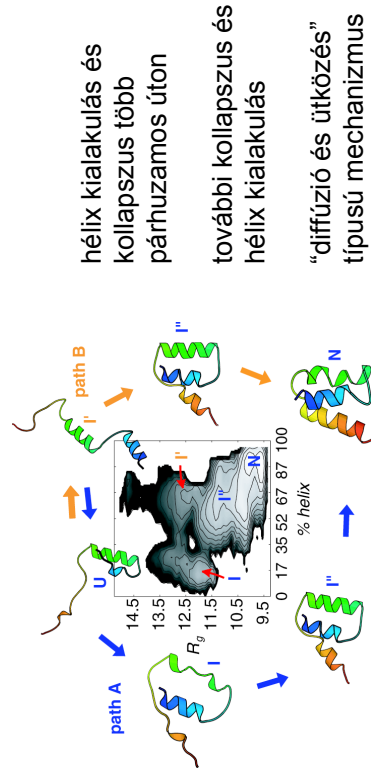


Fehérjék szerkezetének kialakulása II

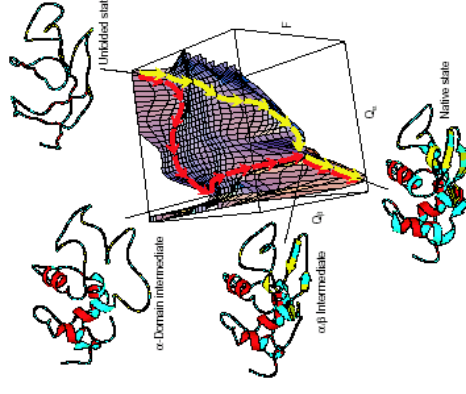
Osváth Szabolcs

Semmelweis Egyetem
szabolcs.osvath@eok.sote.hu

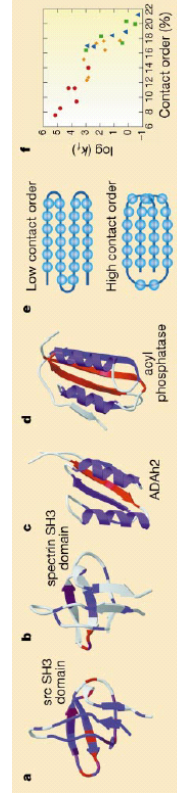
Egy kis fehérje gombolyodása több párhuzamos úton



Lizozim gombolyodásának energiefelszín leírása

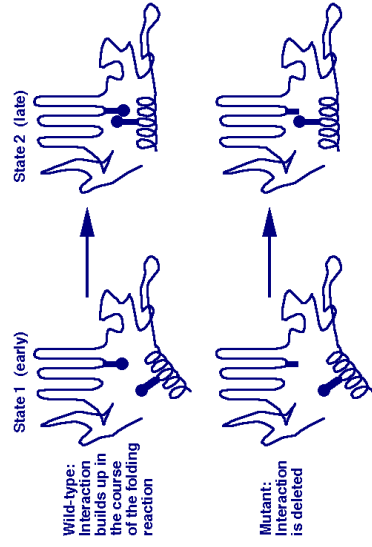


A natív szerkezet hatása a gombolyodás kinetikájára

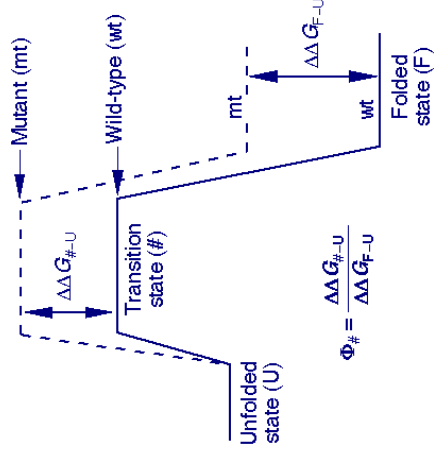


A kisebb kontaktus rendű szerkezetek gyorsabban gombolyodnak, mint a magasabb kontaktus rendűek.
A korreláció a natív kontaktusok átlagos távolsága és gombolyodás sebessége között 6 nagyságrenden keresztül fennáll.

