

# Templát-vezérelt amiloid fibrillogenézis biofizikai vizsgálata

Doktori tézisek

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

A szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Csermely Péter egyetemi tanár, az MTA doktora

A szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Káldi Krisztina egyetemi docens, PhD

Dr. Derényi Imre egyetemi docens, az MTA doktora

Budapest

2012



## Bevezetés

A béta amiloidok filamentumszerű aggregátumok, melyek fehérjelerakódás formájában jelennek meg az Alzheimer kórban. A vízben oldhatatlan aggregátumokat képező amiloid fibrillumok szerkezetének vizsgálata mai napig nagy metodikai kihívást jelent. Az atomerő-mikroszkóp (AFM) egy olyan nanométeres felbontású képalkotó módszer, mely sikeresen megfelel ennek a kihívásnak: kiválóan alkalmas az amiloid fibrillumok szerkezeti vizsgálatára és a fibrillogenezis követésére.

Az általunk vizsgált amiloid béta<sub>25-35</sub> (A $\beta$ <sub>25-35</sub>) peptid az amiloid béta<sub>1-42</sub> peptid biológiailag aktív szakasza. Ez a tizenegy aminosav hosszúságú peptid in vitro körülmények között gyors kinetikával képez fibrillumokat, és neurotoxikus tulajdonságai megegyeznek a teljes hosszúságú amiloid peptidével.

A peptidből létrejövő fibrillumok szerkezete magas fokú rendezettséget mutat. A fibrillum tengelyére merőlegesen álló peptidek ( $\beta$ -szálak) hidrogén hidakkal kapcsolódnak össze, létrehozva a fibrillumok szerkezeti alapegységeit, a protofilamentumokat. 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.

Az amiloid fibrillumok kialakulásának, szerkezetének és stabilitásának vizsgálata egyre jobban a tudományos érdeklődés homlokterébe kerül, ugyanis a neurodegeneratív betegségben szenvedők száma az előregedő társadalmak miatt rohamosan növekszik, valamint az Alzheimer kór terápiájában használt gyógyszerek csak lassítják a betegség előrehaladását, hatékony profilaktikus vagy gyógyító kezelés azonban még nem létezik. Az Alzheimer kór potenciális terápiás lehetőségei közt megemlíthető az amiloid-aggregátum képződésének megakadályozása  $\beta$ -lemez rombolókkal (BSB). 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. Nagy remény fűződik ahhoz, hogy a BSB peptidek esetleg a terápiában is alkalmazásra kerülhetnek.

Az amiloidok nemcsak a fehérjeterakodási betegségek főszereplői. Önszerveződő tulajdonságaik révén nanotechnológiai, nanoelektronikai alkalmazási lehetőségeknek nyitnak teret.

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 $\beta$ 25-35 peptid csillámfelületen epitaxiális növekedéssel orientált hálózatot képez, ezt a szabályos, könnyen és gyorsan létrehozható hálózatot kísérleteinkben modellrendszerként használtuk.

### **Célkitűzéseink:**

- I. A csillámfelületen epitaxiális növekedéssel létrejött, orientált hálózat paramétereinek pontos feltérképezése szükséges ahhoz, hogy a hálózatot kísérleti modellrendszerként használhassuk. Célul tűztük ki ezért:
  1. a csillámfelületen 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 csillámfelületen kialakuló orientált hálózat felfogható-e jó amiloid fibrillum (vagy plakk-) modellként?
  1. Oldatban növesztett, csillámfelületre adszorbeált érett amiloid fibrillumok alak, nanomechanikai összehasonlítása az epitaxiálisan orientált fibrillumokkal.
  2. Másodlagos szerkezet-vizsgálat FTIR spektroszkópiával.
- III. LPFFD béta-lemez romboló peptid hatásának vizsgálatát terveztük az amiloid hálózatra nézve. Van-e az LPFFD peptidnek általános béta-lemez romboló hatása?
- IV. A módosított peptid cisztein szulfhidril csoportja számos molekula hozzákapcsolását teszi lehetővé a mutáns amiloid peptidhez. A jövőbeli „nano-módszer” alkalmazások alapjainak lefektetése végett, célul tűztük ki a csillámon orientált mutáns A $\beta$ 25-35 peptidből felépülő fibrilláris hálózat vizsgálatát, a hálózat paramétereinek (felületi befedettség, fibrillum-hossz) finomhangolását.

