

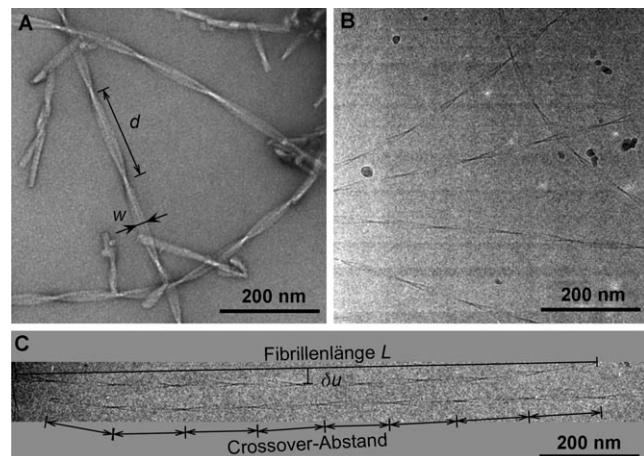
# Kryoelektronenmikroskopische Bestimmung der nanoskaligen Flexibilität von Amyloidfibrillen\*\*

Carsten Sachse, Nikolaus Grigorieff und Marcus Fändrich\*

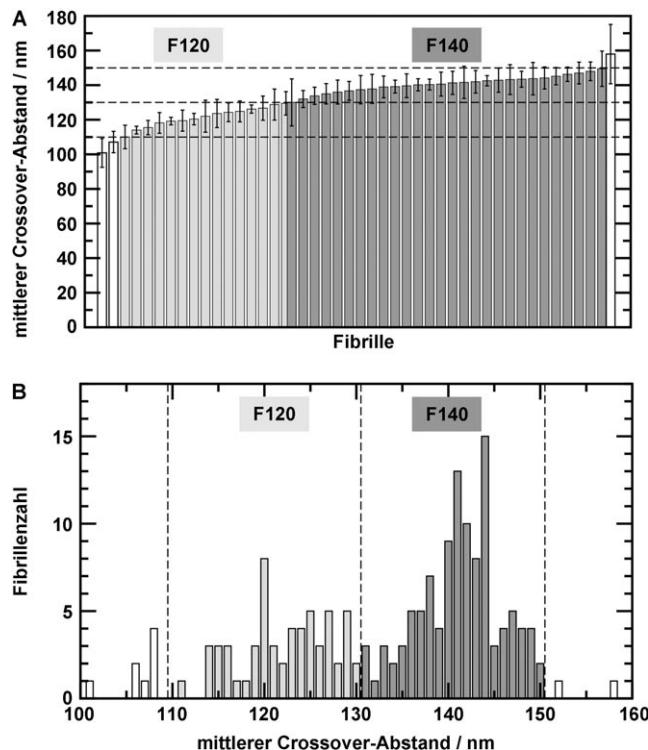
Amyloidfibrillen sind fibrilläre Polypeptidaggregate mit  $\beta$ -Kreuz-Struktur.<sup>[1,2]</sup> Steifigkeit und Stabilität dieser Fibrillen sind Teil ihrer natürlichen Pathogenität oder Funktionalität und inspirierten Anwendungen in der Bionanotechnologie.<sup>[3-6]</sup> Amyloidfibrillen können in unterschiedlichen Morphologien mit jeweils spezifischen mechanischen und flexiblen Eigenschaften auftreten.<sup>[7-9]</sup> Wir nutzten nun die Kryoelektronenmikroskopie (Kryo-EM), um diese nanoskaligen Struktureigenschaften zu charakterisieren. Kryo-EM-Bilder sind im Prinzip Momentaufnahmen von thermisch fluktuierenden Fibrillen in Lösung, die keine Mikromanipulation oder Immobilisierung auf fester Oberfläche erforderlich machen. Die hier analysierten Amyloidfibrillen bestehen aus dem Alzheimer- $\text{A}\beta(1-40)$ -Peptid. Sie sind in ihrer Breite sehr homogen ( $w \approx 20 \text{ nm}$ ), während ihre Crossover-Abstände  $d$  signifikant variieren (Abbildung 1).

