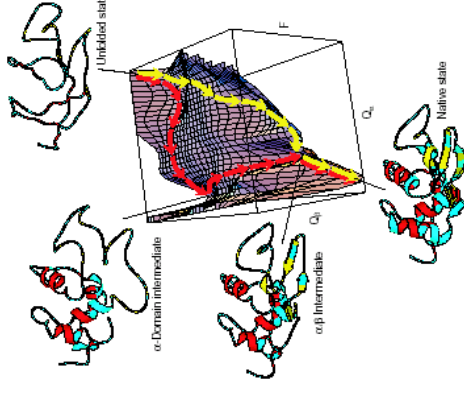


Fehérjék szerkezetének kialakulása II

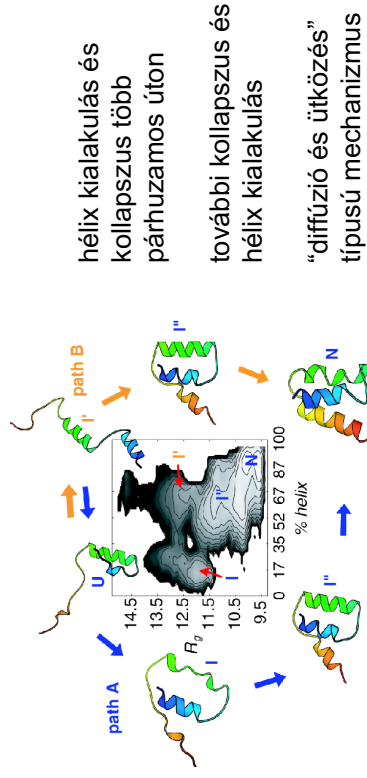
Osváth Szabolcs

Semmelweis Egyetem
szabolcs.osvath@eok.sote.hu

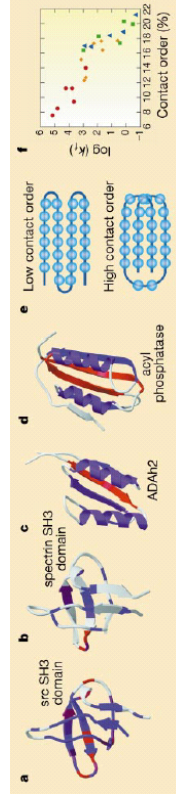
Lizozim gombolyodásának energiatájak leírása



Egy kis fehérje gombolyodása több párhuzamos úton

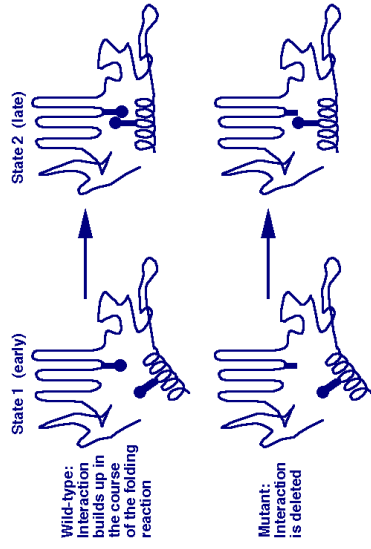


A natív szerkezet hatása a gombolyodás kinetikájára

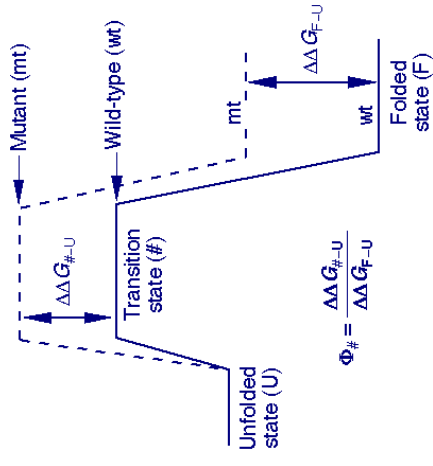


A kisebb kontaktus rendű szerkezetek gyorsabban gombolyodnak, mint a magasabb kontaktus rendűek.
A korreláció a natív kontaktusok átlagos távolsága és gombolyodás sebessége között 6 nagyságrenddel keresztlétezik.

