

# **Rekombináns párválasztási technikák: T2DM és SRNS betegségekben szerepet játszó fehérjék és peptidek előállítása és biofizikai vizsgálata**

Doktori (Ph.D) értekezés

Stráner Pál



Témavezető: Dr. Perczel András

**Eötvös Loránd Tudományegyetem Biológiai Doktori Iskola**

Doktori Iskola vezetője: Dr. Erdei Anna

**Szerkezeti Biokémia Doktori Program**

Programvezető: Dr. Kovács Mihály

**Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar**

MTA-ELTE Fehérjemodellező Kutatócsoport

# Tartalomjegyzék

<b>Felhasznált publikációk.....</b>	<b>3</b>
<b>Köszönetnyilvánítás .....</b>	<b>4</b>
<b>Előszó .....</b>	<b>5</b>
<b>Rövidítésjegyzék.....</b>	<b>6</b>
<b>1. Bevezetés.....</b>	<b>7</b>
1.1. Bevezetés – Bakteriális Heterológ Expresszió.....	7
1.1.1. Előzetes megfontolások – <i>nGLP-1r</i> expresszió.....	15
1.1.2. Előzetes megfontolások – „cell-free” expresszió .....	19
1.1.3. Előzetes megfontolások – Minifehérjék expressziója.....	23
1.1.4. Előzetes megfontolások – <i>Podocin</i> expressziója.....	23
1.2. Bevezetés - <i>Podocin</i> .....	24
1.2.1. Genetikai háttér .....	24
1.2.2. Szerkezeti háttér.....	26
1.3. Bevezetés – <i>GLP-1R</i> .....	30
1.4. Bevezetés - Minifehérjék .....	32
<b>2. Anyagok és módszerek .....</b>	<b>35</b>
2.1. DNS-konstrukciók.....	35
2.1.1. <i>pET-32b</i> alapú fúziós vektorcsalád ( <i>p32FUS</i> ) .....	35
2.1.2. <i>Cell-free</i> expresszióhoz kialakított DNS konstrukciók .....	36
2.1.3. További felhasznált DNS konstrukciók.....	36
2.1.4. Alkalmazott baktériumtörzsek .....	36
2.2. <i>E. coli</i> heterológ expresszió és az egyes fehérjék tisztítása, előállítása.....	37
2.2.1. <i>Triptofán</i> kalitkás minifehérjék.....	37
2.2.2. <i>Podocin H1 (coiled coil) fragmens</i> .....	37
2.2.3. <i>SPFH</i> fragmensek.....	38
2.2.4. <i>nGLP1r</i> előállítás, renaturálás, és tisztítás.....	38
2.2.5. Bakteriális expresszió és a fehérjék tisztításának költségszámítása.....	40
2.3. <i>Cell-free</i> expresszió.....	41
2.3.1. <i>S30</i> sejtextraktum preparálása.....	41
2.3.2. <i>T7 RNS</i> polimeráz előállítása és tisztítása .....	42
2.3.3. <i>MSP</i> fehérje előállítása és tisztítása.....	42
2.3.4. Analitikai léptékű <i>Cell-free</i> expresszió.....	43
2.4. <i>GLP-1R</i> agonisták tesztelése.....	44

2.5. Fehérje-fehérje interakciós és spektroszkópiai módszerek .....	44
2.5.1. CD-spektroszkópia .....	44
2.5.2. Fluoreszcens jelölés.....	45
2.5.3. FRET mérések .....	45
2.6. Molekuladinamika.....	45
2.7. Bioinformatikai elemzések.....	45
<b>3. Célkitűzések.....</b>	<b>46</b>
<b>4. Eredmények.....</b>	<b>48</b>
4.1. Eredmények – Bakteriális expresszió .....	48
4.1.1. Eredmények – Bakteriális expresszió: DNS-munka .....	48
4.1.2. Eredmények – Bakteriális expresszió – nGLP-1R.....	50
4.1.2. Eredmények – Cell-free expresszió .....	58
4.1.3. Eredmények – Bakteriális expresszió: Minifehérjék .....	59
4.1.4. Eredmények – Bakteriális expresszió - Podocin .....	61
4.1.5. Bakteriális expresszió költségszámítása.....	63
4.2. Eredmények – Exendin-4 analóg molekulák tervezése, előállítása és vizsgálata 68	
4.2.1. Eredmények – Különböző hosszúságú minifehérjék ECD mérései .....	69
4.2.2. Eredmények – Különböző hosszúságú minifehérjék NMR analízise .....	71
4.2.3. Eredmények – Ex-4 és analógjai közötti térszerkezeti különbségek.....	75
4.2.4. Eredmények – További NMR vizsgálatok.....	75
4.2.5. Eredmények – in vitro bioaktivitás teszt.....	76
4.3. Eredmények - Podocin .....	78
4.3.1. Podocin szerkezet-funkció összefüggései .....	78
4.3.2. A podocin fehérje-fragmensek előállítása .....	80
4.3.3. A Hélix1 domén vizsgálata .....	81
4.3.4. Intracelluláris fragmensek FRET vizsgálata.....	85
4.3.5. Homológia modellezés.....	86
<b>5. Eredmények megvitatása .....</b>	<b>90</b>
5.1. Bakteriális expresszió.....	90
5.2. Exendin-4 analóg minifehérjék biofizikai vizsgálata.....	93
5.3. A podocin dimerizációjának biofizikai vizsgálata .....	95
<b>Összefoglalás.....</b>	<b>101</b>
<b>Summary.....</b>	<b>103</b>
<b>Függelék.....</b>	<b>105</b>
<b>Irodalomjegyzék.....</b>	<b>114</b>

## Felhasznált publikációk

- **Pál Stráner, Eszter Balogh, Gusztáv Schay, Christelle Arrondel, Ágnes Mikó, Gerda L'Auné, Alexandre Benmerah, András Perczel, Dóra K. Menyhárd, Corinne Antignac, Géraldine Mollet, Kálmán Tory**; C-terminal oligomerization of podocin mediates interallelic interactions; *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 1864 (7) 2448-2457 (2018)*
- **Pál Stráner, Nóra Taricska, Mária Szabó, Gábor K. Tóth, András Perczel**; Bacterial expression and/or solid phase peptide synthesis of 20-40 amino acid long polypeptides and miniproteins, the case study of Class B GPCR ligands; *Curr. Prot. Pept. Sci. 17(2):147-155. (2016)*
- **Petra Rovó, Viktor Farkas, Pál Stráner, Mária Szabó, Ágnes Jermendy, Orsolya Hegyi, Gábor K. Tóth, András Perczel**; Rational Design of  $\alpha$ -Helix-Stabilized Exendin-4 Analogues; *Biochemistry 53 (22):3540-3552. (2014)*
- **Kálmán Tory, Dóra K. Menyhárd, Stéphanie Woerner, Fabien Nevo, Olivier Gribouval, Andrea Kerti, Pál Stráner, Christelle Arrondel, Evelyne Huynh Cong, Tivadar Tulassay, Géraldine Mollet, András Perczel, Corinne Antignac**; Mutation-dependent recessive inheritance of NPHS2-associated steroid-resistant nephrotic syndrome; *Nat. Genet. 46:299–304 (2014)*
- **Petra Rovó, Pál Stráner, András Láng, István Bartha, Kristóf Huszár, László Nyitrai, András Perczel**; Structural insights into the Trp-cage folding intermediate formation; *Chem. Eur. J. 19(8):2628-2640. (2013)*

## További publikációk

**Péter Hudáky, Pál Stráner, Viktor Farkas, Györgyi Váradi, Gábor Tóth, András Perczel**; Cooperation between a salt bridge and the hydrophobic core triggers fold stabilization in a Trp-cage miniprotein; *Biochemistry 47(3):1007-1016. (2008)*

**Bodor Andrea, Farkas Viktor, Harmat Veronika, Jákli Imre, Karancsiné Menyhárd Dóra, Stráner Pál, Perczel András**; Kémlelni a láthatatlant: építőelemek, foldamerek, peptidek, és fehérjék; *Magyar Kémiai Folyóirat – Kémiai Közlemények 118:159-167. (2012)*

## **Köszönetnyilvánítás**

Először is szeretnék köszönetet mondani dr. Perczel András témavezetőmnek, aki mint biológus hallgatót kutatócsoportjába hívott, majd a kezdeti NMR-asszignációs feladatok után, az ELTE TTK Biokémia Tanszékére, dr. Nyitray László laboratóriumába küldött, hogy ott a bakteriális expresszió alapjait elsajátítsam. Ezt követően bízott meg egy bakteriális expressziós laboratórium kiépítésére, amelyhez szabad kezet adott.

Neki, és dr. Nyitray Lászlónak is köszönetet mondanék, hogy bár hallgató koromban tanulmányilag „nem teljesen nőtt be a fejem lágya”, mindvégig megbíztak bennem szakmailag.

Szeretném megköszönni az ELTE TTK Biokémia Tanszék, ELTE TTK Kémiai Intézet Szerkezeti Kémia és Biológia Kutatócsoport, és az MTA ELTE Fehérjemodellező Kutatócsoport tagjainak a doktori munkám során nyújtott segítséget. Közülük kiemelném dr. Bodor Andreát, dr. Karancsiné dr. Menyhárd Dórát, Taricska Nórát, dr. Jákli Imrét, dr. Láng Andrást, dr. Süveges Dánielt, akik segítségével ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.

Külön köszönet illeti dr. Tory Kálmánt, aki a podocin fehérje vizsgálatába bevont és a kezdeti nehézségek ellenére mindvégig megbízott az általam végzett munkában. Ebben a témában öröm volt Balogh Eszterrel, Mikó Ágnessel és dr. Schay Gusztávval, a Semmelweis Egyetem munkatársaival az együttműködés.

Annak ellenére, hogy mérhető szakmai eredménye nem volt, szeretnék köszönetet mondani dr. Frank Bernhardnak, hogy lehetőséget biztosított a *cell-free* expresszió elsajátításához. Külön köszönet illeti dr. Orbán Erikát, akivel egy feledhetetlen fél évet töltöttem Frankfurtban ennek kapcsán.

Végezetül, szeretnék köszönetet mondani családomnak, feleségemnek és két fiamnak, akik végtelen türelemmel viselték el a doktori munkához kapcsolódó élethelyzeteimet.

## **Előszó**

Témavezetőmtől többször hallottam az alábbi két gondolatot: nevezetesen, hogy a doktori munka célja nem a szükséges publikációk teljesítése, hanem annak bizonyítása, hogy a jelölt képes az önálló kutatásra, valamint, Albert Einstein után szabadon azt, hogy a kutatás 90% kitartás, 10% zsenialitás.

A doktori munkám kitűzött célját, egy három diszulfidhíddal rendelkező fehérje előállítását, majd NMR-spektroszkópiával történő vizsgálatát nehéz volt egy 10%-os felszereltséggel rendelkező expressziós laborban végezni, ahol az inkubátoros rázaton kívül, ultrahangos sejtroncsoló, centrifuga, egy gélelektroforézis-rendszer és egy kombinált hűtő állt rendelkezésemre. Ezért a labor folyamatos fejlesztésének feladatát is megkaptam témám mellé. Egy közel két millió forintos autokláv volt az első nagyobb beszerzésünk, amelyet a többi eszköz (ultramélyhűtő, kromatográfias rendszer, PCR-készülék, stb.) beszerzése csak évekkel később követett. A készülékek vásárlását egyrészt nehezítette a szűkös pályázati forrás és elköltésének gyakran körülményes menete, másrészt témavezetőm minden esetben elvárta a részletes szakmai indoklást valamint megfelelő ár-értékarányú eszköz felkutatását, mivel a cél egy hosszútávon fenntartható labor kialakítása volt. Sokéves munka eredményeként mára az ELTE TTK Kémia Intézetben egy teljes értékű bakteriális expressziós labor működik, amely lehetővé teszi a DNS-konstrukció kialakításától a célfehérje tiszta előállítását szerkezetkutatási célokra. Az erre fordított időm tetemes volt, s noha mindez doktori munkaként „el nem számolható”, mégsem tartom elvesztegetettnek, hiszen ezáltal egy pályázat nemcsak szakmai, hanem finanszírozási és kivitelezhetőségi szempontjait is megismertem.

Az egyik eredeti célomat, nevezetesen a GLP1-R extracelluláris részének térszerkezet-vizsgálatát nem sikerült teljesen elérnem, aminek az egyik oka annak a megtapasztalása, hogy a publikációkban nem feltétlenül ismertetik a felmerülő problémákat, esetenként a módszerleírások nem helyesek, nem működnek valamilyen „rejtélyes faktor” hiánya miatt. Ezért dolgozatomban a beszámolok a megvalósítás problémákról is, mivel ezek – a maradék 90% – megtapasztalása is a kutatómunka része, még akkor is ha a legvégén az adott problémát esetleg nem sikerül megoldani. Ezek leírása, számbavétele fontos, értékeléséből rengeteget lehet tanulni – ami át- és továbbadható – még akkor is ha tényleges végeredmény hiányában nem vagy csak nehezen publikálható.

## Rövidítésjegyzék

ACN	Acetonitril
ADP	Adenozin-difoszfát
ATP	Adenozin-trifoszfát
cAMP	Ciklikus adenozin-monofoszfát
cAMP-GEF	cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor
CSD	Chemical Shift Deviation
C-term	C-terminális
C. elegans	Caenerhobits elegans
DPP-4	Dipeptidil-peptidáz-4
Dsb	Disulphie isomerase /Diszulfid Izomeráz
DTT	Ditioltreitol
E. coli	Escherichia coli
CD	Circular Dichroism
ER	Endoplazmatikus retikulum
ESRD	End stage renal disease / végstádiumú veseelégtelenség
FRET	Förster resonance energy transfer
GIP	Glucose dependent insulinotropic peptide / glükóz függő inzulinszerű fehérje
GLP-1	Glucagon like peptide 1
GLP-1R	Glucagon like peptide 1 receptor
GLUT	Glucose transporter
GPCR	G-protein coupled receptor / G-fehérje kapcsolt receptor
GSH	redukált glutathione
GSSG	oxidált glutathione
GST	Glutation-S-transzferáz
HPLC	High Performance Liquid Chromatography / nagy hatékonyságú folyadékromatográfia
IMAC	Immobilized metal affinity chromatography
IPTG	Izopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid
LB	Lutia Broth média
MBP	Maltose Binding Protein / maltóz kötő fehérje
MF	McFarland egység
NMR	Nuclear Magnetic Resonance / magmágneses magrezonancia
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
NTA	Nitrilo-trieetsav
N-term	N-terminális
nGLP-1r	GLP-1 receptor extracelluláris domén
PAGE	Poliakrilamid gélelektroforézis
PDB	Protein Data Bank
PKA	Protein kináz A
RCF	Relative centrifugal force
SDS	Nátrium-dodecil-szulfát
SRNS	Szteroid rezisztens nefrotikus szindróma
SUMO	Small Ubiquitin like Modifier
T2DM	Type II Diabetes Mellitus / 2-es típusú cukorbetegség
T7RNAP	T7 RNS polimeráz
Tris	Trisz-(hidroximetil)-amino-metán
Trx	Thioredoxin
YUH	Yeast Ubiquitin Hydrolase – Élesztő Ubikvitin hidroláz

# 1. Bevezetés

A fehérjék számos betegség kialakulásában és gyógyításában központi szerepet játszanak. Mutációik miatt bekövetkező szerkezeti változások miatt nem, vagy csak részben tudják betölteni eredeti, az evolúció során kialakult funkciójukat. Vannak olyan betegségek, melyekben a fehérjék gyógyszerészeti célpontok, és olyanok melyekkel kapcsolatban a hatóanyag szerepét töltik be. Doktori munkám két betegség, a II-es típusú cukorbetegség (T2DM) gyógyszerészeti célpontjában levő Glucagon like-protein-1 receptor (GLP-1R) és ligandumainak kölcsönhatás-vizsgálatát, illetve a szteroid rezisztens nefrózist (SRNS) okozó podocin pontmutációi okozta szerkezetváltozások miatt bekövetkező funkcióvesztés okainak felderítését tűzte ki célul.