## Módszerek

### 1. A KÍSÉRLETEKHEZ FELHASZNÁLT A $\beta$ -PEPTIDEK

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. A vad típusú **A $\beta$ 25-35** aminosav-szekvenciája:  $^{25}\text{GSNKGAIIGLM}^{35}$ -amid. Molekulatömege 1060,3 g/mol. Az N27C mutáns A $\beta$ 25-35 peptid, **A $\beta$ 25-35\_N27C** szekvenciája:  $^{25}\text{GSCKGAIIGLM}^{35}$ -amid. Molekulatömege 1007,3 g/mol. A béta-lemez romboló peptid szekvenciája: **LPFFD**. Molekulatömege 636 g/mol.

### 2. AMILOID FIBRILLUMOK NÖVESZTÉSE

Az oldatban történő növesztéskor a liofilizált A $\beta$ 25-35 mintát első lépésben DMSO-ban oldottuk fel. A DMSO oldatot 10 mM PBS pufferben hígítottuk tovább úgy, hogy a végső peptidkoncentráció  $\geq 0,5\text{mg/ml}$  legyen. A növesztés szobahőmérsékleten ( $T = 24\text{ }^\circ\text{C}$ ) történt 3-14 napig. Polimerizációs góctól mentes minták előállítására érdekében az A $\beta$ 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,  $T = 4\text{ }^\circ\text{C}$ ). A felülúszót, mely csupán peptideket tartalmazott, folyékony nitrogénben gyorsan lefagyasztottuk, majd a mintákat felhasználásig  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ -on tároltuk. Az így előállított mintákat a csillámfelületen végzett mérésekhez használtuk. A minták peptid koncentrációját nagy érzékenységű teszttel határoztuk meg (Bicinchoninic acid assay, SIGMA).

### 3. ALKALMAZOTT SZUBSZTRÁT FELÜLETEK

Az epitaxiálisan növekedett fibrillumok atomerő-mikroszkópos képalkotásához frissen hasított csillámfelületet használtunk. A frissen hasított csillám felszínéről vizes közegben gyengén kötött  $\text{K}^+$  ionok diffundálnak el, lehetővé téve ezáltal pozitív felületi töltésű biomolekulák kitapadását. A minta illetve a puffer  $\text{K}^+$  tartalmának függvényében dinamikus egyensúly alakul ki a szabad és a telített kötőhelyek között.

#### 4. MINTÁK KEZELÉSE

A mintákat az atomerő-mikroszkópia alkalmazhatósága céljából a megfelelően előkészített felszíneken inkubáltuk. Az inkubációs idő leteltével, pufferrel történő mosással távolítottuk el a nem vagy csak gyengén kötődött fibrillumokat. Szárított preparátumok esetében ultratiszta (Milli-Q) vízzel mostuk le a felszínt, majd tiszta N<sub>2</sub> gázzal szárítottuk.

#### 5. ATOMERŐ-MIKROSZKÓPIA

##### 5. 1. AZ MFP3D ATOMERŐ-MIKROSZKÓP

A képalkotáshoz egy Molecular Force Probe 3D (MFP3D) típusú atomerő-mikroszkópot használtunk (Asylum Research, Santa Barbara, CA, USA) A pásztázást oszcillációs üzemmódban végeztük szárított mintákon, illetve fiziológias 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 képalkotáshoz Olympus AC160TS-C2 illetve Olympus BioLever (BL-RC150VB) rugólapkákat használtunk.

##### 5. 2. ERŐSPEKTROSZKÓPIA

A felülethez kötött, adszorbeált fibrillumokat mechanikailag manipuláltuk egy felszínhez nyomott Olympus BioLever (BL-RC150VB) rugólapka segítségével. 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. Az *in situ* erőspektroszkópia során előbb a számunkra érdekes területet pásztázzuk, majd ezen a területen levő fibrillumokon erőspektrumokat veszünk fel, végezetül ugyanezt a területet újból pásztázzuk. Az első és utolsó pásztázási képet összehasonlítva, észlelhetőek az esetlegesen bekövetkező szerkezeti változások.