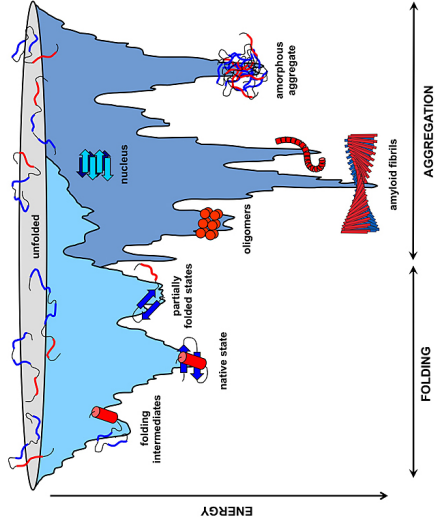
A tranziens állapot vizsgálata Φ érték analízissel



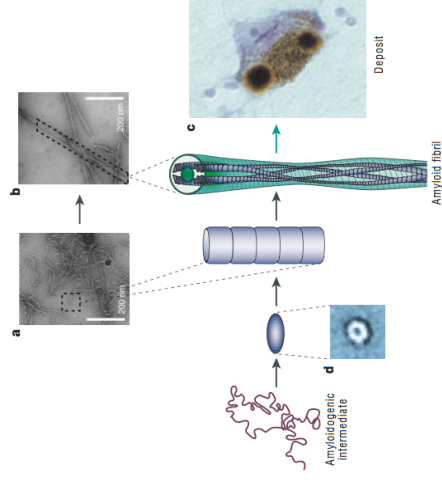
A tranziens állapot vizsgálata Φ érték analízissel



Fehérje gombolyodás és aggregáció



Amyloid plak kialakulása

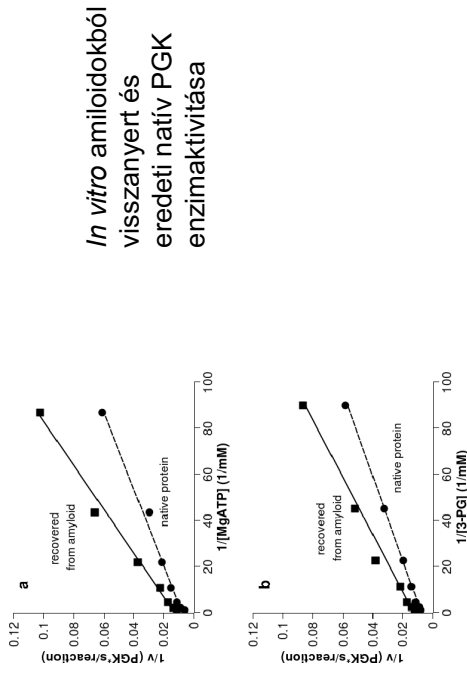


Amiloid

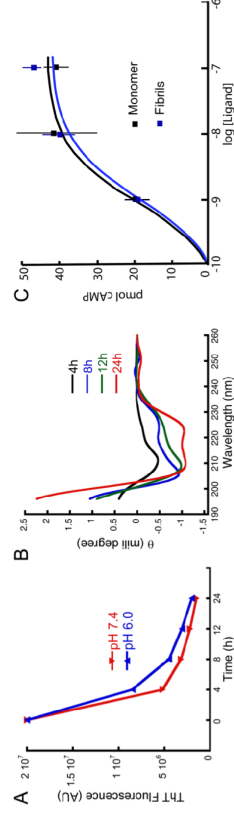
Az amiloid elnevezést Rudolph Virchow vezette be 1854-ben, miután megfigyelte, hogy az agyban előforduló viaszos állagú abnormális képletek jódal – a keményítőhöz hasonlóan – kékre festődnek (amylum latinul keményítőt jelent).

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

Előfordul, hogy aktív fehérje nyerhető vissza amiloidból



Funkcionális amiloid szerkezetek



Humán corticotropin releasing factor tárolódása amiloid szerkezetben.