A fehérjék szerkezet-funkció összefüggéseinek felderítését ígérő spektroszkópai módszerek sikerének előfeltétele a fehérjék tiszta előállítása, melynek bevált módja a heterológ bakteriális expresszió.

## 1.1. Bevezetés – Bakteriális Heterológ Expresszió

A rekombináns fehérjék előállításának lehetősége különböző mikroorganizmusokban mára forradalmasította a biokémia számos tudományterületét. A fehérjék előállítása és tisztítása egy új kutatói projekt során kulcsfontosságú, sikeressége a kutatást nagymértékben meghatározza. Elméletileg egyszerű a több évtizedes irodalmi tapasztalatok birtokában egy-egy rekombináns fehérje előállítása: az adott gént a megfelelő expressziós vektorba klónozva, a választott mikroorganizmusba transzformálva, majd azt indukálva kinyerhető a megfelelő mennyiségű fehérje, melyet a tisztítást követő biofizikai jellemezések tesznek teljessé. A hétköznapi gyakorlat azonban néha igen csak más képet mutat: gyakori gond a célfehérje alacsony koncentrációja és/vagy kinyerhetősége, azok denaturált formájának inklúziós testbe záródása, vagy a tisztított forma inaktivitása. Ezeket a problémákat okozhatja akár a fehérje térszerkezete, a nem-megfelelően kialakuló téralkat, a poszttranszlációs módosulások hiánya, a fehérje citotoxicitása, stb. E gondok nem feltétlenül váratlanok, hiszen a gyakran alkalmazott *E. coli* prokarióta sejtben legtöbbször eukarióta fehérjét próbálunk előállítani (heterológ expresszió). Míg az elérhető szakirodalom tele van sikeres expressziós eredményekkel, addig a sikertelen esetek legtöbbször dokumentálatlanok maradnak, és újra elkövetődnek ugyanazok a hibák.

A doktori munkám során három különböző eukarióta fehérje vagy mesterségesen tervezett fehérjecsalád szerkezetalapú vizsgálatát terveztük, mely feladat sikeres elvég-



zéséhez nélkülözhetetlen volt nagy mennyiségben és tisztaságban előállítanom azokat. Gazdasejtként *E. coli*-t választottam, hogy a doktori munka során a kutatócsoport fokozatosan kiépülő bakteriális expressziós laboratóriumában (ld. *Előszó*) egyre hatékonyabban és rutinosabban tudjunk fehérjéket előállítani.

Az *E. coli*-nak számos előnyös tulajdonsága közé tartozik, hogy optimális körülmények között (hőmérséklet, tápoldat összetétel) rendkívül gyorsan nő: a körülbelül 20 perces duplázódási ideje a gyakorlatban azt jelenti, hogy az ún. „starter kultúrából” 1/100 arányban indított nagy expresszió során a stacionárius fázis elérése pár óra<sup>1</sup>. Nagy sűrűségű sejt kultúra is elérhető, melynek elméleti maximuma  $1 \times 10^3$  sejt/ml, azaz megközelítőleg 200 g száraz sejt tömeg/L tápoldat<sup>2</sup>. Gyakorlatban ennek kevesebb mint 0,1%-a érhető el ( $< 1 \times 10^{10}$  sejt/ml), hiszen a rekombináns fehérje termelésére készítés (indukálás) jelentősen megterheli a sejt metabolikus rendszerét, mely a generációs idő csökkenéséhez is vezet<sup>3</sup>. További előny, hogy a tápoldat aránylag olcsó vegyszerekből áll, valamint hogy a külső eredetű DNS transzformálása egyszerű és gyors folyamat<sup>4</sup>. Az expresszióra használt baktérium törzs típusának kiválasztása széles körben oldható meg, ám általánosnak tekinthető a kezdeti próbatermelésre (ún. „screen”-re) a BL21 törzset használata<sup>5</sup>.

A gazdaszervezet mellett fontos az expressziós vektor típusa is, melyek kereskedelmi forgalomban elérhető száma nagy. Legelterjedtebbnek a pET vektor család mondható, melyben a célgént a T7 promóter klónozó helyek egyikébe (MCS - Multi Cloning Site) ültethetjük be<sup>6,7</sup>. A vektor használata során figyelniük kell a megfelelő T7 RNS polimerázt (T7RNAP)<sup>8</sup> profágként a genomjában tartalmazó baktérium törzs használatára ( $\lambda$ DE3), illetve ko-expresszálas esetén a plazmid inkompatibilitásra is<sup>9,10</sup>.

Az előállítandó fehérje típusa, jellege több problémát is okozhat, ennek első jele, hogy alacsony koncentrációban termelődik az indukálást követően, vagy a tisztítási lépések során nem vagy alig nyerhetőek ki. Indukció előtt is történhet célfehérje átírás transzláció-transzkripció a tápoldat laktóz tartalma következtében, az ekkor fellépő citotoxikus hatás megakadályozható a laktóz-permeáz gátlásával glükóz forrás hozzáadással. További lehetőség pLysS/pLysE vektorok ko-transzformálása, vagy az ezt tartalmazó baktérium törzs használata, mivel a képződő T7 lizozim gátolja a T7RNAP működését. Lehetséges még más promóter használata vagy speciális, kifejezetten citotoxikus fehérjék termelésére kifejlesztett baktérium törzsek alkalmazása (Lemo21, C41, C43), illetve a szignálszekvenciával célfehérjének a periplazmatikus térbe történő irányítása (pelB – pET-22b).

A fehérje sikeres termelését követően problémát jelenthet a célfehérje oldhatatlan csapadékba, ún. inklúziós testbe kerülése, a nem-megfelelően kialakuló térszerkezete miatti inaktivitása, illetve akár elválasztása a baktérium többi fehérjéjétől. Inklúziós testbe kerülés esetén, amely diszulfidhidas fehérjék esetében gyakori, az onnan történő izolálást követően elméletileg a denaturált fehérje natív foldja előállítható, más kérdés, hogy ez többnyire nehézkes, a végeredmény is kérdéses<sup>11</sup>.

Szolubilis termeltetés esetében a következő lépés a fehérje nagy tisztaságban történő izolálása. Ennek első lépése a célfehérje a baktérium többi fehérjéjétől történő elválasztása, mely kivitelezhető akár klasszikus kémiai (kicsapás, kiforrálás), akár adszorpciós kromatográfias módszerekkel. A különböző affinitás-, ioncsere- és gélszűrési-kromatográfiai eljárások egymásra épülő lépéseit követően a célfehérje akár 99%-os tisztaságban is előállítható.

A kromatográfias tisztítási lépéseket nagymértékben segítik az ún. fúziós partnerek vagy fúziós fehérjék (ún. „tag”-ek, magyarul címkék). Ezek olyan kisebb (6-10 aminosav-tagszámú) peptidek vagy nagyobb méretű globuláris fehérjék, amelyek

- i) lehetővé teszik az adott célfehérje hatékony tisztítását adszorpciós kromatográfias lépéssel;
- ii) megvédik a célfehérjét a proteolízistól (kisebb fehérjék / peptidek)<sup>12</sup>;
- iii) segíthetik a fehérjék feltekeredését, a megfelelő térszerkezetének kialakulását, kialakítását<sup>13</sup>;
- iv) növelik a hozamot és az oldhatóságot<sup>14,15</sup>;
- v) többnyire nem módosítják a célfehérje harmadlagos szerkezetét;
- vi) eltávolíthatók specifikus proteáz hasítással.

A címkék alkalmazásának hátránya, hogy esetleges kölcsönhatásuk a célfehérjével megváltoztathatja annak térszerkezetét<sup>16</sup> vagy aktivitását<sup>17</sup>. Emiatt a fúziós rendszer tervezésekor figyelemmel kell venni a címke eltávolításának módját és lehetőségét, amely történhet kémiai vagy enzimatis útton is. A kisebb tag-ek előnye, hogy többnyire nem interferálnak a célfehérjével, így nem feltétlenül kell eltávolítani arról: közvetlenül akár antigénként is felhasználhatók<sup>18</sup>. A nagyobb „tag”-eket a későbbi szerkezetvizsgálati célok miatt többnyire el kell távolítani, kivéve Carrier-driven-crystallization módszere esetében. Figyelembe kell venni továbbá, hogyha az oldhatóság fokozása a fúziós partner révén valósult meg, akkor az arról történő lehasítást követően a célfehérje nem feltétlenül marad az oldatban. Érdeemes megjegyezni, hogy a kristályosítás céljából előállított fehérjék ~75%-a fúziós konstrukcióként került expresszióra<sup>19</sup>. A

különböző fúziós fehérjék elterjedt változatait, illetve a proteázok tulajdonságait az **1. táblázat** foglalja össze.

*1. táblázat: Az elterjedt fúziós partnerek tulajdonságai*

Fúziós partner	Méret (A. sav)	Pozíció	Tisztítás	Alkalmazás célja	Megjegyzések
T7-tag <sup>20</sup>	11	N-term	mAB / alacsony pH	Tisztítás, hozamnövelés	(-) alacsony pH irreverzibilis hatás a fehérjére
Zöld Fluoreszcens fehérje (GFP) <sup>21</sup>	220	N-term / C-term	-	Detektálás	(+) ellenanyag nélküli detektálás, monitorozás (folding, targeting, interakció)
Glutathione S-transferase (GST) <sup>22</sup>	211	N-term / C-term	glutathione/ GSH	Hozamnövelés, Tisztítás, Detektálás, Szolubilizálás	(-) csak natív tisztítás, dimerizáció
Maltóz kötő fehérje (MBP) <sup>23</sup>	396	N-term	amilóz / maltóz	Hozamnövelés, Tisztítás, Detektálás, Szolubilizálás	(-) redukálószer nem alkalmazható, nagy méret (+) hozamnövelés, szolubilizálás
NusA <sup>24</sup>	495	N-term	-	Hozamnövelés Szolubilizálás	(-) nem alkalmas tisztításra, nagy méret (+) szolubilizálás,
Ketosteroid isomerase (KSI) <sup>25</sup>	125	N-term	-	Hozamnövelés	(+) IB-be targeting, (-) denaturált fehérjét refoldálni kell
Poliarginin tag <sup>24</sup>	5-8	C-term	IEX	Tisztítás	(+) Egylépes tisztítás, (-) a töltött tag zavarja a fehérjét
His-tag <sup>26</sup>	2-10	N-term / C-term	IMAC / imidazol, alacsony pH	detektálás, tisztítás	(+) 20-80%-os első tisztítás, denaturálva tisztítható, SPR-re közvetlen használható, WB detektálás, megbízhatósága kérdéses
Small Ubiquitin like Modifier (SUMO) <sup>24</sup>	100	N-term	-	Hozamnövelés, szolubilizálás	(+) in vitro és in vivo jelölés, fehérjeinterakció, bakteriális – eukarióta felhasználás
Thioredoxin (Trx) <sup>24</sup>	109	N-term / C-term	-	Szolubilizálás	(+) Hőstabil
Ubiquitin <sup>27</sup>	76	N-term	-	Hozamnövelés	(+) Szolubilizálás, (-) eukariótáknál nem jó

A doktori munkám során heterológ bakteriális expresszióval a következő feladatokat oldottam meg:

1. *Triptofán-kalitka (20-39 aminosav hosszú) szerkezeti motívummal rendelkező minifehérjék előállítása bakteriális úton azért, hogy azok térszerkezeti- és dinamikai tulajdonságaik felderítéséhez a <sup>13</sup>C és/vagy <sup>15</sup>N izotópjelölés jó hozammal és gazdaságosan legyen megoldható.*

2. *Három diszulfidhidat tartalmazó GLP-1 receptor extracelluláris doménjének (nGLP-1r) előállítása nagy mennyiségben NMR spektroszkópia alapú ligandumkötődési vizsgálatokhoz.*
3. *A podocin membránfehérje előállítása térszerkezet-vizsgálathoz (NMR és röntgendiffrakció).*

A különböző fehérje expresszióval foglalkozó review-ek remek, több gyakorlati példát is bemutatnak, a megfelelő eszköztár kiválasztása azonban a kutató dolga marad. Érdeemes figyelembe venni, hogy becslések szerint az eukarióta fehérjék 20-40%-a nem előállítható prokarióta szervezetben. A három különböző fehérje előállítása több előzetes probléma lehetőségét is felvetett<sup>b</sup>, amely megoldásához különböző fúziós partnereket választottam.

A His-taget (polihisztidin-tag) elsőként a galaktóz dehidrogenáz előállítására alkalmazták<sup>28</sup>, mára az egyik legelterjedtebb fúziós címkének mondható<sup>29</sup>. Relatív kis mérete nincs hatással többnyire a célfehérje térszerkezetére és aktivitására. His-tag címkével ellátott fehérjék fém-immobilizált affinitás kromatográfia (IMAC) segítségével közel 80%-os tisztaságban, natív vagy denaturált állapotban közvetlenül tisztítható. A tisztítási lépés aránylag gazdaságosan alkalmazható hosszútávon, a kromatográfias gyanta-regenerálhatósága miatt<sup>30</sup>. Becslések szerint a prokarióta fehérjék közel 50%-a oldhatatlan csapadékot képez(ne) vele<sup>31</sup>, emiatt célszerű más címkével való együttes (tandem tisztítás) alkalmazásának megfontolása<sup>32,33</sup>. Hátránya a célfehérje eluálására alkalmazott imidazol, amely zavarja a különböző biofizikai módszereket (NMR, kompetíciós mérések, röntgenkristallográfia), illetve nagy koncentrációban fehérje aggregálódáshoz vezethet, valamint fémkötése révén metalloproteinek előállításához nem alkalmas.

Affinitás kromatográfia tisztítást tesz lehetővé a Glutathione-S transferáz (GST), amelyet elsőként a *Taenia ovis* antigénjeinek előállítására használták<sup>34</sup>. A *Schiistosomaja punicum*ból származó 26 kDa-os GST címke glutathione-sepharose gyantán elválasztható akár 90%-os tisztaságban a sejtlizátum többi fehérjéjétől. Tapasztalatok szerint jelentősen növeli a hozamot és hidrophil felszíne miatt jelentős szolubilizáló hatása van. Kolorimetriás assay-ekkel specifikusan detektálható (1-chloro-2,4-dinitrobenzene vagy antiGST-antitest). Dimerizációja azonban zavarhatja a célfehérje aktivitását és térszerkezetét, valamint a glutathione-sepharose gyanta élettartama véges a sejtlizátumban levő  $\gamma$ -

---

<sup>b</sup> ld. *Előzetes megfontolások* alfejezetek

glutamyl-transpeptidáz miatt. A tisztítás során továbbá alacsony koncentrációban alkalmazhatunk denaturáló- és redukálószerket. A GST-fúziót előszeretettel alkalmazzák fehérje-fehérje vagy DNS-fehérje interakciók vizsgálatához.

Számos, több diszulfidhíddal rendelkező fehérjét állítottak elő *E. coli* heterológ expresszióval, azonban a megfelelő diszulfidhíd mintázat kialakítása problémát okozhat. Anfiensen RnaseA-val végzett kísérletei után, amelyben a három diszulfidhíddal rendelkező fehérje *in vitro* refoldálás során került denaturált állapotból aktív formába, feltételezték, hogy a diszulfidhidak kialakulása a sejten belül a polipeptidláncban kódolt szerkezeti információk alapján, spontán történik. Jóval később fedezték fel, hogy baktériumokban a diszulfidhidas fehérjék a periplazmában alakulnak ki a Dsb fehérjecsalád (DsbA-D) segítségével, a citoplazma redukív közegében, termodinamikai és energetikai okok miatt ez nem lehetséges. A diszulfidhidak kialakulása a cisztein oldalláncok között két egymást követő kémiai lépés eredménye: a véletlenszerűen kialakuló diszulfidhidakat tartalmazó intermedierek képződése után átrendeződés során alakulnak ki a natív mintázatú fehérjék<sup>35,36</sup>. A folyamatot *in vivo* a redox enzimek végzik a baktérium periplazmatikus terében (oxidázok, izomerázok)<sup>37,38,39</sup>. *In vitro* „refoldálás” során redox pufferek (GSH/GSSG) alkalmazása segíti a natív diszulfidhíd mintázat kialakulását.