##### 5. 3. 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.

## 6. FTIR SPEKTROSKÓPIA

A fibrillumok másodlagos szerkezetének meghatározására Fourier transzformációs infravörös (FTIR) spektroszkópiát használtunk (Bruker Vertex80v FTIR spektrométer). A puffer-oldatban összeállt A $\beta$ 25-35 fibrillumokat SpeedVac vákuum-centrifugán oldószermentesítettük koncentrációnövelés céljából. A víz elpárolgása után a mintát 4  $\mu$ l nehézvízben (D<sub>2</sub>O) oldottuk fel. A mért FTIR spektrumok felbontása 2 cm<sup>-1</sup> volt (hullámszám). A jel/zaj viszonyt 256 spektrum átlagolásával javítottuk. A spektrumok kiértékeléséhez ProteIR szoftvert használtunk.

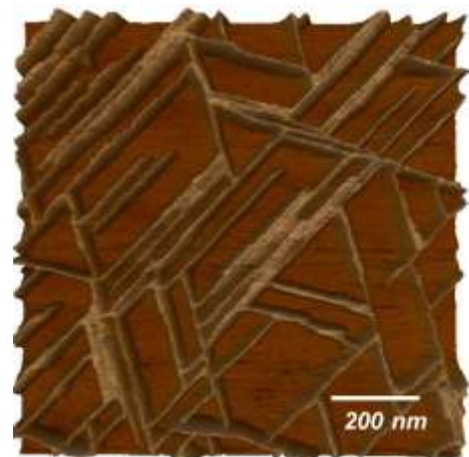
### Eredmények

#### 1. CSILLÁMFELSZÍNEEN ORIENTÁLT AMILOID $\beta$ 25-35 MODELL-RENDSZER JELLEMZÉSE

A csillámfelületen növesztett orientált A $\beta$ 25-35 hálózat morfológiai és nanomechanikai jellemzése azért is fontos, mert reprodukálhatósága, paramétereinek homogenitása miatt a későbbiekben kísérleti modell-rendszerként használjuk.

##### 1. 1. MORFOLÓGIAI VIZSGÁLAT

Kísérleteinkben AFM segítségével vizsgáltuk szintetikus A $\beta$ 25-35 peptidekből növesztett fibrillumok **morfológiáját**. A csillámfelületre adszorbeált fibrillumok a felületen szabályos trigonális elrendezésben orientálódtak (**1. ábra**), a fibrillumok közti szög egyenként 60° volt. A csillám negatív töltésű hasítási felületére a peptidet annak pozitívan töltött Lys28 csoportjának  $\epsilon$ -amino csoportja elektrosztatikus kölcsönhatással lehorgonyozta. Az orientált A $\beta$ 25-35

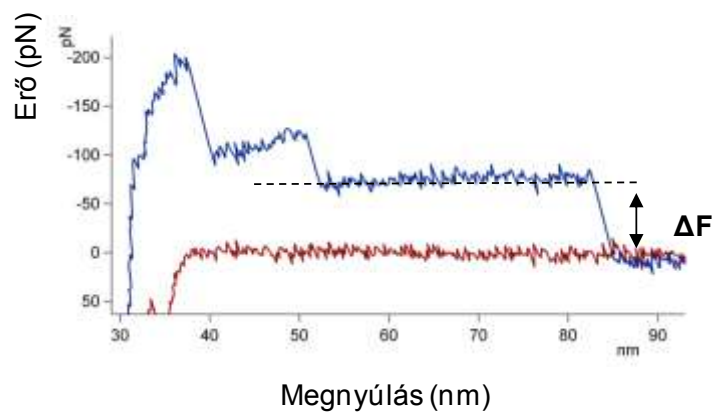


**1. Ábra.** Csillámfelületre adszorbeált A $\beta$ 25-35 fibrillumok jellegzetes trigonális elrendezésben.

fibrillumok létrejötte csillámfelületen-vezérelt epitaxiális növekedés eredménye volt. A peptidek rendkívül gyors kinetikával, másodpercek - percek alatt felépítették az orientált hálózatot. A fibrillumok magassága multimodális eloszlást mutatott, az egyes fibrillumok magassága 0,8 - 4 nm között változott. A fibrillumok nem mutattak felszíni egyenetlenséget.

## 1. 2. ERŐSPEKTROSKÓPIA

Az **erőspektroszkópia** a fibrillumok belső dinamikájába és szerveződésébe enged betekintést. Az eddig vizsgált A $\beta$  fibrillumokhoz hasonlóan a méréseinkben szereplő epitaxiálisan nőtt A $\beta$ 25-35 fibrillumokra is jellemző az erőplatók megjelenése (**2. ábra**). A mechanikai manipulációnak kitett A $\beta$ 25-35 fibrillumok erőválasza az összes  $\beta$ -amiloidra nézve karakterisztikus, és a  $\beta$ -lemezes szerkezettel magyarázható meg.

