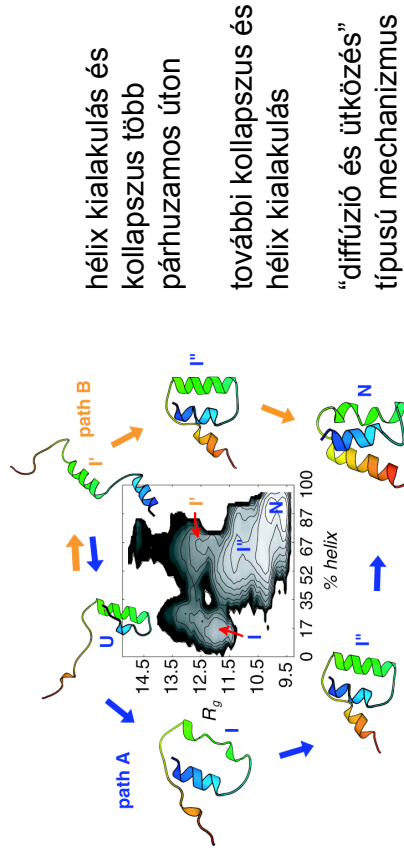


Fehérjék szerkezetének kialakulása II

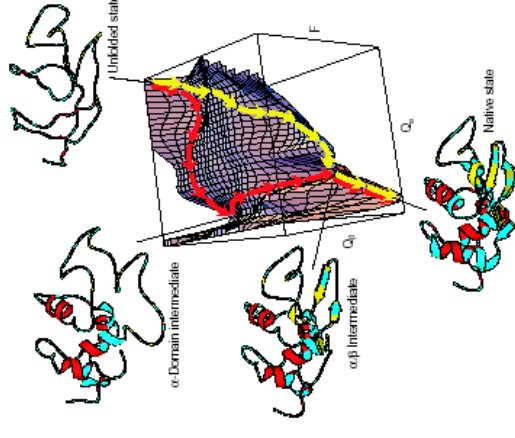
Osváth Szabolcs

Semmelweis Egyetem
szabolcs.osvath@eok.sote.hu

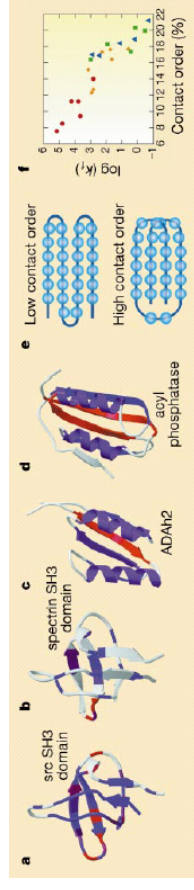
Egy kis fehérje gombolyodása több párhuzamos úton



Lizozim gombolyodásának energiefelvezetése

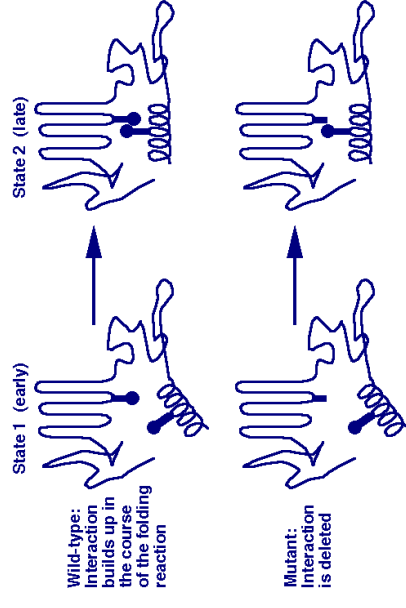


A natív szerkezet hatása a gombolyodás kinetikájára

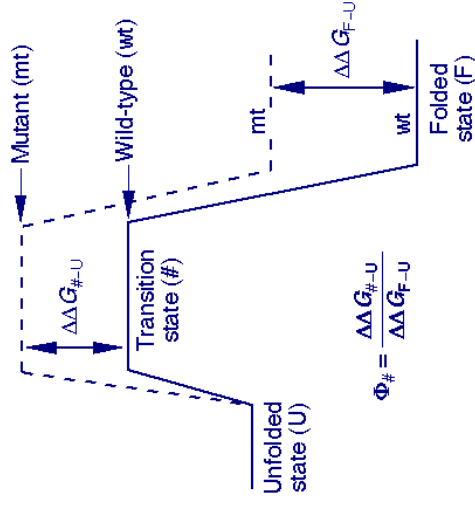


A kisebb kontaktus rendű szerkezetek gyorsabban gombolyodnak, mint a magasabb kontaktus rendűek. A korreláció a natív kontaktusok átlagos távolsága és gombolyodás sebessége között 6 nagyságrenddel keresztlől fennáll.