A DsbC, mint fúziós partner használata is felmerülhet diszulfidhidas fehérjék előállításakor. A Dsb fehérjék közül a DsbA oxidáz alakítja ki a fehérjék diszulfidhidjait összekapcsolva a tiol csoportokat, a DsbC izomerázként ezt követően a nem megfelelő diszulfidhidakat átrendezve, alakítja ki a natív mintázatot<sup>40</sup>. A DsbC egy 23kDa-os homodimer fehérje, amelynek aktív központja egy V-alakú 38 Å méretű hidrofób zseb, ahol az aktív CxxC thioredoxin motívum is található. A hidrofób zseb szerepe a kölcsönhatás kialakítása a szubsztráttal, mivel ha a célfehérje diszulfidhíd mintázata nem natív, belső diszulfidhidjait védő hidrofób magja nem alakul ki, így azok hozzáférhetőek az enzim számára<sup>41</sup>.

Erős promóterrel túltermelve a diszulfidhidas fehérjék gyakran kerülnek oldhatatlan inklúziós testbe, azonban irányító szignálszekvencia (pl. pelB) címke alkalmazásával, sikeres transzport esetén a kis térfogatú periplazmában alacsony koncentrációban kialakulhat a natív diszulfidhíd mintázat. Másik lehetőség olyan tervezett baktériumtörzs alkalmazása, amelyben mutációk révén a citoplazmában oxidatív közeg alakul ki. A glutathione és thioredoxin reduktáz deléciós mutáns Origami *E. coli* baktériumtörzsben, illetve az Shuffle sejtekben, ahol genomiálisan

citoplazmatikusan kódolt DsbC chaperont is tartalmaz a rendszer, ez elméletileg lehetséges. Számolni kell azonban a törzsek igen lassú növekedésével. Harmadik lehetőség redox-aktív enzimek, mint például a Trx vagy a DsbC, ko-expressziója vagy fúziós fehérjeként történő alkalmazása.

Természetesen lehetőség van az oldhatatlan csapadék vagy inklúziós testek izolálására és tisztítására denaturáló körülmények között, majd a redukált állapotban levő fehérje in vitro refoldálására is redox közegben, többnyire GSH/GSSG redox rendszer jelenétében, ám a módszer gyakran körülményes és nem is vezet eredményre.

A megfelelő fúziós partner kiválasztásában nagy szerepe van annak „oldatban tartó”, azaz szolubilizáló hatása, amely ha párosul az expressziós szint jelentős növelésével, nagy eséllyel teszi azt népszerűvé. Ebbe a kategóriába esik az *E. coli malE* génjének terméke, a 45 kDa-os Maltóz-kötő fehérje (MBP)<sup>42</sup>. Átlagos expressziós hozama emiatt 10-40 mg / L tápoldat között van, szignálszekvenciával periplazmatikus termelés is lehetséges. Affinitás kromatográfia tisztítás keresztkötött amilóz gyantán valószínű meg, azonban a sejtlizátumban levő amiláz enzim bontása miatt hamar tönkremegy, az élettartama hosszabbítható a tápoldathoz plusz glükóz forrás hozzáadásával. Mivel az amilóz gyantán történő elválasztás során a fúziós partner maltóz-kötött formába kerül, a célfehérje hasítását követően egy második amilóz tisztítási lépést nem lehetséges. A gyanta nem teszi lehetővé a denaturált formában történő tisztítást, és alacsony redukáló ágens koncentráció szintet visel el. Az MBP fúziós címke nagy mérete miatt a legtöbb esetben proteolitikus emésztéssel el kell távolítani, mivel nagy eséllyel befolyásolja a célfehérje működését. A hasítást követően számolni kell a tömegarány miatt a célfehérje mennyisége alacsony mennyiségével (peptidek előállításánál).

A Maltóz-kötő fehérje fúziós partnerként történő alkalmazása az utóbbi időben igen elterjedt, alkalmazása esetén nagy eséllyel előállítható a célmolekulával szolubilis fúziós rendszer<sup>33,43</sup>. Azonban nagy mérete miatt eltávolítása többnyire szükségszerű, ami gyakran a célfehérje kicsapódásával jár<sup>44,45</sup>, azaz felvethető a kérdés: Mi a mechanizmusa a szolubilizálásnak? Mi ebben a fúziós partner szerepe?

Egyrészt lehetséges, hogy szolubilitás növelők egyfajta „elektrosztatikus pajzsként” funkcionálnak, megakadályozva a célfehérje elektrosztatikus töltöttséggel rendelkező fragmenseinek aggregálódását<sup>46</sup>. Entrópia-horgony szerepét is betölthetik, azaz a célfehérjével történő kölcsönhatásaik révén csökkentik annak feltekeredési útvonalai számát<sup>47,48</sup>.

Másik lehetőség, hogy a fúziós rendszer egy szolubilis aggregátum, azaz micella-szerű struktúra hidrofób célfehérjék aggregátumával a központban, a fúziós partner pedig körbeveszi. Kialakulására jó példa a human papilloma virus E6 fehérje esetében tapasztaltak<sup>49</sup>, azonban a mechanizmus felveti a kérdést: hogyan képződhetnek aggregátumokból szolubilis feltekeredett fehérjék? Az elmélet kiegészíthető, hogyha a fúziós fehérjére egyfajta „chaperone-mágnes”-ként tekintünk. A fenti hatások együttese révén lehetővé teszik a sejt chaperone-jai számára a célfehérje helyes foldjának kialakítását<sup>50</sup>. Ez nem zárja ki a fúziós fehérje egyfajta passzív chaperone-szerepét: az oldékonyság fokozásával lehetővé teszi a célfehérje átmeneti állapotainak kialakulását és intermolekuláris kölcsönhatások révén iteratív ciklusként megakadályozzák azok önszerveződését, aggregációját a megfelelő téralkalat kialakulásáig<sup>51,52,53</sup>. Pozitív, de nem egyértelmű hatásai miatt mára az MBP fúziós-fehérjeként történő alkalmazása egyfajta mentő-megoldást jelent (a végső kétségbeesésben)<sup>54,55,56</sup>.

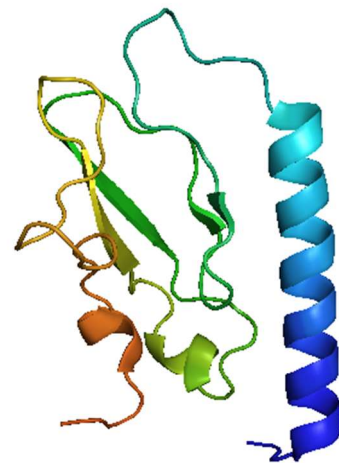
A címke eltávolítása történhet kémiai úton vagy enzimatis hasítással<sup>57,58</sup>. Előbbi esetben (CnBr vagy hydroxilamine) figyelemmel kell lenni a megfelelő pozíciójú egyedüli metioninra. A gyakori a nem specifikus hasítás és a fehérje denaturációja miatt az endopeptidázokkal történő enzimatis hasítás az elterjedtebb. Több esetben a célfehérje hasítása közvetlenül történik a hasító hely után, azonban például a thrombin és a TEV<sup>59</sup> esetében plusz két aminosav adódik a célfehérje N-terminálisához, ami például kisebb méretű peptidek (minifehérjék) esetében megváltoztathatja annak térszerkezetét. Az enzimatis hasítás hátránya, hogy az enzim arányaiban nagy mennyiségben szükséges valamint az inkubációs idő is hosszú lehet, valamint számolni kell a nem kívánt hasítás következményeire, ami degradációhoz vagy alacsony hozamhoz vezethet.

Többdimenziós heteronukleáris NMR spektroszkópiai mérésekhez a célfehérjét <sup>13</sup>C és <sup>15</sup>N izotóp jelöléssel látjuk el a heteronukleáris mérések érdekében. Ennek módszere alaposan publikált<sup>60</sup>, és nem okozhat problémát, amennyiben a fehérje gazdag táptalajon előállítható<sup>61,62</sup>. Természetes izotóparányú kisebb peptidek („jelöletlen”) esetében (<50 aminosav) bár alternatívát jelenthet a szilárd fázisú peptidszintézis, már egyes izotópjelölésnél is megfontolandó a bakteriális expresszió alkalmazása a kémiai szintézis horrorisztikus anyagi költségvonzata miatt. Kisebb peptidek előállítása azonban problémába ütközhet, mivel önmagában expresszáva a peptid mérete és harmadlagos szerkezetének hiánya proteolitikus degradációhoz vezethet, fúziós partnerrel előállítva figyelemmel kell lenni a hordozó molekulaméretére, azaz a tömegarányra, valamint a proteolitikus hasításra, mivel a célpeptiden maradó plusz aminosavak módosíthatják a

peptid szerkezetét. Emiatt célszerű olyan kisméretű fehérjét választani fúziós partnernek, amely lehetővé teszi az aminosav-maradék nélküli hasítást. Erre alkalmas mind az ubikvitin (76 aminosav) mind a Small Ubiquitin like modifier (SUMO – 100 aminosav) globuláris fehérjék. Mindkét fehérje kisméretű, térszerkezetük hasonló, irodalmi adatok alapján a célfehérje szolubilitását növelik. Hátrányuk, hogy az ubiquitin eukarióta rendszerben nem használható, emiatt a SUMO elterjedtebb. Alkalmazásuk esetén N-terminális His-taggal lehetséges a fúziós fehérje tisztítása, így a hasítást követően egy második Ni-IMAC tisztítással a fúziós partner elválasztható a célpeptidtől, amely ezt követően RP-HPLC-n tisztítható tovább. A kis tömegarány lehetővé teszi a peptidek gazdaságos előállítását.

### 1.1.1. Előzetes megfontolások – nGLP-1r expresszió

A G-fehérje kapcsolt receptorok (GPCR-ek) olyan sejtfelszíni molekulák, amelyeknek közös architektúrájuk (extracelluláris domén; 7 transzmembrán hélix; intracelluláris domén) és jelátviteli mechanizmusuk. Mivel számos fiziológiai funkcióban központi szerepet töltenek be, gyógyszercélpont-molekulák közel 30%-át teszik ki. A transzmembrán régió szekvencia-homológiája alapján 5 családra oszthatóak (A-E), amelyek közül az A-család (rhodopsin) a legnagyobb (700-tag), a B-család



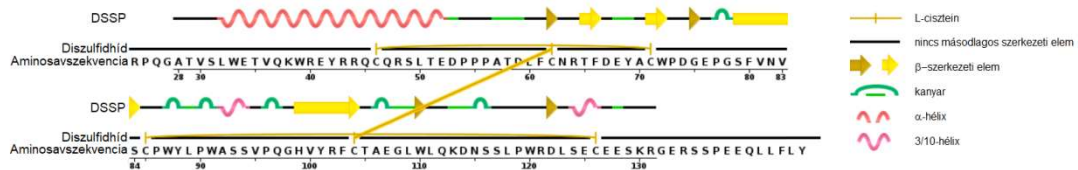
*1. ábra: Az nGLP-1r röntgendiffrakcióval kapott térszerkezete (PDB: 3C5T)*

(peptidhormon-receptorok – secretin-like receptorok) kisebb (15 tag). Mivel az extracelluláris domén szerkezetét, méretét tekintve is különbség van köztük, így a ligandum-felismerés mechanizmusa is eltér a családok között<sup>63</sup>.

A GLP-1 receptor a G-fehérje kapcsolt receptorok II-es vagy ún. B-családjába tartozó peptidhormonreceptor<sup>64</sup>. Az ebbe a családba tartozó receptorok közös jellemzője a GPCR-ekre általánosan tulajdonságain kívül, hogy 100-130 aminosav nagyságú extracelluláris doménnel rendelkeznek, amelyek maximum 27 aminosav hosszúságú endokrin eredetű peptidhormonokat kötnek. Az extracelluláris domén fontos szerkezeti jellemzője a 3 konzervált diszulfidhíd, amely elengedhetetlen a ligandum kötődéséhez. Jelenleg 31 röntgen és 4 NMR extracelluláris domén térszerkezet szerepel a PDB



adatbázisában, amelyek közül mindet *E. coli* heterológ expresszióval állítottak elő (2. táblázat).



2. ábra: Az nGLP-1R röntgenszerkezetének (PDB: 3C5T) másodlagos szerkezeti elemei és diszulfidhid mintázata

A GPCR-ek B-család tagjainak extracelluláris domén szekvencia-azonossága alacsony. Az extracelluláris domén téralkatára (1. ábra) általánosságban jellemző a nagyfokú hasonlóság a komplement kontroll fehérje architektúrájával ( $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ / $\alpha$  architektúra). Központi magját két antiparalel  $\beta$ -redő alkotja, amelyet 3 diszulfidhid és hidrofób kölcsönhatások stabilizálnak (2. ábra). A domén N-terminálisát egy hosszabb  $\alpha$ -hélix alkotja, amelyet egy diszulfidhid kapcsol az első redőhöz, így alkotva a ligandum kötőzsebet. A B-családba tartozó GPCR-ek extracelluláris doménjei között meglepően alacsony a szekvencia homológia (3. ábra), lényegében a 6 cisztein és egy tucatnyi aminosav azonos. Utóbbiak közül a 113Asp, 118Trp, 132Pro, 154Trp emelhetőek ki, mint amelyek a harmadlagos szerkezet stabilizálásában fontos szerepet játszó aminosavak. Azaz az aktív konformációt a 3 diszulfidhid által stabilizáló másodlagos szerkezeti elemek alkotják, amelyek közötti kanyarok (loop-ok) változatossága biztosítja a ligandum kötés specifikusságát, így fontos szerkezetük megismerése a ligandum specifikitás felderítése érdekében<sup>63</sup>.

Ha áttekintjük a B-családba tartozó GPCR-ek publikált extracelluláris domének (3. ábra) *E. coli*-ban történő előállításának protokolljait, három különböző módszert különíthetünk el (2. táblázat):

- i. Az extracelluláris domén „közvetlen” előállítása pET vektor segítségével, többnyire N-terminális His-taggal, BL21(DE3) baktériumtörzsben, többnyire 10 L-es fermentálással. Mindegyik esetben a célfehérje inklúziós testből került izolálásra, amelyet refoldálási folyamat követ<sup>69,70,70,72,73</sup>.
- ii. Az extracelluláris domén előállítása pET32 vektorban ThioredoxinA fúziós fehérjével Origami sejtekben. Mindegyik esetben közös, hogy a végső vizsgálati módszer NMR-spektroszkópia volt, ehhez a fúziós fehérjét thrombinnal hasították. A PTHR esetében azonban Monaghan és munkatársai<sup>65</sup> arról számoltak be, hogy a fúziós fehérje inklúziós testbe került, refoldálási folyamat után, a thrombinos

hasítás során az extracelluláris domén pedig degradálódott, feltehetőleg a nem megfelelő téralkat miatt. A CRF esetében Mesleh és munkatársai publikációja<sup>66</sup> szerint a fúziós fehérje inklúziós testbe került, a refoldálás oszlopon történt ligand-affinitás kromatográfia segítségével.

- iii. A harmadik módszert elsőként Parthier alkalmazták a PTH receptor extracelluláris domén esetében<sup>78</sup>. Az eljárás lényege, hogy OrigamiB sejtekben pET-Duet vektor segítségével ko-expresszálják az N-terminálison MBP-vel fuzionált extracelluláris domént DsbC-vel. A termelést követően a két affinitás kromatográfia lépés után (IMAC; Amilóz affinitás kromatográfia) az eluált fúziós fehérjét refoldálják GSH/GSSG redox rendszerben DsbC jelenlétében. Az ezt követően ioncsere és gélszűrővel tisztított mintát minden esetben kristályosításnak vetették alá (Carrier-driven-crystallization), azaz nem választották el a célfehérjét az MBP-től. Néhány esetben a refoldálás során nem használtak DsbC izomerázt. Más fehérjék esetében is alkalmazható módszer<sup>67,68</sup>.

