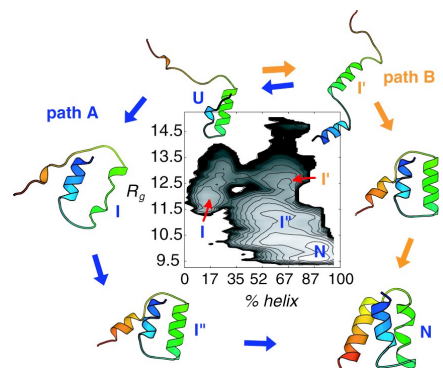


Fehérjék szerkezetének kialakulása II

Osváth Szabolcs

Semmelweis Egyetem

Egy kis fehérje gombolyodása több párhuzamos úton



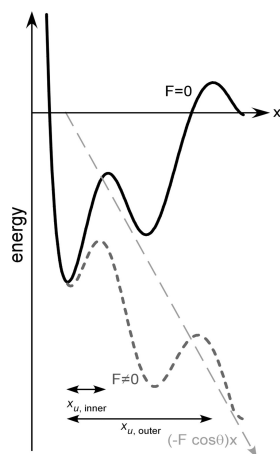
hélix kialakulás és
kollapszus több
párhuzamos úton

további kollapszus és
hélix kialakulás

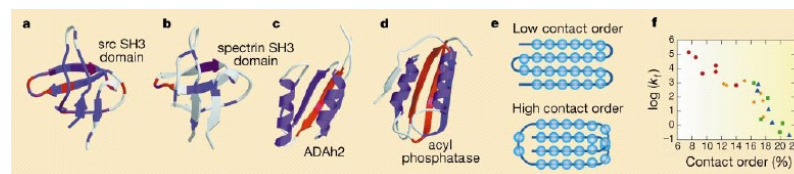
“diffúzió és ütközés”
típusú mechanizmus

Destabilizálás hatása az energiaszínre

Mechanikai húzóerő hatása

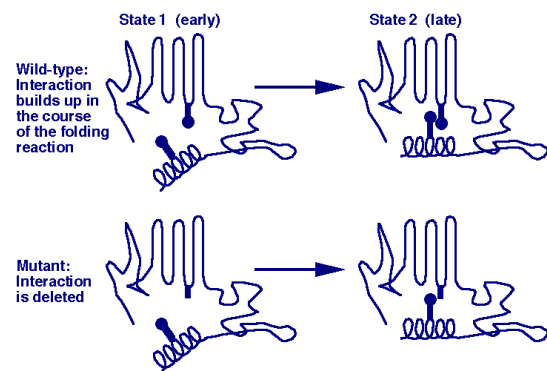


A natív szerkezet hatása a gombolyodás kinetikájára

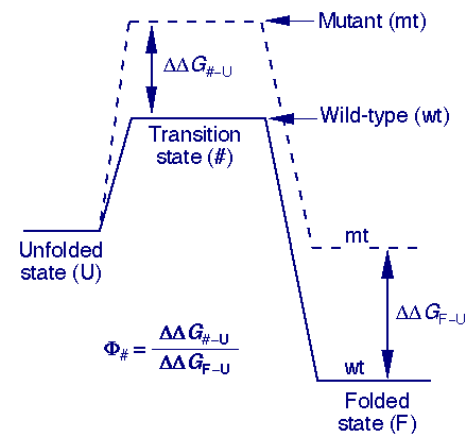


A kisebb kontaktus rendű szerkezetek gyorsabban gombolyodnak, mint a magasabb kontaktus rendűek. A korreláció a natív kontaktusok átlagos távolsága és gombolyodás sebessége között 6 nagyságrenden keresztül fennáll.

