OS, Morris KL, Marshall KE, Tian P, Sikorski P, Serpell LC. 2009. The Common Architecture of Cross-beta Amyloid. *J Mol Biol*.

Karsai A, Martonfalvi Z, Nagy A, Grama L, Penke B, Kellermayer MS. 2006. Mechanical manipulation of Alzheimer's amyloid beta1-42 fibrils. *J Struct Biol*. 155(2):316-26.

Karsai A, Murvai U, Soos K, Penke B, Kellermayer MS. 2008. Oriented epitaxial growth of amyloid fibrils of the N27C mutant beta 25-35 peptide. *Eur Biophys J* 37(7):1133-7.

Karsai A, Nagy A, Kengyel A, Martonfalvi Z, Grama L, Penke B, Kellermayer MS. 2005. Effect of lysine-28 side-chain acetylation on the nanomechanical behavior of alzheimer amyloid beta25-35 fibrils. *J Chem Inf Model*. 45(6):1641-6.

Kauppinen JK, Moffatt DJ, Cameron DG, Mantsch HH. 1981. Noise in Fourier self-deconvolution. *Appl Opt*. 20(10):1866-79.

Kellermayer MS, Grama L, Karsai A, Nagy A, Kahn A, Datki ZL, Penke B. 2005. Reversible mechanical unzipping of amyloid beta-fibrils. *J Biol Chem*. 280(9):8464-70.

Kellermayer MS, Karsai A, Benke M, Soos K, Penke B. 2008. Stepwise dynamics of epitaxially growing single amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(1):141-4.

Khurana R, Fink AL. 2000. Do parallel beta-helix proteins have a unique fourier transform infrared spectrum? *Biophys. J*. 78(2):994-1000.

Kim JR, Gibson TJ, Murphy RM. 2003. Targeted control of kinetics of beta-amyloid self-association by surface tension-modifying peptides. *J Biol Chem*. 278(42):40730-5.

Kirschner DA, Inouye H, Duffy LK, Sinclair A, Lind M, Selkoe DJ. 1987. Synthetic peptide homologous to beta protein from Alzheimer disease forms amyloid-like fibrils in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(19):6953-7.

Kosik KS, Joachim CL, Selkoe DJ. 1986. Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(11):4044-8.

Krimm S, Bandekar J. 1986. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. *Adv Protein Chem*. 38:181-364.

Kyle RA. 2001. Amyloidosis: a convoluted story. *Br J Haematol*. 114(3):529-38.

Lashuel HA, Lansbury PT, Jr. 2006. Are amyloid diseases caused by protein aggregates that mimic bacterial pore-forming toxins? *Q Rev Biophys*. 39(2):167-201.

LeVine H, 3rd. 1993. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci* 2(3):404-10.

Lin MC, Kagan BL. 2002. Electrophysiologic properties of channels induced by Abeta25-35 in planar lipid bilayers. *Peptides* 23(7):1215-28.

Luca S, Yau WM, Leapman R, Tycko R. 2007. Peptide conformation and supramolecular organization in amylin fibrils: constraints from solid-state NMR. *Biochemistry* 46(47):13505-22.

Luhrs T, Ritter C, Adrian M, Riek-Loher D, Bohrmann B, Dobeli H, Schubert D, Riek R. 2005. 3D structure of Alzheimer's amyloid-beta(1-42) fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(48):17342-7.

Makin OS, Sikorski P, Serpell LC. 2006. Diffraction to study protein and peptide assemblies. *Curr Opin Chem Biol.* 10(5):417-22.

Makin OS, Serpell LC. 2005. Structures for amyloid fibrils. *FEBS J* 272(23):5950-61.

Mason RP, Estermyer JD, Kelly JF, Mason PE. 1996. Alzheimer's disease amyloid beta peptide 25-35 is localized in the membrane hydrocarbon core: x-ray diffraction analysis. *Biochem Biophys Res Commun.* 222(1):78-82.

Mastrangelo IA, Ahmed M, Sato T, Liu W, Wang C, Hough P, Smith SO. 2006. High-resolution atomic force microscopy of soluble Abeta42 oligomers. *J Mol Biol.* 358(1):106-19.

Middaugh CR, Mach H, Ryan JA, Sanyal G, Volkin DB. 1995. Infrared spectroscopy. *Methods Mol Biol.* (Clifton, N.J 40:137-56.

Millucci L, Raggiaschi R, Franceschini D, Terstappen G, Santucci A. 2009. Rapid aggregation and assembly in aqueous solution of A beta (25-35) peptide. *J Biosci.* 34(2):293-303.

Mirzabekov T, Lin MC, Yuan WL, Marshall PJ, Carman M, Tomaselli K, Lieberburg I, Kagan BL. 1994. Channel formation in planar lipid bilayers by a neurotoxic fragment of the beta-amyloid peptide. *Biochem Biophys Res Commun.* 202(2):1142-8.

Moore WH, Krimm S. 1975. Transition dipole coupling in Amide I modes of betapolypeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(12):4933-5.