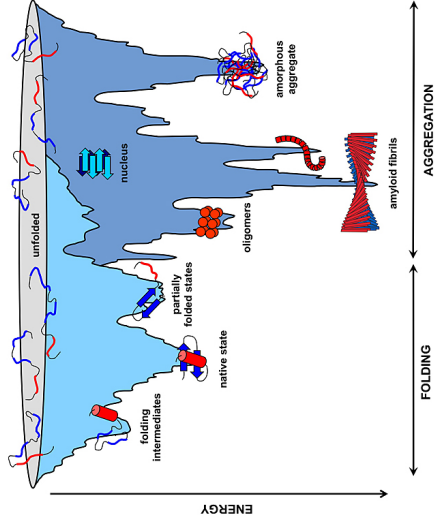
A tranziens állapot vizsgálata Φ érték analízissel



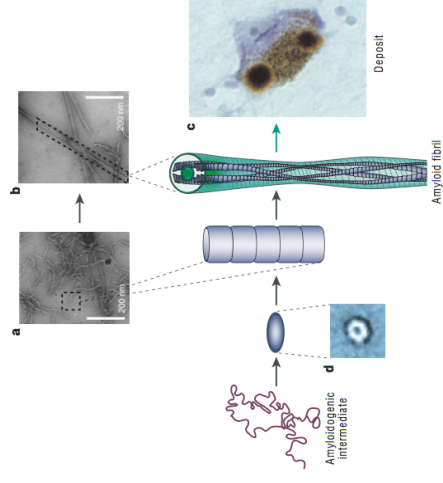
A tranziens állapot vizsgálata Φ érték analízissel



Fehérje gombolyodás és aggregáció



Aamiloid plakk kialakulása

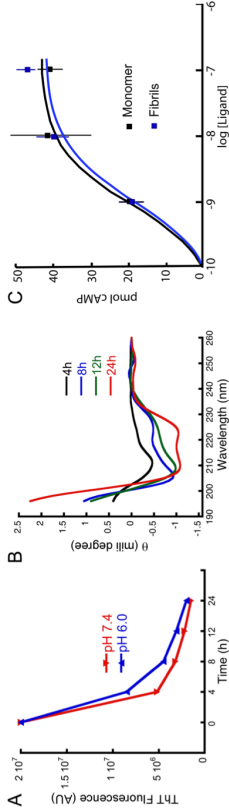


Aamiloid

Az aamiloid elnevezést Rudolph Virchow vezette be 1854-ben, miután megfigyelte, hogy az agyban előforduló viaszos állagú abnormális képletek jódval – a keményítőhöz hasonlóan – kékre festődnek (amylum latinul keményítőt jelent).

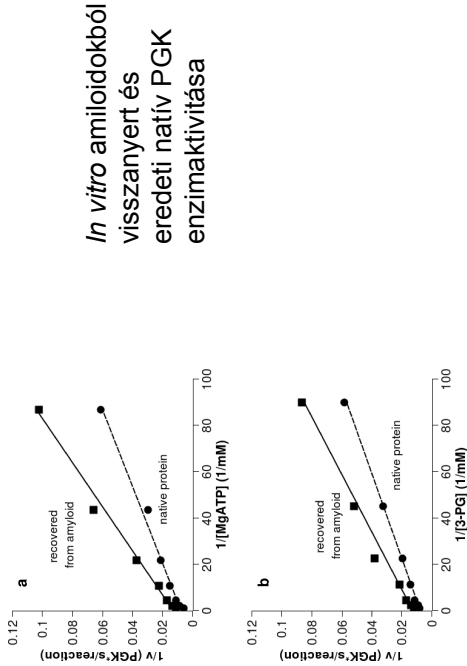
1859-ben Nicolaus Friedreich és August Kekulé vizsgálatai bebizonyították, hogy valójában fehérjéből áll.

