

**AMYLOID BÉTA-FIBRILLUMOK MORFOLÓGIAI ÉS
NANOMECHANIKAI VIZSGÁLATA ATOMERŐ-
MIKROSKÓPPAL**

Dr. Karsai Árpád

**Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Biofizikai Intézet**

2008

Mottó

*„Létezésem értelme az, hogy az élet kérdést tett fel
nekem. Vagy fordítva: én magam vagyok a kérdés,
amelyet a világhoz intézek és fel kell mutatnom a
magam válaszát.”*

Carl Gustav Jung

TARTALOMJEGYZÉK

I. Összefoglalás.....	4
II. Köszönetnyilvánítás.....	5
III. Bevezetés.....	6
III.1. Vizsgáló módszerek.....	7
III.2. Az egyes A β -fibrillumok feltételezett szerkezete.....	8
III.3. Egyedi fibrillumok vizsgálata atomerő-mikroszkóppal.....	10
III.4. Peptid alapú nano-vezeték hálózatok.....	12
IV. Célkitűzések.....	14
V. Anyagok és módszerek.....	15
V.1. A kísérletekhez felhasznált A β -peptidek szekvenciái.....	15
V.2. Amyloid fibrillumok növesztése.....	15
V.3. Alkalmazott szubsztrát felszínek.....	16
V.4. Minták kezelése.....	17
V.5. Atomerő-mikroszkópia	17
V.5.1. Az atomerő-mikroszkóp működési elve és sajátosságai.....	17
V.5.2. A képkészítéshez használt rugólapkák.....	20
V.5.3. Atomerő-mikroszkópos képek analízise.....	21
V.6. Erőspektroszkópia.....	21
V.7. Amyloid polimerizáció pásztázó próba kimográfias analízise.....	23
VI. Eredmények és következtetések.....	25
VI.1 A β -fibrillumok morfológiája és belső szerkezeti dinamikája.....	25
VI.1.1 A β -amyloid fibrillumok erőspektroszkópiája.....	25
VI.1.2. A β -amyloid fibrillumok mechanikai ujjlenyomata.....	27
VI.1.3. Reverzibilis jelenségek a fibrillumok belső dinamikájában.....	29
VI.1.4 In situ erőspektroszkópia.....	31
VI.2. A β 1-42 fibrillumok atomerő-mikroszkópos vizsgálata.....	35
VI.2.1 A β 1-42 fibrillumok morfológiája.....	35
VI.2.2. A β 1-42 fibrillumok erőspektroszkópiás vizsgálata.....	39
VI.3. Az A β 25-35_K28Ac fibrillumok mechanikai stabilitásának vizsgálata.....	42
VI.4 A β 25-35 fibrillumok kálium függő orientációja csillámfelületen.....	46
VI.4.1 A β 25-35 fibrillumok morfológiája csillámfelületen.....	46
VI.4.2. A β 25-35 fibrillumok in-situ erőspektroszkópiás vizsgálata.....	48
VI.4.3. Az orientált elrendeződés koncentráció függése.....	50

VI.4.4. Az orientált kötődés kálium függése.....	51
VI.4.5. Az A β 25-35 acetilált variánsainak orientációja csillámfelszínen.....	52
VI.4.6. A β 25-35 fibrillumok növekedése csillámfelszínen.....	54
VI.5.A β -fibrillumok vizsgálata pásztázó próba kimográfiával.....	56
VI.5.1. A β 25-35 fibrillumok nagyfelbontású növekedési dinamikája.....	56
VI.5.2. A β 1-42 fibrillumok növekedési dinamikájának vizsgálata.....	59
VII. Összefoglalás	61
VIII. Perspektívák.....	63
IX. Publikációs lista.....	65
X. Referenciák.....	68

I. ÖSSZEFOGLALÁS

Az amyloid fibrillumok kialakulásának és szerkezetének tanulmányozása mind a mai napig nagy metodikai kihívást jelent. A vízben oldhatatlan aggregátumokat képző amyloid fibrillumokat a hagyományos szerkezet-meghatározó módszerekkel nem, vagy csak nagyon nehezen és korlátozottan lehet vizsgálni.

Ezen a területen folyó kutatásokban ezért is kerültek előtérbe új, modernnek számító technikák, mint amilyen az atomerő-mikroszkóp is.

Kísérleteink során igyekeztünk kiaknázni az atomerő-mikroszkóp nyújtotta lehetőségeket, mely lehetővé teszi, hogy nanométeres felbontású felvételeken vizsgáljuk az amyloid fibrillumok morfológiai sajátosságait, illetve kövessük a fibrillogenezis lépéseit olyan körülmények között, melyek nem változtatják meg a fibrillumok natív szerkezetét. Az elmúlt évtizedben kifejlesztett egyedi molekula manipulációs módszereket sikeresen adaptáltuk egyedi amyloid fibrillumok szerkezeti dinamikájának karakterizálására, illetve a fibrillumokat összetartó erők természetének és a fibrillumok stabilitásának vizsgálatára. Egy a laboratóriumunkban elsőként alkalmazott módszerrel lehetővé vált, hogy egyedi fibrillumok növekedését kövessük nyomon az atomerő-mikroszkópiában szokatlanul nagy, milliszekundumos időfelbontás mellett.

Túl azon, hogy metodikailag újszerű megközelítéssel sikerült újabb információkat megtudnunk az amyloid fibrillumok sajátosságairól, az alkalmazott nanobiotechnológiai módszerekkel betekintést nyertünk egy olyan „világba”, amelynek számos tulajdonsága hagyományos módszerekkel megközelítve rejtve marad.

II. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS:

Szerencsésnek érzem magam, mert az elmúlt évek során nagyszerű kutatókkal dolgozhattam együtt, akik segítségével és barátsága nélkül régen eltévedtem volna a labor csapdás és olykor csalogatóan szofisztikált világában, ugyanúgy, mint a hétköznapi élet útvesztőiben.

Mindenek előtt szeretném köszönetet mondani ifj. Dr. Kellermayer Miklósnak, mentoromnak, támogatásáért, végtelen türelméért, és nagyszerű ötleteiért. Köszönöm Dr. Nyitrai Miklós intézetvezetőnek és Dr. Somogyi Bélának, intézetünk néhai vezetőjének, hogy befogadtak az intézetbe és támogatták munkámat.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Nagy Attilának, Mártonfalvi Zsoltnak és Kolsofszki Mátyásnak a közös munkákban nyújtott segítségükért és bizalmukért. Dr. Pasquale Bianconak az örökké pozitív életségükért. Köszönettel tartozom Dr. Grama Lászlónak, Huber Tamásnak, Szatmári Dávidnak, Dr. Kiss Balázsnak, Konrád Ildikónak és a Biofizikai Intézet dolgozóinak a laborbéli mindennapokban nyújtott segítségükért.

Végezetül szeretnék köszönetet mondani Édesanyának, Édesapámnak, Húgomnak és Nagyapámnak.

S ajánlom mindazt, amit eddig tettem Nagymamám emlékének, aki révén megértettem, hogy a tankönyvek és cikkek sorai sterilek és üresen tárgyilagosak, ha az Alzheimer-kór tüneteiről és végkifejletéről írnak.

III. BEVEZETÉS

Az Alzheimer-kór súlyos neurodegeneratív megbetegedés, melyet Alois Alzheimer írt le 1907-ben. A kórképre jellemző a kognitív és memória funkciók progresszív romlása, neuropszichiátriai és viselkedési zavarok, és a mindennapi életvitel jelentős minőségi leromlása (Cummings, 2004). Az Alzheimer-kór incidenciája az életkor előrehaladtával progresszíven nő. A hetvenöt éven túli korcsoportban előfordulása eléri a 15%-ot. Ha figyelembe vesszük, hogy a fejlett országokra az átlagéletkor fokozatos növekedése, valamint a populáció elöregedése jellemző, érthetővé válik, hogy a kórkép, az érintett betegeken túl, nagy terheket ró a társadalomra is. A helyzetet súlyosbítja az a tény, hogy az elmúlt évtizedek kutatásai ellenére hatásos gyógymód nem áll rendelkezésünkre (Selkoe, 2004a) a már kialakult kórkép gyógyítására, a betegség progressziójának megállítására, vagy a kórkép kialakulásának megelőzésére. Ezen okok miatt egyre nagyobb figyelem irányul az Alzheimer-kór jobb megértésére.

Az Alzheimer-kórban egy transzmembrán fehérje, az amyloid prekursor protein (APP) 39-43 aminosavból álló proteolitikus hasítási termékeiből, az amyloid- β (A β) peptidekből felépülő, oldhatatlan aggregátumok, úgynevezett amyloid plakkok alakulnak ki és rakódnak le a központi idegrendszer extracelluláris térrészeiben (Selkoe, 1997) (Selkoe, 2004b). Az A β -peptidek keletkezése önmagában fiziológiás folyamat, de normál körülmények között a peptidek nem mutatnak aggregációs hajlamot. Alzheimer-kórban, eddig nem tisztázott okok miatt, a peptidek másodlagos szerkezete megváltozik. Ebben a tévesen, avagy kórosan tekeredett (misfolded) állapotban megnő a peptidek aggregációs hajlama, és felszaporodásukkal amyloid plakkokat hoznak létre a központi idegrendszerben (Thirumalai et al., 2003).

Az amyloid plakkok elsősorban a hippocampus és az amygdala területén valamint a frontális, temporális és parietális lebenyben figyelhetők meg. A plakkok megjelenésével párhuzamosan progrediáló idegsejt elhalás is zajlik, mely idővel makroszkóposan is kimutatható agyi atrófiához vezet. Az amyloid plakkok fő komponensei tehát az amyloid β (A β) -fibrillumok, A β -peptidekből felépülő szigorúan rendezett szerkezetű struktúrák, melyeket a plakkok központi részében helyezkednek el, körbevéve disztrófikus dentritekkel és axonokkal, valamint reaktív astrocitákkal és aktivált microglia sejtekkel. Emellett fellép egy markáns, intracellulárisan megjelenő patológiás elváltozás, a neurofibrilláris kötegek megjelenése a neuronok sejttestjeiben, melynek hátterében a tau mikrotubulus kötő fehérje hiperfoszforilációja és aggregációja áll.

Mivel az A β -fibrillumok jelenléte, illetve mennyisége korrelációt mutat a kórkép súlyosságával, élénk figyelem irányul az A β -fibrillumok szerkezetének valamint a fibrillogenezis mechanizmusainak pontosabb megértésére (Golde, 2003). Ugyanakkor jelenleg sem tisztázott teljes mértékben, hogy az abnormális térszerkezetet felvett A β -peptidek aggregációja áll-e elsődlegesen a neuronpusztulás és így az Alzheimer-kór kialakulásának hátterében, vagy egyéb, az A β -fibrillumok és amyloid plakkok megjelenésével párhuzamosan zajló folyamat. Egyre több bizonyíték mutat arra, hogy maguk az amyloid plakkok rezervoárként szolgálnak olyan A β -oligomerek számára, melyek direkt neurotoxikus tulajdonságokkal rendelkeznek (Meyer-Luehmann et al., 2008).

Túl az Alzheimer-kór orvosbiológiai jelentőségén az A β -fibrillumok fizikokémiai- és önszervező tulajdonságai lehetővé teszik, hogy modellként szolgáljanak peptid alapú, önfelépítő struktúrák létrehozásához és vizsgálatához, melyek nanotechnológiai szempontból is értékes, az alapkutatáson túlmutató gyakorlati alkalmazási lehetőségeket rejthetnek magukban.

III.1. VIZSGÁLÓ MÓDSZEREK

Az A β -fibrillumok szerkezetét, belső dinamikáját, kialakulásuk mechanizmusait, nanomechanikai tulajdonságait, illetve celluláris hatásuk mechanizmusát nem ismerjük pontosan.

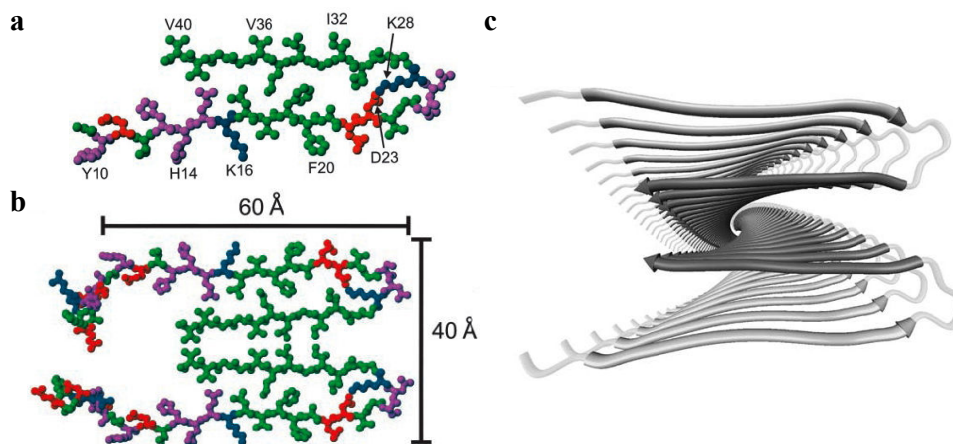
Az első szerkezeti információk röntgendiffrakciós mérésekből származnak (Eanes and Glenner, 1968). A mérések tanúsága szerint az A β -fibrillumokra és egyben minden más típusú amyloidra jellemző egy sajátos diffrakciós mintázat, mely arra utal, hogy a fibrillumok nagy fokban rendezett, β -lemez szerkezetű monomerekből felépülő struktúrák. Morfológiai szempontból elektronmikroszkópos, illetve későbbiekben atomerő-mikroszkópos (AFM) és más pásztázó próba mikroszkópos megfigyelések gazdagították a rendelkezésünkre álló tudást. Lényegében ezen vizsgálómódszerek (Nilsson, 2004), valamint kémiai festési eljárások eredményeiből született meg az amyloid empirikus definíciója, mivel függetlenül a prekursor fehérje szekvenciájától vagy másodlagos szerkezetétől, minden amyloid típus rendelkezik legalább három univerzális tulajdonsággal (Makin and Serpell, 2005). Jelenleg amyloidnak tekinthető az a peptid vagy fehérje asszociátum, mely 1) mutatja a karakterisztikus röntgen diffrakciós mintázatot (később kerül részletesebb tárgyalásra) 2) nem elágazó fibrilláris struktúrákat alkot, 3) pozitív reakciót ad bizonyos festékmolekulákkal, melyek közül a Thioflavin-T (LeVine, 1993) és a Congo-vörös a legfontosabb.

Hagyományos szerkezet-meghatározó módszerekkel nem sikerül közelebb jutni az amyloid fibrillumok pontos szerkezetének megismeréséhez. Ennek oka, hogy a felépülő fibrillumok és belőlük kialakuló aggregátumok vízben oldhatatlanok. Tovább nehezíti a helyzetet az a tény, hogy az A β -peptidek nem kristályosíthatók. Így kerültek előtérbe olyan módszerek, mint a különleges spinjelölők alkalmazása (Török et al., 2002) és szilárdfázisú NMR spektroszkópia (Petkova et al., 2002; Tycko, 2004), melyek segítségével sikerült felállítani az A β 1-40 és A β 1-42 peptidekből felépülő fibrillumok tentatív szerkezeti modelljét.

III.2. AZ EGYES A β -FIBRILLUMOK FELTÉTELEZETT SZERKEZETE

Az Alzheimer-kórban döntően kétféle A β -peptidből képződnek A β -fibrillumok: A β 1-40 és A β 1-42. Bár a két peptid csupán két aminosavban különbözik egymástól, mind szerkezetükben és mind tulajdonságaikban igen eltérő fibrillumokat alakítanak ki (Bitan et al., 2003).

A jelenleg elfogadott modell szerint A β 1-40 fibrillumok esetében β -szál – kanyar – β -szál (más néven β - β -ív (Efimov, 1987)) szerkezetű monomerek sorakoznak a fibrillum hossztengejére merőlegesen és alakítanak ki két β -lemezt. A β - β ív szerkezetet egy a D23 és K28 aminosavak oldalláncai közt kialakuló só-híd stabilizálja (**1. ábra**). Két, helikálisan egymásba csavarodó β -lemez duplex alakít ki egy protofilamentumot (Petkova et al., 2002). Több, a fibrillum hossztengejében egymással párhuzamosan futó protofilamentum alakítja ki az ugyancsak helikális szerkezetű fibrillumot.



1. Ábra. Az A β 1-40 protofilamentum szerkezeti modellje. **a.** A β 1-40 peptid protofilamentumon belüli szerkezetének modellje (zöld: hidrofób oldallánc, piros: savas oldallánc, lila: bázikus oldallánc, kék: hidrofil oldallánc). Nyilak jelölik a peptid szerkezetét stabilizáló só-hidat. **b.** A β 1-40 peptidok által kialakított duplex szerkezeti modellje **c.** A helikális szerkezetű protofilamentum modellje.

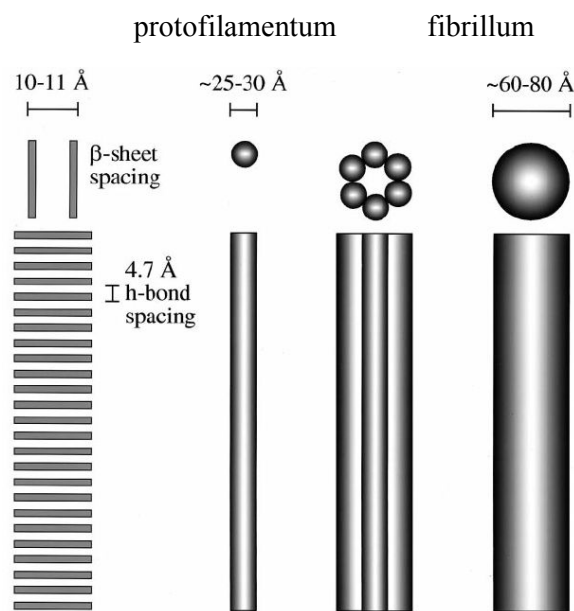
Egy a közelmúltban A β 1-42-es fibrillumokról megjelent munka szerint a β - β -ívet intermolekuláris és nem intramolekuláris kölcsönhatások stabilizálják. Ebben a modellben egyetlen β -lemez duplex alakít ki egy protofilamentumot. Az A β -protofilamentumok egymással párhuzamosan rendeződve építik fel a 4-8 nm vastag helikális A β 1-42 fibrillumot (Luhrs et al., 2005).

A teljes hosszúságú A β -peptidek vizsgálatában használt modell peptidek között az A β 25-35 egy érdekes tulajdonságokkal rendelkező, tizenegy aminosav hosszú fragmentum. A vizsgálatok tanúsága szerint az A β 25-35 reprezentálja a természetben előforduló A β -peptidek biológiailag aktív szakaszát. Fibrillum képződése in vitro körülmények között hasonlóan gyors kinetikával zajlik, mint az A β 1-42 esetében, továbbá neurotoxikus tulajdonságai is hasonlóak (Pike et al., 1995). Ugyanakkor ennek a peptid variánsnak a szerkezetéről relatíve kevés információ áll rendelkezésünkre. A jelenlegi modellek szerint az A β 25-35 nem alakít ki β -szál – kanyar – β -szál szerkezetet, hanem a β -lemez szerkezettel rendelkező peptidek a fibrillumok hossz tengelyére merőlegesen, parallel vagy anti-parallel sorakoznak (Ippel et al., 2002).

Az amyloid fibrillogenezis folyamatában elsőként globuláris aggregátumok jelennek meg (Mastrangelo et al., 2006), melyek valószínűleg fúzió révén olvadnak össze fibrilláris szerkezetekké (Rochet et al., 2000). A morfológiai felosztásban megjelenésük idejét tekintve a globuláris aggregátumokat követő struktúrák a protofibrillumok. Ezek erősen meghajlított, dudoros szerkezetű, ~200 nm hosszú és ~6-8 nm átmérőjű fibrilláris prekurzorok, a fibrillumok közvetlen, azoktól eltérő szerkezetű előalakjai (Walsh et al., 1997). A protofibrillumok feltehetően szerkezeti változáson mennek át miközben kialakul az érett amyloid fibrillum.

Az érett fibrillumokra általánosan igaz, hogy rendezett szerkezetű, egyenes lefutású vagy helikális, el nem ágazódó struktúrák. Jellemző rájuk, hogy röntgen diffrakciós mintázatukon egy a fibrillum hossz tengelyére merőleges 4,7 Å valamint a hossz tengellyel párhuzamos 10,7 Å ismétlődést reprezentáló reflexió figyelhető meg. A 4,7 Å távolság megfelel az egyes β -lemez konformációjú monomerek közötti hidrogén hid távolságnak, míg a 10,7Å megfelel a fibrillum hossz tengelyére merőlegesen elhelyezkedő β -lemezek oldalláncai közötti távolsággal (Kirschner et al., 1987; Makin and Serpell, 2005).

A hidrogén hidakkal összekapcsolódó β -peptidek alakítják ki a fibrillumok hossz tengelyében futó protofilamentumokat (**2.ábra**), melyeket ma a fibrillumok szerkezeti alapegységeinek tekintünk.



2. *Ábra* Az Aβ-fibrillumok szerkezetére jellemző a hierarchikus szerveződés.

A β-amyloid fibrillum típusától függően lehetnek eltérések abban, hogy egy (Aβ1-42) vagy két (Aβ1-40) β-lemez alakít ki egy protofilamentumot, továbbá egy fibrillumot változó számú, 2-6 protofilamentum építhet fel (Serpell, 2000).

III.3. EGYEDI FIBRILLUMOK VIZSGÁLATA ATOMERŐ-MIKROSZKÓPPAL

Az amyloid fibrillumok morfológiájának tanulmányozásában az AFM egy, egyre szélesebb körben használt, igen informatív vizsgálóeljárás (Gosal et al., 2006). A mikroszkóp egy flexibilis rugólapon elhelyezkedő nanométeres végátmérőjű tűvel pásztázza le a mintát, topografikus, háromdimenziós, azaz magasság információt is tartalmazó képeket hozva létre.

Legfőbb előnye más mikroszkópos technikákkal szemben, hogy alkalmas biológiai minták natív szerkezetének vizsgálatára, fizioiógias vagy fizioiógias körülményeket modellező kondíciók közt. Tehát, szemben a hagyományos elektronmikroszkópos technikákkal, az AFM esetében a minta előkészítése során nincs szükség kontrasztfokozó eljárásokra, illetve a minták fixálására, így a műtermékek kialakulásának lehetősége minimalizálható. Továbbá az AFM elvileg szubnanométeres, tipikus esetben 1-5 nanométeres részletek elkülönítésére ad lehetőséget, mely lehetővé teszi, hogy az amyloid minták a fibrillogenezis bármely stádiumában vizsgálhatók legyenek. Tehát vizsgálhatók a néhány nanométeres peptidek és oligomerek, a fibrillogenezis korai stádiumában kialakuló protofibrillumok, továbbá a mikronos hosszúságot is elérő érett fibrillumok és a belőlük kialakuló aggregátumok.

