



การตรวจสอบการเกิดโครงสร้างเส้นใยอมัยลอยด์ของโปรตีนด้วยเทคนิคอิเล็กทรอนิกส์สปินเรโซแนนซ์

Structural determination of amyloid fibrils by Electron Spin Resonance

ไศรยา พรสุวรรณ

Soraya Pornsuwan

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

Correspondent author: soraya.por@mahidol.ac.th

บทคัดย่อ

การรวมตัวและม้วนพับผิดปกติของโปรตีนและเปปไทด์บางชนิดเกิดเป็นโครงสร้างเส้นใยอมัยลอยด์มีส่วนเกี่ยวข้องโดยตรงกับการเกิดโรคภัยเรื้อรังหลายประเภทรวมถึงโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท เช่น อัลไซเมอร์และพาร์กินสันฉะนั้นเทคนิคที่สามารถตรวจสอบโครงสร้างและกระบวนการเกิดเส้นใยอมัยลอยด์จึงมีความสำคัญในการทำควมเข้าใจบทบาทของเส้นใยอมัยลอยด์ต่อการเกิดโรคได้ อย่างไรก็ตามวิธีการวิเคราะห์กระบวนการเกิดเส้นใยโดยเฉพาะในระดับโมเลกุลนั้นมีความท้าทายเนื่องจากโครงสร้างเส้นใยนี้มีลักษณะรูปร่างที่เป็นเอกลักษณ์ มีขนาดใหญ่และมีความซับซ้อนกว่าโปรตีนในสภาวะปกติอยู่มากบทความนี้กล่าวถึงโครงสร้างโดยทั่วไปของอมัยลอยด์ที่เป็นที่ยอมรับในปัจจุบันโดยตรวจสอบด้วยวิธีการกระตุ้นเรโซแนนซ์อิเล็กตรอนและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน นอกจากนี้จะนำเสนอหลักการของElectron spin resonance (ESR) เพื่อการติดตามการเกิดเส้นใยอมัยลอยด์ ตั้งแต่การพัฒนาเทคนิคในระยะเริ่มต้นด้วยการติดฉลากสปินในตรอกไซค์และการวัดระยะห่างระหว่างฉลากในตรอกไซค์ ทำยที่สุดจะกล่าวถึงทิศทางในอนาคตสำหรับการใช้เทคนิค ESR ควบคู่กับเทคนิคอื่นๆในการวิเคราะห์โครงสร้างอมัยลอยด์และเพื่อทดสอบด้วยสำหรับการป้องกันการเกิดอมัยลอยด์

Abstract

Aggregation of some proteins and peptides into amyloid fibrils is directly related to many protein-misfolding diseases including those from neurodegeneration such as Alzheimer's and Parkinson's diseases. Determination of the fibril structure and the fibrillation process is essential for developing methods to control the aggregation process. However, present techniques developed for analysis of the aggregation process have been challenged due to the lack of well-defined and complicated structures in the fibrillar stage. This review describes the principle and application of nitroxide spin-labeling strategy combined with Electron Spin Resonance (ESR) as an alternative

tool for monitoring the fibril process. The progress of the technique for revealing insights in the molecular level is discussed. Finally, the future direction of the ESR application for providing analysis of structural detail and drug design for preventing amyloid fibril formation is commented.

คำสำคัญ : เส้นใยอมัยลอยด์ ผลิตในตรอกไซค์ อิเล็กตรอนสปินเรโซแนนซ์

Keywords : amyloid fibrils, Nitroxide spin-label, Electron spin resonance

1. บทนำ

โปรตีนและเปปไทด์บางชนิดมีแนวโน้มที่จะเกิดการรวมตัวและม้วนพับผิดปกติภายใต้สภาวะที่เหมาะสมเกิดเป็นโครงสร้างเส้นใยอมัยลอยด์ (amyloid) คำว่า “อมัยลอยด์” ถูกบัญญัติขึ้นครั้งแรกโดยนายแพทย์และนักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมันชื่อว่า Rudolph Virchow ในปี 1854 เพื่อบรรยายถึงลักษณะของสารชนิดหนึ่งที่สะสมในตับของผู้ป่วยและมีคุณสมบัติที่ย้อนติดสีน้ำเงินกับไอโอดีน (1) และต่อมาพบลักษณะของสารแบบเดียวกันในผู้ป่วยกลุ่มโรคร้ายแรงหลายชนิด อาทิเช่นโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท เช่นโรคอัลไซเมอร์ พาร์กินสัน และ

ฮันติงตันรวมถึงโรคไขข้ออักเสบเรื้อรัง และโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ดังตัวอย่างในตารางที่ 1 (2) ในปัจจุบันพบว่ากลุ่มโรคที่เกี่ยวข้องกับการสะสมของเส้นใยอมัยลอยด์นี้มีอยู่ประมาณ 40 ชนิด (3,4) ถึงแม้ว่าสาเหตุของโรคที่กล่าวมาข้างต้นยังไม่ทราบแน่ชัด แต่อาจกล่าวได้ว่ามีสาเหตุเชื่อมโยงกับการสะสมของเส้นใยอมัยลอยด์คือเริ่มจากการรวมตัวของโปรตีนเกิดเป็นโอลิโกเมอร์และก่อตัวเป็นเส้นใยอมัยลอยด์ที่ไม่ละลายน้ำสะสมภายในอวัยวะต่างๆ ถึงแม้ว่าเส้นใยอมัยลอยด์นั้นจะพบได้จากโปรตีนหลายชนิด แต่พบว่ามีความสัมพันธ์โดยรวมทั้งที่คล้ายกัน เช่นมีรูปแบบการหักเหของรังสีเอ็กซ์ และรูปร่างจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเป็นแบบเดียวกัน

ตารางที่ 1. ตัวอย่างของโรคและโปรตีนที่เกิดเส้นใยอมัยลอยด์

โรค	โปรตีน	ตำแหน่งที่เกิด
อัลไซเมอร์	เปปไทด์ A β โปรตีน Tau	ภายในและภายนอกเซลล์สมองโดยเฉพาะในส่วนที่เกี่ยวข้องกับความจำและความรู้สึก
พาร์กินสัน	α -synuclein	เซลล์ประสาทส่วน Presynaptic terminal
Creutzfeldt-Jakob (โรควัวบ้า)	Prion protein	เซลล์ประสาท
เบาหวานชนิดที่ 2	Amylin (islet amyloid polypeptide)	ตับอ่อน

การค้นพบโครงสร้างอมัยลอยด์ที่มีลักษณะคล้ายๆ กันจากโปรตีนหลายชนิดทำให้นักวิทยาศาสตร์สามารถเชื่อมโยงบทบาทของโครงสร้างของโปรตีนกับการเกิดโรคได้มากขึ้น อย่างไรก็ตามการเข้าใจกลไกการเกิดเส้นใยอมัยลอยด์นี้ยังคงเป็นปัญหาสำคัญ เนื่องจากโครงสร้างของเส้นใยมีลักษณะที่ยากต่อการวิเคราะห์ในระดับโมเลกุล เช่น มีสมบัติไม่ชอบน้ำสูง (hydrophobic) มีขนาดใหญ่ มีโครงสร้างที่ซับซ้อนไม่สม่ำเสมอ มีลักษณะ

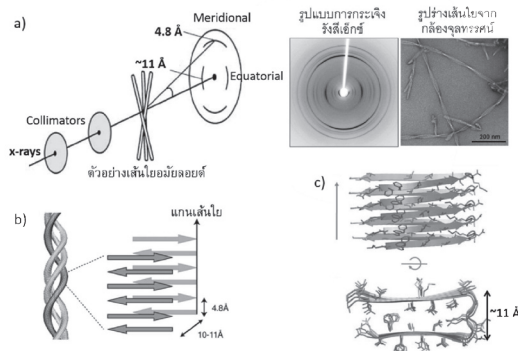
คล้ายเจลสีขาวขุ่นจึงไม่ตกผลึกจึงต้องใช้ข้อมูลจากหลายๆเทคนิคที่มีความละเอียดสูงบทความนี้จะกล่าวถึงโครงสร้างของเส้นใยที่วิเคราะห์ได้จากเทคนิคทางเคมีที่ใช้ในปัจจุบัน และจะนำเสนอหลักการของเทคนิค Electron spin resonance (ESR) ในการติดตามการเกิดเส้นใยและวิเคราะห์หาโครงสร้างในระดับโมเลกุลที่พัฒนามาถึงปัจจุบัน และกล่าวถึงแนวโน้มในอนาคตเพื่อนำไปประกอบเป็นข้อมูลในการตรวจสอบและสกรีนโมเลกุล