Amiloid 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	Transthyretin	
Diabetes type II	Amylin	
Hemodialysis-associated amyloidosis	β_2 -microglobulin	
Familial systemic amyloidosis	Lysozyme mutant	
Huntington's disease	Huntingtin	Huntingtin inclusion
Parkinson's disease	α -synuclein	Lewy body
CJD, other prion diseases	PrP ^{Sc}	Prion aggregate
Taupathies, Pick disease, FTDP-17	Tau protein	PHF, Pick-body

Amyloidosis-related diseases

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

organ-specific deposition: neurodegeneration, dementia, movement disorder

About amyloid structure

many two-tailed disease mechanism
protein / peptide
systemic / tissue-specific
young / old
hereditary / sporadic
familial / non-familial
low molecular weight / high molecular weight
in vivo functional role
in vitro disease mechanism not clear from protein

Protein destabilization leads to amyloid formation

destabilization causes:

- fragmentation
- mutation
- evolutionary change
- increased concentration

Amiloidok és prekursor fehérjék

Table 1. Amyloid fibril proteins and their precursors in humans.*

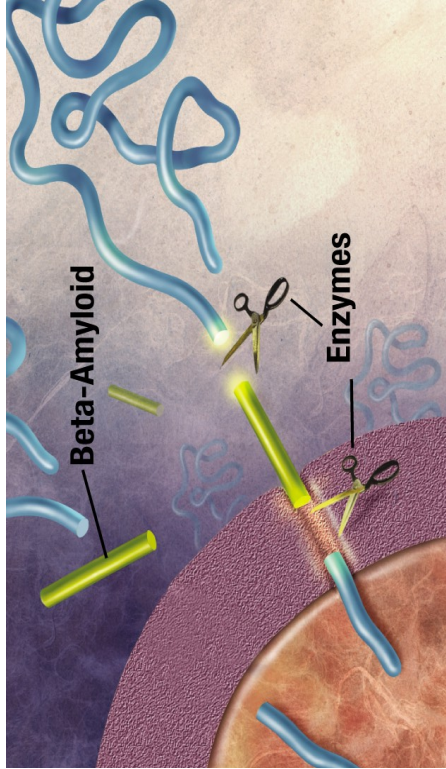
Amyloid protein	Precursor	Systemic (S) or localized, organ restricted (L)		Syndrome or involved tissues
		S, L	L	
AL	Immunoglobulin light chain		S, L	Primary
AI	Immunoglobulin heavy chain		S, L	Myeloma-associated
A β 2M	I β -microglobulin	S		Myeloma-associated
AT	T β -microglobulin	L		Hereditary
ATTR	Transthyretin	S		Hereditary
AA	(Apo)serum AA	L		Secondary, reactive
ApoA1	ApoA1	S		Hereditary
ApoAII	ApoAII	S		Hereditary
ApoAIV	ApoAIV	S		Hereditary
AGel	Gelsolin	S		Hereditary
AAL	AA1	S		Hereditary
AFB	AFB	S		Hereditary
ACys	Cystatin C	S		Hereditary
ABr	ABr	S		Hereditary
ADa	ADa	S		Hereditary
ADa2	ADa2	S		Hereditary
ADa3	ADa3	S		Hereditary
ADa4	ADa4	S		Hereditary
ADa5	ADa5	S		Hereditary
ADa6	ADa6	S		Hereditary
ADa7	ADa7	S		Hereditary
ADa8	ADa8	S		Hereditary
ADa9	ADa9	S		Hereditary
ADa10	ADa10	S		Hereditary
ADa11	ADa11	S		Hereditary
ADa12	ADa12	S		Hereditary
ADa13	ADa13	S		Hereditary
ADa14	ADa14	S		Hereditary
ADa15	ADa15	S		Hereditary
ADa16	ADa16	S		Hereditary
ADa17	ADa17	S		Hereditary
ADa18	ADa18	S		Hereditary
ADa19	ADa19	S		Hereditary
ADa20	ADa20	S		Hereditary
ADa21	ADa21	S		Hereditary
ADa22	ADa22	S		Hereditary
ADa23	ADa23	S		Hereditary
ADa24	ADa24	S		Hereditary
ADa25	ADa25	S		Hereditary
ADa26	ADa26	S		Hereditary
ADa27	ADa27	S		Hereditary
ADa28	ADa28	S		Hereditary
ADa29	ADa29	S		Hereditary
ADa30	ADa30	S		Hereditary
ADa31	ADa31	S		Hereditary
ADa32	ADa32	S		Hereditary
ADa33	ADa33	S		Hereditary
ADa34	ADa34	S		Hereditary
ADa35	ADa35	S		Hereditary
ADa36	ADa36	S		Hereditary
ADa37	ADa37	S		Hereditary
ADa38	ADa38	S		Hereditary
ADa39	ADa39	S		Hereditary
ADa40	ADa40	S		Hereditary
ADa41	ADa41	S		Hereditary
ADa42	ADa42	S		Hereditary
ADa43	ADa43	S		Hereditary
ADa44	ADa44	S		Hereditary
ADa45	ADa45	S		Hereditary
ADa46	ADa46	S		Hereditary
ADa47	ADa47	S		Hereditary
ADa48	ADa48	S		Hereditary
ADa49	ADa49	S		Hereditary
ADa50	ADa50	S		Hereditary
ADa51	ADa51	S		Hereditary
ADa52	ADa52	S		Hereditary
ADa53	ADa53	S		Hereditary
ADa54	ADa54	S		Hereditary
ADa55	ADa55	S		Hereditary
ADa56	ADa56	S		Hereditary
ADa57	ADa57	S		Hereditary
ADa58	ADa58	S		Hereditary
ADa59	ADa59	S		Hereditary
ADa60	ADa60	S		Hereditary
ADa61	ADa61	S		Hereditary
ADa62	ADa62	S		Hereditary
ADa63	ADa63	S		Hereditary
ADa64	ADa64	S		Hereditary
ADa65	ADa65	S		Hereditary
ADa66	ADa66	S		Hereditary
ADa67	ADa67	S		Hereditary
ADa68	ADa68	S		Hereditary
ADa69	ADa69	S		Hereditary
ADa70	ADa70	S		Hereditary
ADa71	ADa71	S		Hereditary
ADa72	ADa72	S		Hereditary
ADa73	ADa73	S		Hereditary
ADa74	ADa74	S		Hereditary
ADa75	ADa75	S		Hereditary
ADa76	ADa76	S		Hereditary
ADa77	ADa77	S		Hereditary
ADa78	ADa78	S		Hereditary
ADa79	ADa79	S		Hereditary
ADa80	ADa80	S		Hereditary
ADa81	ADa81	S		Hereditary
ADa82	ADa82	S		Hereditary
ADa83	ADa83	S		Hereditary
ADa84	ADa84	S		Hereditary
ADa85	ADa85	S		Hereditary
ADa86	ADa86	S		Hereditary
ADa87	ADa87	S		Hereditary
ADa88	ADa88	S		Hereditary
ADa89	ADa89	S		Hereditary
ADa90	ADa90	S		Hereditary
ADa91	ADa91	S		Hereditary
ADa92	ADa92	S		Hereditary
ADa93	ADa93	S		Hereditary
ADa94	ADa94	S		Hereditary
ADa95	ADa95	S		Hereditary
ADa96	ADa96	S		Hereditary
ADa97	ADa97	S		Hereditary
ADa98	ADa98	S		Hereditary
ADa99	ADa99	S		Hereditary
ADa100	ADa100	S		Hereditary