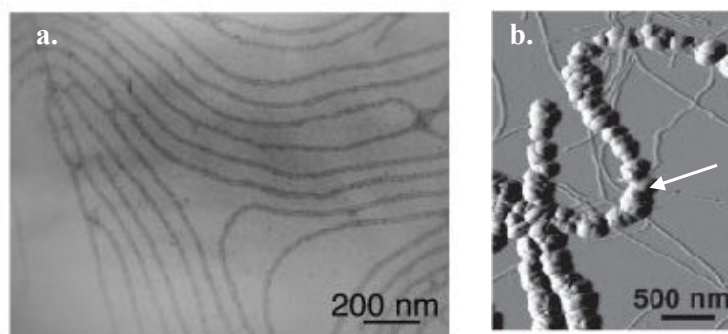
Lehetőség van arra, hogy egymást követő pásztázások sorozatát elkészítve, az idő függvényében kövessük nyomon a mintában végbemenő morfológiai változásokat. Bár az AFM időbeli felbontása messze elmarad a fénymikroszkópos technikáktól, az átlagosan 2-4 perc alatt rögzített felvételekből összeállított képek sorozatai így is bepillantást engednek a fibrillum formálódás folyamatába, lehetővé téve a morfológiai változások időbeli követését akár egyetlen amyloid fibrillum esetében is. Így olyan jelenségek is megfigyelhetők, melyek molekulásokokon végzett kísérletek esetében kiátlagolódnának.

Túl a morfológiai vizsgálatokon az AFM lehetőséget nyújt arra, hogy egyedi fibrillumokon elvégzett erőspektroszkópiás méréseken keresztül betekintést nyerhessünk az A β -fibrillumok belső szerkezeti felépítésébe. Vizsgálhatóvá válnak a fibrillumokat összetartó kölcsönhatások és azok dinamikája is.

III.4. PEPTID ALAPÚ NANO-VEZETÉK HÁLÓZATOK

Az amyloid peptidek kedvező fizikai-kémiai tulajdonságai (Knowles et al., 2007) elméletileg lehetővé teszik, hogy építőegységei lehessenek nano-léptékű önszerveződő rendszereknek és szerkezeteknek.

Számos eredmény bizonyítja az amyloid alapú nano-skálájú struktúrák relevanciáját és elvi működőképességét (Gazit, 2007; Reches and Gazit, 2003). Élesztő sejtekben expresszálandó Sup35 fehérje N-terminális és középső, úgynevezett NM régiójának genetikai módosításával sikerült létrehozni olyan amyloid fibrillumokat, melyek egy cisztein SH csoportján keresztül képesek kolloidális arany partikulumok megkötésére és így több mikrométer hosszú és 50nm vastag (**3.ábra**), vezetőképessé tett nanohuzalok kialakítására (Scheibel et al., 2003), bizonyítva, hogy a célzott módosításokkal új tulajdonságokkal ruházhatók fel amyloid képzésre alkalmas fehérjék, anélkül, hogy alapvető tulajdonságaikat elveszítenék.



3. Ábra Véletlen elrendezésű nanohálózat **a.)** Sup35 fehérje NM régiójából létrehozott amyloid fibrillumok felszínre adszorbeált véletlenszerű hálózata. **b.)** kolloidális arannyal és ezüstözéssel vezetőképessé tett Sup35 amyloid fibrillumok (nyíl) valamint jelöletlen fibrillumok (Scheibel et al., 2003).

A rendezett, megjósolható szerkezetű, valamint szabályozható hálózatok létrehozása kulcsfontosságú a célzott alkalmazhatóság szempontjából. Az egyik legnagyobb nehézséget és egyben a legnagyobb kihívást a fibrillumok felépülésének, valamint a kialakuló hálózat paramétereinek kontrollálhatósága jelenti. Ilyen paraméterek például a vezetékek közti átlagos távolság, a vezetékek átlagos hossza, és a kapcsolódási pontok sűrűsége. A problémát fokozza, hogy egy stabil hálózat kialakításához a fibrillumokat egy megfelelő felszínre kell adszorbeálni, vagy a felszínhez kötötten kell növeszteni. A nanohálózatok kontrollálható kialakítására lehet egy megoldás, ha a hálózatot egy olyan szabályos szerkezetű felszínen hozzuk létre, mely specifikus interakciókon keresztül képes adott irányba orientálni az amyloid fibrillumokat vagy más típusú önszerveződő molekulákat. Erre példa a rendezett

grafit (highly ordered pyrolytic graphite, HOPG) felszínén hexagonálisan növekvő A β 1-42 peptidek által létrehozott 1 nm magas fibrilláris struktúrák (Kowalewski and Holtzman, 1999), illetve csillámfelszínen szintén hexagonális elrendezésben kötődő α -synuclein fibrillumok (Hoyer et al., 2004). Továbbá, a vázolt nehézségek megoldásához feltehetően mesterséges, módosított kémiai szerkezetű, vagy szerkezeti homológiát nem mutató amyloid szerű peptidek vizsgálatára (Del Mercato et al., 2007), illetve a hálózatok kialakítása szempontjából releváns felszínek tulajdonságainak tanulmányozásán át vezet az út. Elképzelhető, hogy a nanométeres skálájú önfelépítő rendszerek esetében a fent vázolt nehézségek a rendszer alaptulajdonságaiból fakadnak, így teljes mértékben nem kiküszöbölhetőek. Feltehetően alapvetően új gondolkodásmódra van szükség ahhoz, hogy képesek legyünk kiaknázni az önfelépítő struktúrák kínálta lehetőségeket.

Összefoglalva elmondható, hogy bár ismeretanyagunk dinamikusan bővül a kutatásoknak köszönhetően, az A β -fibrillumok szerkezeti dinamikája, a fibrillogenezis háttérében álló mechanizmusok, valamint a fibrillumok magasabb rendű szerkezete és nanotechnológiai felhasználhatóságuk mikéntje továbbra is megismerésre vár.

IV. CÉLKITŰZÉSEK

Kísérleteink során az A β -fibrillumok szerkezeti dinamikáját, mechanikai stabilitását valamint a fibrillogenezis folyamatát terveztük tanulmányozni nanobiotechnológiai módszerekkel.

1. Munkánk során első lépésben szintetikus úton előállított különböző A β -peptidekből (A β 1-42, A β 1-40, A β 25-35, A β 25-35_K28Ac, A β 25-35_G25Ac) kívántunk A β -fibrillumokat előállítani, azokról nagy felbontású felvételeket készíteni atomerő-mikroszkóp segítségével, morfológiai vizsgálatok céljából.
2. Egyedi molekula manipulációs technikákkal, AFM segítségével, in-situ erőspektroszkópiás méréseken keresztül tanulmányozni kívántuk az egyes A β -fibrillum variánsok szerkezeti dinamikáját, mechanikai stabilitását azért, hogy megismerjük és jellemezzük a fibrillumokat hierarchikusan felépítő és stabilizáló kölcsönhatások természetét és a mechanikai denaturációnak kitett fibrilláris alegységek (protofilamentumok) viselkedését.
3. Vizsgálni kívántuk A β 25-35, illetve különböző helyeken acetilált peptidből felépülő A β 25-35 fibrillumok mechanikai stabilitását és csillámfelszínen mutatott káliumfüggő, trigonális orientációját.
4. Pásztázó próba kimográfiával az A β 25-35 és A β 1-42 fibrillumok polimerizációjának követésével kívántuk vizsgálni egyedi fibrillumok növekedési dinamikáját csillám és grafit felszínen.

V. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

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

Az egyes peptidek szilárd fázisú szintézissel kerültek előállításra a MTA-SZTE Szupramolekuláris és Nanoszerkezetű Anyagok Kutatócsoport valamint a SZTE ÁOK Orvosi Vegytani Intézet segítségével (Zarandi et al., 2007). Tisztaságuk elérte a 99%-ot.

A β 1-42

¹*DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA⁴²-amid*

A β 1-40

¹*DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGV⁴⁰-amid*

A β 25-35

²⁵*GSNKGAIIGLM³⁵-amid*

A β 25-35_K28Ac (Lys28 ϵ -aminocsoportján acetilált variáns)

²⁵*GSN^{K28}GAIIGLM³⁵-amid*
Ac

A β 25-35_G25Ac (Gly25 N-terminális aminocsoportján acetilált variáns)

Ac-²⁵GSNKGAIIGLM³⁵-amid

V.2. AMYLOID FIBRILLUMOK NÖVESZTÉSE

A liofilizált A β 25-35, A β 1-40 és A β 1-42 peptidek 10mM PBS pufferben kerültek feloldásra (10 mM K₂HPO₄-KH₂PO₄, pH 7,4, 140 mM NaCl, 0,02% NaN₃) 0,5 mg/ml koncentrációban. A növesztés szobahőmérsékleten történt, a fibrillum típus tulajdonságaitól függően 1-7 napig. Az így előállított mintákat típusosan erőspektroszkópiás mérésekhez használtuk.

A β 25-35, A β 25-35_K28Ac és A β 25-35_G25Ac minták esetében első lépésben DMSO-ban oldottuk fel a peptideket. A DMSO oldatot 10mM PBS pufferben hígítottuk tovább (10 mM Na₂HPO₄-NaH₂PO₄, pH 7,4, 140 mM NaCl, 0,02% NaN₃) úgy, hogy a végső peptid koncentráció $\geq 0,5$ mg/ml, és a DMSO koncentrációja $\leq 1,0$ % (v/v) legyen.

Polimerizációs góctól mentes (magmentes) minták előállítása érdekében az A β 25-35, A β 25-35_K28Ac és A β 25-35_G25Ac 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). A felülúszót, mely csupán peptideket és kisméretű oligomereket tartalmazhat, folyékony nitrogénben gyorsan lefagyasztottuk, majd a mintákat felhasználásig -80C°-on tároltuk. Az így előállított mintákat típusosan a csillámfelületen végzett mérésekhez használtuk.

A β 1-42 fibrillumok pásztázó próba kimográfias vizsgálatához a liofilizált peptid mintát 1,1,1,6,6,6-hexafluoro-propanolban (HFIP) oldottuk fel, majd az így kapott oldatot 10 mM Na-citrát pufferben (pH 5,0) hígítottuk tovább úgy, hogy a végső hígítás elérésekor a HFIP koncentrációja $\leq 1,0$ % (v/v) legyen. Az oldódás elősegítése érdekében a mintákat erőteljes szonikálásnak vetettük alá.

A minták peptid koncentrációját az amyloid peptidekre szenzitív, nagy érzékenységgű teszttel határoztuk meg (Bicinchoninic acid assay, SIGMA) (Smith et al., 1985).

V.3. ALKALMAZOTT SZUBSZTRÁT FELÜLETEK

AFM-es képalkotáshoz a tárgylemezeket 96%-os alkoholba, majd 99%-os acetomba merítve szonikáltuk 20-20 percig. Az egyes tisztítási fázisok között és a tisztítás végén ultra-tiszta (MilliQ) vízzel mostuk le, majd tiszta nitrogén gázzal szárítottuk őket. Felhasználásig a tárgylemezeket pormentes helyen tároltuk.

Erőspektroszkópiás mérésekhez 3-glycidiloxypopyl-trimethoxysilane (GOPS) (Fluka) keresztkötővel bevont üvegfelületet alkalmaztunk. A GOPS alkalikus körülmények között kovalens kötést képes kialakítani aminocsoportokkal. Ehhez a már megtisztított üveglemezeket 2 %-os (v/v) GOPS-t tartalmazó toluol oldat gőzében inkubáltuk 16 órán át. Az inkubáció végén az üveglemezeket ultra-tiszta (MilliQ) vízzel mostuk le, majd tiszta nitrogén gázzal szárítottuk. Az így elkészített üveglemezek por- és páramentes helyen hetekig tárolhatók a felhasználás előtt.

Pásztázó próba kimográfias vizsgálatához frissen hasított csillámfelület (V2 grade, #52-6, Ted Pella, Inc., Redding, CA, USA), illetve nagymértékben rendezett szerkezetű grafit (highly oriented pyrolytic graphite, HOPG) felületet használtunk.

V.4. MINTÁK KEZELÉSE

A mintákat megfelelően előkészített felszínre vittük fel. A fibrillum és a felszín típusától függő inkubációs idő (GOPS aktivált felszín: 30 perc, csillámfelszín 1-10 perc) után pufferral történő mosással eltávolítottuk a nem vagy gyengén kötődött fibrillumokat. A szárított preparátumok esetében ultratiszta vízzel (MilliQ) történő lemosást, majd tiszta N₂ gázzal történő szárítást alkalmaztunk.

A csillám illetve HOPG felszíneken végbemenő polimerizációt vizsgáló mérések esetében a minta felcseppentése után azonnal megkezdjük a képalkotást, illetve a pásztázó próba kimográfias vizsgálatokat.

A biológia minták sérülékenysége miatt a képalkotásra oszcillációs üzemmódot alkalmaztunk. Ezzel az eljárással minimalizálhatók a tű és a minta közti kontaktus során fellépő, a pásztázás irányába mutató oldalirányú erők (lateral force), melyek nem csak a képalkotást zavarják, de minta morfológiáját is megváltoztathatják.

Pásztázás során, különös tekintettel a natív szerkezetű mintákra, olyan beállításokat választottunk, melyek minimalizálták a minta és a rugólapka közti interakciókat.

V.5. ATOMERŐ-MIKROSKÓPIA

A képalkotáshoz egy Molecular Force Probe 3D (MFP3D) mikroszkópot használtunk (Asylum Research, Santa Barbara, CA, USA). A pásztázást oszcillációs üzemmódban végeztük szárított mintákon, illetve fiziológiás körülményeket modellező kondíciók mellett, natív szerkezetű mintákon, puffereben.

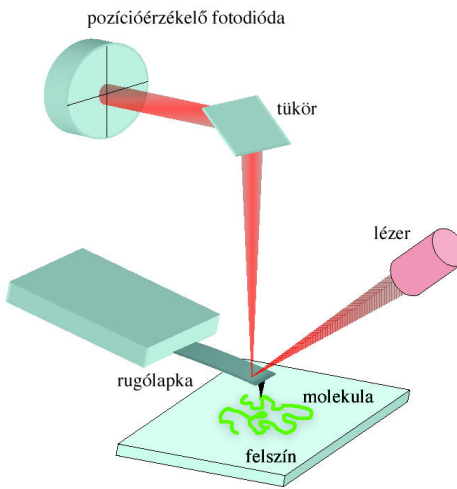
V.5.1. AZ ATOMERŐ-MIKROSKÓP MŰKÖDÉSI ELVE ÉS SAJÁTOSÁGAI

Az atomerő-mikroszkópia (AFM) a pásztázó tűszondás mikroszkópiák csoportjába tartozó, nem diffrakció-limitált képalkotó eljárás, mely lehetővé teszi, hogy a mintákról nanométeres felbontású, topografikus, tehát magasság információt is tartalmazó, háromdimenziós képeket alkossunk.

A pásztázás egy flexibilis rugólap végén elhelyezkedő, nanométeres végátmérőjű tűvel történik, mellyel a műszer pontról pontra „végigtapogatja” a mintát. (**4. ábra**), A rugólapka tője a képalkotás során kontaktusba kerül a mintával. A mintán belüli magasságkülönbségek hatására a tű és a felszín közötti kontaktus erőssége folyamatosan változik. Ez a rugólap meghajlásának (kontakt üzemmódban) vagy az oszcilláció amplitúdójának (oszcillációs üzemmódban) változását eredményezi.

A rugólapka meghajlásának illetve oszcillációjának változásait a műszer egy a rugólap hátára fókuszált lézernyaláb segítségével követi és detektálja. A lézer egy pozícióérzékelő

fotódiódába vetül. A lézernyaláb helyzetének változása a pozícióérzékelő fotódiódán arányos a rugólapka viselkedésében fellépő változásokkal.

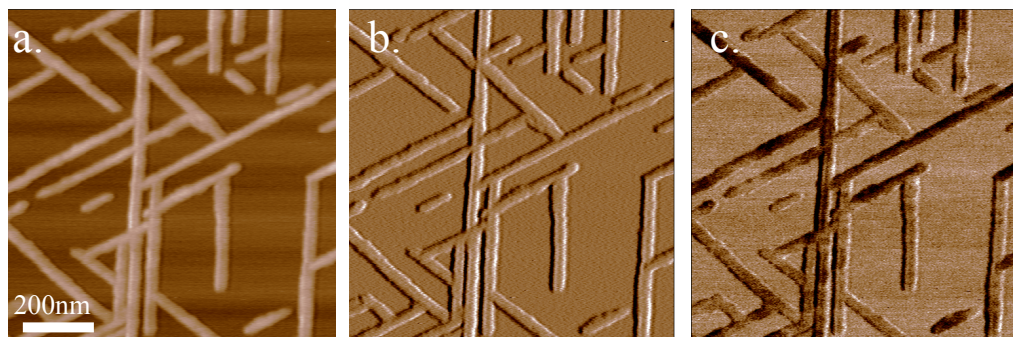


4. Ábra. Az atomerő-mikroszkóp sémás ábrája.

Az AFM képalkotás típusosan visszacsatolásban (feedback) történik. Ehhez a rugólap elmozdulásának egy paraméterét (meghajlás vagy oszcillációs amplitúdó) konstans értéken tartjuk úgy, hogy a rugólapkát a mintához képest függőegesen mozgatjuk. Tehát, ha az említett paraméterekben változás következik be és eltérnek a felhasználó által megadott célértéktől (set point), a műszer a pásztázás síkjára merőleges irányú elmozdulást biztosító piezoelektromos kristály segítségével kompenzálja a változás hátterében álló magasság különbséget. Azaz közelíti, vagy távolítja a rugólapot egészen addig, amíg a visszacsatolt paraméter újra el nem éri a célértéket. Eközben a műszer regisztrálja a vertikális elmozdulás nagyságát és ezáltal követi a minta felületi topográfiáját. Az így összegyűjtött magasság értékeket hozzárendeljük a pixelekre osztott pásztázási terület XY koordinátáihoz, és létrejön magasságkontraszt kép (**5.a. ábra**).

Oszcillációs üzemmódban a magasságkontraszt mellett egyéb kontrasztmechanizmusok is fellépnek. Ezek az amplitúdó- és fáziskontraszt. Az amplitúdókontraszt alapja a rugólap valós oszcillációs amplitúdója és a célamplitúdó közötti eltérés, figyelembe véve, hogy a feedback rendszer véges sebességgel működik. Mivel a kontraszt a visszacsatolási hibából ered, az amplitúdókontrasztot hibajelnek is nevezik. Minél nagyobb a pásztázási sebesség, annál nagyobb a visszacsatolási hiba és így a kontraszt. Az eredmény egy topografikus árnyékoltságra emlékeztető kép (**5.b. ábra**). A fáziskontraszt alapja a rugólap oszcillációjában fellépő fáziseltolódás (**5.c. ábra**). A fáziseltolódás mértékét a tü és a felszínre adszorbeált képletek közötti interakciók eltérő erőssége okozza. A

fáziskontraszt kép a minta viszkoelasztikus tulajdonságairól, a tű és a minta közötti adhéziós erőkről ad információt.



5. Ábra. *Trigonális orientációt mutató A β 25-35 fibrillumok csillámfelszínen. a. Magasságkontraszt felvétel. b. Amplitúdókontraszt felvétel. c. Fáziskontraszt felvétel.*

Az AFM sajátosságaiból fakadó és nem kiküszöbölhető képalkotási hiba az úgynevezett tű- vagy laterális konvolúció jelensége, amely a vizsgált képletek oldalirányú kiszélesedését eredményezi. Ez annak a következménye, hogy a tű hegye nem pontszerű, hanem több nanométer széles. Ezt a kiterjedést a tű végátmérőjével, vagy sugarával szokás jellemezni. A végátmérő, a tű geometriájától illetve a pásztázott minta magasságától függően a leképezés során valamilyen mértékben minden esetben hozzáadódik a vizsgált képlet valós szélességéhez. Ez a kiszélesedés abban az esetben feltűnő, ha a minta mérete (szélessége, átmérője) kisebb vagy összehasonlítható nagyságú a tű átmérőjével. Ezt a jelenséget a képek kvantitatív analízisének, mint szisztémás hibát figyelembe kell venni.

A tű végátmérőjének mérete a magasság információban torzítást nem hoz létre. Az AFM Z-irányú felbontása szubangströmös. Az XY-irányú felbontóképességet a képalkotáshoz használt tű végátmérője determinálja, tipikus esetben 0,5-5 nm tartományba esik.

V.5.2. A KÉPALKOTÁSHOZ HASZNÁLT RUGÓLAPKÁK

Olympus AC160TS-C2 microcantilever

A szárított minták pásztázásához AC160TS-C2 típusú rugólapkát használtunk.

Rugólap anyaga:	szilícium
Rugóállandó:	42 N/m
Rezonancia frekvencia:	300kHz
Tű alakja:	tetraedrális
Tű sugara	< 10 nm
Borítás:	Al a reflektív oldalon

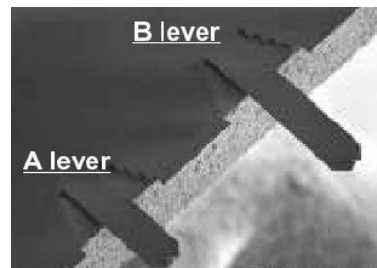


Alkalmazási lehetőségek: pásztázás oszcillációs üzemmódban, szárított mintákon.

Olympus BioLever (BL-RC150VB)

Csillám és funkcionizált üvegfelszínen, pufferben végzett képalkotáshoz és erőspektroszkópiai mérésekhez Olympus BioLever A rugólapot használtunk.

Rugólap anyaga:	szilícium nitrid
Rugóállandó:	0,03 N/m
Rezonancia frekvencia:	9,2 kHz (pufferben).
Tű alakja:	V alakú
Tű sugara	< 40 nm
Borítás:	Au/Cr a tűn és a reflektív oldalon

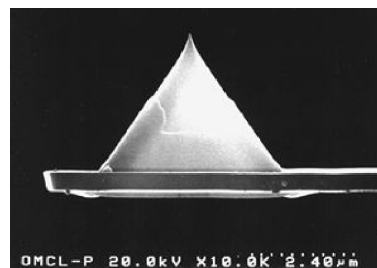


Alkalmazási lehetőségek: pásztázás oszcillációs üzemmódban, folyadékban, különös tekintettel polimerek és biomolekulák vizsgálatára. Erőspektroszkópia.

