

Amyloid-lignende fimbria

- En hjælpende hånd til forståelsen af den molekulære baggrund for demenssygdomme

Af Morten Simonsen Dueholm, M.Sc., Institut for Kemi, Miljø og Bioteknologi, Aalborg Universitet

En lang række sygdomme, heriblandt flere demenssygdomme, er karakteriseret ved en ophobning af aggregerede, uopløselige proteinfibriller, kaldet amyloider. Denne ophobning resulterer i skader på væv eller nedbrydning heraf. De amyloide sygdomme omfatter velkendte sygdomme såsom Parkinsons og Alzheimers sygdom. Mellem hhv. 5-10% og 1-2% af befolkningen over 65 år rammes af disse sygdomme. En detaljeret beskrivelse af mekanismen bag omdannelsen af native proteiner til amyloide strukturer er derfor af både social og økonomisk interesse.

Selvom de proteiner, der knytter sig til de amyloide sygdomme, er forskellige mht. sekundære og tertiære strukturer, polymeriseres de alle under amyloid-dannelsen til fibriller med en karakteristisk β -helix-struktur. Pga. den unikke struktur binder amyloiderne de fluorescerende indikatorstoffer thioflavin T (ThT) og Congo rød, hvorved begge stoffer ændrer spektrale egenskaber [1,2].

Inden for det sidste årti er der foretaget en lang række undersøgelser af omdannelsen fra native proteiner til amyloide strukturer. Da mulighederne for at foretage *in vivo* studier af dannelsen af amyloider er meget begrænsede, er størstedelen af undersøgelserne foretaget *in vitro*. Derfor er vores viden om amyloid-dannelsen begrænset til meget forsimplede systemer.

For nylig er det vist, at der i naturen findes en lang række systemer, hvor bl.a. mikroorganismer drager nytte af strukturer, der i høj grad er sammenlignelige med amyloiderne. Et specielt interessant eksempel er en unik type af bakterielle fimbria.

Amyloid-lignende fimbriae

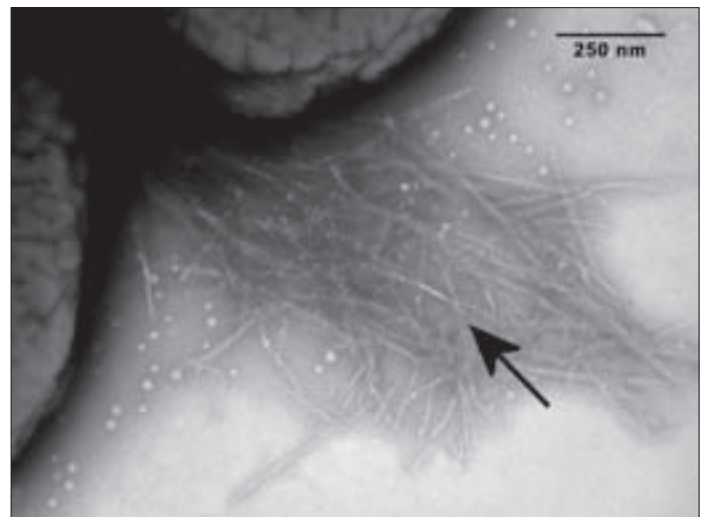
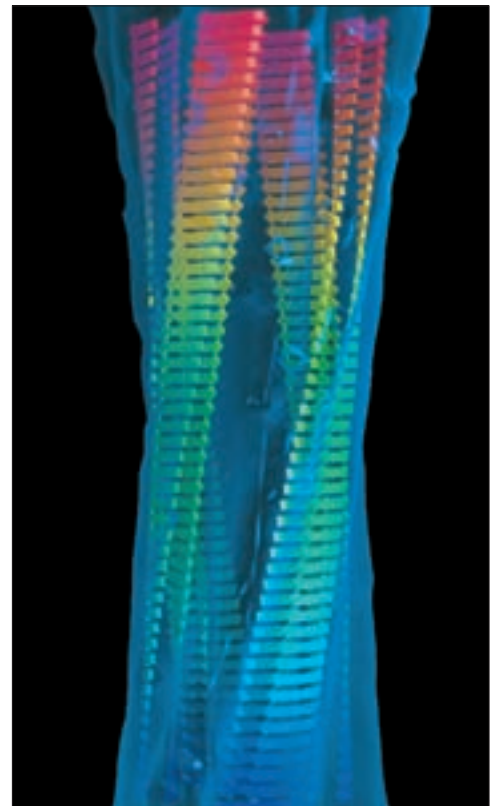
Visse *Salmonella*- og *Escherichia coli*-stammer udtrykker under bestemte vækstbetingelser en helt speciel type fimbriae med amyloid-lignende struktur [3]. De hårlignende overfladestrukturer benyttes af bakterierne til bl.a. at kolonisere abiotiske overflader under dannelse af biofilm. Hermed har de en evolutionær fordel for bakterien i naturlige miljøer. *In vivo* undersøgelser af naturlige biofilm foretaget af vores gruppe har vist, at produktionen af amyloid-lignende fimbriae (ALF) ikke kun er knyttet til medlemmer af *Enterobacteriaceae*-familien, hvor de tidligere er identificeret, men er et langt mere udbredt fænomen [4].