ขนาดเล็กที่สามารถยับยั้งการเกิดเส้นใยอมัยลอยด์ เพื่อการพัฒนาเป็นตัวยาในการรักษาต่อไป

2. โครงสร้างโดยทั่วไปของเส้นใยอมัยลอยด์

การศึกษาเส้นใยอมัยลอยด์ในระยะแรกๆ นั้นข้อมูลทางโครงสร้างส่วนมากได้จากการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนการวิเคราะห์รูปแบบการหักเหรังสีเอ็กซ์และจาก Nuclear magnetic resonance (NMR) ลักษณะเฉพาะสำคัญที่ได้จากการกระเจิงของรังสีเอ็กซ์คือเป็นโครงสร้างแบบ cross β -sheet (5-8) ดังแสดงในรูปที่ 1a และ 1b เมื่อฉายรังสีเอ็กซ์ผ่านแกนของเส้นใย ในทิศที่ตั้งฉากกับทิศทางของรังสี รูปแบบการตกกระทบเมอริเดียน (meridional reflection) บอกถึงการเรียงตัวของเส้น β -sheet ที่ขนานกับแกนตามยาวของเส้นใย มีระยะระหว่าง β -sheet ห่างประมาณ 4.8 Å และเส้นตกกระทบอีควาโทเรียล (equatorial reflection) บอกถึงการเรียงตัวของ β -sheet ในทิศทางที่ตั้งฉากกับแกนของเส้นใยมีระยะห่างประมาณ 11 Å นอกจากนี้ข้อมูลจากการส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าเส้นใยที่โตเต็มที่ มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 100 Å และความสั้นยาวต่างกันอยู่ในระดับไมโครเมตร เป็นเส้นตรงบิดเป็นเกลียวไม่มีกิ่งก้าน (รูปที่ 1a ซ้าย) นอกจากนี้ข้อมูลจาก NMR บอกถึงแรงกระทำในช่วงระยะระหว่าง β -sheet เป็นผลมาจากการสร้างพันธะไฮโดรเจนทำให้โครงสร้างมีความแข็งแรงกว่าแรงระหว่างโมเลกุลชนิดอื่น (รูปที่ 1c) ต่อมาได้มีการใช้กล้องจุลทรรศน์แบบแรงอะตอม (atomic force microscopy, AFM) ในการวิเคราะห์รูปร่างของอมัยลอยด์จากโปรตีนหลายชนิด เช่น Ab a-synuclein amylin และ lysozyme(9) ทำให้มีการเสนอโมเดลในการเกิดเส้นใยว่าเป็นกระบวนการที่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างแบบเป็นลำดับขั้น (hierarchical assembly) (10) คือในระหว่างที่โปรตีนรวมตัวเป็นโอลิโกเมอร์กลายเป็นเส้นใยเต็มที่สามารถจำแนกเป็น 3 ช่วงคือเริ่มจากโปรโตไฟลามেন্টเป็นโปรโตไฟบริล และไฟบริล โดยโครงสร้างจะมีความเป็นระเบียบมากขึ้นในระดับขั้นที่สูงขึ้นไปซึ่งเกิดจากการ

รวมตัวและหมุนเป็นเกลียวของโครงสร้างที่เกิดก่อนหน้านี้ โครงสร้างตามลำดับขั้นของ α -synuclein และ Ab แสดงโดยสรุปในรูปที่ 2a และ 2b ตามลำดับ

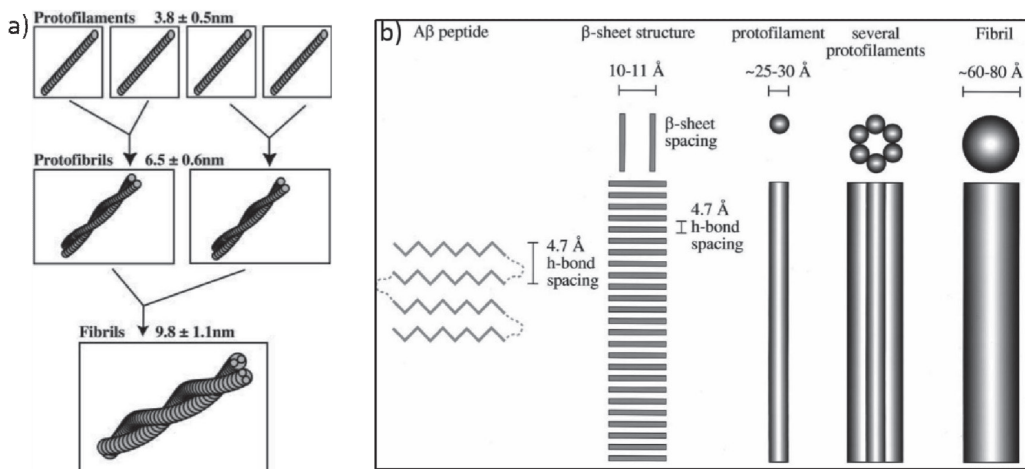


รูปที่ 1. (a) การทดลองการกระเจิงรังสีเอ็กซ์ของเส้นใยอมัยลอยด์ (38) (ซ้าย) เส้น Meridian และ Equator แสดงรูปแบบการกระเจิงรังสีเอ็กซ์ของอมัยลอยด์ (38) และรูปร่างเส้นใยที่ได้จากการส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน มีลักษณะเป็นเส้นตรงบิดเป็นเกลียวไม่มีกิ่งก้าน (ขวา) (b) โครงสร้างแสดง cross- β ของอมัยลอยด์ตั้งฉากกับทิศทางของแกนเส้นใย ระยะห่างระหว่างแถบ β -sheet 4.8 Å (เส้น Meridian) และระยะห่างระหว่างโมเลกุลโปรตีน ~11 Å (เส้น Equator) (17) (c) แถบ β -sheet แสดงการเรียงตัวของเปปไทด์ AB ตามแนวตั้งฉากกับแกนของเส้นใย (บน) และเมื่อหมุน 90° (ล่าง) แสดงระยะห่าง ~11 Å ขนานกับแกนของเส้นใย (8)

ถึงแม้ว่าสาเหตุและกลไกการเกิดเส้นใยอมัยลอยด์นั้นจะมีความซับซ้อนและยังไม่มีเป็นที่ทราบแน่ชัด ขึ้นกับชนิดของโปรตีนและสภาวะแวดล้อมแต่ข้อมูลทางโครงสร้างจากรังสีเอ็กซ์และกล้องจุลทรรศน์ดังกล่าวข้างต้นรวมทั้งข้อมูลจากเทคนิคทางเคมี-ฟิสิกส์อื่นๆ ทำให้มีแนวทางในการเสนอกลไกของการเกิดเส้นใยอมัยลอยด์โดยเริ่มจากการที่โมเลกุลของโปรตีนมีโครงสร้างที่ม้วนพับต่างไปจากสภาวะปกติกล่าวคือโครงสร้างบางส่วน of โปรตีนจะคลี่ออก (partially

unfold) ทำให้มีแรงกระทำระหว่างโมเลกุล เช่นแรง hydrophobic หรือ electrostatic มากขึ้น และจะช่วยส่งเสริมให้เกิดการเกาะรวมกันระหว่างโปรตีนหลายๆ โมเลกุลกลายเป็นโอลิโกเมอร์ที่ละลายน้ำและแรงระหว่างโมเลกุลโดยเฉพาะส่วนที่เป็นแถบ β -sheet จะเหนี่ยวนำให้เกิดการรวมตัวเป็นโปรโตไฟลามেন্টโปรโตไฟบริลและเป็นเส้นใยที่ไม่ละลายน้ำในที่สุดขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรตีนนี้แสดงในรูปที่ 3a (11, 12) สำหรับเหตุปัจจัยที่ส่งผลให้โครงสร้างบางส่วนของโปรตีนคล้อยออกนี้มีอยู่หลายปัจจัย อาจเป็นที่สภาวะทางกายภาพที่เปลี่ยนไป อาจเป็นการกลายพันธุ์ (mutation) ทำให้กรดอะมิโนภายในสายโปรตีนเปลี่ยนไป หรือการ

