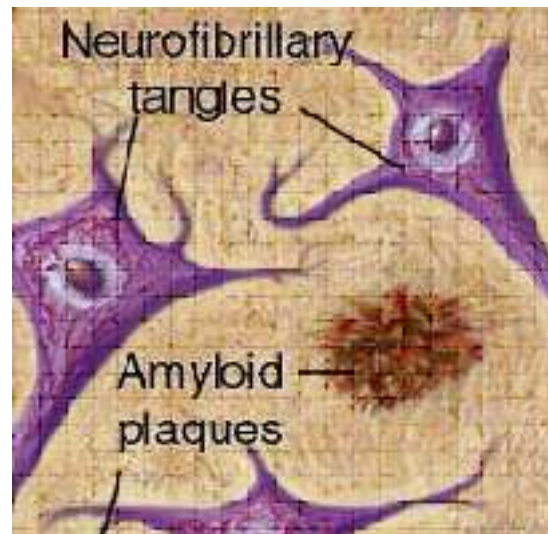




# Історія амилоїду: від хворіб до промислового застосування



**А. Баумкетнер**

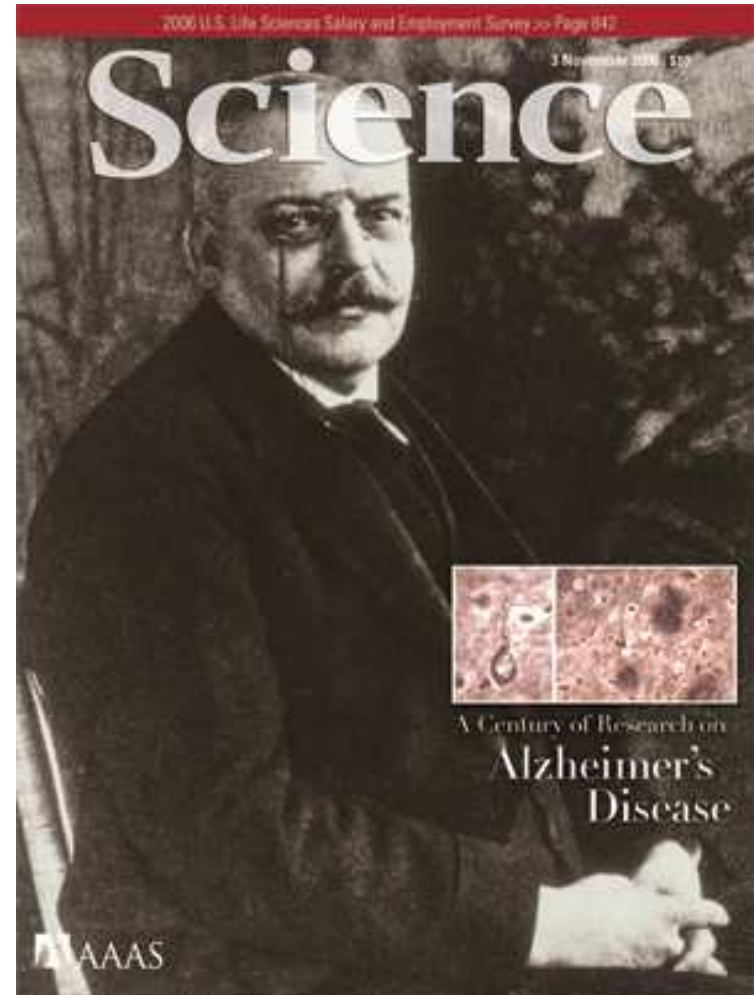
Інститут фізики конденсованих систем  
НАН України

# Що таке хвороба Альцгаймера?

- Хвороба центральної нервової системи

- Симптоми:

- втрата пам'яті
- спантеличеність
- зміни особистості
- зміни ваги
- сповільнене мислення
- тривога
- втрата мови
- втрата моторних функцій
- утворення плашок

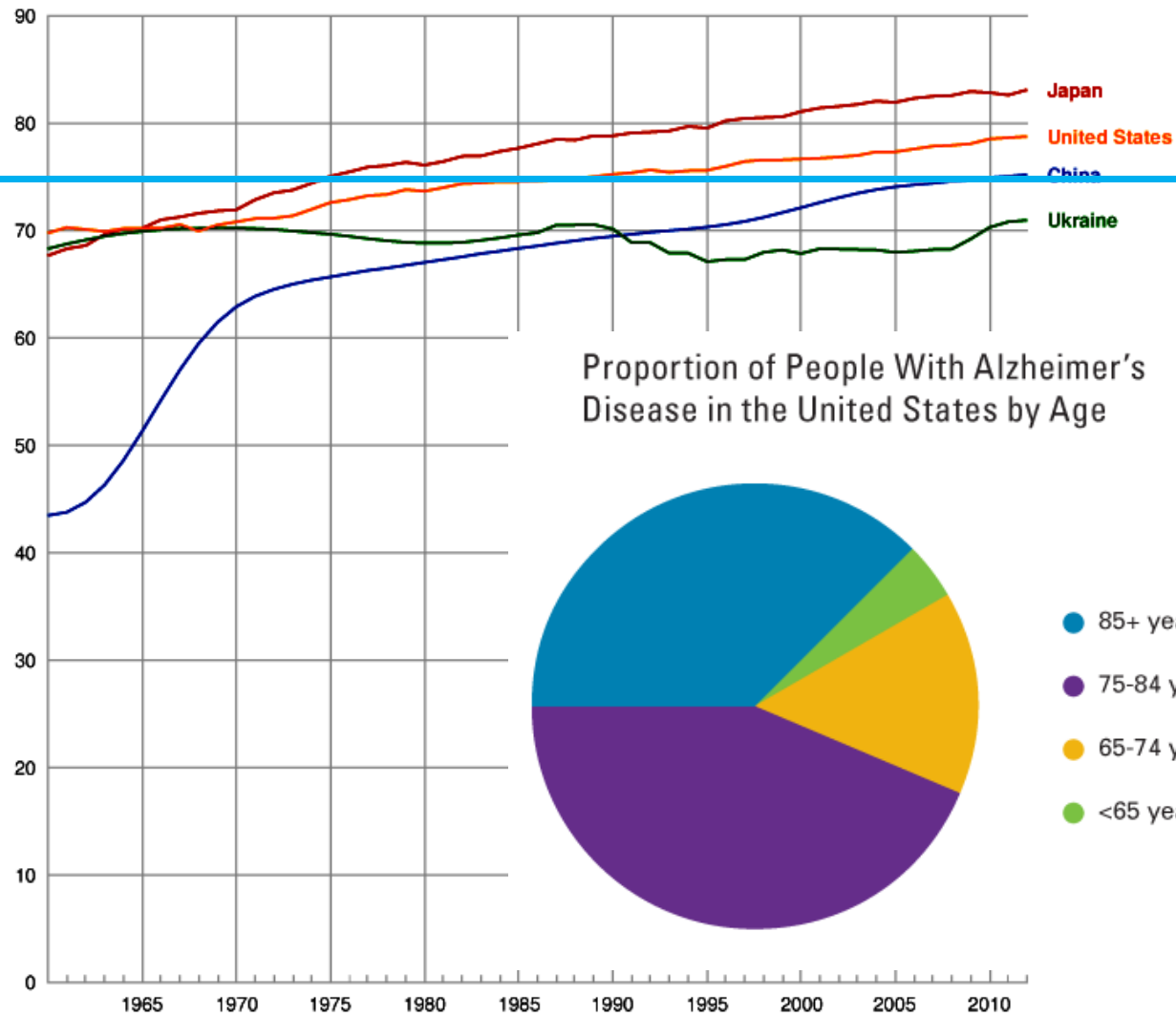


Munich medical school (assistant to Emil Kraepelin)

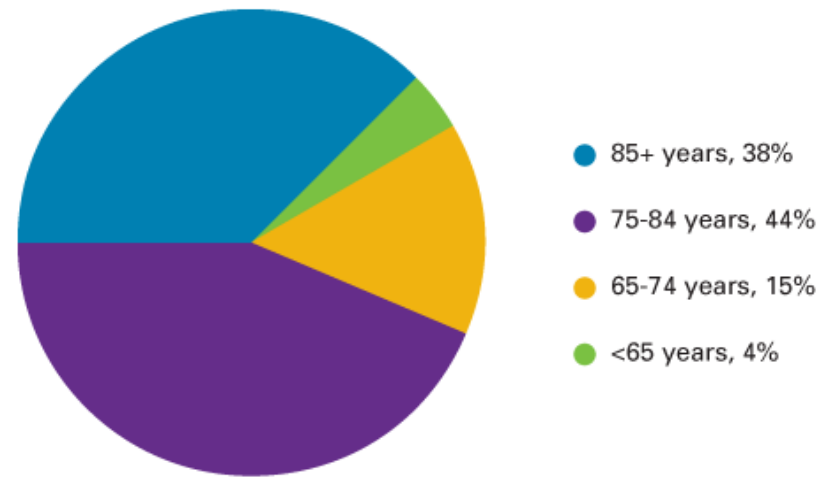
Alzheimer, A. *About a peculiar disease of the cerebral cortex*. 30, 177–179 (1907).

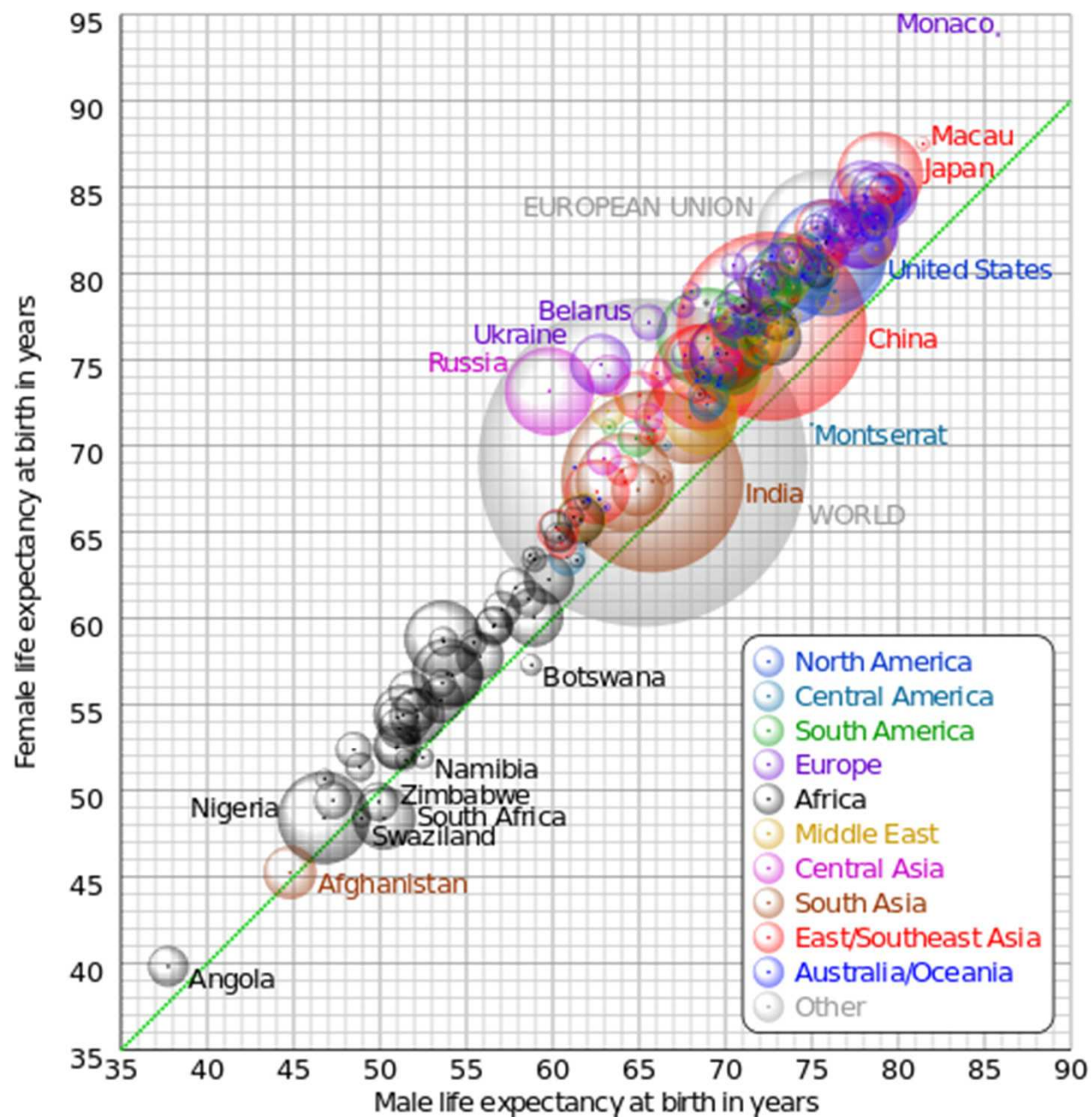
# Статистика

Life expectancy ?