*Proteins are listed, when possible, according to relationship. Thus, apolipoproteins are grouped together, as are polypeptide hormones.

¹ADa1 causes frontotemporal dementia.

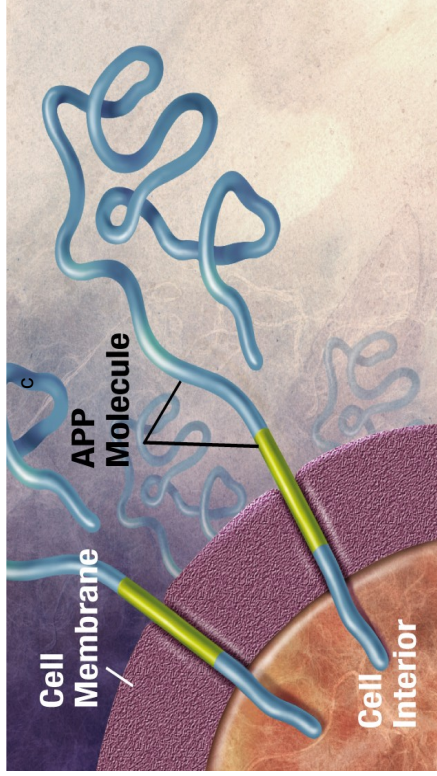
²Also called 'amylin'.