Doch nicht nur zwischen den Fibrillen, sondern auch innerhalb einer einzelnen Fibrille variiert  $d$ . Dabei beträgt die intrafibrilläre Standardabweichung meist 5–7 nm, während die mittleren  $d$ -Werte verschiedener Fibrillen von 100 bis 160 nm variieren (Abbildung 2 A). Deshalb können die beobachteten Unterschiede nicht durch rein thermisch verursachte stochastische Fluktuationen erklärt werden. Sie repräsentieren vielmehr die subtilen, aber systematischen Strukturunterschiede der Fibrillen dieser Probe.

Zur Analyse dieser Strukturunterschiede definierten wir zwei Gruppen: F120- und F140-Fibrillen. Die F140-Fibrillen weisen einen mittleren  $d$ -Wert von  $(140 \pm 10) \text{ nm}$  auf (Abbildung 2 B); ihre 3D-Struktur wurde bereits mit einer Auflösung von etwa 8 Å bestimmt.<sup>[10,11]</sup> Der mittlere  $d$ -Wert der F120-Fibrillen ist  $(120 \pm 10) \text{ nm}$  (Abbildung 2 B); ihre Struktur wurde von uns mit einer Auflösung von etwa 10 Å bestimmt (Abbildung 3 A, B, Abbildung 2 in den Hintergrund).



**Abbildung 1.** Allgemeine Strukturkennzeichen von Fibrillen. Negativkontrast- (A) und Kryomikrographien (B, C) zeigen die Definitionen der Fibrillenlänge  $L$ , der Breite  $w$ , des Crossover-Abstands  $d$  und des Normalabstands  $\delta u$ .



**Abbildung 2.** A) Mittlere Crossover-Abstände repräsentativer Fibrillen. B) Verteilung der mittleren Crossover-Abstände der gesamten Fibrillenpopulation. F120-Fibrillen: hellgrau; F140-Fibrillen: dunkelgrau.

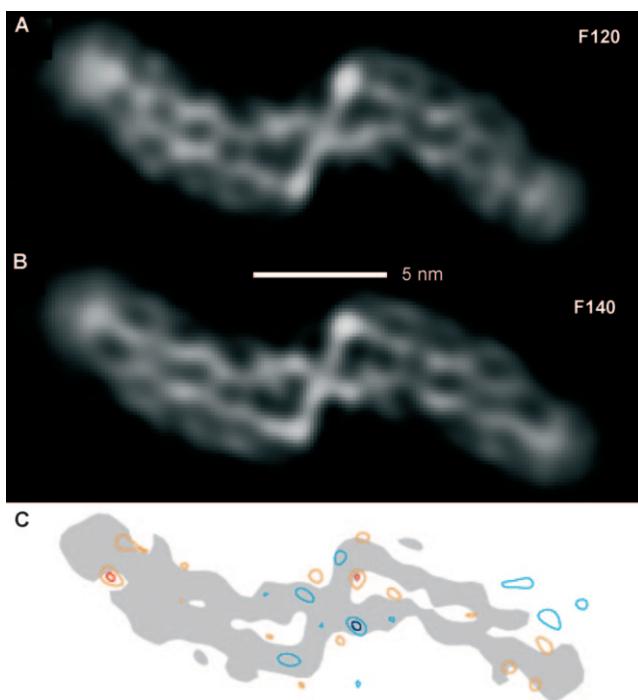
[\*] M. Fändrich  
Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung und Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Weinbergweg 22, 06120 Halle an der Saale (Deutschland)  
E-Mail: fandrich@enzyme-halle.mpg.de

C. Sachse  
MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge (Großbritannien)

N. Grigorieff  
Rosenstiel Basic Medical Sciences Research Center and  
Howard Hughes Medical Institute  
Brandeis University, Waltham (USA)

[\*\*] Diese Arbeit wurde durch das BMBF (BioFuture) und die DFG (SFB610) (M.F.), die National Institutes of Health (Grant 1 P01 GM-62580; N.G.) sowie durch ein EMBO-Postdoc-Stipendium (C.S.) unterstützt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200904781> zu finden.



**Abbildung 3.** Querschnitt der F120- (A) und F140-Fibrillen (B). C) Differenzkarte F140–F120. Negative Banden: orange =  $2\sigma$ , rot =  $3\sigma$ ; positive Banden: hellblau =  $2\sigma$ , blau =  $3\sigma$ .

informationen). Obgleich die Aufteilung in F120- und F140-Fibrillen willkürlich geschah, sind die zwei Gruppen von ausreichender Größe, um die 3D-Struktur mit mittlerer Auflösung zu bestimmen und die nanoskaligen elastischen Eigenschaften zu messen. Rekonstruierte F120- und F140-Fibrillen weisen denselben Querschnitt auf (Abbildung 3). Das bedeutet, dass sich der Konformationsunterschied der Peptide, welcher den F120- und F140-Fibrillen zugrundeliegt, zu klein ist, um ihn mit der derzeitigen Auflösung sichtbar machen zu können. Unsere Daten legen nahe, dass sich die einzelnen Fibrillen einer Grundmorphologie systematisch in ihren Crossover-Abständen unterscheiden können (Abbildung 2A).