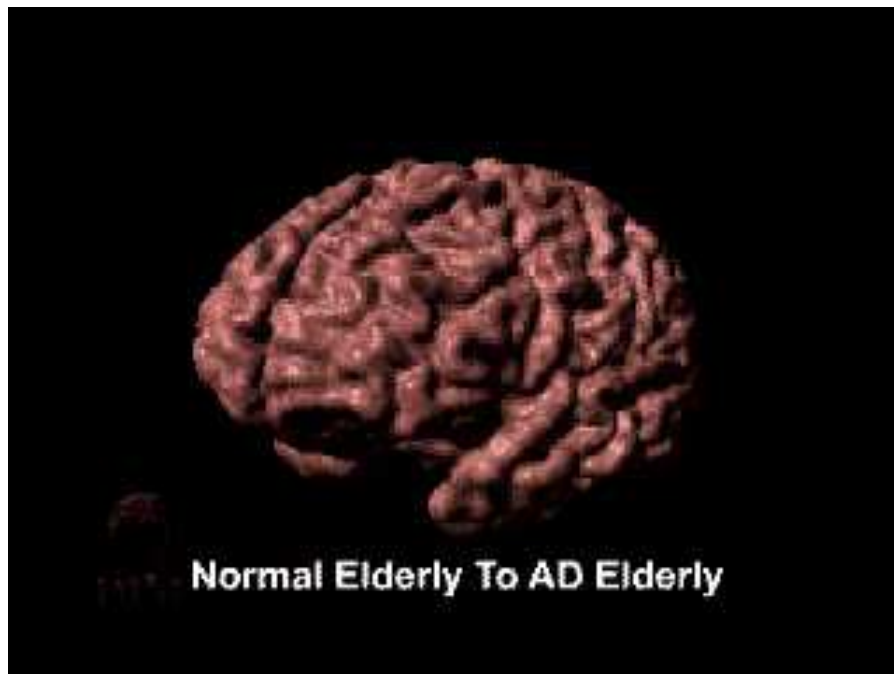
Proportion of People With Alzheimer's Disease in the United States by Age



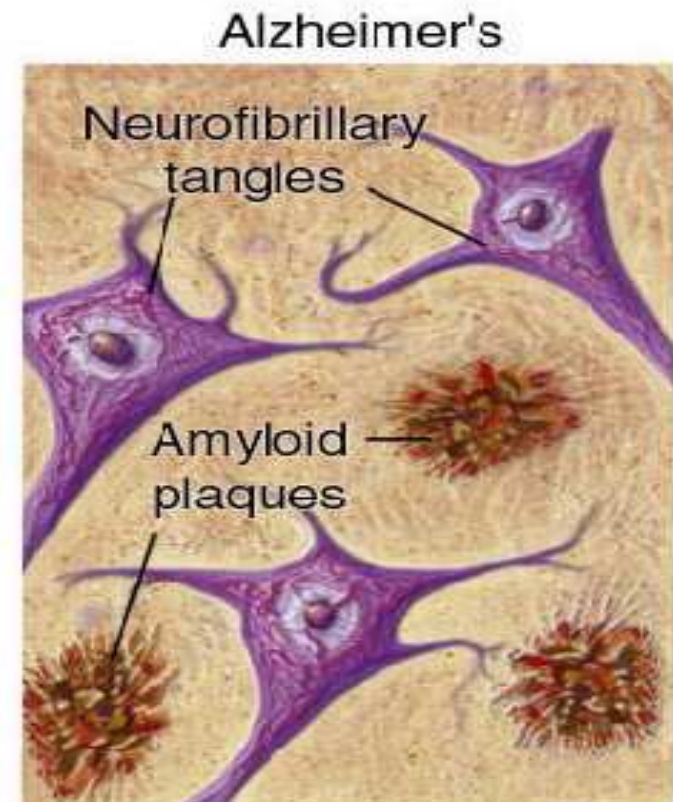


# Гістопатологічні ознаки AD

- *Intracellular* tangles are found within neurons of brain regions essential for cognitive function. Filamentous tangles are formed from paired helical fragments (PHF) composed of neurofilament and hyperphosphorylated tau protein.

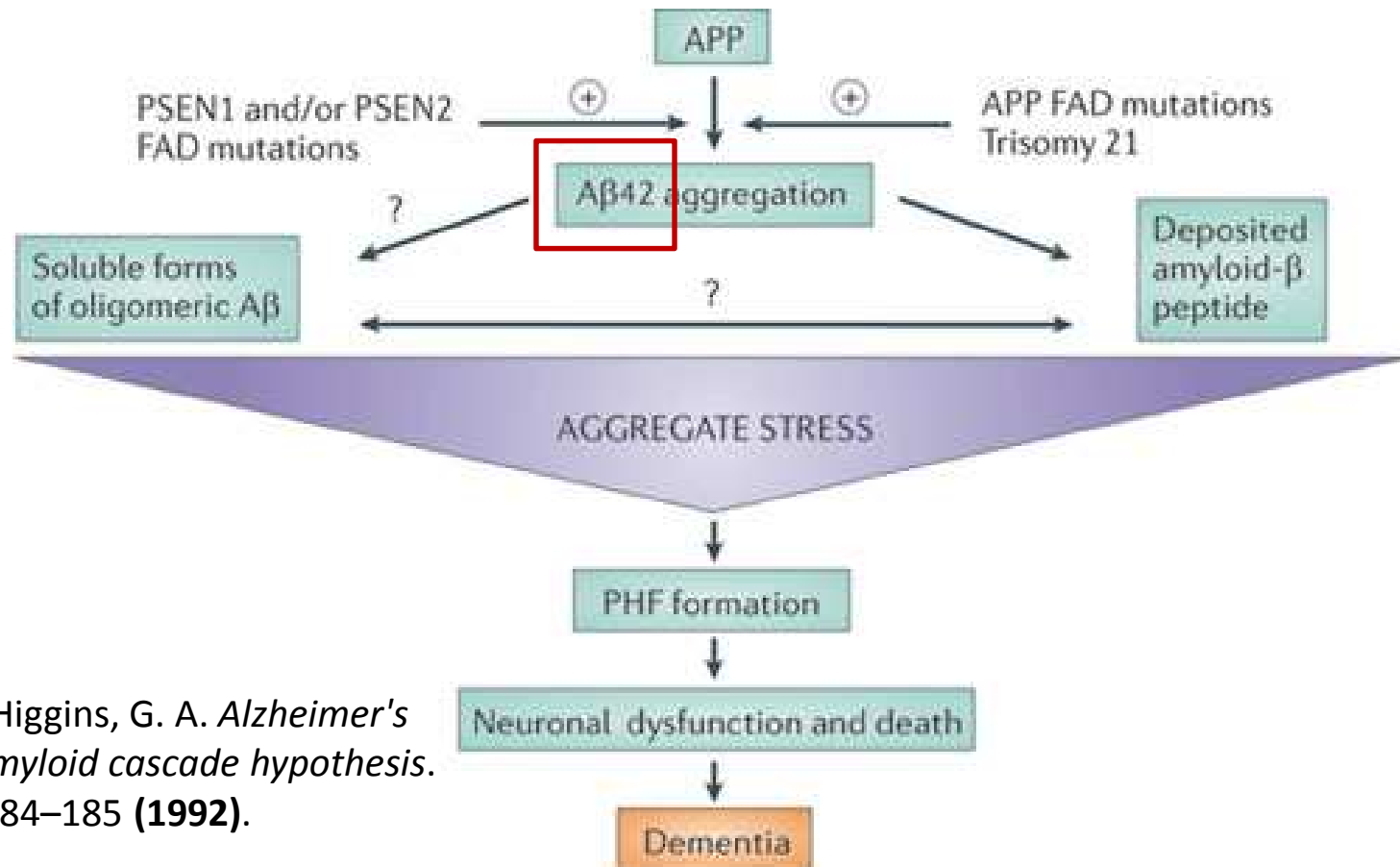


- Plaques of amyloid  $\beta$  protein are accumulated *extracellularly*.



# Амлоїдна гіпотеза

- Агрегація  $A\beta$  пептиду є початковою подією що спричиняє AD:

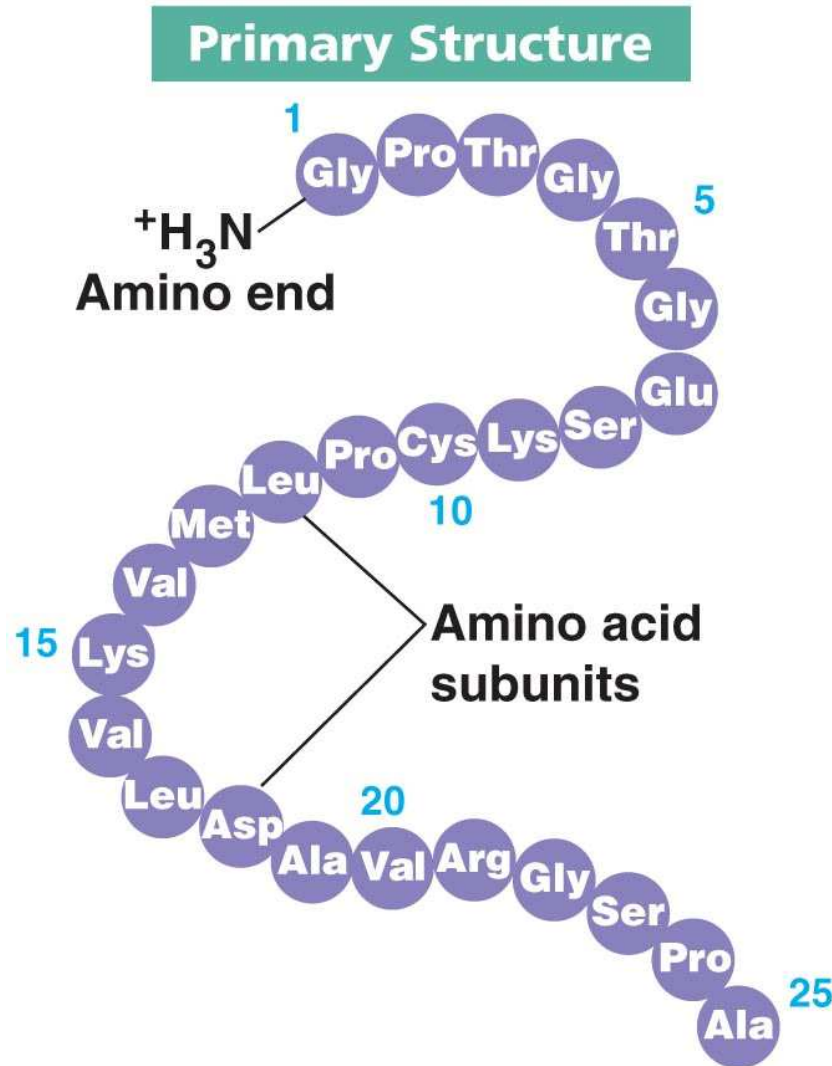


Hardy, J. A. & Higgins, G. A. *Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis*. *Science* 256, 184–185 (1992).

- 1) Мутації в APP генах ведуть до AD
- 2) Мутації в генах  $\gamma$ -секретази ведуть до AD
- 3) Мутації в генах  $\tau$  ведуть до PHP але не AD

The first semi-automated DNA sequencing machine presented at CALTECH in 1986

# Білок = полімер з амінокислотних груп

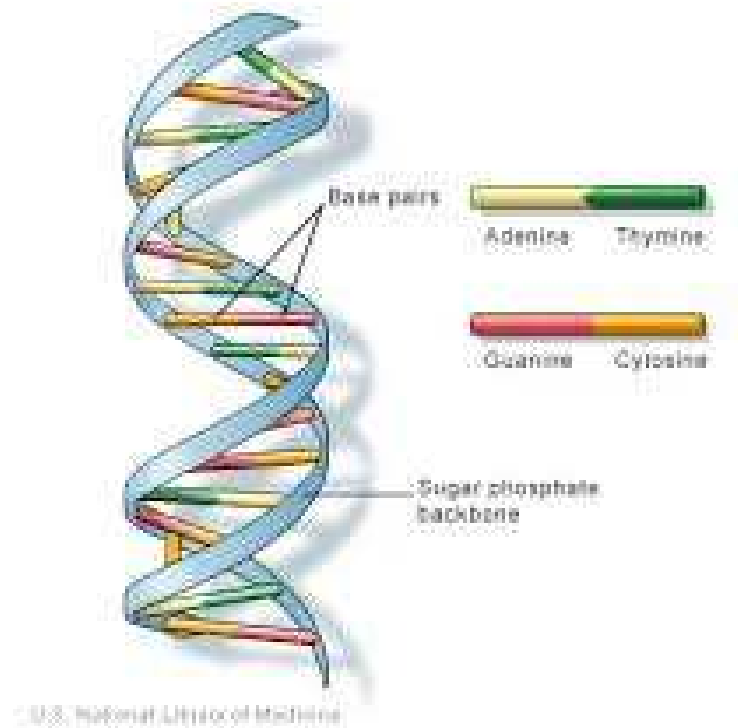


Первинна структура =  
послідовність  
амінокислот яка є  
унікальною для всіх  
білків