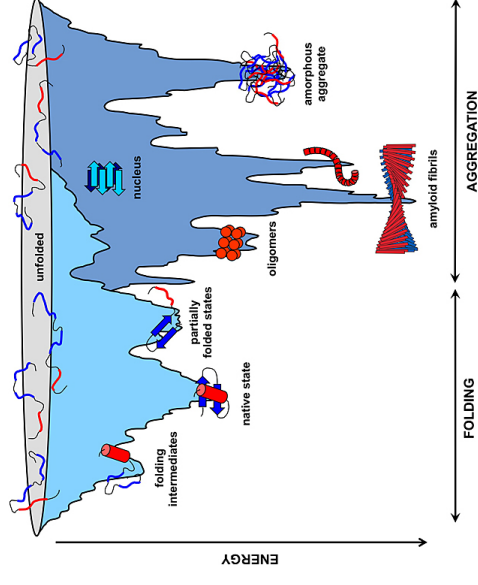
A tranziens állapot vizsgálata Φ érték analízissel



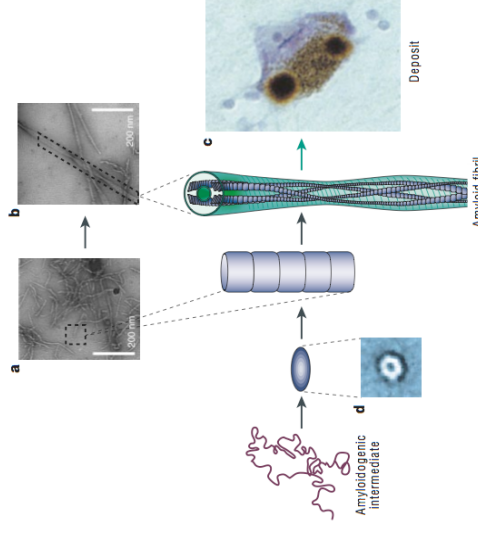
A tranziens állapot vizsgálata Φ érték analízissel



Fehérje gombolyodás és aggregáció



Aamiloid plakk kialakulása

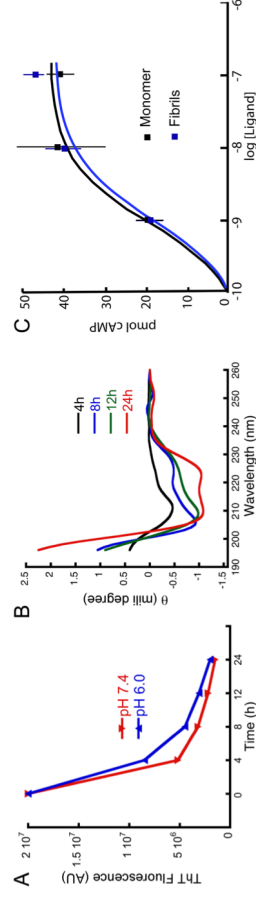


Amyloid

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

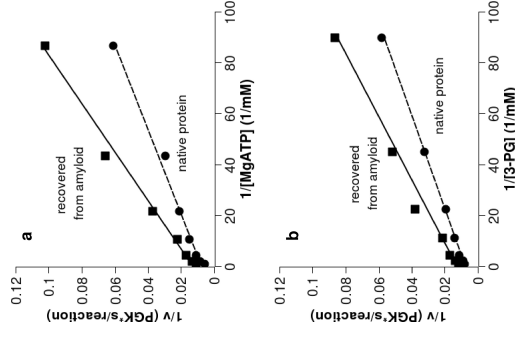
1859-ben Nicolaus Friedreich és August Kekulé vizsgálatai bebizonyították, hogy valójában fehérjéből áll.

Funkcionális amyloid szerkezetek



Humán corticotropin releasing factor tárolódása amyloid szerkezetben.

