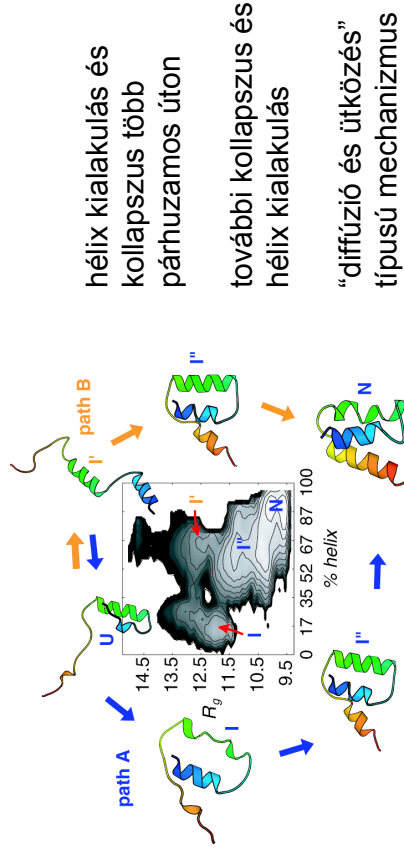


Fehérjék szerkezetének kialakulása II

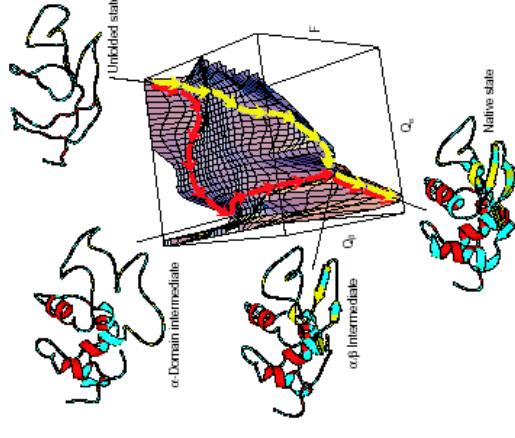
Osváth Szabolcs

Semmelweis Egyetem
szabolcs.osvath@eok.sote.hu

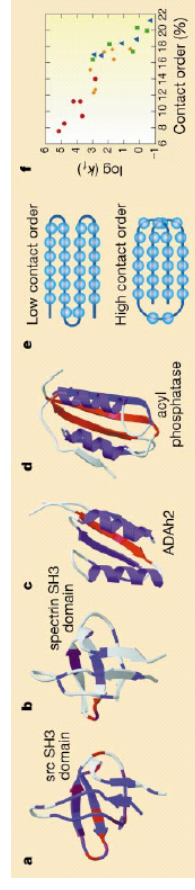
Egy kis fehérje gombolyodása több párhuzamos úton



