Nanoműanyagok amiloidogén fehérjék szerkezetére gyakorolt hatásának vizsgálata

Készítette:

Nyiri Márton Péter

Eötvös Loránd Tudományegyetem – Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi egyetem – biotechnológia mesterszak

Konzulensek:

Dr. Kardos József – adjunktus

Dr. Micsonai András – adjunktus

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar

Biológiai Intézet, Biokémiai Tanszék

36. OTDK Biológia szekció – 2023. április 24-26.

ELTE
EÖTVÖS LORÁND
TUDOMÁNYEGYETEM

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék	3. oldal
Bevezetés és célkitűzések	4. oldal
Anyagok és módszerek	10. oldal
Eredmények és diszkusszió	13. oldal
Összefoglalás	24. oldal
Köszönetnyilvánítás	25. oldal
Irodalomjegyzék	26. oldal

Rövidítésjegyzék

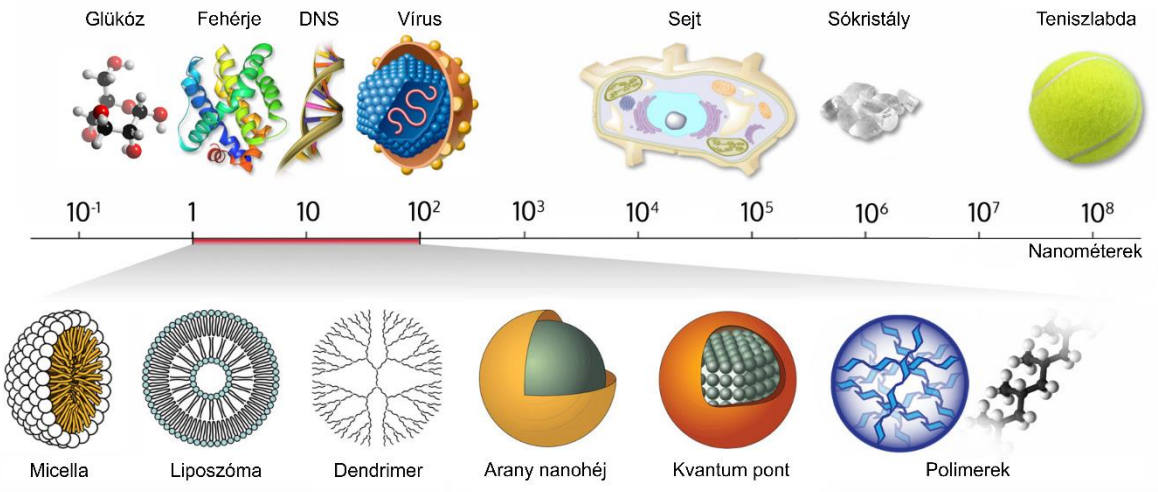
Aß	Amiloid- ß
APP	Amyloid precursor protein
CD	Cirkuláris dikroizmus
PBS	Phosphate-buffered saline
PS	Polisztirol
ThT	Thioflavin T

Bevezetés és célkitűzések

A Tudományos Diákköri tevékenységemhez kapcsolódó kutatást az Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Biológiai Intézet, Biokémiai Tanszék, Fehérje folding és amiloid csoportjában végzem. A csoport egyik kutatási célkitűzése a környezetben, iparban és kutatásban előforduló nanorészecskék (Pl.: CaF_2, SiO_2, Nanogold) fehérjék szerkezetére gyakorolt hatásának vizsgálata. Nagyobb hangsúlyt kapnak a kutatás során a fehérjeaggregációs betegségekben szerepet játszó, amiloidképzésre hajlamos fehérjék, melyek a kutatócsoport fő kutatási profilját képezik.

Nanorészecskék

A nanorészecskék, a környezetben előforduló nanométeres mérettartományba eső anyagok és anyagtöredékek. 100 nm-nél kisebb részecskéket sorolunk ebbe a kategóriába (**1. ábra**) [1]. Ezen mérettartomány már önmagában is érdekes, hiszen ezen tartományban a molekulák és különböző anyagok között fellépő kölcsönhatások megváltoztathatják a molekulák fizikokémiai paramétereit és tulajdonságait.

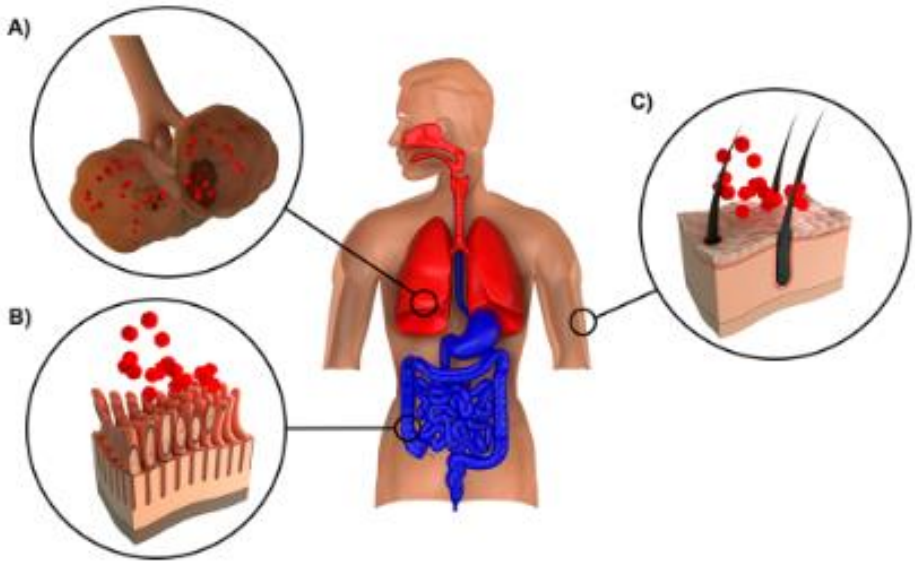


1. ábra: Méretskála, amely részletesen bemutatja a nanométeres mérettartományt *(forrás: https://www.wichlab.com/nanometer-scale-comparison-nanoparticle-size-comparison-nanotechnology-chart-ruler-2/ [2022.10.18.])*

A nanorészecskék vizsgálata iránti megnövekedett érdeklődés annak köszönhető, hogy egyszerre rejlik bennük rendkívüli potenciál és fenyegetés is. Felhasználhatóak kontrasztanyagként orvosi vizsgálatok során [2], vagy például gyógyszermolekulák szállítására is [3,4], de már a génterápiával kapcsolatban is felmerült az alkalmazásuk [5]. Manapság egyre

gyakrabban hallunk ezekről az anyagokról az általuk okozott megnövekedett környezeti terhelés miatt. A mikro- és nanoműanyagok mindennapi környezetünkben is megjelentek, és több élőlényben és emberi fogyasztásra szánt termékben is kimutatták őket [6], ilyenek például a méz, sör, só, cukor, valamint a csapvíz is [7,8]. Továbbá több emberi szervben és szövetben is kimutatták őket, többek között az emberi placentában is [9].

A környezetre gyakorolt negatív hatásukat tovább növeli, hogy képesek lehetnek a felületükön toxikus anyagokat adszorbeálni (például policiklusos aromás vegyületek, fémek, toxinok), ezzel pedig transzportvektorrá válnak, és növekszik az alapvetően is káros hatásuk [10]. Több vízi élőlényen, például zebrahalon (*Danio rerio*) is végeztek vizsgálatokat, hogy felmérjék ezen anyagok hatását. Megállapították, hogy polisztirol (PS) részecskék jelenétében a fiatal halak fejlődése lelassul, valamint gyulladási folyamatok indulnak el bennük. Arra utaló jeleket is találtak, hogy a PS részecskéknek generációkon átívelő hatásai is lehetnek [11]. Megállapítható, hogy a részecskeméret csökkenésével párhuzamosan megnő azon szervezetek aránya, amik azt akkumulálni tudják, valamint azt is kimutatták, hogy a részecskék tulajdonságai (méret, alak, felszínmódosítás) nagymértékben befolyásolják azok élő szervezetre gyakorolt hatását [10].



2. ábra: Az emberi szervezet három fő útvonalon lehet kitéve nanorészecskéknek. *Ezek a tüdő és légzőszervrendszer (A), a táplálkozási szervrendszer (B) és a bőr (C) [7].*

Több kutatás is elindult arra vonatkozóan, hogy milyen hatást gyakorolnak a mikro- és nanoműanyagok az emberi szervezetre (**2. ábra**). Ezekben találtak arra mutató jeleket, hogy felszívódnak a bélrendszerből és felhalmozódhatnak a szervekben [5,7,8]. Képezhetnek

plakkokat, és ezt követően nem tudnak teljes mértékben kimosódni a szervezetből. Az eredmények arra engednek következtetni, hogy az emésztőrendszeren keresztül kerülünk leginkább kapcsolatba ezekkel az anyagokkal, és a bekerült részecskék nagyobb része a bélrendszerben marad és onnan távozik [8]. Az irodalmi ismeretek azt mutatják, hogy a nanorészecskék esetleges szöveti felhalmozódása nagymértékben függ azok tulajdonságaitól [12]. Azt már sejtjük, hogy a részecskéket a sejtek fel tudják venni és az is valószínűsíthető, hogy ez passzív transzlokációs mechanizmussal történik [5]. A bélrendszerből esetlegesen a véráramba kerülő részecskék a keringési rendszeren keresztül máshova is eljuthatnak [12]. Arra vonatkozóan is születtek eredmények, hogy az igazán kicsi részecskék (~ 100 nm alattiak) képesek a vér-agy gáton átjutni [7]. A részecskék okozta hatások között leírtak többek között fizikai sérülést, a növekedés és fejlődés gátlását, vagy éppen immunválaszt [12]. Hatásuk lehet a mitokondriumokra és ezáltal anyagcserezavarokhoz is vezethetnek [13].