Alzheimer kór, β amiloid plakkok kialakulása *in vivo*



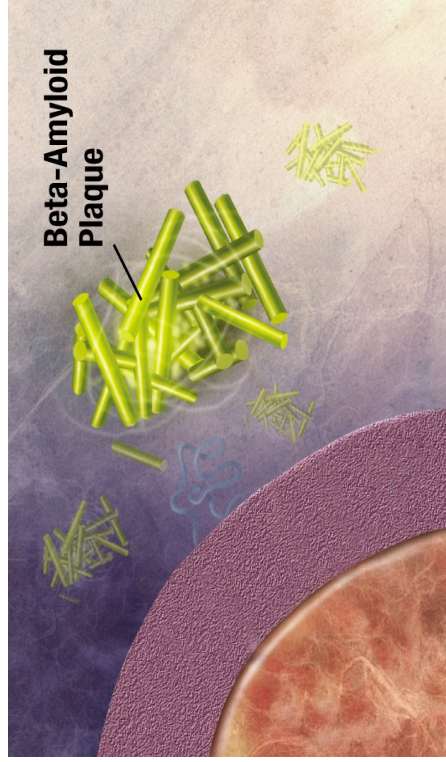
Enzimek elvágják az amyloid prekursor proteint β -amiloid fehérjét termelve.

Alzheimer kór, β amiloid plakkok kialakulása *in vivo*



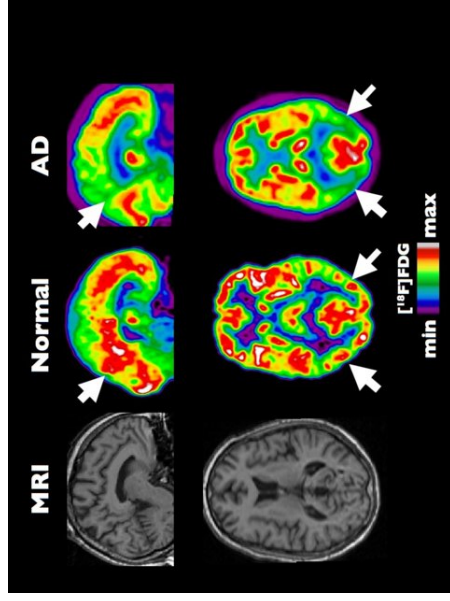
Az amyloid prekursor protein az agysejthez köt.

Alzheimer kór, β amiloid plakkok kialakulása *in vivo*



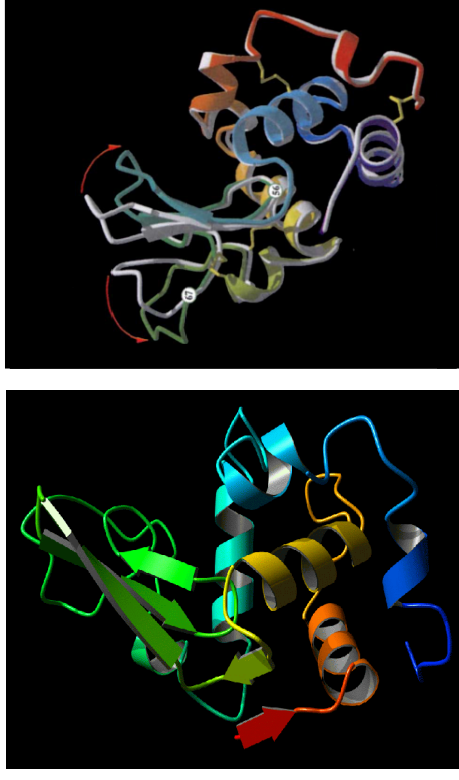
Az amyloid prekursor protein aggregálódik.

Alzheimer kór, β amiloid plakkok kialakulása *in vivo*



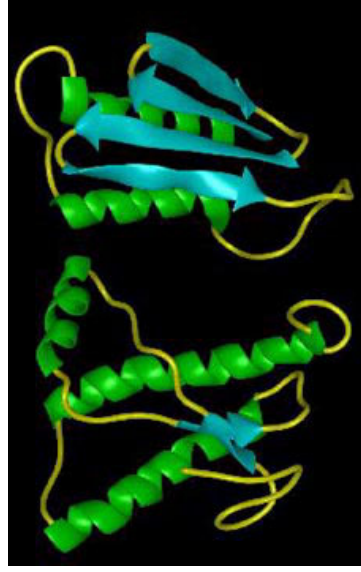
Egészséges és Alzheimer kóros ember agyi aktivitása PET képen.