Lizozim gombolyodásának energiefelzárkózása

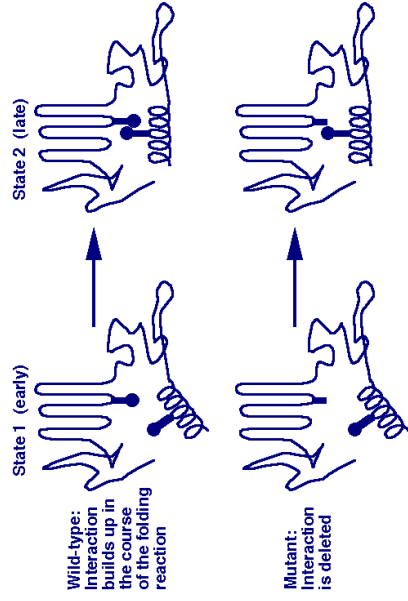


A natív szerkezet hatása a gombolyodás kinetikájára

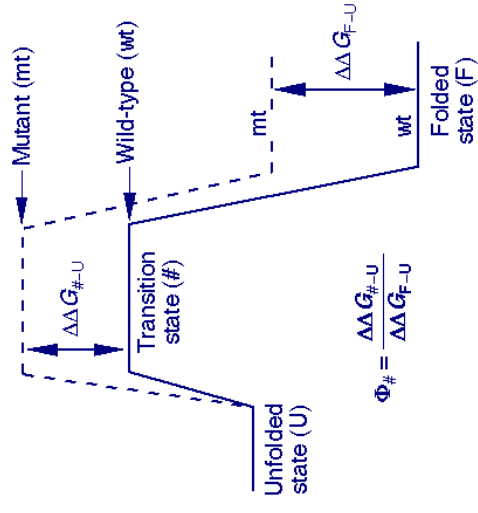


A kisebb kontaktus rendű szerkezetek gyorsabban gombolyodnak, mint a magasabb kontaktus rendűek. A korreláció a natív kontaktusok átlagos távolsága és gombolyodás sebessége között 6 nagyságrenddel keresztlétezik.

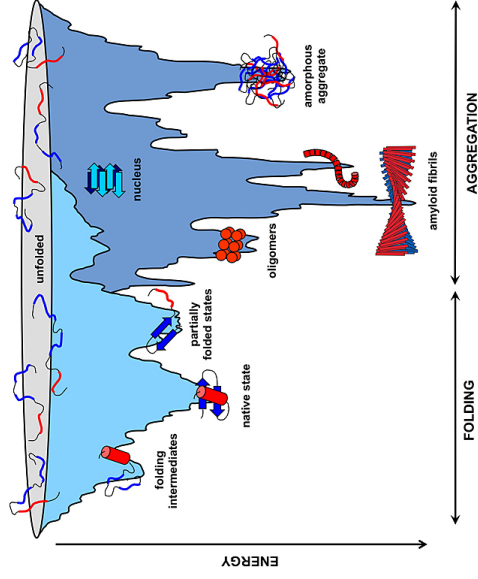
A tranziens állapot vizsgálata Φ érték analízissel



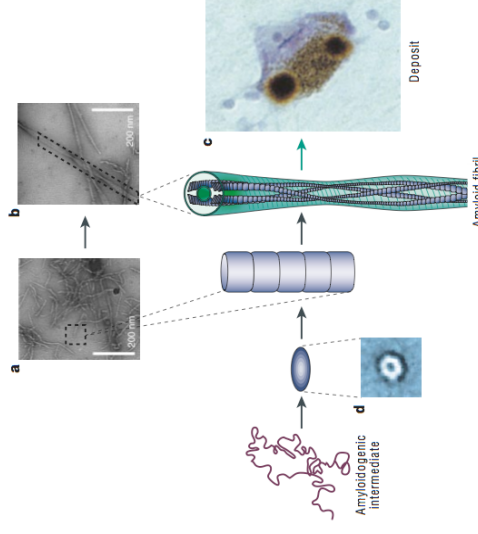
A tranziens állapot vizsgálata Φ érték analízissel



Fehérje gombolyodás és aggregáció



Aamiloid plakk kialakulása

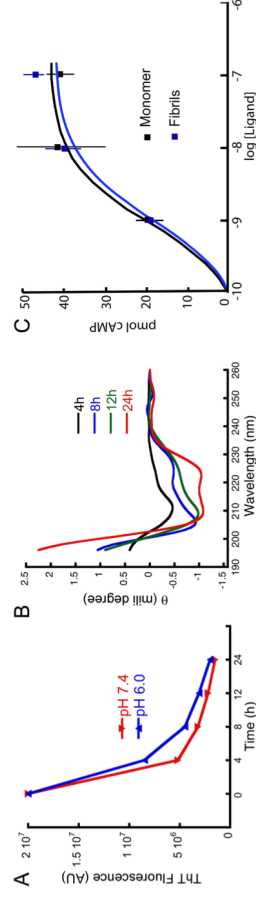


Amyloid

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).

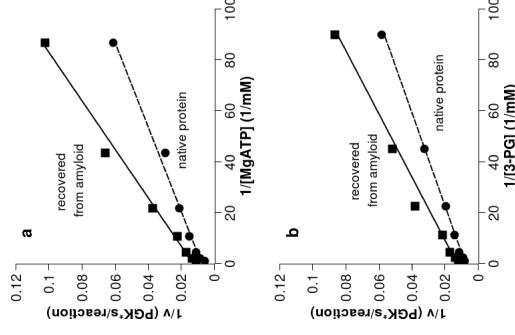
1859-ben Nicolaus Friedreich és August Kekulé vizsgálatai bebizonyították, hogy valójában fehérjéből áll.