Murvai U, Soos K, Penke B, Kellermayer MS. Effect of the beta-sheet-breaker peptide LPFFD on oriented network of amyloid beta25-35 fibrils. *J Mol Recognit* 24(3):453-60.

Nilsson MR. 2004. Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods San Diego, Calif* 34(1):151-60.

Paravastu AK, Leapman RD, Yau WM, Tycko R. 2008. Molecular structural basis for polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(47):18349-54.

Parker MC, Patel N, Davies MC, Roberts CJ, Tendler SJ, Williams PM. 1996. A novel organic solvent-based coupling method for the preparation of covalently immobilized proteins on gold. *Protein Sci*. 5(11):2329-32.

Permanne B, Adessi C, Fraga S, Frossard MJ, Saborio GP, Soto C. 2002. Are beta-sheet breaker peptides dissolving the therapeutic problem of Alzheimer's disease? *J Neural Transm*. (62):293-301.

Petkova AT, Ishii Y, Balbach JJ, Antzutkin ON, Leapman RD, Delaglio F, Tycko R. 2002. A structural model for Alzheimer's beta -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(26):16742-7.

Petkova AT, Leapman RD, Guo Z, Yau WM, Mattson MP, Tycko R. 2005. Self-propagating, molecular-level polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Science (New York, N.Y)* 307(5707):262-5.

Petkova AT, Yau WM, Tycko R. 2006. Experimental constraints on quaternary structure in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Biochemistry* 45(2):498-512.

Pike CJ, Walencewicz-Wasserman AJ, Kosmoski J, Cribbs DH, Glabe CG, Cotman CW. 1995. Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity. *J Neurochem*. 64(1):253-65.

Podstawka E, Ozaki Y, Proniewicz LM. 2005. Part III: Surface-enhanced Raman scattering of amino acids and their homodipeptide monolayers deposited onto colloidal gold surface. *Appl Spectrosc* 59(12):1516-26.

Poduslo JF, Curran GL, Kumar A, Frangione B, Soto C. 1999. Beta-sheet breaker peptide inhibitor of Alzheimer's amyloidogenesis with increased blood-brain barrier permeability and resistance to proteolytic degradation in plasma. *J Neurobiol*. 39(3):371-82.

Reches M, Gazit E. 2003. Casting metal nanowires within discrete self-assembled peptide nanotubes. *Science (New York, N.Y)* 300(5619):625-7.

Reches M, Porat Y, Gazit E. 2002. Amyloid fibril formation by pentapeptide and tetrapeptide fragments of human calcitonin. *J Biol Chem*. 277(38):35475-80.

Sarroukh R, Cerf E, Derclaye S, Dufrene YF, Goormaghtigh E, Ruyschaert JM, Raussens V. Transformation of amyloid beta(1-40) oligomers into fibrils is characterized by a major change in secondary structure. *Cell Mol Life Sci* 68(8):1429-38.

Scheibel T, Parthasarathy R, Sawicki G, Lin XM, Jaeger H, Lindquist SL. 2003. Conducting nanowires built by controlled self-assembly of amyloid fibers and selective metal deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(8):4527-32.

Schmidt M, Sachse C, Richter W, Xu C, Fandrich M, Grigorieff N. 2009. Comparison of Alzheimer Abeta(1-40) and Abeta(1-42) amyloid fibrils reveals similar protofilament structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(47):19813-8.

Selkoe DJ. 2003a. Aging, amyloid, and Alzheimer's disease: a perspective in honor of Carl Cotman. *Neurochem Res.* 28(11):1705-13.

Selkoe DJ. 2003b. Folding proteins in fatal ways. *Nature* 426(6968):900-4.

Serpell LC. 2000. Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly. *Biochim Biophys Acta.* 1502(1):16-30.

Shanmugam G, Jayakumar R. 2004. Structural analysis of amyloid beta peptide fragment (25-35) in different microenvironments. *Biopolymers* 76(5):421-34.

Sigurdsson EM, Permanne B, Soto C, Wisniewski T, Frangione B. 2000. In vivo reversal of amyloid-beta lesions in rat brain. *J Neuropathol Exp Neurol.* 59(1):11-7.

Sipe JD, Cohen AS. 2000. Review: history of the amyloid fibril. *J Struct Biol.* 130(2-3):88-98.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 150(1):76-85.

Soto C. 2001. Protein misfolding and disease; protein refolding and therapy. *FEBS letters* 498(2-3):204-7.

Soto C, Sigurdsson EM, Morelli L, Kumar RA, Castano EM, Frangione B. 1998. Beta-sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: implications for Alzheimer's therapy. *Nat Med.* 4(7):822-6.

Susi H, Byler DM. 1987. Fourier transform infrared study of proteins with parallel beta-chains. *Arch Biochem Biophys.* 258(2):465-9.

Terzi E, Holzemann G, Seelig J. 1994. Reversible random coil-beta-sheet transition of the Alzheimer beta-amyloid fragment (25-35). *Biochemistry* 33(6):1345-50.