Örökletes álmatlanság, lizozim amiloid plakkok *in vivo*



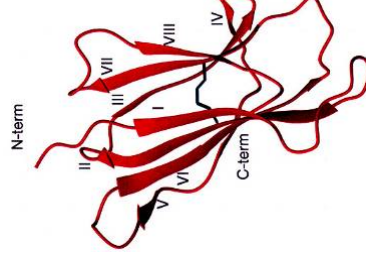
A mutáció által destabilizált lizozim amiloid szerkezetekbe aggregálódik.

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



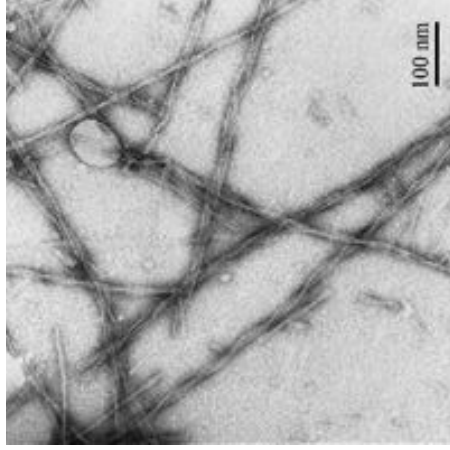
PrP^C és PrP^{Sc} szerkezete

β_2 mikroglobulin



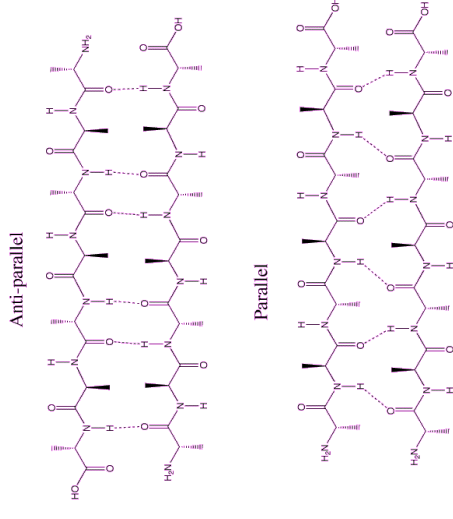
A β_2 mikroglobulin a dialízishez kapcsolódó amyloidózisban rakódik le.