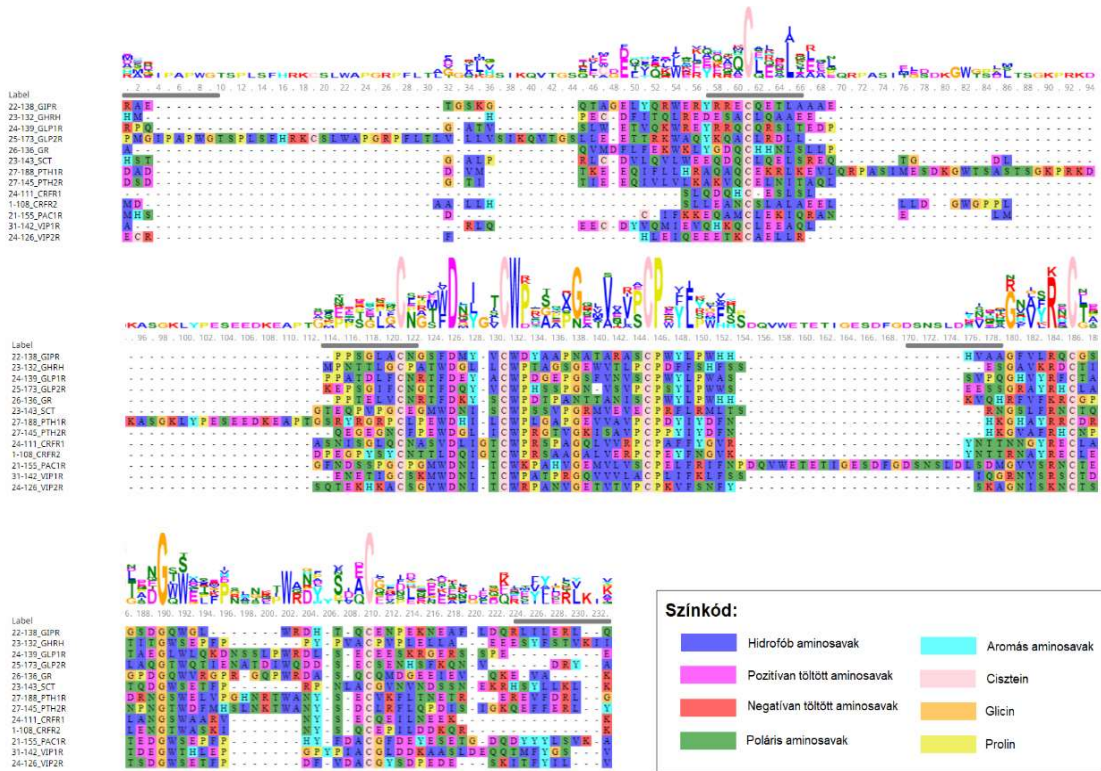
A GLP-1 receptor extracelluláris doménjének előállítását 2002-ben publikálták Bazarsuren és munkatársai<sup>69</sup>, a további nGLP-1r röntgenszerkezetek ez alapján készültek. Ugyanaz a kutatócsoport később Schröder-Tittmann publikációjában<sup>70</sup> egy másik, hasonló előállítási módot is leírt. Az eljárás során M15 *E. coli* baktériumtörzsszel fermentáció útján állítanak elő inklúziós testbe kerülő, denaturált állapotú nGLP1r-t, majd körülményesnek mondható eljárás során jutnak el a tiszta és aktív extracelluláris doménhez. A refoldálás során egy ún. refold-reaktort alkalmaznak, valamint a tisztítást igen nagy (több literes) térfogatban végzik. A módszer laboratóriumunkban fermentor, refold-reaktor illetve megfelelő kromatográfias rendszer hiányában nem volt kivitelezhető a doktori munka kezdetén (ld. *Előszó*). A fermentor hiányában, hagyományos rázatókészülékkel 6 liternyi gazdag tápanyagtartalmú táptalajban (2YT / LB) expresszálván, a protokollt arányaiban módosítva (sejttömeg - IB koncentráció - térfogat) nem sikerült kimutatható mennyiségű nGLP1r-t előállítani az előkísérletek során követve a 2002-es publikációból kinyerhető információkat. Ennek oka feltehetően a Bazarsuren-féle módszer hatékonysága, hiszen a leírás alapján 5 liter fermentléből 700 g sejtpelletet állítottak elő, amelyből leírás szerint 10 g inklúziós testet izoláltak.

**2. táblázat:** G-fehérje kapcsolt receptorok B családjába tartozó extracelluláris domén térszerkezetek a PDB adatbázisban. CDC = Carrier-driven-crystallization, többnyire MBP-vel.

		<b>ECD – Apo forma</b>	<b>ECD – ligand kötött forma</b>	<b>Módszer</b>	<b>Megjegyzés</b>
<b>Corticotropin releasing factor-1 receptor</b>	CRF1	3EHS <sup>71</sup>	3EHU <sup>21</sup>	X-ray	CDC
			2L27 <sup>72</sup>	NMR	
<b>Corticotropin releasing factor-1 receptor</b>	CRF2	1U34 <sup>73</sup>		NMR	
		2JNC	2JND <sup>74</sup>	NMR	
			3N96, 3N95, 3N94 <sup>75</sup>	X-ray	CDC
<b>Calcitonin gene related peptide receptor</b>	CGRP		3N7P, 3N7S <sup>76</sup>	X-ray	CDC
			5IIO <sup>77</sup>	X-ray	CDC
<b>Groth hormon releasing receptor</b>	GHRH	2XDG*		X-ray	Publikáció nincs megadva
<b>Gastrointestinal peptide receptor</b>	GIP	2QKH <sup>78</sup>		X-ray	CDC
			4HJ0 <sup>79</sup>	X-ray	CDC
<b>Glucagon like peptide-1 receptor</b>	GLP-1R		3C59, 3C5T <sup>80</sup> ,	X-ray	
			5E94 <sup>81</sup>	X-ray	
			3IOL <sup>82</sup>	X-ray	
			4ZGM <sup>83</sup> ,	X-ray	
<b>Glucagon like peptide-2 receptor</b>	GLP-2R				
<b>Glucagon receptor</b>	GCGR		4ERS <sup>84</sup>	X-ray	CDC
			5E94 <sup>85</sup>	X-ray	CDC
			5EE7 <sup>86</sup>	X-ray	CDC
<b>Pituitary adenylate cyclase 1 receptor</b>	PAC1	3N94 <sup>65</sup>		X-ray	CDC
			2JOD <sup>87</sup>	NMR	
<b>Parathyroid hormone receptor</b>	PTH1, PTH2	3L2J <sup>88</sup>		X-ray	CDC
			3C4M <sup>61</sup>	X-ray	CDC
			3H3G <sup>89</sup>	X-ray	CDC
<b>Secretin receptor</b>	Secretin				
<b>Vasoactive intestinal peptide receptor</b>	VPAC1, VPAC2	2X57*	3HCV*, 3DTX*	X-ray	Publikáció nincs megadva
			1OF2 <sup>90</sup>	X-ray	CDC
			1OGT <sup>80</sup>	X-ray	CDC

E szerint hagyományos rázatókészülékben 1 liternyi gazdag táptalaj a tapasztalataim alapján ~5 g sejtpelletet, azaz ~70 mg IB-t jelent. A renaturáció során rengeteg kicsapódás volt tapasztalható, amely SDS-PAGE-el vizsgálva rendre az nGLP1R-nek mutatkozott, szolubilis formában megfelelő diszulfidhíd mintázatú nGLP-1r-t nem sikerült előállítani. Emiatt egy alternatív protokolt kívántunk kidolgozni, hogy a rendelkezéseinkre álló laborfelszerelés segítségével hagyományos rázató készülékben is hatékonyan tudjunk aktív extracelluláris domén fehérjét előállítani. Ennek során több

baktériumtörzsben vizsgálni terveztük különböző fúziós partnerek segítségével előállított ECD fehérje tisztításának lehetőségeit.



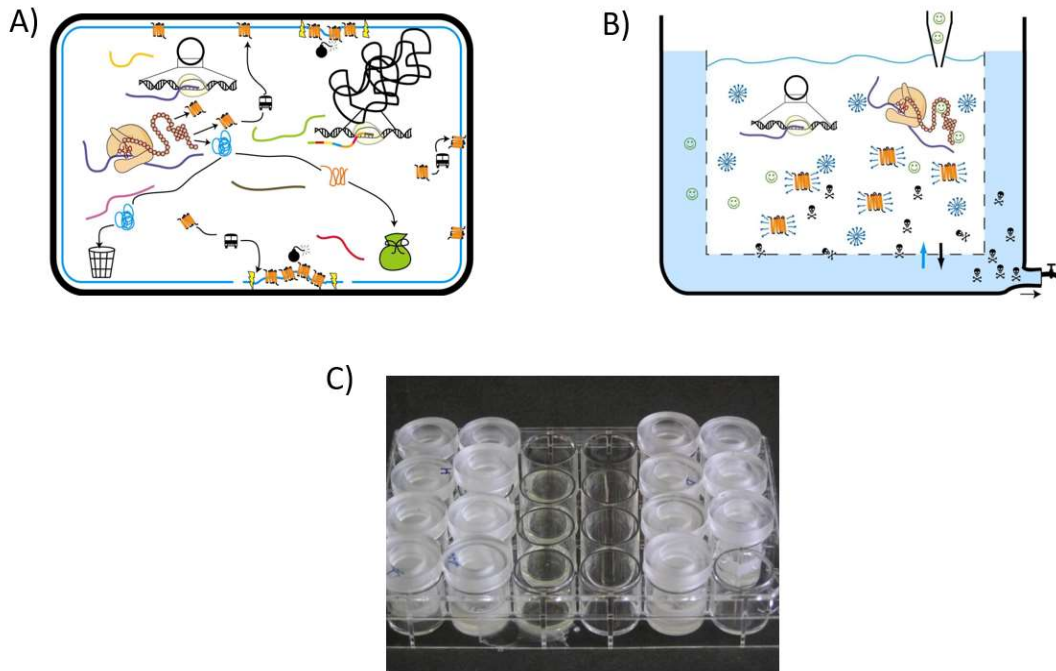
3. ábra: Humán G-fehérje kapcsolt receptorok B1 alcsaládjába tartozó extracelluláris domének szekvenciaillesztése.

### 1.1.2. Előzetes megfontolások – „cell-free” expresszió

A doktori munkám során lehetőségem nyílt a frankfurti Goethe Egyetemen a *cell-free* expresszió technikájának elsajátítására, a projekt keretében a teljes GLP-1 receptort, azaz egy teljes G-fehérje kapcsolt receptort kívántuk előállítani, majd interakcióját a minifehérje ligandumokkal SPR-el vizsgálni.

A *cell-free* (CF), vagy sejtmentes expresszió mára széles körben elterjedt és elfogadott technika a proteomikában: alkalmas gyorsan, megbízhatóan nagy hozamban, aktív konformációban fehérje előállítására<sup>91</sup>. Fő előnye az akár több transzmembrán szegmessel rendelkező membránfehérjék előállításában mutatkozik meg. Szerkezeti célokra ugyanis nagy mennyiségű membránfehérje előállítása élő rendszerekben számos problémát okozhat azzal, hogy beépülve a gazdasejt membránjába megzavarja annak belső folyamatait, citotoxikus hatást válthat ki, a hidrofób részek aggregálódhatnak, nem alakulnak ki a szükséges poszttranszlációs módosítások. További nehézséget okozhat sikeres előállítás esetén az onnan történő kinyerés.

Ezzel szemben a sejtmentes expresszió a membránfehérjék termelésének összetettségét a központi transzkripció – transzlációs folyamatokra csökkenti. Nyitott rendszerként lehetővé teszi a belső környezet tág határok közötti változtatását a transzkripció – transzlációs rendszer stabilitása miatt. Ezáltal minimalizálhatóak a hagyományos expresszió buktatói, ráadásul a módszer gyors, akár egy „overnight” CF-reakcióval milligrammos fehérjemennyiség állítható elő.<sup>92,93,94</sup>



**4. ábra:** A cell-free expresszió típusai: A) „Batch”-típus B) CECF-típus C) Analitikai léptékű sejtmentes reakció kivitelezése 24 lyukú kristályosító tálcán egyedi gyártású reakció-edényekkel.

Milligrammos mennyiség előállítását elsősorban az ún. „Continuous-exchange CF” (CECF – **4/B ábra**) mód tesz lehetővé, ahol a reakció két egységre van szétválasztva egy szemipermeabilis membránnal<sup>95,96</sup>. A „*Reaction Mixture*” (RM) egység tartalmazza a transzlációhoz és a transzkripcióhoz szükséges fehérje és nukleinsav összetevőket (sejtextraktum ld. később), míg a „*Feeding Mixture*” (FM) az alacsony molekulatömegű prekursorokat (nukleotidok, aminosavak) tartalmazza. A rendszer így lehetővé teszi a prekursorok folyamatos pótlását és a képződő gátló hatású melléktermékek (pirofoszfát) eltávolítását. Ezzel szemben a „batch”-típusú rendszerekben egy kompartmentben levő összetevők a reakció időt 0,5-2 órára csökkentik, ami alacsony képződő fehérjekoncentrációt is jelent (**4/A. ábra**).<sup>97</sup>

A *cell-free* expresszió fő komponense a sejtextraktum<sup>98,99</sup>, amely tartalmazza a transzkripcióhoz és transzlációhoz elengedhetetlen összetevőket (riboszómák, tRNS

szintetáz, translációs faktorok, acetát-kináz). Ez lehet eukarióta<sup>c</sup> vagy prokarióta eredetű. Utóbbi egyszerűbb kezelhetősége, megbízhatósága és előállításának egyszerűsége miatt népszerűbb. Az *E. coli* eredetű sejtextraktum<sup>d</sup> előállítása akár BL21(DE3) törzsből is történhet (ld. részletesebben *Módszerek*), azaz a transzkripciót a T7 TNS polimeráz kontrollálja: specificitása miatt csökkenti az endogén promóterekről történő átírást<sup>e</sup>.

A sejtmentes expresszió összeállításának leírása részletesen szerepel a *Módszerek* fejezetben, a reakció kivitelezése a szükséges komponenseket tartalmazó protokoll szerint történik (*Függelék F2 táblázat*), azonban az összeállítást a célfehérje esetében a rendszer nyitott volta miatt minden esetben optimalizálni kell, ami az összetevők koncentrációjának változtatását vagy plusz aditívok hozzáadását jelenti. Emiatt érdemes kitérni az összetevők szerepére röviden.<sup>100</sup>

A DTT fő feladata a T7RNAP stabilizálása, azonban redukáló környezetet teremtve gátolja a diszulfidhidak kialakulását – ez ellensúlyozható chaperonok vagy megfelelő arányú GSH/GSSG redox rendszer alkalmazásával. Az enzim szubsztrátjai a nukleozid trifoszfátok, a képződő mRNS-es degradációját RNáz inhibitorok akadályozzák, a ritka kodon használatot a tRNS szint növelésével lehet ellensúlyozni. A CF-reakció másik előnye, hogy kontroll alatt vannak az aminosavak is, így szelektív aminosavak beépítése is lehetséges. Az endogén aminosavak az extraktumból a preparálása során eltávolításra kerülnek. Figyelni kell azonban az aminosav-degradációra is, amely a triptofán, cisztein, arginin, glutamát és aszpartát esetében jelentős. Folsav segítségével az fMet képződés segíthető elő.