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

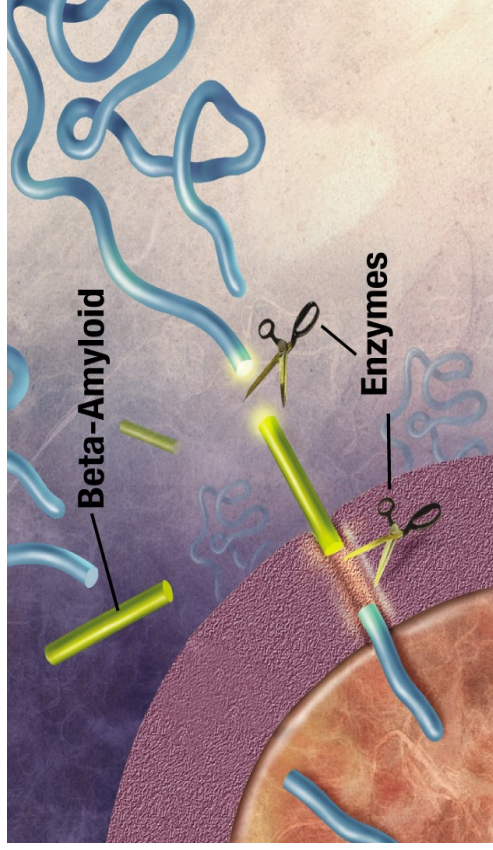
- fragmentálódás
- mutáció
- evolúciós változás
- megnövekedett koncentráció

Ailoidok és prekursor fehérjék

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

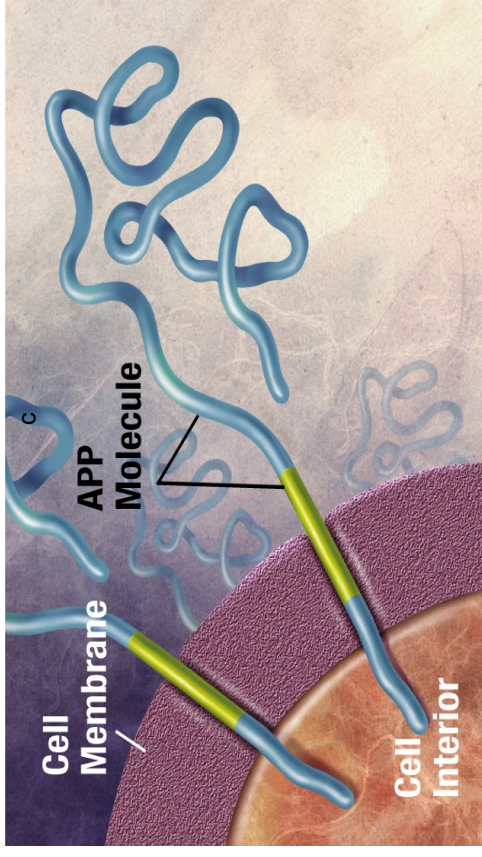
Anyfold protein	Precursor	Systemic (S) or localized, organ targeted (L)	Syndrome or involved tissues
AL	Immunoglobulin light chain	S, L	Primary
AH	Immunoglobulin heavy chain	S, L	Myeloma-associated
A β /M	β ₂ -microglobulin	S	Primary
ATTR	Transferrin	L2	Hereditary
		S	Hemodialysis-associated
		L2	Joint
		S	Cardiac
		L2	Senile systemic
AA	(Apo)serum AA	L2	Tenosynovium
AApoAI			Secondary, reactive
AApoAI	Apolipoprotein AI	L	Familial
AApoAII			Familial
AApoAIV	Apolipoprotein AIV	S	Sporadic, associated with aging
ACeI	Cholesterol	S	Familial (Finnish)
AF	Albumin	S	Familial
AFB	Fibrinogen α -chain	S	Familial
ACys	Cystatin C	S	Familial
ABn	ABrPP	S	Familial dementia, British
ALec2	Leukocyte chemotactic factor 2	S	Mainly kidney
ADan*	ADanP	L	Familial dementia, Danish
A β	A β protein precursor (A β PP)	L	Alzheimer's disease, aging
AP	Protein precursor	L	Synganglion encephalopathy
ACe	Cholesterol	L	Cardiovascular diseases
CA	Calcitonin	L	Idiopathic hypoparathyroidism
ADAPP	late amyloid polypeptide**	L	Islands of Langerhans
ANF	Atrial natriuretic factor	L	Cardiac atria
APro	Proctactin	L	Aging pituitary
			Proctinomas
Alns	Insulin	L	Idiopathic
AMed	Lactadherin	L	Hereditary
AKer	Kerato-epithelin	L	Senile keratosis, media
AL	Albumin	L	Cornea, lamellar
AOap	Oligomeric amyloidase-associated protein	L	Oligomeric tumors
ASem	Semaphorin 1	L	Vesicular seminals