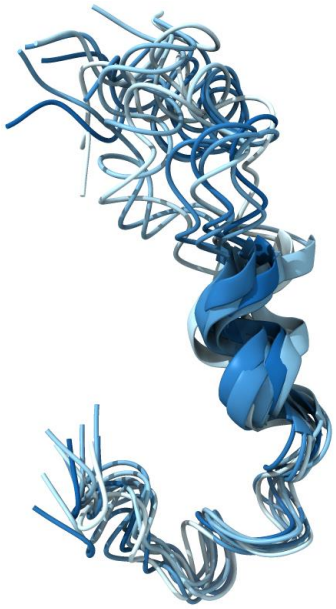
A fentebb leírtak alapján jogosan feltételezhetjük, hogy a fehérjék kapcsolatba kerülhetnek nanorészecskékkel, mind a környezetben, mind az emberi szervezeten belül. Ismertté vált, hogy a részecskék felszínén úgynevezett protein-korona tud kialakulni [14]. Kísérletesen vizsgálták már a kimotripszin szerkezetváltozását SiO_2 részecskék mellett [15]. Nemcsak kísérletes, hanem *in silico* módszerek alapján is lehet arra következtetni, hogy a fehérjék szerkezete megváltozik, ha nanorészecskékkel érintkeznek [16,17]. Vizsgálták már a dolgozat fő témáját képező PS részecskék amiloidokkal történő aggregációját is [18].

Amiloid-ß

Munkám másik „résztvevője” az amiloid-ß (angolul: amyloid-ß, röviden: Aß) peptid, melynek több, 37-49 aminosav hosszúságú variánsa létezik. Az irodalomban leggyakrabban az Alzheimer-kórral kapcsolatban kerül említésre. A betegséget az 1900-as évek elején írta le Alois Alzheimer és Oskar Fisher. Ők voltak az elsők, akik demens ember agyából plakkokat izoláltak, de csak az 1980-as évek közepén sikerült megállapítania Glennernek, Mastersnek és Beyreuthernek, hogy a plakkok Aß peptidet tartalmaznak [19]. A betegség világszerte körülbelül 50 millió embert érint, és a demenciás esetek nagyjából 75%-áért felelős. Az Alzheimer-kór lehet örökletes vagy sporadikus előfordulású [20,21].

Az Aß a szervezetben az amiloid prekurzor fehérjéből keletkezik (angolul: amyloid precursor protein, APP). Az APP egy 1. típusú membrán-glikoprotein. A fehérjének 1 transzmembrán doménje van, és főként a neuronok termelik. Három jelentősebb izoformát különböztetnek meg aminosavszám alapján: APP_{695}, APP_{751}, APP_{770}. Alapvető szerepet

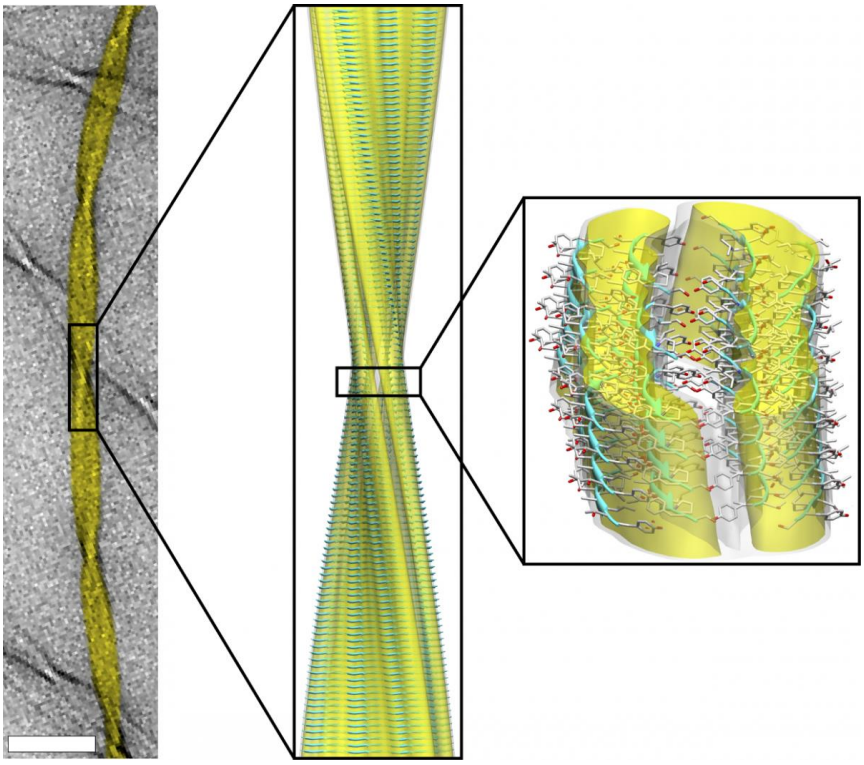
tulajdonítanak neki az anterográd neuronális transzporban és a vas-transzportban is. Maga az APP az endoplazmás retikulumban és a Golgi-szervben szintetizálódik, ezután történik meg a kihelyeződése a membránba. A fehérjének két fő feldolgozási útvonala van, és a metabolizmusa összetett folyamat. Az első a *nem-amiloidogén* út, amikor az α-szekretázok bontják le a fehérjét. Ebben az esetben nem képződnek oligomerek és amiloidogén peptidek. A másik az *amiloidogén* útvonal. Ekkor a lebontást a β-szekretáz kezdi meg. Ez a fehérje a APP N-terminálisát hasítja, és egy C99 fragmentumot képez. Ezt a fragmentumot hasítják tovább a γ-szekretázok. A lipoprotein receptor LRP1 kölcsönhatásba lép az APP-vel és gyorsítja annak lebontását [22]. További hasítási lépések során alakul ki a két leggyakoribb forma: az Aß40 és az Aß42. A hasítások utáni termékek extra- és intracelluláris térbe is kerülhetnek. Az APP lebontási útvonalai egyedülálló módon komplexek, és még további tanulmányozást igényelnek [23].



3. ábra: Az amiloid-ß szerkezete (NMR) *(forrás: PDB 6SZF)*

A monomer Aß peptid (**3. ábra**) oligomer, protofibrillum és amiloid fibrillum formában is aggregálódhat. Az érett fibrillumok jellemzően ß-redős másodlagos szerkezettel rendelkeznek. Mind a 40-es, mind a 42-es formának a C-terminálisán találhatóak olyan szakaszok (ß-hajtű), amik csökkentik a szerkezet rugalmasságát, és ezáltal hajlamossá teszik a fehérjéket az amiloidképzésre [23]. A monomer Aß termelődése alapvetően a sejtanyagcsere normális eleme. A kutatások arra is rámutattak, hogy fiziológiás (pikomólos) koncentrációban a fehérje meghatározó szereppel bír a memória kialakításában. A hatását a foszfatidil-inozitol-3-kináz aktiválásán keresztül fejti ki. Mindazonáltal nagyobb koncentrációban (mikromólos)

gátló hatású [19]. Azt, hogy az Aß peptid keletkezése egy természetes folyamat, az is mutatja, hogy a szervezetben több enzimről is bizonyították, hogy képes azt bontani (pl.: neprilizin, inzulinbontó enzim) [20]. A peptid önmagában többféle partnerhez is képes kötni. Ezek közül is kiemelendő a Tau fehérje, aminek hiperfoszforilációja gyulladási folyamatokat indít be, ami az Alzheimer-kór egyik jelentős tünete [24].



4. ábra: Az Aβ-szálak szerkezete. *A modell bemutatja az Aβ által jellegzetesen kialakított β-lemezes szerkezetet. (forrás: https://griffingroup.mit.edu/amyloid-protein [2023.01.08.])*

Az Aß aggregációja sokféle útvonalon történhet, és nincs egyértelmű magyarázat arra, hogy melyik útvonal játssza a fő szerepet az Alzheimer-kór kialakulásában [23]. Az viszont bizonyos, hogy a szupramolekuláris szerkezetben az aggregátumok ß-lemezes konformációt vesznek fel **(4. ábra)** [25]. A betegségre jellemző plakkok Aß-aggregátumokat tartalmaznak, és az extracelluláris térben a találhatóak meg. A fehérje toxikussága az aggregált formához kötődik, ami zavarja a szinaptikus folyamatokat [20]. Az irodalom többféle toxicitást is feltételez az Aß-aggregátumok típusától függően. A kisebb aggregátumok inkább a membránpermeabilitást zavarják, a nagyobbak inkább gyulladáskeltő hatással rendelkeznek [26]. A közelmúltban több olyan cikk is napvilágot látott, amiben hangsúlyozzák a Aß mitokondriális diszfunkciót okozó hatását, ami az Alzheimer-kór egyik jellemzője [22].

Nem pontosan ismert az összefüggés az Alzheimer-kór és az Aß között, de alapvetően két nagy elmélet van a probléma feloldására. Az első az úgynevezett „*amiloid kaszkád hipotézis”*, míg a másik az „*Aβ mitokondriális ördögi kör”.* Az előbbi elmélet szerint inkább a plakkok és a többi extracelluláris hatás az, ami a betegséget kialakítja, míg utóbbi inkább az intracelluláris oldható aggregátumokat és azok mitokondriumra tett hatását teszi felelőssé [19,22].

Az Aβ peptid Alzheimer-kórban betöltött szerepét jelenleg is kiterjedten kutatják. Érdemes azt is megjegyezni, hogy számos eredmény szerint a szintetikus fibrillumok eltérnek a valódi agyi fibrillumoktól [27,28]. De folyamatosan jelennek meg újabb es újabb írások és eredmények, amik biztató esélyekkel kecsegtetnek a betegség legyőzésének irányába [29,30].

Célkitűzés

TDK munkám célja a nanorészecskék fehérjék szerkezetére gyakorolt hatásának vizsgálata. Vizsgálataim teljesen az alapoktól indultak, így kezdetben a nanorészecskék alapvető fizikokémiai tulajdonságainak megismerése volt a cél. Innen kiindulva szeretném megismerni ezen részecskék fehérjékre gyakorolt hatásait. A kísérleti megközelítés többféle módszerrel történt, mint például a cirkuláris dikroizmus spektroszkópia, elektronmikroszkópia vagy éppen fluorimetriás mérések. Munkám során elsősorban a polisztirollal kapcsolatos vizsgálatokban vettem részt, így a dolgozatban a PS nanorészecskék Aβ peptid aggregációjára és az Aβ aggregátumok szerkezetére gyakorolt hatásának vizsgálatára helyeztem a hangsúlyt.

Anyagok és módszerek

Amiloid-ß előállítása

A mérésekhez amiloid-ß 1-42 fehérjét használtunk, amit a kutatócsoport állít elő rekombináns úton. A termelés általában négy liter kultúrában történik, de ez a szükséges mennyiségtől függően változhat. A BL21 DE3 pLysS *E. coli* sejtek inklúziós testben termelik a fehérjét, ezért egy többlépéses és komplex tisztításra van szükség, melynek végén hexafluoro-izopropanollal monomerizáljuk a fehérjét. Liofilizálás után mérjük a fehérje tömegét, amely megkönnyíti a feloldás során a koncentráció beállítását.