Az energiaháztartás regenerációja során az ATP és GTP újraképződés történik másodlagos energiaforrások és specifikus kinázok<sup>f</sup> segítségével. A sejt viszkozitását PEG segítségével mimikálhatjuk, stabilizálva az mRNS-eket és biztosítva a sejten belüli „crowding”-hatást. Az általános sejt-kondíciókat pH 7-es pufferrel és Mg<sup>2+</sup> és K<sup>+</sup> ionok segítségével biztosítjuk, utóbbiak a piruvát kináz működésében is nélkülözhetetlenek.<sup>101</sup>

A DNS-templátnak is meghatározó szerepe van a termelődő célfehérje hozamában<sup>102</sup>. T7RNAP alkalmazása miatt lineáris vagy cirkuláris T7 promóterrel rendelkező DNS alkalmas CF-reakcióra. Lineáris DNS-szakasz esetén megspórolható a

---

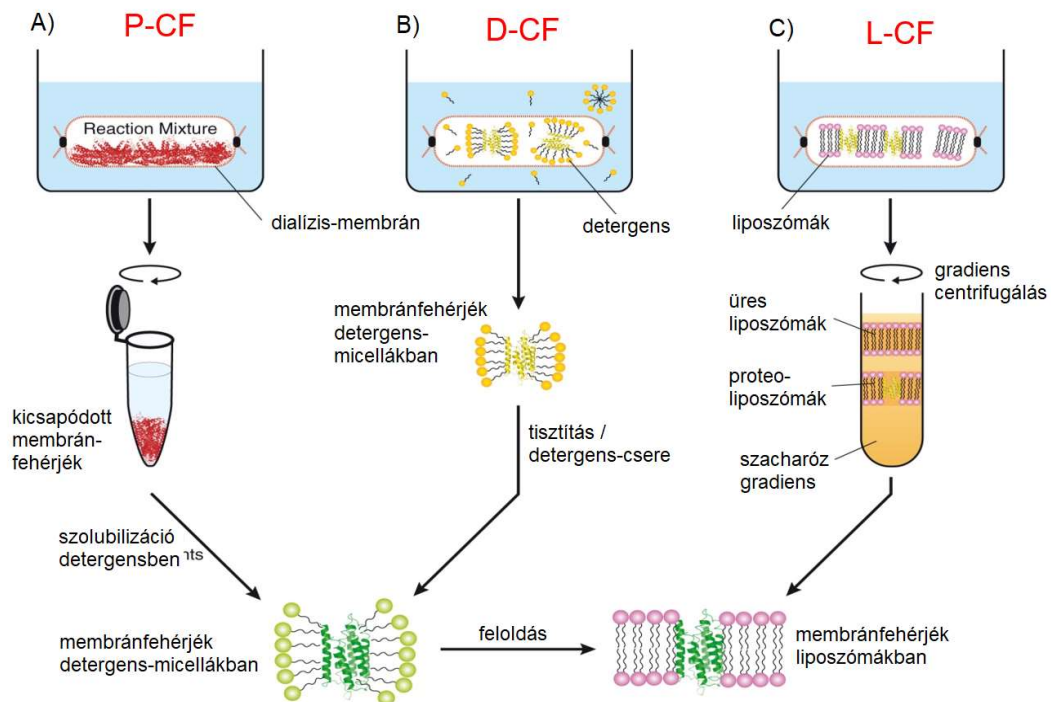
<sup>c</sup> wheat germ, rabbit reticulocita

<sup>d</sup> S30 extraktum – 30,000xg szedimentáció után

<sup>e</sup> Az endogén mRNS-ek az extraktum előállítása során eltávolításra kerülnek.

<sup>f</sup> acetil-foszfát/acetát-kináz és foszfoenol piruvát/piruvát-kináz

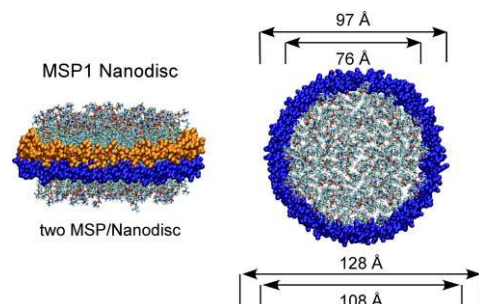
klónozási idő, számolnunk kell a reakció közbeni degradációval (endogén eredetű exonukleáz aktivitás). A templát tisztasága és koncentrációja ( $> 0,15 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) is meghatározó<sup>8</sup>. Az alacsony koncentrációjú végtermék oka gyakran a transzláció iniciáció lépésének problémáival függ össze, mivel annak hatékonysága nagyban függ a start kodont követő körülbelül tíz nukleotid fajtájától. Ennek jóslása nehéz, emiatt gyakran rövid fúziós-tageket alkalmaznak (pl. T7-tag), a további fúziós tag-ek alkalmazása többnyire a C-terminálison történik (His-tag, GFP).



**5. ábra:** Membránfehérjék cell-free expressziójának típusai: A) "Precipitate-based" B) "Detergent-based" C) "Lipid-based"

A CECF reakciókhoz szükséges két kompartment kialakítása történhet kereskedelmi forgalomban kapható eszközökkel (Slide-A-lizer), vagy házilag-gyártott eszközökkel is, preparatív mennyiségben akár dialízis-zacskóval is kialakítható a szükséges kialakítás. A kapott hozamban nagy szerepe van a megfelelő RM:FM aránynak is, a preparatív lépték előtt ezt analitikai úton tesztelni kell.

A membránfehérjék CF szintézisének 3 módja van (**5. Ábra**). Az élő szervezetekben nem lehetséges D-CF („detergent-based”-CF)



**6. ábra:** Két MSP fehérje (narancssárga, kék) által kialakított ún. Nanodisc.

<sup>8</sup> kizárólag midiPrep-kit használata, nem mindegyik gyártó terméke megfelelő

és L-CF („*lipid-based*”-CF) közös, hogy az RM-ben jelen levő detergensok vagy lipidek miatt a szintetizálódó membránfehérje a micellákba vagy liposzómákba épül be. Az L-CF módszer esetében lehetséges az ún. *nanodisc*-ek alkalmazása is<sup>103</sup>, amelyekben a változtatható összetételű foszfolipidek nem kovalensen kapcsolódó komplex kettős réteget alakítanak ki a *Membrane-scaffold Protein*-nel (MSP – **6. Ábra**). Ez lehetővé teszi a könnyebb izolálásukat is. Amennyiben hidrofób közeg nincsen jelen, úgy a képződő membránfehérje kicsapódik (P-CF: *precipitate-based* CF), amely akár reszolubilizálható detergensokkal.

### 1.1.3. Előzetes megfontolások – Minifehérjék expressziója

Peptidek többdimenziós heteronukleáris spektroszkópai vizsgálatához elengedhetetlen azok <sup>13</sup>C és <sup>15</sup>N izotópjelölése, amely nagyobb fehérjék esetében (5000 Da felett) megoldott, azonban a kisebb méretű peptidek esetében több felmerülő problémával is számolnunk kell:

- i.* A kisebb peptidek közvetlenül nehezen termelhetőek, mivel nem rendelkeznek rendezett térszerkezettel, ki vannak téve a sejt proteázainak degradálásának.
- ii.* Tisztításukhoz valamilyen címke szükséges, amelyet később mindenképpen el kell távolítani. A tipikusan használt proteázok plusz aminosavat hagynak a célfehérje N-terminálisán, amely interferálhat a peptid térszerkezetével.
- iii.* Figyelembe kell venni az alkalmazott fúziós fehérje:peptid tömegarányát is a kitermelhető célfehérje mennyiségének érdekében.

Az ubikvitin, mint kisméretű (8,5 kDa) fúziós fehérje lehetővé teszi a különböző minifehérjék hatékony termelését azáltal, hogy az N-terminális His-tagjének segítségével hatékonyra tehető a tisztítás, illetve a C-terminálásra klónozott minifehérje az ubikvitin hidroláz enzimmal proteolitikusan lehasítható a fúziós partnerről úgy, hogy N-terminális nem módosul az enzim hasítóhely miatti további aminosav beépülésével.

### 1.1.4. Előzetes megfontolások – Podocin expressziója

A podocin atomi felbontású térszerkezetét elsősorban NMR és röntgenkristallográfiai módszerekkel szerettük volna felderíteni. A mutációk térszerkezetre gyakorolt hatásának vizsgálata miatt elegendőnek látszott a podocin C-



terminális fragmensének (128-383) előállítására. Előzetes eredmények<sup>h</sup> alapján tudtuk, hogy *E. coli*-ban a teljes podocin (1-383) valamint a citoszólikus fragmens (127-383) expressziója is N- illetve C-terminális His-taggal illetve N-terminális GST-taggal sikertelen volt. Irodalmi előzmények azonban a homológ sztomatin (94-202) és a *P. horikoshii* homológ fehérjéjének előállítása GST-taggal illetve tag-nélkül sikeres volt.

## 1.2. Bevezetés - Podocin

A nefrotikus szindróma egy olyan ritka öröklődő vesebetegség, amely esetén a beteg kilátásai különösen rosszak. Oka a glomerulus filtrációs barrierének sérülése, ami proteinuriához, hypoalbuminémiához, ödémához és hiperlipidémiához vezet. A betegség kezelésének elsődleges gyógyszerei szteroidok (prednizon, metilprednizolon), azonban a betegek 10-20%-a egyáltalán nem reagál a gyógyszeres kezelésre (Sztteroid Reizisztens Nefrotikus Szindróma - SRNS).<sup>104,105</sup>

Az SRNS rossz prognózissal rendelkezik, mivel nagy eséllyel 5 éven belüli végstádiumú veseelégtelenséghez (ESRD) vezet<sup>106</sup>. Az esetek 30%-a genetikai okokra vezethető vissza, amelyért a podocita fehérjék mutációi tehetők felelőssé. Több mint 20 érintett gén mutációit találtak felelősnek, amelyek közül az esetek nagy részében (12-18%) az NPHS2 gén alléljeinek mutációi a felelősek.<sup>107</sup>

### 1.2.1. Genetikai háttér

Az SRNS monogénes autoszomális-recesszív öröklődő betegség, azaz egyetlen gén mutációja mindkét alléllon szükséges a betegség kialakulásához. Az NPHS2 mutációval rendelkezőknél általában 6 éves kor előtt kialakul az SRNS és 10 éves korukra az ESRD is<sup>108</sup>. A betegség lefolyása enyhébb (13 évesen SRNS, 26 évesen ESRD) olyan esetekben, amikor az egyik alléllon egy NPHS2 mutáció a másikon Arg229Gln mutáció található ([R229Q];[mut] genotípus). Azonban az Arg229Gln homozigóta formában nem okoz megbetegedést.<sup>109,110</sup>

Az Arg229Gln mutáció allél sűrűsége 15-ször magasabb, mint a többi ismert NPHS2 mutációé, így arra következtethetnénk, hogy a [R229Q];[mut] okozta megbetegedések gyakorisága 30-szorosa a [mut];[mut] genotípusénak – ennek ellenére 3,5-szer kisebb a [R229Q];[mut] genotípusos megbetegedések gyakorisága, azaz ez a genotípus ritkán okoz betegséget (**3. táblázat**, részletesebben ld. **Függelék F1 táblázat**).

111

---

<sup>h</sup> szóbeli információ Corine Antignac laboratóriumából

Tory Kálmán és Kerti Andrea olyan egészséges szülőkön végeztek genetikai szűrést, akiknek beteg, NPHS2 mutációval rendelkező gyerekük volt (obligát hordozó szülők)<sup>112</sup>. A 129 tesztelt alanyból 6 volt [R229Q];[mut] genotípusú. Kimutatták, hogy az Arg229Gln transzheterozigóta egyedek amennyiben a másik mutációt az NPHS2 gén 1-6 exonja hordozza, nem lesznek betegek, ellentétben, ha 7-8 exonokon van a mutáció, akkor SRNS alakul ki. Mivel az összes Arg229Gln-el betegséget okozó mutáció a C terminálison található aminosavakat érintette, ezért arra következtettek, hogy ezen mutációknak káros hatásuk van a Arg229Gln podocinre.

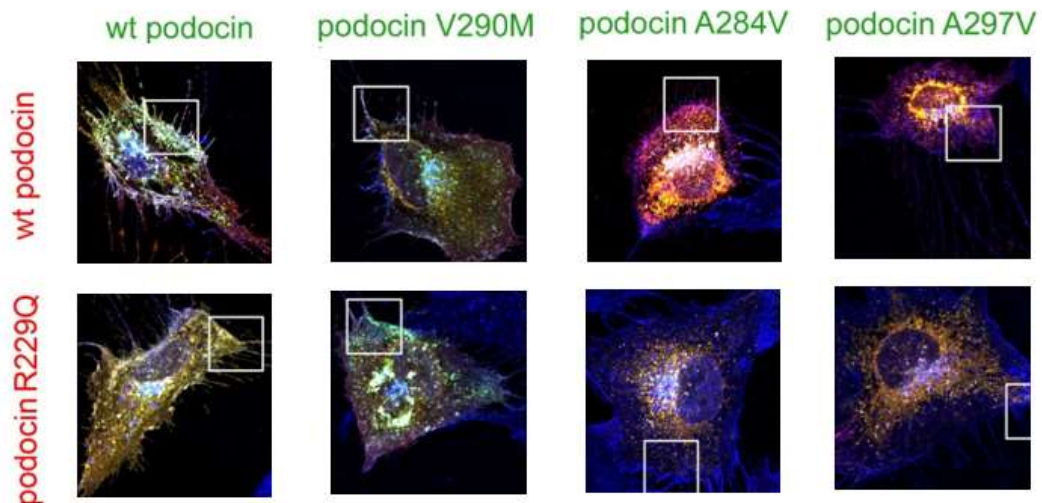
**3. táblázat: NPHS2 allélgyakoriság megoszlások**

	Korai nephrosis		Késői nephrosis	
<b>ESRD kialakulása</b>	< 10 év		3-4. évtized	
<b>genotípus</b>	[mutáció];[mutáció]		[Arg229Gln];[mutáció]	
<b>Várt prevalencia</b>	1 / 300000		1 / 10000	
	<b>Allélfrekvencia az átlagpopulációban</b>			
<b>Arg229Gln</b>	357/12649		2,7%	
<b>NPHS2 mutációk</b>	24/13006		0,18%	
<b>Megfigyelt családok száma</b>	247		71	
<b>Genotípus</b>	[mutáció];[mutáció]		[R229Q];[bizonyos 3' mutáció]	
<b>P = 1,2x10<sup>-35</sup></b>	<b>mutáns allélok száma</b>			
	247 beteg [mut];[mut]		71 beteg [R229Q];[mut]	
	n	arány	n	arány
<b>1-6. exonok</b>	419	85%	8	11%
<b>7-8. exonok</b>	75	15%	63	89%

Ezt kísérleteik is igazolták, amikor az NPHS2 gén termékét sejtvonalakban fejezték ki és a Arg229Gln podocin membrán elhelyezkedését vizsgálták különféle podocin 7. és 8. exont érintő mutánsokkal ko-expresszáva (**7. ábra**): [WT]:[WT] és [WT]:[R229Q] a setjmembránba jutott, azaz betöltötte a funkcióját, a [R229Q]: [A284V / A288T / A291W / A297V / Q310K] podocinok a citoplazmában maradtak. További molekuláris szintű kutatások azt állapították meg, hogy ezen podocinok esetében a dimerizáció megváltozik, emiatt a citoplazmában maradnak, amely végső soron a betegséget okozza<sup>112</sup>.

A betegség öröklött volta miatt az érintettek számára genetikai tanácsadás volt szükséges. Ennek módszere az volt, hogy amennyiben az egyik fél Arg229Gln hordozó, akkor minden transzheterozigóta utódjuk beteg lesz, így a gyermekvállalást nem tanácsolták. Az újabb *in vitro* és *ex vivo* kísérletek eredményei azt mutatják, hogy

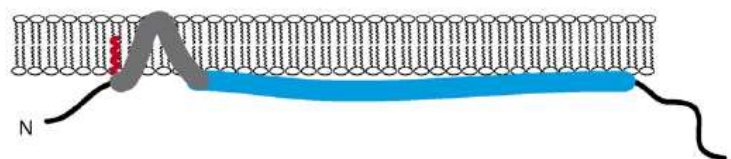
bizonyos podocin mutációknak káros hatásuk van Arg229Gln podocinra nézve, egyfajta domináns-negatív hatáshoz hasonlóan. Az 1-6 exonokon NPHS2 mutációval rendelkező szülőknél nincs kockázata beteg gyerek születésének, ugyanakkor a Arg229Gln és az azzal betegséget okozó mutációkat hordozó szülők genetikai tanácsadása bonyolultabbá válik, mivel ilyen esetekben nem alkalmazhatóak a mendeli genetikai szabályok. Az sem kizárható, hogy más autoszomális-recesszív betegségek esetében is hasonló öröklődésment játszódik le<sup>112</sup>.



