

DISS. ETH NO. 22456

**QUANTITATIVE ANALYSIS, CHIRALITY AND MECHANICAL
PROPERTIES OF NATURAL FIBRILLAR NANOSTRUCTURES**

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

IVAN USOV

MSc in Physics of Condensed Matter, Lomonosov Moscow State University

born on *18.10.1988*

citizen of Russian Federation

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Raffaele Mezzenga, examiner

Prof. Dr. Giovanni Dietler, co-examiner

Dr. Tuomas P. J. Knowles, co-examiner

2015

Abstract (English)

This thesis tackles a range of topics; it deals with the fundamental statistical, morphological and mechanical properties of natural fibrillar nanostructures on the collective- and single-particle levels. The main results achieved were fourfold: the disclosure of complex polymorphic transformations in amyloid fibrils, coupled with their chirality inversion; the development of a theoretical approach associating the mechanical properties of the most-common polymorphisms with their fibrillar shapes; the thorough study of the nanocellulose fibrils and crystals down to the single cellulose polymer chain length scale; and the general quantitative characterization of miscellaneous fibrillar systems on solid substrates and at the air-water interfaces. The latter challenges were addressed by the accurate coordinate acquisition of fibrillar structures in images obtained by the different types of microscopy, and their processing *via* the in-house developed, multifunctional analytical tool called FiberApp.

Article 1 provides a brief review of existent methods for tracking slender objects of different nature in 2D and 3D, and describes analytical methods, mostly based on polymer physics concepts, that are implemented in the FiberApp software. The program, written in MATLAB programming language, is positioned as an open-source project, which ultimately leads to a free distribution and usage for a broad audience of scientists. As a result, FiberApp can also serve as a platform for the future development of advanced algorithms for closed contour analysis, branched structures etc.

Article 2 describes the study of amyloid fibrils obtained from bovine serum albumin (BSA) upon incubating the protein solution at high temperatures for several days in acidic environment. It was shown that the resulting amyloid fibrils are stable and, upon incubation time, undergo a common polymorphic transition pathway from twisted ribbons into closed nanotubes *via* the transient metastable state of helical ribbon conformations. In total, thin and thick fibril classes were detected and comprehensively characterized for each polymorph type.

Article 3 develops the main conclusions of Article 2 and unravels a brand-new way of creating a polymorphic transition with a chirality inversion in the system. This pathway occurs when two flexible left-handed twisted ribbons intertwine, resulting in a right-handed twisted ribbon conformation, which then evolves into right-handed helical ribbons, following the established pathway of polymorphic transformations. All six distinct classes of coexisting amyloid fibrils, together with four intermediates, were identified and quantified using the detailed statistical analysis of their contours. This work provided the first compelling evidence that the inversion of handedness of amyloid fibrils can be accompanied by the hierarchy level increase of structural complexity.

In Article 4, an investigation into the “structure–mechanical property” relationship was carried out using formalism from the theory of elasticity and, as a result, the analytical expressions were derived for the most common polymorphic types of amyloid fibrils. They were benchmarked against experimental data from nanoindentation, resulting in an excellent

correlation. The conclusions of this work are general and can be applied to other fibrillar nanostructures like collagen, fibronectin, microtubules etc.

In Article 5, the previously developed strategy for studying amyloid fibrils was successfully implemented for different nanocellulose samples: TEMPO-oxidized wood cellulose nanofibrils (W-CNF), wood cellulose nanocrystals (W-CNC), and bacterial cellulose nanocrystals (B-CNC). The detailed statistical analysis of the kinks – which are the structural features in W-CNF sample – leads to evidence that the accepted model with alternating regions of crystalline and amorphous cellulose chains along the fibril length is not appropriate to explain this phenomenon. Consequently, it was concluded that the presence of kinks is better explained by the harsh mechanical treatment of the material during the process of fibril preparation.

All in all, this thesis enhances the amount of information which can be extracted from quantitative analysis of microcopy images of fibrous objects. The concept of handedness inversion in amyloid fibrils, the “polymorphic shape–mechanical property” relationships, the method for amorphous *versus* crystalline domains discrimination *via* the lengthscale-dependent order parameter, and the kink angle analysis of the cellulose nanofibrils were successfully established for the first time in this work. The newly developed FiberApp open-source code, deeply rooted in statistical polymer physics, may play a central role in bridging the gap currently existing between the imaging of fibrous objects and their structural analysis, and can contribute in enhancement of our understanding of a broad class of naturally occurring filamentous colloids.

Kurzfassung (Deutsch)

Diese Doktorarbeit setzt sich mit den grundlegenden statistischen, morphologischen und mechanischen Eigenschaften von natürlichen, fibrillären Nanostrukturen auf der Kollektiv- und Einzelebene auseinander. Die wichtigsten erzielten Ergebnisse sind (I) die Offenlegung von komplexen polymorphen Umwandlungen in Amyloidfibrillen, gepaart mit einer Inversion ihrer Chiralität. (II) Die Entwicklung eines theoretischen Ansatzes zur Zuordnung der mechanischen Eigenschaften der meistverbreiteten Polymorphismen fibrillärer Strukturen. (III) Die Untersuchung von Nanocellulosefibrillen und -kristallen hin bis zur Längenskala der einzelnen Cellulosepolymerketten. (IV) Die allgemeine quantitative Charakterisierung verschiedener fibrillärer Systeme auf festen Substraten und an der Luft-Wasser-Grenzfläche. Letztere Ergebnisse konnten mit Hilfe einer detaillierten statistischen Analyse der Fibrillen-Konturen in Bildern belegt werden, die durch verschiedene Arten der Mikroskopie gewonnen und mit Hilfe eines eigens entwickelten, multifunktionalen analytischen Tool namens „FiberApp“ verarbeitet wurden.