Amyloid szálak szerkezete



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

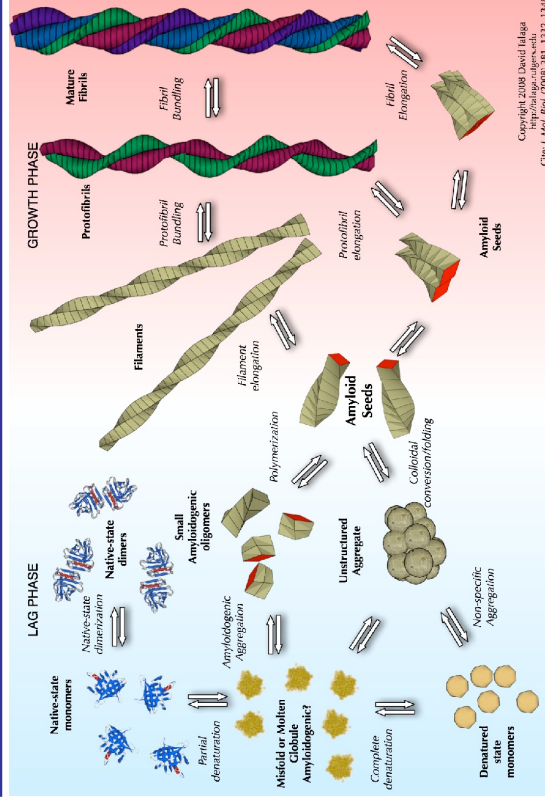
Fehérjék polimerizációs csapdája



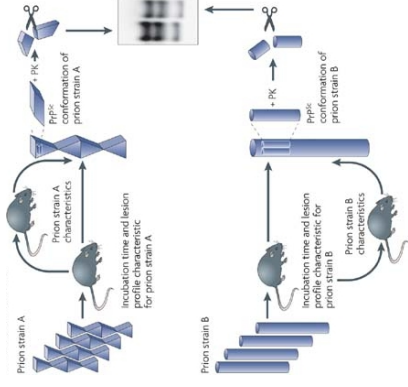
Amyloid plak szerkezeti hierarchiája

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

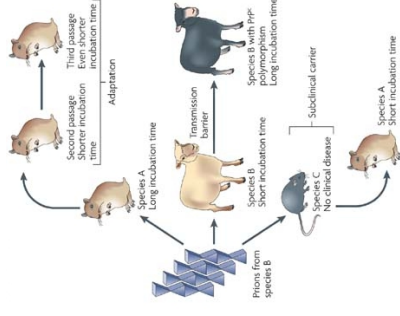
Amyloid szálak növekedése



Prion szerkezeti „törzsek”



Fajok közötti „gát”



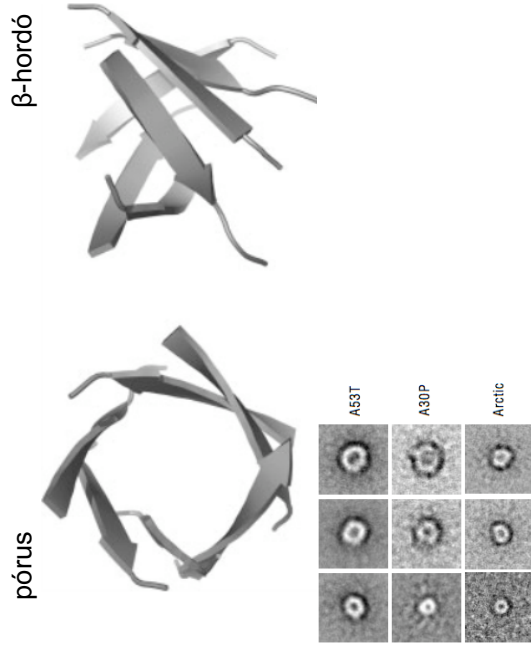
Aamiloid oligomerek

az amiloid fibrillumok kialakulása felé vezető aggregált szerkezetek

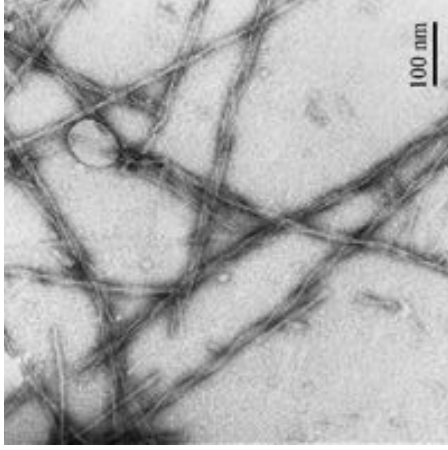
valószínűleg toxikusabbak, mint az amiloid plakkok

eltérő fehérjékből keletkezett oligomerek szerkezete hasonló, hasonló hatásmechanizmusra utalva

Aamiloid oligomerek szerkezete

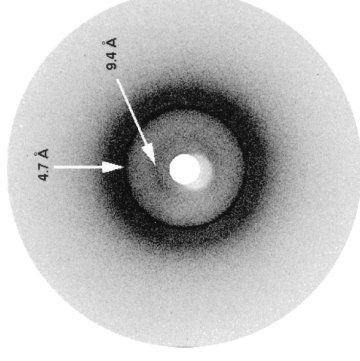


Amiloid szálak kimutatása, elektronmikroszkópia



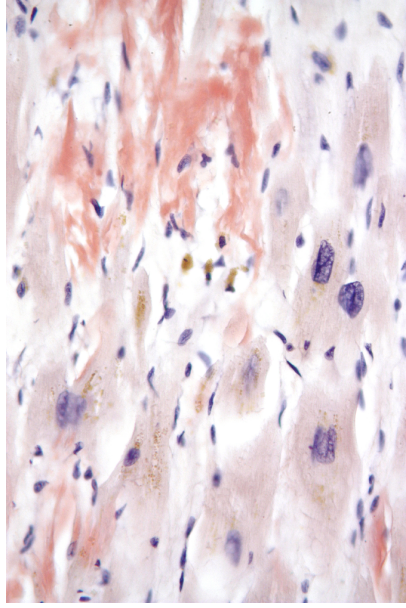
foszfatidilinozitol 3-kináz
SH3 doménből *in vitro*
növesztett amiloid
szálak transzmissziós
elektronmikroszkóppal
készített képe