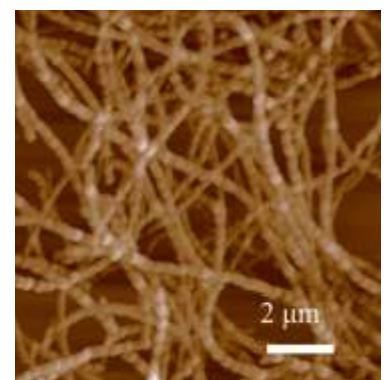


**2. Ábra.** Tipikus erő-megnyúlás görbe.

## 2. OLDATBAN ÖSSZEÁLLT VALAMINT EPITAXIÁLISAN NÖVESZTETT AMILOID FIBRILLUMOK ÖSSZEHASONLÍTÓ VIZSGÁLATA

### 2. 1. MORFOLÓGIA

Bár mindkét fibrillum-típus azonos monomerekből épült fel, a két különböző úton összeállt fibrillum felszíni topográfiája jelentősen különbözött egymástól. Az epitaxiálisan növesztett fibrillumok szabályos trigonális elrendeződésével ellentétben, az oldatban összeállt több napos fibrillumok szabálytalanul, rendszertelenül tapadtak ki a csillámra. (**3. ábra**), a fibrillumok felszínén periodikus kiemelkedések figyelhetők meg. Az



**3. Ábra.** Oldatban növesztett A $\beta$ 25-35 minta

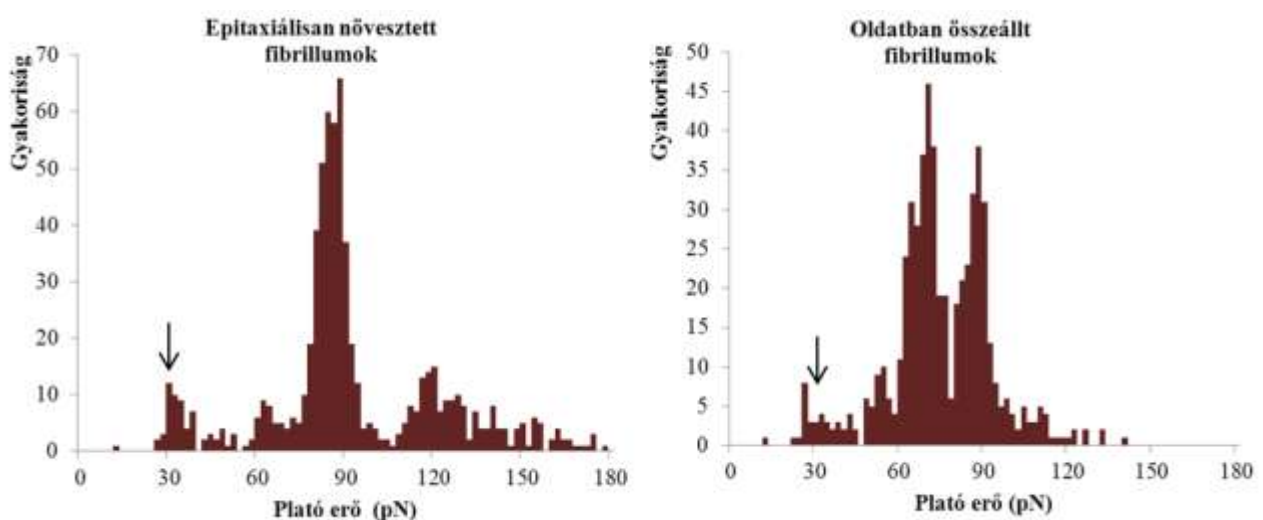


epitaxiálisan orientált fibrillumokkal ellentétben az oldatban összeállt fibrillumok atomerő-mikroszkópos felvételeinken nagyfokú polimorfizmust mutattak: egyazon mintán belül egyaránt láthatóak lapszerű, egyenes lefutású fibrillumok valamint helikális, csavarodott fibrillumok.

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.

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.