Fluorimetriás mérések

A polisztirol nanorészecskéket kereskedelmi forgalomból, szuszpenzió formájában szereztük be (Sigma-Aldrich, Micro particles based on polystyrene, size 100 nm). Azért választottuk a polisztirol műanyagot a vizsgálataink tárgyául, mert ez az egyik leggyakrabban előforduló műanyagtípus a hétköznapokban. Felhasználják többek között hőszigetelő anyagok és élelmiszerek csomagolása során is. Továbbá, a szakirodalom alapján a PS nanorészecskék és fehérjék kölcsönhatásainak vizsgálata tudományos érdeklődésre is számot tartó, de még nem teljesen felderített terület [14,18]. A vásárolt szuszpenziónak nem ismertük a koncentrációját, ezért ezt meg kellett határozni. Ehhez lemértük egy üres eppendorf cső tömegét és megtöltöttük PS nanorészecske mintával. Liofilizáló készülékben (Labconco Centrivao Concentrator, Labconco Corporation, Kansas City, USA) az oldatot fagyasztva szárítottuk. Mivel ismertük a cső tömegét és a bemért mennyiséget, így a tömeg növekedésének megállapítása után meg tudtuk határozni az eredeti oldat koncentrációját. Ez 114,9 mg/ml koncentrációnak adódott.

A nanorészecskének először az optikai tulajdonságait vizsgáltuk. Ehhez első elemként fluorimetriás méréseket végeztünk (SPEX FluoroMax, Spex Industries Inc., New Jersey, USA), ahol emissziós spektrumot vettünk fel 425 – 465 nm tartományban 445 nm-en történő gerjesztéssel (PMT feszültség: 550 V, gerjesztő fény sávszélessége: 5 nm).

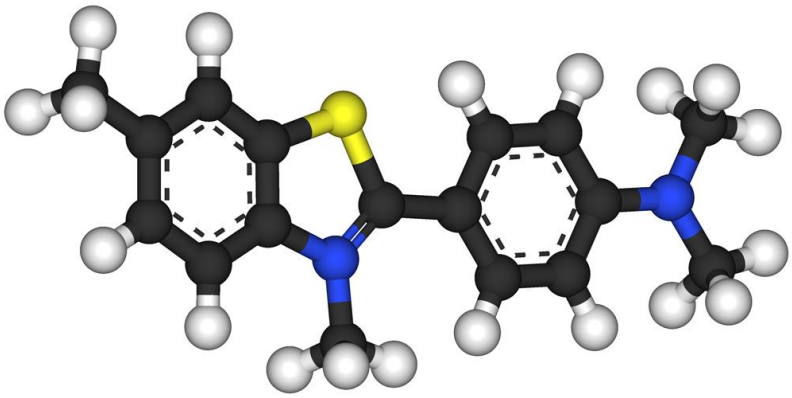
Elektronmikroszkópiás vizsgálatok

Mivel vizuálisan is szerettük volna látni a részecskéket, amelyek a leírás alapján 100 nm nagyságúak, elektronmikroszkópos technikához fordultunk. Ehhez a Biológiai Intézet JEOL JEM-1011 elektronmikroszkópját (JEOL LTD., Tokyo, Japan) használtuk. A mintákat formvar hártyázott és szenezett réz gridre vittük fel és 1%-os uranil-acetát segítségével negatívan

festettük. A mintát 2 percig inkubáltuk a griden, majd leszívtuk, ezt követte az uranil-acetát 1 perces inkubációja, majd leszívása és szárítása. TEM felvételek nem csak a PS részecskékről készültek, hanem az amiloidszálak morfológiáját is ilyen mintaelőkészítés mellett vizsgáltuk.

ThT-floureszcencia mérése

Arra kerestük a választ a méréseink során, hogy hogyan hat a PS az Aβ másodlagos szerkezetére. Így elengedhetetlen volt az aggregációs vizsgálatok kivitelezése. Ezeket a méréseket 96-lyukú plate-en végeztük és thioflavin T (ThT) (**5. ábra**) jelölést használtunk, aminek a segítségével detektáltuk az Aß szálak növekedését. Mintáink változó koncentrációban tartalmazták az Aß-t és PS is. Emellett az oldatok 20 mM foszfátpuffert, 100 mM NaCl-ot és 5 µM ThT-t tartalmaztak. A méréseket a Biokémiai Tanszék Synergy H4 Hybrid Reader (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA) készüléke segítségével végeztük. A mérések 24 órán át tartottak, 37 °C-on, 5 percenként történő detektálás mellett. A ThT gerjesztése 445 nm-en, emissziójának detektálása pedig 485 nm-en történt. Célunk az volt, hogy az amiloidszálak teljesen felnövekedjenek a mérés végére, ezért választottunk 24 óra időtartamot. A felnövesztés után a legtöbb esetben a szálakat elektronmikroszkópban és CD spektroszkópiával is megvizsgáltuk.



5. ábra: A thioflavin T molekula szerkezete. *A molekula egy dimetilált benzotiazolgyűrűből és egy dimetil-amino-benzilgyűrűből áll, amelyeket egyetlen C-C kötés kapcsol össze.* (forrás: https://en.wikipedia.org/wiki/Thioflavin [2022.11.24.])

A thioflavin T molekula egy dimetilált benzotiazolgyűrűből és egy dimetil-amino-benzilgyűrűből áll, amelyeket egyetlen C-C kötés kapcsol össze (**5. ábra**). Ez utóbbi teszi lehetővé, hogy a két gyűrű egymáshoz képest szabadon elforoghasson. Amennyiben a ThT molekulában a gyűrűk forgása korlátozott, például amiloidfibrillumokhoz kötve vagy viszkózus oldószerben, egy erősen fluoreszcens relaxáció következik be. Ez megközelítőleg 160-

szorossára növeli a fluoreszcenciajel értékét amiloid környezetében. A mai napig nem tisztázott teljes mértékben, hogy a ThT milyen módon kötődik az amiloidfibrillumokhoz [31,32].

CD- és SRCD-spektroszkópia

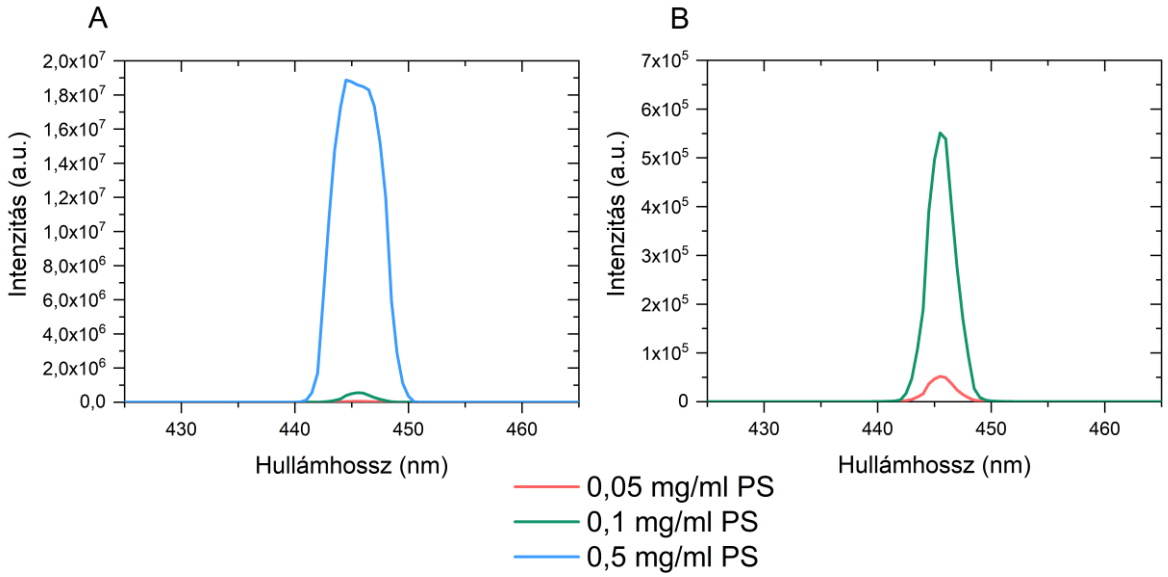
A kutatócsoport egyik fő profilja a fehérjék cirkuláris dikroizmus spektroszkópiával történő vizsgálata, mely információt szolgáltat a fehérjék másodlagos szerkezetéről. Mivel témavezetőim nagy tapasztalattal rendelkeznek ezen a téren, így adott volt ennek a módszernek a használata. A PS anyagú nanorészecskék nagymértékű fényszórással rendelkeznek, ezért ezen a területen viszonylag korlátozottak voltak a lehetőségeink. A tapasztalatunk azt mutatta, hogy 0,05 mg/ml-nél magasabb PS-koncentráció esetén a mérés nem kivitelezhető megfelelően a részecskék okozta fényszórás miatt. A méréseket Jasco J-810 spektropolariméterrel (JASCO Corporation, Tokyo, Japan) végeztük. A spektrumfelvétel 185 nm és 260 nm között történt, 25°C-on (szkennelési sebesség 50 nm/perc, integrálási idő 2 mp, sávszélesség 2 nm). A kutatócsoport nemzetközi együttműködésének keretében lehetőségem nyílt a franciaországi SOLEIL szinkrotronnál méréseket végezni a DISCO beamline SRCD mérőállomáson. Itt 170 nm és 280 nm közötti spektrumok felvételét végeztük el. Az oldatokat 24,2 μm úthosszú küvettában helyeztük a készülékbe. Az itt használt Aß-mintákat egy napig rázattuk 37°C-on 3,6 mg/ml és 0,7 mg/ml PS-koncentráció mellett, PBS puffer jelenlétében.

A kutatócsoport az elmúlt évek során kifejlesztett és fenntart egy szoftvert, amely CD-spektrumok elemzésére és tartalmának feltárására szolgál. A BeStSel szoftver rendkívül pontos elemzésre képes, így alkalmas volt arra, hogy felhasználjuk az általunk kapott eredmények elemzésére és értékelésére [33,34,35,36].