Tjernberg LO, Naslund J, Lindqvist F, Johansson J, Karlstrom AR, Thyberg J, Terenius L, Nordstedt C. 1996. Arrest of beta-amyloid fibril formation by a pentapeptide ligand. *J Biol Chem.* 271(15):8545-8.

Torok M, Milton S, Kaye R, Wu P, McIntire T, Glabe CG, Langen R. 2002. Structural and dynamic features of Alzheimer's A β peptide in amyloid fibrils studied by site-directed spin labeling. *J Biol Chem.* 277(43):40810-5.

Tycko R. 2004. Progress towards a molecular-level structural understanding of amyloid fibrils. *Curr Opin Struct Biol.* 14(1):96-103.

van Veen M, O'Shea P. 1995. The interaction of the neurodegenerative fragment of the beta-amyloid peptide with phospholipid membranes. *Biochem Soc Trans.* 23(4):547S.

Walsh DM, Lomakin A, Benedek GB, Condron MM, Teplow DB. 1997. Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate. *J Biol Chem.* 272(35):22364-72.

Wei G, Jewett AI, Shea JE. 2010. Structural diversity of dimers of the Alzheimer amyloid-beta(25-35) peptide and polymorphism of the resulting fibrils. *Phys Chem Chem Phys* 12(14):3622-9.

Wong CW, Quaranta V, Glenner GG. 1985. Neuritic plaques and cerebrovascular amyloid in Alzheimer disease are antigenically related. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(24):8729-32.

Wood JG, Mirra SS, Pollock NJ, Binder LI. 1986. Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (τ). *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(11):4040-3.

Zarandi M, Soos K, Fulop L, Bozso Z, Datki Z, Toth GK, Penke B. 2007. Synthesis of A β [1-42] and its derivatives with improved efficiency. *J Pept Sci* 13(2):94-9.

Alzheimer's Disease International World Alzheimer Report, The Global Economic Impact of Dementia, 2010 (<http://www.alz.co.uk>)

X. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények:

1. Ünige Murvai, Katalin Soós, Botond Penke and Miklós S. Z. Kellermayer. Effect of the beta-sheet-breaker peptide LPFFD on oriented network of amyloid β 25-35 fibrils, *J. Mol. Recognit.* 2011. 24 (3): p. 453-60.
2. Árpád Karsai, Ünige Murvai, Katalin Soós, Botond Penke and Miklós S.Z. Kellermayer. Oriented epitaxial growth of amyloid fibrils of the N27C mutant β 25-35 peptide. *European Biophys. J.*, 2008. 37 (7): p. 1133-7.
3. Árpád Karsai, László Grama, Ünige Murvai, Katalin Soós, Botond Penke and Miklós S Z Kellermayer: Potassium-dependent oriented growth of amyloid β 25–35 fibrils on mica, *Nanotechnology*. 2007. 18 345102

Egyéb közlemények:

Éva M. Szego, Attila Csorba, Tamás Janáky, Katalin A. Kékesi, István M. Ábrahám, Gábor M. Mórotz, Botond Penke, Miklós Palkovits, Ünige Murvai, Miklós S.Z. Kellermayer, József Kardos, Gábor D. Juhász. Effects of Estrogen on Beta-Amyloid-Induced Cholinergic Cell Death in the Nucleus Basalis Magnocellularis. *Neuroendocrinology*. 2011. 93 (2): p. 90-105.

XI. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Egy doktori értekezés elkészülte valaminek a végét és egyben az elejét is jelenti. Bár a doktori kutatómunka alapvetően önálló munka, témavezetőm, kollégáim tanácsai, útmutatásai nélkül ez a disszertáció sem születhetett volna meg.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Kellermayer Miklósnak, hogy kutatócsoportjának tagjai közé befogadott, a kutatás rejtélyes világába bevezetett, és rengeteg eredeti ötlettel, tanáccsal látott el. Személyében lendületes, kreatív kutatót ismerhettem meg. Szakmai tisztessége, éles kritikája és tudományszeretete példamutató, inspiráló és szemléletformáló volt számomra.

A FTIR spektrumok felvételében és kiértékelésében nyújtott segítségért köszönet illeti Dr. Smeller Lászlót és Somkuti Juditot.

Köszönöm Intézetünk munkatársainak támogatását és segítségét, különösen Dr. Kis Petik Katalin és Dr. Herényi Levente tanácsait, útmutatását.

Köszönet és hála illeti Dr. Gál Erikát, akinek köszönhetően elindultam a tudomány nehéz, de szépségekkel teli útján. Köszönet barátaimnak a szüntelen biztatásért, kitartásom erősítéséért.

Hálás vagyok családomnak, hogy mérhetetlen szeretetükkel egész életemben támogattak, és példaértékű életükkel megtanították nekem, hogy a siker, teljesítmény önmagában keveset ér, de hatalmas értékkel bír, hogyha általuk gazdagabbá válik a közösség és a nemzet, amelyhez tartozunk.

Doktori értekezésemet Bartha Dénes és Nemes Ida emlékének ajánlom.