Alzheimer kór, β amiloid plakkok kialakulása *in vivo*



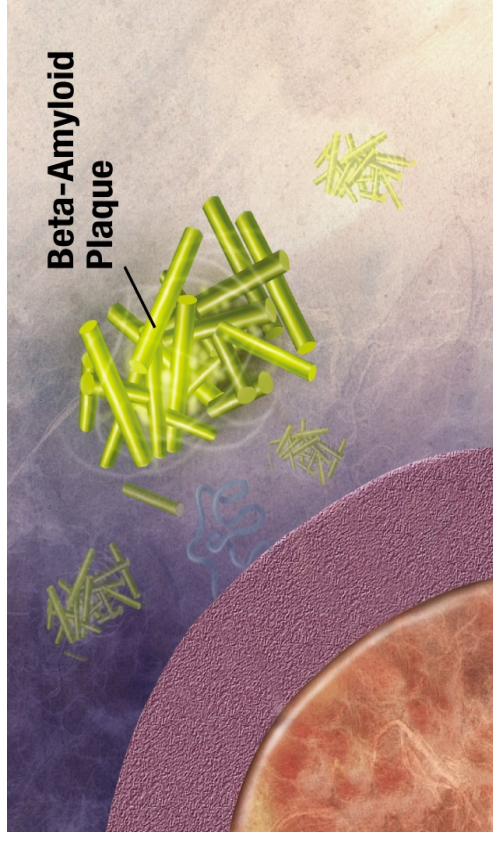
Enzimek elvágják az amyloid prekursor proteint β -amiloid fehérjét termelve.

Alzheimer kór, β amiloid plakkok kialakulása *in vivo*



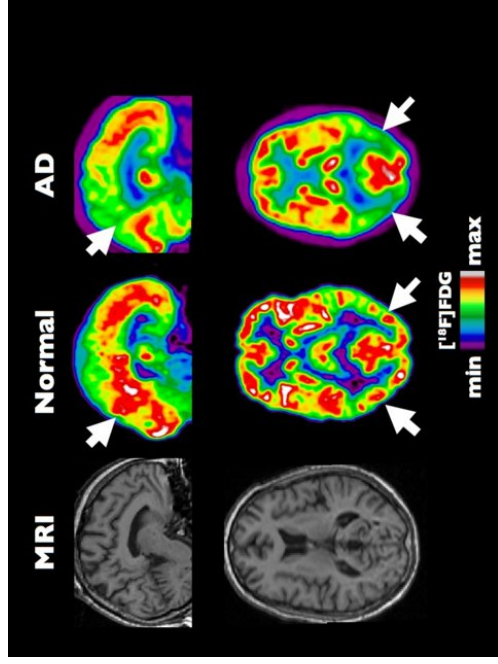
Az amyloid prekursor protein az agysejthez köt.