เปลี่ยนโครงสร้างด้วยสารเคมีทั้งนี้ขั้นตอนที่โครงสร้างบางส่วนคล้อยออกอาจไม่จำเป็นสำหรับโปรตีนที่โครงสร้างมีการพับไม่เป็นระเบียบ (random coil) อยู่แล้ว เช่นในกรณีของ α -synuclein เมื่ออยู่ในสภาวะที่ค่า pH ต่ำหรืออุณหภูมิสูงจะเหนี่ยวนำให้รวมตัวเกิดกระบวนการเป็นเส้นใย โดยไม่จำเป็นต้องผ่านการเปลี่ยนโครงสร้างให้คล้อยออกในตอนแรกอย่างไรก็ตามกลไกสำหรับ α -synuclein นี้ยังคงเป็นที่ถกเถียงกันเกี่ยวกับโครงสร้างตามธรรมชาติในร่างกายเมื่อ Selkoe และคณะ (13) เสนอว่าน่าจะเป็นโครงสร้างแบบ α -helix ที่มีสี่โมเลกุล (tetramer) ม้วนพับรวมกันไม่ใช่โครงสร้างโมเลกุลเดี่ยวที่พับไม่เป็นระเบียบดังที่เข้าใจก่อนหน้านี้



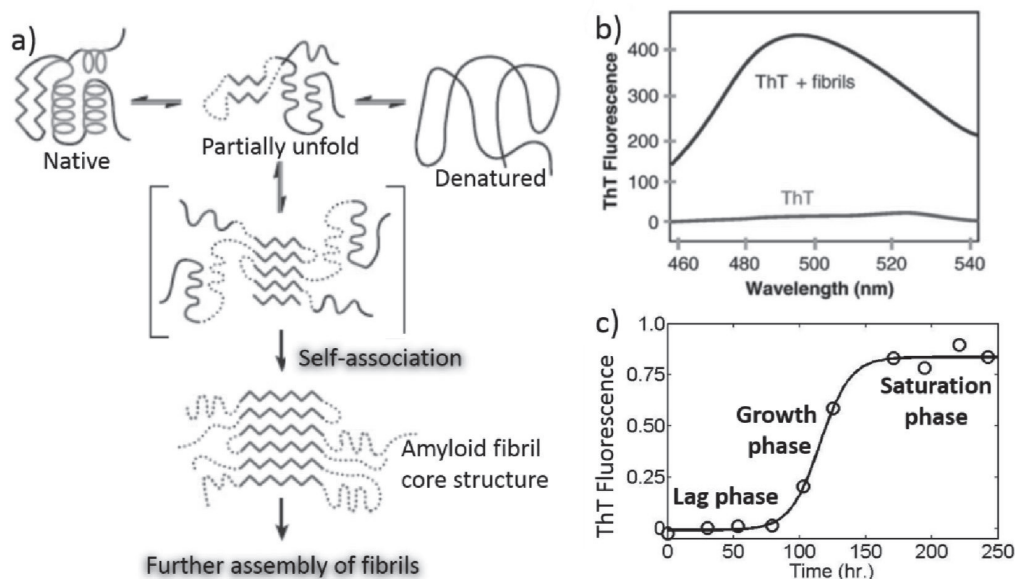
รูปที่ 2. โมเดลแสดงขนาดและโครงสร้างเป็นลำดับขั้นจากโปรโตไฟลามেন্টกลายเป็น โปรโตไฟบริลและเส้นใยเต็มตัวของ α -synuclein(10)(a)และเปปไทด์ A β (39)(b)

คุณสมบัติเด่นอีกประการหนึ่งของเส้นใยอมัยลอยด์คือสามารถย้อมติดสีย้อมบางชนิดทำให้ติดตามได้ด้วยฟลูออเรสเซนซ์การศึกษาในระยะแรกในปี 1959 Vassar และ Culling (14) ได้แสดงว่า Thioflavin-T (ThT) มีความเฉพาะเจาะจงเมื่อจับกับเส้นใยอมัยลอยด์แล้วการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์จะเพิ่มขึ้นอย่างมากเมื่อเทียบกับ ThT ในสภาวะปกติในช่วงปลาย 1980 ถึงต้น 1990 เป็นช่วงที่มีความสำคัญในการประยุกต์ใช้ ThT โดย Naiki และคณะ(15) และ LeVine(16) เป็นผู้วิจัยแรกๆ ที่ศึกษาลักษณะของสเปกตรัมฟลูออเรสเซนซ์ของ ThT

เมื่อจับกับโปรตีนในรูปเส้นใยอมัยลอยด์ซึ่งจะเปลี่ยนความยาวคลื่นสูงสุดจาก 445 nm เป็น 482 nm และพบว่า การเพิ่มขึ้นของฟลูออเรสเซนซ์ตามช่วงเวลาของการเกิดเส้นใยเป็นรูปตัว S แบบ sigmoidal curve ดังแสดงในรูปที่ 3c เป็นลักษณะตามจลนศาสตร์ของการเกิดอมัยลอยด์ คือเกิด lag phase ในระยะแรก ต่อมาสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เพิ่มขึ้นอย่างมากซึ่งสอดคล้องกับปริมาณ β -sheet ที่เพิ่มขึ้นและคงที่ในระยะสุดท้าย การติดตามด้วยฟลูออเรสเซนซ์ได้ถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบการเกิดอมัยลอยด์ในสภาพแวดล้อมต่างๆ และการทดสอบ

คุณสมบัติของยาบางชนิดในการยับยั้งการเกิดอัมัยลอยด์ (17) อย่างไรก็ตามเทคนิคต่างๆ ที่ใช้ศึกษาโครงสร้างอัมัยลอยด์ในปัจจุบันยังคงต้องมีการพัฒนาเพื่อให้เหมาะสมกับคุณสมบัติที่เฉพาะเจาะจงของอัมัยลอยด์แต่ละชนิด นอกจากนี้เทคนิคที่สามารถให้ข้อมูลในระดับโมเลกุล จะมีความสำคัญในการเข้าใจกระบวนการเกิดอัมัยลอยด์

เพื่อนำไปสู่การพัฒนาวิธียับยั้งและการรักษาโรคที่เกี่ยวข้อง ในหัวข้อถัดไปจะกล่าวถึงวิธีการศึกษาเส้นใยอัมัยลอยด์ด้วยเทคนิค ESR ซึ่งนับว่ายังเป็นเทคนิคที่ใหม่เมื่อเทียบกับเทคนิคอื่นๆ เช่น การใช้ฟลูออเรสเซนซ์ การกระเจิงด้วยรังสีเอ็กซ์ และส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เป็นต้น



รูปที่ 3. (a) กลไกแสดงสมมติฐานการเกิดเส้นใยอัมัยลอยด์ เริ่มจากโครงสร้างโปรตีนที่คล้อยออกบางส่วน (partially unfold) รวมตัวเกิดเป็นโครงสร้างที่เป็นแกน cross- β -sheet (11) แสดงเป็นเส้นหยัก (b) สเปกตรัมฟลูออเรสเซนส์ของ ThT เปรียบเทียบเมื่อกรณีที่มีและไม่มีเส้นใย (c) สัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่ 490 nm แสดงช่วงเวลาต่างๆในการเกิดเส้นใยเป็น Sigmoidal curve