## 2. 2. ERŐSPEKTROSZKÓPIA



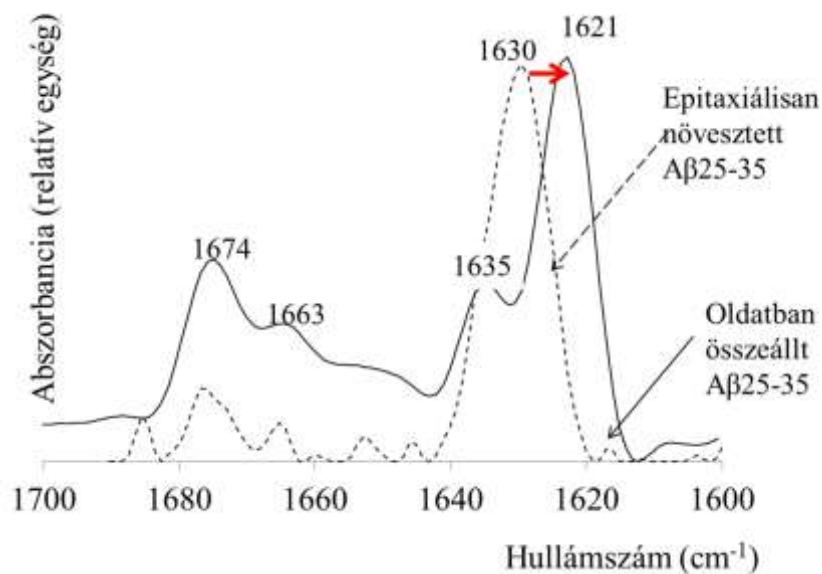
**4. ábra** A plató erő eloszlása epitaxiálisan növesztett és oldatban összeállt A $\beta$ 25-35 fibrillumok esetén. A nyilak az elemi plató erőt jelzik.

A fibrillumok nanomechanikai vizsgálatából kiderült, hogy az erőválaszok alakja hasonló volt az epitaxiálisan növesztett és az oldatban összeállt A $\beta$ 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 (**4. ábra**). A platóerőmagasság-eloszlásokban diszkrét maximumok figyelhetőek 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.

### 2. 3. MÁSODLAGOS SZERKEZET VIZSGÁLATA

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,  $1600\text{ cm}^{-1}$  és  $1700\text{ cm}^{-1}$  közötti hullámszám-tartomány a legérzékenyebb. Az amid I rezgés energiájának nagy része (83%) a C=O nyújtási módusból származik.



**5 Ábra.** Epitaxiálisan növesztett illetve oldatban összeállt Aβ25-35 fibrillumok FTIR spektruma.

A FTIR spektrumok alapján mindkét típusú fibrillum β-lemezes másodlagos szerkezettel rendelkezik. A spektrális csúcsok eltolódása fontos információt közvetíthet arról a molekuláris szerkezetről, amelyhez a spektrumvonal rendelhető. Az amid I sávban  $1630\text{ cm}^{-1}$  felől  $1621\text{ cm}^{-1}$  felé történő eltolódás arra utal, hogy az oldatban összeálló amiloid sokkal kompaktabb szerkezettel rendelkezik (**5. ábra**).

### 3. AZ LPFFD BÉTA-LEMEZ ROMBOLO PEPTID HATÁSA ORIENTÁLT A $\beta$ 25-35 HÁLÓZATRA

A BSB peptidek közül az LPFFD peptidet választottuk, kísérleteinkben a peptidnek az A $\beta$ 25-35 hálózat képződésére, morfológiájára és nanomechanikai tulajdonságaira kifejtett hatását vizsgáltuk atomerő-mikroszkóppal. A fibrillumok mechanikai stabilitását erőspektroszkópiával határoztuk meg.

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

Az LPFFD peptiddel kezelt minták esetében is orientált hálózatot kaptunk. Megmértük az orientált fibrillumok szögeloszlását és összehasonlítottuk a kontroll hálózat szögeloszlásával. Az LPFFD jelenlétében képződött hálózat orientációs szögeinek eloszlása a kontrolléhoz hasonlóan bizonyult. A fibrillumok átlagos magasságában sem volt jelentős különbség, az átlagos fibrillum magasság 2,41 nm ( $\pm 0,09$  nm SEM,  $n=513$ ) volt a kontroll esetében és 2,64 nm ( $\pm 0,14$  nm SEM,  $n = 60$ ) az LPFFD-kezelt hálózatnál.