Alzheimer kór, β amiloid plakkok kialakulása *in vivo*



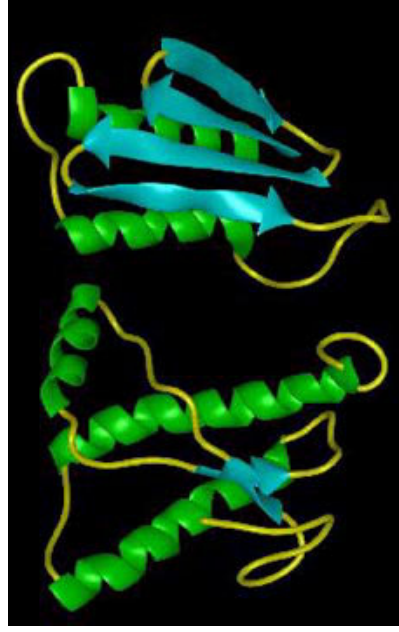
Az amyloid prekursor protein aggregálódik.

Alzheimer kór, β amiloid plakkok kialakulása *in vivo*



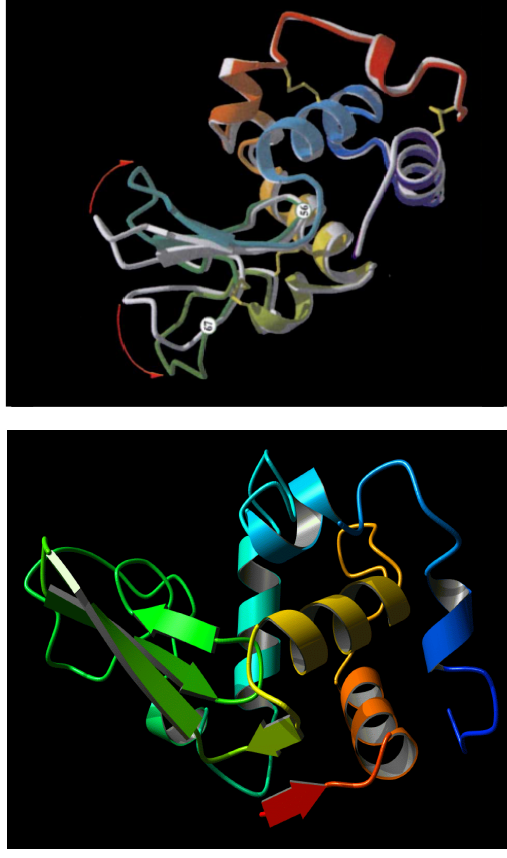
Egészséges és Alzheimer kóros ember agyi aktivitása PET képen.

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



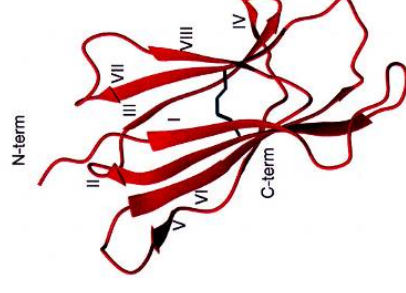
PrP^{C} és PrP^{Sc} szerkezete

Örökletes álmatlanság, lizozim amiloid plakkok *in vivo*



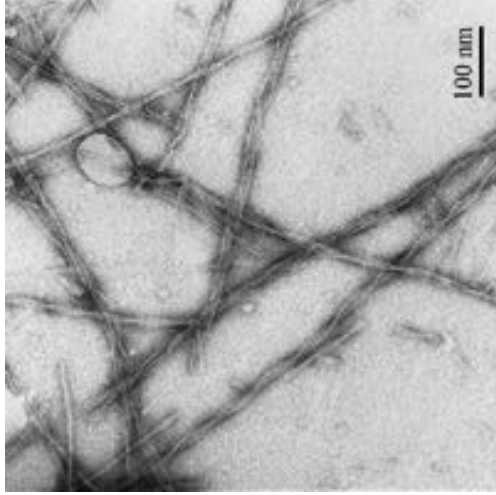
A mutáció által destabilizált lizozim amiloid szerkezetekbe aggregálódik.