In vitro sker dannelsen af ALF spontant, når monomererne er til stede i en passende høj koncentration. Det forventes derfor, at proteinstrukturen af disse monomerer er optimeret mht. at kunne danne amyloide strukturer. Hvis der findes strukturelle elementer eller aminosyresekvenser, der øger proteiners tilbøjelighed til at danne sådanne strukturer, findes disse sandsynligvis som konserverede eller repeterede sekvenser i fimbria-monomererne. Ved at oprense ALF fra forskellige bakteriestammer og sekvensere de tilhørende monomere proteiner kan man identificere mulige amylogene proteinsekvenser. En sådan identifikation kan give generel viden om mekanismen bag amyloid-dannelsen og kan være med til at identificere steder, der kan benyttes som mål for lægemidler i kampen mod de amyloide sygdomme.

Isolering og karakterisering af ALF-producerende bakterier

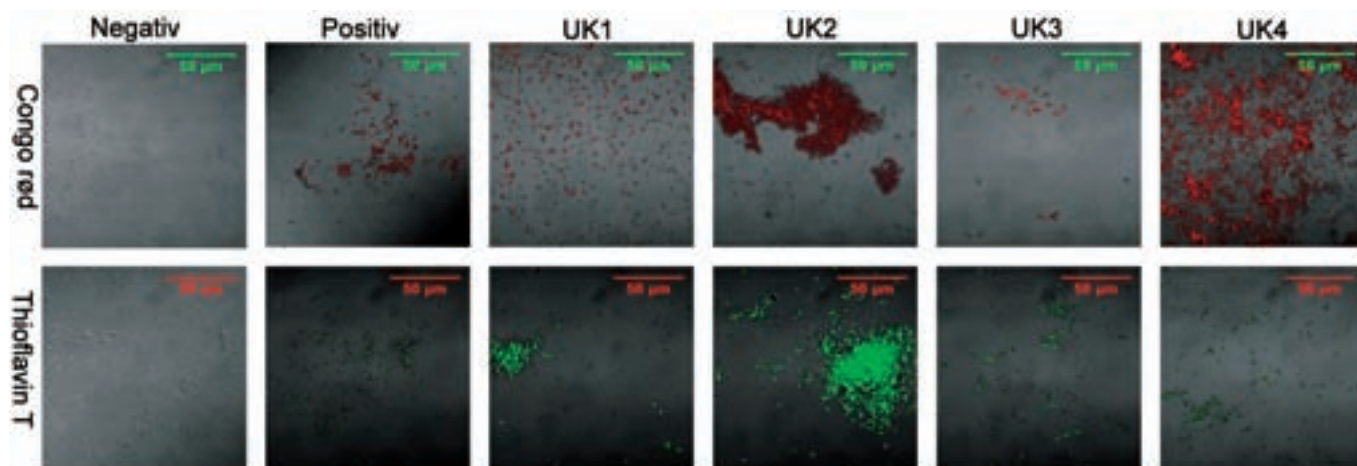
Til at foretage en initial screening for ALF-producerende

Molekylær model af arrangementen af proteinerne i amyloid-fibriller [7].