Az LPFFD peptidnek A $\beta$ 25-35 fibrillumok növekedési kinetikájára kifejtett hatását időtől függő (*time lapse in situ AFM*) kísérletek segítségével vizsgáltuk. Egyedi fibrillumok hossznövekedését követtük az idő függvényében. A hosszakat idő függvényében ábrázolva, a kapott görbékre illesztett egyenesekből megkaptuk a fibrillumok átlagos növekedési sebességét. Az átlagos fibrillum növekedési sebesség 0,1 nm/s illetve 0,08 nm/s volt a kontroll illetve LPFFD-kezelt minták esetében. A BSB peptid tehát a fibrillumok növekedésére nem volt szignifikáns hatással.

#### 3. 2. AZ LPFFD HATÁSA A $\beta$ 25-35 FIBRILLUMOK SZÉTESÉSÉRE

Az LPFFD peptid fibrillum-szétszedő hatását egy előzőleg létrehozott, „érett” A $\beta$ 25-35 hálózaton vizsgáltuk. Igaz ugyan, hogy az LPFFD hozzáadásával 10 %-os csökkenést tapasztaltunk a felszíni befedettségben, de ugyanekkora csökkenést idézett elő a szimpla felszínle mosás is PBS pufferrel. A felszíni befedettség változása tehát nem az LPFFD fellazító hatásának tulajdonítható, hanem a mosás okozta mechanikai hatásnak.

### 3. 3. AZ LPFFD HATÁSA A $\beta$ 25-35 FIBRILLUMOK NANOMECHANIKAI TULAJDONSÁGÁRA

Az LPFFD peptid A $\beta$ 25-35 fibrillumok mechanikai stabilitására gyakorolt hatását a fibrillumok ezen peptid jelenlétében történő mechanikai manipulációja során vizsgáltuk.

LPFFD jelenlétében felvett erőgörbék globális megjelenése (alakja) hasonló volt a kontroll minta erőgörbéihez, de csökkent az erő-lépcsők száma és megnőtt a platóhossz. Az átlagos plató erő lecsökkent az LPFFD jelenlétében, ez feltehetően arra utal, hogy a béta-lemez-romboló peptid a protofilamentumok közötti kölcsönhatásokat gyengíti.

### 4. N27C MUTÁNS A $\beta$ 25-35 PEPTID EPITAXIÁLISAN ORIENTÁLT HÁLÓZATÁNAK JELLEMZÉSE

A csillámfelületen létrejövő orientált A $\beta$ 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 $\beta$ 25-35 egy módosított változatát oly módon, hogy a 27. pozícióban elhelyezkedő aszparagin aminosavat egy ciszteinre cseréltük. Az így létrehozott A $\beta$ 25-35\_N27C peptidek szabad SH csoportja reakcióképessége révén a peptidekből képződő fibrillumokat kémiai jelölhetővé teszi. A megfelelő keresztkötők alkalmazásával ugyanis elvileg bármilyen fehérje hozzákapszolható a hálózat szabad -SH csoportjaihoz, melyek a csillámfelületen nanométeres sűrűség mellett alakíthatók ki. Az így létrehozott nano-array lehetőségeinek tesztelése intenzív kutatás tárgyát képezi jelenleg is munkacsoportunkban.

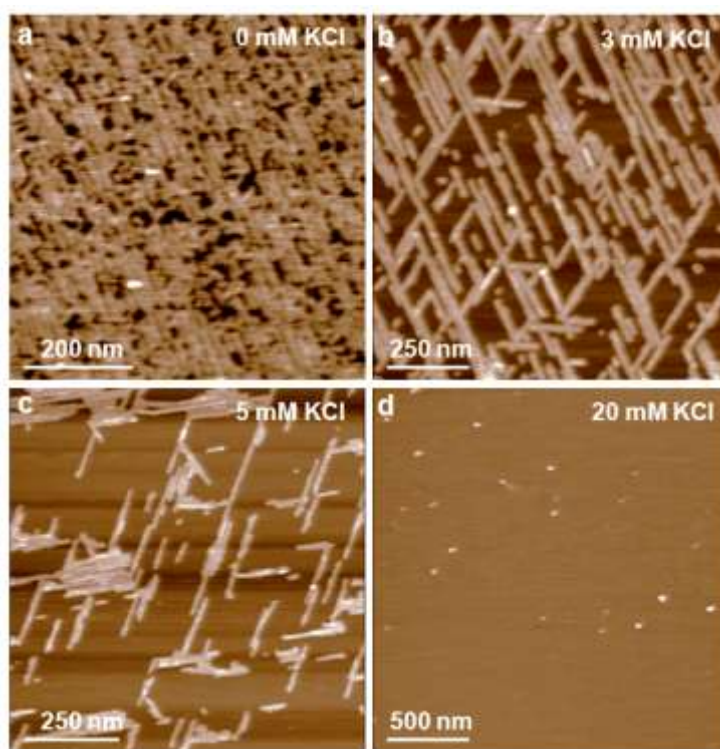
A csillámfelületen epitaxiális növesztéssel létrejött A $\beta$ 25-35\_N27C fibrillumok a vad típusú A $\beta$ 25-35 fibrillumokhoz nagyon hasonlóan viselkedtek, ezt az alábbi kísérletek bizonyítják.