3. Electron spin resonance (ESR) สำหรับการศึกษการเกิดเส้นใยอัมัยลอยด์

ESR (18) เป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจจับสัญญาณจากสปินของอนุมูลหรืออิเล็กตรอนเดี่ยวซึ่งมีค่าสปินควันตัม $S = 1/2$ โดยระดับพลังงานของอิเล็กตรอนเดี่ยวประกอบด้วยสปินขึ้น ($m_s = +1/2$) และสปินลง ($m_s = -1/2$) ตามปกติแล้วระดับพลังงานทั้งสองนี้จะอยู่ในระดับเดียวกันและจะแยกกันเมื่ออยู่ภายใต้สนามแม่เหล็ก ดังนั้นเครื่องมือขั้นพื้นฐานของ ESR จะเหมือน

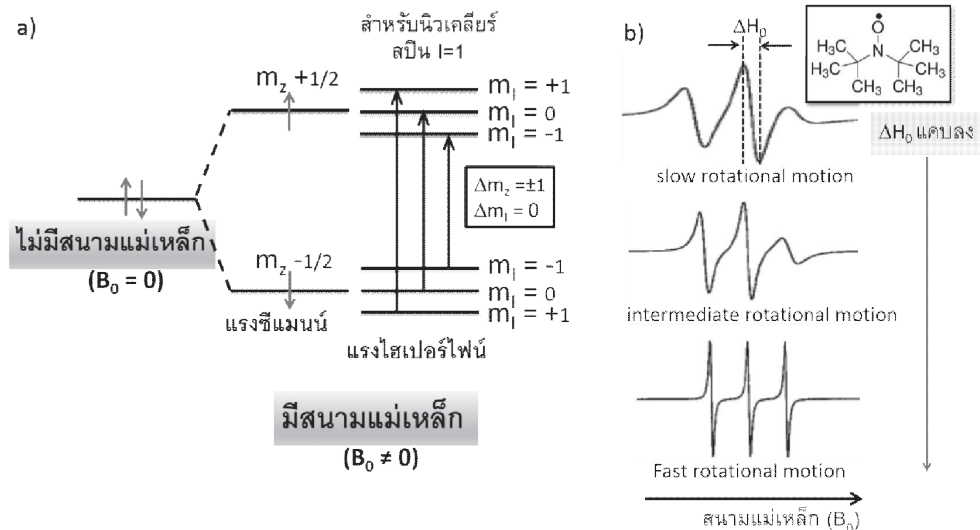
กับ spectroscopy ทั่วไปคือประกอบด้วยแหล่งกำเนิดแสง (radiation source) และเครื่องตรวจวัด (detector) เพียงแต่สารตัวอย่างต้องอยู่ภายใต้สนามแม่เหล็กเพื่อแยกระดับชั้นพลังงานของสปินอิเล็กตรอนสเปกตรัมของ ESR เกิดจากแรงกระทำหลักๆ 2 ชนิดดังต่อไปนี้ (รูปที่ 4a)

(1) แรงระหว่างสปินของอิเล็กตรอนกับสนามแม่เหล็ก เรียกว่าแรงซีแมนน์ (Zeemann interaction) ระดับพลังงานนี้จะอยู่ห่างกันในช่วงคลื่นไมโครเวฟ (~ 9 GHz ที่ความแรงสนามแม่เหล็ก 0.3 Tesla)

(2) แรงระหว่างสปินของอิเล็กตรอนกับนิวเคลียสสปินข้างเคียง เรียกว่าแรงไฮเปอร์ไฟน์

(hyperfine interaction) เกิดขึ้นเนื่องจากอิเล็กตรอนเดี่ยว โดยทั่วไปแล้วจะไม่อยู่ตามลำพัง แต่จะอยู่เป็นอะตอม หรือโมเลกุลจึงมีแรงกระทำกับนิวเคลียสข้างเคียงที่มี ค่านิวเคลียร์สปินไม่เป็นศูนย์ ($I \neq 0$) ระดับพลังงานจะแยกออกเป็น $2I+1$ เส้น และเมื่อฉายแสงในช่วงคลื่น ไมโครเวฟอิเล็กตรอนจะถูกกระตุ้นจากระดับพลังงานต่ำไประดับสูงขึ้นบางค่าเท่านั้นโดยจะเป็นไปตามกฎ se-

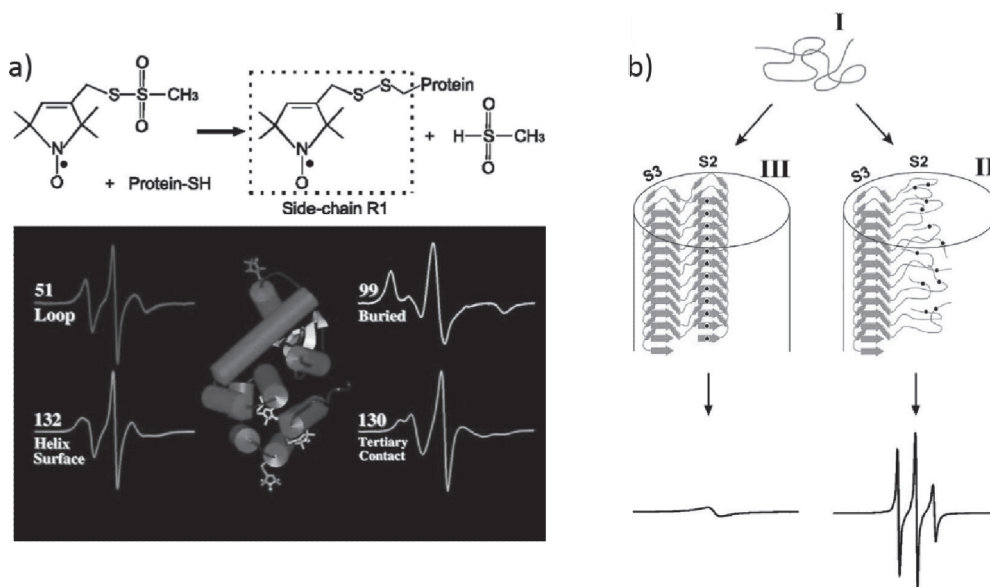
lectionrule คือ $\Delta m_s = 1$ และ $\Delta m_l = 0$ เช่นสเปกตรัมของอนุมูลของไนโตรเจน (^{14}N) จะแตกออกเป็น 3 พีกเนื่องจากสปินนิวเคลียร์ของไนโตรเจนเป็น 1 ($I=1$) ดังแสดงในรูปที่ 4b รูปแบบของสเปกตรัมที่เกิดจากแรงไฮเปอร์ไฟน์นี้เป็นลักษณะสำคัญในการระบุชนิดของนิวเคลียสและสภาพแวดล้อมในตัวอย่างที่ศึกษา



รูปที่ 4. (a) แผนภาพแสดงระดับพลังงานของอิเล็กตรอนเดี่ยวเมื่ออยู่ในสนามแม่เหล็ก แรงกระทำหลักคือแรงซีแมนน์และแรงไฮเปอร์ไฟน์ สำหรับนิวเคลียร์สปินข้างเคียงที่มีเลขสปิน (I) เป็น 1 เส้นไฮเปอร์ไฟน์จะแยกออกเป็น 3 เส้น (b) สเปกตรัม ESR ของสปินไนโตรเจนในไดรอกไซด์เมื่ออยู่ในสถานะที่มีความเร็วต่างกัน ความกว้างของพีคจะแคบลงและสูงขึ้นเมื่อไนโตรเจนเคลื่อนที่ได้เร็วขึ้น

สำหรับโปรตีนที่มีแนวโน้มในการเกิดเส้นไฮอมัลลอยด์นั้น โดยธรรมชาติมักจะไม่มียูอิเล็กตรอนเดี่ยวอยู่ ฉะนั้นจึงจำเป็นต้องติดฉลากสปินอิเล็กตรอน (electron spin-label) เข้าไปในโครงสร้างของโปรตีนฉลากสปินที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบันคือ “สปินไนโตรเจน” เป็นสารประกอบเมทิลไฮดรอกซิลฟอสเฟตที่ติดกับหมู่ไนโตรเจนซึ่งเป็นอนุมูลที่เสถียรของไนโตรเจนดังแสดงโครงสร้างในรูปที่ 5a สำหรับวิธีการติดฉลากสปินโดยทั่วไปนั้น สปินไนโตรเจนจะทำปฏิกิริยาเฉพาะเจาะจงกับหมู่ซีสเทอีน (cysteine) ฉะนั้นการใช้ ESR ใน