Die Berechnung der nanoskaligen elastischen Eigenschaften basiert auf der Messung der Variationen der Fibrillenverdrillung und -verbiegung. Unter der Annahme, dass die Fibrillen aus einem isotropen, homogenen Medium bestehen, können aus der Veränderung der Fibrillenverdrillung  $d$  die Torsionspersistenzlänge  $l_c$  und die Verwindungssteife  $c$  berechnet werden. Variationen der Biegung ergeben die Persistenzlänge  $l_p$  und die Biegesteifigkeit  $\kappa$  (siehe Hintergrundinformationen). Nach unseren Messungen haben die F120- und die F140-Fibrillen sehr ähnliche, wenn nicht identische Verdrillungseigenschaften ( $c$  und  $l_c$  in Tabelle 2 der Hintergrundinformationen). Bezuglich der Biegeeigenschaften hingegen unterscheiden sich die beiden Fibrillengruppen signifikant (Tabelle 3 der Hintergrundinformationen): Bei den F120-Fibrillen ist die Biegesteifigkeit  $\kappa$  geringer (Tabelle 3 der Hintergrundinformationen) und die normalisierte Biegefliktuation  $\Delta u$  größer als bei den F140-Fibrillen (Abbildung 3B der Hintergrundinformationen). Zum Teil mögen

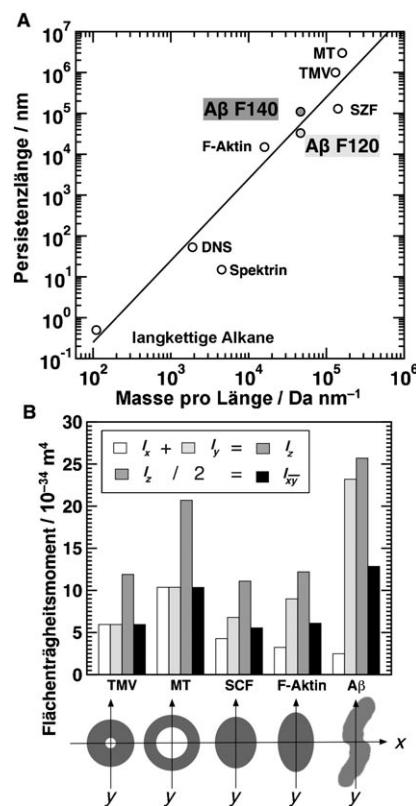
diese Unterschiede aber auch an den unterschiedlichen Crossover-Abständen der beiden Gruppen liegen (Abbildung 3 der Hintergrundinformationen).

Die gemessenen  $l_p$ - und  $\kappa$ -Werte liegen im Bereich der für andere Amyloidfibrillen veröffentlichten Werte,<sup>[12–14]</sup> und sie sind mit der Basisbeziehung zwischen  $l_p$  und der molekularen Dichte (Masse pro Länge) in Einklang (Abbildung 4A).

Die Abhängigkeit von  $c$  und  $\kappa$  von form- und materialspezifischen Faktoren wurde schon für mehrere Proteinfibrillen analysiert.<sup>[15–17]</sup> In diesen Analysen wurde aber ein physikalischer Formalismus verwendet, der ursprünglich für makroskopische Objekte entwickelt worden war und dessen allgemeine Anwendbarkeit auf nanoskalige Proteinfibrillen daher noch abschließend etabliert werden muss. Diesem Formalismus zufolge hängt die Verwindungssteife  $c$  vom formabhängigen polaren Flächenträgheitsmoment  $I_z$  und vom materialspezifischen Schermodul  $G$  ab [Gl. (1)]. Für die Biegesteifigkeit  $\kappa$  gilt die in Gleichung (2) formulierte Abhängigkeit des materialspezifischen Young-Moduls  $Y$  vom durchschnittlichen axialen Flächenträgheitsmoment  $I_{\bar{x}}$ .