Előfordul, hogy aktív fehérje nyerhető vissza amyloidból



In vitro amyloidokból visszanyert és eredeti natív PGK enzimaktivitása

Amyloid oligomerek szerkezete

18. sz.

1920 Creutzfeldt-Jakob kór első leírása
1939 a sűrűlőr fertőző
1954 sűrűlőr: „lassú vírus”
1959 kuru, Creutzfeldt-Jakob kór, sűrűlőr hasonlóan
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"

Amiloidózissal járó betegségek

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	
Huntingon'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

Az amiloid szerkezetekről

mintegy két tucat betegség velejárója
 fehérje / peptid
 szisztémás / szövetspecifikus
 fiatalon / idős korban
 örökletes / sporadikus
 elsődleges / másodlagos
 alig kimutatható / kilogrammnyi mennyiségben
in vivo funkcionális szerepe lehet
in vitro betegséghez nem köthető fehérjéből is

Amiloidózissal járó betegségek tünetei

szisztémás amiloidózis: szervi (szív, vese, máj) elégtelenség

szövet specifikus lerakódás: neurodegeneráció, demencia, mozgás koordinálatlanság

A fehérje destabilizációja vezet az amiloid képződéshez

destabilizáció oka:

- fragmentálódás
- mutáció
- evolúciós változás
- megnövekedett koncentráció

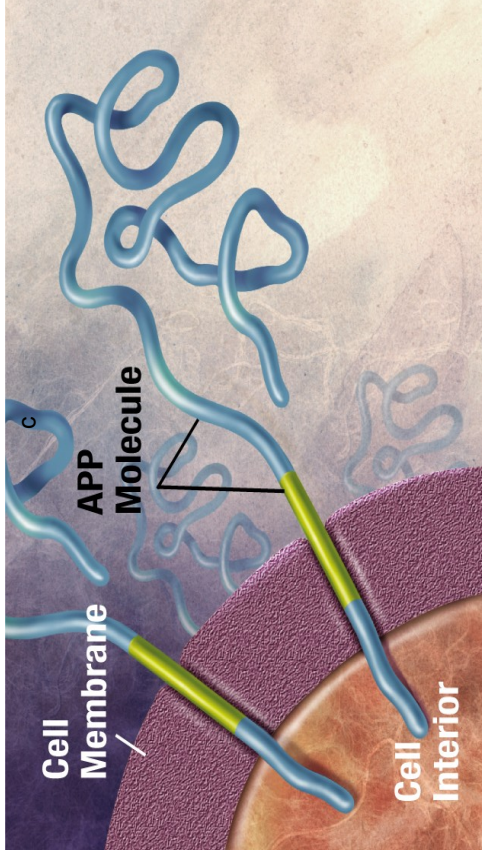
Amiloidok és prekursor fehérjék

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

Amyloid protein	Precursor	Systemic (S) or localized, organ restricted (L)	Syndrome or involved tissues
AL	Immunoglobulin light chain	S, L	Primary
AH	Immunoglobulin heavy chain	S, L	Myeloma-associated
A β -M	β_2 -microglobulin	S	Myeloma-associated
ATTR	Transthyretin	L ²	Hemodialysis-associated
AA	(Apo)serum AA	L ²	Senile systemic
ApoAII	Apolipoprotein AI	S	Tenosynovium
ApoAII	Apolipoprotein AII	L	Primary
ApoAIV	Apolipoprotein AIV	S	Secondary, reactive
AGel	Gelsolin	S	Primary
ALys	Lysosome	S	Aorta, pericardium
ACys	Cystine	S	Primary
ACys	Cystine	S	Primary
ABri	Abriap	S	Primary
ALect2	Leucocyte chemotactic factor 2	S	Primary
ADan*	ADan	L	Primary
A β	A β protein precursor (A β PP)	L	Primary
A β	A β protein precursor (A β PP)	L	Primary
ACul	Cul	L	Primary
AMAPP	Inter amyloid polypeptide**	L	Primary
AANF	Atrial natriuretic factor	L	Primary
APro	Protein	L	Primary
ALys	Lysine	L	Primary
AKer	Keratin	L	Primary
ALac	Lactoferrin	L	Primary
AOap	Osteopontin	L	Primary
ASem1	Semenogelin 1	L	Primary