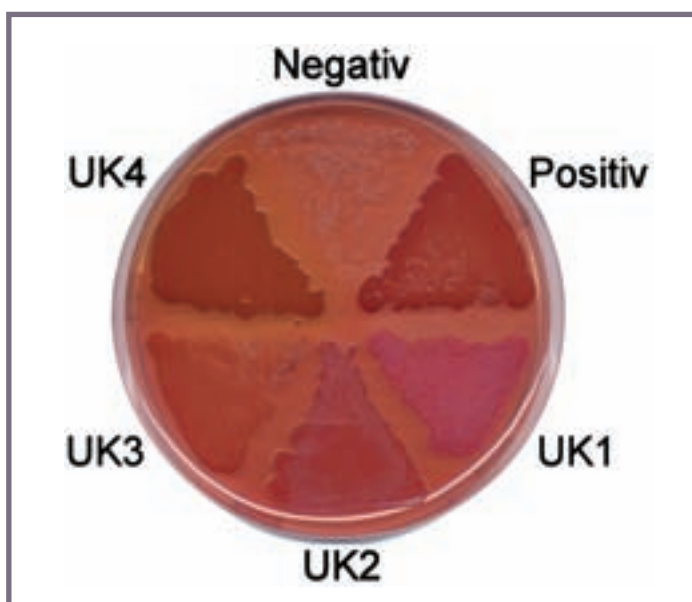


Transmissionselektronmikroskopi af *E. coli* celler der producerer ALF. ALF er angivet med en pil og ses som et netværk af fibrillære strukturer.

bakteriestammer kan man benytte Congo rød-indikatorplader. Disse agarplader indeholder et vækstmedium, der stimulerer ekspressionen af ALF samt Congo rød og Coomassie blå. ALF-producerende bakterier danner en karakteristisk rød, tør og ru koloni-morfofotype, når de gror på pladerne [5]. Ud fra vækst på



ALF positiv og negativ *E. coli* kontrol samt isolerede stammers binding af indikatorstofferne Congo rød og ThT undersøgt ved brug af konfokal laser scannings mikroskopi. Det ses, at alle isolerede stammer samt den positive kontrolstamme binder begge stoffer, mens den negative kontrol ikke binder nogen af dem.



Undersøgelse af koloni-morfotyper for negativ og positiv *E. coli* kontrol samt fire isolerede bakteriestammer efter 42 timer vækst på Congo rød-agarplader ved 26°C. Det ses, at alle isolerede stammer optager Congo rød og danner en tyk koloni. Den negative kontrol optager ikke Congo rød og danner adskilte kolonier.



Det simple, præparative SDS-PAGE-system benyttet i dette studie. Systemet består af et 50 mL Greiner-rør, hvori der er støbt en 12% SDS-PAGE-gel. Gelen er i begge ender i kontakt med bufferreservoirer, der er forsynet med platinelektroder, hvormed den nødvendige spænding kan skabes over gelen. Prøven påføres i toppen af Greiner-røret.

Congo rød-plader har vi isoleret fire ukendte bakteriestammer som renkulturer fra naturligt forekommende biofilm. Vha. 16S rRNA sekvensering og mikrobiologiske studier kan de isolerede bakteriestammer identificeres. En indledende identifikation med 16S rRNA viste, at ingen af de oprensede stammer var fra *Enterobacteriaceae*-familien, hvor man tidligere har fundet ALF. En af stammerne var endog grampositiv, hvilket tyder på en meget stor fylogenetisk diversitet blandt de ALF-producerende bakterier.