β_2 mikroglobulin



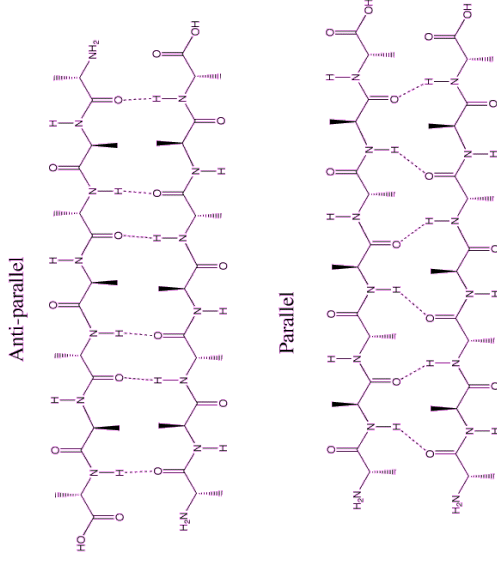
A β_2 mikroglobulin a dialízishez kapcsolódó amyloidózisban rakódik le.

Amyloid szálak szerkezete



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

Fehérjék polimerizációs csapdája



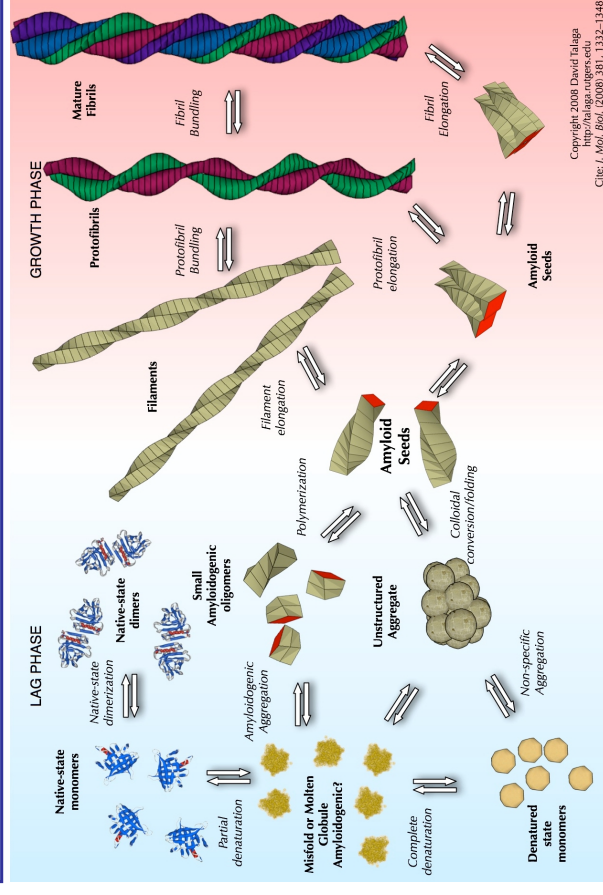
Amyloid plakk szerkezeti hierarchiája

β -redő kialakulása – hidrogén híd kötések

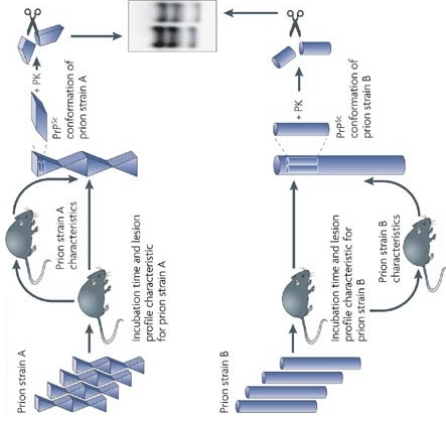
kereszt β -redős szerkezet – Van der Waals erők, „steric zipper”

szálak képződése – nem kovalens kötések

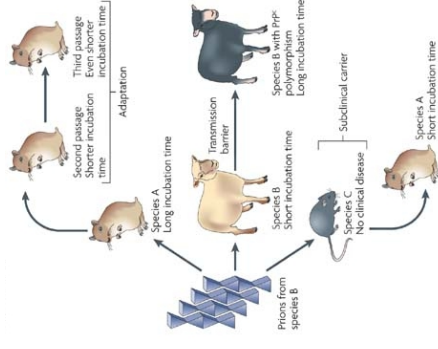
Amyloid szálak növekedése



Prion szerkezeti „törzsek”



Fajok közötti „gát”