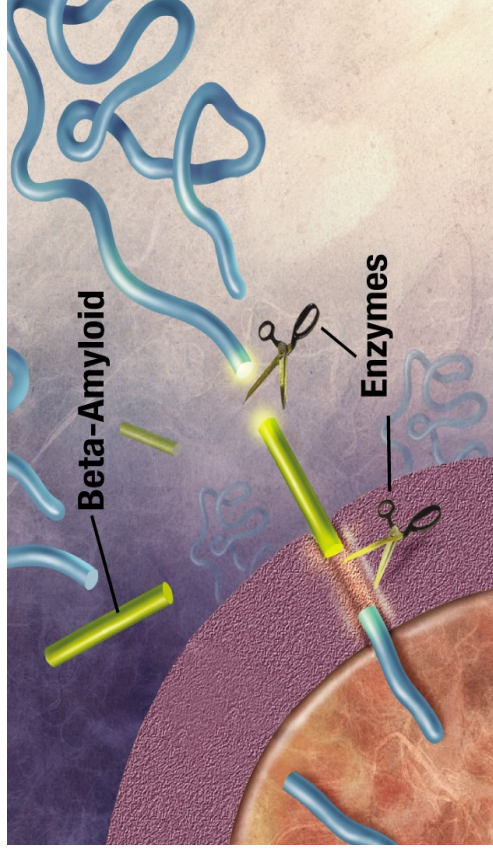
*Proteins are listed, when possible, according to relationship. Thus, apolipoproteins are grouped together, as are polypeptide hormones.
*ADan comes from the same gene as A β .
**Also called 'amylin'.

Alzheimer kór, β amiloid plakkok kialakulása *in vivo*



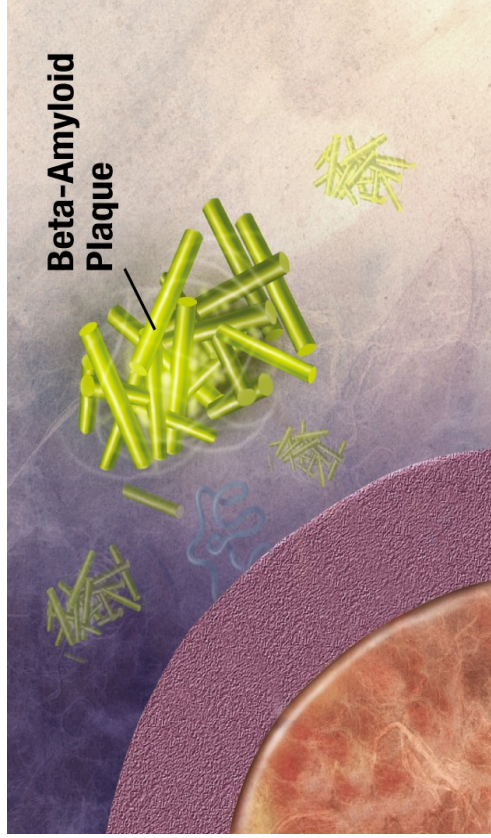
Az amyloid prekursor protein az agysejthez köt.

Alzheimer kór, β amiloid plakkok kialakulása *in vivo*



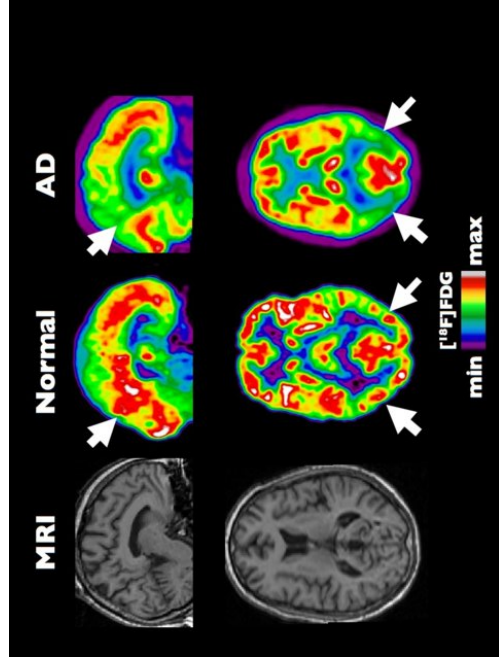
Enzimek elvágják az amyloid prekursor proteint β -amiloid fehérjét termelve.