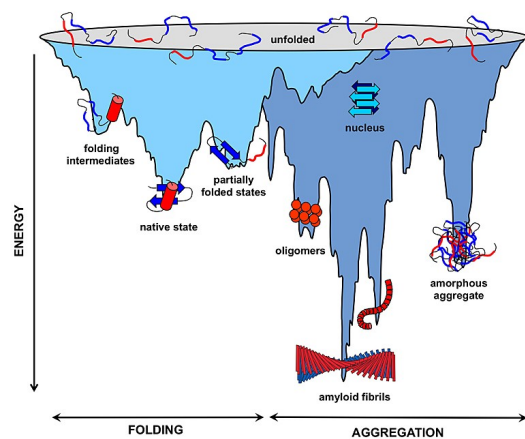
A tranziens állapot vizsgálata Φ érték analízissel



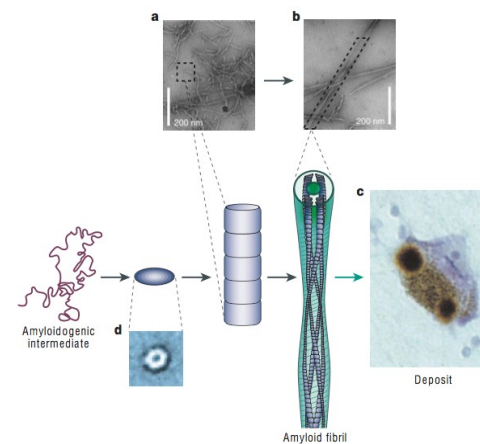
A tranziens állapot vizsgálata Φ érték analízissel



Fehérje gombolyodás és aggregáció



Amiloid plakk kialakulása

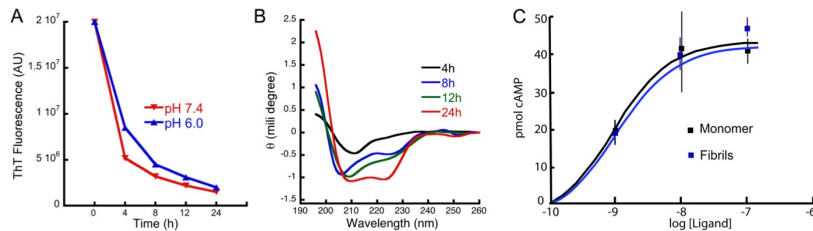


Amiloid

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

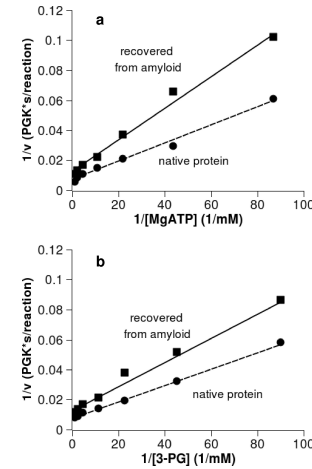
1859-ben Nicolaus Friedreich és August Kekulé vizsgálatai bebizonyították, hogy valójában fehérjéből áll.

Funkcionális amiloid szerkezetek



Humán corticotropin releasing factor tárolódása amyloid szerkezetben.

Előfordul, hogy aktív fehérje nyerhető vissza amiloidból



In vitro amiloidokból visszanyert és eredeti natív PGK enzimaktivitása

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 hasonlítanak
- 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

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 koordinátlanság

A fehérje destabilizációja vezet az amiloid képződéshez

destabilizáció oka:

- fragmentálódás
- mutáció
- evolúciós változás
- megnövekedett koncentráció

Amiloidok és prekursor fehérjéik

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

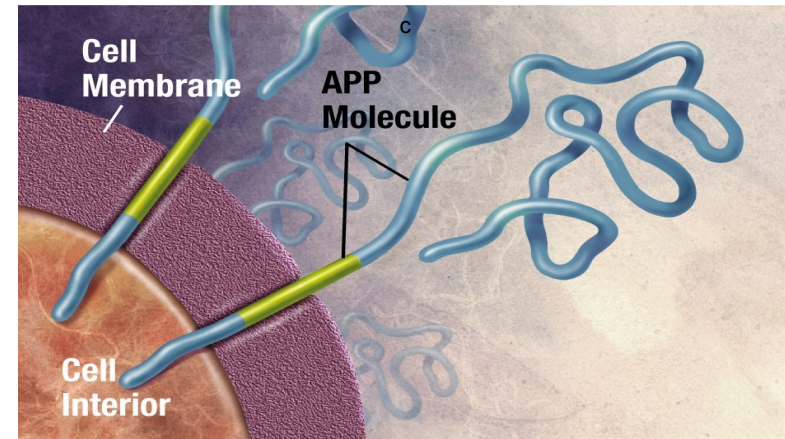
Amyloid protein	Precursor	Systemic (S) or localized, organ restricted (L)	Syndrome or involved tissues
AL	Immunoglobulin light chain	S, L	Primary Myeloma-associated
AH	Immunoglobulin heavy chain	S, L	Primary Myeloma-associated
A β_2 M	β_2 -microglobulin	S	Hemodialysis-associated
ATTR	Transthyretin	L ² S	Joints Familial Senile systemic Tenosynovium
AA	(Apo)serum AA	L ²	
AApoAI	Apolipoprotein AI	S	Secondary, reactive
AApoAII	Apolipoprotein AII	L	Familial Aorta, meniscus
AApoAIV	Apolipoprotein AIV	S	Familial
AGel	Gelsolin	S	Sporadic, associated with aging
ALys	Lyszyme	S	Familial (Finnish)
AFib	Fibrinogen γ -chain	S	Familial
ACys	Cystatin C	S	Familial
ABri	ABriPP	S	Familial dementia, British
ALex2	Leukocyte chemotactic factor 2	S	Mainly kidney
ADan ¹	ADan ¹ PP	L	Familial dementia, Danish
A β	A β protein precursor (A β PP)	L	Alzheimer's disease, aging
APri	Prion protein	L	Spongiform encephalopathies
ACal	(Pro)calcitonin	L	C-cell thyroid tumors
AIAPP	Islet amyloid polypeptide**	L	Islets of Langerhans Insulinomas
AANF	Atrial natriuretic factor	L	Cardiac atria
APro	Prolactin	L	Aging pituitary Prolactinomas
AIns	Insulin	L	Idiopathic
AMed	Lactadherin	L	Senile aortic, media
AKer	Kerato-epithelin	L	Cornea, familial
ALac	Lactoferrin	L	Cornea
AOap	Odontogenic ameloblast-associated protein	L	Odontogenic tumors
ASeml	Semenogelin I	L	Vesicular seminalis

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

¹ADan comes from the same gene as ABri.

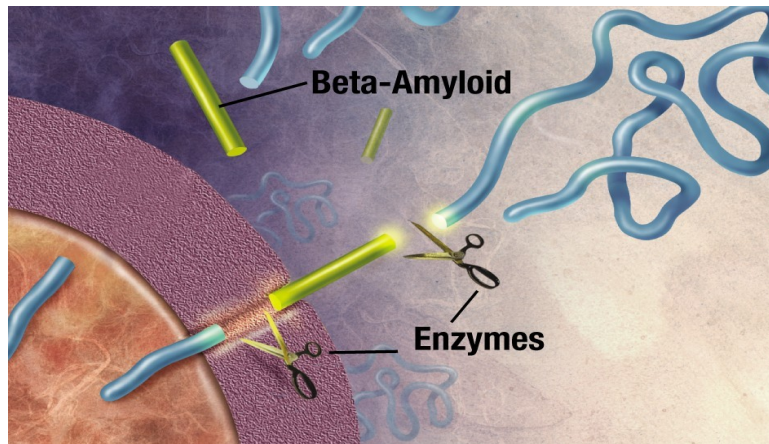
²Also called 'amylin'.