Eredmények és diszkusszió

A nanorészecskék tulajdonságainak vizsgálata

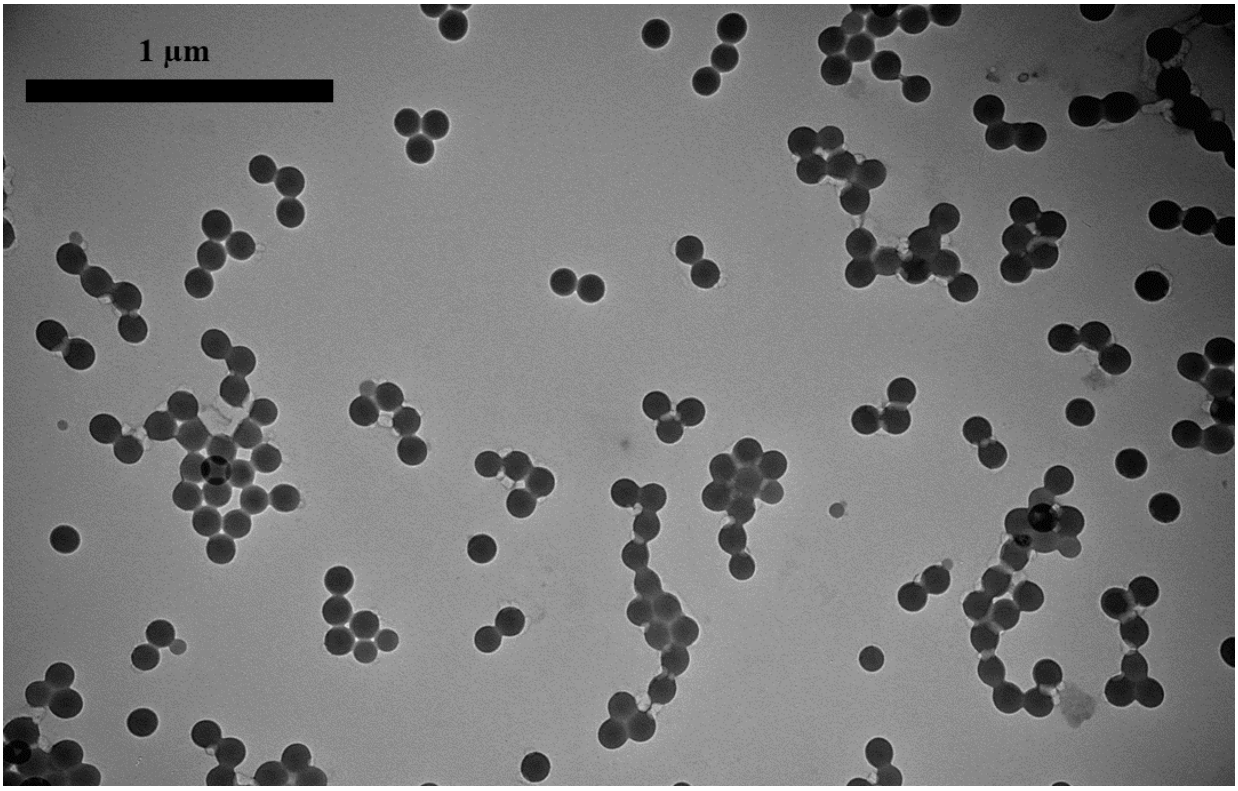
A nanorészecskék vizsgálatának a kutatócsoporton belül nem volt előzménye, ezért a vizsgálatokat az alapoktól kellett kezdeni. Ahhoz, hogy megfelelően értelmezhető és pontos méréseket tudjunk végezni, szükség volt az általunk vásárolt nanorészecskék karakterizálására, méretük, alakjuk, optikai tulajdonságaik meghatározására. A gyártó leírása alapján a PS nanorészecskék 100 nm átmérőjűek. Először az *Anyagok és módszerek* részben leírtaknak megfelelően, vízből történő beszárítással és tömegméréssel meghatároztuk a vásárolt oldat koncentrációját, amely ~115 mg/ml-nek adódott. Ezután fluoriméterben mértük a részecskék fényszórási tulajdonságát az *Anyagok és módszerek* fejezetben leírtaknak megfelelően.



6. ábra: A fényszórás vizsgálata fluoriméter segítségével. *Az **A;** és a **B;** ábra között a különbség az intenzitásban (y-skálázásban) van, amely annak következménye, hogy az A panel esetében az emissziós rés 5 nm volt, míg a B panelen bemutatott mérésnél 1 nm. Látható, hogy 445 nm-en történő gerjesztés során ugyanott kapunk jelet, így megállapítható a nagyfokú fényszórás.*

Az eredmények (**6. ábra**) alapján megállapíthatjuk, hogy a részecskék nagymértékű fényszórást mutatnak. Ebből következően minden spektrometriás mérés során (CD, SRDC) a részecskék csak viszonylag kis koncentrációban használhatóak fel, hogy ne zavarja a kapott eredményt túlzott mértékben a részecskék fényszórásából származó hiba. Ez az ismeret alapjaiban határozta meg a további méréseinket.

A részecskék alapvető tulajdonságainak vizsgálatát elektronmikroszkópiás vizsgálatokkal folytattuk. Ezekre azért volt szükség, mert egyfelől szerettük volna megismerni a részecskék alakját, másfelől meg akartunk bizonyosodni róla, hogy a részecskék a gyártó által megadott mérettel rendelkeznek. A felvételeken (**7. ábra**) látható, hogy a részecskék egyforma méretű gömbök, amik ideálisak a fehérjék vizsgálatához, ugyanis ilyen formában az oldatban történő mozgás során kevés nyíróerőt fejtenek ki, amelynek figyelembevétele nehéz lenne szabálytalan alakú és méretű részecskék esetén. Valamint az is megállapítható, hogy a mintában találhatóak „összenőtt" nagyobb csoportok is. Ennek ismerete fontos volt a további mérések mintaelőkészítési folyamataihoz. Mivel elsődleges célunk az egyedi részecskéket vizsgálni, a minta megfelelően történő szuszpendálása, vagy szonikálása elengedhetetlen volt minden további mérés előkészítése során.

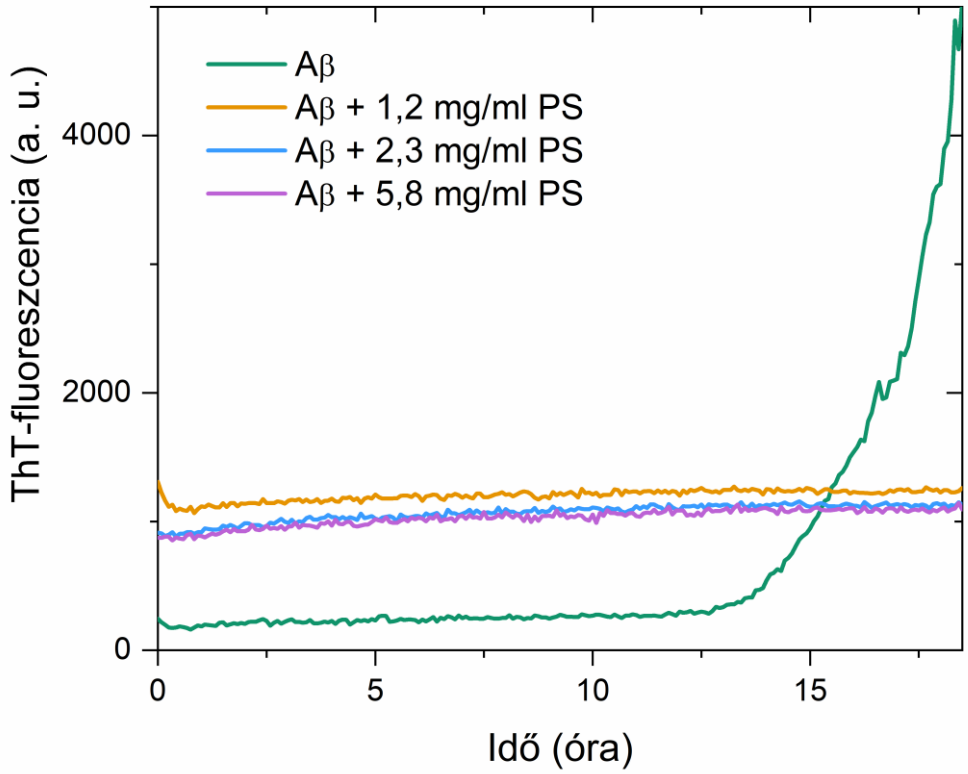


7. ábra: Elektronmikroszkópos felvételek a PS részecskékről. *A kép 50 000-szeres nagyítású, ami mellett látható, hogy a részecskék egyforma méretű gömbök, valamint az is látszik, hogy az egyedi részecskék mellett vannak "összenőtt" részecskecsoportok is.*

A fehérje aggregációjának vizsgálata

Az Aβ peptid aggregációját egy amiloidspecifikus festék, a thioflavin-T fluoreszcenciájának mérésével követtük. A vizsgálatok során arra voltunk kíváncsiak, hogy