Alzheimer kór, β amiloid plakkok kialakulása *in vivo*



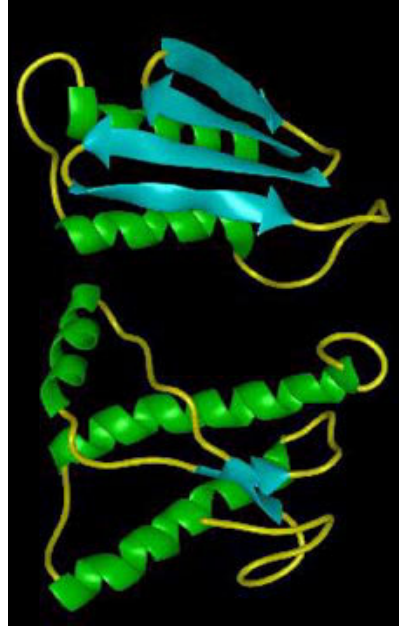
Az amyloid prekursor protein aggregálódik.

Alzheimer kór, β amiloid plakkok kialakulása *in vivo*



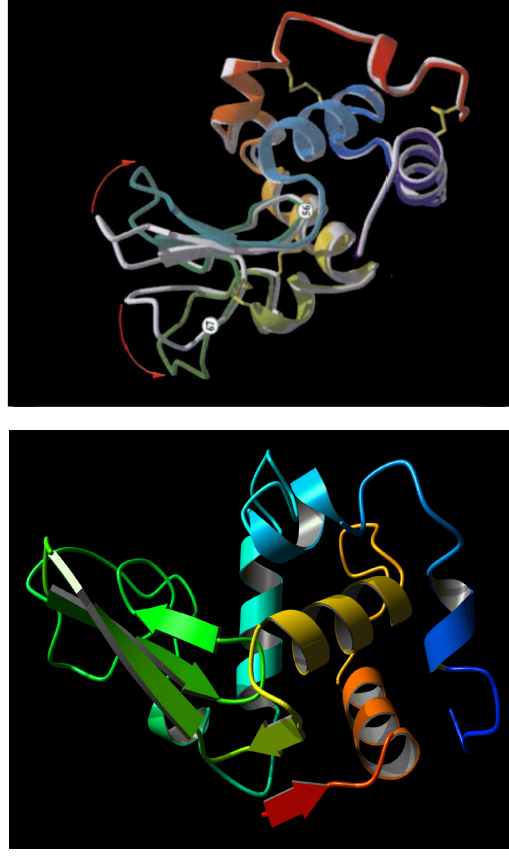
Egészséges és Alzheimer kóros ember agyi aktivitása PET képen.

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



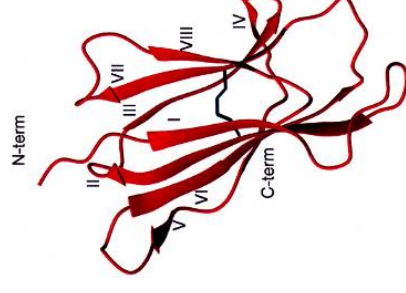
PrP^C és PrP^{Sc} szerkezete

Örökletes álmatlanság, lizozim amiloid plakkok *in vivo*



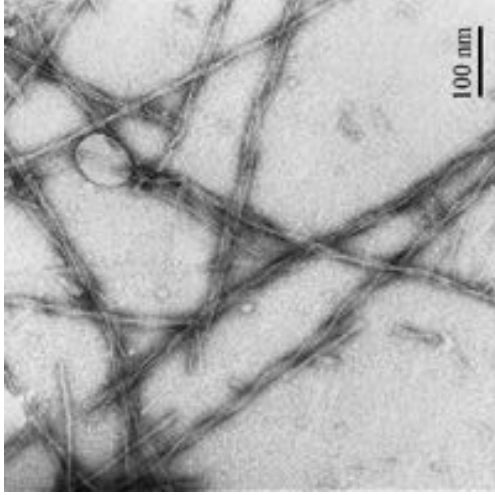
A mutáció által destabilizált lizozim amiloid szerkezetekbe aggregálódik.