Alzheimer kór, β amiloid plakkok kialakulása *in vivo*



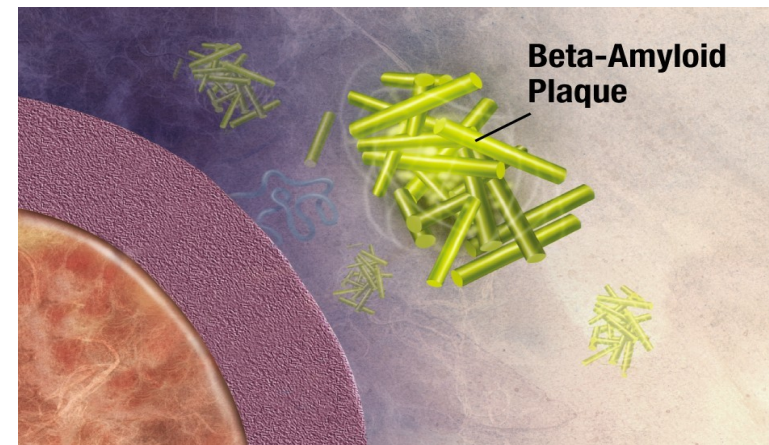
Az amyloid prekursor protein az agysejthez köt.

Alzheimer kór, β amiloid plakkok kialakulása *in vivo*



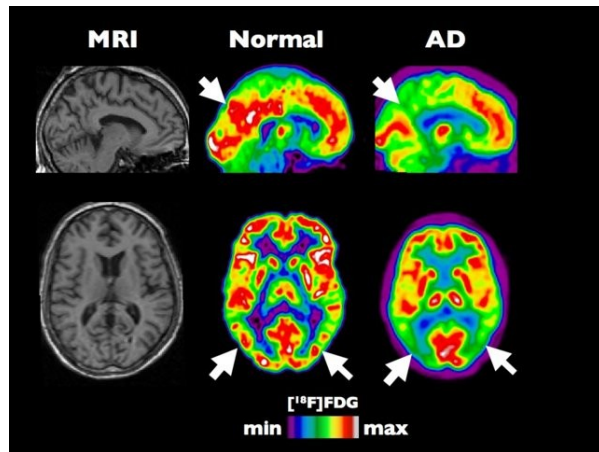
Enzimek elvágják az amyloid prekursor proteint β -amiloid fehérjét termelve.

Alzheimer kór, β amiloid plakkok kialakulása *in vivo*



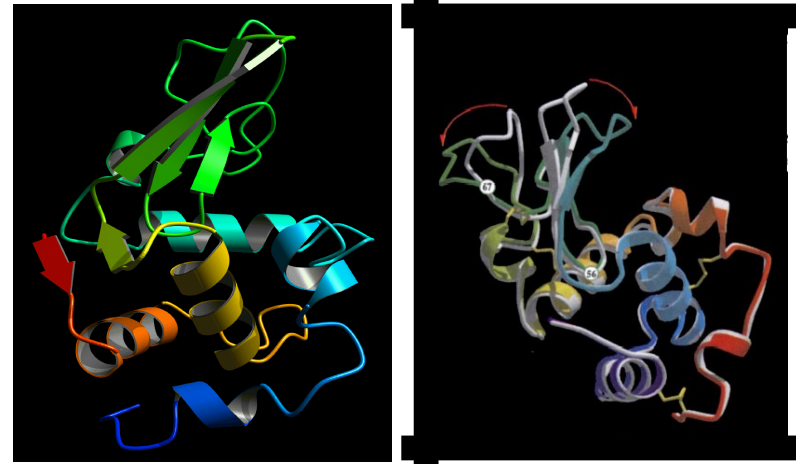
Az amyloid prekursor protein aggregálódik.

Alzheimer kór, β amiloid plakkok kialakulása *in vivo*



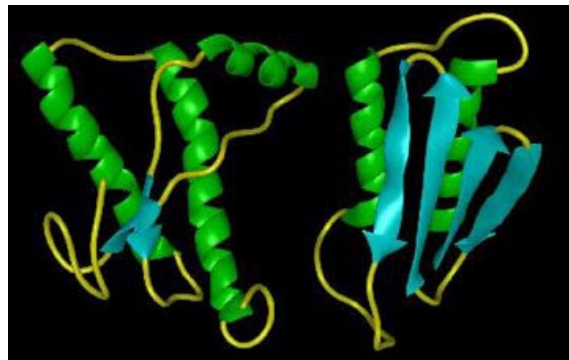
Egészséges és Alzheimer kóros ember agyi aktivitása PET képen.