#### 4. 1. A FIBRILLUMOK ORIENTÁCIÓJA CSILLÁMFELSZÍNEN

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 fibrillumok átlagos magassága 0,8 – 1 nm volt, ez az érték nagy valószínűséggel egyetlen, A $\beta$ 25-35\_N27C peptidekből létrejött  $\beta$ -lemez vastagságának felel meg

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

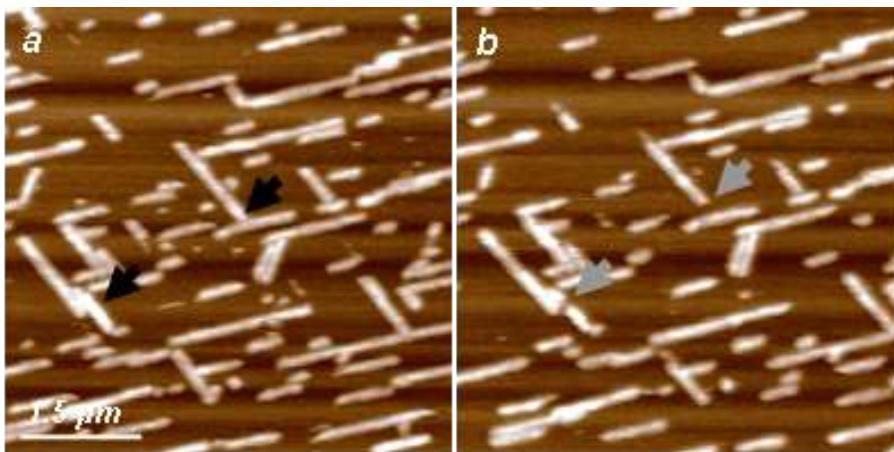
Az A $\beta$ 25-35\_N27C peptidek csillámhoz kötődése kation-koncentráció függőnek bizonyult. Kísérleteinkben kétféle ionnak: a NaCl illetve a KCl jelenlétének hatását vizsgáltuk. NaCl hatásának vizsgálata során kiderült, hogy 140 mM feletti NaCl koncentráció csökkentette a kötődést, 200 mM NaCl jelenlétében pedig csak néhány rövid fibrillumot és oligomereket figyeltünk meg a csillámfelületen. A KCl jelenléte már alacsonyabb koncentrációnál is képes volt befolyásolni a fibrillum-képződést: 3 mM KCl bizonyos fokú gátló hatást fejtett ki, és 20 mM KCl jelenléte teljesen meggátolta a peptidek csillámhoz kötődését (**6. ábra**). Ezen eredményekkel ellentétben, a vad típusú peptidből létrejött fibrillumok kevésbé voltak érzékenyek a NaCl-koncentrációra, és akár 640 mM NaCl jelenlétében is képesek voltak hálózatot kialakítani a csillámfelületen. Az N27C mutáció nem módosította ugyan a fibrillumok orientációját, de a csillámfelülettel való kölcsönhatást gyengítette.



**6. ábra.** A $\beta$ 25-35\_N26C fibrillumok  $K^+$ -függő kötődése, AFM-felvételek

#### 4. 3. A FIBRILLUMOK NANOMECHANIKAI VIZSGÁLATA

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 felszínt újból végigpásztáztuk, hogy a mechanikai manipuláció hatását megvizsgálhassuk. A fent leírt módszert „*in situ*” nanomechanikai manipulációnak is nevezik. Az eredmények a **7. ábrán** láthatók. Az A $\beta$ 25-35\_N27C fibrillumok lokális nanomechanikai manipulációja során rövid fibrillum-részeket távolítottunk el azokon a pontokon, ahol a tűt a fibrillumhoz nyomtuk.