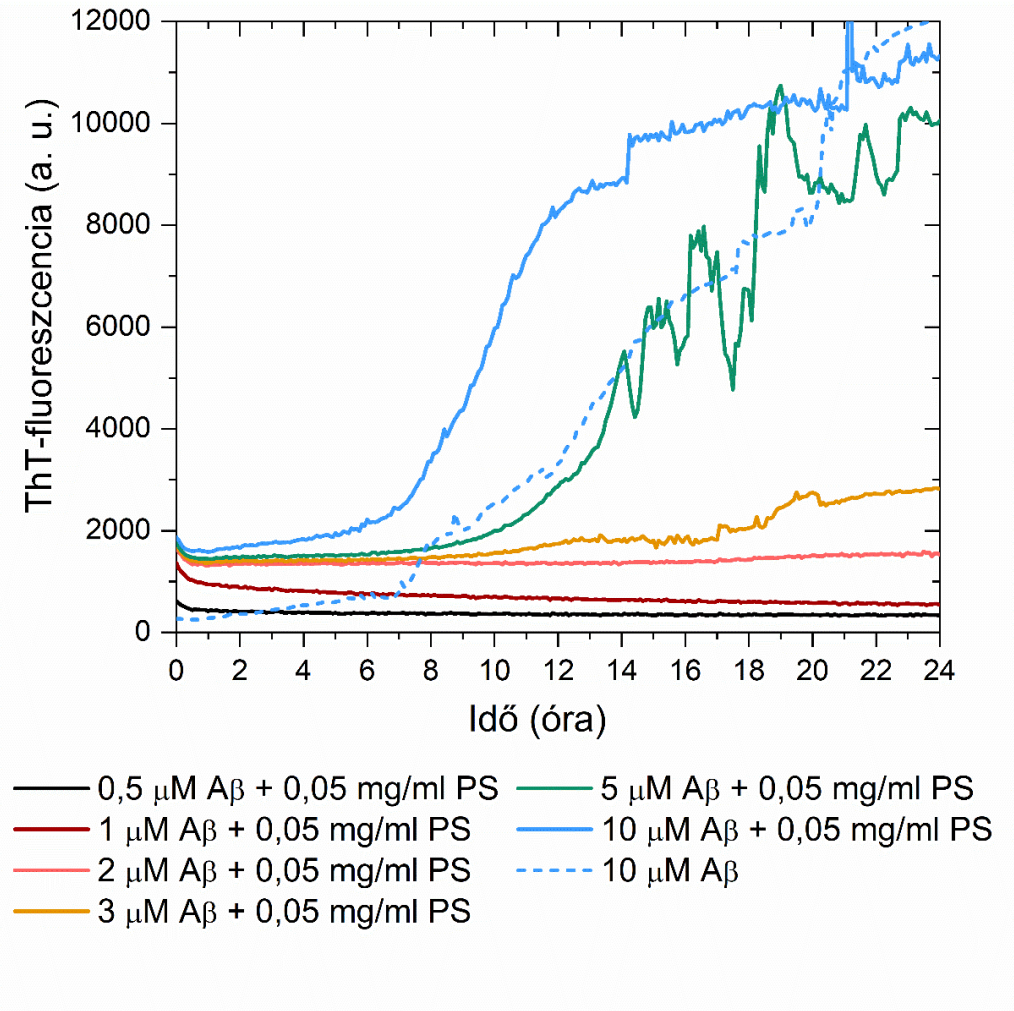
nanorészecskék jelenlétében milyen sebességgel aggregálódik a kezdetben monomer Aß. Az első mérések során – annak ellenére, hogy már vizsgáltuk a részecskéket és ismertük a fényszórást – nagy koncentrációkkal próbálkoztunk, mivel nem ismertük, hogy hol van az a határ, ahol a fényszórás már érdemben nem zavarja a méréseket.



8. ábra: Aggregációs mérés eredménye nagy koncentrációjú PS mellett. *Magas PS-koncentráció esetén a nanorészecskék megkötik a felszínükön az Aβ-monomereket és ez a kötött forma emelkedett ThT-jelet mutat. A megkötött monomerek nem képeznek amiloidot.*

A **8. ábrán** bemutatott eredményből először arra következtettünk, hogy az Aß polimerizációjának jelét a PS jelenlétéből származó fényszórás erősen zavarja. A későbbi mérések során kiderült, hogy ez csak részben volt igaz, mert a teljes Aβ-mennyiség a részecskék felszínéhez kötött és ezért nem látható amiloidképződés a teljes idő alatt. A mérés eredménye egyértelműen rávilágított arra, hogy csökkenteni kell a részecskék koncentrációját, és változtatni a fehérje bemérési koncentrációját. A mérések során felmerült a kérdés, hogy a nanorészecskék milyen mennyiségű fehérjét képesek megkötni a felszínükön. Ennek a kérdésnek a megválaszolása fontos volt az aggregációs kísérletek értelmezéséhez. A **9. ábrán** megfigyelhető, hogy állandó koncentrációjú (0,05 mg/ml) PS mellett az Aβ koncentrációját növelve 1 µM koncentrációig nem látunk amiloidképződésre utaló jelet. A lag-fázist követő felugró ThT-fluoreszcencia a 2 µM vagy nagyobb koncentráció esetében észlelhető. Az

eredményt úgy interpretáltuk, hogy egy bizonyos koncentrációig a PS nanorészecskék felületükön megkötötték az Aβ peptidet, amely így nem tudott amiloidszálakat képezni még hosszabb idő elteltével sem. Megfigyelhető volt az is, hogy míg PS nélkül az Aβ kezdeti ThT-intenzitása alacsony volt, addig PS jelenlétében egy azonnali megnövekedett értéket mértünk. Ez az érték az alacsonyabb koncentrációk mellett arányos volt az Aβ koncentrációjával, majd 2 μM felett (ahol az amiloidképződés megjelent) már csak csekély mértékben emelkedett.



9. ábra: Aggregációs mérés. *ThT-fluoreszcencia állandó PS-koncentráció és változó fehérjekoncentráció mellett. Ezt a mérést használtuk fel a későbbiekben a PS-fehérje arány megállapításához.*

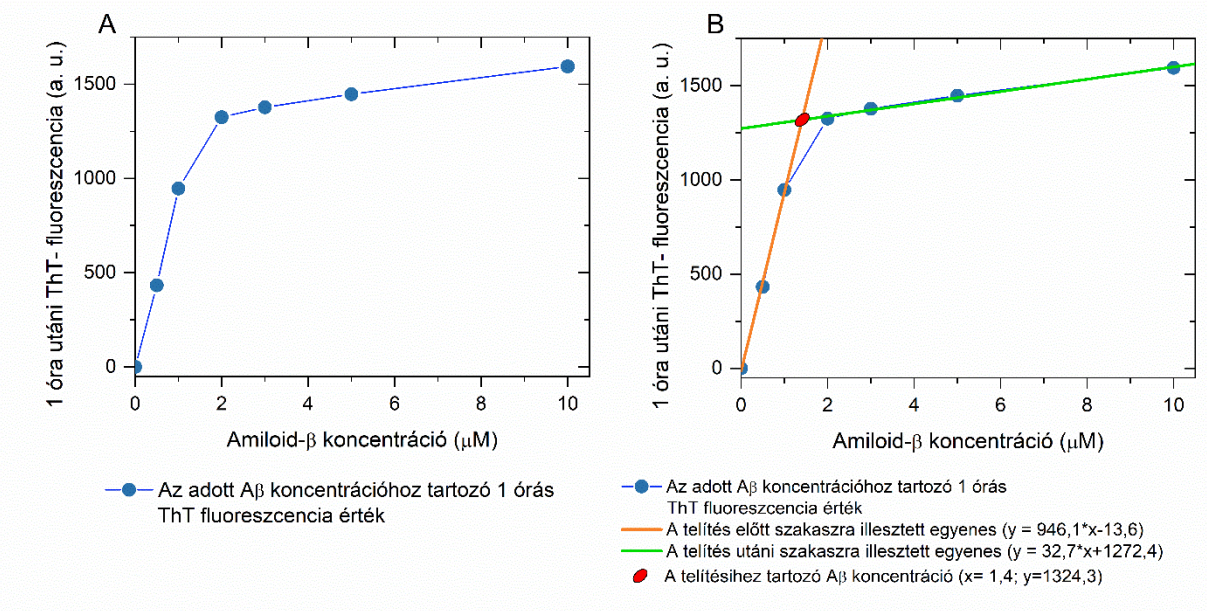
Hipotézisünk szerint a PS-hoz kötődő Aβ egy jellemző, emelkedett ThT-intenzitást mutat, szemben a szabad Aβ gyenge ThT-fluoreszcenciájával, így a kezdeti intenzitások a két állapot összegeként értelmezhetőek. A **10.A. ábrán** az 1 órás (± 15 perc) kezdeti ThT-fluoreszcenciaértékek átlagát ábrázoltuk az Aβ-koncentráció függvényében. A modell szerint a telítési görbére hasonlító koncentrációfüggés meredek szakaszán csak PS-kötött Aβ van jelen,

a jel ezzel arányos, majd a nanorészecskék felületének telítése után a kis meredekségű szakaszt a további, már nem kötődő, szabad Aβ mennyiségének növekedése határozza meg. A **10.B. ábra** mutatja a két szakaszhoz történő lineáris illesztéseket. A két egyenes metszéspontjához tartozó Aβ-koncentráció megadja a 0,05 mg/ml PS által megkötni képes Aβ koncentrációját, ami ~ 1,4 µM-nak adódott.

$$PS\ részecskéhez\ kötött\ Aß\ egyenesének\ egyenlete: y_1 = 946{,}1 * x_1 + 13{,}6\ \ [1.egyenlet]$$

$$szabad\ Aß\ egyenesének\ egyenlete: y_2 = 32{,}7 * x_2 + 1272{,}4\ \ [2.egyenlet]$$

$$Az\ egyenesek\ metszétpontja: \frac{1272{,}4 - 13{,}6}{946{,}1 - 32{,}7} = \frac{1258{,}8}{913{,}4} = 1.37 \sim 1.4\ \mu M\ \ [3.egyenlet]$$