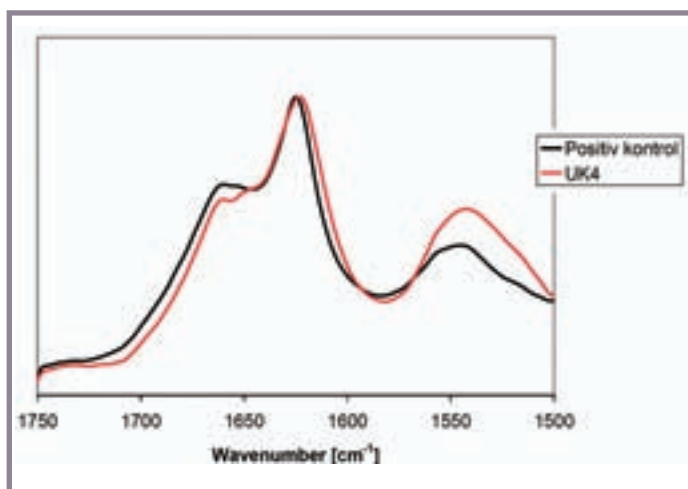
For at verificere at oprensede bakteriestammer producerer ALF, kan de undersøges ved konfokal laser scannings mikroskopi kombineret med Congo rød og ThT som fluorescerende prober. En sådan undersøgelse viste, at alle fire bakteriestammer bandt indikatorstofferne. Det indikerede, at bakterierne producerede ALF. Som en ekstra sikkerhed benyttedes elektronmikroskopi (EM) til at verificere ALF-produktion. EM-undersøgelse viste, at tre af stammerne producerer fibriller, mens den sidste stamme producerede en meget tyk ekstracellulær matrix, der muligvis kunne indeholde ALF.

Oprensning af ALF

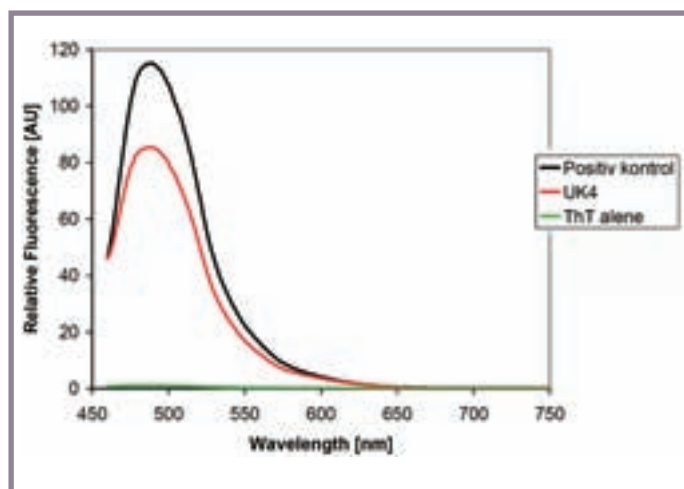
Til oprensning af ALF fra bakteriesuspensioner kan det udnyttes, at ALF består af meget stabile strukturer, der bl.a. kan modstå kogning i 2% SDS. Kontaminerende proteiner kan derfor fjernes vha. præparativ SDS-PAGE. Da ALF ikke binder SDS i særlig høj grad og samtidig er meget store proteinstrukturer, migrerer ALF ikke ned i elektroforesegelen og kan derfor isoleres fra brønden efter endt elektroforese. Andre cellemakromolekyler kan fjernes ved enzymatisk nedbrydning [6].

Forsøg på at oprense ALF fra de isolerede bakteriestammer viste, at vi kunne oprense ALF i høj koncentration fra en positiv ►

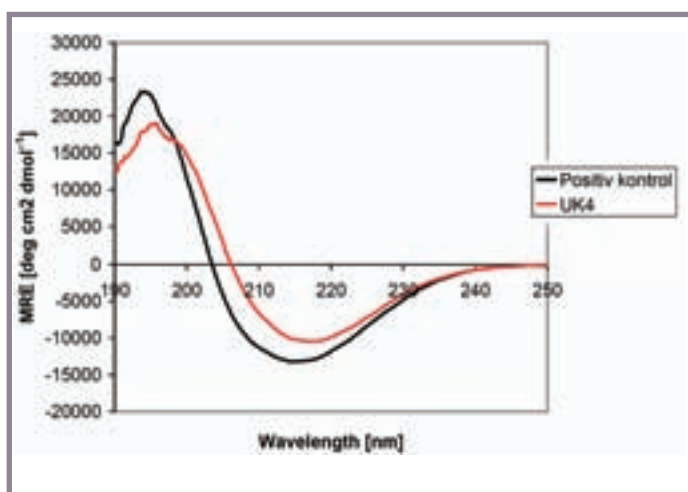




Fourier-transform infrarød spektroskopi foretaget på oprensede ALF. Begge spektre viser klare amyloide β -strukturer med et amyloid β -sheet specifikt maksimum ved 1625 cm^{-1} samt en top ved 1660 cm^{-1} . Den sidstnævnte top ses tit for de amyloide proteiner. En lille top ved ca. 1650 cm^{-1} antyder små mængder uløst struktur.