Olympus TR400PSA

HOPG felszínen növekvő A β 1-42 fibrillumok vizsgálatához Olympus TR400PSA rugólapot használtunk.

Rugólap anyaga:	szilícium nitrid
Rugóállandó:	0,08 N/m
Rezonancia frekvencia:	52,8-58 kHz (pufferben).
Tű alakja:	piramidális
Tű sugara	<20 nm
Borítás:	Au/Cr a reflektív oldalon
Alkalmazási lehetőségek:	pásztázás és erőspektroszkópia kontakt üzemmódban, pásztázás oszcillációs üzemmódban, folyadékban, különös tekintettel polimerek és biomolekulák vizsgálatára.



V.5.3. ATOMERŐ-MIKROSZKÓPOS KÉPEK ANALÍZISE

A felvételeken szereplő amyloid struktúrák egyes morfológiai paramétereinek (magasság, szögeloszlás, felületi fedettség) kvantifikálására az MFP3D atomerő-mikroszkóp saját szoftverét (Igor Pro5 WaveMetrics Portland OR, USA), valamint az NIH Image, Image J (1.32j verzió, NIH, USA) szoftvereket használtuk.

V.6. ERŐSPEKTROSKÓPIA

Erőspektroszkópiával molekulákon belüli vagy molekulák közötti kémiai kötések mechanikai hatásra bekövetkező felszakadását és átrendeződését lehet nyomon követni a spektrumban megjelenő erőátmenetek formájában, melyekből a molekulán illetve jelen esetben A β -fibrillumokon belül lezajló szerkezeti változásokra lehet következtetni. Az általunk alkalmazott kísérleti elrendezésben különböző A β -fibrillumokon belüli másodlagos kémiai kötésrendszereket perturbáltuk mechanikailag.

In-situ erőspektroszkópiás mérések esetén a rugólapka kalibrációját követően képet készítettünk a mintáról, majd a rugólapot egy számunkra érdekes fibrillum fölé pozicionáltuk. A rugólapka tujét a felszínen található képletbe nyomva a tű felülete és a fibrillum között nem specifikus, másodlagos kémiai kötések keresztül, kapcsolat alakul ki.. Ha a rugólapkát a felszíntől állandó sebességgel távolítjuk (tipikus húzási sebesség 500 nm/s) lehetővé válik,

hogy a fibrillum szerkezetét megbontsuk. A húzás alatt detektált erőátmenetek alakja és nagysága tükrözi a mechanikai hatásra bekövetkező szerkezeti változásokat (kísérleteink esetben protofilamentumok deszorpcióját a fibrillum felszínéről), míg a visszaengedés alatt detektált erőátmenetek tükrözik a relaxálódó rendszer sajátosságait.

Egy erőspektroszkópiás kísérlet során átlagosan ezer erőgörbét vettünk föl a minta több pontján, majd a vizsgált területet újra lepasztáztuk, hogy ellenőrizzük a mechanikai perturbáció megváltoztatta-e a minta AFM-el feloldható morfológiáját.

A rugólapka kalibrációjához a termikus módszert használtuk (J. Hutter et al., 1993). A termikus módszer alapja az ekvipartíció tétele. Eszerint a termodinamikai rendszer egy szabadsági fokára (jelen esetben a rugólap vertikális, elhajlási irányára) eső termikus energia ($1/2k_B T$) egyenlő a mechanikai energiával (az ugyanebbe az irányba eső rugólapka elhajláshoz szükséges munkával):

$$\frac{1}{2} \kappa \langle x^2 \rangle = \frac{1}{2} k_B T \quad (1)$$

ahol κ a rugóállandó, x a transzducer (rugólap) elhajlási amplitúdója, k_B a Boltzman állandó, T az abszolút hőmérséklet. Az alábbi, 2. egyenlet alapján a rugóállandó (κ) ismeretében a rugólap kitéréséből (Δx) meghatározható a rugólapra ható erő (F):

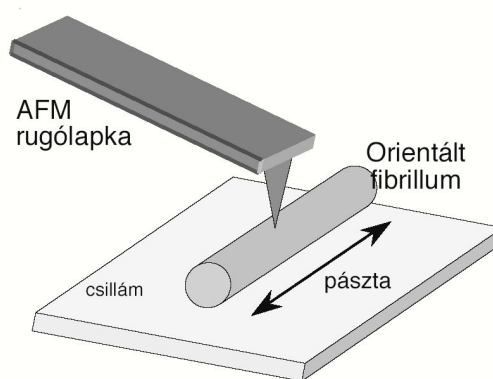
$$F = \kappa \Delta x \quad (2)$$

Mivel erőspektroszkópiában a rugólap elhajlását a reá kötődött molekulán keresztül közvetített mechanikai erő okozza, a módszerrel meghatározhatjuk a vizsgált molekuláris rendszerben mechanikai perturbáció hatására ébredő erő nagyságát.

V.7. AMYLOID POLIMERIZÁCIÓ PÁSZTÁZÓ PRÓBA KIMOGRÁFIÁS ANALÍZISE

A módszerben felhasználtuk az A β 25-35 fibrillumok csillámfelszíni, valamint az A β 1-42 fibrillumok grafit felszíni orientációját, azaz azt a megfigyelést, hogy a fibrillumok a felszín által meghatározott, kitüntetett irányba, lineárisan növekednek.

A pásztázó próba kimográfiában az AFM tüvel az orientált fibrillum tengelyében repetitív módon, egy vonalban pásztázzunk (**6.ábra**).

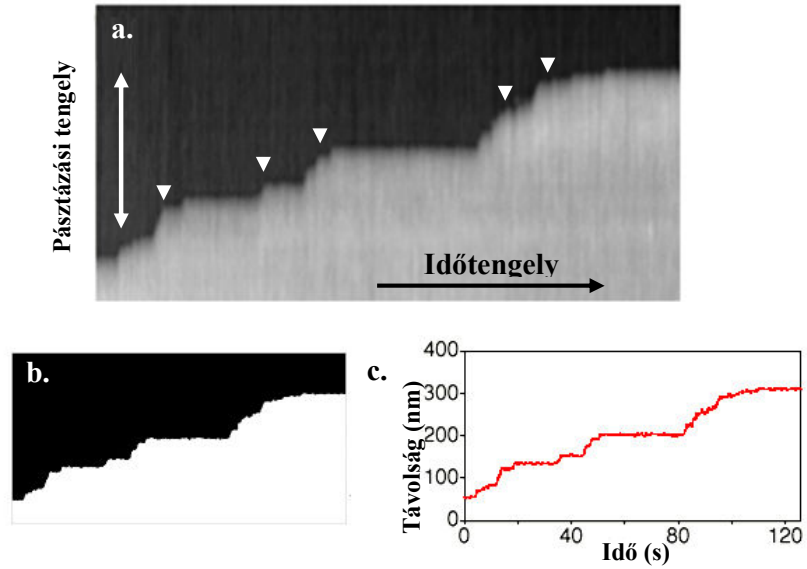


6. Ábra. A pásztázó próba kimográfia sémája.

A műszer a pásztázási vonalakat egymás után jeleníti meg, így a vizsgált fibrillum növekedése az idő függvényében, úgynevezett kimogramban kerül ábrázolásra. A fibrillum hosszában bekövetkező változását a topográfiai magasságban, illetve az A β 1-42 fibrillumok esetében a fázis képben észlelhető hirtelen, lépcsőszerű ugrások mutatják (**7.a ábra**).

A filamentum-vég pozíciójának meghatározása csupán a pixel-felbontástól függ (mely a képméret és a pixel szám hányadosa, típusosan 1 nm/pixel). A módszer érzéketlen a tükonvolúcióra, mivel nem a fibrillumok abszolút hosszát mérjük, hanem a fibrillum hosszban bekövetkező változást. Az egymást követő vonal-pásztázási frekvencia határozza meg az időfelbontást. A pásztázási frekvencia az A β 25-35 fibrillumok esetében típusosan 3 Hz, míg az A β 1-42 fibrillumok esetében 1 Hz volt.

A laboratóriumunkban kifejlesztett képanalízis algoritmusok segítségével a képi információt két lépésben adatsorrá konvertáljuk (**7. ábra**). Az adatsorból a polimerizációs dinamika paramétereit - lépés nagyság, polimerizációs szünetek, azaz pauzák idejét – tudjuk mérni és kiszámítani (**7.c ábra**).



7. Ábra. Pásztázó próba kymogram analizésének menete. **a.** Pásztázási kép (a háromszögek jelölik a növekedési lépéseket). **b.** Bináris képpé transzformált pásztázási kép. **c.** A bináris képből nyert számadatok (fibrillum hossz és idő) ábrázolása.

VI. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

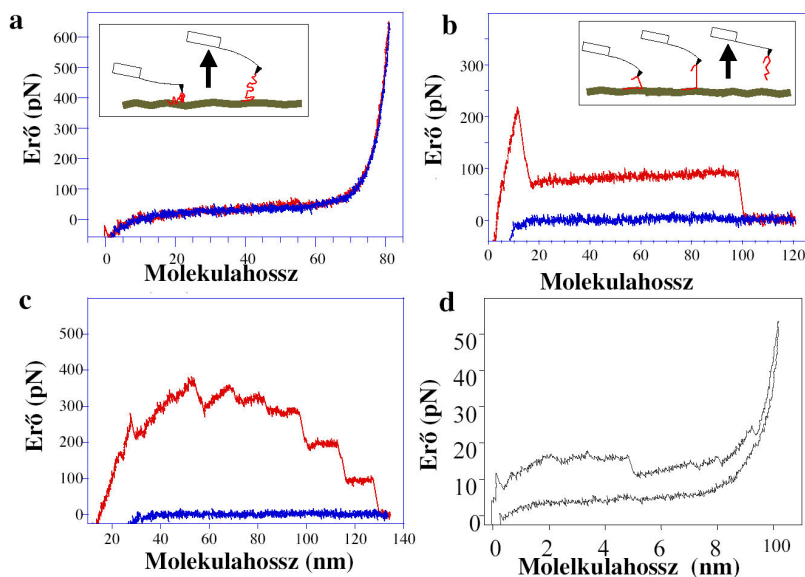
VI.1 AB-FIBRILLUMOK MORFOLÓGIÁJA ÉS BELSŐ SZERKEZETI DINAMIKÁJA

VI.1.1. AB-AMYLOID FIBRILLUMOK ERŐSPEKTROSKÓPIÁJA

Az AB1-40 fibrillumokon elvégzett erőspektroszkópiás mérések során sikerült első ízben megörökíteni a β -amyloidokra jellemző, karakterisztikus erőválaszokat. Kísérleteinkben kovalens keresztkötővel (GOPS) a felszínhez rögzített amyloid fibrillumokat manipuláltunk mechanikailag AFM segítségével.

A kapott erőgörbék alapján két alapvető, elemi mechanikai választ figyeltünk meg: 1.) nem-lineáris rugalmas választ (**8.a ábra**) és 2.) erő platót. (**8.b ábra**)

Gyakran megfigyelhető az elemi mechanikai jelenségek hierarchikus egymásra épülése, például többszörös erő platók formájában (**8.c ábra**), illetve a nemlineáris rugalmas viselkedés kombinálódása erő platókkal (**8.d ábra**).



8. Ábra. β -fibrillumok molekuláris erőspektroszkópiája. **a.** Nem-lineáris rugalmas erőválasz. **b.** Erő plató. **c.** Hierarchikusan egymásra épülő, lépcsőt kialakító erő platók. **d.** Nem-lineáris erőválasz kombinálódása erő platóval. **Betét ábrák:** a kísérleti elrendezést szemléltetik.

Hasonló erő platót figyeltek meg egyedi homopolimer láncok AFM segítségével, felszínről történő deszorpciója során (Haupt et al., 1999; Haupt et al., 2002). Haupt és munkatársai által alkalmazott kísérleti elrendezésben, az egyik végén megfogott

polimerláncot folyamatosan, konstans húzási sebességgel fejtették le a felszínről. A lánc húzása közben, egy adott időpillanatban egyetlen kötés terhelődik mechanikailag. Egy kötés felszakadásakor annyival nő a szabad polimer szakasz hossza, amekkora a távolság két szomszédos, a láncot a felszínhez rögzítő kötés között. Mivel a kötések azonos kémiai természetűek, tehát azonos energiájúak, felszakításukhoz ugyanakkora erőre van szükség. Mivel a kötőhelyek közötti távolság nanométeres vagy az alatti nagyságú, a műszer felbontóképessége miatt, két felszakított kötés közti időintervallumban erőcsökkenés nem figyelhető meg.

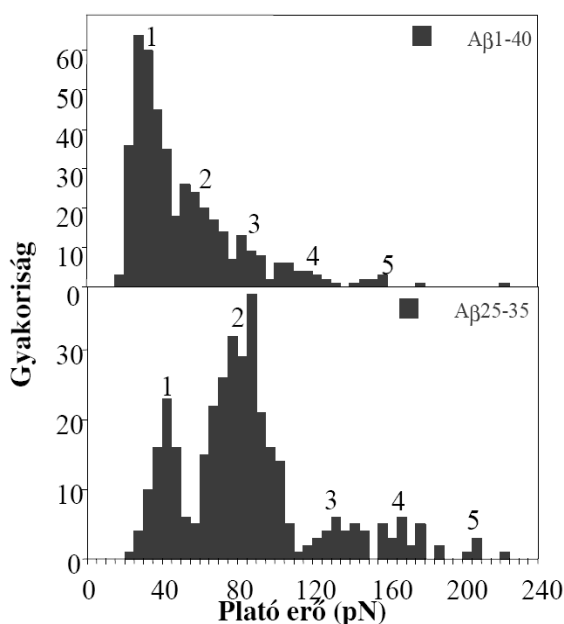
Elképzelésünk szerint hasonló a mechanizmus áll az amyloid fibrillumok esetében megfigyelt erőválaszok mögött, azzal a kitételrel, hogy kísérletünkben a fibrillumokat kovalens keresztkötő (GOPS) közbeiktatásával rögzítettük a felszínhez, melynek felszakításához hozzávetőlegesen 1.4 ± 0.3 nN erő szükséges (Grandbois et al., 1999). Ez az erő körülbelül húsz-ötvenszer nagyobb, mint az általunk mért plató erők, tehát ki lehet zárni annak a lehetőségét, hogy a fibrillumok felszínről történő deszorpciója okozza a jellegzetes erőválaszt.

A mechanikailag perturbált amyloid fibrillumok esetében megfigyelt erő plató legplauzibilisebb magyarázata az, hogy a filamentumot felépítő alegységet, azaz egy protofilamentumot vagy - abban az esetben ha, egy protofilamentumot több β -lemez egység épít fel – egy β -lemez egységet fejtünk le a fibrillum felszínéről. A hierarchikus erő plató azzal magyarázható, hogy több protofilamentumot illetve β -lemez egységet fogunk és húzunk le egy időben a fibrillum felszínéről.

VI.1.2. A β -AMYLOID FIBRILLUMOK MECHANIKAI UJJLENYOMATA

Megfigyeléseink szerint az erő platók magassága (“plató erő”) diszkrét eloszlást mutat, melyben a csúcsok egy egységnyi plató erőnél és ennek egész számú többszöröseinél jelentkeznek (**9.ábra**). Az egységnyi plató erő megfeleltethető az egyetlen protofilamentum lecipzározásához szükséges erővel. Eredményeink szerint az egységnyi plató erő különbözik A β 1-40 és A β 25-35 fibrillumok esetében, ami a fibrillumokat összetartó erők különböző természetére utal. Az egységnyi plató erő nagysága karakterisztikus egy adott típusú fibrillumra, így a mérési eredményeink az egyes A β -fibrillumok mechanikai ujjlenyomataként is értelmezhetők. Méréseink alapján megállapítottuk, hogy az egységnyi plató erő az A β 1-40 esetében 33 pN, az A β 25-35 esetében 41 pN.

A jelenleg rendelkezésünkre álló szerkezeti információk és modellek szerint a fibrillum hossz tengelyére merőlegesen elhelyezkedő aminosav oldalláncok kapcsolják össze a protofilamentumokat. Feltételezhető, hogy a szétcipzározási erők eltérő nagyságának hátterében az állhat, hogy a különböző típusú amyloid fibrillumokon belül a protofilamentumok összetartásában más-más aminosavak oldalláncainak van szerepe. Ebből fakadóan az egyes kapcsolódó oldalláncok közti kölcsönhatások természete és erőssége az egyes amyloid fibrillumokon belül eltérő.



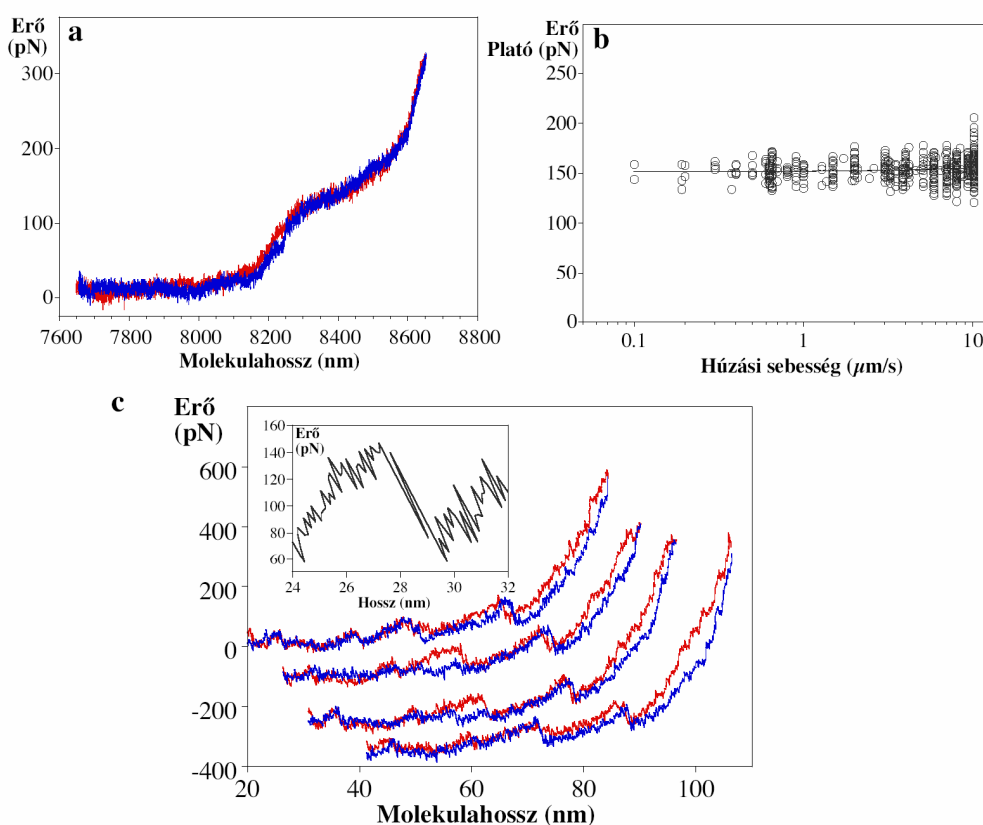
9.Ábra. A plató erő eloszlása A β 1-40 (fent) és A β 25-35 fibrillumok (lent) esetén. A számok a plató átmenetben résztvevő polimerláncok (protofilamentumok) számát jelölik.

Egyik lehetséges magyarázat lehet a különbségre az A β 1-40 és A β 25-35 fibrillumok esetében, a Lys²⁸ reziduum eltérő helyzete és ebből fakadó eltérő szerepe a fibrillumok

stabilizálásában. Az A β 1-40 esetében a Lys²⁸ sóhidat alakít ki az Asp²³ reziduummal és így az A β monomer, hajtűkanyar szerkezet stabilizálásában vesz részt, míg az A β 25-35 esetében elképzelhető (Terzi et al., 1994), hogy intrafibrilláris stabilizáló kölcsönhatást alakít ki egy szomszédos protofilamentumban elhelyezkedő monomer Met³⁵ reziduumával és így a fibrillum stabilizálásában játszik szerepet.

VI.1.3. REVERZIBILIS JELENSÉGEK A FIBRILLUMOK BELSŐ DINAMIKÁJÁBAN

Fontos megfigyelésünk, hogy a szétcipzározódás reverzibilis (**10.ábra**). Azaz, a lefejtett láncok képesek nagy sebességgel visszakapcsolódni, visszafeküdni a fibrillum felületére (összeczipzározódás). Ez abban az esetben válik detektálhatóvá, ha az erőspektroszkópia során lefejtett fibrillum alegység a húzás során nem szakad le a rugólapka tűjéről (vagy a fibrillum felszínéről). Így a visszaengedés folyamán monitorozhatók a rendszer relaxációja alatt bekövetkező erőátmenetek.



10. Ábra. Aβ1-40 fibrillumok reverzibilis és repetitív erőválaszai. **a.** Reverzibilis erő plató, mely esetében a plató egy nem-linéáris elasztikus erőválasszal csatoltan látható. **b.** Plató erők a húzási sebesség függvényében. A plató erőket ugyanazon a fibrillumon mértük egymásután, változó húzási sebesség mellett **c.** Reverzibilis erőátmenetek Aβ1-40 fibrillumok esetében. Az ábra egymást követő húzási ciklusokat mutat. A **betétábrán** jól látható a rendszer két állapota közötti gyors fluktuáció.