Amiloid oligomerek

az amiloid fibrillumok kialakulása felé vezető aggregált szerkezetek

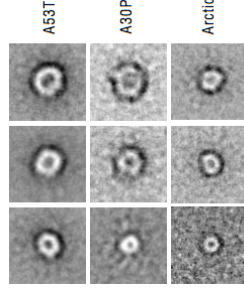
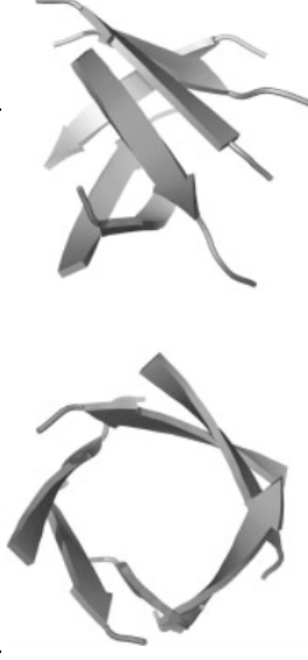
valószínűleg toxikusabbak, mint az amiloid plakkok

eltérő fehérjékből keletkezett oligomerek szerkezete hasonló, hasonló hatásmechanizmusra utalva

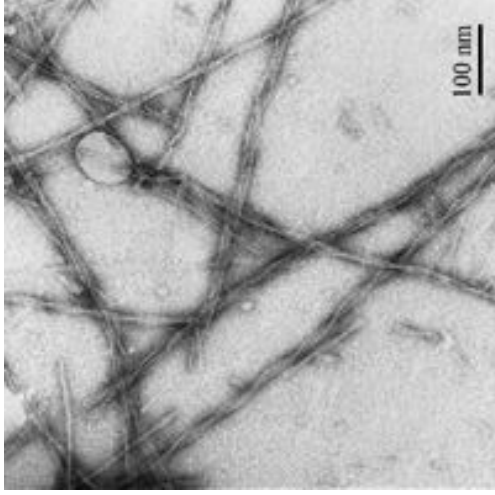
Amiloid oligomerek szerkezete

pórus

β -hordó

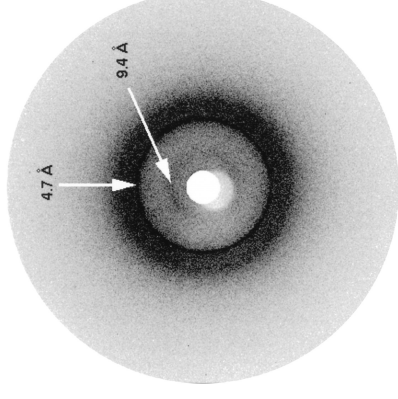


Amlloid szálak kimutatása, elektronmikroszkópia



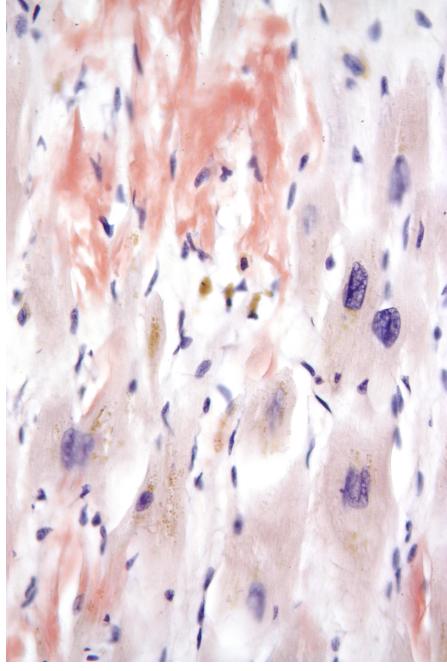
foszfatidilinozitol 3-kináz
SH3 doménből *in vitro*
növesztett amlloid
szálak transzmissziós
elektronmikroszkóppal
készített képe