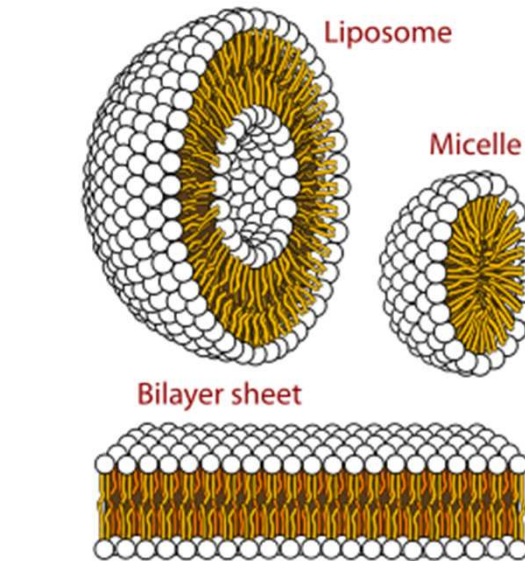
# Три типи біологічних молекул

- There are three main types of biological molecules:

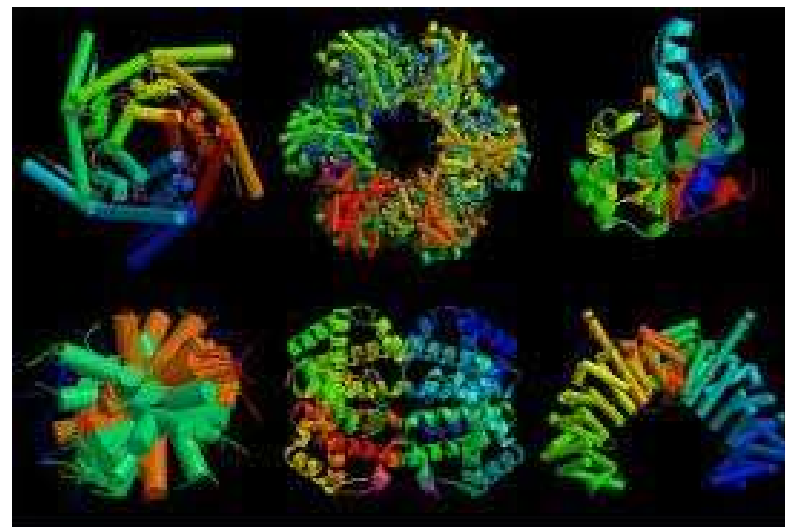
## Nucleosides and nucleotides



## Proteins

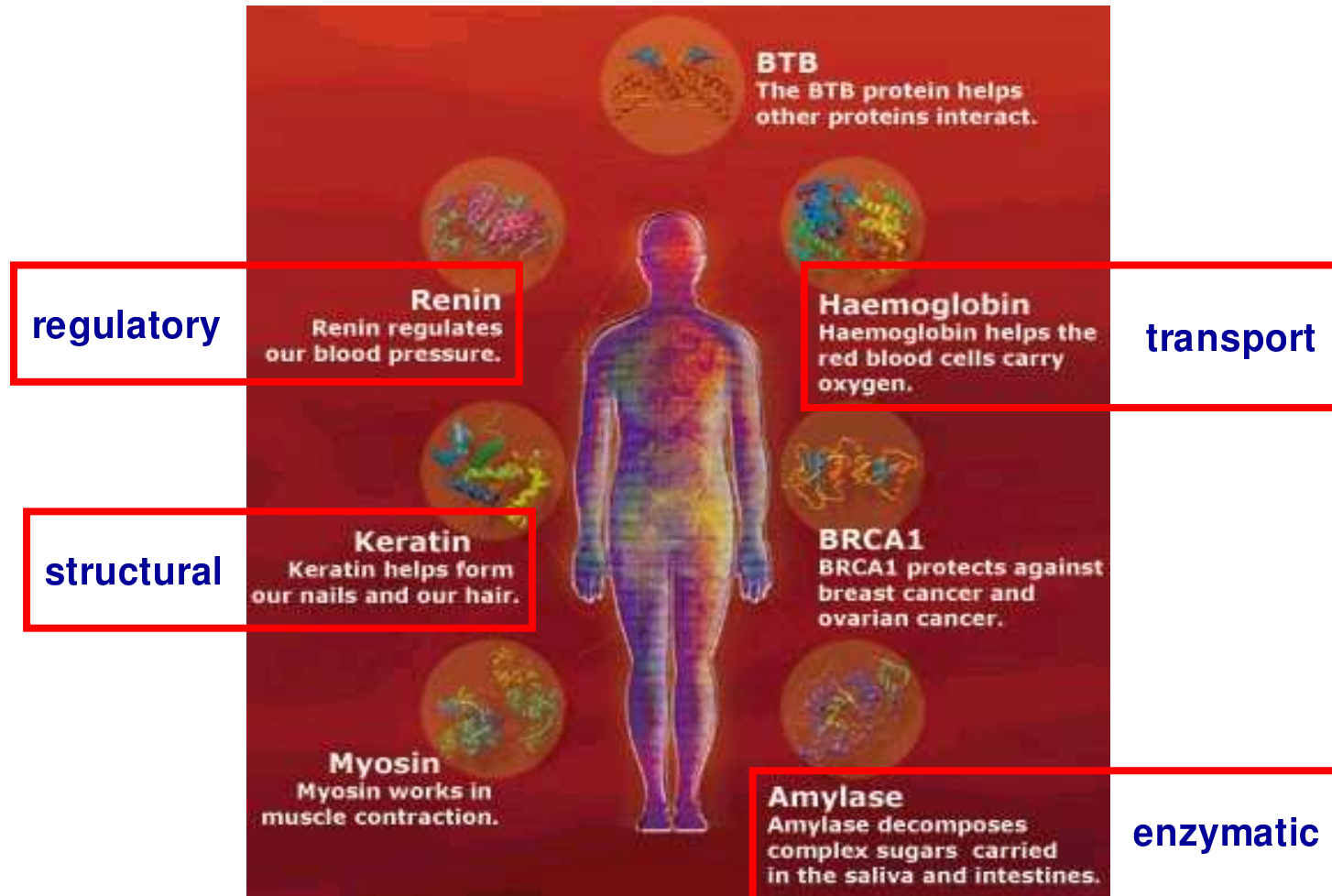


Lipids,  
polysaccharide,  
glycolipids,  
sterols...



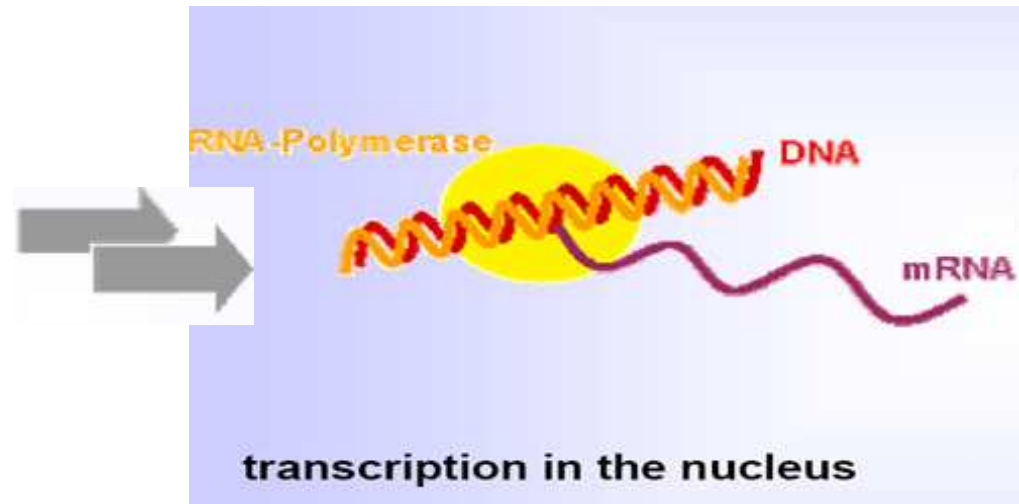
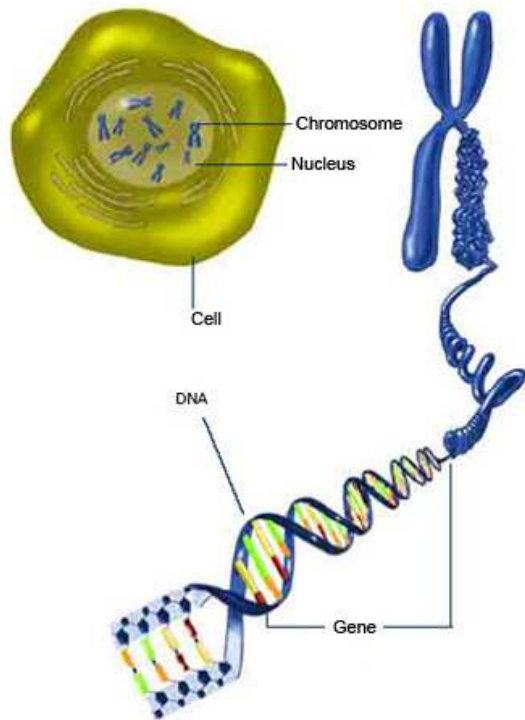
# Білок – молекула життя

- More than 50% of all solid mass in living organisms are proteins



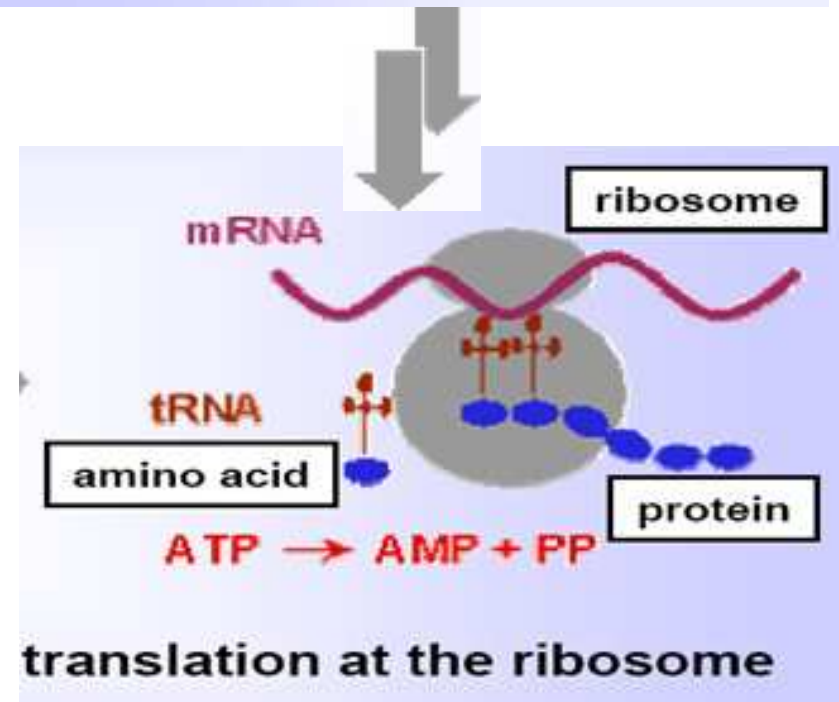
- When proteins don't function properly, we get sick

# Синтез білка



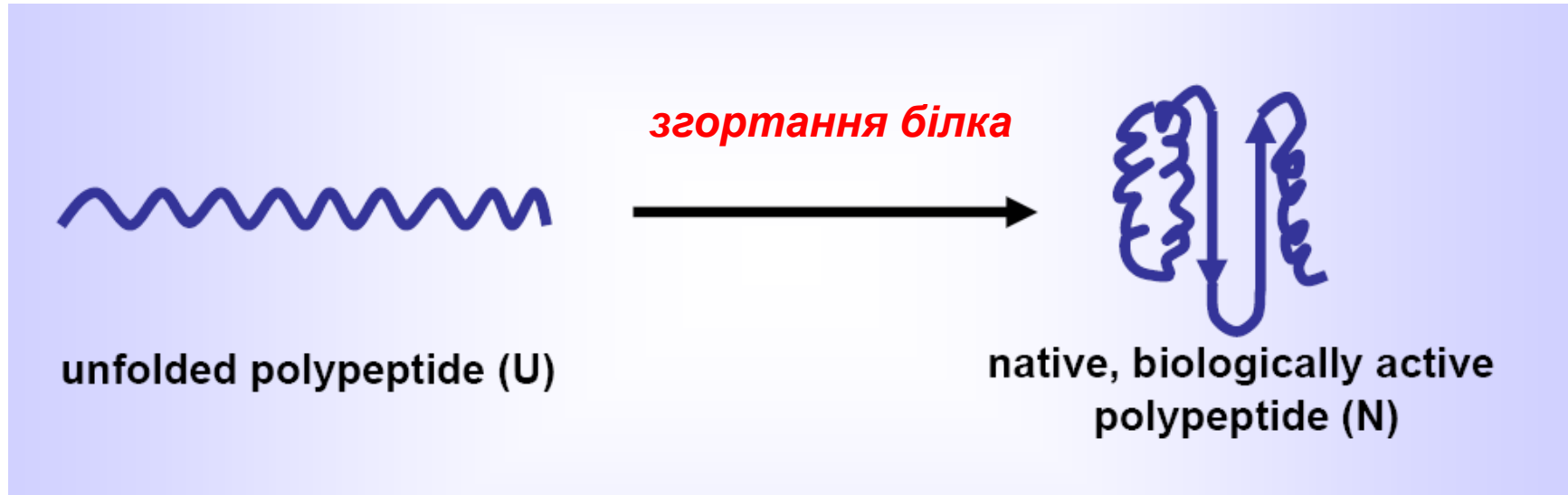
- Кожен білок має свій *код* що записаний в геномі – бібліотеці всього живого. Інформація з геному передається за посередництвом mRNA - транскрипція

- Білки синтезуються молекулою рибосоми у вигляді лінійного полімеру – трансляція.