7. ábra: A különböző podocin mutációk okozta hatások az emlős sejtekben. Tory Kálmán nyomán<sup>112</sup>.

### 1.2.2. Szerkezeti háttér

Az NPHS2 gén terméke a 383 aminosav hosszúságú podocin, amely egy SPFH domén családba<sup>i</sup> tartozó fehérje<sup>113</sup>. Az SPFH családba emlősöknél a prohibitin, flotillin, sztomatin, sztomatin-like-protein, és az erlin is tartoznak. Közös jellemzőjük, hogy membránba horganyzottak vagy ahhoz kapcsolódtak (8. ábra). Úgynevezett. lipid raftokba, vagy detergens-ellenálló membránfrakciókba tömörülnek mikrodoméneket alkotva a plazmamembrán, vagy egyéb sejt szervecskék (ER, Golgi, mitokondrium) membránjaiban. Pontos funkciójuk nem teljesen tisztázott, szerepet játszanak ioncsatornák szabályozásában, a membrán-citoszkeleton kapcsolat illetve egyéb speciális membrán szerkezetek kialakításában (4. táblázat és 10. ábra).<sup>114,117</sup>



8. ábra: Az SPFH domén családba tartozó fehérjék topológiája.<sup>114</sup>

<sup>i</sup> Az irodalomban PHB vagy band7 családnév is szerepel ugyanerre a domén családra.

A domént emiatt korábban evolúciósan konzerváltak vélték, azonban feltehetően kialakulásuk konvergens evolúció eredménye, ami feltételezi, hogy a betöltött funkciójuk nélkülözhetetlen<sup>114</sup>.

Szerkezeti jellemzőjük, hogy az N-terminálisukon egy hidrofób, membránba, vagy ahhoz asszociált rész van. A PHB-1 esetében ez transzmembrán-régió, a sztomatin, az SLP-3 és a podocin esetében egy hairpin-szerű membránhorgony, míg a flotillin esetében a membránhoz rögzítés palmitoilálódással alakul ki. C-terminálisuk felelős az oligomerizációért, és konzervált prolin aminosavakon keresztül palmitoilálódással koleszterin kötésért, ami nélkülözhetetlen a funkciójukhoz, azonban az oligomerizációért és a membránba ágyazódásért nem.<sup>114</sup>

A podocin dimer vagy oligomer formában halmozódik fel lipid raft mikrodoménekben a vese glomerulusainak podocita sejtjeinek rés-diafragmájában<sup>115</sup>, amely központi eleme a glomeruláris filtrációnak<sup>116</sup>. **(9/C. ábra)**.

**4. táblázat:** Az emberi SPFH családba tartozó fehérjék.<sup>117</sup>

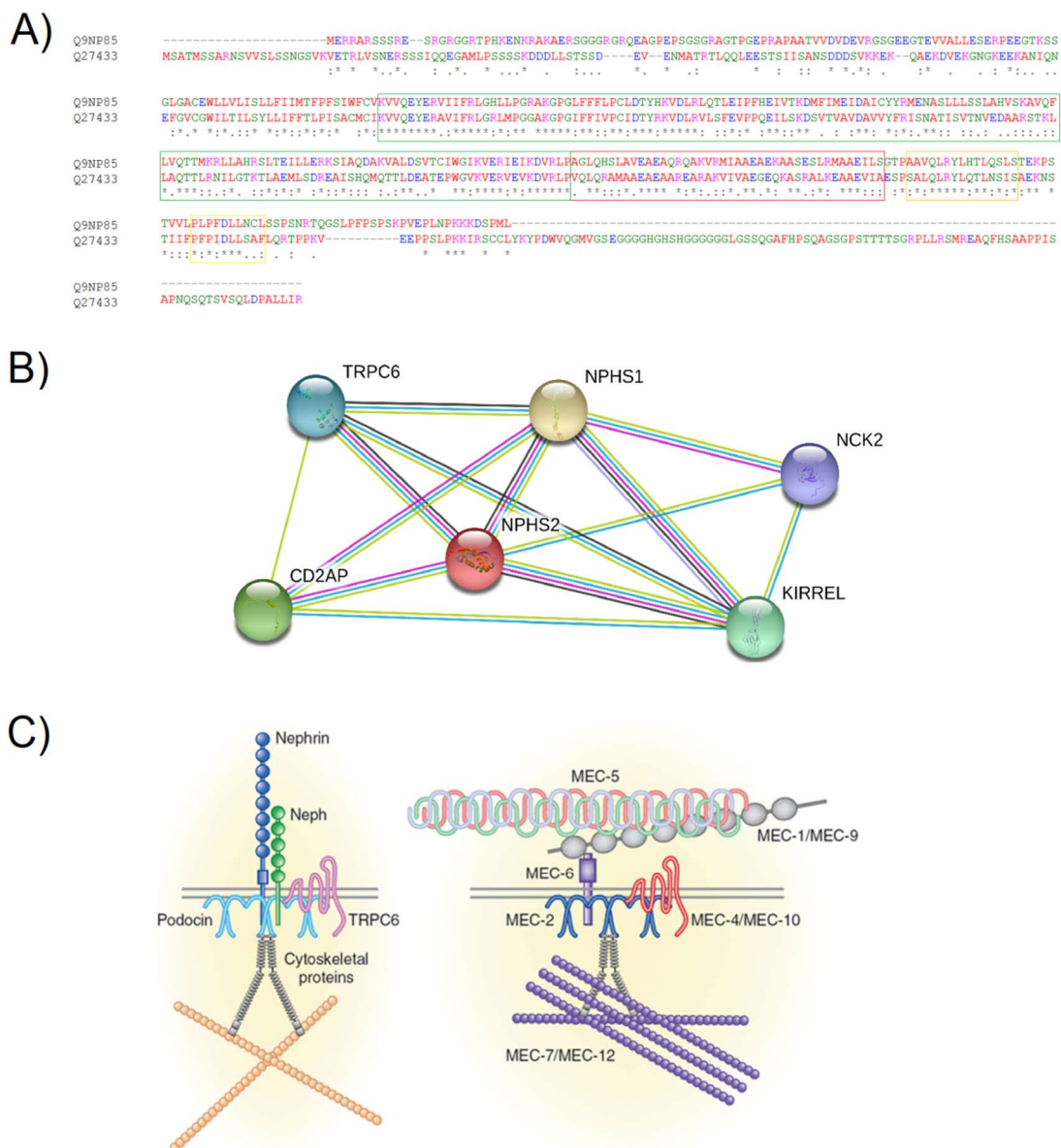
Fehérje	Uniprot	Lokalizáció	Feltételezett funkció	Betegség
<b>SLP-1</b>	Q9UBI4	plazmamembrán, endoszómák	koleszterin szállítás	N/A
<b>Prohibitin-1</b>	P35232	mitokondrium, sejtmag	chaperone, apoptózis, Ras-Raf jelátvitel	N/A
<b>Prohibitin-2</b>	Q99623	mitokondrium, sejtmag	chaperone, ösztrogén receptor szabályozás, apoptózis	N/A
<b>SLP-2</b>	Q9UJZ1	mitokondrium	N/A	N/A
<b>Flotillin-1</b>	O75955	plazmamembrán, endoszómák, sejtmag	sejt proliferáció, jelátvitel	Alzheimer kór, Parkinson kór
<b>Flotillin-2</b>	Q14254	plazmamembrán, endoszómák, sejtmag	neuronal regeneration, jelátvitel	Alzheimer, melanoma
<b>Sztomatin</b>	P27105	plazmamembrán, endoszómák,	ioncsatorna szabályozás	sztomatocitózis
<b>SLP-3</b>	Q8TAV4	idegsejt plazmamembrán	érintés érzékelés	
<b>Podocin</b>	Q9NP85	podocita plazmamembrán	ultraszűrés, TRPC6 és nefrin aktiválás	nefortikus szindróma
<b>Erlin-1</b>	O75477	ER	N/A	
<b>Erlin-2</b>	O94905	ER	ERAD	mellrák

A podocin pontos funkciója nem ismert. N-terminális SPFH doménén keresztül a lipid raftokban fehérje-fehérje alapú kölcsönhatást alakít ki az elsődleges szűrésért felelős nefrinnel. C-terminálisa pedig a CD2AP, és TRPC6 fehérjékkel alkot komplexet. Előbbi egy ioncsatorna, utóbbi pedig egy a membránfehérjéket a citoszkeletonnal összekapcsoló adapter fehérje.<sup>119,120</sup>

Nagyfokú szekvenciális homológiája miatt (SPFH domén: 50% azonosság, 80% hasonlóság – **9/A. ábra**) feltételezhető, hogy a *C. elegans* MEC-2 fehérjéjéhez hasonló

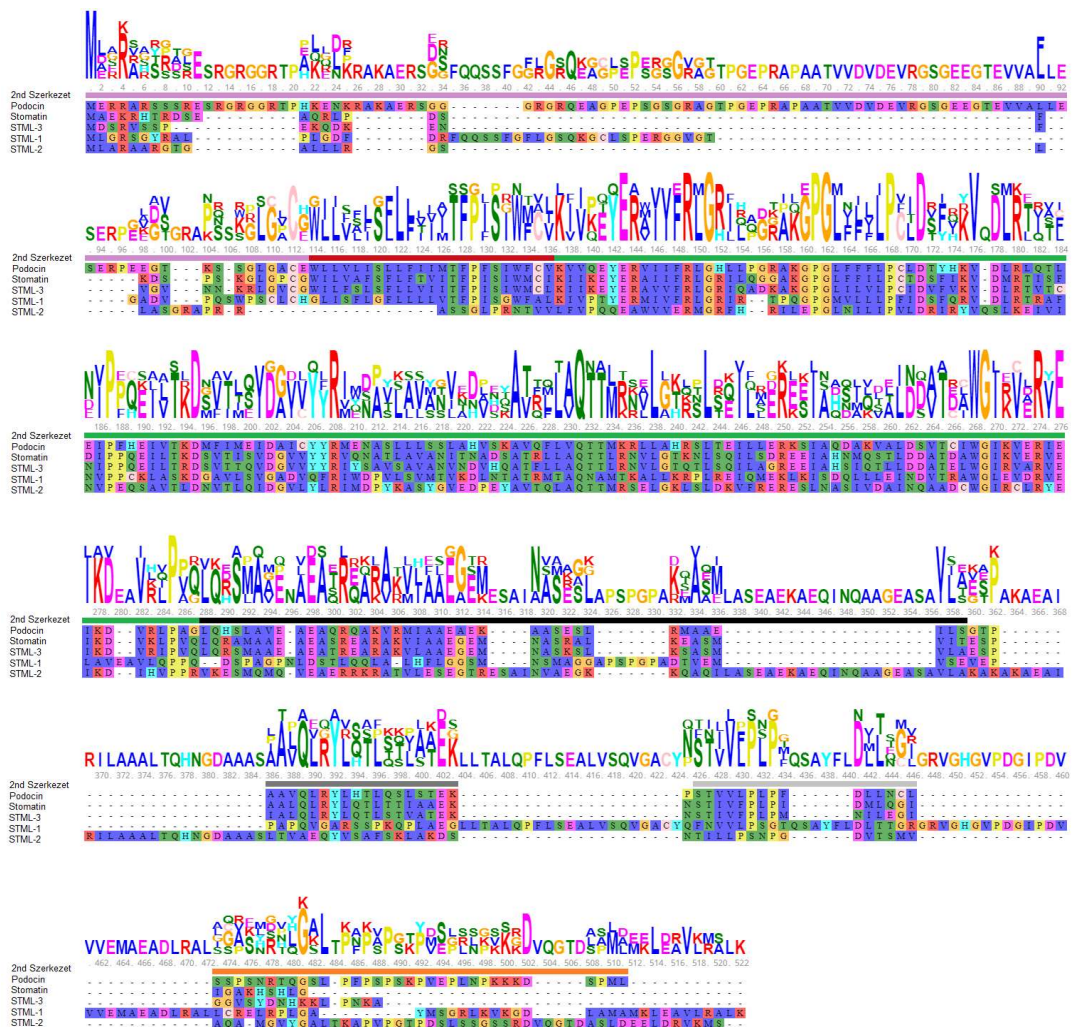
szerepet tölt be (9/C. ábra). A MEC-2 egy, az érintés érzékelésében résztvevő<sup>118,119</sup>, fehérjekomplex része, a MEC-4/MEC-10 Na<sup>+</sup>-ioncsatorna szabályozásában (podocin – TRPC6) vesz részt<sup>120</sup>, valamint a kapcsolatban áll a sejt mikrotubulusaival (podocin – CD2AP<sup>121</sup>).

A MEC-2 ennek ellenére nem szükséges az ioncsatorna működéséhez, mivel a koleszterinkötése általi speciális membránkörnyezet biztosítja a fehérje-komplex megfelelő működését<sup>122</sup>. A podocin fehérjekomplexének egy kationcsatorna (TRPC6) is tagja (9/B ábra)<sup>123</sup>, feltehetőleg szerepe így ennek az ioncsatornának a szabályozása a

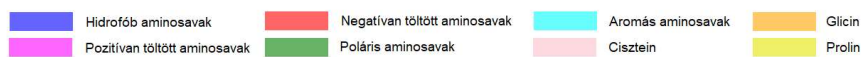


**9. ábra:** A podocin és a MEC-2 szerkezet-funkció összehasonlítása. A) Az elsődleges szerkezeti szekvencia-illesztése, zöld keretben az SPFH domén, piros illetve narancssárga kerettel a Hélix1 és Hélix2 régiók (ld. még ÁBRA). B) A podocinnal (NPHS2 gén terméke) kölcsönható fehérjék, lila vonallal a kísérletes eredmények, zöld vonallal az adatbázisokból kikövetkeztethető kapcsolatok. C) A podocin (balra) illetve a MEC-2 (jobbra) fehérjekomplexének sematikus ábrája.<sup>120,121</sup>

MEC-2-höz hasonló módon. Az ioncsatorna mutációi szintén nefrózishoz vezethetnek<sup>124125</sup>, továbbá TRPC6 deléziós egerek esetében magas vérnyomás volt megfigyelhető<sup>126</sup>. Számos nefrózisban szenvedő beteg jól reagál a glükokortikoidos kezelésre, amely erősíti azt a feltevézést, hogy az SPFH domén fehérjék funkciója a koleszterinkötés révén a fehérje-komplexük szabályozása speciális lipid-környezet biztosításával. Emiatt a podocin C-terminális, intracelluláris, részének térszerkezeti változása jelentős hatással lehet a fehérjekomplexben résztvevő fehérjék közötti kölcsönhatásra.



**Színkód - aminosavak**



**Színkód - doménhatárok**



10. ábra: Az emberi SPFH családba tartozó fehérjék aminosav szekvencia illesztése.