ระยะแรกจะทำได้กับโปรตีนที่มีหมู่ซีสเทอีนเท่านั้น ต่อมาในปี 1989 Hubbell และคณะ (19) ได้นำเทคโนโลยีในการทำ site-directed mutagenesis เพื่อเปลี่ยนหมู่ซีสเทอีนอื่นให้เป็นซีสเทอีนซึ่งสามารถติดสปินไนโตรเจนได้ในตำแหน่งใดๆที่ต้องการดังแสดงในรูปที่ 5a หลังจากนั้นการศึกษโปรตีนโดยใช้ ESR ทำได้แพร่หลายมากขึ้น อีกทั้งการพัฒนาเทคนิค ESR จนถึงปัจจุบันได้ถูกประยุกต์ใช้ในการศึกษาการเกิดเส้นไฮอมัลลอยด์ดังที่จะกล่าวในหัวข้อต่อไป



รูปที่ 5. (a) วิธีการติดฉลากสปินไนโตรอกไซด์บนโครงสร้างโปรตีน โดยใช้เมธิลไรโอซัลโฟเนตทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนซิสเทอีน (บน) สเปกตรัมไนโตรอกไซด์ที่ติดบน T4-lysozyme ความกว้างของพีคแตกต่างกันขึ้นกับตำแหน่งที่ติดบนโปรตีน (ล่าง) (20) (b) โมเดลแสดงฟิลาเมนต์ของโปรตีน Tau(III และ III) จากโมโนเมอร์ (I) ได้จากการติดฉลากไนโตรอกไซด์ที่บริเวณ S2 ผลจากสเปกตรัม ESR สามารถได้ทั้งสองแบบคือ กว้างและต่ำ (III) และแคบและสูง (II) แสดงถึงโครงสร้างที่เป็นไปได้ทั้งสองแบบ (23)

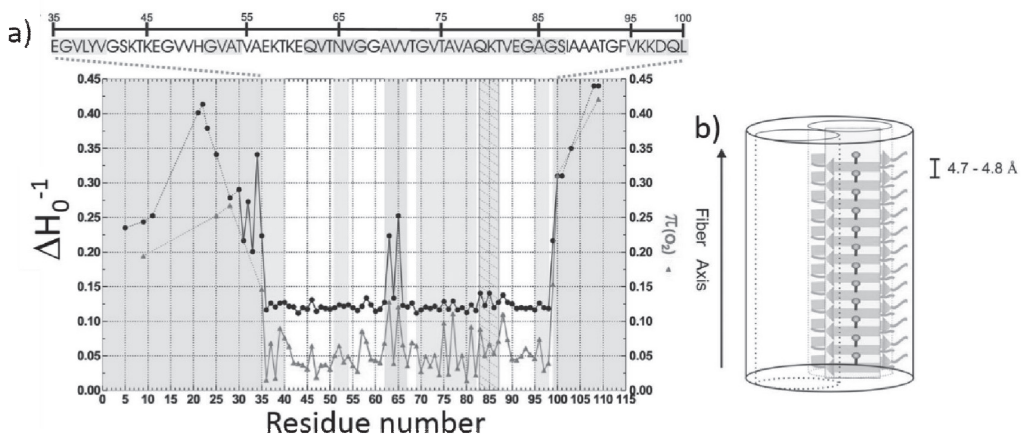
3.1 ลักษณะสเปกตรัมของสปินไนโตรอกไซด์ที่ติดกับโปรตีน

นอกจากสเปกตรัม ESR ของไนโตรอกไซด์จะแสดงลักษณะเส้นไฮเปอร์ไฟน์เป็น 3 เส้นแล้ว ความกว้างของเส้นไฮเปอร์ไฟน์ยังเปลี่ยนแปลงได้ขึ้นกับความเร็วในการเคลื่อนที่ของไนโตรอกไซด์ในสารละลายเมื่อไนโตรอกไซด์ติดอยู่กับโครงสร้างของโปรตีน จะเคลื่อนที่เร็วหรือช้าขึ้นกับการเคลื่อนที่ของโปรตีนในสารละลาย และหมู่กรดอะมิโนที่อยู่ข้างเคียง (20) การหมุนของสายโปรตีนในสารละลายเป็นการเคลื่อนที่ในช่วงที่ตรวจจับการเปลี่ยนแปลงได้ด้วย ESR ซึ่งจะอยู่ในช่วง 10^{-10} - 10^{-6} วินาทีต่อรอบ โดยความกว้างของเส้นไฮเปอร์ไฟน์จะแคบและสูงเมื่อไนโตรอกไซด์ติดอยู่กับตำแหน่งที่สายโปรตีนหมุนได้ง่าย เช่นตำแหน่งที่เป็น random coil ส่วนในอีกกรณีความกว้างของพีคจะกว้างขึ้นและต่ำลงเมื่ออยู่ในตำแหน่งที่เคลื่อนที่ได้ช้าลง เช่นในตำแหน่งที่มี tertiary contact หรือฝังอยู่ในบริเวณที่ไม่รวมตัวกับน้ำ (hydrophobic) ลักษณะของสเปกตรัมของ ESR ที่

ไวต่อการหมุนของสายโปรตีนในตำแหน่งที่ติดฉลากไนโตรอกไซด์นี้เป็นคุณสมบัติที่ถูกนำมาใช้กับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสภาวะแวดล้อมของโปรตีนหลายชนิด (21) รวมทั้งโปรตีนเมื่อเกิดเป็นเส้นใยมัลลอยด์ด้วย กลุ่มวิจัยของ Ralf Langer เป็นกลุ่มที่บุกเบิกในการใช้ฉลากสปินร่วมกับ ESR เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเส้นใยในโปรตีนหลายชนิด (22-24) เช่นใช้โปรตีน Tau (23) เป็นโมเดลในการตรวจสอบว่าการกรดอะมิโนตำแหน่งใดมีแนวโน้มที่จะรวมตัวอยู่ในแถบ β -sheet เมื่อเกิดเป็นเส้นใย โดยสำรวจกรดอะมิโนในช่วง S2 (ตำแหน่ง 272-289) พบว่าเมื่อเกิดเป็นเส้นใย การจัดเรียงโครงสร้างในช่วง S2 นี้ประกอบด้วยโครงสร้างที่ต่างกัน 2 แบบคือแบบ II และ III ดังแสดงในรูปที่ 5b ซึ่งความแตกต่างแสดงได้ชัดจากสเปกตรัมของฉลากสปินไนโตรอกไซด์เมื่อตำแหน่งที่ติดสปินนี้เรียงชิดกันเป็นระเบียบในแถบ β -sheet (พีคกว้างและเตี้ย) ความกว้างของพีคจะกว้างกว่าเมื่ออยู่ในสภาวะ random coil ที่เคลื่อนที่ได้อย่างอิสระ (พีคแคบและสูง) นอกจากนี้

การติดตามการเปลี่ยนแปลงด้วย ESR สามารถใช้ได้กับการเกิดโอลิโกเมอร์ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่ติดตามได้ยาก ในระหว่างการเกิดเส้นใย (25) นอกจากนี้การวิเคราะห์สเปกตรัม ESR ทำให้ Chen และคณะ (24) ได้เสนอโมเดลของโครงสร้างเส้นใย α -synuclein โดยการติดฉลากในตรอกไฮโดรเจนตั้งแต่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 5 ถึง 110 และวิเคราะห์ส่วนกลับของความกว้างพีคกลาง (ΔH_0^{-1}) ที่ตำแหน่งต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 6a จะเห็นว่าตำแหน่งที่ 36 ถึง 98 เป็นช่วงที่ความกว้างของพีคกว้างกว่าส่วนปลาย C และ N terminal นั่นคือการเคลื่อนที่อย่างจำกัด