Örökletes álmatlanság, lizozim amiloid plakkok *in vivo*



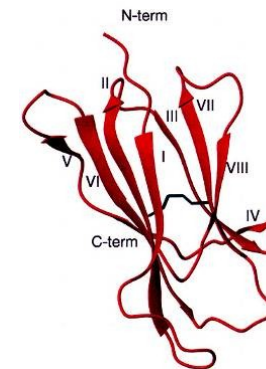
A mutáció által destabilizált lizozim amiloid szerkezetekbe aggregálódik.

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



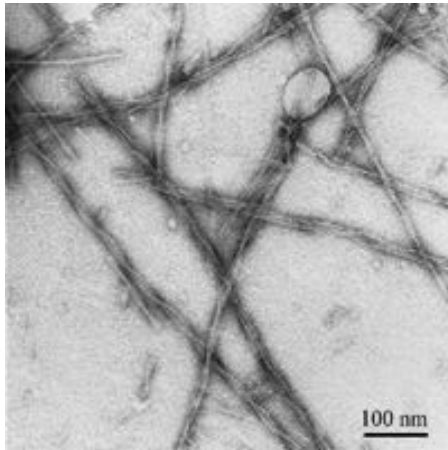
PrP^C és PrP^{Sc} szerkezete

β_2 mikroglobulin



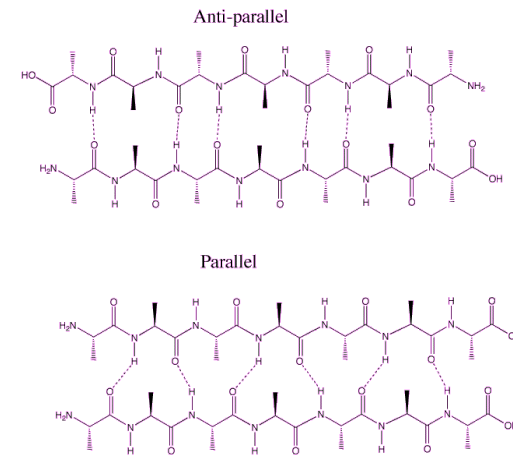
A β_2 mikroglobulin a dialízishez kapcsolódó amyloidózisban rakódik le.

Amiloid szálak szerkezete



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

Fehérjék polimerizációs csapdája



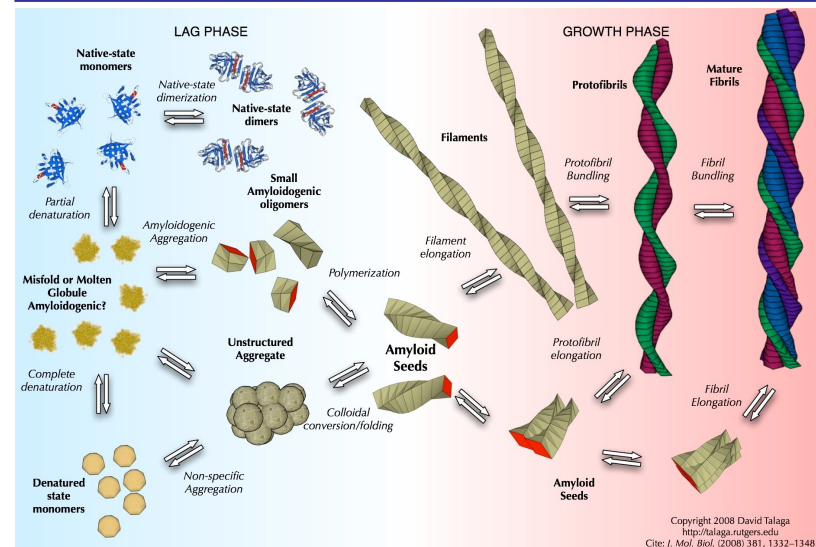
Amiloid plakk szerkezeti hierarchiája

β -redő kialakulása – hidrogén híd kötések

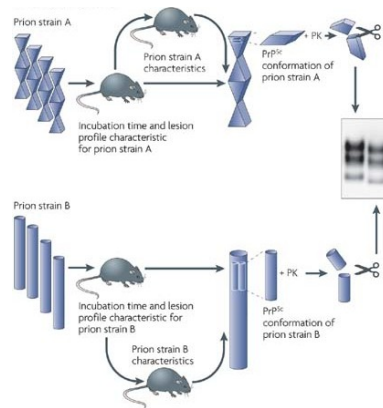
kereszt β -redős szerkezet – Van der Waals erők, „steric zipper”