Artikel 1 bietet einen Überblick über existierende Methoden zur bildbasierten Verfolgung von fibrillenähnlichen Objekten in 2D und 3D, und beschreibt analytische Methoden, meist basierend auf Polymerphysik-Konzepten, die in die FiberApp Software implementiert wurden. Das Programm, das in der MATLAB-Programmiersprache geschrieben ist, ist ein Open-Source-Projekt, das kostenlos von einem breiten wissenschaftlichen Publikum verwendet und verbreitet werden kann. Das Programm kann auch als Plattform für die zukünftige Entwicklung von fortschrittlichen Algorithmen für eine Analyse geschlossener Konturen, verzweigter Strukturen usw. dienen.

Artikel 2 beschreibt die Untersuchung von Amyloidfibrillen aus Rinderserumalbumin (BSA) die mittels mehrtätiger Inkubation bei hohen Temperaturen und in saurem Milieu hergestellt wurden. Es konnte gezeigt werden, dass die resultierenden Amyloidfibrillen stabil sind und während der Inkubationszeit ein polymorpher Übergang von gedrehten Bändern über einen vorübergehenden, metastabilen Zustand einer helikalen Konformationen hin zu geschlossenen Nanoröhren durchlaufen. Insgesamt wurden dünne und dicke Fibrillenklassen erkannt und umfassend für jeden polymorphen Typ charakterisiert.

Artikel 3 geht auf die wichtigsten Ergebnisse von Artikel 2 ein und deckt eine brandneue Art von polymorphem Übergang mit einhergehender Inversion der Chiralität auf. Diese Transformation tritt auf, wenn sich zwei flexible, linksdrehende Schleifen ineinander verflechten, was in rechtsgewunden, verdrehten Bändern resultiert und sich dann zu rechtsgewunden helikalen Strukturen weiterentwickelt, entsprechend dem bereits etablierten Weg der polymorphen Umwandlung. Alle sechs Klassen von koexistierenden Amyloidfibrillen, gemeinsam mit vier Zwischenprodukten, wurden mit Hilfe der detaillierten statistischen Analyse ihrer Konturen identifiziert und quantifiziert. Diese Arbeit lieferte die ersten überzeugenden Beweise dafür, dass die Umkehrung der Chiralität in Amyloidfibrillen mit der Erhöhung der Hierarchieebene der strukturellen Komplexität einhergehen kann.

Im Artikel 4 wurde die Untersuchung der mechanischen Struktur-Eigenschafts-Beziehungen unter Verwendung des Formalismus der Elastizitätstheorie durchgeführt. Als Ergebnis wurden die analytischen Ausdrücke für die häufigsten Arten von polymorphen Amyloidfibrillen abgeleitet. Sie wurden mit experimentellen Daten der Nanoindentierung gebenchmarkt, was eine ausgezeichnete Korrelation ergab. Die Schlussfolgerungen dieser Arbeit sind genereller Natur und lassen sich auch auf andere fibrilläre Nanostrukturen wie Kollagen, Fibronectin, Mikrotubuli usw. anwenden.

Im Artikel 5 wurde die zuvor entwickelte Strategie für das Studium der Amyloidfibrillen erfolgreich für verschiedene Nanocelluloseproben implementiert: TEMPO-oxidierte Holz-Cellulose Nanofibrillen (W-CNF), Holz-Cellulose Nanokristalle (W-CNC) und bakterielle Cellulose Nanokristalle (B-CNC). Die detaillierte statistische Auswertung der Knicke (die Strukturmerkmale der W-CNF Proben) konnte beweisen, dass das allgemein anerkannte Modell mit abwechselnden Bereichen von kristallinen und amorphen Celluloseketten entlang der Fibrillenlänge nicht zutreffend ist. Die Existenz von Knicken lässt sich demnach besser durch die harsche mechanische Behandlung während des Herstellungsprozesses der Fibrillen erklären.

Insgesamt erhöht diese Dissertation den Gehalt an Informationen, der aus der statistischen Analyse von mikroskopischen Bildern von faserigen Objekten unter Verwendung von Konzepten der Polymerphysik extrahiert werden kann. Konzepte wie die Inversion der Chiralität in Amyloidfibrillen und die Beziehung bzw. Diskriminierung der mechanischen Eigenschaften amorpher gegenüber kristalliner Domänen wurden im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal erfolgreich eingeführt. Der neu entwickelte FiberApp Open-Source-Code, der auf der statistischen Polymerphysik basiert ist, kann eine zentrale Rolle bei der Überbrückung der momentan bestehenden Kluft zwischen der Abbildung von Faserobjekten und deren Strukturanalyse spielen und kann dazu beitragen, unser Verständnis einer breiten Klasse von natürlich vorkommenden Fadenkolloiden zu verbessern.