$$c = I_z G \quad (1)$$

$$\kappa = I_{\bar{x}} Y \quad (2)$$



**Abbildung 4.** Flexibilitätsparameter der F120- und F140-Fibrillen im Vergleich mit denen anderer filamentöser Proteinstrukturen. A) Die Persistenzlänge nimmt mit der Masse pro Länge zu.<sup>[19]</sup> B) Vergleich der axialen Flächenträgheitsmomente mit dem polaren Flächenträgheitsmoment von Modellen flächennormalisierter Querschnitte verschiedener Proteinfilamente. TMV: Tabakmosaikvirus; MT: Mikrotubuli; SZF: Sichelzell-Hämoglobinfasern.

Während bei früheren Ansätzen die Form des Fibrillenquerschnitts aus Modellen geschätzt werden musste, ermöglicht die hier verwendete Kryo-EM eine direkte Berechnung der beiden formabhängigen Faktoren  $I_z$  und  $I_{xy}$  aus dem Querschnitt der 3D-Fibrillenrekonstruktionen. Da F120- und F140-Fibrillen einen nahezu gleichen Querschnitt aufweisen (Abbildung 3), besitzen sie auch ähnliche formabhängige Faktoren  $I_z$  und  $I_{xy}$  (Tabellen 2 und 3 in den Hintergrundinformationen). Ihre gemessenen Verwindungssteifen sind ebenfalls sehr ähnlich und ergeben im Rahmen der Fehlergrenzen denselben Schermodul  $G$  (Gl. (1), Tabelle 2 in den Hintergrundinformationen).

Wir verglichen die berechneten Materialmoduli mit Literaturwerten, wobei zu bedenken ist, dass die exakten numerischen Werte wegen möglicher Einflüsse des Analysenverfahrens mit Bedacht interpretiert werden müssen.<sup>[14]</sup> Die Schermodule  $G$  der F120- und F140-Fibrillen (12.7 MPa) sind nahe an denen anderer Proteinkomplexe wie F-Aktin (9 MPa)<sup>[16]</sup> oder Sichelzell-Hämoglobinfasern (SZF, 1 MPa)<sup>[18]</sup> und liegen zwischen denen der makroskopischen Materialien Kunststoff ( $\approx$  100 MPa) und Gummi ( $\approx$  0.6 MPa).<sup>[19]</sup> Die mittleren Young-Module  $Y$  der F120- und F140-Fibrillen (90 bzw. 320 MPa) liegen nahe an den Werten filamentöser Proteine wie SZF (50 MPa),<sup>[18]</sup> sind jedoch niedriger als die von Mikrotubuli und Aktin (1 bzw. 3 GPa).<sup>[15]</sup>

Die Materialkonstanten der F120- und F140-Fibrillen unterscheiden sich jedoch deutlich von den für Insulin-Amyloidfibrillen berichteten (Schermodul  $G$  = 130 MPa, Young-Modul  $Y$  = 6 GPa<sup>[14]</sup>). Persistenzlänge (42  $\mu$ m) und Biegesteifigkeit ( $1.7 \times 10^{-25}$  N m<sup>2</sup>) der Insulinfibrillen waren dagegen denen der  $\text{A}\beta(1-40)$ -Fibrillen bemerkenswert ähnlich. Da noch keine 3D-Rekonstruktion der analysierten Insinfibrillen veröffentlicht wurde, ist es schwierig, ihre Querschnittsstruktur mit der Struktur der hier verwendeten  $\text{A}\beta(1-40)$ -Fibrillen zu vergleichen.

Unsere Daten belegen demzufolge keine ungewöhnlich hohen nanoskaligen Materialkonstanten für die analysierten  $\text{A}\beta(1-40)$ -Fibrillen, zeigen aber zumindest, dass die formabhängigen Eigenschaften polares Flächenträgheitsmoment  $I_z$  und Flächenträgheitsmoment  $I_{xy}$  dieser Fibrillen größer sind als die von flächennormierten Querschnitten anderer Proteinfilamente sind (Abbildung 4B). Die analysierten  $\text{A}\beta$ -Fibrillen bieten daher einen sehr materialeffizienten Weg, um Proteinfilamente von hoher Stabilität und struktureller Flexibilität zu erzeugen. Diese Beobachtungen sind für eine verbesserte Abschätzung der Anwendungsmöglichkeiten von Amyloidfibrillen in den Materialwissenschaften wesentlich.