Funkcionális aamiloid szerkezetek



Humán corticotropin releasing factor tárolódása aamiloid szerkezetben.

Előfordul, hogy aktív fehérje nyerhető vissza aamiloidból



In vitro aamiloidokból visszanyert és eredeti natív PGK enzimaktivitása

Aamiloid oligomerek szerkezete

- | | |
|---------|--|
| 18. sz. | súrlókór ismert |
| 1920 | Creutzfeldt-Jakob kór első leírása |
| 1939 | a súrlókór fertőző |
| 1954 | súrlókór: „lassú vírus” |
| 1959 | kuru, Creutzfeldt-Jakob kór, súrlókór hasonlóknak |
| 1966 | kuru csimpánz kísérletek (Daniel C. Gajdusek) |
| 1976 | Gajdusek Nobel díjat kap "for discoveries concerning new mechanisms for the origin and dissemination of infectious diseases" |
| 1982 | „prion” Stanley B. Prusiner |
| 1986 | első kerge marha kór eset |
| 1997 | Prusiner Nobel díjat kap "for his discovery of Prions
– a new biological principle of infection" |

Amyloidosis-related diseases

Disease	Protein/peptide	Aggregate
Alzheimer's disease	A β	Senile plaque
Primary systemic amyloidosis	Ig light chain	
Senile systemic amyloidosis	Transferrin	
Diabetes type II	Amylin	
Hemodialysis-associated amyloidosis	β_2 -microglobulin	
Familial systemic amyloidosis	Lysosome mutant	
Huntington's disease	Huntingtin	Huntingtin inclusion
Parkinson's disease	α -synuclein	Lewy body
CJD, other prion diseases	PrP ^{Sc}	Prion aggregate
Tauopathies, Pick disease, FTDP-17	Tau protein	PHF, Pick-body

About amyloid structure

minitely two types of amyloidosis
 protein / peptide
 systemic / tissue-specific
 young / old
 hereditary / sporadic
 mostly / secondarily
 little detectable / kilogram weight in quantity
 in vivo functional role may be
 in vitro amyloidosis not from protein

Amyloidosis-related diseases

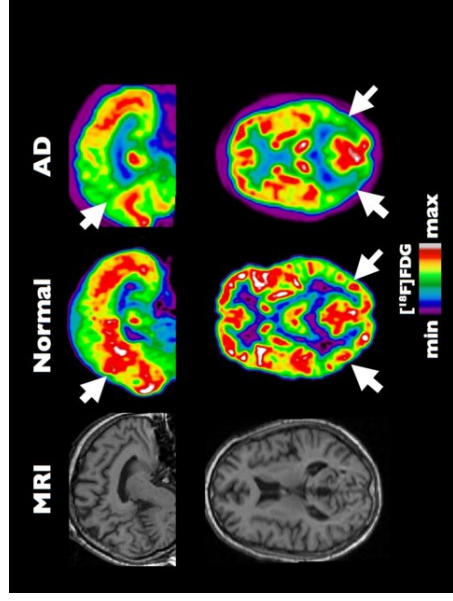
systemic amyloidosis: organ (heart, kidney, liver) insufficiency

 tissue-specific deposition: neurodegeneration, dementia, movement coordination

A protein destabilization leads to amyloid formation

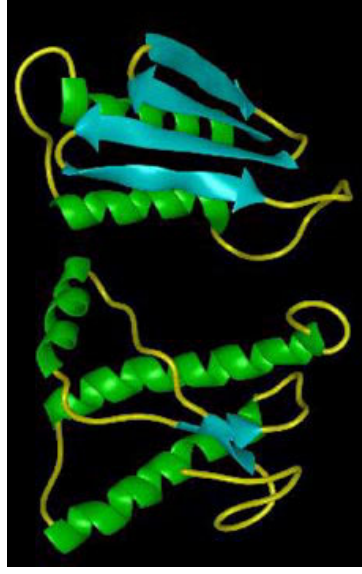
destabilization causes:
 - fragmentation
 - mutation
 - evolutionary change
 - increased concentration