A reverzibilitásnak több megnyilvánulását is tapasztaltuk: 1) Az erő plató mind nyújtáskor, mind visszaengedéskor ugyanazt az elrendeződést mutatta, azaz a molekuláris rendszer ugyanazt az utat járta be mindkét irányú folyamat során. 2) Az erő plató magassága

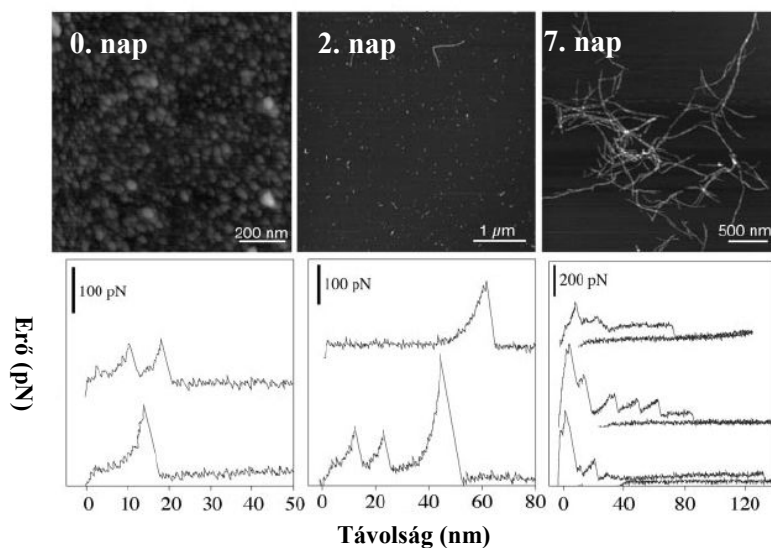
széles húzási sebességtartományban azonos volt, ami arra utal, hogy a reaszociáció lépései rövidebb időskálán zajlanak, mint a húzási kísérlettel kapcsolatos mechanikai lépések. 3) Repetitív mechanikai ciklusokban, rugalmas viselkedéssel csatolt erő plató esetén ugyancsak tapasztaltunk reverzibilitást, és ilyenkor a rendszer két állapota: közötti, oda-vissza fluktuációt is tapasztaltunk, mely jelzi, hogy dinamikus egyensúlyról van szó.

Feltételezhető, hogy a mechanikai manipuláció során, a felszínen fekvő fibrillum szerkezeti integritását megbontva (egy vagy több protofilamentum deszorpciójával) szabaddá válnak azok a rendezetten elhelyezkedő aminosav oldalláncok, melyek az intrafibrilláris kötések kialakításáért felelősek. A lefejtett protofilamentum visszacipzározódása során ezek az aminosav oldalláncok templátként szolgálhatnak a visszakapcsolódó protofilamentum oldalcsoportjainak a kötőhelyek megtalálásában, egyúttal determinálva a visszacipzározódás helyét és a folyamat irányát.

VI.1.4. IN SITU ERŐSPEKTROSKÓPIA

Az A β 1-40 fibrillumokon végzett kísérleteinkben AFM segítségével követtük a fibrillumok kialakulását, illetve morfológiájának változását az inkubációs idő függvényében. A fibrillumok lassú kinetikával alakulnak ki (**11.ábra**). A peptidek beoldását követő második órában (0. nap), még csupán globuláris alakú aggregátumok figyelhetők meg, melyek átlagos magassága 1 nm, így feltételezhető, hogy ezek a struktúrák a fibrillumképződés kezdeti fázisában lévő peptid oligomerek. A második naptól megjelennek a jellegzetes, el nem ágazódó, változó hosszúságú A β -fibrillumok, melyek magassága 6-8 nm. A további érés során, a hetedik nap után, egyrészt hossz- és magasságnövekedés figyelhető meg. A fibrillumok elérik a több mikrométeres hosszt, másrészt asszociációjukból elkezdnek kialakulni a kevésbé rendezett szerkezetű A β aggregátumok, miközben eltűnnek, az érés korábbi stádiumában lévő entitások. Az előbbi jelenségre utal az a tény, hogy az érett fibrillumok nem egyenletesen, hanem – mint az alábbi ábrán megfigyelhető - szigetszerű gócbokba csoportosulva kötődtek a csillámfelszínhez, miközben ülepedésük illetve kötődésük diffúzióvezérelt. Tehát a képen, feltehetően egy fibrillumokból álló, még csupán lazán összekapcsolódott, aggregátum kezdemény látható, mely a hétnapos inkubáció során, az oldatban alakult ki.

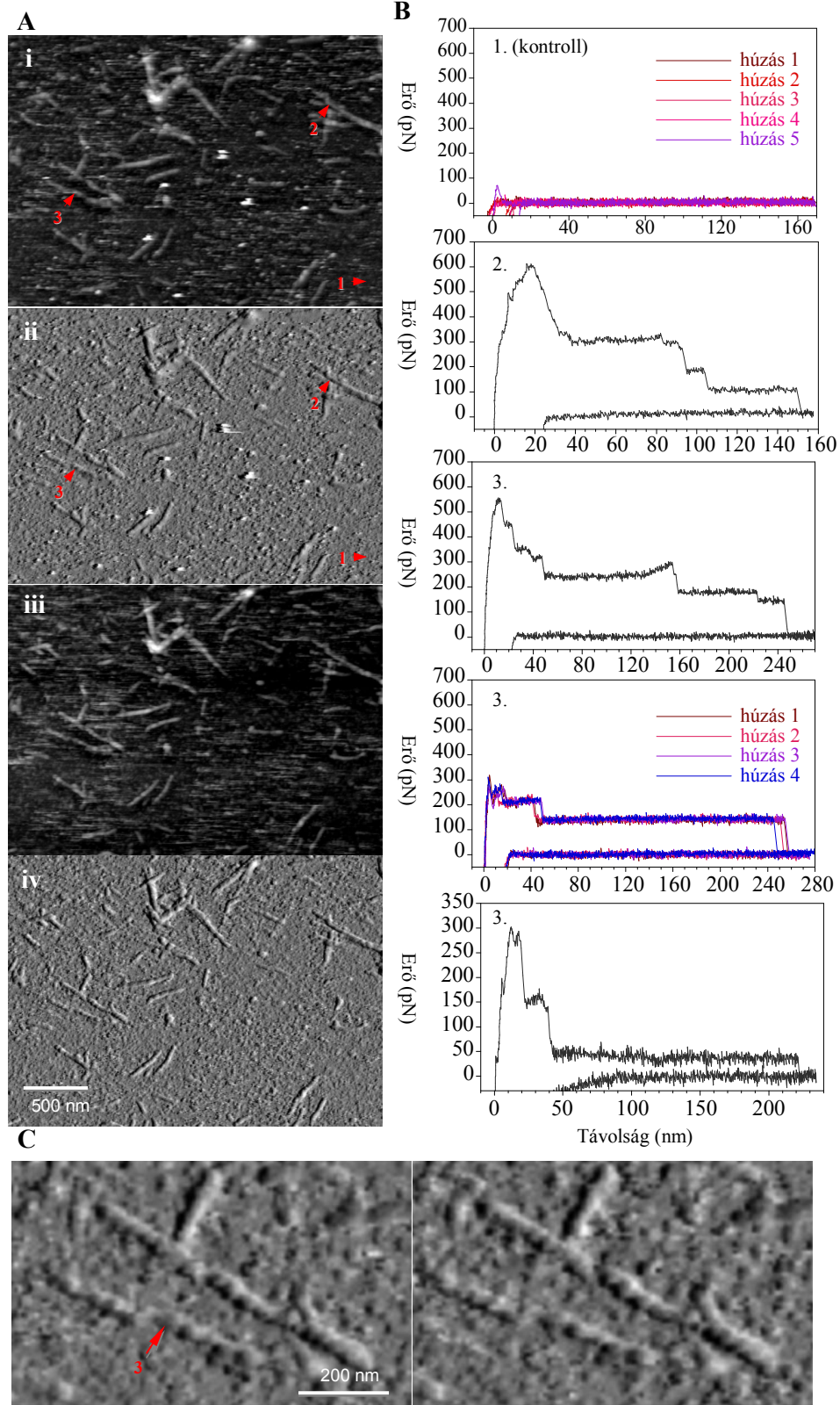
A lassú kinetikával növvő A β 1-40 mintákat az érés különböző fázisaiban vizsgálva megállapítottuk, hogy a karakterisztikus, plató típusú erőválaszok csak az érett fibrillumokra jellemzők (**11.ábra**).



11. Ábra. Felső panel: A β 1-40 fibrillumok AFM morfológiájának változása az idő függvényében. A felvételek oszcillációs üzemmódban, levegőben, csillámfelszínre adszorbeált szárított mintáról készültek. **Alsó panel:** morfológiai megfigyelésekhez használt mintákkal egyidős preparátumok jellegzetes erőspektrumai. A méréseket GOPS aktivált üvegfelületen, kovalensen rögzített fibrillumokon végeztük pufferben.

Megfigyeléseink arra utalnak, hogy az amyloid fibrillumok érésük során belső szerkezeti átalakulásokon mennek keresztül. Számos, mások által elvégzett vizsgálat is arra utal, hogy a protofilamentumok a fibrillumok alegységei (Petkova et al., 2002; Tycko, 2004), míg a globuláris előalakok és protofibrillumok nem rendelkeznek ilyen jól definiálható szerkezeti alegységekkel. Ezek a megfigyelések összhangban vannak és erősítik azt a feltételezésünket, hogy a mechanikai manipuláció során protofilamentum alegységek deszorpciója történik a fibrillum felszínéről.

További in situ erőspektroszkópiás méréseknél a már korábban tapasztalt erő plató típusú erőválaszokon kívül, két fontos további megfigyelést tettünk: 1.) számos esetben, ugyanazon a ponton elvégzett, egymást követő húzási ciklusok során teljesen megegyező erőválaszokat, tehát egyező plató magasságot és hosszt kaptunk, **(12. ábra)** 2.) az erőspektroszkópiát megelőző és az azt követő pásztázásból kiderült, hogy a rugólapka tűjével végzett mechanikai manipuláció, atomerő-mikroszkóppal feloldható morfológiai változást a fibrillumokban nem okoz.



12. Ábra. Ábramagyarázat a 34. oldalon.

Ezek a megfigyelések magyarázhatók a korábban bemutatott reverzibilis erőspektrumokból levont következtetésekkel, miszerint a lefejtett protofilamentumok a rendszer relaxációja során, tehát az erőspektroszkópia második szakaszában, visszacipzározódnak a fibrillum felszínére. Ezt a feltételezést erősíti az a tény, hogy az A β 1-40 protofilamentumai 2-4 nm átmérőjű struktúrák, tehát méretüket tekintve nem esnek az AFM feloldóképessége alá.

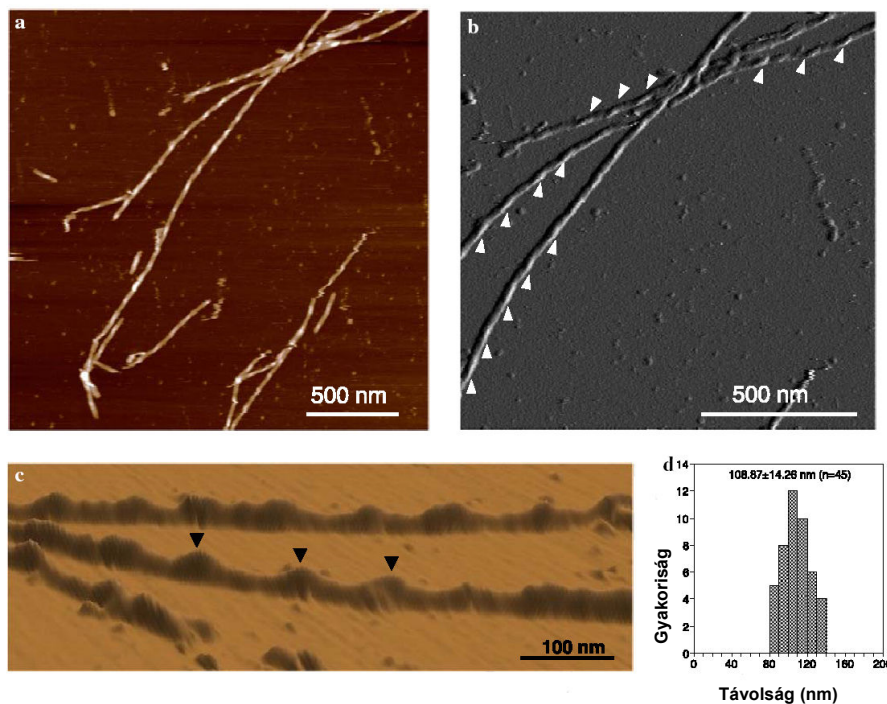
Megfigyeléseink egyúttal utalnak arra, hogy az erő platók végén megfigyelt hirtelen lecsökkenő erő esetén, a protofilamentum nem a fibrillum felszínéről, hanem a rugólap tűjéről szakad le.

12. Ábra a 33. oldalon. A β 1-40 fibrillumok in situ erőspektroszkópiája. **A(i)** és **(ii)** GOPS aktivált üvegfelületre abszorbeált fibrillumok a mechanikai manipuláció előtt. Az egyes nyilak jelölik a mintavételezés helyét. **(i)** Magasságkontraszt, **(ii)** amplitúdókontraszt felvétel. **a(iii)** és **(iv)**: a vizsgált terület képe a mechanikai manipuláció után. **(iii)** Magasságkontraszt, **(iv)** amplitúdókontraszt felvétel. **B.** Az atomerő-mikroszkópos képeken bejelölt mintavételezési helyekhez tartozó, jellegzetes erőspektrumok. **C.** Amplitúdókontraszt felvétel manipulációnak kitétt fibrillumról, a manipuláció előtt és után. A felvételen látható, hogy az erőspektroszkópiás mérések atomerő-mikroszkóppal felbontható morfológiai változásokat a fibrillumban nem okoztak.

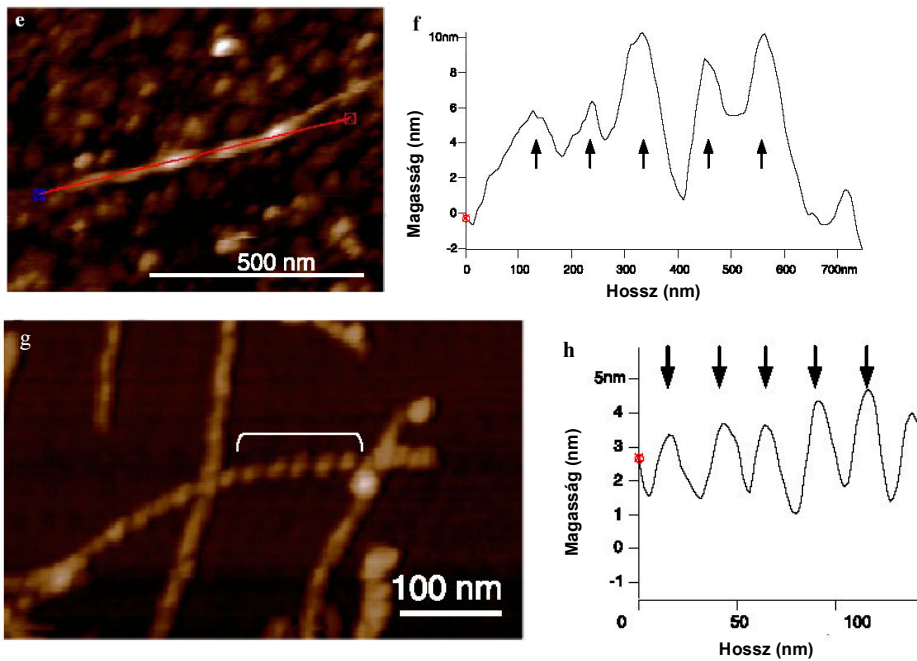
VI.2. A β 1-42 FIBRILLUM ATOMERŐ-MIKROSZKÓPOS VIZSGÁLATA

VI.2.1 A β 1-42 FIBRILLUMOK MORFOLÓGIÁJA

A β 1-42 fibrillumok morfológiai vizsgálata során megállapítottuk, hogy az általunk vizsgált preparátumokban az fibrillumok hossza eléri a több mikrométert, továbbá balmenetes helikális szerkezetet mutattak (13.a,b,c ábra). A hélix periodicitása a fiziológias körülményeket utánzó kondíciók mellett vizsgált, natív szerkezetű minták esetében ~ 110 nm volt, míg a szárítva fixált mintáknál ugyanez az érték ~ 25 nm-nek adódott (13.e,g ábra). Az átlagos fibrillum magasság – mely abban az esetben, ha feltételezzük, hogy az adott struktúra a hossz tengelyére szimmetrikus, atomerő-mikroszkópos felvételek esetén, kis hibával megfeleltethető a fibrillum vastagságával, $4,77 \pm 1,82$ nm volt.

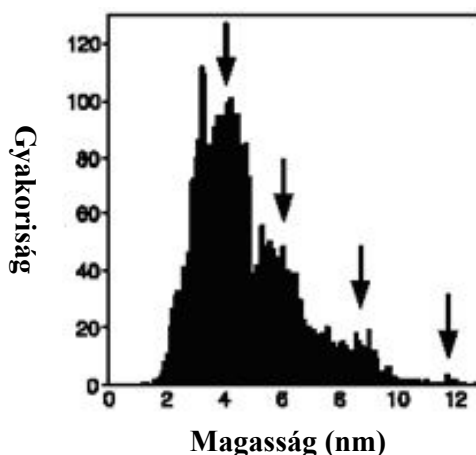


13. Ábra. A β 1-42 fibrillumok szerkezeti elemzése. (a) Pásztázó atomerő-mikroszkópos, oszcillációs üzemmódban felvett magasságkontraszt felvétel, csillámfelületre abszorbeált A β 1-42 fibrillumokról, pufferben. (b) Amplitúdókontraszt kép, az utóbbi (a) felvétel kinagyított része, melyen jobban kitűnik a fibrillumok balmenetes helikális szerkezete. Nyílhegyek jelzik a helicitás helyét és irányát. (c) Helikális szerkezetű fibrillum 3D rekonstrukciója. Nyílhegyek jelölik a periodikus magassági maximumokat. (d) A periodikus magassági maximumok hisztogramja (Az ábra folytatása a 35. oldalon található.)



13. Ábra folytatása. (e) GOPS kezelt felszínhez keresztkötött fibrillumok magasságkontraszt képe, pufferben. (f) Az (e) képen bemutatott fibrillum keresztmetszete a piros vonal síkjában. Nyilak jelzik a periodikus magassági maximumokat. (g) Csillámfelszínhez kötött és szárítással fixált A β 1-42 fibrillum. (h) A (g) képen jelölt fibrillum keresztmetszete. Nyilak jelzik a periodikus magassági maximumokat.

A fibrillumok magasságát elemezve multimodális eloszlást kaptunk, lokális maximumok mutatkoztak ~ 4 , ~ 6 , ~ 9 és ~ 12 nm-es fibrillum magasságnál (**14. ábra**). Ebből a megfigyelésből levonható az a következtetés, hogy a fibrillumokat változó számú, 2 szubfibrilláris alegység: protofilamentum építi fel (Serpell, 2000), így feltételezhető, hogy az általunk vizsgált képletek a fibrillumérés különböző szakaszaiban lettek megőrkítve.



14. Ábra. A hisztogram a topografikus magasság eloszlást mutatja az A β 1-42 fibrillumok tengelyében. Az átlagos magasság 22 fibrillum analízisa után $4,77 \pm 1,82$ nm. Nyilak jelzik a lokális maximumokat.

A korábbi mikroszkópos felvételek alapján készült morfológiai jellemzések (Harper et al., 1997) (Walsh et al., 1997) a $\sim 4,0$ nm átmérőjű fibrilláris struktúrákat a protofibrillumokkal – az amiloidogenezisben, az érett fibrillumokat megelőző előalakokként azonosították. Ugyanakkor ezek hossza nem haladta meg a 200 nm-t, morfológiailag pedig „gyöngyfűzérre” hasonlítottak és nem mutatták a helikális sajátságokat.

Szilárd fázisú NMR vizsgálatok alapján felállított – és jelenleg legplauzibilisebbnek tartott - szerkezeti modellben (Luhrs et al., 2005) négy egymás mellett párhuzamosan futó, mintegy 2,4 nm vastagságú protofibrillum épít fel egy helikális szerkezetű fibrillumot, ahol a helix periodicitása hozzávetőlegesen 120nm. Az általunk kapott eredmények: fibrillum magasság multimodális eloszlásában tapasztalt magasság különbségek (~ 2 -3 nm), valamint az egyéb fent leírt morfológiai jellemzők összhangban vannak Lührs és munkatársai által kapott eredményekkel. Ugyanakkor eredményeink szerint léteznek olyan fibrillum populációk, ahol a protofilamentumok száma eléri a hatot.

Ezeket az adatokat figyelembe véve feltételezhetjük, hogy az általunk vizsgált struktúrák érett A β 1-42 fibrillumok voltak és nem protofibrillumok, jóllehet a korábban definiált morfológiai kritériumoknak mintáink nem mindenben feleltek meg.

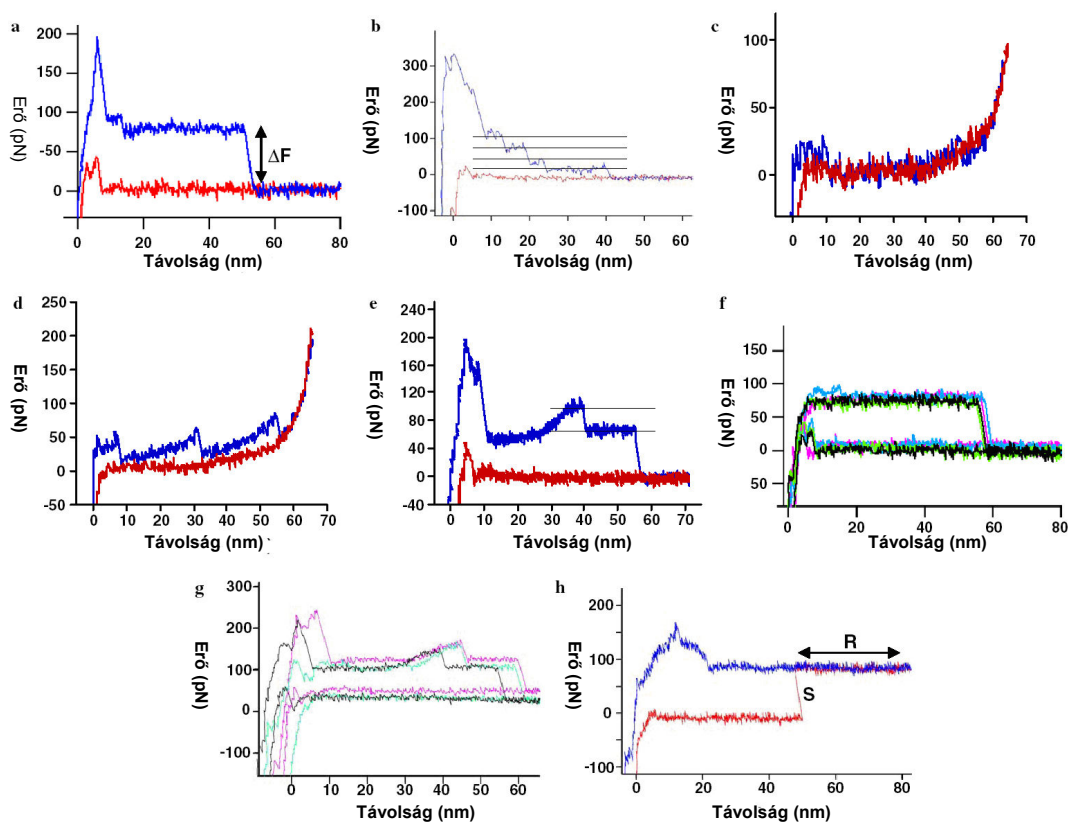
Nem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy az elmúlt években végzett nagyfelbontású atomerő-mikroszkópos vizsgálatokból kiderült, hogy a protofibrillumok, illetve érett fibrillumok szerkezetét és összeépülését nagymértékben befolyásolják a fibrillumok növesztési körülményei, elsősorban az alkalmazott pufferek összetétele (pH érték), az

inkubációs idő, hőmérséklet valamint, a felszín hidrofíl avagy hidrofób sajátosságai, továbbá a felszín rendezett, monoton kristályszerkezete, például.: nagymértékben rendezett szerkezetű grafit, (HOPG) esetében (Kowalewski and Holtzman, 1999) (Arimon et al., 2005) (Wang et al., 2003). Mindez két fontos, a kísérleti eredmények értékelés során figyelmen kívül nem hagyható szempontra mutat rá: egyfelől erősíti azt az elképzelést, hogy az A β 1-42 fibrillumok érése egy komplex folyamat, melyben a fibrillogenezis több párhuzamos útvonalon halad (Mastrangelo et al., 2006), morfológiailag és ebből következően szerkezetileg eltérő fibrillumokat illetve fibrillum asszociátumokat, aggregátumokat eredményezve. Másfelől felhívja a figyelmet arra, hogy a szintetikus peptidekből kiinduló kísérletek során létrehozott fibrillumok szerkezete és viselkedése az in vitro alkalmazott körülmények által befolyásolható.