β_2 mikroglobulin



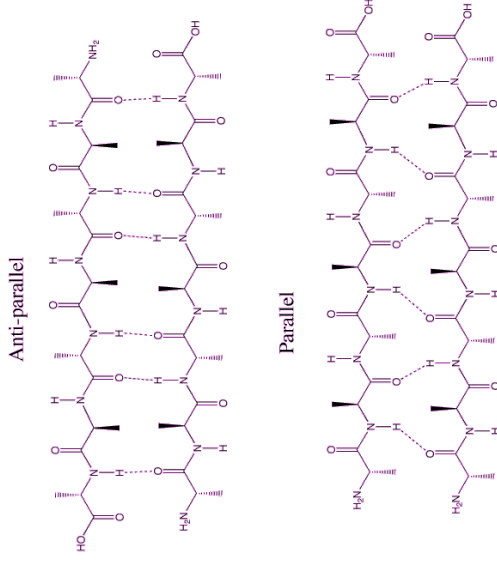
A β_2 mikroglobulin a dialízishez kapcsolódó amyloidózisban rakódik le.

Amyloid szálak szerkezete



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

Fehérjék polimerizációs csapdája



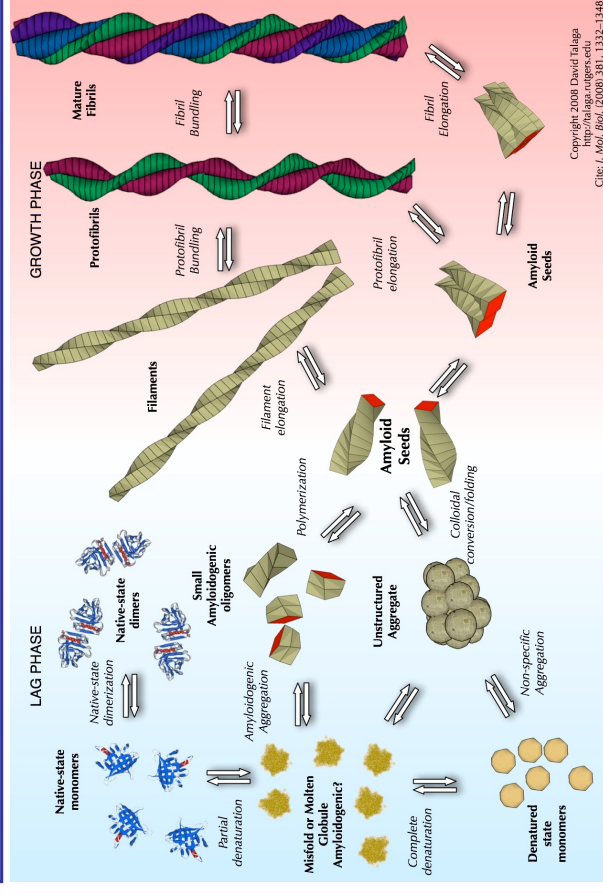
Amyloid plakk szerkezeti hierarchiája

β -redő kialakulása – hidrogén híd kötések

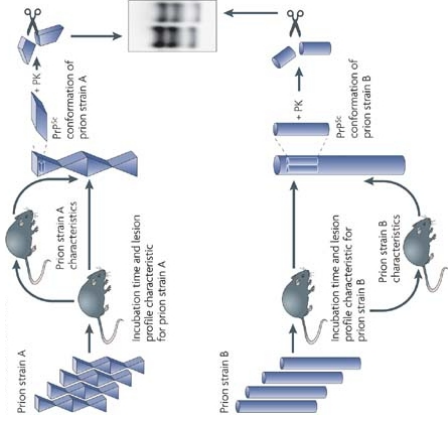
kereszt β -redős szerkezet – Van der Waals erők, „steric zipper”

szálak képződése – nem kovalens kötések

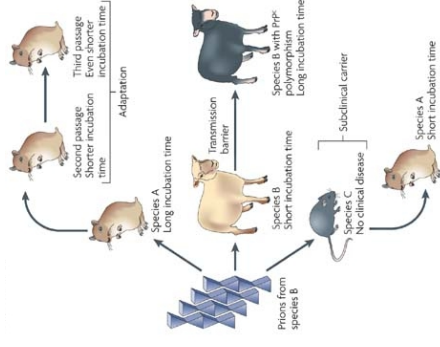
Amyloid szálak növekedése



Prion szerkezeti „törzsek”