Alzheimer kór, β amiloid plakkok kialakulása *in vivo*



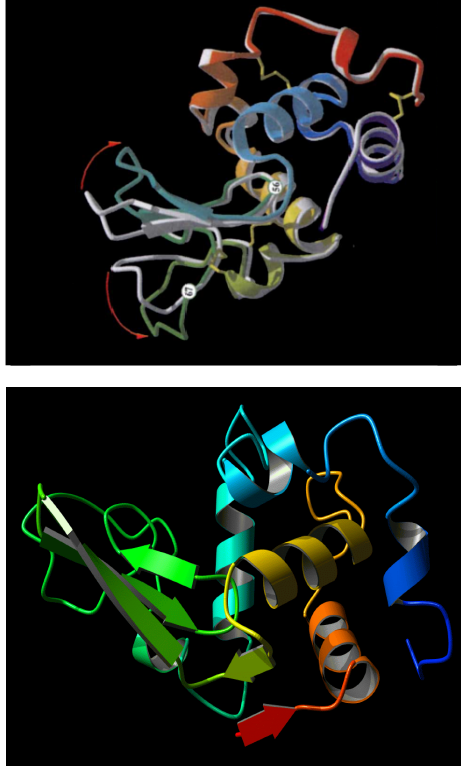
Egészséges és Alzheimer kóros ember agyi aktivitása PET képen.

Creutzfeldt-Jakob kór, prion amiloid plakkok *in vivo*



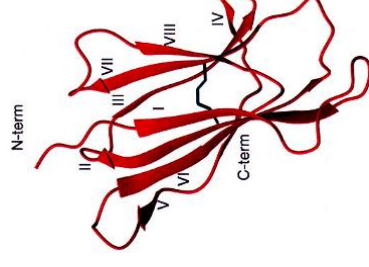
PrP^C és PrP^{Sc} szerkezete

Örökletes álmatlanság, lizozim amiloid plakkok *in vivo*



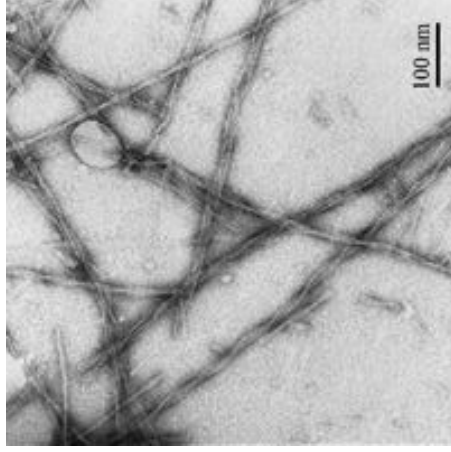
A mutáció által destabilizált lizozim amiloid szerkezetekbe aggregálódik.

β_2 mikroglobulin



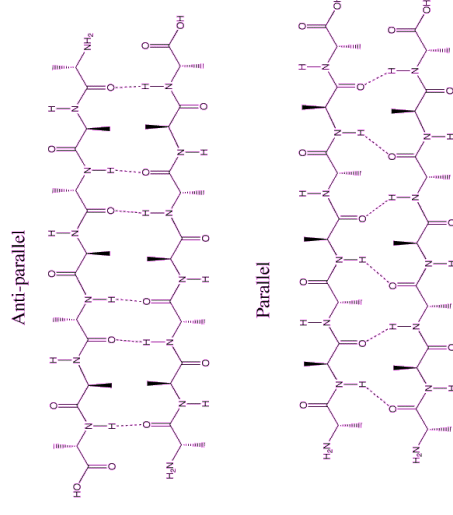
A β_2 mikroglobulin a dialízishez kapcsolódó amyloidózisban rakódik le.