VI.2.2 A β 1-42 FIBRILLUMOK ERŐSPEKTROSKÓPIÁS VIZSGÁLATA

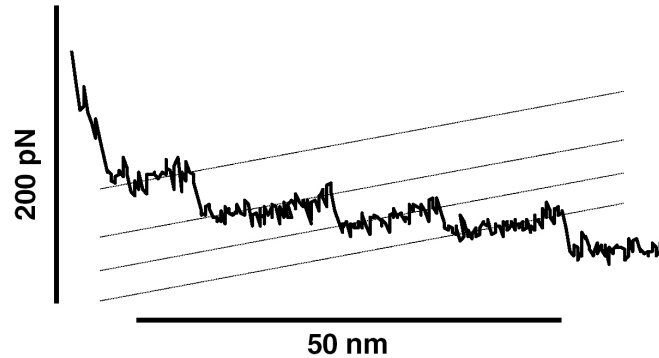
Az A β 1-42 fibrillumokon elvégzett erőspektroszkópiás mérések alapján betekintést nyertünk a fibrillumok belső dinamikájába és szerveződésébe. Megállapítottuk, hogy hasonlóan a korábban vizsgált A β -fibrillumokhoz, erőválaszok szempontjából a mechanikai manipulációnak kitett A β 1-42 is hasonlóan viselkedik, mint az A β 1-40 és A β 25-35 fibrillumok.

Erőspektroszkópiás méréseink során két jellegzetes erőválaszt és azok egymásra épülő kombinációit tudtuk elkülöníteni: 1.) erő platókat 2.) nem-lineáris, rugalmas erőválaszt, mely az esetek egy részében reverzibilitást mutatott 3.) és ezek egymásra épülő kombinációját (**15. ábra**). Valamint az A β 1-42 esetében is megfigyeltünk reverzibilis folyamatokat és ismétlődő, egymással lényegében azonos erőgörbéket, egymást követő húzási ciklusok során.



15. Ábra. A β 1-42 fibrillumok jellegzetes erőspektrumai. **a.** Reprezentatív erő plató. ΔF jelöli az erő plató magasságát. **b.** Többszörös erő platók, melyek lépcsőszerű elrendezésben. A hirtelen erőesések a lecipzározott protofilamentum, a rugólapka tűjéről történő, egymástól független leszakadásának következményei. **c.** Reverzibilis, nem-lineáris erőválasz. **d.** Nem-lineáris erőválasszal kombinálódó erő platók. **e.** Hosszabb erő platóra épülő rövidebb erő plató, melyet nem-lineáris erőnövekedés előz meg. A platókat vízszintes vonalak jelölik. **f.** Repetitív erő platók, melyek egymást követő húzási ciklusokban kerültek rögzítésre. Az egyes húzási ciklusokat különböző színű görbék jelölik. **g.** Egymást követő húzási ciklusokban rögzített, repetitív erő platók, melyekre egy rövidebb erő plató épül. **h.** Reverzibilis erő plató. „R” jelöli az erőválasz reverzibilis részét. „S” jelöli azt a hirtelen erőesést, mely a protofilamentum tőről történő leszakadásával áll kapcsolatban a relaxáció során.

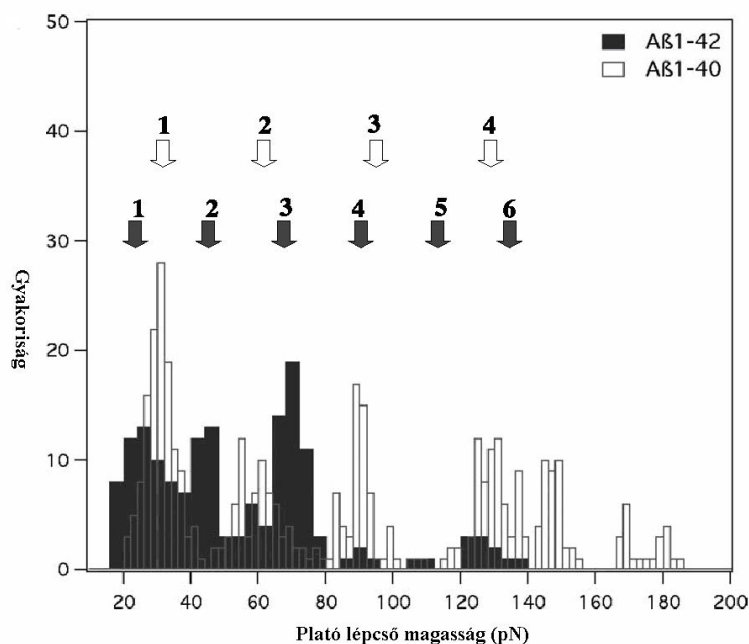
Az erőspektrumokban megjelenő erő platók egy része ferde volt (**16.ábra**). Ez jelenség abban az esetben következhet be, ha - jelen esetben - protofilamentum fibrillum felszínéről történő lefejtéséhez növekvő erőre van szükség a húzás során.



16. Ábra. *β 1-42 fibrillum mechanikai manipulációja során megfigyelt ferde erő platók.*

Ez a jelenség feltehetően a fibrillumok helikális szerkezetével áll kapcsolatban. Húzás során, a valószínűleg egymással párhuzamosan futó protofilamentumok hélix kanyarulatát követve megváltoztatják a húzás geometriáját, azaz a vertikálisan elmozduló rugólapka és a fibrillum között kifeszülő protofilamentumok bizonyos helyzetekben a merőlegetől eltérő szöget fognak bezárni. Abban az esetben, ha helikális lefutású protofilamentumok a fibrillum alá kerülnek, a kovalens keresztkötések és a megváltozott geometria miatt bekövetkezik a protofilamentumok leszakadása a rugólapka tűjéről.

A paltó erők statisztikai elemzéséből kiderült, hogy az erők nagysága multimodális eloszlást mutat. Az alap plató erő értéke 23 pN nagyságúnak adódott (**17.ábra**).



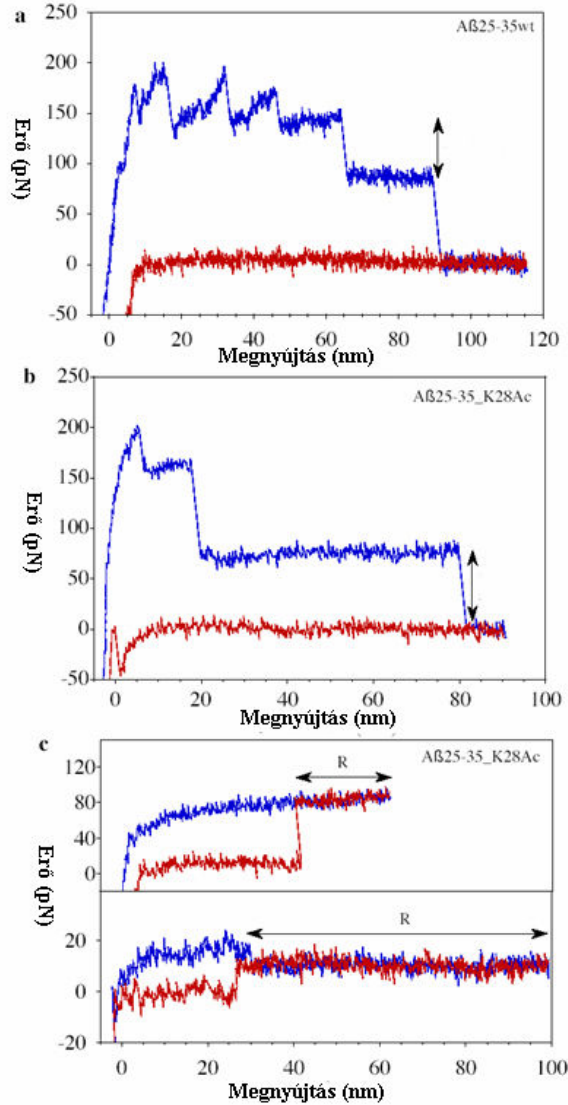
17. Ábra. Az Aβ1-42 fibrillumok erőspektrumainak elemzésével kapott plató erő értékek hisztogramja, összevetve az Aβ1-40 fibrillumok korábbi mérések során kapott plató erő eloszlásával. Az Aβ1-42 esetében az alap plató erő 23 pN nagyságúnak, míg az Aβ1-40 esetében 33 pN nagyságúnak adódott.

A hisztogramon az egyes plató erő értékek hat lokális maximumba csoportosulva helyezkednek el. Ez az eredmény összhangban van a fibrillumok morfológiai analízisével kapott magasság hisztogram (**14.ábra**) eredményével és a jelenleg elfogadott szerkezeti modellekkel. Feltételezhető, hogy az egyes Aβ1-42 fibrillumokat változó számú, maximális hat protofilamentum alegység építi fel. Az Aβ1-42 és Aβ1-40 esetében kapott különböző értékek is utalnak a fibrillumokat összetartó kölcsönhatások különbségére és így a fibrillumok eltérő belső szerkezetére.

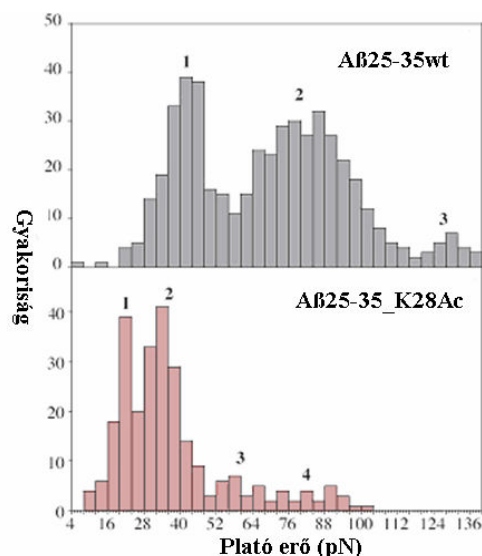
VI.3. AZ A β 25-35_K28Ac FIBRILLUMOK MECHANIKAI STABILITÁSÁNAK VIZSGÁLATA

Az A β 25-35 és A β 25-35_K28Ac fibrillumok összehasonlító erőspektroszkópiás vizsgálatával arra kívántunk fényt deríteni, hogy a Lys²⁸ oldallánc részt vesz-e az A β 25-35 fibrillumok szerkezetének stabilizálásában, és ha igen, milyen mértékben? Feltételezhető ugyanis, hogy a Lys²⁸ oldallánc ϵ -aminocsoportja képes interakcióba lépni egy szomszédos protofilamentumban elhelyezkedő peptid C-terminális Met³⁵ karboxil, illetve az általunk vizsgált fibrillumok esetében a Met³⁵ amid csoportjával (Terzi et al., 1994). A feltételezések szerint, ennek a kölcsönhatásnak a fibrillumok stabilizálásában lehet szerepe.

Az A β 25-35_K28Ac fibrillumokon elvégzett erőspektroszkópiás vizsgálatokból a következőket állapíthattuk meg: 1.) dominánsan erő plató típusú spektrumokat sikerült regisztrálnunk, melyek protofilamentumok a fibrillum felszínéről történő fokozatos deszorpciójára vezethetők vissza (**18.a.b. ábra**). 2.) Megfigyeltünk a már korábbiakban más típusú A β amyloid fibrillumok esetében tapasztaltakhoz hasonló, reverzibilis erőátmeneteket, mely a lefejtett protofilamentum gyors visszacipzározódásának a jele. Ez a megfigyelés utal arra, hogy a felszínhez kovalensen kikötött fibrillum a visszacipzározódás során templátként szolgál a lefejtett protofilamentum számára, tehát determinálja a visszakötődés helyét, továbbá feltehetően facilitálja a folyamatot (**18.c ábra**). 3.) Az erőspektrumokat elemezve megállapítottuk, hogy plató erők multimodális eloszlást mutatnak, ahol az alap plató erő 22 pN szemben a vad típus esetén mért 41 pN nagysággal (**19. ábra**).



18. Ábra. Mechanikai manipulációnak kitett $A\beta_{25-35wt}$ azaz vad típusú és $A\beta_{25-35_K28Ac}$ fibrillumok típusos erőválaszai. **a.** Erő plató az $A\beta_{25-35wt}$ esetében. **b.** Erő plató az $A\beta_{25-35_K28Ac}$ esetében. A függőleges nyilak a plató erők nagyságát jelölik. **c.** Reverzibilis visszacipzározódást bemutató húzási görbe $A\beta_{25-35}$ Lys28 aminosav ϵ -amino csoportján acetilált peptidekből felépült fibrillum esetében. Az „R” szakaszok a húzási görbe reverzibilis szakaszát jelöli.

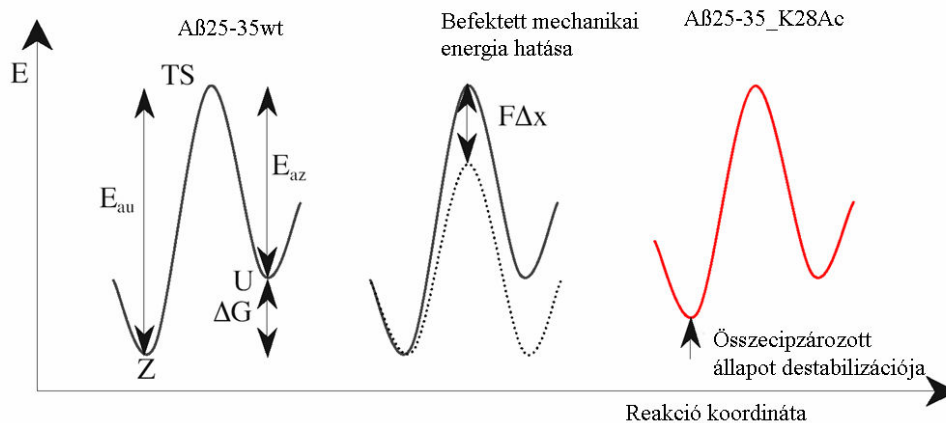


19. Ábra. *Aβ25-35_K28Ac* peptid Lys28 aminosav ε-aminocsoportjának acetilálása hatására a kontrol *Aβ25-35wt* fibrillumokhoz képest a plató erő lecsökken.

Az eredményekből levonható az a következtetés, hogy az Aβ25-35 peptid Lys²⁸ aminosav ε-aminocsoportjának szerepe lehet a fibrillumok belső szerkezetének stabilizálásában. Továbbá a mechanikai manipulációnak kitett Aβ25-35_K28Ac peptidekből felépült fibrillumok is ugyanazokat a karakterisztikus jelenségeket mutatják, mint amiket az Aβ1-40, Aβ1-42 és Aβ25-35 esetében megfigyeltünk.

Feltételezhető, hogy a Lys²⁸ acetilálása során elvesztett pozitív töltésű csoportjának a hiányában nem képes interakcióba lépni egy másik, feltehetően szomszédos protofilamentumban elhelyezkedő peptid Met³⁵ C-terminálisával, így a protofilamentumokat összetartó kölcsönhatások jellege megváltozik. Az elsődleges szerkezetből kiindulva, a Lys²⁸ oldalláncának acetilálása után, a hidrofób-hidrofób kölcsönhatások fognak dominálni, melynek következtében a fibrillum mechanikai stabilitása lecsökkent, mint azt a szétcipzározási erő megváltozása mutatja.

Ez a változás jól szemléltethető egy olyan kétállapotú modellen (**20. ábra**), amiben a két stabil állapot megfeleltethető 1.) az összecipzározott fibrillummal, ahol az Aβ monomerek a fibrillumon belül kötve és rendezetten helyezkednek el, illetve 2.) a mechanikai hatásra szétcipzározódott fibrillummal, ahol az egyes Aβ monomerek oldalcsoportjai szabadabbá váltak.



20. Ábra. A mechanikai hatásra bekövetkező szétcipzározódás energia profilja, egy kétállapotú modellben, ahol a stabil állapot (Z) az összecipzározódott fibrillum, míg (U) jelöli szétcipzározott állapotot. A két végállapot között egy átmeneti állapot (TS) található. E_{au} és E_{az} jelöli az összecipzározáshoz illetve szétcipzározáshoz szükséges aktivációs energiát. A ΔG az U és Z állapotok közötti szabadenergia változás. A mechanikai erő megváltoztatja az energia profilt, a befektetett mechanikai energiával arányos módon ($F\Delta x$), ahol Δx a Z és U állapotok közötti karakterisztikus távolság a reakció koordináta mentén. Az A β 25-35_K28Ac esetében a ΔG csökkenést az összecipzározott (Z) állapot destabilizációjával lehet magyarázni.

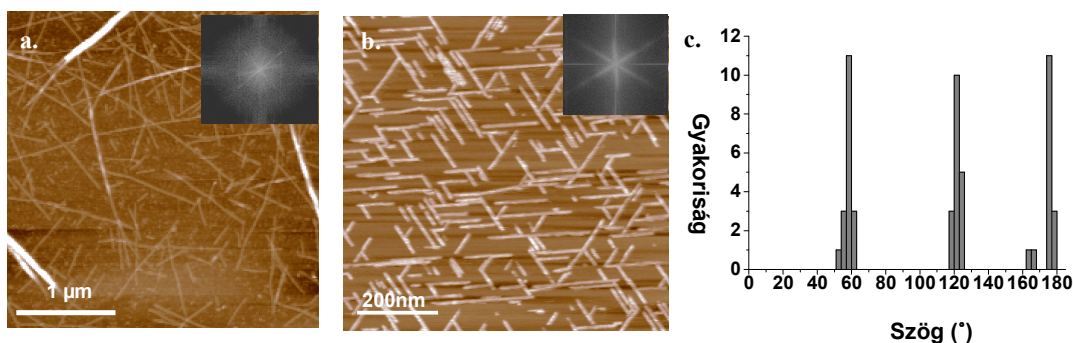
VI.4. A β 25-35 FIBRILLUMOK KÁLIUM FÜGGŐ ORIENTÁCIÓJA CSILLÁMFELSZÍNEN

VI.4.1. A β 25-35 FIBRILLUMOK MORFOLÓGIÁJA CSILLÁMFELSZÍNEN

AFM segítségével megvizsgáltuk csillámfelületre adszorbeált A β 25-35 fibrillumok morfológiáját. A fibrillumok rájuk jellemző módon, nem véletlenszerűen mintázatot alakítanak (**21.a ábra**) ki, hanem szabályos trigonális elrendeződésben orientálódnak a felületen (**21.b ábra**). Hasonló elrendezést figyeltek meg α -synuclein esetében csillámfelületen (Hoyer et al., 2004).

A csillám felülete negatív, hidrofil, hexagonális kristályszerkezetű (Franzini, 1969). Felszíni oxigén atomok mintegy 0,52 nm átmérőjű hatszögekbe rendeződve helyezkednek el, negatív töltésű és szintén hexagonális mintázatot mutató K⁺ kötőhelyeket alakítva ki. Két szomszédos K⁺ kötőhely távolsága szintén 0,52 nm. A csillám hasítása esetén ezek a kötőhelyek szabaddá válnak, mivel a K⁺ ionok elektrosztatikus kölcsönhatással kapcsolódnak a kötőhelyekhez. A minta felcseppentésekor a gyengén kötött K⁺ ionok képesek az oldatba diffundálni, kialakítva egy dinamikus egyensúlyt a szabad és telített kötőhelyek arányában. Ez az egyensúly elsősorban a minta illetve a puffer K⁺ tartalmának függvénye.