# Реакція згортання білка

- Для того щоб стати функціонально активним білок набуває певної 3D форми



- Догма Анфінсена:

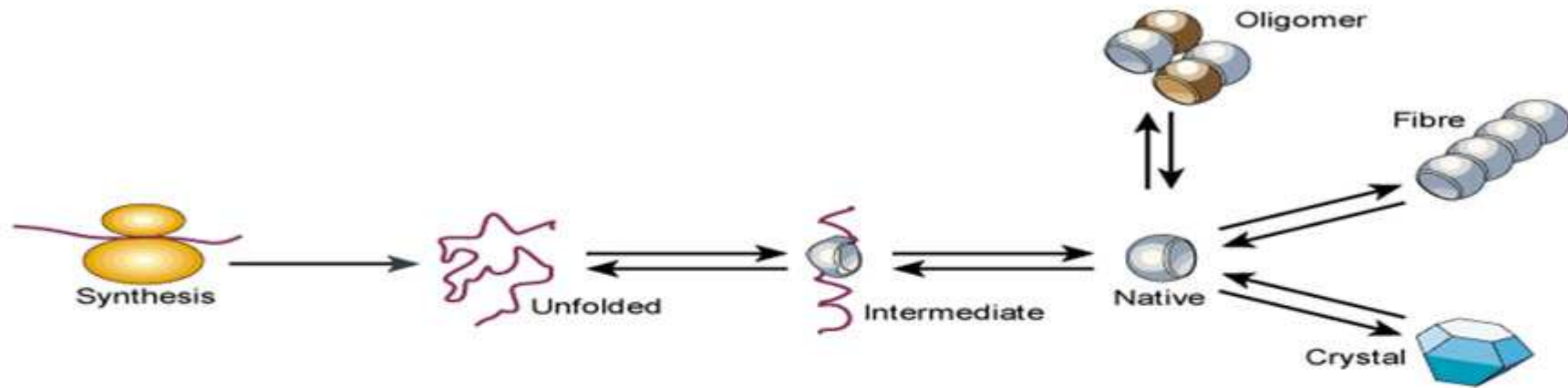
Послідовність амінокислот повністю визначає функціональну структуру білка. Основний стан білка є:

- Єдино можливим*
- Кінетично доступним*
- Відповідає найменшій вільній енергії*

*(Нобелівська премія 1972)*

- В процесі згортання можуть виникати проміжні стани (I)

# Згортання білка в межах клітини



# Макробілкові структури

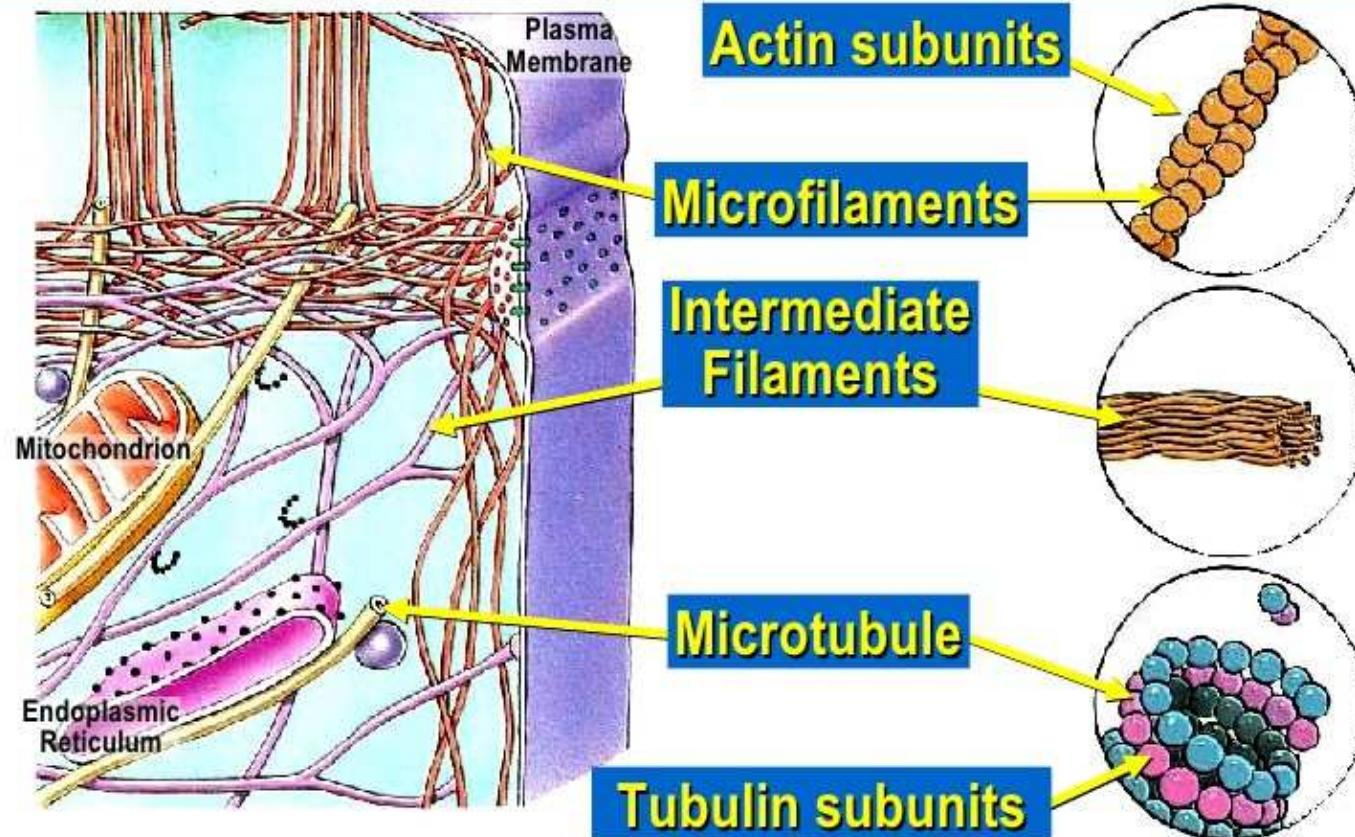
- Цитоскелет зроблений з полімеризованих білкових волокон. Має структурні та транспортні функції



## The Cytoskeleton

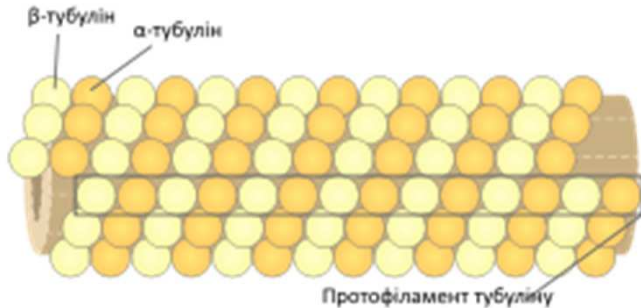
Chapter 5

12



# Макробілкові структури

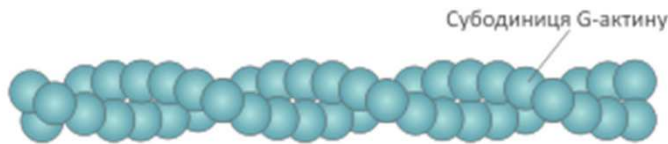
## Мікротрубочки



*Трубка з протофіламентів білка тубуліну*

- Підтримання форми клітини
- Утворення війок та джгутиків, що забезпечують локомоцію клітини
- Розходження хромосом під час клітинного поділу
- Транспорт органел

## Актинові філаменти



*Два закручених протофіламенти актину*

- Підтримання клітинної форми
- Зміни у формі клітин
- Скорочення м'язів
- Рух цитоплазми
- Локомоція клітини
- Забезпечення цитокінезу

## Проміжні філаменти



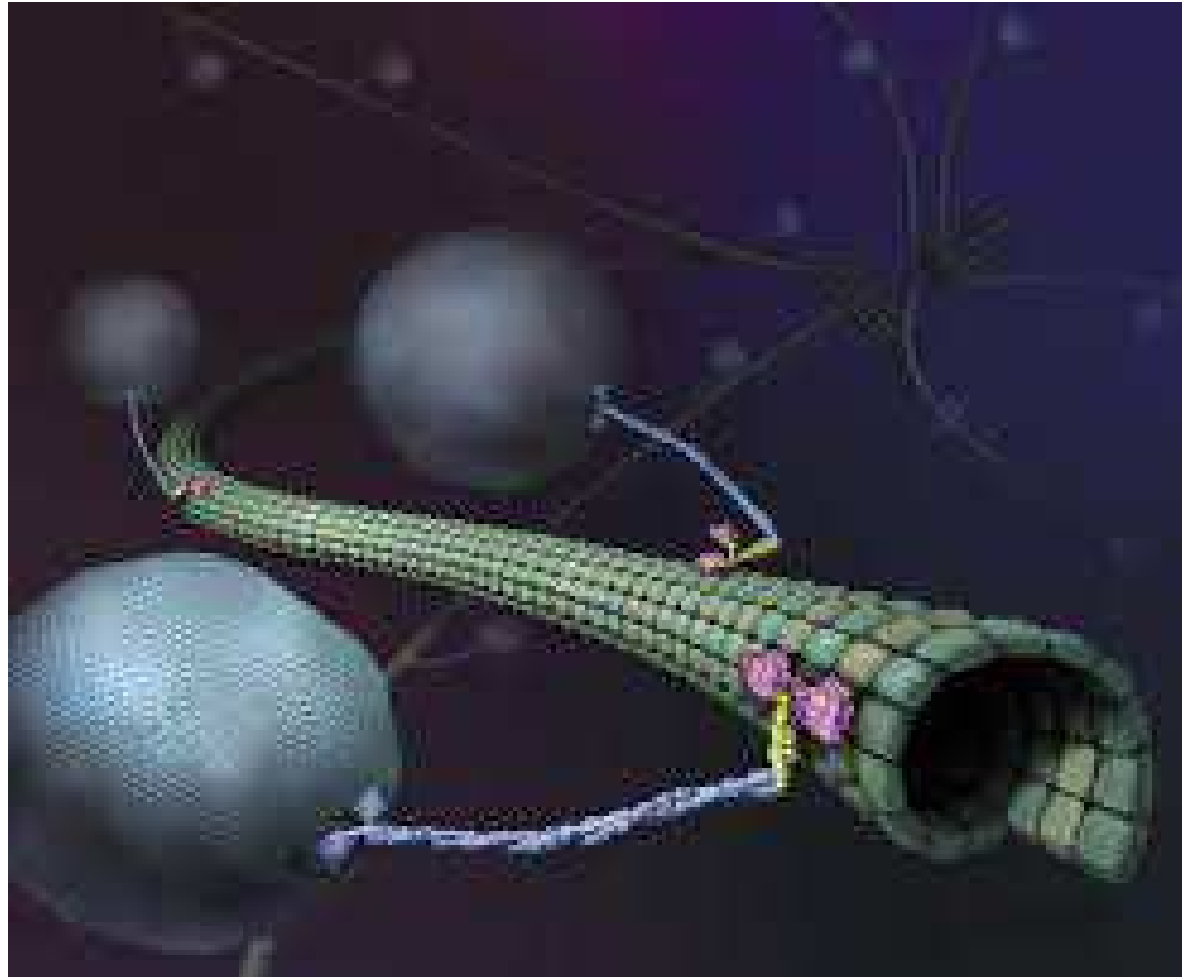
*Кілька протофіламентів, що складаються із фібрилярних білків (кератин) об'єднані у канатоподібну структуру*

- Підтримання форми клітини
- Закріплення ядра та деяких інших органел у певному положенні
- Утворення ядерної ламіни
- Підтримка аксонів у нейронах