Amlloid szálak kimutatása, kisszögű röntgen szórás



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

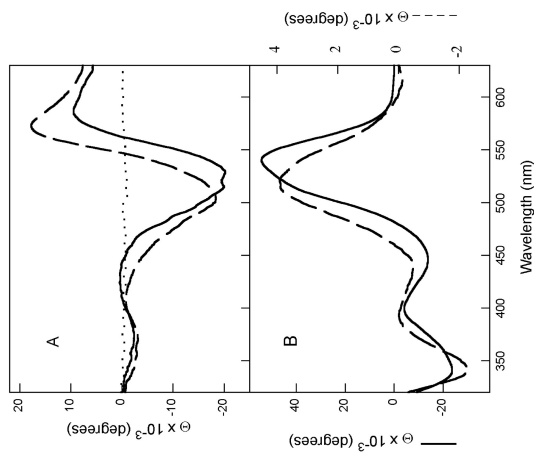
Amlloidok kimutatása, Kongó vörös festés



Amlloid plakkok kimutatása Kongó vörös festéssel szívizom szövetben

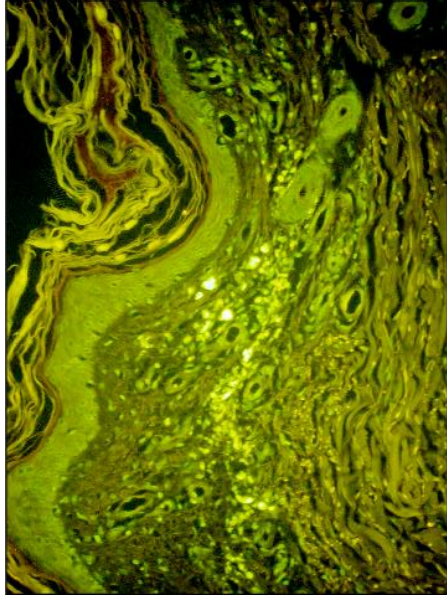
Amlloidok kimutatása, Kongó vörös kettőtörés

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



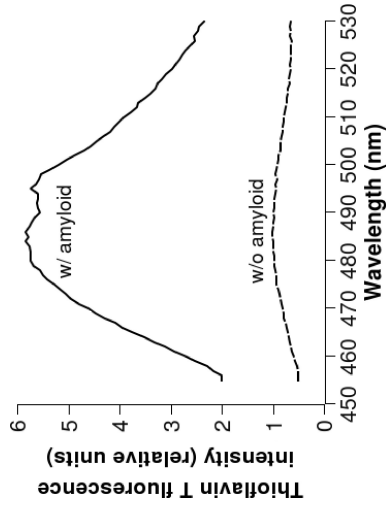
B) Kongó vörös kettőtörése
10 μM natív inzulin vagy
10μM natív Ig light chain
(---) amlloid jelenlétében

Amiloidok kimutatása, Thioflavin t festés



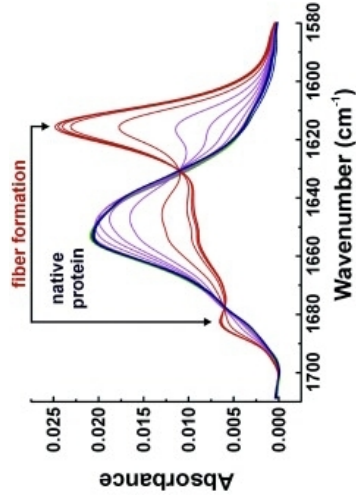
Amiloid lerakódások kimutatása a bőrben
Thioflavin t festéssel

Amiloidok kimutatása, Thioflavin t fluoreszcencia



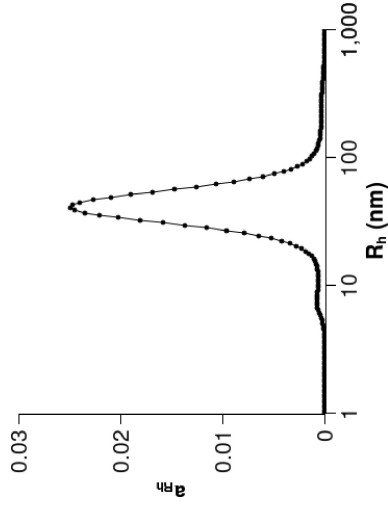
Thioflavin t fluoreszcencia emisszió PGK
amiloid szálak jelenlétében és nélkülük

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