ในตำแหน่ง 36-98 เป็นช่วงที่เกิดเป็น β -sheet ส่วนปลายทั้งสองข้างเคลื่อนที่ได้ง่ายกว่า ดังแสดงเป็นโมเดลในรูปที่ 6b อย่างไรก็ตามโครงสร้างการจัดเรียงภายในสาย β -sheet มีการพับอย่างไรวินั้นยังไม่เป็นที่รู้แน่ชัด มีเพียงโมเดลที่เสนอโดย Riek และคณะ จากการหาโครงสร้างด้วย NMR และ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบแช่แข็ง (26) เสนอว่าสาย β -sheet ภายในแกนเส้นใยของ α -synuclein พับเรียงเป็น 5 ชั้นต่อโมเลกุลของโปรตีนซึ่งมีความหนา ~ 4 nm และเรียงตัวในทิศทางตั้งฉากกับแกนของเส้นใย



รูปที่ 6. (a) โครงสร้างปฐมภูมิแสดงลำดับกรดอะมิโนของ α -synuclein (บน) และกราฟความสัมพันธ์ระหว่างส่วนกลับความกว้างพีคกลางของสปีนในตรอกไฮโดรเจน (ΔH_0^{-1}) และตำแหน่งกรดอะมิโนของ α -synuclein (ล่าง) แสดงถึงการเคลื่อนที่ของไนโตรเจนในสภาวะแวดล้อมที่จำกัดในช่วงตำแหน่ง 35 ถึง 96 และเคลื่อนที่ได้เร็วขึ้นในตำแหน่งปลาย C และ N terminal (b) โมเดลแสดงการเรียงตัวของเส้นใยของ α -synuclein เรียงตัวเป็น cross β -sheet (ตำแหน่ง 35 ถึง 96) โดยที่ตำแหน่งเดียวกันของแต่ละโมเลกุลอยู่ตรงกันและขนานกันโดยห่างเป็นระยะประมาณ 4.7-4.8 Å (จากผลการกระเจิงรังสีเอ็กซ์) (24)

3.2 เทคนิค ESR เพื่อวัดระยะห่างระหว่างฉลากในตรอกไฮโดรเจน

ดังที่ได้กล่าวแล้วว่าแรงกระทำพื้นฐานของสเปกตรัม ESR คือแรงซีแมนน์ และแรงไฮเปอร์ไฟน์ นอกเหนือจากนี้ ถ้ามีสปีนของอิเล็กตรอนเดี่ยวมากกว่าหนึ่งตัวอยู่ห่างกันพอที่จะเกิดแรงกระทำระหว่างกันได้ ก็จะมีผลต่อสเปกตรัม ESR ด้วยเช่นกัน แรงกระทำระหว่างสปีนอิเล็กตรอนนี้เรียกว่าแรงไดโพล โดยปกติจะแปรผกผันกับกำลังสามของระยะห่างระหว่างสปีนทั้งสอง ($\propto 1/r^3$) การวัดแรงไดโพลเพื่อคำนวณหาระยะ

ห่างระหว่างสปีนอิเล็กตรอนด้วย ESR นี้ทำได้หลายวิธี ในทศวรรษที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาเทคนิคทาง pulsed-ESR เรียกว่า double electron-electron resonance (DEER) (27) และ double quantum coherence (DQC) (28) ทั้งสองเทคนิคนี้มีความเฉพาะเจาะจงในการตรวจวัดแรงไดโพลได้โดยตรงสเปกตรัมที่ได้จะเป็นสัญญาณความถี่จากแรงไดโพลเทียบกับเวลา จากรูปที่ 7 สัญญาณไดโพลนี้จะมีค่าที่สัมพันธ์กับระยะห่างระหว่างสปีนที่ตำแหน่งทั้งสองดังสมการที่ 1

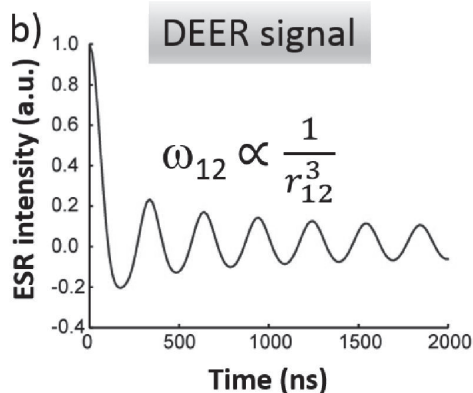
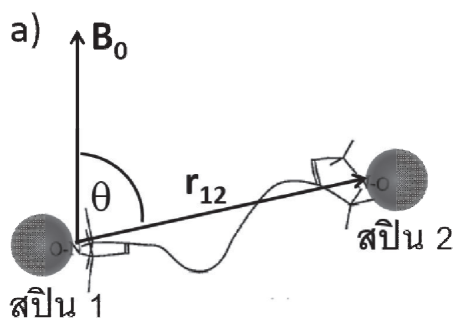
$$\omega_{12} = c \cdot \frac{1}{r_{12}^3} (3 \cos^2 \theta - 1) \quad (1)$$

โดย w_{12} คือค่าความถี่เชิงมุมจากแรงไดโพล c เป็นค่าคงที่ $c = \frac{\mu_0}{4\pi\hbar} g_1 g_2 \beta_e^2 r_{12}$ คือระยะห่างระหว่างสปินอิเล็กตรอนและ θ คือมุมระหว่างเวกเตอร์ r_{12} และสนามแม่เหล็ก เมื่อ θ ทำมุม 90 องศา ค่าความถี่จะสัมพันธ์โดยตรงกับส่วนกลับระยะ r_{12} ตามสมการที่ 2 โดยที่หน่วยของความถี่และ r_{12} เป็น MHz และ nm ตามลำดับ

$$\omega_{12} (MHz) = 2\pi \frac{52.04}{r_{12}^3 (nm^3)} \quad (2)$$

เทคนิคทั้งสองนี้สามารถวัดระยะห่างระหว่างสปินสองอิเล็กตรอนในช่วงระยะที่ห่างประมาณ 1.5-8 nm ช่วงระยะห่างนี้เป็นช่วงที่เหมาะสมสำหรับการติดตามการเคลื่อนที่หรือการเปลี่ยนแปลงของโมเลกุลขนาดใหญ่เช่นพอลิเมอร์สายยาวและโปรตีนการประยุกต์ใช้

เทคนิค DEER ในการวัดระยะห่างระหว่างฉลากไนโตรเจนที่ติดกับอิมัลลอยด์โปรตีนเริ่มมีขึ้นในปี 2006 ในการศึกษาโครงสร้างของ α -synuclein ที่เปลี่ยนไปเมื่อก่อนและหลังจากจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ไขมัน (29) และต่อมาได้ใช้วัดระยะห่างในโครงสร้างเส้นใยของ α -synuclein (30, 31) ระหว่างตำแหน่งที่อยู่ภายในบริเวณ β -sheet พบว่าขนาดของตำแหน่งที่อยู่บนขอบทั้งสองข้างของ β -sheet ห่างกันประมาณ 4 nm ซึ่งสอดคล้องกับโมเดลที่ Riek เสนอ และมีแนวโน้มว่าการม้วนพับของ β -sheet จะม้วนเป็น 5 ชั้น อย่างไรก็ตามการม้วนพับในรายละเอียดของตำแหน่งกรดอะมิโนยังต้องทำการศึกษาต่อไปนอกจากนี้เมื่อเร็วๆ นี้ Meyer และคณะ (32) ได้วัดระยะห่างระหว่างตำแหน่งภายใน β -sheet ของโปรตีน Tau เมื่อมีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่มีอิทธิพลในการเร่งการเกิดเส้นใยเพื่อวิเคราะห์ว่าการเกิดการกลายพันธุ์มีผลอย่างไรกับกระบวนการการเกิดเส้นใยในช่วงเริ่มต้น



รูปที่ 7. (a) แผนภาพแสดงระยะห่างระหว่างสปิน 1 และ สปิน 2 และทิศทางสนามแม่เหล็ก (b) สัญญาณที่ได้จากการวัดระยะด้วย DEER ความถี่แปรผกผันกับส่วนกลับยกกำลังสามของระยะทางของโรคและโปรตีนที่เกิดเส้นใยอิมัลลอยด์