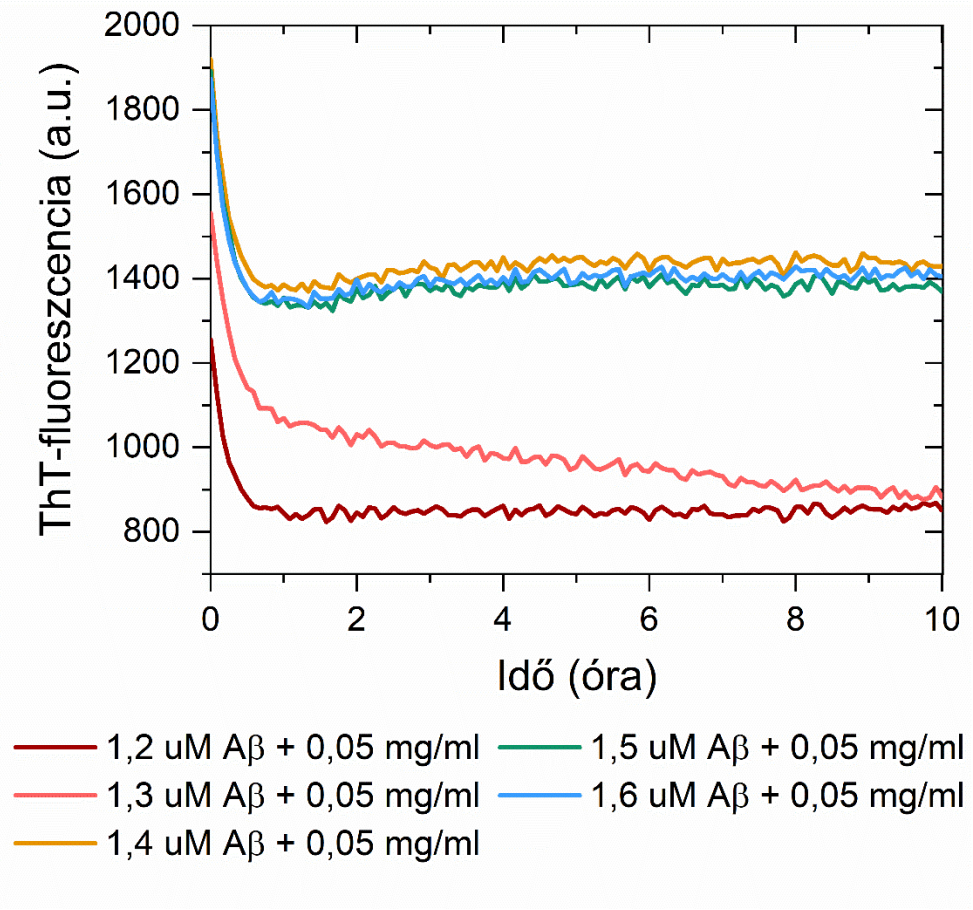


10. ábra: A PS nanorészecskék Aβ-kötő kapacitásának meghatározása. A) *Az 1 órás ThT-fluoreszcencia az Aβ-koncentráció függvényében ábrázolva.* ***B)*** *A mérés során megállapítottuk, hogy a jel két különböző járulékból, a PS-kötött és a szabad Aβ jeléből adódik össze. A PS telítéséhez tartozó Aβ-koncentrációt az illesztett egyenesek metszéspontja mutatja.*

Tehát, ha a PS aggregációra való hatását szeretnénk vizsgálni, akkor ezen arány felett kell adagolni a monomer Aβ peptidet. Szerettük volna ezt a telítési pontot kísérleten keresztül is bizonyítani, ezért további, szűk koncentrációtartományú méréseket is végeztünk.

A **11. ábrán** látható mérések során finom skálázással körbejártuk az 1,4 uM-os Aß-koncentrációt. Az 1,4 µM alatti fehérjekoncentrációk esetében a teljes Aβ-mennyiség kötődött,

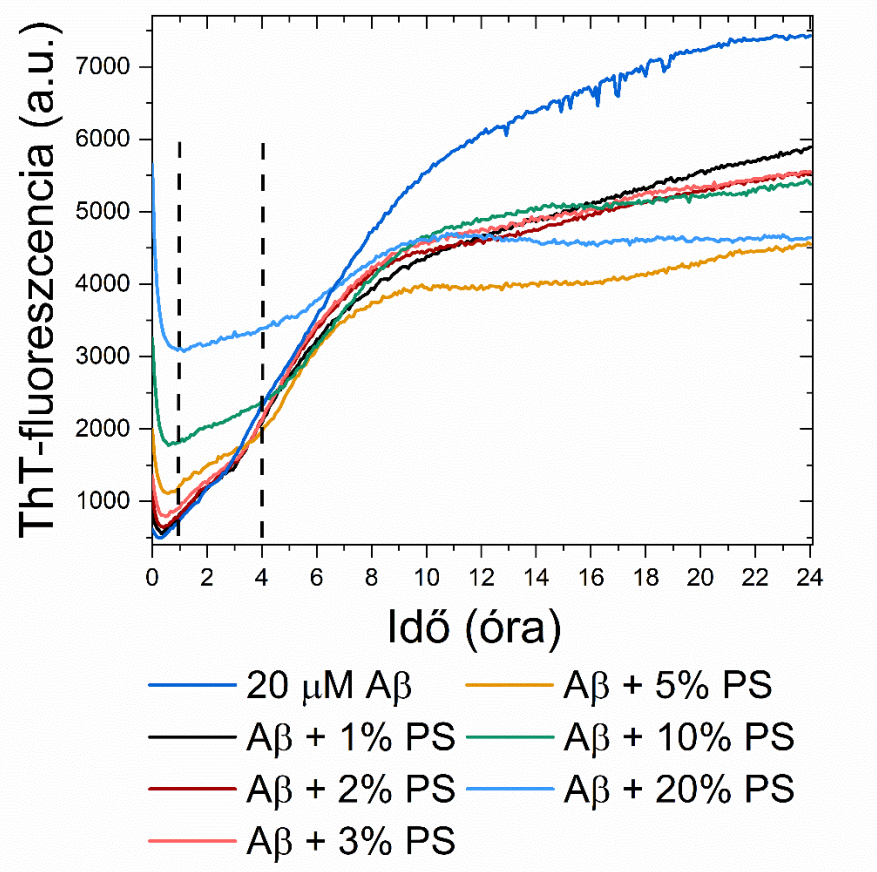
míg e fölött megindult az aggregáció. Az eredmények alapján kijelenthetjük, hogy a matematikailag levezetett telítési pontot a valós adatok is alátámasztják.



11 ábra: A PS Aβ-felvevő kapacitásának bizonyítására szolgáló kísérletek. *A nagyon precíz, szűk koncentrációtartományú mérés során megállapítható, hogy a korábbi kísérlet eredményeiből származó 1,4 μM Aβ – 0,05 mg/ml PS arány valóban a részecskék felszínének telítéséhez kapcsolódik. Az ábrán egy 24 órás mérésnek az első tíz órájából származó eredmények vannak ábrázolva, ezzel kiemelve a számunkra lényeges tartományt.*

A korábbi mérések ismeretében kíváncsiak voltunk arra, hogy a nanoműanyag jelenléte mennyire változtatja meg az Aß-szálak növekedésének sebességét. Ezen kérdés megválaszolásához a mérési elrendezést úgy állítottuk össze, hogy a részecske a monomer Aß-nak adott százalékát kösse meg. A mérés során (**12. ábra**) elsőre nehéz érdemi változást látni az aggregációs sebességben, mivel a PS-hez kötött Aβ mennyisége és így a kezdeti ThT-intenzitás változik, a görbék nem egy pontból indulnak. Az egy és négy óra közötti szakaszokra egyenest illesztettünk, és a kapott meredekségeket hasonlítottuk össze egymással (**1. táblázat**). Megállapítható, hogy nanorészecskék jelenlétében változik az amiloid növekedésének

sebessége, a szálak egyre lassabban növekednek (**12. ábra, 1. táblázat**). Ez nagyon érdekes eredmény annak ismeretében, hogy a részecskék a természetben találkozhatnak monomer amiloidogén fehérjével, és az eredmények alapján azt mondhatjuk, hogy potenciálisan hatásuk lehet az adott fehérjéhez kapcsolódó betegség kialakulására.



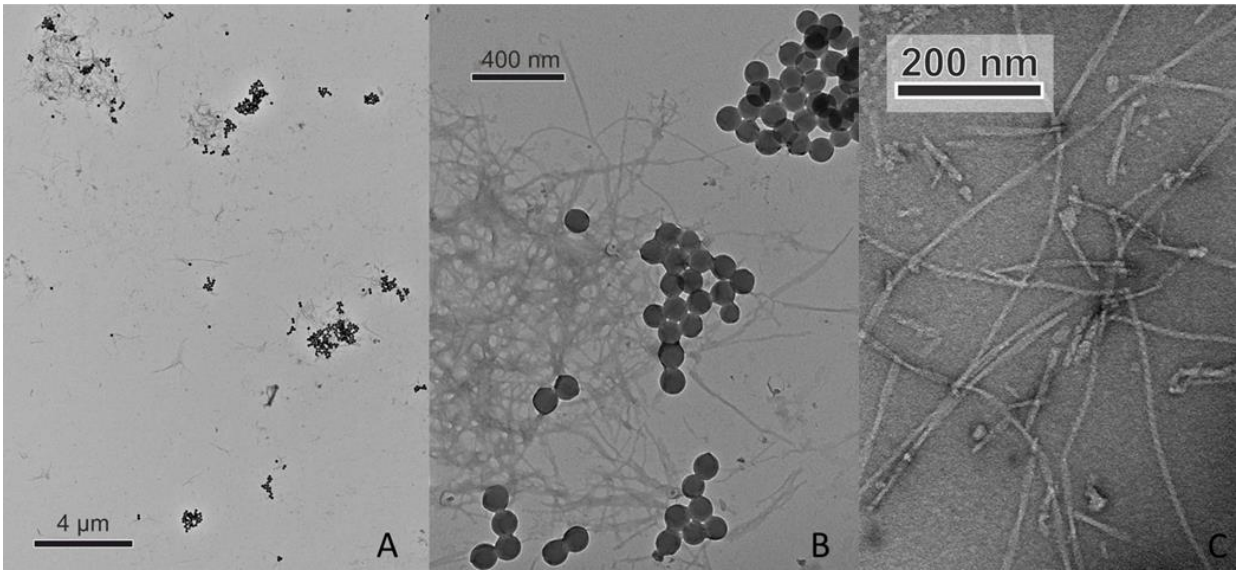
12. ábra: Az aggregációs sebesség részecskék általi befolyásolásának vizsgálata. *A mérés során úgy adagoltuk a PS nanorészecskéket, hogy az Aβ peptid adott százalékát kössék meg. A fekete szaggatott vonalak közötti intervallumon végeztük el az egyenesek illesztését és a meredekségek leolvasását. (1. táblázat)*

Minta neve	Szabad amiloid-ß koncentráció	Meredekség
20 µM Aß	20 µM	299,06
1 % PS + 20 µM Aß	19,8 µM	211,48
2 % PS + 20 µM Aß	19,6 µM	191,38
3 % PS + 20 µM Aß	19,4 µM	190,22
5 % PS + 20 µM Aß	19 µM	130
10 % PS + 20 µM Aß	18 µM	159,3
20 % PS + 20 µM Aß	16 µM	63,1

1. táblázat: Az Aβ aggregációs görbék 1 és 4 óra közötti tartományára illesztett egyenesek meredeksége. *Látható, hogy a PS mennyiségének növekedésével a meredekségek csökkenek, tehát a részecskék jelenlétében csökken az amiloid aggregációjának sebessége.*

Morfológiai és szerkezeti vizsgálatok:

A felnövekedett Aß-szálak morfológiáját elektronmikroszkópia segítségével vizsgáltuk, és az eredményeket összevetettük az irodalmi adatokkal.