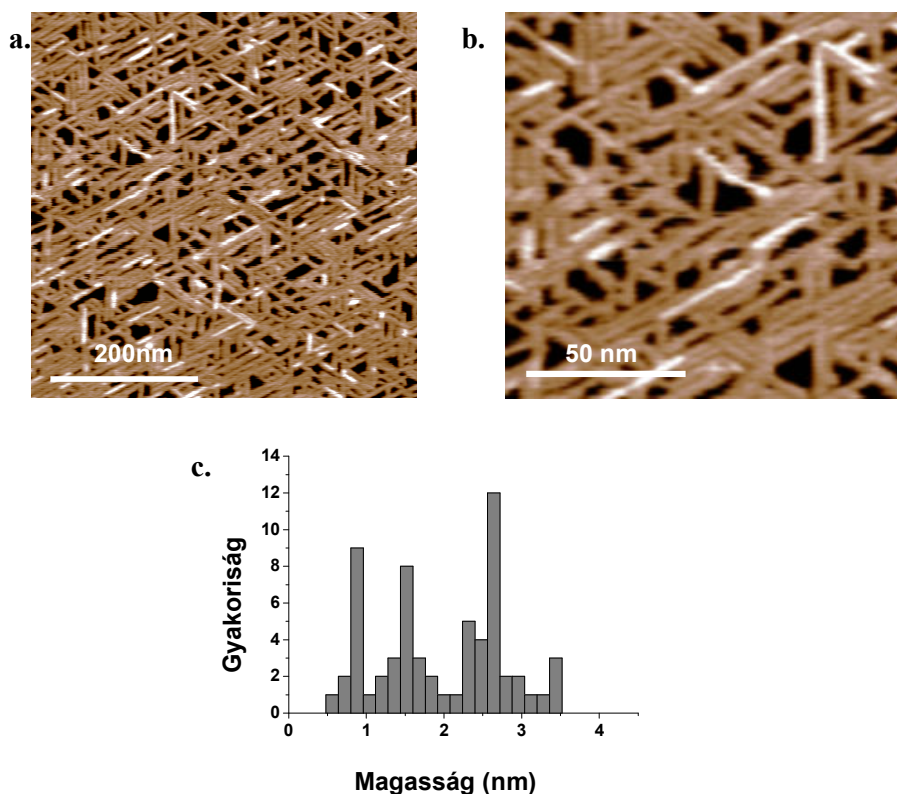
A csillám kristályszerkezete és a fibrillumok által kialakított hexagonális mintázat egyezése önmagában sugallja azt a lehetőséget, hogy a csillám rendezett kötőhelyei határozzák meg a fibrillumok elhelyezkedését.



21.Ábra. a. GOPS kezelt üvegfelületre kötött A β 25-35 fibrillumok morfológiailag heterogének és véletlenszerű eloszlást mutatnak. (Pásztázó atomerő-mikroszkópos, oszcillációs üzemmódban, pufferben felvett magasságkontraszt felvétel) **Betétábra:** AFM kép 2D Fourier Transzformációja. **b.** Csillámfelületre adszorbeált A β 25-35 fibrillumok jellegzetes trigonális elrendeződésben. **Betétábra:** AFM kép 2D Fourier Transzformációja. (Pásztázó atomerő-mikroszkópos, oszcillációs üzemmódban, pufferben felvett magasságkontraszt felvétel) **c.** Fibrillumok három fő irányának szögeloszlása, egy horizontális referencia vonalhoz képest.

Frissen készített, a peptidek feloldása után azonnal csillámfelületre vitt minta esetében, az A β 25-35 fibrillumok orientált hálózata gyors kinetikával, másodpercek alatt, alakul ki. A hálózatra jellemző az orientált elrendeződés, az egymást át nem fedő fibrillumok (**22.a,b ábra**), melyek diszkrét, ~0,8 nm-es magasságkülönbségeket mutatnak (**22.c ábra**).

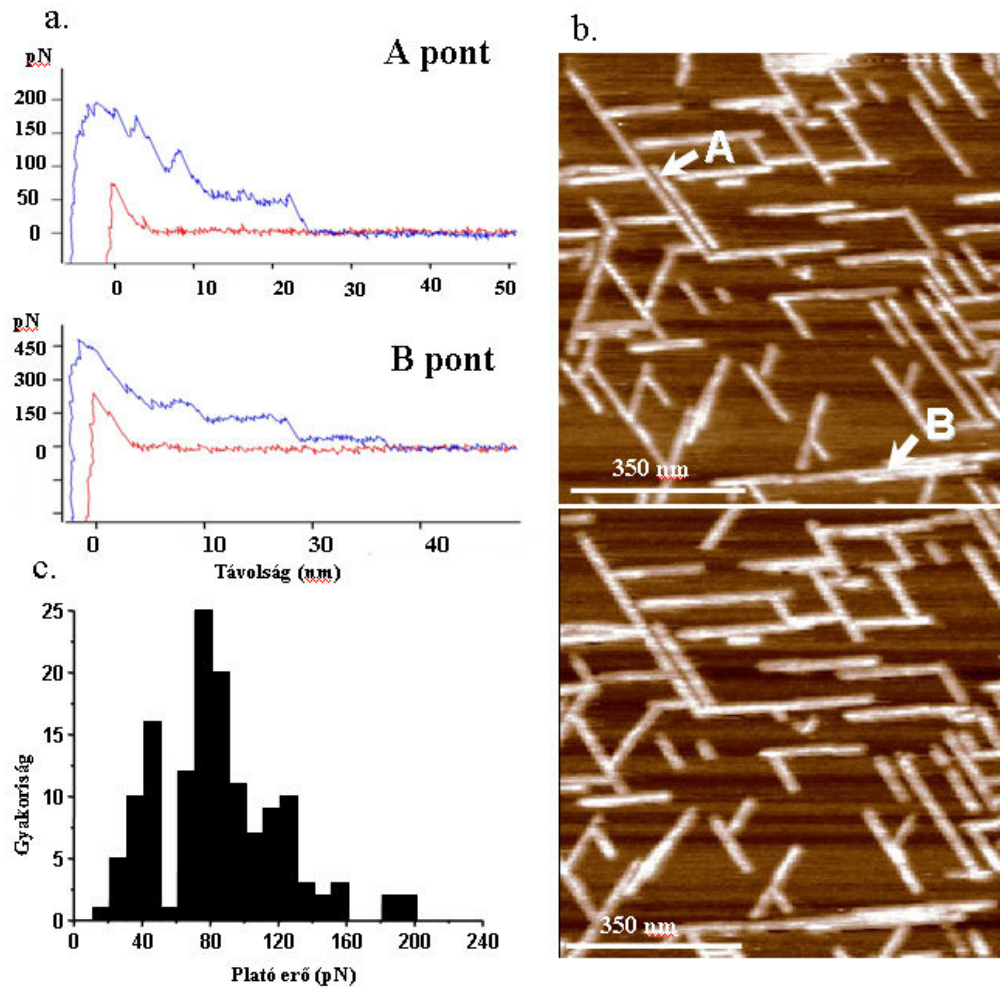
Ez a ~0,8 nm-es magasságkülönbség megegyezik egy β -lemez vastagságával, tehát a csillámfelületen kialakuló fibrillumok feltehetően változó számú, a fibrillum hossz tengelyére merőlegesen egymáshoz kapcsolódó β -lemezből épülnek fel, melyek a fibrillum hossz tengelyében, hidrogén hidakkal összekapcsolódva protofilamentumokat alakítanak ki.



22. Ábra. *a.* Orientált A β 25-35 fibrillumokkal sűrűn fedett csillámfelület. (A kép magasságkontraszt felvétel, pufferben, oszcillációs üzemmódban készült.) *b.* Digitálisan kinagyított részlet az (a) képből, melyen jól látható, hogy az egyes fibrillumok végei más fibrillumokkal szorosan érintkezve, egymást át nem fedve helyezkednek el. *c.* A fibrillumok magassága multimodális eloszlást mutat. A lokális maximumok közti különbség ~0,8 nm.

VI.4.2. A β 25-35 FIBRILLUMOK IN-SITU ERŐSPEKTROSKÓPIÁS VIZSGÁLATA

Csillámfelületen orientáltan elhelyezkedő A β 25-35 fibrillumok in situ erőspektroszkópiás vizsgálata során ugyanolyan típusú erőátmeneteket illetve spektrumokat regisztráltunk, mint azt a korábban más típusú felületre adszorbeált A β 25-35 fibrillumok esetében tapasztaltuk. A spektrumokon a plató típusú erőátmenetek domináltak **(25.a ábra)**. Megállapítottuk, hogy egyetlen protofilamentum lefejtéséhez szükséges erő nagyságában nincs eltérés. A többszörös erő platókat mutató spektrumok utalnak arra, hogy a csillámfelülethez kötődő A β 25-35 fibrillumok felépítése ugyanazt a hierarchiát követi, mint az oldatban növesztett és GOPS aktivált üvegfelületre adszorbeált fibrillumok. Mivel az alap plató erő ugyanolyan nagyságú, azaz 41 pN **(23.c ábra)**, feltételezhető, hogy a fibrillumokat összetartó kölcsönhatásokban nincs eltérés. Az in situ erőspektroszkópiás mérések során, a mechanikai manipulációnak kitett fibrillumokban, a korábbi mérésekhez hasonlóan, morfológiai eltérést nem tapasztaltunk, a fibrillumot a csillámfelületről nem távolítottuk el **(23.b ábra)**.

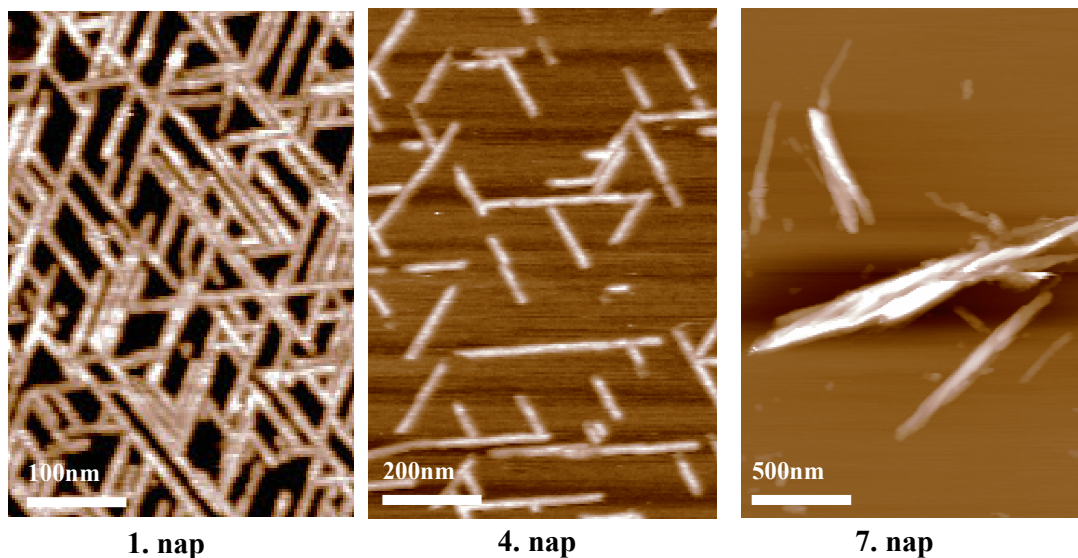


23. Ábra. Csillámfelületen orientáltan kötődő A β 25-35 fibrillumok in-situ erőspektroszkópiája. **a.** A és B pontokon mért erőspektrumok. **b.** Csillámfelületen orientáltan rendeződő A β 25-35 fibrillumok magasságkontraszt képe, az erőspektroszkópia előtt (felső kép) és a mechanikai manipuláció után (alsó kép). A mechanikai manipuláció helyét nyilak jelölik. **c.** A plató erők eloszlásának hisztogramja.

Eredményeink szerint a plató erők multimodális eloszlást mutatnak, öt lokális maximummal. Ez a megfigyelés összhangban áll a fibrillumok magasság eloszlásának vizsgálatokor kapott eredményeinkkel. Feltételezhető, hogy a csillámfelületen orientáltan kötődő A β 25-35 fibrillumokat változó számú, maximum öt protofilamentum építi fel.

VI.4.3. AZ ORIENTÁLT ELRENDEZŐDÉS KONCENTRÁCIÓ FÜGGÉSE

Amennyiben a peptidek beoldása után a törzsoldatot hagyjuk inkubálódni, egy nap elteltével csillámfelületre cseppentve a minta egy részét, orientált fibrillumokkal sűrűn behálózott felszín figyelhető meg. Négy nap után kicseppentett és megvizsgált minta esetében a felszín csökkent fedettsége figyelhető meg, majd a hetedik napra orientált fibrillumok helyett gyengébb affinitással kötődő, rendezetlen szerkezetű aggregátumok láthatók (24.ábra).

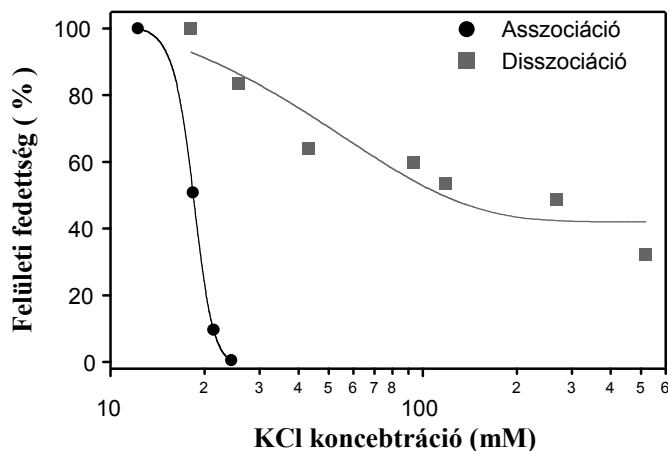


24. Ábra. *Eltérő ideig oldatban növesztett, majd csillámfelületre vitt A β 25-35 minták AFM képe. (A képek magasságkontraszt felvételek, puffemben, oszcillációs üzemmódban készültek.)*

Ebből a megfigyelésből levonható az a következtetés, hogy trigonális orientációt csak a fibrillum érés egy adott, kezdeti szakaszán álló A β 25-35 populáció – feltehetően monomerek illetve oligomerek képesek kialakítani. A fibrillum érés előrehaladtával csökken ennek a populációnak az aránya a nagyobb fibrillumokhoz és aggregátumokhoz képest, melyek kötődési affinitása sokkal gyengébb, trigonális orientációt pedig nem mutatnak.

VI.4.4. AZ ORIENTÁLT KÖTŐDÉS KÁLIUM FÜGGÉSE

Az A β 25-35 fibrillumok orientált kötődése csillámfelszínhez erősen függ a médiumban lévő K⁺ koncentrációtól (25.ábra). K⁺ koncentráció növelésével gátolható az újabb fibrillumok letapadása. Ehhez a jelenséghez hasonlóan a már csillámfelszínhez kötődött fibrillumok megemelt K⁺ koncentráció hatására disszociálnak a felszínről. Ugyanakkor nagy eltérés mutatkozik a K⁺ érzékenység tekintetében a kötődést gátló koncentrációtartomány és a disszociációt előidéző koncentrációtartomány között.



25. Ábra. Az A β 25-35 kötődését már 12 mM K⁺ hozzáadása gátolja (szürke körök), míg 500 mM K⁺ hatására a lekötődött fibrillumok 60% disszociálódik (fekete négyzetek).

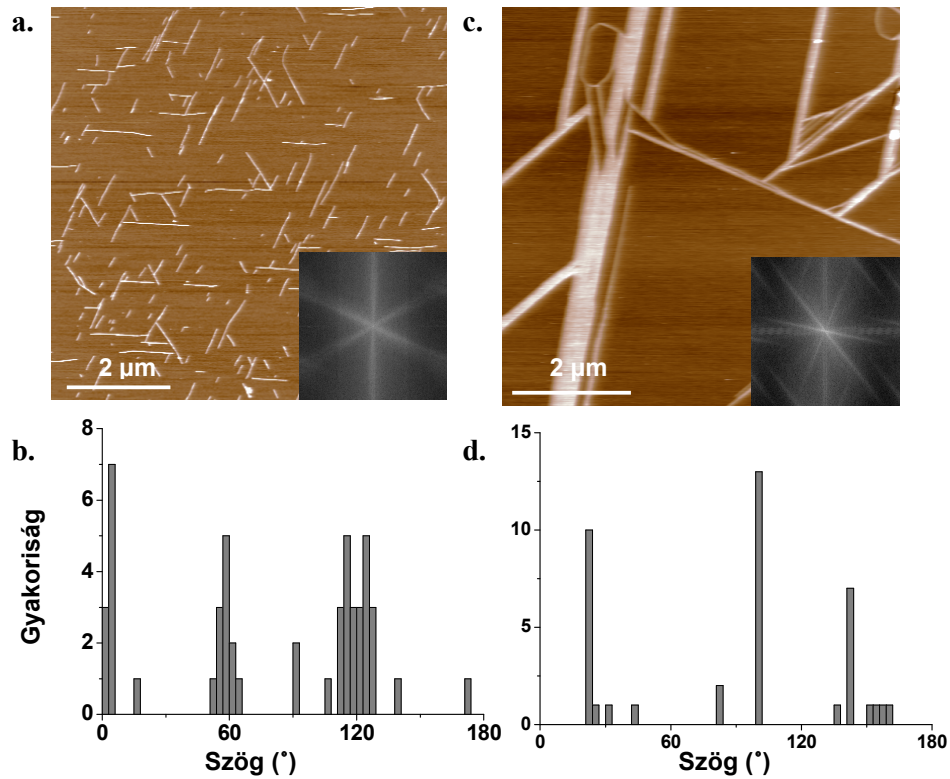
Ez a megfigyelés alátámasztja azt a hipotézist, hogy az A β 25-35 fibrillumok esetében elektrosztatikus kölcsönhatások határozzák meg a felszíni orientációt, melyek a fibrillumot felépítő egyes A β 25-35 peptidek valamely töltéssel rendelkező oldallánca és a csillám K⁺ kötőhelye között alakul ki.

VI.4.5. AZ A β 25-35 ACETILÁLT VARIÁNSAINAK ORIENTÁCIÓJA CSILLÁMFELSZÍNEN

Az A β 25-35 peptid két olyan pozitív töltésű csoporttal rendelkezik, melyek képesek lehetnek interakcióba lépni a csillámfelszín K⁺ kötőhelyeivel. Az egyik az N-terminális aminocsoportja, a másik a Lys28 ϵ -aminocsoportja. Ezt a hipotézist olyan A β 25-35 variánsokkal kívántuk tesztelni, melyek esetében az említett aminocsoportokat a peptidszintézis során acetilálták.

Az A β 25-35_G25Ac fibrillumok a csillámfelszínen a vadtypushoz hasonlóan, trigonális elrendezésben orientálódnak, de a fibrillumok által bezárt szög sokkal nagyobb szórást mutat, **(26.ábra)** illetve megfigyelhetők olyan fibrillumok és fibrillum szakaszok, melyek jelentős mértékben eltérnek a fő orientációs iránytól.

Az A β 25-35_K28Ac fibrillumok viselkedése ezzel szemben nagymértékben eltér a vadtypustól. Bár az elrendezés dominánsan trigonális, a fibrillumok által bezárt szög nem szabályos 60°, mint ez a szögeloszlási hisztogramon látható, valamint az A β 25-35_K28Ac fibrillumok képesek ellipszoid alakú struktúrákat létrehozni. A fibrillumok növekedését követve egymás után készített felvételeken, kiderült, hogy ezek az ellipszoid alakba rendeződő fibrillumok jelennek meg először a felszínen, melyek tartalmaznak olyan szakaszokat, melyek semmiféle kitüntetett irányt nem respektálnak. Az őket követően kialakuló fibrillumok jelentős hányadára jellemző laterális asszociációjuk, mely egy erősen inhomogén fibrillum eloszlást eredményez a felszínen. Ez elsődlegesen az A β 25-35_K28Ac és csillámfelszín közötti gyenge interakcióra lehet visszavezethető. Feltételezhető, hogy a laterális kapcsolódás stabilizálhatja a csillámfelszínhez kötődő új fibrillumokat és másodlagosan elősegítheti a fibrillumok lineáris irányú növekedését.



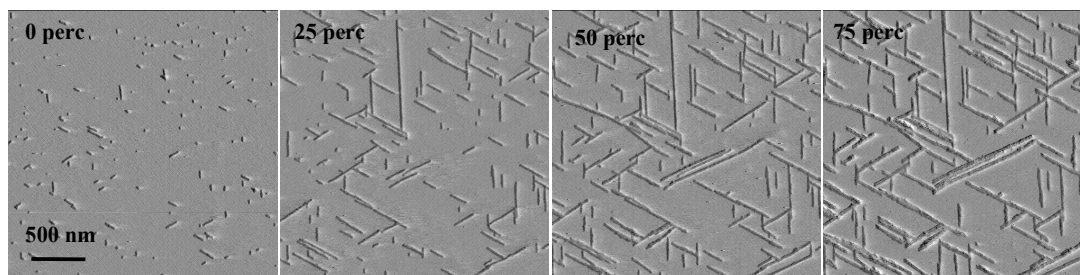
26. Ábra. a. $A\beta_{25-35_G25Ac}$ fibrillumok csillámfelületén. **b.** Az $A\beta_{25-35_G25Ac}$ fibrillumok szögeloszlási histogramja. **Betétábárák:** AFM kép 2D Fourier Transzformációja. (A képek magasságkontraszt felvételek, pufferben, oszcillációs üzemmódban készültek.) **c.** $A\beta_{25-35_K28Ac}$ fibrillumok csillámfelületén. **d.** $A\beta_{25-35_K28Ac}$ fibrillumok szögeloszlási histogramja.

Megállapítható, hogy az N-terminális aminocsoportja részt vesz a trigonális elrendeződés kialakításában, de szerepe feltehetőleg másodlagos, a Lys²⁸ ϵ -aminocsoportjához képest, mely eredményeink szerint elsősorban felelős a szabályos trigonális elrendeződés kialakításáért.

Megjegyzendő, hogy a kettősen acetilált $A\beta_{25-35}$ peptidek esetében semmiféle kötődést nem sikerült kimutatni csillámfelületén.

VI.4.6. A β 25-35 FIBRILLUMOK NÖVEKEDÉSE CSILLÁMFELSZÍNE

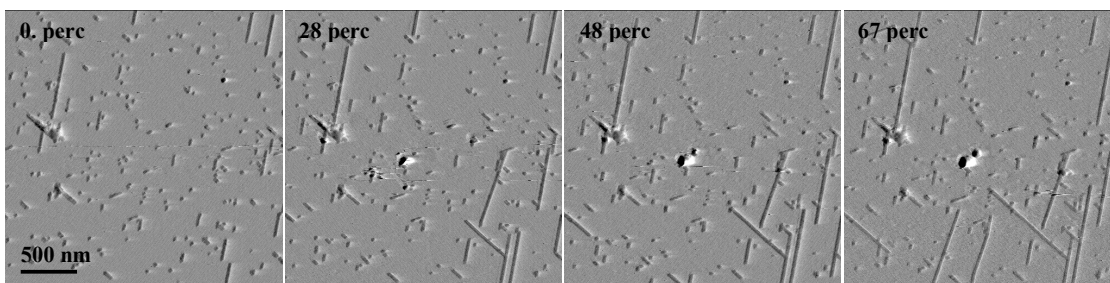
Csak A β 25-35 peptideket tartalmazó mintákon elvégzett időfüggő AFM mérésekből kiderült, hogy az A β 25-35 fibrillumok a csillámfelszínen alakulnak ki (**27.ábra**). A mérés kezdetén globuláris jellegű, tehát az alkalmazott rugólap túátmérőjével összevethető méretű, partikulumok és rövid, 50-100 nm hosszú fibrillumok figyelhetők meg. Ezek alkotják a kezdeti növekedési magokat, melyekből kiindulva a felszínen nőnek ki az orientált fibrillumok. A hálózat növekedése során újabb kiindulási magok is keletkeznek, az oldatból a csillámfelszínre kötődő – feltehetően – A β 25-35 oligomerekből, melyekből újabb fibrillum növekedés indul. A növekedés egészen addig tart, 1.) amíg a növekvő fibrillum bele nem ütközik egy másik fibrillumba, illetve 2.) amíg szabad monomerek állnak rendelkezésre. Megfigyeltük, hogy a fibrillumok mindkét végükön növekednek, a növekedési sebesség pedig elérheti a 100 nm/perc értéket.