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

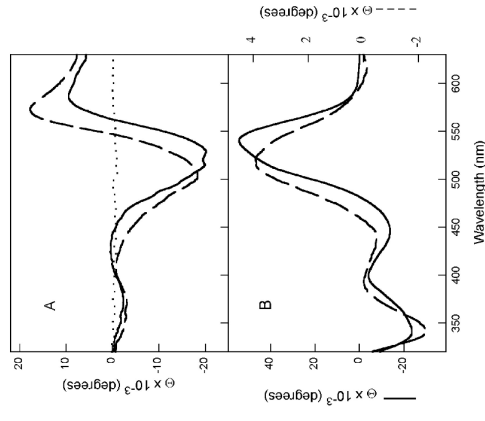


Amiloid plakkok kimutatása Kongó vörös festéssel szívizom szövetben

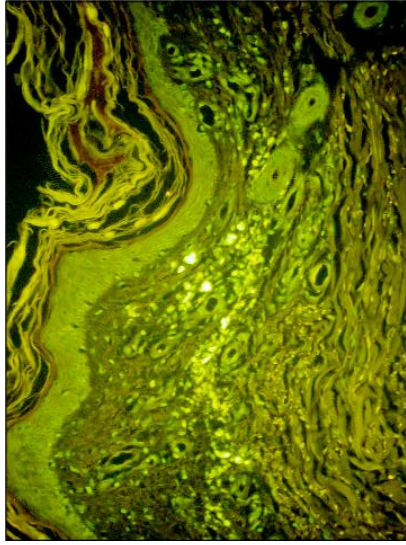
Amiloidok kimutatása, Kongó vörös kettőtörés

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

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

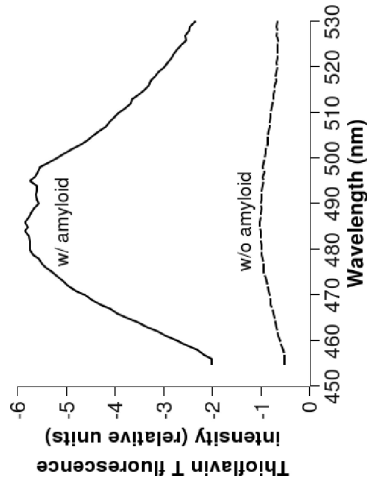


Amiloidok kimutatása, Thioflavin t festés



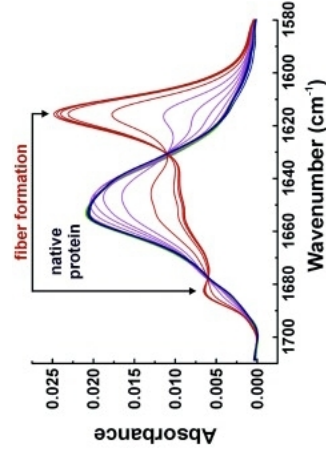
Amiloid lerakódások kimutatása a bőrben
Thioflavin t festéssel

Amiloidok kimutatása, Thioflavin t fluoreszcencia



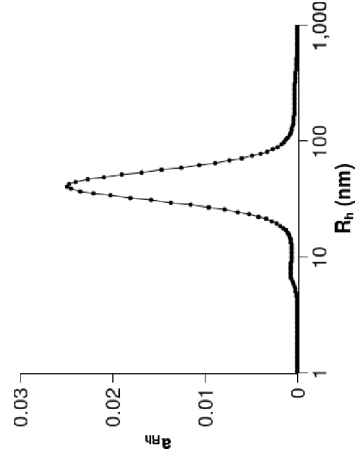
Thioflavin t fluoreszcencia emisszió PGK
amiloid szálak jelenlétében és nélkülük

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