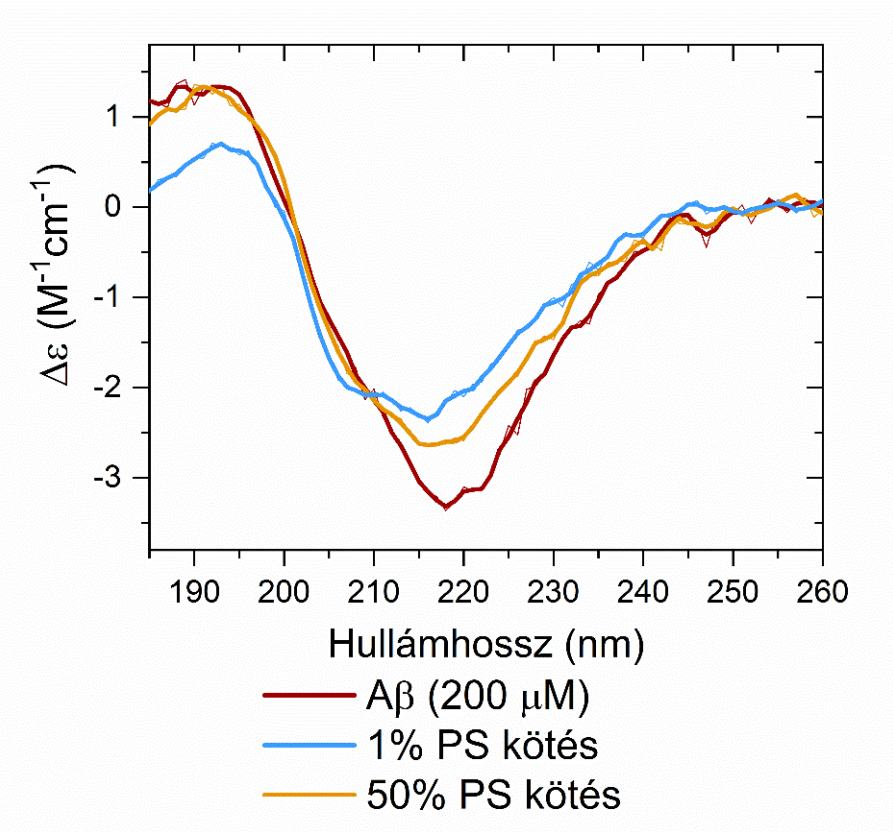


13. ábra: Elektronmikroszkópos felvételek a nanorészecskék mellett növesztett szálakról. *Az **A)** felvétel 5000-szeres nagyítású, míg a **B)** 50000-szeres. A szálak az önmagukban növesztettektől (**C**) morfológiailag nem mutatnak szignifikáns eltérést.*

A képek (**13. ábra**) irodalmi ismereteinkkel történő összevetése alapján megállapítottuk, hogy az önmagukban növesztett és a nanorészecskék mellett növesztett szálak morfológiája nem mutat szignifikáns eltérést egymástól. Viszont több olyan esettel is találkoztunk, amikor a felvételek alapján úgy tűnt, mintha a részecskék felszínéről indulna a szálnövekedés. Ez egy új

irányt indított a kutatásban, amelyben arra keressük a választ, hogy előfordulhat-e az, hogy a részecskék ugyan telítődnek a monomer formával, de ezt követően nukleációs magként szolgálnak a szálak növekedéséhez. Az ezzel kapcsolatos vizsgálatok jelenleg még zajlanak.

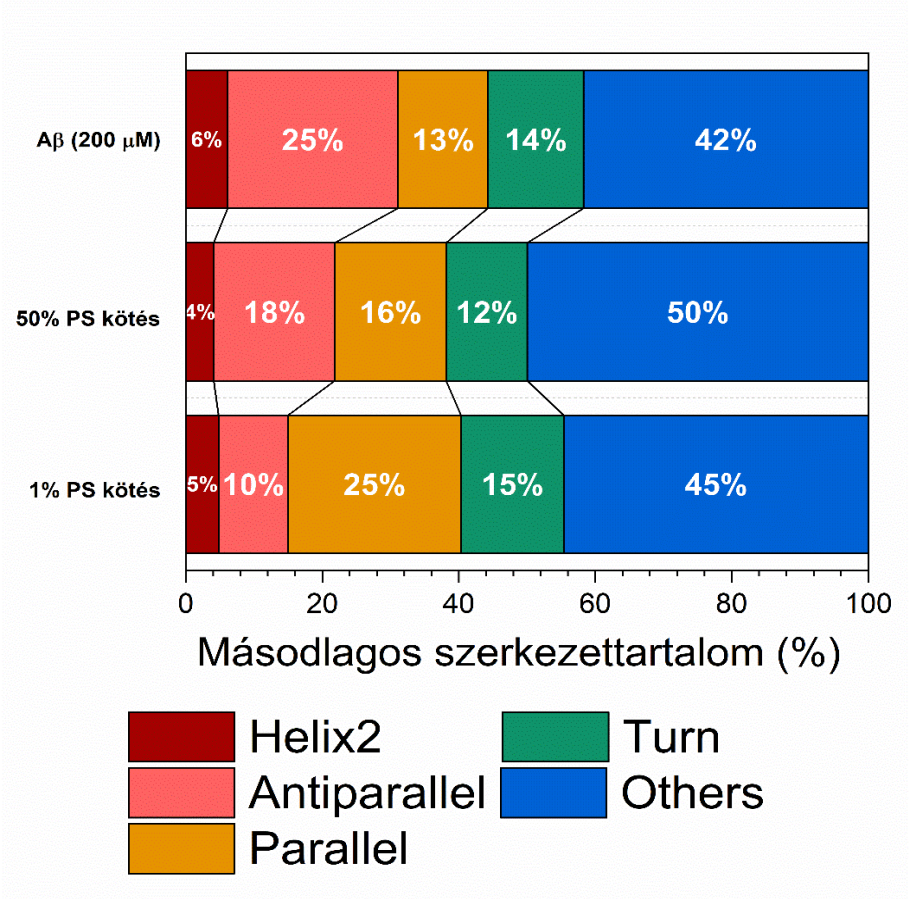
A szerkezetvizsgálathoz cirkuláris dikroizmus spektroszkópiát is alkalmaztunk, ahol a felnövekedett amiloidszálak jellegzetes ß-szerkezetet tartalmazó másodlagos szerkezetet mutathatnak. A CD-mérések során (**14. ábra**) arra kerestük a választ, hogy a részecskék jelenlétében növekedő szálakban bekövetkezik-e a másodlagos szerkezetben változás.



14. ábra: Az SRCD-mérések során kapott eredmények. *A mérés során úgy adagoltuk a PS nanorészecskéket a monomer Aß-hoz, hogy annak adott százalékát kössék meg. Az eredmények alapján látszik, hogy a spektrumok lefutása eltér az önmagában növesztett amiloidszál spektrumától. Ezért feltételezhetjük, hogy a részecskék jelenléte a növekedéskor kihat arra, hogy milyen másodlagos szerkezet-összetételű szálak növekednek.*

A spektrumok elemzését a BeStSel programmal végeztük el. Az eredmények alapján (**15. ábra**) nem állapítható meg jelentős eltérés az önmagukban növesztett és a PS részecskék mellett növesztett szálak összes β-szerkezet tartalma között, azonban a parallel β-szerkezet mennyisége az antiparallel β-szerkezet rovására nőni látszik a PS jelenlétében. Elképzelhető, hogy ez nem

a szálak szerkezetének változásához köthető, mivel az EM mérések nem mutattak különbséget, hanem az eltérő mennyiségű nem amiloid formában lévő Aβ-hoz (a CD spektrum az átlagos másodlagos szerkezetet mutatja). Ez a kérdés a jövőben további tanulmányozást igényel.



15. ábra: ***A BeStSel módszerrel végzett szerkezetelemzés eredménye.*** *Az eredmények százalékosan mutatják, hogy az egyes másodlagos szerkezettípusok milyen arányban fordulnak elő a fehérjében a CD-spektrum alapján. Az eredmények azt mutatják, hogy PS mellett megnőtt a parallel β-szerkezet aránya.*

Eredmények összefoglalása

TDK munkám során a PS nanorészecskék tulajdonságait és az Aβ peptid aggregációjára gyakorolt hatását vizsgáltam. Megállapítottam, hogy a részecskék okozta fényszórással szinte minden típusú mérésnél számolni kell. Munkám legfontosabb eredménye, hogy a PS nanorészecskék nem viselkednek semlegesen, hanem jól kimutatható módon és mennyiségben kötik a neurodegenerációban szerepet játszó Aβ peptidet, és hatással vannak annak aggregációs tulajdonságaira. A PS részecskék jelenlétében a fehérje aggregációs sebessége csökken. Az eredményeket, ha összevetjük a korábban említett szakcikkel [18], amely aggregálódó fehérjék és nanoműanyagok kapcsolatát vizsgálja, akkor azt mondhatjuk, hogy vannak hasonlóságok (pl. leírták, hogy adott arányban adagolva a két anyagot nem történik aggregáció) és különbségek is. De az összevetést nem lehet egzakt módon elvégezni az eltérő kísérleti elrendezések miatt.

Célunk a továbbiakban ezt az eredményt még alaposabban körüljárni. Jelenleg a legnagyobb kihívás az, hogy megtaláljuk a módját annak, hogyan lehet jól vizsgálni a kialakult polimerek szerkezetét, mivel a részecskék okozta fényszórás nem engedi meg, hogy egy bizonyos koncentrációnál feljebb menjünk. További célunk, hogy a PS nanorészecskéknek az Aβ peptid citotoxicitására gyakorolt hatását sejttenyészeteken vizsgáljuk, amely munka már folyamatban van.