Fajok közötti „gát”



Amyloid oligomerek

az amyloid fibrillumok kialakulása felé vezető aggregált szerkezetek

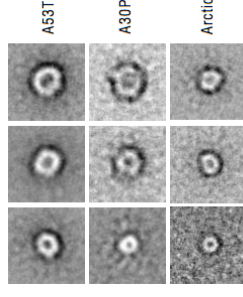
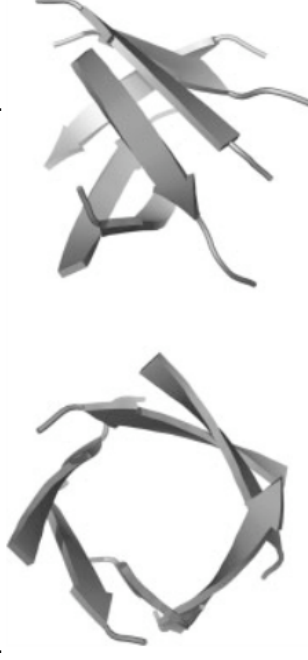
valószínűleg toxikusabbak, mint az amyloid plakkok

eltérő fehérjékből keletkezett oligomerek szerkezete hasonló, hasonló hatásmechanizmusra utalva

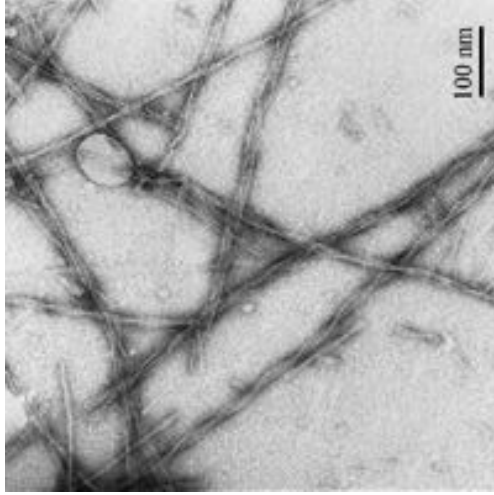
Amyloid oligomerek szerkezete

pórus

β -hordó

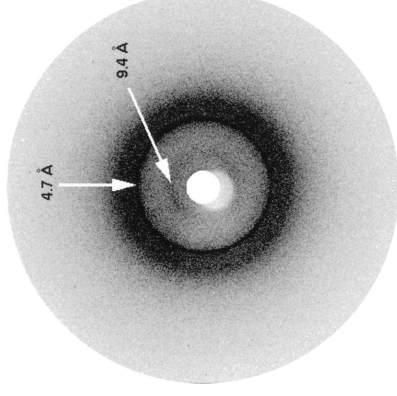


Amloid szálak kimutatása, elektronmikroszkópia



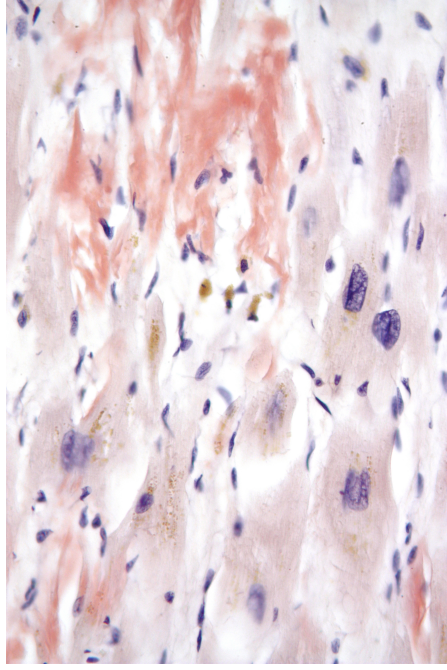
foszfatidilinozitol 3-kináz
SH3 doménből *in vitro*
növesztett amloid
szálak transzmissziós
elektronmikroszkóppal
készített képe