Amiloid szálak szerkezete



6 - 12 nm vastag szálak
egyenes
elágazásmentes
stabil
megfelelően festődő
kereszt β redős

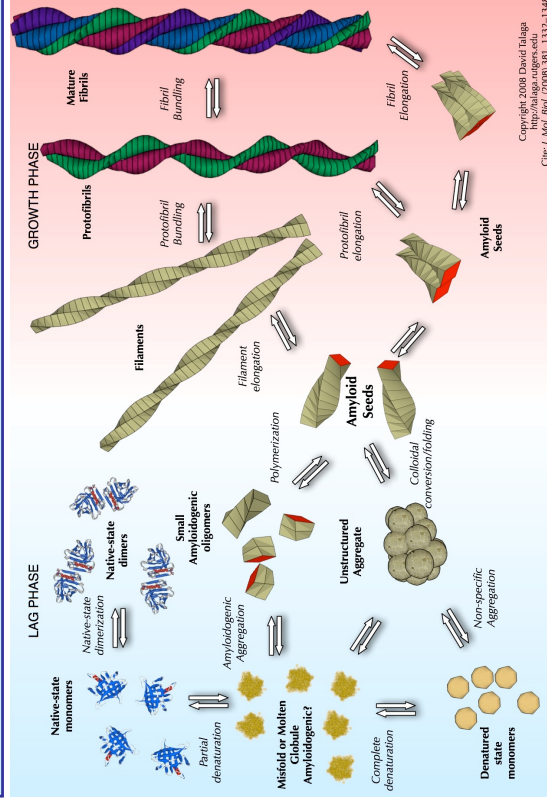
Fehérjék polimerizációs csapdája



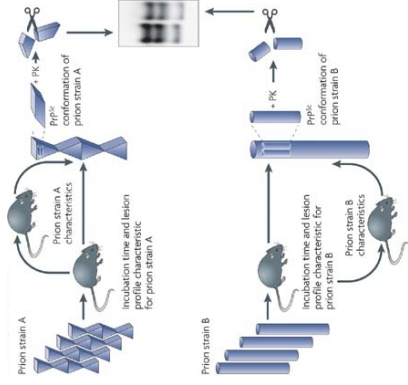
Amiloid plak szerkezeti hierarchiája

β -redő kialakulása – hidrogén híd kötések
kereszt β -redős szerkezet – Van der Waals erők, „steric zipper”
szálak képződése – nem kovalens kötések

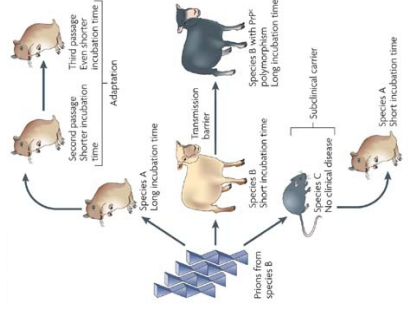
Amiloid szálak növekedése



Prion szerkezeti „törzsek”



Fajok közötti „gát”