27. Ábra. Csillámfelszínen növekvő A β 25-35 fibrillumok amplitúdókontraszt AFM képei, melyek ugyanarról a területről készültek, folyamatos pásztázás mellett. Az egyes képek között eltelt idő a képek bal felső sarkában van jelölve.

Ha a kezdeti növekedési magok kialakulása után, a csillám pufferes lemosásával leállítjuk a folyamatot és lecseréljük a mintát 30 mM K⁺ iont is és A β 25-35 monomereket tartalmazó mintára, újabb növekedési magok nem alakulnak ki, mivel (mint ezt korábban kimutattuk) 30 mM K⁺ nagymértékben gátolja az A β 25-35 peptidek illetve oligomerek kötődését. Ugyanakkor a már kialakult fibrillumok a csillámfelszínről nem disszociálnak, mivel ehhez sokkal magasabb K⁺ koncentráció lenne szüksége (**25.ábra**).

Megfigyelhető (**28.ábra**), hogy, újabb növekedési magok nem alakulnak ki a felszínen, de a már kialakult magok illetve fibrillumok növekedése a megemelt K⁺ koncentráció ellenére tovább folytatódik.



28. Ábra. Csillámfelszínen, 30 mM K^+ jelenlétében növekvő A β 25-35 fibrillumok. A képek készítése előtt a felszín A β 25-35 magokkal lett bevonva 10 mM K^+ jelenlétében. Megjegyzendő, hogy 30 mM K^+ jelenlétében új magok lekötődése gátolt, ugyanakkor fibrillum növekedés megfigyelhető. Amplitúdókontraszt AFM képek ugyanarról a területről készültek, folyamatos pásztázás mellett. Az egyes képek között eltelt idő a képek bal felső sarkában van jelölve.

Tehát a csillámon történő fibrillum növekedés esetében két különböző interakciónak van kulcsfontosságú szerepe: 1.) a peptid kötődése a csillámfelszín K^+ kötőhelyéhez. 2.) a peptid kötődése a fibrillumok szabad végéhez.

Az első esetben egy elektrosztatikus kapcsolat jön létre, elsősorban az A β 25-35 peptid Lys²⁸ ϵ -aminocsoportja, másodlagosan az N-terminális aminocsoportja és a csillám K^+ kötőhelye között. Ebben az interakcióban a K^+ mint kompetitív inhibitorként viselkedik. A peptidek illetve oligomerek csillámhoz való kötődése a kezdeti növekedési magok, és így a magoknak az orientált fibrillumoknak a kialakulása szempontjából kulcsfontosságúak.

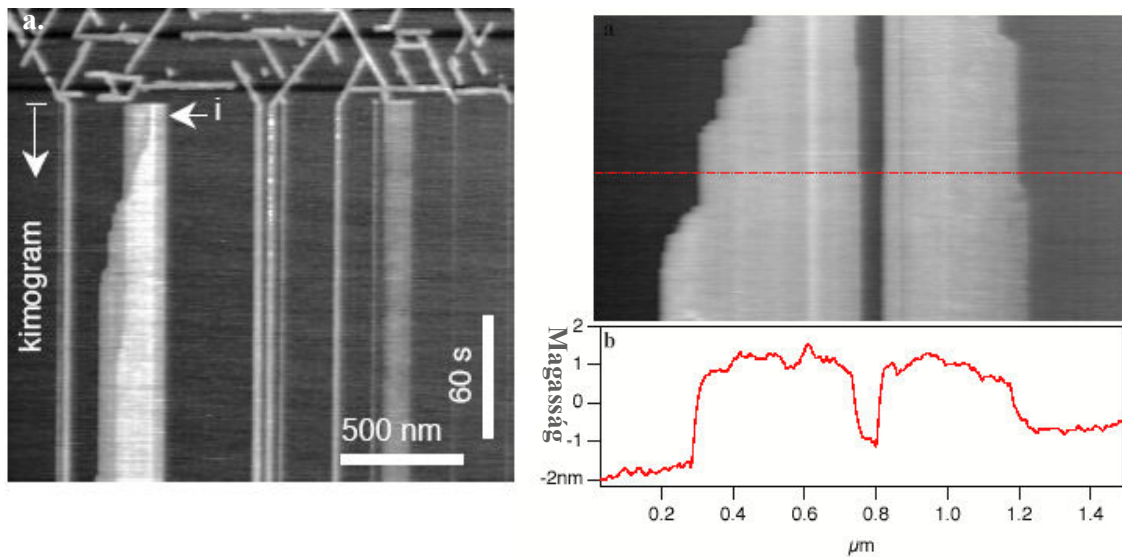
A második interakcióban a hidrogén hidak alakulnak ki két szomszédos peptid között, a peptid fibrillum véghez történő kötődése során. Kísérleteink tanulsága szerint ez a lépés nagyban csökkenti a folyamat K^+ érzékenységét, feltehetőleg úgy, hogy a már felszínhez kötődött fibrillum stabilizálja a beépülő peptidet.

Tehát a kialakuló rendezett mintázat sűrűsége, az egyes fibrillumok hossza illetve a fibrillumok közötti átlagos távolság a K^+ koncentráció illetve A β -peptid koncentráció változtatásával modulálható. Ez a tény felveti az orientált elrendeződést mutató A β 25-35 hálózatok nanotechnológiai alkalmazhatóságát.

VI.5. A β -FIBRILLUMOK VIZSGÁLATA PÁSZTÁZÓ PRÓBA KIMOGRÁFIÁVAL

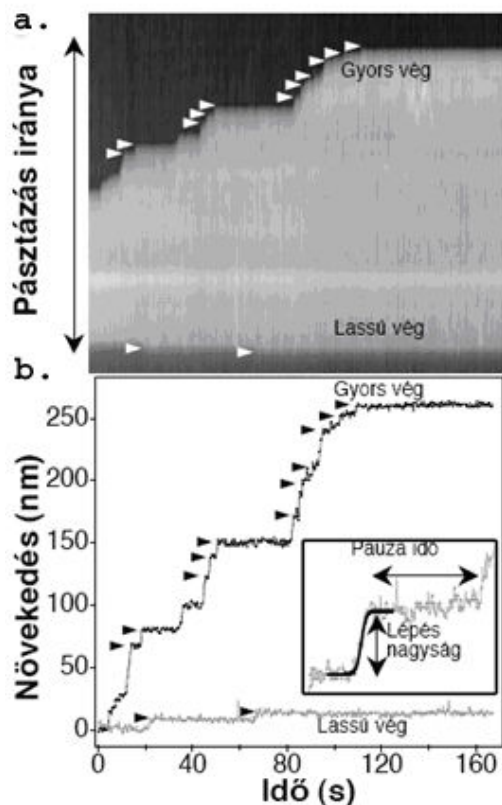
VI.5.1 A β 25-35 FIBRILLUMOK NAGYFELBONTÁSÚ NÖVEKEDÉSI DINAMIKÁJA

A pásztázó próba kimográfia egy, a laboratóriumunk által a világon elsőként alkalmazott, vizsgálati módszer, mellyel egyedi amyloid fibrillumok növekedési dinamikáját követtük nagy tér- és időfelbontással.



29. Ábra. a. A β 25-35 fibrillumok pásztázó próba kimogram felvétele. A 2D kép kimogrammá alakul a vertikális pásztázás leállítását követően. A szürkeintenzitás a topográfiai magasságot jelenti. **b.** Két egyvonalban elhelyezkedő, de a gyorsan növő véget tekintve, ellentétes irányba növekvő A β 25-35 fibrillum kimogramja (felül). A követett fibrillumok magasság profiljából látható, hogy egy több protofilamentumból álló fibrillumot vizsgáltunk. A fibrillum magassága $\sim 2,8-3,0$ nm.

Az A β 25-35 fibrillumok pásztázó próba kimogramjai alapján következő megfigyeléseket tettünk: 1.) fibrillumok mindkét végükön nőnek, de az egyik végen (gyors vég) a növekedés jóval gyorsabb, mint a másikon (lassú vég). 2.) A fibrillumok nem csupán a csillámfelületen növekednek, hanem egy már meglévő fibrillum felületén is (**29.ábra**). Az ilyen fibrillum növekedési dinamikája hasonló a csillám felületén növekedőéhez. 3.) A fibrillumok nem folyamatosan, hanem a diszkontinuus, ugrásszerű növekedési mintát mutatnak. Hirtelen, gyors, lépcszerű növekedési periódusok váltakoznak növekedési szünetekkel vagy pauzákkal. (**30.a ábra**). A nettó fibrillumnövekedés voltaképpen egymást követő ugrások és pauzák sorozata



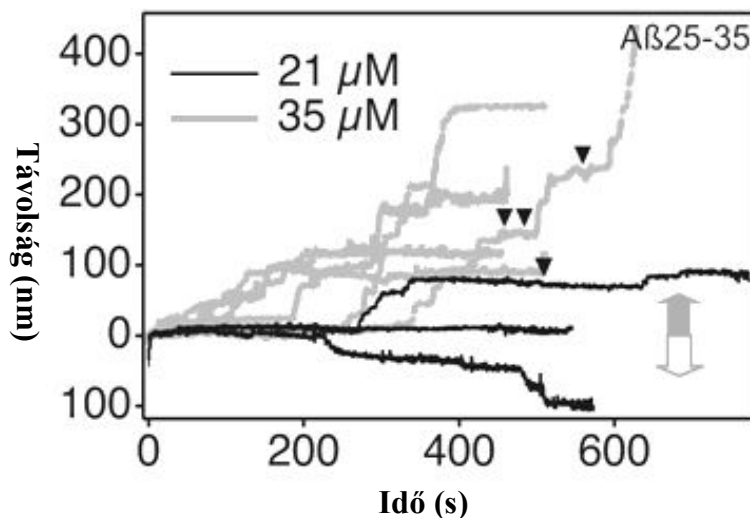
30. Ábra. a. Kimogram. **b.** Kimogram időfüggő adatsorrá alakítva. A fehér és fekete nyílhegyek az apró diszkrét növekedési átmeneteket mutatják. **Betét ábra:** Szigmoid függvény illesztése egy lépcső alakú polimerizációs átmenetre.

Adaptált képanalízis algoritmusok segítségével a képi információt adatsorrá alakítottuk át (**30.b ábra**). A növekedési lépéseket szigmoid függvénnyel jellemeztük (**30.b betétábra**) és megkaptuk a lépésmagyságot, a lépési időt és a lépési sebességet. A pauza az egymást követő lépések között eltelt idő. A pauza exponenciális eloszlást mutat, a gyors végén $32.3 \text{ s} \pm 0.8 \text{ s}$ időállandóval.

Becsléseink szerint a lassú végén az átlagos pauza egy nagyságrenddel nagyobb. A lépésmagyság hisztogram multimodális eloszlást mutat, melyben a csúcsok 8 nm-nél és ennek integrális többszöröseinél jelentkeznek mind a gyors, mind a lassú vég esetében. 4.7 nm-es β -lemez periodicitást feltételezve a 8 nm-es távolság 17 peptid alegység hosszúságú fibrillumdarabot jelent. A lépési sebesség – lépési idő diagram inverz összefüggést mutat, amely egybevághat a megfigyelt konstans, diszkrét lépésmagysággal. Az átlagos lépési sebesség $4.37 \pm 0.09 \text{ nm/s}$, de ennél jóval nagyobb, akár 100 nm/s sebességek is előfordultak. Összehasonlításképpen, korábbi nettó fibrillumnövekedési sebességek más típusú felszíneken, fluoreszcens mikroszkópos technikák alkalmazásával $\sim 0.02 \text{ nm/s}$ és $\sim 3 \text{ nm/s}$ közé estek. Ez

azt jelentheti, hogy a csillámfelszín nem csupán a növekedés irányát szabja meg, de facilitálja is a fibrillumok növekedését.

A lépésekben történő növekedés magyarázatára egy modellt állítottuk fel. A növekvő fibrillum egy bizonyos számú növekedési lépést követően a blokkolt állapotba kerül, amit pauza formájában látunk a kimogramon. Feltételezzük, hogy az újonnan beépült peptidek és így a fibrillum növekvő vége, szerkezetileg eltér a fibrillum többi részétől. Ez az eltérés okozza a növekedés hirtelen leállítását. A fibrillum vég egészen addig marad blokkolt állapotban, amíg az újonnan beépült peptidek konformációs változáson mennek keresztül. Ez a változás elősegíti, hogy blokkolt állapotból ismét a növekedési állapotba kerüljön a fibrillum. Ez a szerkezeti átalakulás a paúzák ideje alatt zajlik le. Elképzelésünket erősíti az a megfigyelés, hogy a paúzák időtartama nem mutat semmilyen összefüggést a peptid koncentrációval.

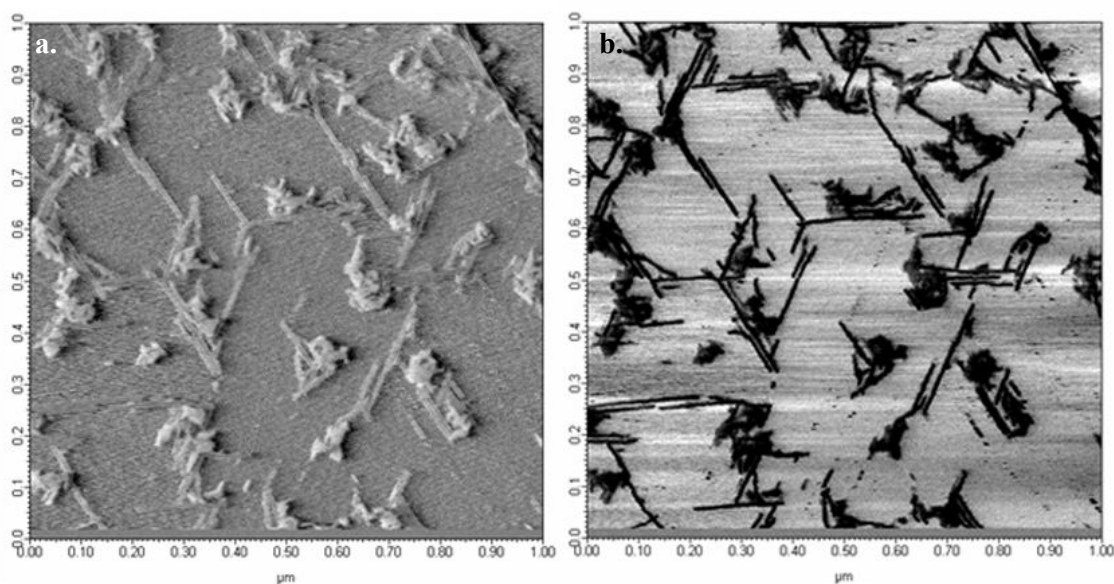


31. Ábra. Polimerizációs és disszociációs lépések különböző A β 25-35 peptid koncentráció mellett elvégzett kimográfias mérések esetében. A 35 μ M peptid koncentráció mellett a polimerizáció dominál, ugyanakkor disszociációs lépések is megfigyelhetők (nyilakkal jelzett pontok) 21 μ M mellett elvégzett méréseknél a disszociáció, illetve a fibrillum növekedésének stagnálása sokkal dominánsabban jelentkezik.

A kimogramok alapos elemzésekor feltűnt, hogy nem csak felépülési, hanem kis számban disszociációs lépések is megfigyelhetők (**31.ábra**). Ez a jelenség visszavezethető lehet a pásztázó rugólap tüje által okozott mechanikai hatásra. Ugyanakkor a disszociációs lépések mechanizmusa valószínűleg ennél összetettebb, mivel korrelációt mutat a peptid koncentrációval.

VI.5.2. A β 1-42 FIBRILLUMOK NÖVEKEDÉSI DINAMIKÁJÁNAK VIZSGÁLATA

Az A β 25-35 esetében csillámfelületen megfigyeltékhez hasonló, trigonális mintázatot alakít ki az A β 1-42 HOPG felületén (32.ábra) (Kowalewski and Holtzman, 1999). A lienáris fibrillumok morfológiai sajátosságai lehetővé teszik, hogy növekedésüket pásztázó próba kimográfiával vizsgáljuk. HOPG felületén végzett kísérleteinkben arra voltunk kíváncsiak, hogy a diszkontinuos, lépésekben történő növekedés mennyire általános mechanizmus a felszín által irányított polimerizációt mutató A β -fibrillumok esetén.



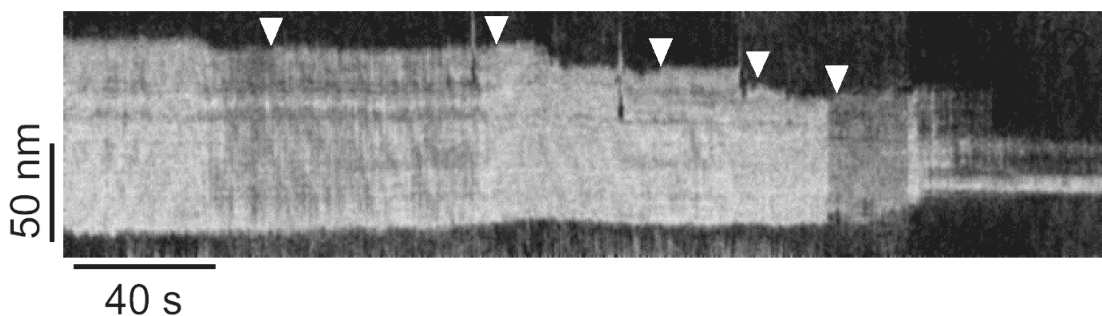
32. Ábra. Trigonális elrendeződést mutató A β 1-42 fibrillumok amplitúdó (a.) és fázis kontraszt (b.) felvétele HOPG felületén. A fibrillumok jellegzetes szigetszerű eloszlást mutatnak. A szigeteket alkotó rövidebb fibrillumok a növekedés kezdeti fázisában alakulnak ki. Ezt követően épülnek fel a szigetekből kinyúló hosszabb fibrillumok.

Az A β 1-42 esetében jelenség magyarázata, hogy a grafit felületén hexagonálisan mintázatban elhelyezkedő szénatomok három fő irányt jelölnek ki, melyek mentén az A β 1-42 peptidek hidrofób-hidrofób kölcsönhatással preferentáltan kapcsolódnak és trigonálisan orientált, fibrillumokra emlékeztető, hozzávetőlegesen 1nm magas, struktúrákat alakítanak ki. Az elfogadott modell szerint ezekben, a struktúrákban az A β 1-42 peptidek teljes hosszukban extendáltak, β -lemez konformációban helyezkednek el (Kowalewski et al.), oldalláncaikkal kötődve a grafit felületéhez. Az egyes peptideket hidrogén hidak kötik össze.

A fibrillumok jellegzetesen, (az alkalmazott koncentráció viszonyok esetében) 30-60 perces lag-fázis után indulnak növekedésnek. Magára a lag-fázisra a rövid fibrillumok megjelenése és laterális asszociációja jellemző. Ezt követően alakulnak ki, a laterálisan

asszociálódott fibrillumokból kinövő, a hosszabb, több száz nanométeres fibrillumok melyekre növekedésük során a lépésszerű hosszúságváltozások fluktuációja jellemző.

Az A β 1-42 fibrillumokról rögzített kimogramok esetében (**33.ábra**) megfigyeltük, hogy a fibrillumokra a lépésekben történő disszociáció túlsúlya jellemző. Ennek legvalószínűbb oka a pásztázó rugólap tűjének mechanikai hatása lehet. Az A β 1-42 fibrillumok, szemben az A β 25-35 fibrillumokkal a felszínhez gyenge kölcsönhatásokkal kapcsolódó, sokkal törékenyebb struktúrák. Ugyanakkor a kimogramon rögzített dinamika ugyanazokat a karakterisztikus jegyeket hordozza magán, mint amiket a csillámfelszínen növekvő A β 25-35 esetében megfigyeltünk: 1.) a hosszváltozás lépésekben történik. 2.) elkülöníthető egy gyors és egy lassú dinamikával változó fibrillum vég. Megjegyzendő, hogy az apró növekedési lépések csak a fibrillum egyik végén láthatók.



33. Ábra. A β 1-42 fibrillum kimogramja, fázis kontraszt felvételen. A kimogramon látható, hogy a disszociációs lépések dominálnak, ugyanakkor rövid növekedési lépések is megfigyelhetők a nyilakkal jelzett pontokon.

Megfigyeléseink felvetik azt a lehetőséget, hogy az a felszín által meghatározott növekedést mutató amyloidok esetében a lépésszerű növekedési dinamika általános jelenség lehet. Továbbá az általunk használt módszer alkalmas lehet más, lineárisan növekvő polimerek vizsgálatára, nagy idő és térbeli felbontással nyújtva betekintést felépülésük folyamatába.

VII. ÖSSZEFOGLALÁS

1. Megfigyeléseink alapján karakterizáltuk az Alzheimer-kór pathogenezisében szerepet játszó A β 1-42 és A β 1-40 továbbá A β 25-35 valamint A β 25-35 Lys²⁸ ϵ -acetilált amyloid β -fibrillumok “mechanikai ujjlenyomatát”, mely az amyloid belső szerkezetére, rugalmasságára, kölcsönhatásaira, és a kölcsönhatások dinamikájára utal.

Megállapítottuk, hogy az A β -fibrillumokra univerzálisan jellemző elemi mechanikai jelenségek: az erő platók, melyek megjelenése protofilamentumok fibrillumról történő deszorpciójával magyarázhatók, illetve nemlineáris rugalmas erőválasz, mely a hidrogén híd rendszer terhelésével hozható összefüggésbe. Továbbá megfigyelhető ezen erőválaszok hierarchikus egymásra épülése. Az elemi erőválaszok, illetve azok kombinációi a vizsgált A β amyloid fibrillumok esetében spektrális mintázatukban nem, csupán az erőválaszok nagyságában térnek el egymástól.