# Макробілкові структури

Microtubule-based movement

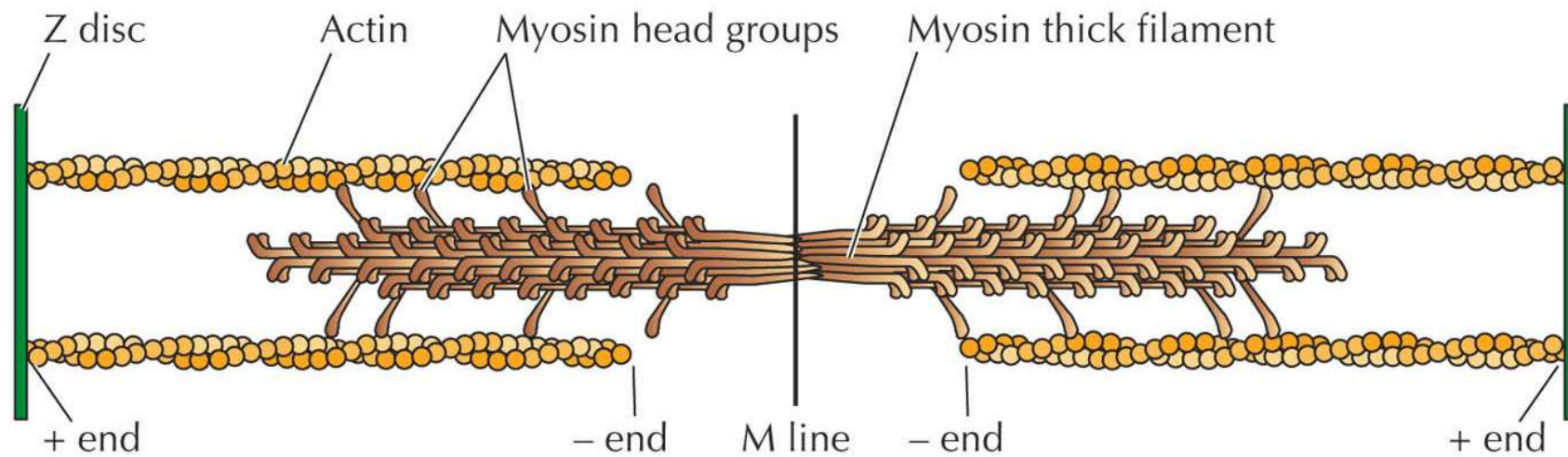
Kinesin  
or  
dynein



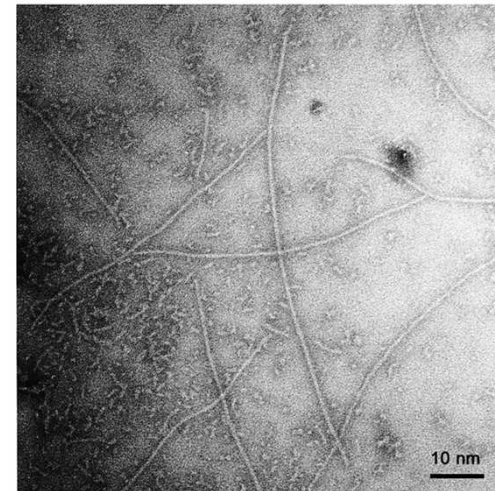
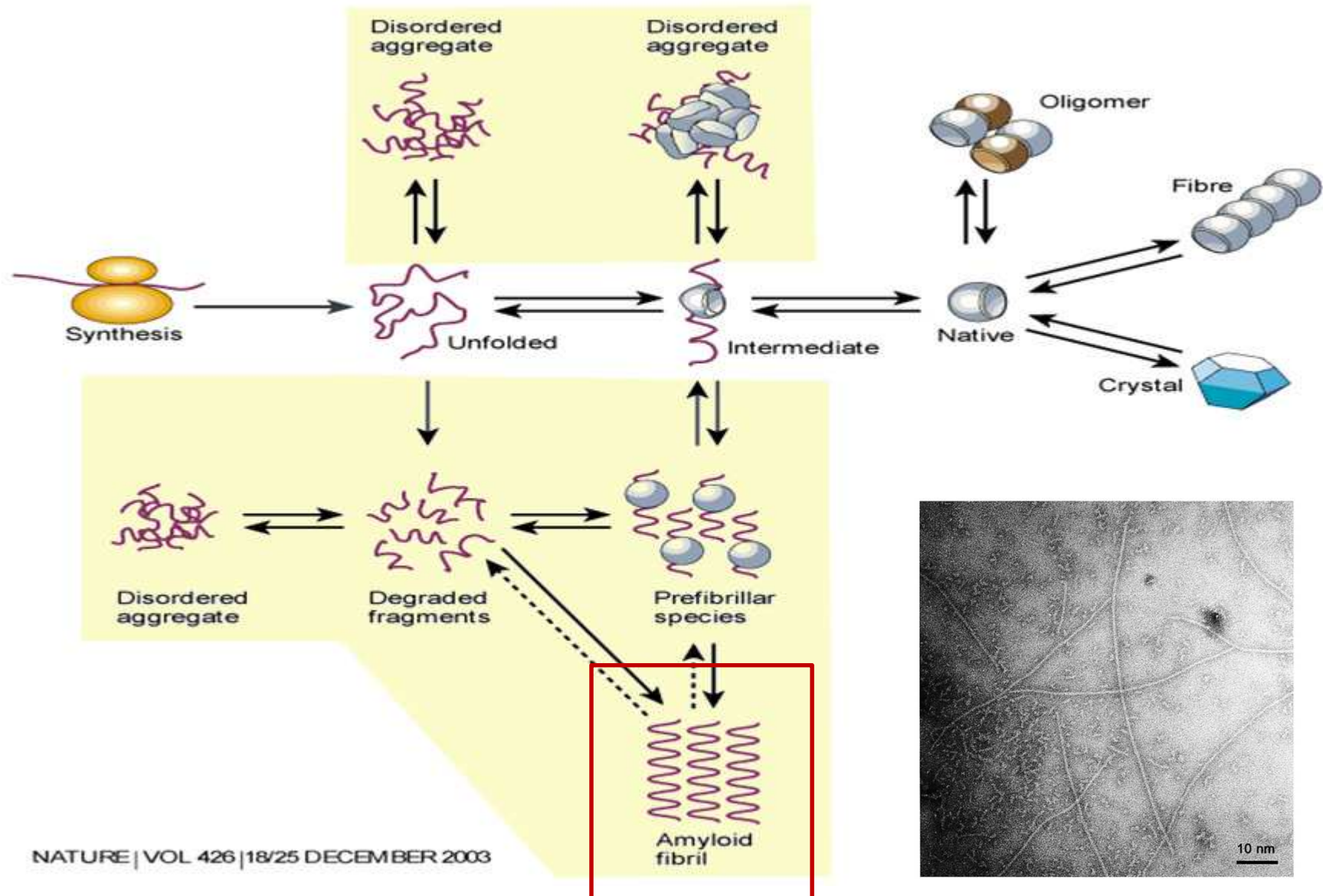
# Макробілкові структури

## Muscle contraction

### Myosin

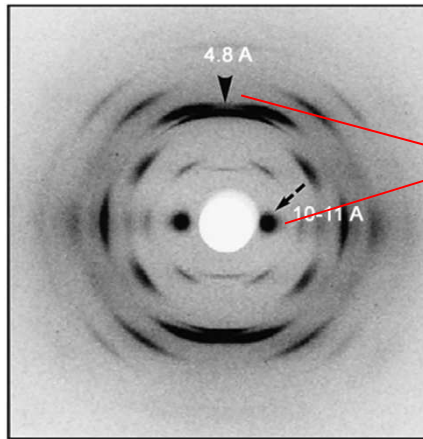


# Агрегація білка



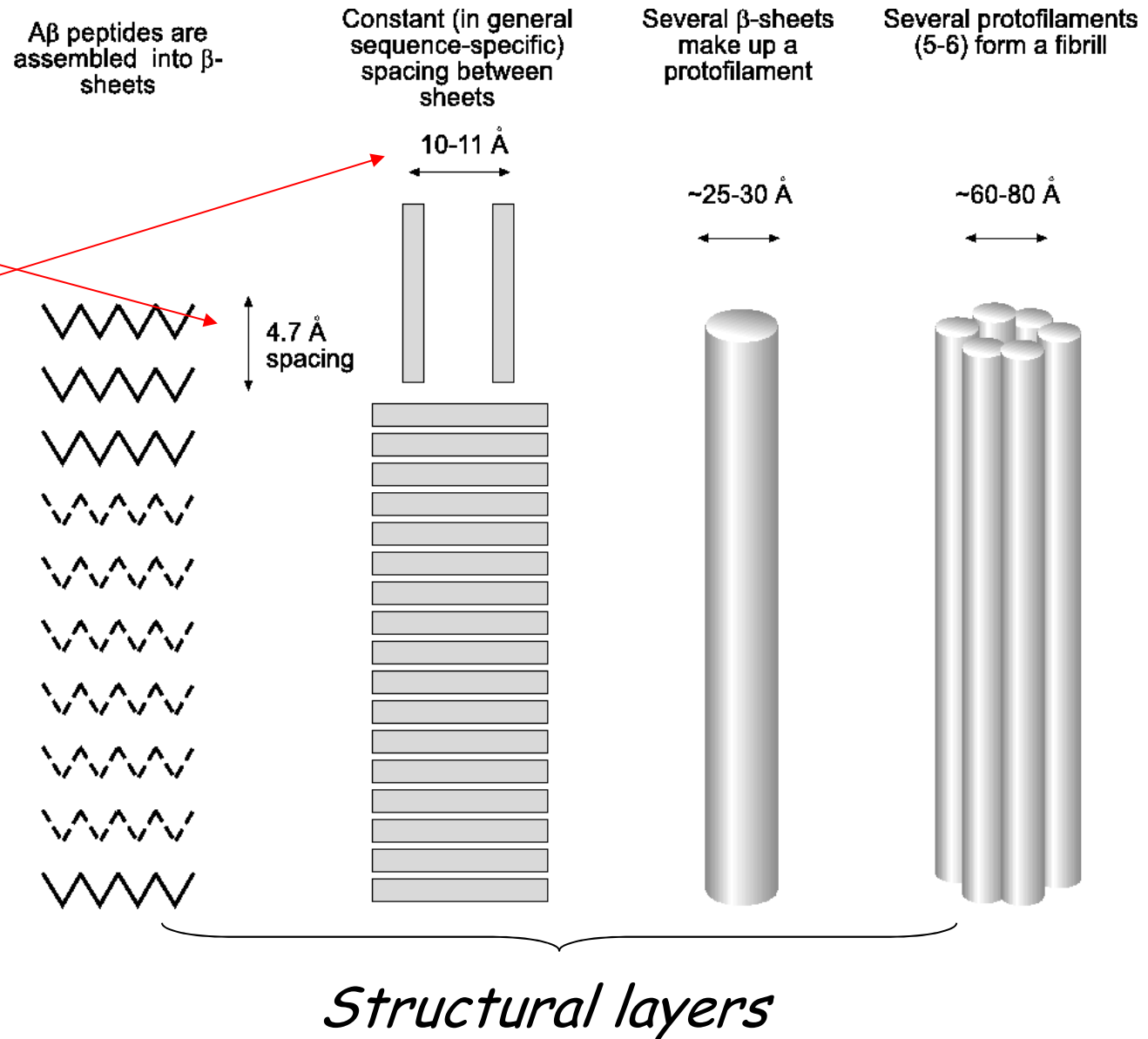
# Структура фібрил

- All fibrils have cross  $\beta$ -structure



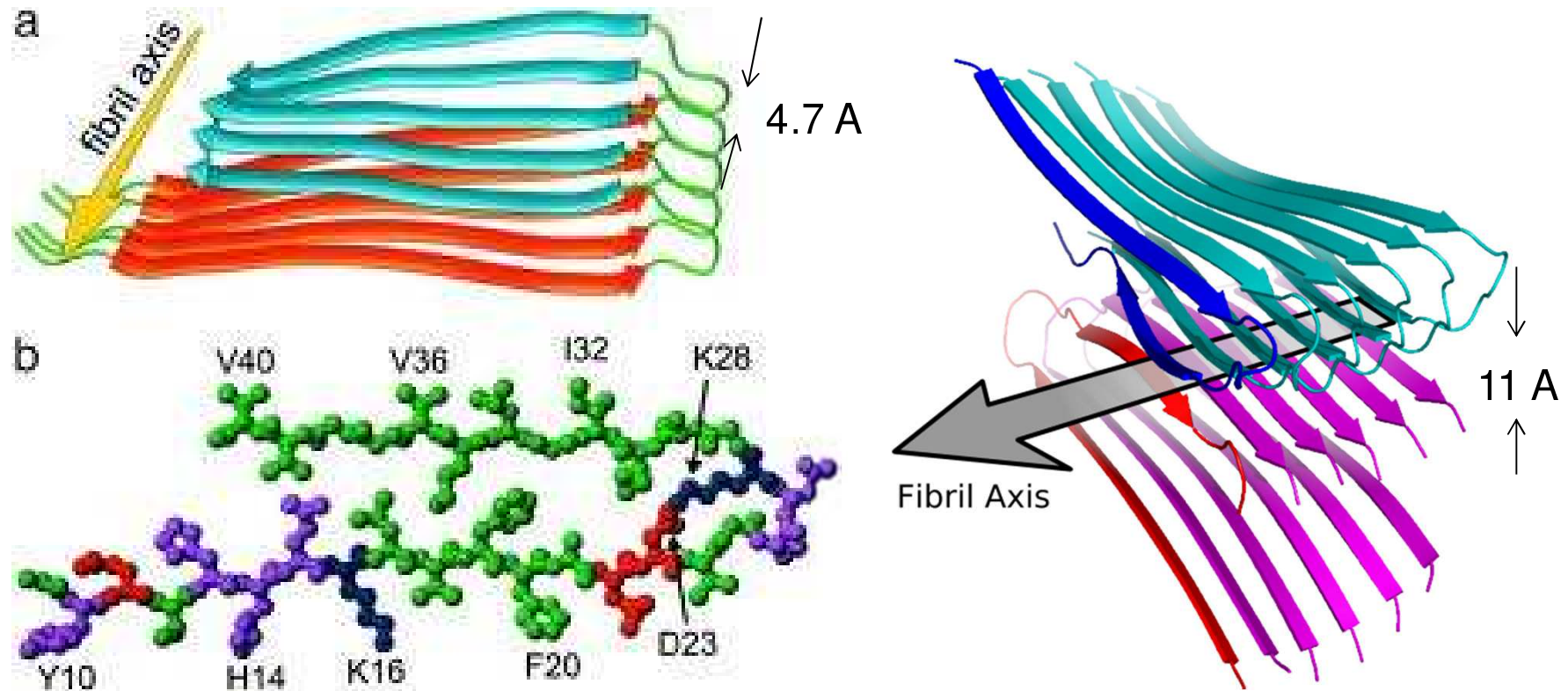
[Kirschner et al., *Biophys. J.*, 64 (1993) 502]