3.3 การตรวจสอบโมเลกุลที่มีส่วนในการยับยั้งการเกิดเส้นใยอิมัลลอยด์

การยับยั้งกระบวนการเกิดเส้นใยอิมัลลอยด์อาจมีส่วนในการยับยั้งการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับการพับผิดปกติของโปรตีนนั้นๆ มีข้อมูลพบว่าโมเลกุลขนาดเล็กหลายชนิดที่มีหมู่ aromatic และ polyphenol (33) มีคุณสมบัติยับยั้งกระบวนการดังกล่าวได้ ซึ่งโมเลกุล

เหล่านี้มักจะมีฤทธิ์ในการต่อต้านการติดเชื้อและต่อต้านอนุมูลอิสระด้วย เช่น เควอทิน และแทนนินการพัฒนาเทคนิคในการตรวจสอบโมเลกุลเพื่อยับยั้งการเกิดอิมัลลอยด์จึงมีความสำคัญเพื่อการพัฒนาตัวยาในการรักษาโรคเทคนิคที่นิยมใช้ในการตรวจสอบนี้จะเป็นเทคนิคที่สามารถแยกแยะโครงสร้างในช่วงที่เกิดการเปลี่ยนแปลงได้ เช่นการตรวจวัดด้วยฟลูออเรสเซนซ์ของ ThT เมื่อ

จับกับอิมัลลอยด์เป็นวิธีที่สะดวกและใช้อย่างแพร่หลายวิธีหนึ่งซึ่งนอกเหนือจากจะได้ข้อมูลในการคัดเลือกโมเลกุลที่มีแนวโน้มในการรักษาแล้วยังสามารถศึกษาในเชิงลึกเกี่ยวกับกลไกของโมเลกุลที่มีผลต่อการเกิดเส้นใยด้วยอย่างไรก็ตามการตรวจสอบด้วย ThT นี้จะต้องทำด้วยความระมัดระวังเมื่อสารประกอบที่ใช้ทดสอบอาจจะให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ในช่วงเดียวกัน (34, 35) นอกจากนี้ ESR ก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถตรวจสอบได้ โดยการติดฉลากไนโตรกไฮโดรไลซ์ที่โปรตีนและวิเคราะห์จากความกว้างพีคของฉลากไนโตรกไฮโดรไลซ์ที่เปลี่ยนไปซึ่งมีข้อดีคือสัญญาณจะไม่มีถูกรบกวนจากโมเลกุลที่ต้องการตรวจสอบ การใช้ ESR ในการตรวจสอบนี้ถือว่าเป็นวิธีที่ยังใหม่และยังไม่แพร่หลายเมื่อเทียบกับฟลูออเรสเซนซ์ของ ThT และเทคนิคอื่นๆ อย่างไรก็ตามการใช้ ESR เริ่มมีมากขึ้นในช่วงหลายปีที่ผ่านมา เมื่อเร็ว ๆ นี้ได้มีการสำรวจประสิทธิภาพของเคอคูมินและกลไกในการยับยั้งอิมัลลอยด์ต่อโปรตีน amylin (36) โดยการติดตามด้วย ThT และ ESR และได้แสดงว่าผลจากการติดตามด้วย ThT ให้ข้อมูลที่คลาดเคลื่อนเนื่องจากมีสัญญาณรบกวนจากเคอคูมินนอกจากนี้ ESR ถูกใช้ในการตรวจสอบสารประกอบ phthalocyanine tetrasulfonate ต่อโปรตีน Tau (37) ข้อมูลที่ได้จาก ESR สอดคล้องและเสริมกับข้อมูลที่ได้จากเทคนิคอื่นเช่น NMR และกล้องจุลทรรศน์

อิเล็กตรอนฉะนั้นเทคนิคการติดฉลากไนโตรกไฮโดรไลซ์เพื่อตรวจวัดด้วย ESR นี้มีแนวโน้มที่จะถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์กระบวนการยับยั้งการเกิดอิมัลลอยด์มากขึ้นในอนาคต

4. สรุป

เป็นที่ทราบกันว่าการพับที่ผิดปกติของโปรตีนไปเป็นเส้นใยอิมัลลอยด์นี้เป็นกระบวนการผิดปกติที่นำไปสู่โรคที่รักษายากหลายชนิด โดยเฉพาะโรคที่เกิดขึ้นจากการสะสมเส้นใยอิมัลลอยด์ในสมองเช่น โรคพาร์กินสัน และอัลไซเมอร์ซึ่งเกิดจากโปรตีน α -synuclein และ Tau ตามลำดับ โครงสร้างอิมัลลอยด์ที่เกิดจากโปรตีนชนิดต่างๆมีคุณสมบัติทางกายภาพคล้ายๆกัน จากข้อมูลที่ได้จากการกระเจิงรังสีเอ็กซ์และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนทำให้ได้โครงสร้างพื้นฐานของเส้นใยอิมัลลอยด์ คือเป็นสาย β -sheet ที่เรียงอย่างเป็นระเบียบตั้งฉากกับทิศทางตามแกนของเส้นใย เรียกว่า cross β -sheet ปัจจุบันได้มีความพยายามในการพัฒนาเทคนิคทางกายภาพหลายวิธีเพื่อที่จะติดตามกลไกการเกิดเส้นใยอิมัลลอยด์เช่นกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนการกระเจิงรังสีเอ็กซ์ และฟลูออเรสเซนส์เป็นต้น

ตารางที่ 2. เปรียบเทียบเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์โครงสร้างเส้นใยอิมัลลอยด์ที่กล่าวถึงในบทความ

เทคนิค	ข้อมูลที่ได้	ข้อจำกัด
ฟลูออเรสเซนซ์	- สะดวกในการติดตามการเกิดเส้นใยตามช่วงเวลา - ใช้ศึกษาบทบาทของโมเลกุลขนาดเล็กในการเกิดเส้นใยได้ง่าย	อาจได้ข้อมูลที่คลาดเคลื่อนเนื่องจากโมเลกุลขนาดเล็กเข้าไปจับกับเส้นใยแทนที่สีย้อม
กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	รูปร่างของโปรตีนเมื่อเกิดการตกตะกอน เช่น โอลิโกเมอร์ขนาดใหญ่ โปรโตไฟบริลและเส้นใยที่โตเต็มที่	ต้องยึตรูปตัวอย่างกับพื้นผิวเช่น Mica (สำหรับ AFM) ซึ่งอาจเป็นการรบกวนโครงสร้างของเส้นใย
การกระเจิงรังสีเอ็กซ์	โครงสร้างของเส้นใย	จำเป็นต้องเรียงสารตัวอย่างในทิศทางที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ข้อมูลที่แม่นยำ
ESR	- การเคลื่อนที่ของโปรตีนที่ตำแหน่งติดฉลากสปิน ใช้ติดตามการเกิดเส้นใยตามช่วงเวลา - วัดระยะระหว่างตำแหน่งฉลากสปิน	จำเป็นต้องติดฉลากสปิน

ESR ถือว่าเป็นเทคนิคที่ยังอยู่ในขั้นเริ่มต้นในการศึกษาเส้นใยอมัยลอยด์เมื่อเทียบกับเทคนิคที่ได้กล่าวข้างต้นหลังจากที่วิธีการติดฉลากในตรอกไซค์ได้ถูกพัฒนาให้สามารถเตรียมได้ในโปรตีนเกือบทุกชนิด แนวโน้มในการนำเทคนิค ESR มาใช้ในการศึกษาโครงสร้างเส้นใยอมัยลอยด์จึงมีมากขึ้น เนื่องจาก ESR มีความไวต่อการเคลื่อนที่ (การหมุน) ของสายโปรตีนทำให้สามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงที่เกิดที่ตำแหน่งที่ติดฉลากเมื่อเกิดการเปลี่ยนโครงสร้างไป สำหรับกรณีของเส้นใยอมัยลอยด์นั้นโครงสร้างโปรตีนจะเปลี่ยนจากการพับที่ไม่เป็นระเบียบเป็นโครงสร้าง β -sheet ที่มีหลายๆโมเลกุลอยู่เรียงกันอย่างมีระเบียบ การเปลี่ยนแปลงนี้สามารถเห็นได้อย่างชัดเจนจากสเปกตรัม ESR นอกจากนี้การใช้ ESR ในการวัดระยะห่างภายในโครงสร้างของโปรตีนเป็นวิธีที่เหมาะสมกับขนาดโปรตีนโดยเฉพาะขนาดของสาย β -sheet ภายในแกนของโปรโตไฟลามেন্টและ ESR สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นวิธีเพื่อตรวจสอบคุณสมบัติของโมเลกุลเพื่อนำไปพัฒนาเป็นยารักษาต่อไป อย่างไรก็ตามการศึกษากลไกการเกิดอมัยลอยด์ในเชิงลึกนั้นจำเป็นต้องอาศัยข้อมูลจากหลายเทคนิคซึ่งแต่ละเทคนิคมีหลักการและข้อจำกัดแตกต่างกันไปดังแสดงในตารางที่ 2 สุดท้ายนี้ผู้เขียนเสนอว่าข้อมูลจาก ESR เสริมกับเทคนิคอื่นที่เหมาะสมสามารถนำไปวิเคราะห์เพื่อศึกษาบทบาทของตัวต่อโปรตีนในเชิงลึกต่อไปได้