Ezek a megfigyelések felvetik annak a lehetőségét, hogy az általunk alkalmazott módszer alkalmas lehet a különböző peptidekből növesztett amyloid fibrillumok szerkezeti dinamikájának és fizikai-kémiai paramétereinek feltérképezésére. Az A β 25-35 valamint A β 25-35 Lys²⁸ ϵ -acetilált amyloid β -fibrillumokkal végzett kísérleteink külön rámutatnak a módszer érzékenységére.

2. Megállapítottuk, hogy az A β 25-35 fibrillumok esetében elektrosztatikus kölcsönhatások határozzák meg a felszíni orientációt, jelezve egyúttal azt, hogy az A β 25-35 fibrillumok felszíni tulajdonságai kevésbé hidrofób jellegűek, mint más amyloid fibrillumoké.

Az A β 25-35 acetilált variánsainak vizsgálatával megállapítottuk, hogy a Lys²⁸ ϵ -aminocsoportja kulcsfontosságú az orientált kötődés kialakításában.

Karakterizáltuk az orientált A β 25-35 kálium függő kötődését és disszociációját, valamint kimutattuk, hogy a trigonális hálózat a csillámfelszínhez kötött, irányított növekedés útján jön létre.

A kialakuló rendezett mintázat és annak modulálhatósága (K⁺ koncentráció, A β -peptid koncentráció változtatása) magában rejti a nanotechnológiai alkalmazhatóság lehetőségét.

3. Pásztázó próba kimográfiávia alkalmazásával betekintést nyertünk az A β 25-35 fibrillumok növekedésének dinamikájába. Megállapítottuk, hogy a fibrillumok növekedése során hirtelen, gyors, lépésszerű növekedési periódusok váltakoznak növekedési pauzákkal. A nettó fibrillumnövekedés voltaképpen egymást követő ugrások és pauzák sorozata. Továbbá a fibrillum végek eltérő növekedési rátát mutatnak, mely alapján elkülöníthető egy gyorsan és egy lassan növekvő vég.

Megfigyeléseink magyarázhatók egy olyan kétállapotú modellel, melyben az A β -fibrillum végei vagy növekvő, vagy blokkolt állapotban vannak. A blokkolt állapotban pauza lép fel, míg a növekvő állapotban gyors polimerizáció történik. A blokkolt állapotból a növekvőbe történő átmenet, és így a pauza időtartama, független a peptid koncentrációtól, jelezve, hogy a folyamatban peptidcsere nem megy végbe. Az átmenet során valószínűleg szerkezeti változás történik, mely elsőrendű kinetikát követ.

HOPG felszínen növekvő A β 1-42 fibrillumok esetében alkalmazott pásztázó próba kimográfiás vizsgálatokból megállapítottuk, hogy esetükben is hasonló növekedési dinamika figyelhető meg, mint amit csillámfelszínen az A β 25-35 fibrillumok esetében tapasztaltunk. Tehát itt is elkülöníthető volt az egyes végek eltérő növekedési, illetve disszociációs dinamikája, melyre lépésekben bekövetkező, időben pauzákkal elválasztott események voltak jellemzők. A kimográfiás mérések tanulsága szerint A β 1-42 fibrillumoknál a disszociációs lépések dominálnak, mely a gyengébb fibrillum-felszín interakcióra illetve intrafibrilláris szerkezetre vezethető vissza.

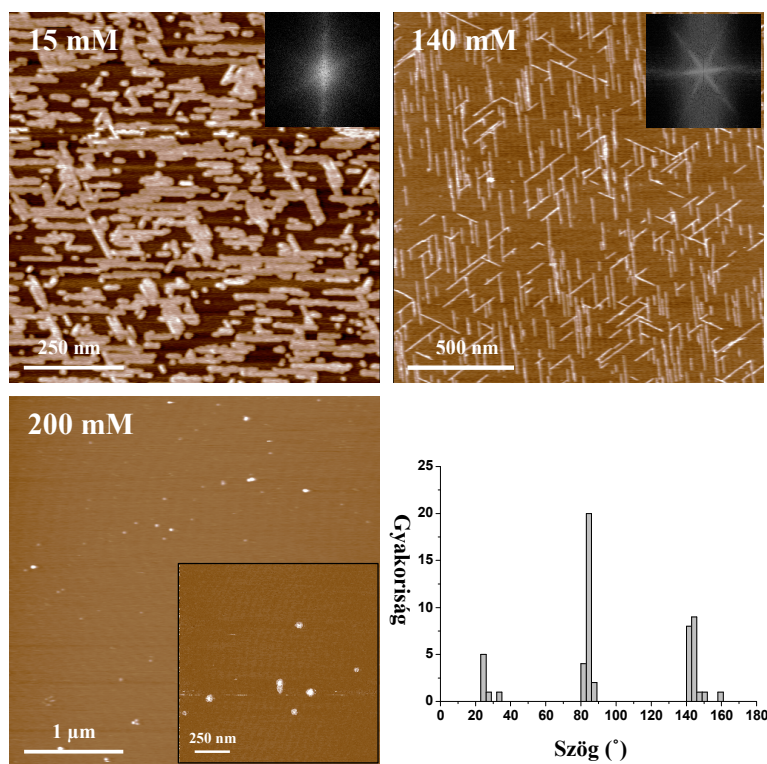
Feltételezzük, hogy a megfigyelt diszkontinuos, lépésszerű növekedési dinamika általánosan jellemző lehet a felszín által irányított növekedés mutató amyloid fibrillumokra.

VIII. PERSPEKTÍVÁK

A laboratóriumunkban létrehozott és karakterizált, csillámfelületen trigonálisan orientálódó A β 25-35 amyloid hálózat már önmagában számos olyan tulajdonsággal bír, mely felveti a gyakorlati, nanobiotechnológiai alkalmazhatóság lehetőségét. Igazi perspektívát azonban egy olyan rendezett nanohálózat jelenthetné, mely túl a rendezett és kontrollálható szerveződésen, specifikusan, a felhasználás igényeinek megfelelően ruházható fel tulajdonságokkal.

Ennek érdekében teszteltük az A β 25-35 egy módosított változatát, ahol a 26. pozícióban elhelyezkedő aszparagin aminosavat egy cysteinre cseréltünk. Az így létrehozott A β 25-35_N26C peptidek szabad SH csoportja lehetővé teszi, hogy a peptid által kialakított fibrillumok kémiai címezhetőek legyenek.

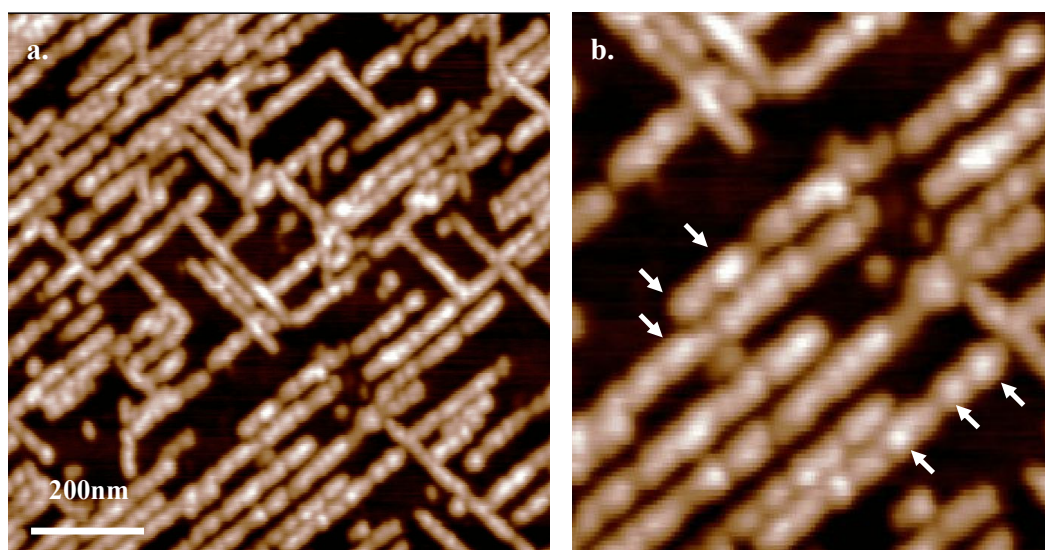
Kísérleteink során kiderült, hogy az A β 25-35_N26C fibrillumok a csillámfelületen az A β 25-35 fibrillumokhoz nagyon hasonlóan viselkednek (**34. ábra**).



34. Ábra A β 25-35_N26C fibrillumok Na⁺ függő trigonális orientációja csillámfelületen. **Betétábrák:** AFM kép 2D Fourier Transzformációja. (A képek magasságkontraszt felvételek, pufferben, oszcillációs üzemmódban készültek.) Az ábrán szereplő hisztogram a 140 mM Na⁺ jelenlétében megfigyelt hálózat szögeloszlását mutatja.

A hálózat a csillámfelületen, jön létre, kialakítva a szabályos trigonális orientációt. Szignifikáns eltérés csupán a K^+ szenzitivitás terén észleltünk. Tapasztalataink szerint az A β 25-35_N26C fibrillumok K^+ és Na^+ ionok jelenlétére sokkal érzékenyebbek a növekedés fázisában. Tapasztalataink szerint a hálózat tulajdonságai a Na^+ koncentráció változtatásával könnyebben befolyásolhatók.

Előkísérleteinkben maleimiddel konjugált nano-arany partikulumokat kötöttünk a kialakult fibrillumokhoz. Eddigi eredményeink arra utalnak, hogy az 1,4 nm átmérőjű arany részecskék specifikusan kötődnek a fibrillumok szabad SH csoportjaihoz. Így az A β 25-35_N26C fibrillumokból elektromosan vezetőképes, nanohálózat hozható létre (35. ábra).



35. Ábra. *a.* Nano-arany partikulumokkal részlegesen bevont, trigonálisan orientált A β 25-35_N26C fibrillumok csillámfelületén. *b.* A digitálisan kinagyított képrészleten megfigyelhetők gyöngyszerűen sorakozó, nano-arany partikulumokkal borított fibrillum szegmensek. Nyilak jelölik a legtipikusabb részeket.

A megfelelő keresztköttők alkalmazásával, elvileg bármilyen molekuláris biológiai módszerekkel módosított protein hozzákapcsolható a hálózat szabad SH csoportjaihoz, melyek elvileg nanométeres denzitás mellett alakíthatók ki a csillámfelületen. Az így létrehozott nano-array lehetőségeinek tesztelése intenzív kutatás tárgyát képezi jelenleg is laboratóriumunkban.

IX. PUBLIKÁCIÓS LISTA

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények

1. Kellermayer, M.S.Z., Grama, L., Karsai, Á., Nagy, A., Kahn, A., Datki, Z. and Penke, B. Reversible unzipping of amyloid β -fibrils. *J. Biol. Chem.* **280(9)**, 8464-8470, 2005.
IF 5,854 (2005)
2. Karsai, Á., Nagy, A., Kengyel, A., Mártonfalvi, Zs., Grama, L., Penke, B. and Kellermayer, M.S.Z. Effect of lysine-28 side chain acetylation on the nanomechanical behavior of Alzheimer amyloid β 25-35 fibrils. *J. Chem. Inf. Mod.* **45 (6)**, 1641-1646, 2005.
IF 2.81 (2004)
3. Karsai, Á., Mártonfalvi, Zs., Nagy, A., Grama, L., Penke, B. and Kellermayer, M.S.Z. Mechanical manipulation of Alzheimer's amyloid β 1-42 fibrils. *J. Struct Biol.* **155**, 316-326, 2006.
IF 3.49 (2005)
4. 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
IF.:3,037 (2006)
5. Kellermayer MS, Karsai A, Benke M, Soós K, Penke B.
Stepwise dynamics of epitaxially growing single amyloid fibrils.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Jan 8;105(1):141-4.
IF.: 9.643 (2006)

Egyéb közlemények

1. Csutora P., Karsai Á., Nagy T., Vas B, Kovács L.G., Rideg O., and Miseta A. Lithium induces phosphoglucomutase activity in various tissues of rats and in bipolar patients
Int J Neuropsychopharmacol. 2005 Nov 1;:1-7 IF: 3,981 (2005)
2. Kiss, B., Karsai, Á. and Kellermayer, M.S.Z. Nanomechanical properties of desmin intermediate filaments. *J. Struct Biol.* **155**, 327-339, 2006
IF 3.49 (2005)
3. Miklós S.Z. Kellermayer, Árpád Karsai, András Kengyel, Attila Nagy, Pasquale Bianco, Tamás Huber, Ágnes Kulcsár, Csaba Niedetzky, Roger Proksch and László Grama. Spatially and temporally synchronized atomic force and total internal reflection fluorescence microscopy for imaging and manipulating cells and biomolecules. *Biohys. J.* 91, 2665-2677, 2006.
IF 4.757 (2006)
4. Karsai A, Murvai U, Soós K, Penke B, Kellermayer MS.
Oriented epitaxial growth of amyloid fibrils of the N27C mutant beta25-35 peptide.
Eur Biophys J. 2008 Jan 9
IF.:1,825 (2006)

REFERÁLT FOLYÓIRATBAN MEGJELENT ABSZTRAKTOK

1. Kellermayer, M.S.Z., Grama, L., Karsai, Á., Nagy, A., Kahn, A., Datki, Z. and Penke, B. Reversible unzipping of amyloid β -fibrils. *Biophys. J.* **88**, 198A-199A, 2005.
2. Kellermayer, M. S., Grama, L., Karsai, Á., Nagy, A., Kahn, A., Datki, Z., Penke, B. (2005) Structural dynamics of amyloid explored by manipulating individual fibrils *FEBS Journal* **272** (s1) F2-016P.
3. Miklós S.Z. Kellermayer, Árpád Karsai, Attila Nagy, András Kengyel, Tamás Huber, Zsolt Mártonfalvi and László Grama. Synchronized atomic force and total internal reflection fluorescence microscopy for imaging cells and biomolecules. *Biophys J.* **90**, 2006.
4. Árpád Karsai, László Grama, Attila Nagy and Miklós Kellermayer. Oriented, potassium-dependent binding of amyloid beta25-35 fibrils to mica. *Biophys J.* **90**, 2006.
5. Miklós S.Z. Kellermayer, Árpád Karsai, Margit Benke, Katalin Soós, and Botond Penke. Stepwise assembly dynamics of single amyloid fibrils revealed by scanning force kymography. *Biophys. J.* **92**. 2007.
6. Árpád Karsai, Ünige Murvai, Katalin Soós, Botond Penke, and Miklós SZ Kellermayer. Oriented, Chemically Functionalized Amyloid Network With Controllable Mesh Size For Nanotechnology Applications *Biophys. J.* **94**: 2790. 2008

X. REFERENCIÁK

- Arimon, M., I. Diez-Perez, M.J. Kogan, N. Durany, E. Giralt, F. Sanz, and X. Fernandez-Busquets. 2005. Fine structure study of Abeta1-42 fibrillogenesis with atomic force microscopy. *Faseb J* 19(10):1344-1346.
- Bitan, G., M.D. Kirkitadze, A. Lomakin, S.S. Vollers, G.B. Benedek, and D.B. Teplow. 2003. Amyloid beta -protein (Abeta) assembly: Abeta 40 and Abeta 42 oligomerize through distinct pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(1):330-335.
- Cummings, J.L. 2004. Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 351(1):56-67.
- Del Mercato, L.L., P.P. Pompa, G. Maruccio, A. Della Torre, S. Sabella, A.M. Tamburro, R. Cingolani, and R. Rinaldi. 2007. Charge transport and intrinsic fluorescence in amyloid-like fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(46):18019-18024.
- Eanes, E.D., and G.G. Glenner. 1968. X-ray diffraction studies on amyloid filaments. *J Histochem Cytochem* 16(11):673-677.
- Efimov, A.V. 1987. Pseudo-homology of protein standard structures formed by two consecutive β -strands. *FEBS Lett* 224:372-376.
- Franzini, M. 1969. The A and B layers and the crystal structure of sheet silicates. *Contr. Mineral. and Petrol.* 21:203-224.
- Gazit, E. 2007. Use of biomolecular templates for the fabrication of metal nanowires. *Febs J* 274(2):317-322.
- Golde, T.E. 2003. Alzheimer disease therapy: can the amyloid cascade be halted? *J Clin Investigation* 111:11-18.
- Gosal, W.S., S.L. Myers, S.E. Radford, and N.H. Thomson. 2006. Amyloid under the atomic force microscope. *Protein Pept Lett* 13(3):261-270.
- Grandbois, M., M. Beyer, M. Rief, H. Clausen-Schaumann, and H.E. Gaub. 1999. How strong is a covalent bond? *Science* 283(5408):1727-1730.
- Harper, J.D., S.S. Wong, C.M. Lieber, and P.T. Lansbury. 1997. Observation of metastable Abeta amyloid protofibrils by atomic force microscopy. *Chem Biol.* 4(2):119-125.
- Haupt, B.J., J. Ennis, and E.M. Sevick. 1999. The detachment of a polymer chain from a weakly adsorbing surface using an AFM tip. *Langmuir* 15:3886-3892.
- Haupt, B.J., T.J. Senden, and E.M. Sevick. 2002. AFM evidence of rayleigh instability in single polymer chains. *Langmuir* 18:2174-2182.
- Hoyer, W., D. Cherny, V. Subramaniam, and T.M. Jovin. 2004. Rapid self-assembly of alpha-synuclein observed by in situ atomic force microscopy. *J Mol Biol* 340(1):127-139.
- Ippel, J.H., A. Olofsson, J. Schleucher, E. Lundgren, and S.S. Wijmenga. 2002. Probing solvent accessibility of amyloid fibrils by solution NMR spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(13):8648-8653.
- J. Hutter, and J. Bechhoefer. 1993. Calibration of atomic-force microscope tips. *Rev. Sci. Instrum.* 64:1868-1873.
- Kirschner, D.A., H. Inouye, L.K. Duffy, A. Sinclair, M. Lind, and D.J. Selkoe. 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):6953-6957.
- Knowles, T.P., A.W. Fitzpatrick, S. Meehan, H.R. Mott, M. Vendruscolo, C.M. Dobson, and M.E. Welland. 2007. Role of intermolecular forces in defining material properties of protein nanofibrils. *Science* 318(5858):1900-1903.
- Kowalewski, T., and D.M. Holtzman. 1999. In situ atomic force microscopy study of Alzheimer's beta-amyloid peptide on different substrates: new insights into mechanism of beta-sheet formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(7):3688-3693.
- 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):404-410.

- Luhrs, T., C. Ritter, M. Adrian, D. Riek-Loher, B. Bohrmann, H. Dobeli, D. Schubert, and R. Riek. 2005. 3D structure of Alzheimer's amyloid-beta(1-42) fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(48):17342-17347 Epub 12005 Nov 17 317.
- Makin, O.S., and L.C. Serpell. 2005. Structures for amyloid fibrils. *Febs J*. 272(23):5950-5961.
- Mastrangelo, I.A., M. Ahmed, T. Sato, W. Liu, C. Wang, P. Hough, and S.O. Smith. 2006. High-resolution atomic force microscopy of soluble A β 42 oligomers. *J Mol Biol*. 358(1):106-119 Epub 2006 Jan 20 30.
- Meyer-Luehmann, M., T.L. Spires-Jones, C. Prada, M. Garcia-Alloza, A. de Calignon, A. Rozkalne, J. Koenigs-Knecht-Talboo, D.M. Holtzman, B.J. Bacskai, and B.T. Hyman. 2008. Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* 451(7179):720-724.
- Nilsson, M.R. 2004. Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods*. 34(1):151-160.
- Petkova, A.T., Y. Ishii, J.J. Balbach, O.N. Antzutkin, R.D. Leapman, F. Delaglio, and R. Tycko. 2002. A structural model for Alzheimer's β -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(26):16742-16747.
- Pike, C.J., A.J. Walencewicz-Wasserman, J. Kosmoski, D.H. Cribbs, C.G. Glabe, and C.W. Cotman. 1995. Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity. *J Neurochem* 64(1):253-265.
- Reches, M., and E. Gazit. 2003. Casting metal nanowires within discrete self-assembled peptide nanotubes. *Science* 300(5619):625-627.
- Rochet, J.C., K.A. Conway, and P.T. Lansbury, Jr. 2000. Inhibition of fibrillization and accumulation of prefibrillar oligomers in mixtures of human and mouse alpha-synuclein. *Biochemistry* 39(35):10619-10626.
- Scheibel, T., R. Parthasarathy, G. Sawicki, X.M. Lin, H. Jaeger, and S.L. Lindquist. 2003. Conducting nanowires built by controlled self-assembly of amyloid fibers and selective metal deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(8):4527-4532 Epub 2003 Apr 4 522.
- Selkoe, D.J. 1997. Images in neuroscience. Alzheimer's disease: from genes to pathogenesis. *Am J Psychiatry* 154(9):1198.
- Selkoe, D.J. 2004a. Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies. *Ann Intern Med* 140(8):627-638.
- Selkoe, D.J. 2004b. Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nat Cell Biol* 6(11):1054-1061.
- Serpell, L.C. 2000. Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly. *Biochim Biophys Acta*. 1502(1):16-30.
- Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, and D.C. Klenk. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150(1):76-85.
- Terzi, E., G. Holzemann, and J. Seelig. 1994. Alzheimer beta-amyloid peptide 25-35: electrostatic interactions with phospholipid membranes. *Biochemistry*. 33(23):7434-7441.
- Thirumalai, D., D.K. Klimov, and R.I. Dima. 2003. Emerging ideas on the molecular basis of protein and peptide aggregation. *Curr Opin Struct Biol*. 13(2):146-159.
- Török, M., S. Milton, R. Kaye, P. Wu, T. McIntire, C.G. Glabe, and R. Langen. 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):40810-40815.
- Tycko, R. 2004. Progress towards a molecular-level understanding of amyloid fibrils. *Curr Opin Struct Biol* 14:96-103.

- Walsh, D.M., A. Lomakin, G.B. Benedek, M.M. Condron, and D.B. Teplow. 1997. Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate. *J Biol Chem* 272(35):22364-22372.
- Wang, Z., C. Zhou, C. Wang, L. Wan, X. Fang, and C. Bai. 2003. AFM and STM study of beta-amyloid aggregation on graphite. *Ultramicroscopy* 97(1-4):73-79.
- Zarandi, M., K. Soos, L. Fulop, Z. Bozso, Z. Datki, G.K. Toth, and B. Penke. 2007. Synthesis of A β [1-42] and its derivatives with improved efficiency. *J Pept Sci* 13(2):94-99.