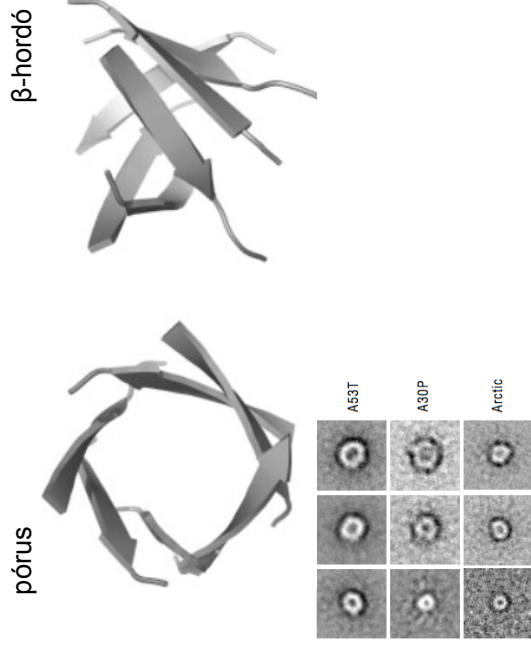
Amiloid oligomerek

az amiloid fibrillumok kialakulása felé vezető aggregált szerkezetek

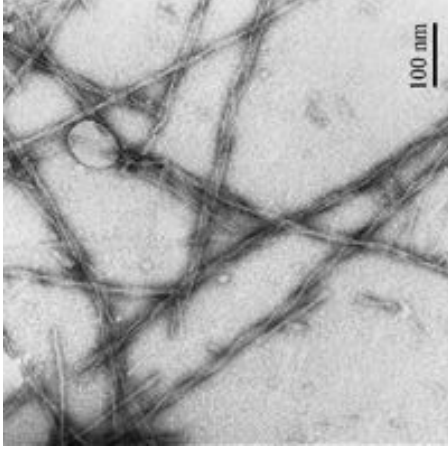
valószínűleg toxikusabbak, mint az amiloid plakkok

eltérő fehérjékből keletkezett oligomerek szerkezete hasonló, hasonló hatásmechanizmusra utalva

Amiloid oligomerek szerkezete

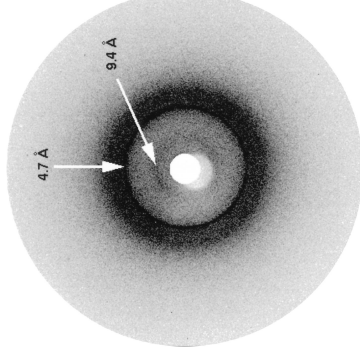


Amiloid szálak kimutatása, elektronmikroszkópia



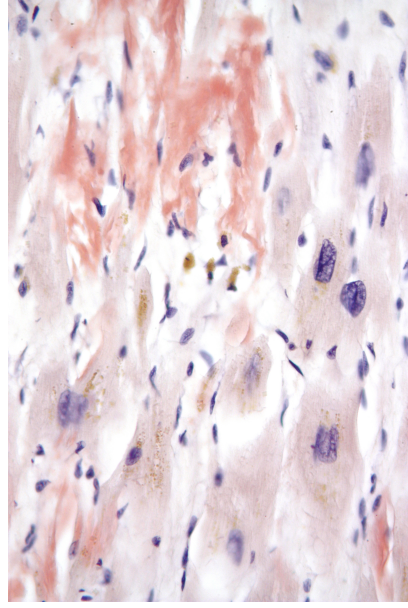
foszfatidilinozitol 3-kináz SH3 doménből *in vitro* növesztett amiloid szálak transzmissziós elektronmikroszkóppal készített képe

Amiloid szálak kimutatása, kisszögű röntgen szórás



A foszfatidilinozitol 3-kináz SH3 doménből *in vitro* növesztett amiloid szálak kisszögű röntgen szórás mintázata jól mutatja az amiloidokra jellemző β síkokat alkotó szálak (4.7 Å) és a β síkok közötti (9.4 Å) távolságokat.

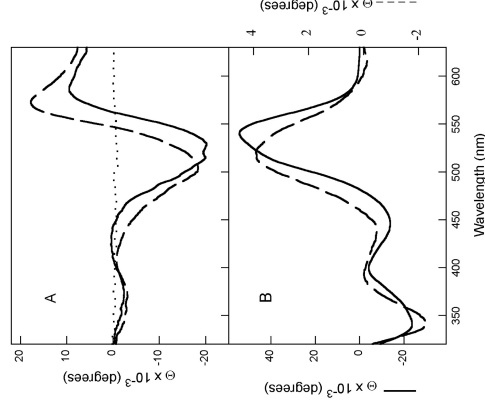
Amiloidok kimutatása, Kongó vörös festés