5. เอกสารอ้างอิง

1. Sipe JD, Cohen AS. Review: history of the amyloid fibril. *J Struct Biol.* 2000;130(2-3):88-98.
2. Prusiner SB. Shattuck lecture--neurodegenerative diseases and prions. *N Engl J Med.* 2001;344(20):1516-26.
3. Hutton M. Missense and splice site mutations in tau associated with FTDP-17: multiple pathogenic mechanisms. *Neurology.* 2001;56(11 Suppl 4):S21-5.
4. Chiti F, Dobson CM. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem.* 2006;75:333-66.
5. Cohen AS, Calkins E. Electron microscopic observations on a fibrous component in amyloid of diverse origins. *Nature.* 1959;183(4669):1202-3.
6. Shirahama T, Cohen AS. High-resolution electron microscopic analysis of the amyloid fibril. *J Cell Biol.* 1967;33(3):679-708.
7. Eanes ED, Glenner GG. X-ray diffraction studies on amyloid filaments. *J Histochem Cytochem.* 1968;16(11):673-7.
8. Morris KL, Serpell LC. X-ray fibre diffraction studies of amyloid fibrils. *Methods Mol Biol.* 2012;849:121-35.
9. Kad NM, Thomson NH, Smith DP, Smith DA, Radford SE. Beta(2)-microglobulin and its deamidated variant, N17D form amyloid fibrils with a range of morphologies in vitro. *J Mol Biol.* 2001;313(3):559-71.
10. Khurana R, Ionescu-Zanetti C, Pope M, Li J, Nielson L, Ramirez-Alvarado M, et al. A general model for amyloid fibril assembly based on morphological studies using atomic force microscopy. *Biophys J.* 2003;85(2):1135-44.
11. Booth DR, Sunde M, Bellotti V, Robinson CV, Hutchinson WL, Fraser PE, et al. Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis. *Nature.* 1997;385(6619):787-93.
12. Selkoe DJ. Folding proteins in fatal ways. *Nature.* 2003;426(6968):900-4.
13. Bartels T, Choi JG, Selkoe DJ. alpha-Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature.* 2011;477(7362):107-10.
14. Vassar PS, Culling CF. Fluorescent stains, with special reference to amyloid and connective tis-

- sues. *Archives of pathology*. 1959;68:487-98.
15. Naiki H, Higuchi K, Hosokawa M, Takeda T. Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1. *Anal Biochem*. 1989;177(2):244-9.
 16. LeVine H, 3rd. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci*. 1993;2(3):404-10.
 17. Biancalana M, Koide S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1804(7):1405-12.
 18. Wertz JE, Bolton JR. *Electron Spin Resonance: Elementary Theory and Practical Applications*: Chapman and Hall; 1986.
 19. Todd AP, Cong J, Levinthal F, Levinthal C, Hubbell WL. Site-directed mutagenesis of colicin E1 provides specific attachment sites for spin labels whose spectra are sensitive to local conformation. *Proteins*. 1989;6(3):294-305.
 20. Guo Z, Cascio D, Hideg K, Hubbell WL. Structural determinants of nitroxide motion in spin-labeled proteins: solvent-exposed sites in helix B of T4 lysozyme. *Protein Sci*. 2008;17(2):228-39.
 21. Hubbell WL, McHaourab HS, Altenbach C, Lietzow MA. Watching proteins move using site-directed spin labeling. *Structure*. 1996;4(7):779-83.
 22. Jayasinghe SA, Langen R. Identifying structural features of fibrillar islet amyloid polypeptide using site-directed spin labeling. *J Biol Chem*. 2004;279(46):48420-5.
 23. Margittai M, Langen R. Side chain-dependent stacking modulates tau filament structure. *J Biol Chem*. 2006;281(49):37820-7.
 24. Chen M, Margittai M, Chen J, Langen R. Investigation of alpha-synuclein fibril structure by site-directed spin labeling. *J Biol Chem*. 2007;282(34):24970-9.
 25. Wu JW, Breydo L, Isas JM, Lee J, Kuznetsov YG, Langen R, et al. Fibrillar oligomers nucleate the oligomerization of monomeric amyloid beta but do not seed fibril formation. *J Biol Chem*. 2010;285(9):6071-9.
 26. Vilar M, Chou HT, Luhrs T, Maji SK, Riek-Loher D, Verel R, et al. The fold of alpha-synuclein fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(25):8637-42.
 27. Larsen RG, Singel DJ. Double electron-electron resonance spin-echo modulation: Spectroscopic measurement of electron spin pair separations in orientationally disordered solids. *J Chem Phys*. 1993;98(7).
 28. Chiang YW, Borbat PP, Freed JH. The determination of pair distance distributions by pulsed ESR using Tikhonov regularization. *J Magn Reson*. 2005;172(2):279-95.
 29. Borbat P, Ramlall TF, Freed JH, Eliezer D. Inter-helix distances in lysophospholipid micelle-bound alpha-synuclein from pulsed ESR measurements. *J Am Chem Soc*. 2006;128(31):10004-5.
 30. Karyagina I, Becker S, Giller K, Riedel D, Jovin TM, Griesinger C, et al. Electron paramagnetic resonance spectroscopy measures the distance between the external beta-strands of folded alpha-synuclein in amyloid fibrils. *Biophys J*. 2011;101(1):L1-3.
 31. Pornsuwan S, Giller K, Riedel D, Becker S, Griesinger C, Bennati M. Long-range distances in amyloid fibrils of alpha-synuclein from PELDOR spectroscopy. *Angew Chem Int Ed*. 2013;52(39):10290-4.
 32. Meyer V, Dinkel PD, Luo Y, Yu X, Wei G,

- Zheng J, et al. Single mutations in tau modulate the populations of fibril conformers through seed selection. *Angew Chem Int Ed*. 2014;53(6):1590-3.
33. Abelein A, Lang L, Lendel C, Graslund A, Danielsson J. Transient small molecule interactions kinetically modulate amyloid beta peptide self-assembly. *FEBS Lett*. 2012;586(22):3991-5.
 34. Hudson SA, Ecroyd H, Kee TW, Carver JA. The thioflavin T fluorescence assay for amyloid fibril detection can be biased by the presence of exogenous compounds. *The FEBS journal*. 2009;276(20):5960-72.
 35. Buell AK, Dobson CM, Knowles TP, Welland ME. Interactions between amyloidophilic dyes and their relevance to studies of amyloid inhibitors. *Biophys J*. 2010;99(10):3492-7.
 36. Daval M, Bedrood S, Gurlo T, Huang CJ, Costes S, Butler PC, et al. The effect of curcumin on human islet amyloid polypeptide misfolding and toxicity. *Amyloid*. 2010;17(3-4):118-28.
 37. Akoury E, Gajda M, Pickhardt M, Biernat J, Pornsuwan S, Griesinger C, et al. Inhibition of tau filament formation by conformational modulation. *J Am Chem Soc*. 2013;135(7):2853-62.
 38. Groenning M. Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils-current status. *J Chem Biol*. 2010;3(1):1-18.
 39. Serpell LC. Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1502(1):16-30.