szálak képződése – nem kovalens kötések

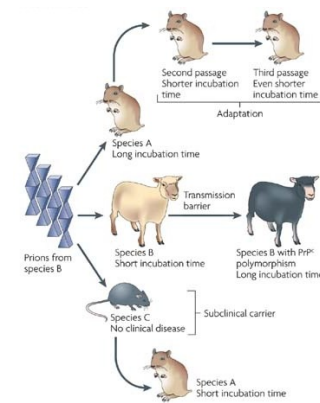
Amiloid szálak növekedése



Prion szerkezeti „törzsek”



Fajok közötti „gát”



Amiloid oligomerek

az amiloid fibrillumok kialakulása felé vezető aggregált szerkezetek

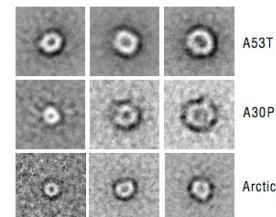
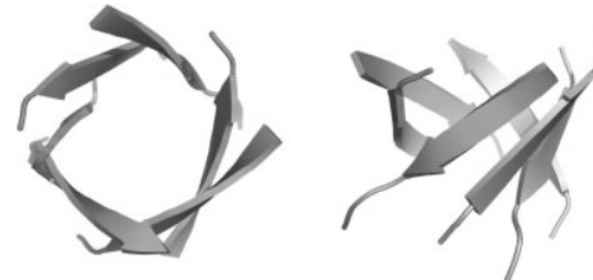
valószínűleg toxikusabbak, mint az amiloid plakkok

eltérő fehérjéből keletkezett oligomerek szerkezete hasonló, hasonló hatásmechanizmusra utalva

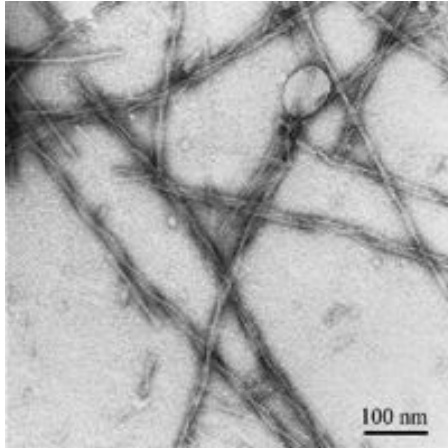
Amiloid oligomerek szerkezete

pórus

β -hordó

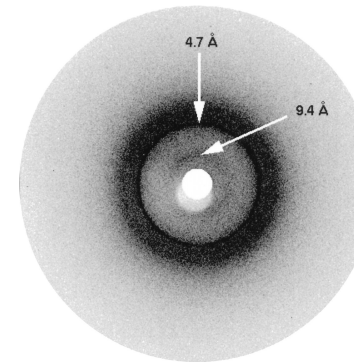


Amiloid szálak kimutatása, elektronmikroszkópia



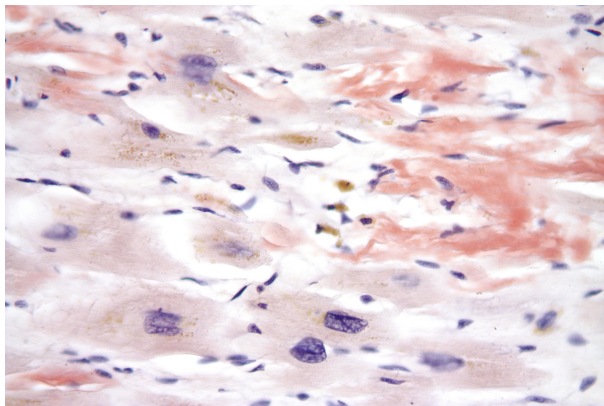
foszfatidilinozitol 3-kináz SH3 doménből *in vitro* növesztett amiloid szálak transzmissziós elektronmikroszkóppal készített képe