Amloid szálak kimutatása, kisszögű röntgen szórás



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

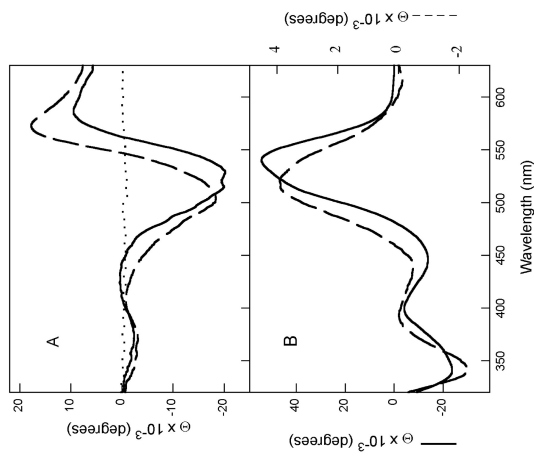
Amloidok kimutatása, Kongó vörös festés



Amloid plakkok kimutatása Kongó vörös festéssel szívizom szövetben

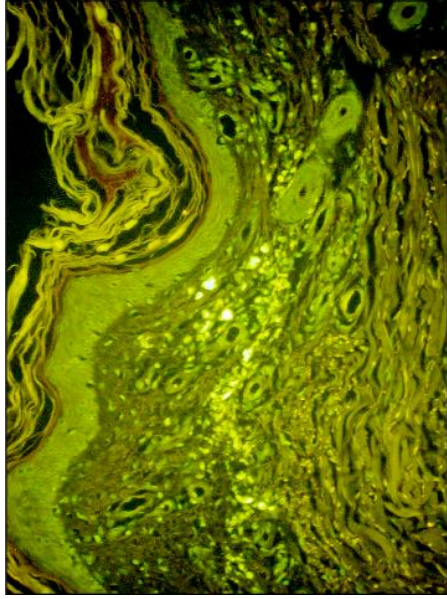
Amloidok kimutatása, Kongó vörös kettőtörés

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



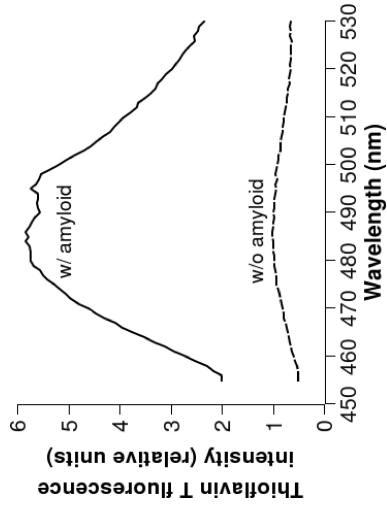
B) Kongó vörös kettőtörése
10 μ M natív inzulin vagy
10 μ M natív Ig light chain
(---) amloid jelenlétében

Amyloidok kimutatása, Thioflavin t festés



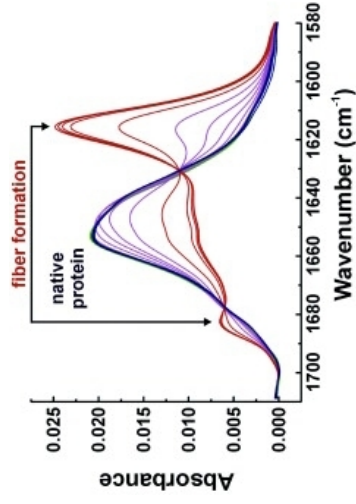
Amyloid lerakódások kimutatása a bőrben
Thioflavin t festéssel

Amyloidok kimutatása, Thioflavin t fluoreszcencia



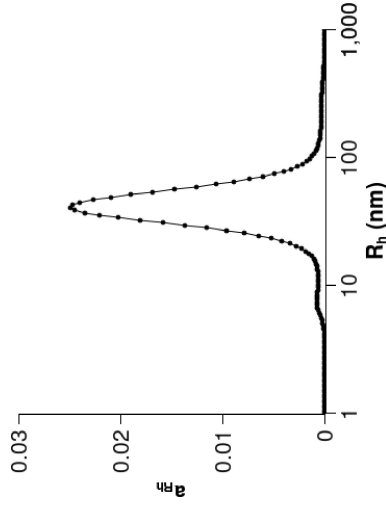
Thioflavin t fluoreszcencia emisszió PGK
amyloid szálak jelenlétében és nélkülük

Amyloid szálak kimutatása, infravörös abszorpció



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

Amyloid szálak méreteloszlása, dinamikus fényszórás



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