### 1.3. Bevezetés – GLP-1R

A II-típusú cukorbetegség során megemelkedett inzulin „felhasználás” miatt a hasnyálmirigy  $\beta$ -sejtjeinek működési elégtelenségéhez, majd annak pusztulásához vezethet, amely végeredményben az inzulin termelésének és szekréciójának csökkenéséhez majd megszűnéséhez vezet. A csökkent inzulin koncentráció miatt a szervezet glükóz homeosztázisa felbomlik, amely hiperglikémiát és további olyan súlyos szövődményeket okozhat, mint az érszűkület, infarktus, vakság, stb.. A jelenleg alkalmazott terápiák során főleg külsőleg beadott inzulint, vagy szulfonilurea származékokat használnak. Ezek legnagyobb hátránya, hogy az ideális glükóz szint helyreállítása után is tovább hatnak, s így a nem megfelelő adagolásuk hipoglikémiához vezethet. A GLP-1R agonisták, köztük az Exendin-4 legnagyobb előnye, hogy inzulin termelés serkentő hatásuk csak a megnövekedett vércukor koncentráció jelenlétében érvényesül, s ezért nem kell tartani a túladagolás okozta hipoglikémiától.<sup>127</sup>

A táplálékbevitelt követően a megemelkedő vércukorszint hatására a hasnyálmirigy  $\beta$ -sejtjei a GLUT (glucose transporter) csatornák segítségével a sejten belülre juttatják a glükózt, ahol az foszforilálódik, piruváttá alakulva a mitokondriumban az ATP termelést fokozza. Ez a megnövekedő ATP-szint vezet az inzulin szekrécióhoz és az ATP-érzékeny  $K^+$ -csatornák zárásához, a sejten belüli  $K^+$ -ion koncentrációjának növekedéséhez, illetve a sejt depolarizációjához vezet. Ez a depolarizáció indítja el az L-típusú feszültségfüggő  $Ca^{2+}$ -csatornák (voltage dependent  $Ca^{2+}$  channel: VDCC) nyitását, a beáramló  $Ca^{2+}$ -ionok indítják be az inzulint tároló vezikulák exocitózisát. A  $\beta$ -sejteken belül az inzulin az endoplazmás retikulumban termelődik és denz vezikulákban tárolódik, illetve szállítódik tovább. Az exocitózis első fázisában gyorsan és nagy mennyiségű, míg a második fázisban jóval lassabban és kisebb mennyiségű inzulin szekretálódik.<sup>128</sup>

Egyetlen  $\beta$ -sejtben átlagosan mintegy tízezer inzulin molekulát tartalmazó granulum található. Ezek többsége (95-99%) raktározó szerepet tölt be, míg kisebb hányadukból (1-5%) az inzulin gyorsan felszabadítható. A szekréció első, gyors fáziséért ezek a gyorsan felszabadítható granulumok, míg a második, a hosszabb fáziséért a raktározott granulumok átalakulása felszabadítható granulummá a felelős.

Az inkretinek olyan gasztrointesztinális hormonok, amelyek aktiválják a táplálékbevitelt követően a glükózfüggő inzulin szekrécióját. Ezt a jelenséget már korábban megfigyelték, amikor is szájon át, illetve intravénásan beadott glükózt kísérő inzulinválaszt vizsgálták. Megállapították, hogy a szájon át történő glükóz beadását

sokkal nagyobb inzulinválasz követi, amit a fentebb leírt inkretinek okoznak. Az inkretinek a szervezetben igen rövid félélettidejűek (néhány perc), mivel a dipeptidil-peptidáz-4 (DPP-4) enzim gyorsan bontják azokat.<sup>129</sup>

A GLP-1 inkretinhormon a GLP-1 receptoron keresztül fejt ki hatását. A ligandum kötése után a receptorhoz kapcsolt trimer G-fehérje komplex aktiválódik és a leváló  $G\alpha_s$  alegység aktiválja a plazmamembránhoz kötött adenil-ciklázt, amely enzim ATP-ből cAMP-t állít elő. A keletkezett cAMP két effektort aktivál, a proteinkináz A-t (PKA), illetve a cAMP-GEF-t.<sup>130</sup>

Korábban említésre került már, hogy az inzulin szekréció indító lépése a  $K^+_{ATP}$  csatornák zárása, amelynek nyitva tartásáért a SUR1 részegységhez kötődő ADP a felelős. A cAMP által aktivált PKA a SUR1 foszforilációja révén az ADP kötődését akadályozza, s ezáltal a csatorna záródását okozza, mely inzulin szekrécióhoz vezet. Itt megfigyelhető a folyamat glükózsztint függése, hiszen alacsony glükózsztint esetén a magas ADP koncentráció mellett a PKA hatása a SUR1 részegységre elhanyagolható. A cAMP másik effektora az Epac viszont a  $K^+_{ATP}$  csatornák záródásához szükséges ATP mennyiségét csökkenti.<sup>130</sup>

Ezen hatások mellett a GLP-1R aktiválásának van még egy depolarizációra kifejtett hatása. Depolarizáció során a sejt feszültségfüggő  $K^+$  csatornái kinyílnak, amelyen keresztül  $K^+$  áramlik ki a sejtéből, hogy visszaállítsa az egyensúlyi membrán potenciált. A GLP-1R agonisták ezen csatornák nyílását akadályozzák meg, megnyújtva a membrán repolarizáció időtartamát és növelve a beáramló  $Ca^{2+}$  mennyiségét, végső soron a szekretált inzulin mennyiségét.<sup>130</sup>

A beáramlott  $Ca^{2+}$  beindítja az azonnal felszabadítható inzulin granulumok szekrécióját és részt vesz az endoplazmás retikulumból történő  $Ca^{2+}$  indukált  $Ca^{2+}$  felszabadításban (CICR) is. Az endoplazmás retikulumból történő  $Ca^{2+}$  felszabadítást az IP3R (inozitol-trifoszfát receptor) és a RYR (rianodin receptor) szabályozza. Mindkét receptor tartalmaz egy  $Ca^{2+}$  kötőhelyet, amely megnyitja a  $Ca^{2+}$  csatornát. A GLP-1R agonisták úgy segíti elő a CICR folyamatot, hogy az IP3R és a RYR-t érzékenyítik  $Ca^{2+}$ -al szemben, mely folyamatban részt vesz mind a PKA, mind az Epac fehérje.<sup>130</sup>

Végezetül a GLP-1R agonistáknak szerep jut a raktározó inzulin granulumok felszabadítható granulumokká válásában is. A fentebb említett mechanizmus során  $H^+$  illetve  $Cl^-$  áramlik a granulum belsejébe, ezáltal csökkentve a pH-t. A cAMP által aktivált Epac a  $Cl^-$  áramlását gyorsítja fel, azáltal, hogy a granulumokban található SUR1-el lép kölcsönhatásba.<sup>130</sup>



Megállapíthatjuk, hogy a GLP-1R agonisták az inzulin szekréció szinte minden részlépésére pozitívan hatnak és ezt glükóz-függő módon teszik.

Az Exendin-4 egy 39 aminosavból álló GLP-1R agonista, melyet a viperaigyék (*Heloderma suspectum*) nyálmirigyéből izoláltak. A GLP-1-el ellentétben az Exendin-4 nem rendelkezik DPP-4 (dipeptidil-peptidáz-4) hasító hellyel, s ezért sokkal hosszabb a féléletideje, ami elősegíti azt hogy gyógyszerként felhasználható. Hatásai a GLP-1-hez hasonlóan a glükóz-függő inzulin szekréciója, illetve a glukagon szekréciójának gátlása. Továbbá az Exendin-4  $\beta$ -sejt védő hatással is rendelkezik, elősegítve a  $\beta$ -sejtek proliferációját, illetve a differenciációt, gátolva ezzel a  $\beta$ -sejtek apoptózist.

A glükóz homeosztázisra gyakorolt pozitív hatása mellett az Exendin-4-nek vannak további nem glükózhoz kapcsolt hatásai is. Ilyen a jóllakottság érzetének növelése, a táplálkozási inger csökkentése, valamint a gyomor kiürülés lassítása. Ennek következtében azon páciensek körében, akik huzamosabb ideig Exendin-4-t használtak, súlycsökkenés volt megfigyelhető, miközben a vércukorszintjük a normális szinten stabilizálódott.

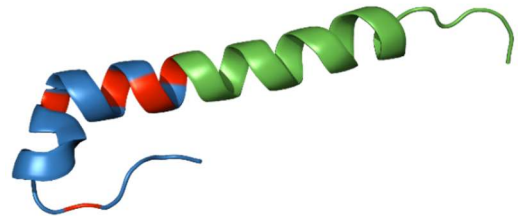
Az Exendin-4-et először az Egyesült Államokban alkalmazták gyógyszerként (BYETTA® exenatide). Mellékhatásai közül leggyakoribb a hányinger, hasmenés és hányás, amelyek tünetek a folyamatos szedés során fokozatosan megszűnnek. A tünetek elkerüléséhez a beadott dózis fokozatos emelése javasolt. Az Exendin-4 legsúlyosabb hátránya a molekula előállításának / tárolásának és forgalmazásának magas együttes költsége: jelenleg 50000 \$ az éves terápiás adag költsége.<sup>131</sup>

#### **1.4. Bevezetés - Minifehérjék**

A Triptofán-kalitka motívummal rendelkező minifehérjék olyan polipeptidek, amelyek a több ezer aminosavas fehérjékhez hasonlóan jól meghatározott, stabil és globuláris térszerkezettel rendelkeznek. A TC5b minifehérje egyike az első, ezeknek a kritériumoknak megfelelő makromolekula (PDB: 1L2Y)<sup>132,133</sup>. NMR spektroszkópiával vizes oldatban meghatározott térszerkezetére jellemző egy *N*-terminális  $\alpha$ -hélix, valamint egy ezt követő rövidebb poliprolin II hélix, amelyek aminosav oldalláncai egy központi triptofán oldallánccal hidrofób magot alkotva alakítják ki a globuláris térszerkezetet.<sup>132,133</sup>

A TC5b-t több aminosav módosítása és N-terminálisának elhagyása révén az Exendin-4 polipeptidből (PDB: 1JRJ) alakították ki (**11. ábra**)<sup>135</sup>. Ezt a 39 aminosav hosszúságú polipeptidet a viperagyík (*Heloderma suspectum*) nyálából izolálták. Különlegessége hogy hasonló biológiai hatása van mint a GLP-1 peptidhormonnak, azonban affinitása nagyobb, a féléletideje hosszabb, így a 2-es típusú diabétesz gyógyszerkutatásának fókuszába került.<sup>134</sup>

Az Exendin-4 atomi felbontású térszerkezetét NMR- és röntgenkristallográfiai módszerekkel is meghatározták (PDB: 1JRJ, 3C5T). E két különböző térszerkezet közös vonása, hogy a 7-28-as aminosav pozíciók között a polipeptidlánc helikális térszerkezetű, míg a C-terminálison az ún. Trp-kalitka szerkezeti motívum azonosítható. Az NMR-szerkezet

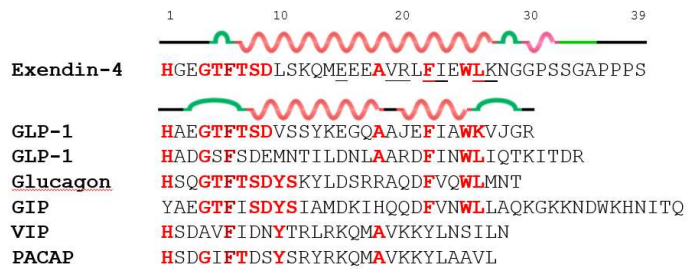


**11. ábra:** Az Exendin-4 térszerkezete. Zölddel jelölve az N-terminális, a GLP-1 receptor transzmembrán régiójával kölcsönható helikális rész, kékkel jelölve a Triptofánkalitkát alkotó szerkezeti elem, pirossal jelölve az Exendin-4 és az általunk tervezett H19 minifehérje közötti aminosavkülönbségek.

meghatározás 30%-os TFE oldatban történt, míg a kristályszerkezetet a GLP-1 receptor extracelluláris doménjéhez kötött formában határozták meg<sup>72, 135</sup>. A két, némiként eltérő környezetben meghatározott térszerkezetek alapján megállapítható, hogy a TFE-s környezet inkább modellezi a receptorhoz kötött állapotot. Az Exendin-4 N-terminálisa 82%-ban homológ a GLP-1-el (7-36), konzervált aminosavaik részt vesznek a receptor kötésben, amelyet elsősorban a központi hélix „irányít” néhány kulcsamino savon keresztül: pl. His1, Glu3, Thr5, Phe6<sup>136,137</sup>.

Az Exendin-4-től eltérően, a GLP-1 receptor extracelluláris doménje csak alacsonyabb affinitással képes a GLP-1 megkötésére, melynek oka feltételezhetően a kötődési kölcsönhatásban résztvevő ligandum oldali hidrofil aminosavak kedvezőbb elrendeződése a receptor oldali töltött aminosavakhoz viszonyítva, valamint hogy az Exendin-4 helicitása fokozottabb. A Trp-kalitkának nincsen kimutathatóan közvetlen szerepe a receptor kötés kölcsönhatásában. Mind az Exendin-4, mind a TC5b típusú minifehérjék számos kutatás fókuszában található, mely munkák célja a térszerkezet-stabilitásért felelős kölcsönhatások szisztematikus felderítése és végső soron az Exendin-4 térszerkezetének optimalizálásán keresztül egy jobb és hatékonyabb gyógyszerhatóanyag előállítás.

Az inkretin peptidhormonokra (12. ábra) általánosan jellemző, hogy kristályszerkezetük alapján ampfiptikus  $\alpha$ -helikális térszerkezettel rendelkeznek. Oldatfázisú szerkezetük alapján a helikális rész egy 3-5 aminosavas linker révén egy N-



**12. ábra:** Inkretin peptidhormonok aminosav szekvenciája, kiemelve az Exendin-4 és a GLP-1 másodlagos szerkezetével. Pirossal és bordóval jelölve a konzervált, aláhúzással a receptorhoz való kötődésben szerepet játszó aminosavak.

és egy C-terminális részre osztja azt. A vizsgálatok azt mutatják, hogy a két rész funkciója eltérő lehet<sup>138</sup>. Míg az N-terminális hélix felelős a receptor aktiválásért, amely a transzmembrán régióban történik, addig a C-terminális hélix az extracelluláris doménhez kötődve, szerepéből adódóan feltételezhetően „irányítja” az N-terminális rész kölcsönhatásának kialakulását a transzmembrán hélixel<sup>139,140,141,142</sup>. Azaz a receptor aktiválása két lépésben történik (*two-domain modell*), amely feltételezést trunkáns és kiméra modellekkel végzett kísérletek is bizonyítják<sup>143</sup>. A rendelkezésre álló szerkezetek alapján a GLP-1 és az Exendin-4 közötti fő térszerkezeti különbség, hogy míg az előbbiben nem-folyamatos az N-terminális hélix, addig az utóbbiban igen.

Számos inkretin hormon, így a GLP-1 és az Exendin-4 esetében is, kimutatták a molekula aggregálódási hajlamát<sup>144,145</sup>. Vizes oldatban, fiziológias körülmények (pH, hőmérséklet) között ezek a polipeptidek helikális köteggé állnak össze<sup>146</sup>, amely nanorendszer fokozza az immunválasz kialakulásának kockázatát, mely jelentős hátrány ezen hatóanyagok gyógyászati alkalmazása során<sup>147</sup>. Emiatt célszerű olyan kémiai módosításokat eszközölni (pontmutáció, oldallánc konjugáció), amelyek növelik a peptidhormonok vízoldhatóságát és hőstabilitását.

A szerkezetstabilitás fokozása révén kialakíthatunk olyan kompakt struktúrát, amely nagyobb eséllyel megőrzi natív térszerkezetét akár szélsőséges körülmények (pH, hőmérséklet, ozmolalitás, koncentráció) között is. Ha a peptidhormon bioaktivitása nem csökken, a stabil gyógyszermolekula révén könnyebbé válik a termelés, a tárolás és alkalmazása is biztonságos lesz. Ezen gondolat mentén olyan Exendin-4 analógok, potenciális agonisták és antagonisták tervezése volt a célunk, amelyek kiindulópontja a Trp-kalitka motívumú minifehérje, amely racionális módosításával növelni tudjuk annak helicitását, és egyben redukálni aggregációs hajlamát.

## 2. Anyagok és módszerek

### 2.1. DNS-konstrukciók

#### 2.1.1. pET-32b alapú fúziós vektorcsalád (p32FUS)

A kitűzött célok számos fehérje előállítását tette szükségessé, amelyek előállításainak optimalizálásához szükséges volt a különböző fúziós fehérjék vizsgálata. A munka során a klónozási feladatot restriktív módszerrel végeztem, így célszerűnek látszott azonos klónozó helyek kialakítására, lehetővé téve a különböző fehérjék ugyanazon primerekkel történő amplifikálása után több vektorba való egyszerű beillesztése.