**7. Ábra.** Atomerő-mikroszkópos felvétel a nanomechanikai manipuláció előtt (**a.**) illetve után (**b.**). Fekete nyílhegyek - a manipuláció célpontjai, szürke nyílhegyek a nanomechanikai manipuláció helyén keletkező hézagok.

A fibrillum-részek eltávolításáért valószínűleg 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.

## Következtetések és új eredmények

A béta amiloid peptidek önszerveződő fibrilláris struktúrákat képeznek Alzheimer kórban. Az A $\beta$ 25-35 peptid a teljes hosszúságú A $\beta$  peptid biológiailag aktív, toxikus töredéke.

- I. Epitaxiális mechanizmussal A $\beta$ 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.
- II. Elsőként hasonlítottuk össze a két különböző fibrillogenetikus úton létrejött amiloid fibrillum szerkezetét. A fibrillumok szerkezetét és dinamikáját atomerő-mikroszkóppal, erőspektroszkópiával és FTIR spektroszkópiával tanulmányoztuk.
  1. Az amiloidokra karakterisztikus fibrilláris morfológia mindkét esetben jellemző volt ugyan, de az oldatban összeállt fibrillumok magasabb fokú szerkezeti hierarchiát mutattak, ezek a fibrillumok morfológiai polimorfizmussal rendelkeztek és gyakran helikálisak voltak. Ezzel ellentétben az epitaxiális fibrillumok lineáris, lapszerű szerkezetet hoztak létre.
  2. 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.
  3. A fibrillumok nanomechanikáját mindkét esetben a karakterisztikus erőplatók jellemezték. Az elemi platóerő  $\sim 30$  pN volt.
  4. A FTIR spektrumok alapján mindkét fibrillum béta-lemezes másodlagos szerkezetet mutatott. Az oldatban összeállt fibrillumok kompaktabb szerkezettel rendelkeztek, mint a csillámfelszínen kialakult fibrillumok.
  5. Eredményeink alapján arra következtettünk, a csillámfelszínen kialakuló orientált hálózat jó amiloid fibrillum modellként fogható fel.
- III. Ezen egyszerű, reprodukálható modell-rendszer, lehetővé teszi különböző faktorok amiloid fibrillumokra gyakorolt hatásának vizsgálatát. A szakirodalomban elsőként vizsgáltuk az LPFFD béta-lemez romboló peptidnek az A $\beta$ 25-35 modellrendszer

növekedési kinetikájára, morfológiai és mechanikai tulajdonságaira kifejtett hatását atomerő-mikroszkóppal.

1. Az erőspektroszkópiai méréseink eredménye alapján feltételezhető, hogy az LPFFD peptid fellazítja az amiloid protofilamentumok közötti oldalirányú kölcsönhatásokat.
2. Az általunk használt amiloid-rendszerre az LPFFD peptidnek nem sikerült kifejtenie jelentős béta-lemez-romboló hatást.

IV. Létrehoztunk egy mutáns A $\beta$ 25-35 peptidet, melynek ciszteines szulfhidril csoportja különféle biomolekulákkal illetve nano-arannyal való jelölést tesz lehetővé. A mutáns peptidet tehát számos nano-arrayben felhasználhatjuk, így szükségessé vált e mutáns peptidből létrehozott szabályos hálózatnak a pontos jellemzése. Atomerő-mikroszkópot használva megvizsgáltuk az A $\beta$ 25-35\_N27C orientált hálózat biomolekuláris nanoszerkezetek létrehozására való alkalmasságát.

1. Új eredményünk, hogy a mutáns hálózat a kation- illetve peptid-koncentráció változtatásával finomhangolható.
2. Bebizonyítottuk, hogy a mutáns peptid cisztein csoportja a felszíntől az oldat irányába mutat, így hozzáférhetővé válik kémiai csoportok, jelölő molekulák számára.
3. Bebizonyítottuk, hogy a mutáns A $\beta$ 25-35 hálózat paraméterei, tulajdonságai teljesítették a nano-módszerben történő felhasználás feltételeit.



## Saját publikációk jegyzéke

Összesített impakt faktor: 11.277 IF

### A disszertációhoz kapcsolódó 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  $\beta$  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  $\beta$ 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  $\beta$ 25–35 fibrils on mica, *Nanotechnology.* 2007. 18 345102

### Disszertációtól független közlemény:

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.

## **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 nem 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 tudományoszeretete 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.