Amiloid plakkok kimutatása Kongó vörös festéssel szívizom szövetben

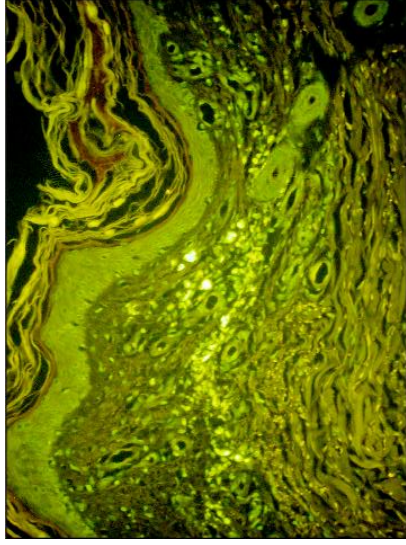
Amiloidok kimutatása, Kongó vörös kettőtörés

A) Kongó vörös kettőtörése
80 nM inzulin (—) vagy
400nM Ig light chain (----)
amiloid jelenlétében



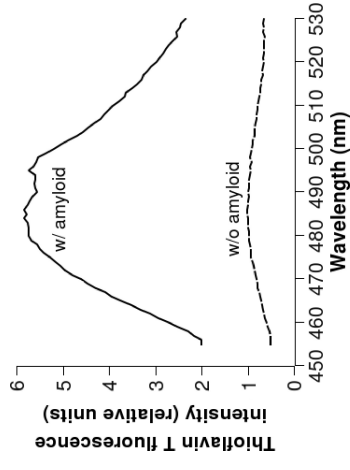
B) Kongó vörös kettőtörése
10 μM natív inzulin vagy
10μM natív Ig light chain
(----) amiloid jelenlétében

Amiloidok kimutatása, Thioflavin t festés



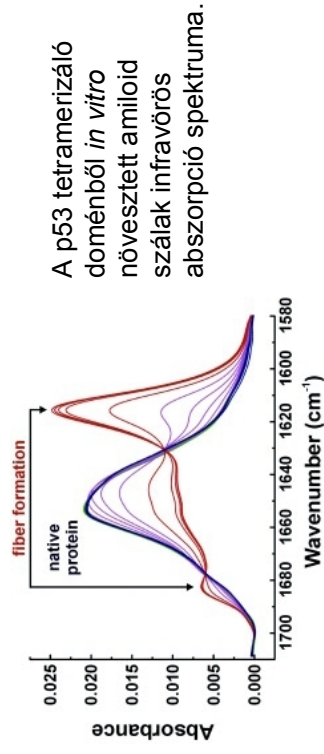
Amiloid lerakódások kimutatása a bőrben
Thioflavin t festéssel

Amiloidok kimutatása, Thioflavin t fluoreszcencia



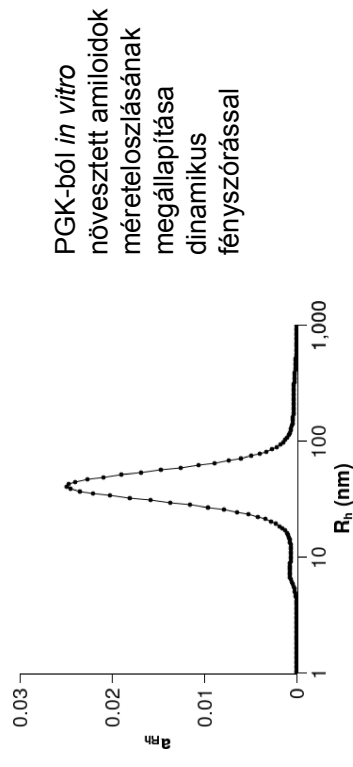
Thioflavin t fluoreszcencia emisszió PGK
amiloid szálak jelenlétében és nélkülük

Amiloid szálak kimutatása, infravörös abszorpció



A p53 tetramerizáló
doménből *in vitro*
növesztett amiloid
szálak infravörös
abszorpció spektruma.

Amiloid szálak méreteloszlása, dinamikus fényszórás



PGK-ból *in vitro*
növesztett amiloidok
méreteloszlásának
megállapítása
dinamikus
fényszórással