Összefoglalás

A nanorészecskék a környezetben előforduló nanométeres mérettartományba eső anyagok és anyagtöredékek. Ezen tartományban a molekulák és különböző anyagok között fellépő kölcsönhatások megváltoztathatják a molekulák fizikokémiai paramétereit és tulajdonságait. A nanorészecskék vizsgálata iránti érdeklődés az elmúlt időkben rendkívüli módon megnőtt, köszönhetően annak, hogy egyszerre rejlik bennük rendkívül nagy potenciál és fenyegetés is. Ezek az anyagok képesek hatást gyakorolni a szervezetben és a környezetben előforduló fehérjékre. A nanorészecskékkel való kölcsönhatás során a fehérjék konformációváltozást szenvedhetnek, részben vagy egészben denaturálódhatnak. Ezért a fehérjék és nanorészecskék közötti kölcsönhatások kialakulásának következményeit elengedhetetlen megismerni ahhoz, hogy feltérképezhessük környezeti hatásaikat. Kutatásunk során nanorészecskék fehérjeszerkezetre gyakorolt hatásait vizsgáltuk ThT-fluoreszcencia, CD- és SRCD-spektroszkópia, elektronmikroszkópia és citotoxicitási mérések segítségével. Eredményeink rámutatnak arra, hogy polisztirol nanorészecskék már kis mennyiségben is befolyásolják az Alzheimer-kórban érintett amiloid-ß fehérje aggregációjának folyamatát. Azt is feltártuk, hogy a részecskék gyorsan és viszonylag nagy mennyiségben képesek megkötni a fehérje monomer formáját a felszínükön, amely befolyásolja a fehérje aggregációs képességeit.

Köszönetnyilvánítás

Mély tisztelettel és szívből jövő hálával mondok köszönetet Dr. Kardos Józsefnek és Dr. Micsonai Andrásnak, az ELTE TTK Biológiai Intézet, Biokémiai Tanszék egyetemi adjunktusainak, akik segítettek a Tudományos Diákköri munka tervezésében, elvégzésében és a kapott eredmények feldolgozásában. Szeretném megköszönni, hogy áldozatos és kitartó munkájukkal segítették a dolgozat elkészülését.

Kiemelten szeretnék köszönetet mondani Moussong Évának, a kutatócsoport PhD hallgatójának, hogy időt és energiát nem sajnálva segített a mérések kivitelezésében, és több ponton is támogatta a dolgozathoz kapcsolódó feladatok elkészülését.

Szeretnék köszönetet mondani a *Fehérje folding és amiloid* kutatócsoport összes munkatársának, akik segítettek a mérések elvégzésében.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Frank Wiennek, a SOLEIL szinkrotron (Gif-sur-Yvette, Franciaország) DISCO mérőállomás munkatársának, hogy lehetőséget biztosított, hogy SRCD készülék segítségével tudjak méréseket végezni.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Kovács Mihály egyetemi tanárnak, a Biokémiai Tanszék vezetőjének és az egész tanszéknek, hogy lehetőséget biztosítottak arra, hogy elvégezzem a kutatással kapcsolatos munkákat a tanszéki infrastruktúra felhasználásával.

Irodalomjegyzék

[1] Gigault, J. et al. Current opinion: What is a nanoplastic? Environmental Pollution 235, 1030–1034 (**2018**).

[2] Caspani, S., Magalhães, R., Araújo, J. P. & Sousa, C. T. Magnetic Nanomaterials as Contrast Agents for MRI. Materials 13, 2586 (**2020**).

[3] Wilczewska, A. Z., Niemirowicz, K., Markiewicz, K. H. & Car, H. Nanoparticles as drug delivery systems. Pharmacological Reports 64, 1020–1037 (**2012**).

[4] Lombardo, D., Kiselev, M. A. & Caccamo, M. T. Smart Nanoparticles for Drug Delivery Application: Development of Versatile Nanocarrier Platforms in Biotechnology and Nanomedicine. Journal of Nanomaterials 2019, 1–26 (**2019**).

[5] Fiorentino, I. et al. Energy independent uptake and release of polystyrene nanoparticles in primary mammalian cell cultures. Experimental Cell Research 330, 240–247 (**2015**).

[6] Ding, J. et al. Toxicological effects of nano- and micro-polystyrene plastics on red tilapia: Are larger plastic particles more harmless? Journal of Hazardous Materials 396, 122693 (**2020**).

[7] Lehner, R., Weder, C., Petri-Fink, A. & Rothen-Rutishauser, B. Emergence of Nanoplastic in the Environment and Possible Impact on Human Health. Environmental Science & Technology 53, 1748–1765 (**2019**).

[8] Keinänen, O. et al. Harnessing PET to track micro- and nanoplastics in vivo. Scientific Reports 11, (**2021**).

[9] Ragusa, A. et al. Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta. Environment International 146, 106274 (**2021**).

[10] Oliveira, M. & Almeida, M. The why and how of micro(nano)plastic research. TrAC Trends in Analytical Chemistry 114, 196–201 (**2019**).

[11] Teng, M. et al. Polystyrene Nanoplastics Toxicity to Zebrafish: Dysregulation of the Brain–Intestine–Microbiota Axis. ACS Nano 16, 8190–8204 (**2022**).

[12] Deng, Y., Zhang, Y., Lemos, B. & Ren, H. Tissue accumulation of microplastics in mice and biomarker responses suggest widespread health risks of exposure. Scientific Reports 7, (**2017**).

[13] Pitt, J. A. et al. Uptake, tissue distribution, and toxicity of polystyrene nanoparticles in developing zebrafish (Danio rerio). Aquatic Toxicology 194, 185–194 (**2018**).

[14] Kihara, S. et al. Soft and Hard Interactions between Polystyrene Nanoplastics and Human Serum Albumin Protein Corona. Bioconjugate Chemistry 30, 1067–1076 (**2019**).

[15] Hildebrand, N. et al. Atomistic Details of Chymotrypsin Conformational Changes upon Adsorption on Silica. ACS Biomaterials Science & Engineering 4, 4036–4050 (**2018**).

[16] Hollóczki, O. & Gehrke, S. Nanoplastics can change the secondary structure of proteins. Scientific Reports 9, (**2019**).

[17] Hollóczki, O. Evidence for protein misfolding in the presence of nanoplastics. International Journal of Quantum Chemistry 121, (**2020**).

[18] Cabaleiro-Lago, C., Quinlan-Pluck, F., Lynch, I., Dawson, K. A. & Linse, S. Dual Effect of Amino Modified Polystyrene Nanoparticles on Amyloid β Protein Fibrillation. ACS Chemical Neuroscience 1, 279–287 (**2010**).

[19] Morley, J. E. & Farr, S. A. The role of amyloid-beta in the regulation of memory. Biochemical Pharmacology 88, 479–485 (**2014**).

[20] Sadigh-Eteghad, S. et al. Amyloid-Beta: A Crucial Factor in Alzheimer's Disease. Medical Principles and Practice 24, 1–10 (**2014**).

[21] Livingston, G. et al. Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. The Lancet396, 413–446 (**2020**).

[22] Pagani, L. & Eckert, A. Amyloid-Beta Interaction with Mitochondria. International Journal of Alzheimer's Disease 2011, 1–12 (**2011**).

[23] Chen, G. et al. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. Acta Pharmacologica Sinica 38, 1205–1235 (**2017**).

[24] Wang, H.-Y., Li, W., Benedetti, N. J. & Lee, D. H. S. α7 Nicotinic Acetylcholine Receptors Mediate β-Amyloid Peptide-induced Tau Protein Phosphorylation. Journal of Biological Chemistry 278, 31547–31553 (**2003**).

[25] Balbach, J. J. et al. Supramolecular Structure in Full-Length Alzheimer's β-Amyloid Fibrils: Evidence for a Parallel β-Sheet Organization from Solid-State Nuclear Magnetic Resonance. Biophysical Journal 83, 1205–1216 (**2002**).

[26] Shi, J.-M. et al. N-terminal Domain of Amyloid-β Impacts Fibrillation and Neurotoxicity. ACS Omega (**2022**) doi:10.1021/acsomega.2c04583.

[27] Kollmer, M. et al. Cryo-EM structure and polymorphism of Aβ amyloid fibrils purified from Alzheimer's brain tissue. Nature Communications 10, (**2019**).

[28] Yang, Y. et al. Cryo-EM structures of amyloid-β 42 filaments from human brains. Science 375, 167–172 (**2022**).

[29] Xie, Y. et al. Novel strategies for the fight of Alzheimer's disease targeting amyloid-β protein. Journal of Drug Targeting 30, 259–268 (**2021**).

[30] Pardo-Moreno, T. et al. Therapeutic Approach to Alzheimer's Disease: Current Treatments and New Perspectives. Pharmaceutics 14, 1117 (**2022**).

[31] Gade Malmos, K., Blancas-Mejia, L. M., Weber, B., Buchner, J., Ramirez-Alvarado, M., Naiki, H. & Otzen, D. ThT 101: a primer on the use of thioflavin T to investigate amyloid formation. Amyloid 24, 1–16 (**2017**).

[32] Housmans, J. A. J., Wu, G., Schymkowitz, J. & Rousseau, F. A guide to studying protein aggregation. The FEBS Journal (**2021**)

[33] Micsonai, A. et al. BeStSel: webserver for secondary structure and fold prediction for protein CD spectroscopy. Nucleic Acids Research 50, W90–W98 (**2022**).

[34] Micsonai, A. et al. Disordered–Ordered Protein Binary Classification by Circular Dichroism Spectroscopy. Frontiers in Molecular Biosciences 9, (**2022**).

[35] Micsonai, A. et al. BeStSel: a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra. Nucleic Acids Research 46, W315–W322 (**2018**).

[36] Micsonai, A. et al. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. Proceedings of the National Academy of Sciences 112, (**2015**).

[37] Selkoe, D. J. Cell Biology of the Amyloid beta-Protein Precursor and the Mechanism of Alzheimer's Disease. Annual Review of Cell Biology 10, 373–403 (**1994**).

[38] Cai, X.-D., Golde, T. E. & Younkin, S. G. Release of Excess Amyloid β Protein from a Mutant Amyloid β Protein Precursor. Science 259, 514–516 (**1993**).

[39] Masters, C. L. & Selkoe, D. J. Biochemistry of Amyloid -Protein and Amyloid Deposits in Alzheimer Disease. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine 2, a006262–a006262 (**2012**).

[40] Haass, C. & Selkoe, D. J. Cellular processing of β-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid β-peptide. Cell 75, 1039–1042 (**1993**).

[41] John, T. et al. Impact of nanoparticles on amyloid peptide and protein aggregation: a review with a focus on gold nanoparticles. Nanoscale 10, 20894–20913 (**2018**).

[42] Gopinath, P. M. et al. Assessment on interactive prospectives of nanoplastics with plasma proteins and the toxicological impacts of virgin, coronated and environmentally released-nanoplastics. Scientific Reports 9, (**2019**).

[43] Li, C. et al. Synergistic effect of polystyrene nanoplastics and contaminants on the promotion of insulin fibrillation. Ecotoxicology and Environmental Safety 214, 112115 (**2021**).