- Experiments usually lack sufficient resolution to solve the structure at the atomic level



# Приклади амилоїду

- модель Тико для A $\beta$ 40



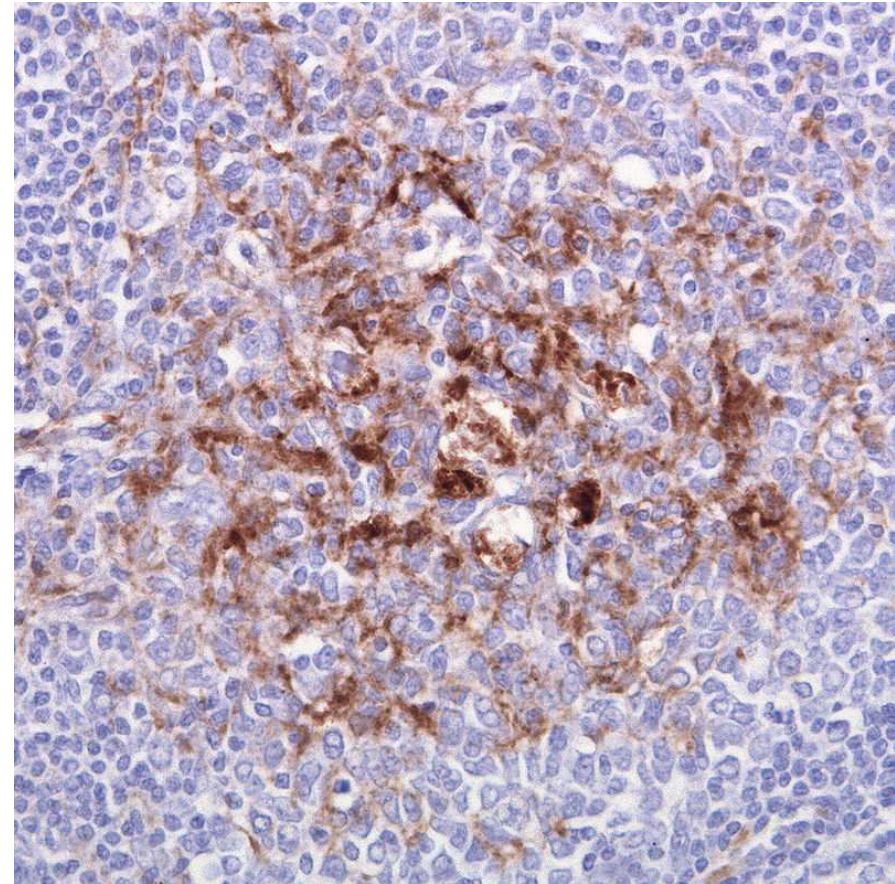
Petkova AT, et al., (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* 99(26):16742–16747

● Deposits of a number of proteins (>20) are linked to diseases:

| Amyloidogenic protein                    | Disease  | Tissue distribution of protein deposits |
|--|--|---|
| Prion protein and its fragments          | Creutzfeld–Jacob disease (CJD)<br>Gerstmann–Straussler–Schneiker syndrome (GSS)<br>Fatal familial insomnia (FFI)<br>Kuru<br>Bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie           | Brain                                   |
| Amyloid- $\beta$ and its fragments       | Alzheimer’s disease (AD)<br>Dutch hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (HCHWA, also known as cerebrovascular amyloidosis)<br>Congophilic angiopathy                           | Brain<br>Brain, spinal cord             |
| Huntingtin                               | Huntington Disease   | Brain                                   |
| Islet amyloid polypeptide (IAPP, Amylin) | Pancreatic islet amyloidosis in late-onset diabetes (type II diabetes mellitus)  | Pancreas                                |
| $\alpha$ -Synuclein                      | Parkinson’s disease (PD)<br>Diffuse Lewy bodies disease (DLBD)<br>Lewy bodies variant of Alzheimer’s disease (LBVAD)<br>Dementia with Lewy bodies (DLB)<br>Multiple system atrophy (MSA) | Brain                                   |
| Insulin                                  | Injection-localized amyloidosis  | Skin, muscles                           |

# Хвороба Кройцфельда — Якоба

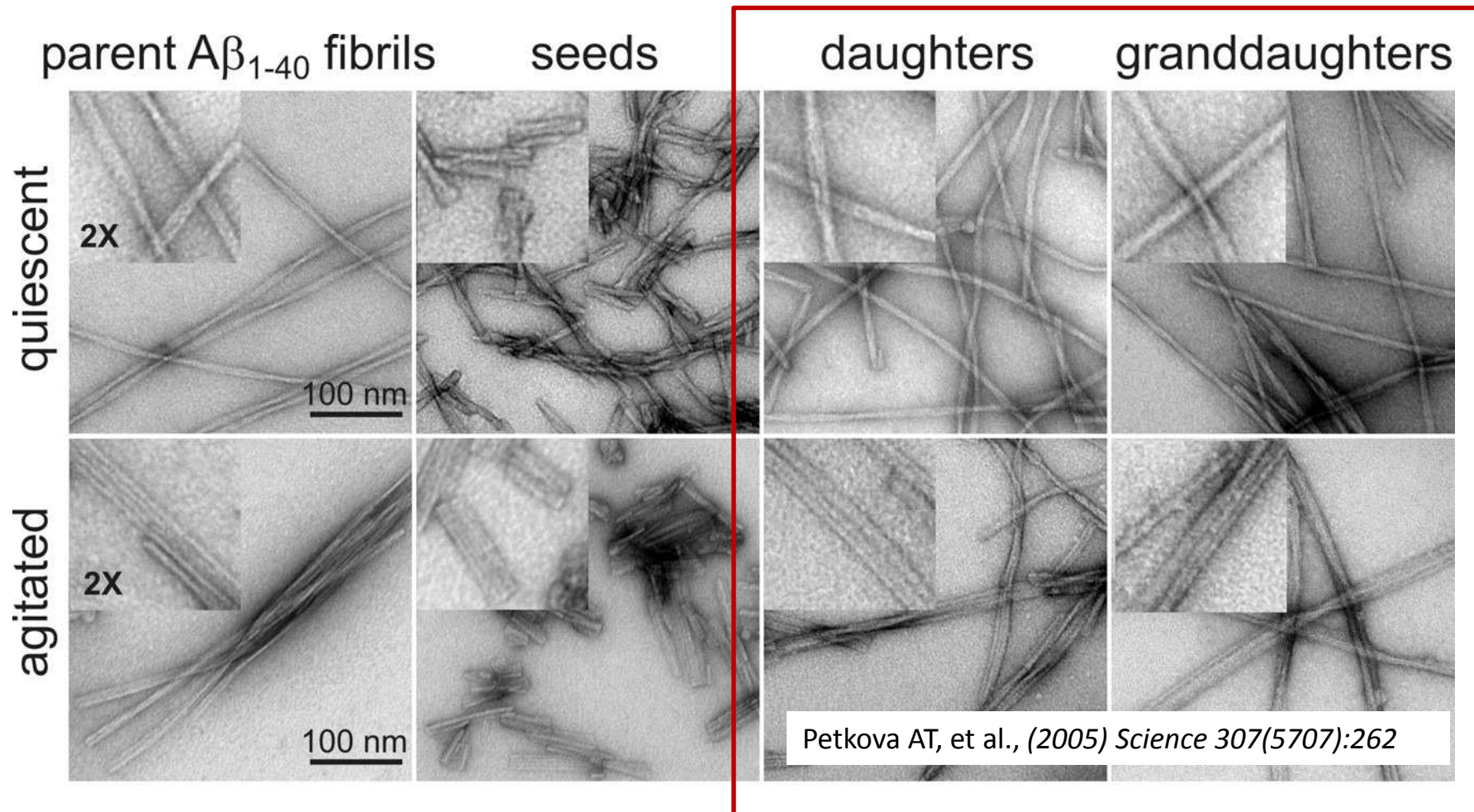
- Нейродегенеративне захворювання людини і тварин з утворенням губчастої енцефалопатії, яке належать до групи повільних інфекцій і характеризується ураженням центральної нервової системи (ЦНС), м'язової, лімфоїдної та інших систем. Завжди закінчується летально.
- Присутні амилоїдні депозити пріону
- Може передаватися від тварин до людей навіть за наявності стерилізації
- Характерна присутність різних *штамів*



Мозок уражений ХВЯ набуває форми губки

# Структурний поліморфізм

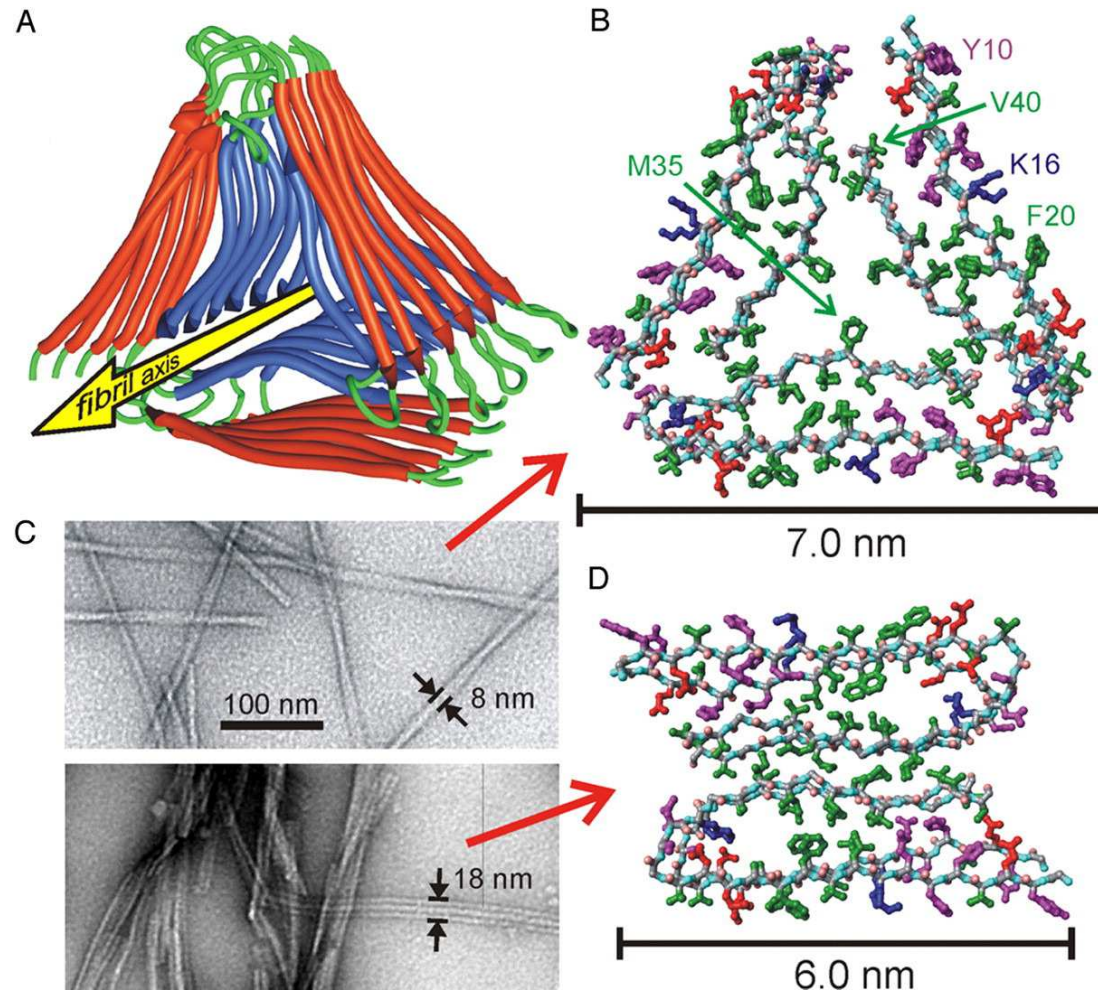
- Морфологія фібрили залежить від умов її утворення
- Структура зародка передається **незалежно** від умов середовища росту



- Молекулярний механізм явища штамів?