Darüber hinaus tragen unsere Daten dazu bei, die Amyloidpathogenität *in vivo* besser zu verstehen. Amyloidfibrillen sind in ihrer Stabilität und Flexibilität den nativen Proteinfilamenten wie F-Aktin oder Mikrotubuli ähnlich. Wachstum und Abbau dieser nativen Proteinfilamente geschehen jedoch als hochgradig dynamische und regulierte

Prozesse. Als solche sind sie außerdem von spezifischen Kontrollproteinen genau gesteuert. Ein unreguliertes Auswachsen ähnlich stabiler Amyloidfibrillen ist daher in einer biologischen Umgebung nicht unproblematisch. In der Tat beruht die Amyloidpathogenität zumindest teilweise auf der Beeinträchtigung von normalerweise elastischen oder flexiblen Geweben wie Herzventrikel oder der Wand von Blutgefäßen.<sup>[20]</sup> Weitere Arbeiten sind aber notwendig, um die Wege zu beschreiben, über die solche Vorgänge zum Absterben der betroffenen Zellen führen.

Eingegangen am 26. August 2009,  
veränderte Fassung am 13. November 2009  
Online veröffentlicht am 12. Januar 2010

**Stichwörter:** Alzheimer · Amyloide · Elektronenmikroskopie · Nanotechnologie · Proteinfaltung

- [1] R. Jansen, W. Dzwolak, R. Winter, *Biophys. J.* **2005**, 88, 1344–1353.
- [2] L. C. Serpell, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2000**, 1502, 16–30.
- [3] I. Cherny, E. Gazit, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 4128–4136; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 4062–4069.
- [4] Y. Goto, H. Yagi, K. Yamaguchi, E. Chatani, T. Ban, *Curr. Pharm. Des.* **2008**, 14, 3205–3218.
- [5] D. Otzen, P. H. Nielsen, *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, 65, 910–927.
- [6] G. Tuchscherer, A. Chandravarkar, M. S. Camus, J. Bérard, K. Murat, A. Schmid, R. Mimna, H. A. Lashuel, M. Mutter, *Bio-polymers* **2007**, 88, 239–252.
- [7] M. Fändrich, J. Meinhardt, N. Grigorieff, *Prion* **2009**, 3, 89–93.
- [8] J. Meinhardt, C. Sachse, P. Hortschansky, N. Grigorieff, M. Fändrich, *J. Mol. Biol.* **2009**, 386, 869–877.
- [9] R. Wetzel, S. Shivaprasad, A. D. Williams, *Biochemistry* **2007**, 46, 1–10.
- [10] C. Sachse, M. Fändrich, N. Grigorieff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 7462–7466.
- [11] C. Sachse, C. Xu, K. Wielgmann, S. Diekmann, N. Grigorieff, M. Fändrich, *J. Mol. Biol.* **2006**, 362, 347–354.
- [12] T. P. Knowles, A. W. Fitzpatrick, S. Meehan, H. R. Mott, M. Vendruscolo, C. M. Dobson, M. E. Welland, *Science* **2007**, 318, 1900–1903.
- [13] T. P. Knowles, J. F. Smith, A. Craig, C. M. Dobson, M. E. Welland, *Phys. Rev. Lett.* **2006**, 96, 238301.
- [14] J. F. Smith, T. P. Knowles, C. M. Dobson, C. E. Macphee, M. E. Welland, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 15806–15811.
- [15] F. Gittes, B. Mickey, J. Nettleton, J. Howard, *J. Cell Biol.* **1993**, 120, 923–934.
- [16] E. Prochniewicz, N. Janson, D. D. Thomas, E. M. De La Cruz, *J. Mol. Biol.* **2005**, 353, 990–1000.
- [17] J. C. Wang, M. S. Turner, G. Agarwal, S. Kwong, R. Josephs, F. A. Ferrone, R. W. Briebl, *J. Mol. Biol.* **2002**, 315, 601–612.
- [18] M. S. Turner, R. W. Briebl, J. C. Wang, F. A. Ferrone, R. Josephs, *J. Mol. Biol.* **2006**, 357, 1422–1427.
- [19] D. Boal, *Mechanics of the Cell*, Cambridge University Press, 2002.
- [20] M. B. Pepys, *Annu. Rev. Med.* **2006**, 57, 223–241.