ThT-emission ved og uden tilstedeværelse af oprensede ALF når der exciteres ved 450 nm. Ved tilstedeværelse af de oprensede ALF ses det karakteristiske emissionsmaksimum for amyloid-bundet ThT ved 485 nm. Uden tilstedeværelse af ALF ses ingen emission ved denne bølgelængde.



Fjern-UV cirkulær dichroisme foretaget på oprensede ALF. Spektrene viser klar β -struktur med det β -sheet karakteristiske minimum og maksimum ved henholdsvis 217 nm og 195 nm.

E. coli kontrolstamme og fra en af de isolerede stammer. Der var endvidere stærke indikationer på, at det også var muligt at oprense ALF fra mindst to af de andre stammer.

Verifikation af den amyloide struktur

For at verificere at oprensede fimbriae har den forventede amyloide struktur, kan man undersøge deres sekundære struktur vha. de komplementære metoder, Fourier-transform infrarød spektroskopi (FTIR) og fjern-UV cirkulær dichroisme (CD). Den kvarternære amyloid-struktur kan undersøges ved binding af ThT, da ThT under binding til amyloide strukturer har et karakteristisk emissionmaksimum ved ca. 485 nm, når der exciteres ved 450 nm [1]. Ydermere kan man tjekke, om det oprensede produkt har den karakteristiske fibrilmorfologi via EM.

FTIR og CD viste, at de oprensede ALF-makromolekyler havde den karakteristiske amyloide β -struktur. Endvidere bandt de ThT, så det amyloid-karakteristiske emissionmaksimum fremkom. EM-undersøgelser efterviste også en fibrilstruktur.

Isolering af ALF-monomerer og identifikation af amylogene sekvenser

Når ALF fra *E. coli* og *Salmonella* opløses i 90% myresyre sker der en nedbrydning af fibrilstrukturen, hvorved monomererne

frigives [6]. De myresyreopløste ALF frysetørres, hvorefter de oprenses vha. SDS-PAGE til trypsin-nedbrydning og efterfølgende MS/MS-sekventering. Fundne sekvenser benyttes til at identificere de monomere proteiner vha. homologisøgninger i protein- og genomdatabaser.

Ved at foretage sekventering på de oprensede ALF fra den positive kontrol og den isolerede stamme blev monomererne fra kontrolstammen identificeret som CsgA, den monomere subunit af *E. coli* curli ALF. Ingen proteiner kunne identificeres ud fra sekvenserne fra den oprensede stamme. Dog forventes det, at det er muligt at identificere proteinet ud fra bedre sekvenser.

Studiet har vist, at det er muligt at isolere fylogenetisk forskellige bakteriestammer, der producerer ALF, og oprense ALF fra disse. Det fremtidige mål er at oprense ALF fra en lang række bakterier og identificere de tilhørende monomere proteiner ved sekventering. Det efterfølgende bioinformatiske studie af monomererne for konserverede eller repeterede sekvenser forventes at kunne bidrage med spændende resultater til forståelsen af amyloid-dannelsesprocessen.

Studiet blev udført som en del af inSPIN-samarbejdet, se www.inspin.dk.

E-mail-adresse
Morten Simonsen Dueholm: md02@bio.aau.dk

Referencer:

1. Krebs, M.R.H.; Bromley, E.H.C.; Donald, A.M., J Struct Biol 149 (2005) 30-37.
2. Linke, R.P., Virchows Arch 436 (2000) 439-448.
3. Römling, U.; Bian, Z.; Hammar, M.; Sierralta, W.D., J Bacteriol 180 (1999) 722-731.
4. Larsen, P.; Nielsen, J.L.; Dueholm, M.; Otzen, D., Submitted for Appl Environ Microbiol.
5. Zogaj, X.; Bokranz, W.; Nimtz, M.; Römling, U., Infect Immun 71 (2003) 4151-4158.
6. Collinson, S.K.; Emödy, L.; Müller, K.-H.; Trust, T.J.; Kay, W.W., J Bacteriol 173 (1991) 4773-4781.
7. Reprinted from Dobson, C.M., TIBS 24 (1999) 329-332, with permission from Elsevier.