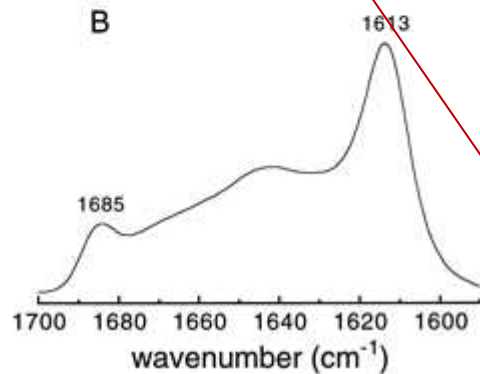
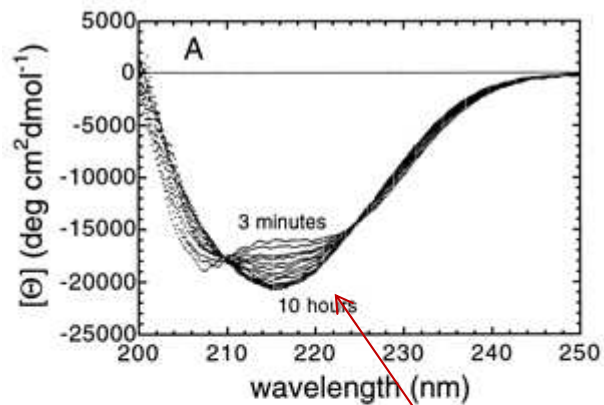
Ріст фібрили в стані спокою з відповідного зародка

- Відмінності сягають рівня індивідуальних молекул

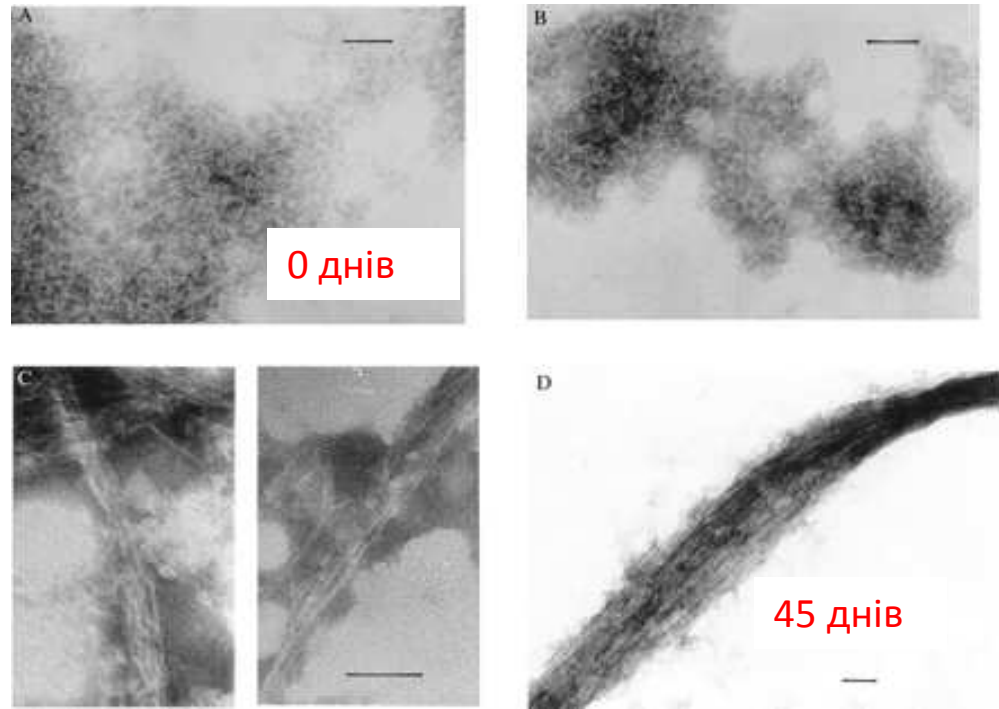


# Амілоїд як новий стан білка

- Білок ацетилфосфатаз (AcP) здатний утворювати амілоїдні фібрили при певних термодинамічних умовах
- Головна умова – білок повинен бути повністю або частково розгорнутим



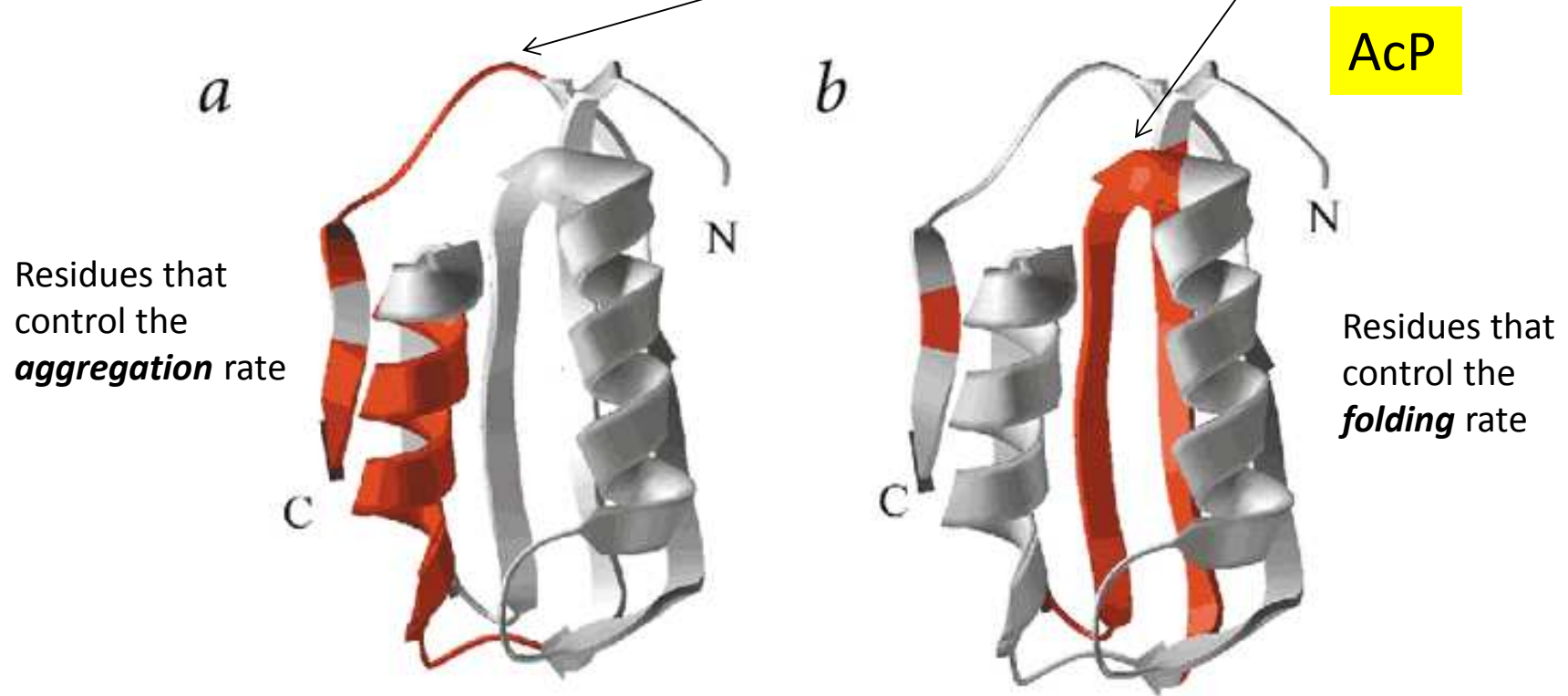
Сигнал який вказує на утворення амілоїду



Chiti, et al., (1999) *PNAS* 96, 3590

# Кінетичні передумови агрегації

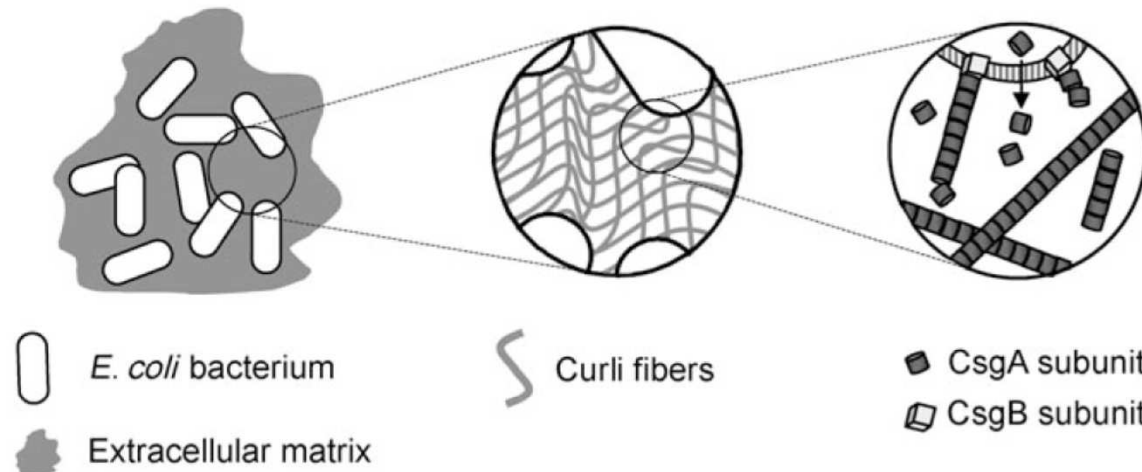
- Сегменти амінокислотних залишків що відповідають за агрегацію та згортання білка не перетинаються



- Different evolutionary mechanisms governing folding and aggregation?

# Чи дійсно фібрили пов'язані виключно з хворобами?

- biofilms



Fibrils of curli proteins:

*protect against chemical and mechanical stresses*

*are resistant to proteolysis*

*essential for the biofilm architecture*

**Figure 2.** Schematic illustration of the amyloid curli component of the bacterial extracellular matrix. The formation of the bacterial biofilm (left) is facilitated by the production of a network of curli fibers (middle). CsgA, the major curli subunits, are secreted by bacteria and self-assemble into amyloid fibers extracellularly (right). As a rule, the assembly of curli fibers is initiated by a “nucleator” protein, CgsB, which is anchored to the bacterial membrane.

● biosynthesis

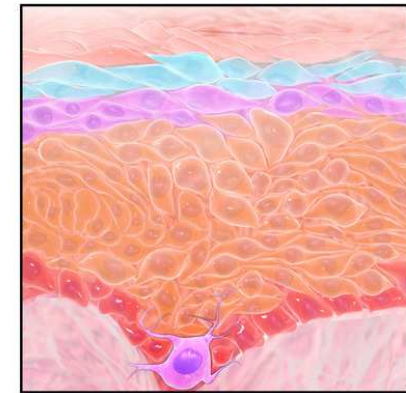
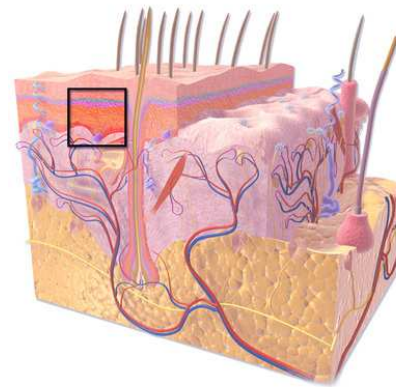
*Melanin - a pigment found in skin cells.*

*- Consists of polymerized tyrosine and its derivatives*

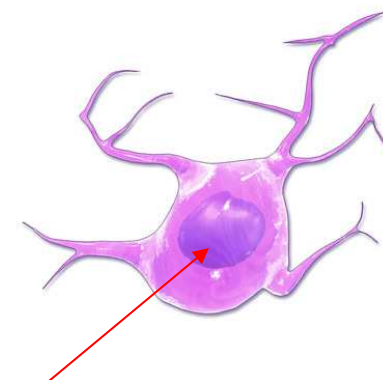
*- Excellent photoprotector. Absorbs 99% of UV light*