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

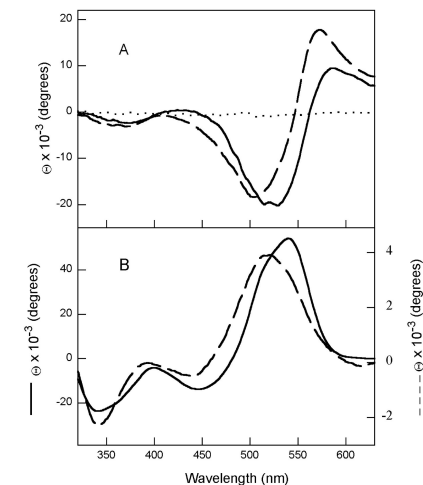


Amiloid plakkok kimutatása Kongó vörös festéssel szívizom szövetben

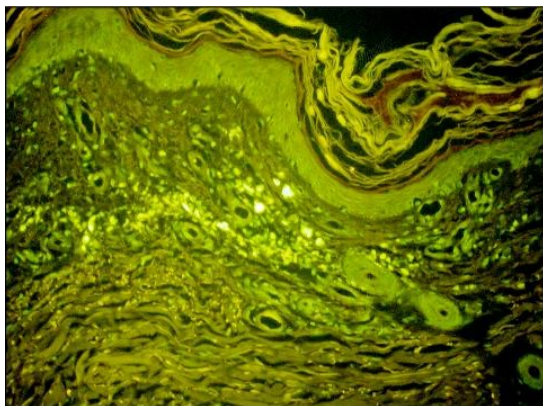
Amiloidok kimutatása, Kongó vörös kettőstörés

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

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

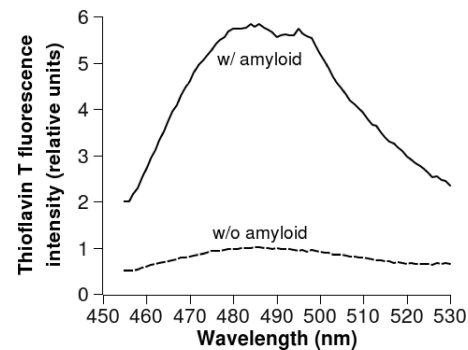


Amiloidok kimutatása, Thioflavin t festés



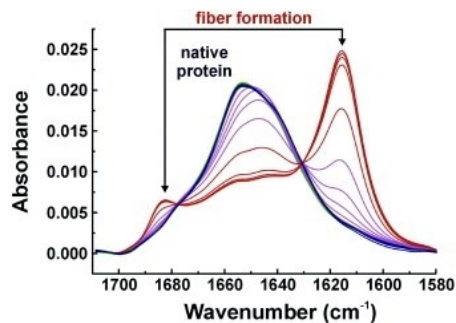
Amiloid lerakódások kimutatása a bőrben
Thioflavin t festéssel

Amiloidok kimutatása, Thioflavin t fluoreszcencia



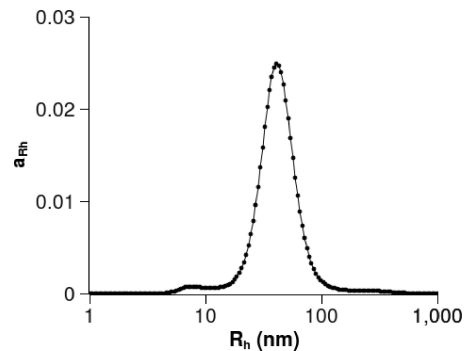
Thioflavin t fluoreszcencia emisszió PGK
amiloid szálak jelenlétében és nélkülük

Amiloid szálak kimutatása, infravörös abszorpció



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

Amiloid szálak méreteloszlása, dinamikus fényszórás



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