*- Synthesized in response to DNA damage by UVB light = the origin of tan*

Melanosome = specialized organelle in which synthesis of melanin takes place

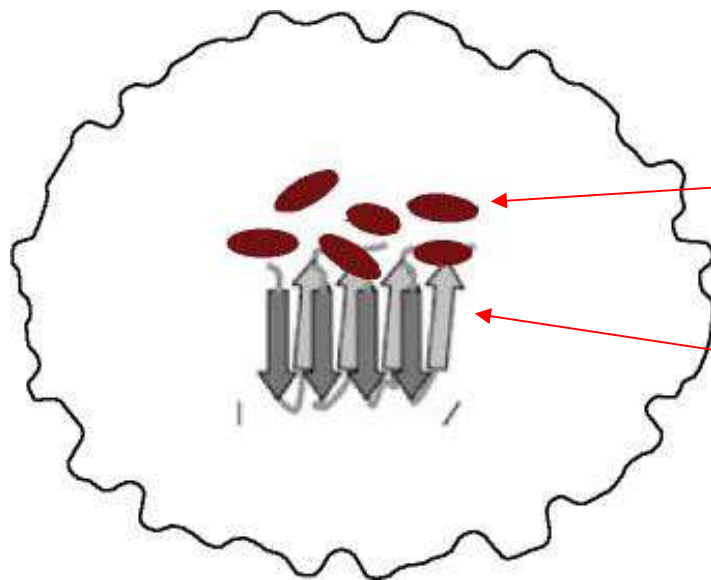


**Melanocyte**  
*cell that produces melanin*



*Pigment*

*Fibrils of Pmel17 protein*



Fibrils provide scaffold on which synthesis occurs

# Механічні властивості фібрил

**Table 1:** Comparison of the measured mechanical properties of amyloid fibrils, peptide nanotubes, and spider silk.

|                         | Amyloid fibrils <sup>[5,90]</sup> | Phe-Phe nanotubes <sup>[91]</sup> | Spider silk <sup>[92-94]</sup> |
|-------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| Stiffness [GPa]         | –                                 | $160 \times 10^{-9}$              | < 30                           |
| Strength [GPa]          | $0.6 \pm 0.4$                     | –                                 | 0.9–1                          |
| Bending rigidity [Pa]   | $(9.1 \pm 1) \times 10^{-26}$     | –                                 | –                              |
| Shear modulus [GPa]     | $0.28 \pm 0.2$                    | –                                 | 2.38                           |
| Thermal stability [°C]  | $\geq 130$                        | $\geq 150$                        | 230                            |
| Torsional rigidity [Pa] | $(1.6 \pm 1.1) \times 10^{-26}$   | –                                 | –                              |
| Young's modulus [GPa]   | $3.3 \pm 0.4$                     | $\approx 19$                      | 11–13                          |

stronger than steel,  
**0.5Gpa**

more flexible than silk

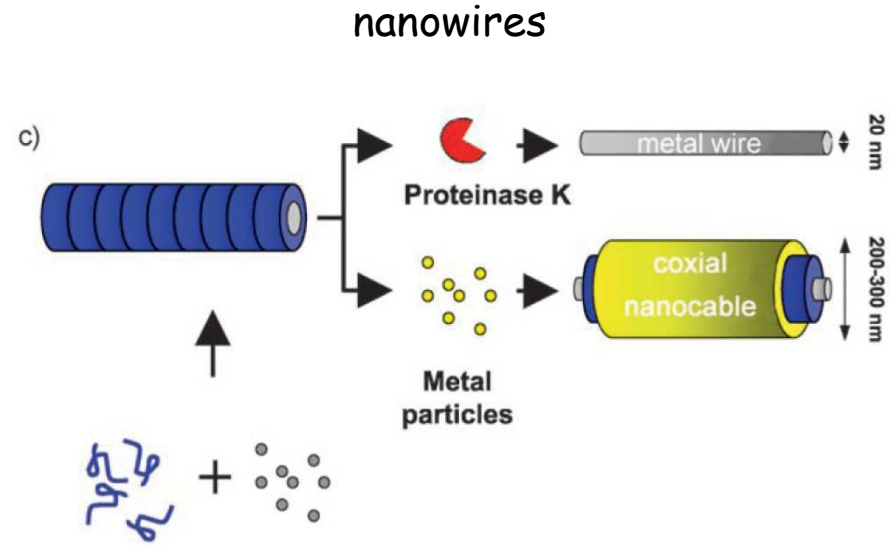
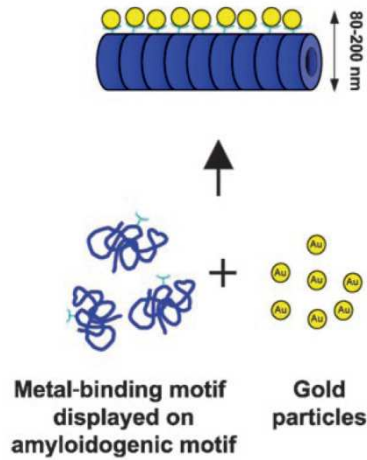
- Characteristics shared with synthetic polymers:

- *stability against chemical modification and thermal treatment*
- *structural isomorphism = reproducibility*
- *structural polymorphism of monomer = plasticity*
- *sequence variability = adaptivity*

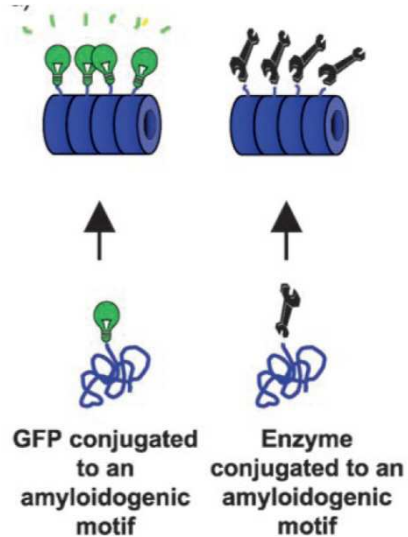
- fibrils are suitable materials at nanoscale

# Фібрили в матеріалознавстві

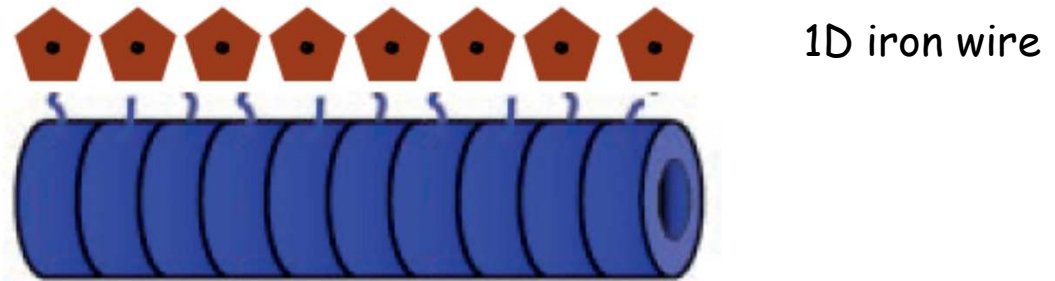
- functional templates



## Biofunctional materials

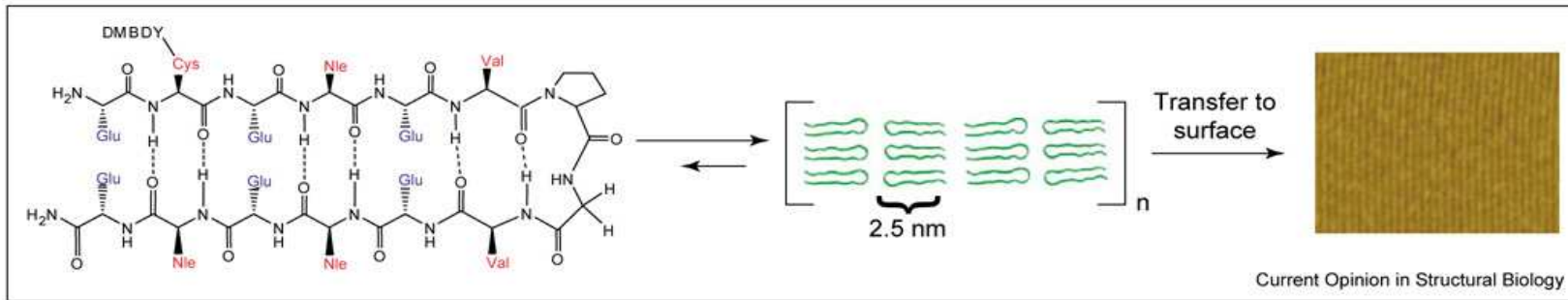


CytB - protein that binds a *heme* group



*Long-distance electron transfer*

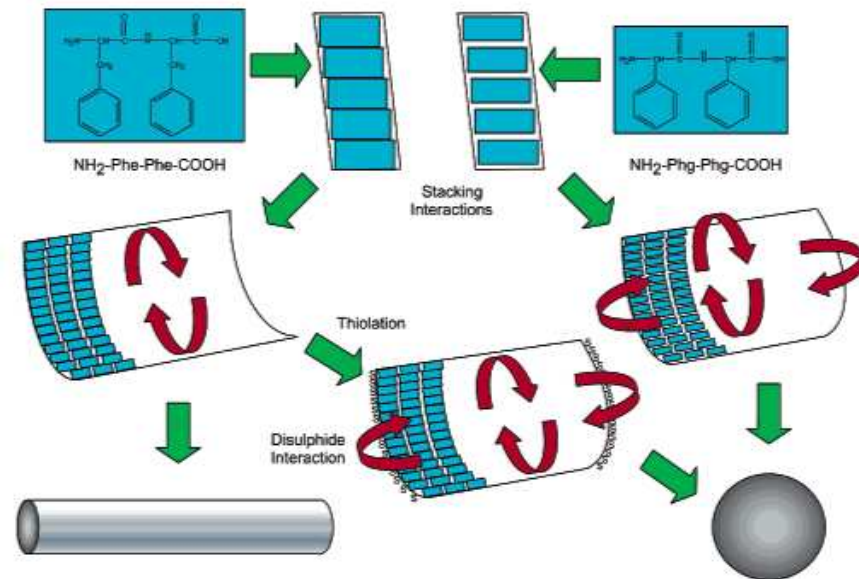
- Layers, coatings.



Use of peptides to form nanoscale-ordered monolayers. An amphiphilic  $\beta$ -hairpin undergoes ordered self-assembly at the air/water interface. Resultant Langmuir-Blodgett films can be transferred to mica for AFM characterization using single-wall carbon nanotube tips. The image shows the expected 2.5 nm spacing consistent with ordered hairpin assembly. DMBDY is a dimethyl derivative of BODIPY, a fluorescent label used for imaging.

Current Opinion in Structural Biology 2004, 14:480–486

- Nano-tubes and nano-spheres. [Gazit et al., *Nano Lett*, 4 (2004) 581]



Nano Lett., Vol. 4, No. 4, 2004

- Other applications:

*Scaffolds for tissue engineering and regeneration*

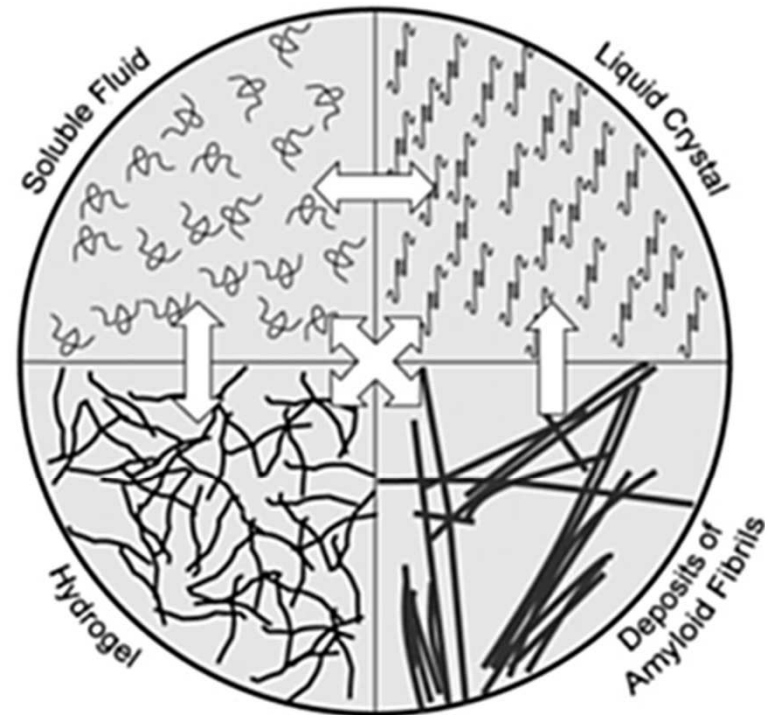
*Matrices for controlled drug release and delivery*

*Biosensors and bioswitches*

*Coatings for analytical and medical instruments*

*Biocatalytic scaffolds*

*Scaffolds for cell cultures*



**Figure 4.** Ultrastructures of phases displayed by amyloidogenic sequences. The scheme shows the general arrangement of soluble monomers (top left) and assembled fibers (or fibrils) in different possible structural phases. Reported transitions between phases are indicated by arrows.

**Beta-Amyloid  
Plaque**