Alapvektorként a pET-32b vektor szolgált, amelybe a fúziós fehérje partnert *NdeI* és *BamHI* restriktív enzimekkel klónoztam (**5. táblázat**), megőrizve az eredeti Multi Cloning Site-ot a *BamHI* hasítási helytől 3' irányban, és a C-terminális His-tag kialakításának lehetőségét. Több esetben a fúziós fehérje N-terminálisán His-tag történt kialakításra (részletesebben ld. *Függelék F1. ábra*). A kialakított DNS-konstrukciókat a következő táblázatok tartalmazzák – Minifehérjék (**11. táblázat**) / nGLP-1R (**10. táblázat**) / podocin (**9. táblázat**).

**5. táblázat:** p32FUS vektorcsalád áttekintése (\*opcionális kialakíthatóság). Részletesebben ld. *Függelék F1. ábráját*.

	Fúziós partner	HIS affinitás címke	Hasító enzim	Felhasználás
p32_H6UBQ	Ubikvitin	N-terminális C-terminális*	Yeast Ubiquitin Hydrolase	Trp-kalitikás minifehérjék, nGLP1R, Podocin CoiledCoil domén
p32_H6SUMO	SUMO	N-terminális C-terminális*	SLP1	Trp kalitikás minifehérjék, nGLP1R, Podocin CoiledCoil domén
p32_Trx(thr)	Thioredoxin	C-terminális	Thrombin	nGLP1R
p32_(tev)GST	GST	C-terminális*	TEV	Podocin CoiledCoil domén
p32_H6MBP(tev)	MBP	N-terminális C-terminális*	TEV	nGLP1R
p32_MBP(thr)	MBP	C-terminális*	Thrombin	nGLP1R, Podocin intracelluláris domén fragmensek
p32_DsbCH6(thr)	DsbC	C-terminális*	Thrombin	nGLP1R

Kivételnek tekinthető a p32\_H6UBQ vektor, ahol az *NdeI* és a *BamHI* helyek közé klónozott N-terminális His-taggal rendelkező ubikvitint kódoló génszakaszt a

*BamHI* hasítási helytől 5' irányban *SacII* hasítási helyet is kialakítottam. Erre azért volt szükség, hogy az átíródó célfehérje ubikvitin hidrolázzal történő hasításakor a célfehérje elsődleges szerkezete ne módosuljon, valamint a korábbi kutatási projektek során kialakított pUBK2 vektorhoz tervezett primerekkel kompatibilis maradjon a rendszer.

### 2.1.2. Cell-free expresszióhoz kialakított DNS konstrukciók

A teljes, szignálszekvencia nélküli GLP-1 receptor cDNS-e a cell-free expresszióhoz optimalizált N-terminális AT-címkével (KYYKYY) pET-21 vektorba klónozott formában adták rendelkezésemre (Frank Bernhard). A további sejtmentes expresszióhoz kialakított konstrukciókat ebből a vektorból site-directed mutagenézissel (deléción) alakítottam ki (**6. táblázat**).

**6. táblázat:** A Cell-free expresszióhoz elkészített konstrukciók

	Vektor	N-term / C-term címke	Pozíció	Leírás
<b>full GLP1R</b>	pET-21a	AT / His10	24-463	Teljes GLP-1R
<b>ECD145 GLP1R</b>	pET-21a	AT / His10	24-145	Teljes ECD (nGLP1R)
<b>ECD132 GLP1R</b>	pET-21a	AT / His10	24-132	Trunkáns ECD (tnGLP1R)
<b>TM3 GLP1R</b>	pET-21a	AT / His10	24-256	GLP-1R TM3-ig
<b>TM7 GLP1R</b>	pET-21a	AT / His10	24-411	GLP1R TM7-ig

### 2.1.3. További felhasznált DNS konstrukciók

A pelB szignálszekvenciával kifejezett nGLP-1R konstrukció a pET-22b vektor alkalmazásával történt, a célfehérje BamHI és XhoI hasítási helyek közé történt klónozással.

A DsbC expressziójához a pBA2219-es expressziós vektort használtam (Addgene #38152) az ott jelzett protokoll alapján.<sup>148</sup>

### 2.1.4. Alkalmazott baktériumtörzsek

A különböző DNS konstrukciók kialakítása során *E. coli* Dh5 $\alpha$  vagy NEB 6 $\alpha$  baktériumtörzset alkalmaztam. Az expressziós kísérletek során Trp-kalitka szerkezeti motívumú minifehérjék és a podocin-konstrukciók során BL21(DE3) baktériumtörzset használtam. A GLP-1 receptor extracelluláris domén előállításánál BL21(DE3), NEB Shuffle T7(DE3), OrigamiB(DE3) baktériumtörzseket alkalmaztam.

## **2.2. E. coli heterológ expresszió és az egyes fehérjék tisztítása, előállítása**

Az alkalmazott tápoldatok és pufferek listáját és összetételét ld. *Függelék*

### 2.2.1. Triptofán kalitkás minifehérjék

Az amino terminálison 6xHis címkét tartalmazó ubikvitin fúziós fehérjéket *E. coli* BL21(DE3) sejtekben termeltettem túl. Az agar lemezre szélesztett transzformált sejtek egy telepéből kiindulva ON előkultúrát készítettem 50 ml LB tápoldatban, 37 °C-on 160 rpm-el rázatva. Ebből az előkultúrából indítottam a literes nagyexpressziót, 8ml előkultúra / L tápoldat hozzáadásával. A sejteket 100 µg/ml ampicillin antibiotikummal kiegészített LB tápoldatban 37 °C-on 1,2 OD<sub>600</sub> értékig növesztettem, majd 1 mM IPTG-vel indukálva 37 °C-on 4 órán át 200 rpm-el rázattam. Feltárást követően Profinity™ IMAC Ni-Charged Resin (Bio-Rad) gyöngyök segítségével, affinitás kromatográfiával tisztítottam. Az eluált fehérjeoldatból dialízissel eltávolítottam az elúcióhoz használt imidazolt, majd a fúziós fehérjét ubiquitin-hidrolázzal történő proteolitikus hasítást követően egy második Ni-IMAC affinitás kromatográfiás lépéssel választottam el a célfehérjétől. Az így áteső frakcióban maradt célfehérjéket fordított fázisú HPLC segítségével (Jupiter 300 C18 300 E 10x250; Phenomenex) tisztítottam. Liofilizálást követően a fehérjék tömegét minden esetben tömegspektrometriás méréssel ellenőriztem dr. Schlosser Gitta közreműködésével. A liofilizált fehérjéket további felhasználásig -80 °C-on tároltam.

<sup>15</sup>N illetve <sup>13</sup>C izotópjelölt minta expresszálása esetén a következőképpen jártam el. A fenti literes expresszió leírását követve a sejteket LB tápoldatban 37°C-on 0,8 OD<sub>600</sub> értékig növesztettem, majd 3000 rpm-es 4 °C-on centrifugálást követően kétszer 100 ml 1x M9 pufferrel mostam a sejteket. A mosási lépések után 3000 rpm-el, 4 °C-on centrifugáltam a sejteket, a második lépés után a sejteket a végső M9 tápoldatban szuszpendáltam fel, és indítottam el a literes nagyexpressziót 37 °C-on 180 rpm-el rázatva. Az expresszió indítását követően 1 órával indukáltam a sejteket 1 mM IPTG-vel, 3 órán keresztül 37 °C-on.

SUMO fúziós fehérje alkalmazása esetén is a fent leírtak szerint jártam el.

### 2.2.2. Podocin H1 (coiled coil) fragmens

Az amino terminálison GST fúziós fehérjecímkét tartalmazó coiled coil fragmenseket *E. coli* BL21(DE3) sejtekben termeltettem túl. A sejteket 100µg/ml

ampicillin antibiotikummal kiegészített LB tápoldatban 37 °C-on 0,8 OD<sub>600</sub> értékig növesztettem, majd 0,5 mM IPTG-vel indukálva 12 órán át 200 rpm-el 18 °C-on rázattam. Feltárást követően fehérjéket GST-Bind™ Resin (Novagen) gyöngyök segítségével, affinitás kromatográfiával tisztítottam. Egy dialízis lépést követően a GST címkét proteolitikus úton, thrombinos hasítással távolítottam el a célfehérjétől. Egy második GST affinitás tisztítási lépéssel az így átesőbe került coiled coil fragmenseket tartalmazó fehérjeoldatot fordított fázisú HPLC segítségével (Jupiter 300 C18 300E 10x250 Phenomenex) tisztítottam. Liofilizálást követően a fehérjék tömegét minden esetben tömegspektrometriás méréssel ellenőriztem dr. Schlosser Gitta közreműködésével. A liofilizált fehérjéket további felhasználásig -80 °C-on tároltam.

A <sup>15</sup>N izotópjelölt forma előállítása során a *2.2.1.-es alfejezetben* leírt protokolt alkalmaztam.

### 2.2.3. SPFH fragmensek

Az amino terminálison MBP fúziós fehérjecímkét tartalmazó Podocin intracelluláris fragmenseket BL21(DE3) sejtekben termeltettem túl. A sejteket 100 µg/ml ampicillin antibiotikummal kiegészített LB tápoldatban 37 °C-on 0,8 OD<sub>600</sub> értékig növesztettem, majd 0,5 mM IPTG-vel indukálva 12 órán át 200 rpm-el 18 °C-on rázattam. Feltárást követően fehérjéket Amylose TM Resin (NEB) gyöngyök segítségével affinitás kromatográfiával tisztítottam. Dialízist követően anion csere kromatográfia során, HiTrapQ ion-exchange oszlop (GEHealthcare) használatával tovább tisztítottam. A végső tisztítási lépést gélszűrőssel Superose 6 oszlopon végeztem. A fehérjék tömegét minden esetben tömegspektrometriás méréssel ellenőriztem dr. Schlosser Gitta közreműködésével. A fehérjék koncentrációját A<sub>280</sub>-on mért abszorbancia és a fehérjék extinkciós koefficiense alapján állapítottam meg, folyékony N<sub>2</sub>-es fagyasztást követően -80 °C-n tároltam felhasználásukig.

### 2.2.4. nGLP1r előállítás, renaturálás, és tisztítás

Az nGLP-1r előállítását az alábbi publikációkban leírtakat megfontolva, a következőképpen végeztem.

A **10. táblázatban** található konstrukciók expressziója 3 különböző baktériumtörzsben (BL-21, OrigamiB, Shuffle) történt. Jelöletlen fehérje előállítása során 2YT, míg <sup>15</sup>N jelölt forma előállításakor M9 tápoldatot használtam.

Az expresszió módszerei nem tértek el a 2.2.1-3. *alfejezetekben* leirtaktól jelentősen. A próbaexpressziók során teszteltem a különböző indukálószer koncentrációjának (0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM), és az indukálás hőmérsékletének (16 °C, 28°C, 37 °C és hosszának (3 óra, 6 óra, 12 óra) hatását. A tapasztalatok szerint azon konstrukciók esetében, amelyek expressziója során a célfehérje inklúziós testbe kerül, minden vizsgált körülmény és baktériumtözs-típus alkalmazásával inklúziós tesztebe kerültek. Ezek esetében az expressziót 37 °C 180 rpm rázatás mellett 2YT tápoldatban végeztem, a sejteket 1 mM IPTG-vel OD<sub>600</sub>=1 értéknél indukáltam 3 órán keresztül. A szolubilis formába citoplazmába kifejeződő konstrukciók (MBP és nsDsbC) esetében a 37 °C-on OD<sub>600</sub>=0,8 sejtsűrűségig növesztett kultúra 0,5 mM IPTG-vel történő indukálása 16 °C-on 12 órán keresztül hozta a legnagyobb hozamot, és kinyerhető natív fehérje mennyiséget.

#### 2.2.4.1. *Inklúziós testként expresszálandó nGLP-1R renaturációja és tisztítása*

A sejtek centrifugálását követő feltárási lépést követően a csapadékot 3x átmostam (pufferrendszert ld. *Melléklet*), annak érdekében, hogy minél több *E. coli* fehérjétől eltávolítsak. A végső csapadék fázist 20 ml 6M guanidin-hidroklorid és 50 mM DTT oldatában vettem fel, majd 12 órán át 37 °C-on gyenge rázatás mellett inkubáltam. Ezt követően a csapadékfázist centrifugálással eltávolítottam. Az eredeti protokoll szerint ezt a mintát denaturáló Ni-IMAC-el tisztították, amelyhez a mintából dialízissel eltávolították a DTT-t. Ezt módosítottam úgy, hogy a mintát C4-es szemipreparatív RP-HPLC oszlopon, acetonitril gradiens ellenében tisztítottam meg. Az elúciós frakciókat dializáltam, tömegspektrometriával igazoltam a megfelelő redukált molekulatömegeket. Ez a változtatás lehetővé tette a pontosabb koncentrációmérést a liofilizált minta tömegének megállapításával. A liofilizált mintát 4 M-os guanidin-hidroklorid 1 ml-nyi oldatában vettem fel, és renaturáltam a következőképpen.

A fehérjeminta 15 percenkénti lassú (Pasteur-pipettával) cseppenkénti hozzáadásával a refold puffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1000 mM L-Arg, 10 mM GSH, 1 mM GSSG, 10mM EDTA, pH 8,5) végtérfogatára nézve 50 µg/ml koncentrációig. A renaturálás állandó kevertetés mellett légkondicionált szobában (18-20 °C) történt, a mágneses keverő melegítő hatása miatt vízfürdőben, 48 órán keresztül. Ezt követően a csapadékot centrifugálással (14000 rpm, 4°C, 30 perc) eltávolítottam. Dialízissel ezt követően eltávolítottam az L-Arg, GSH, GSSG és EDTA összetevőket. A His-tag-el rendelkező mintát ezt követően Ni-IMAC segítségével, a His-tag nélkülieket



Q-IEX kromatográfiával koncentráltam. Az elúciós frakciót C4-es oszlopon RP-HPLC segítségével tisztította acetonitril gradiens ellenében, majd a frakciókat liofilizáltam és tömegspektrometriai illetve diszulfidhid analízissel azonosítottam a megfelelő fehérjét. A minták MS-analízisét Szegeden dr. Tóth Gábor laboratóriumában végezték.

#### *2.2.4.2. Szolubilis formába expresszálandó nGLP-1R renaturációja és tisztítása*

A sejtek feltárását követően az első tisztítási lépés az MBP-fúziós fehérje esetében egymást követő amilóz- illetve Ni-affinitás kromatográfiával történt, nsDsbC fúziós partnerrel csak Ni-affinitás kromatográfiával történt. Az ezt követő dialízis (50 mM Tris.HCl, 150 mM NaCl, pH 8,5) után a renaturálás menete a következő volt.

Koncentrációmérést követően a dializált fehérjeminta 15 percenkénti lassú (Pasteur-pipettával) cseppenkénti hozzáadásával a refold puffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM GSH, 1 mM GSSG, 10 mM EDTA pH 8,5) végtérfogatára nézve 100 µg/ml koncentrációig. A renaturálás állandó kevertetés mellett légkondicionált szobában (18-20 °C) történt, a mágneses keverő melegítő hatása miatt vízfürdőben, 48 órán keresztül. Ezt követően a csapadékot centrifugálással (14000 rpm, 4°C, 30 perc) eltávolítottam, és az anioncseréhez többszöri nagytérfogatú dialízissel (50 mM Tris, 50 mM NaCl) készítettem elő, amelyet 0,1-1 M NaCl gradienssel végeztem. A fúziós fehérjék elúciója 200-250 mM NaCl koncentrációnál történt, amely lehetővé tette a közvetlen thrombinos illetve TEV proteázos emésztést, majd fúziós partnertől történő közvetlen második Ni-IMAC tisztítást. Az nGLP-1R imidazolos elúciója esetén dialízist (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5), „áteső” frakció esetén azonnal C4-es oszlopon reverz fázisú HPLC tisztítás követte acetonitril gradiens ellenében. Az így tisztított frakciókat liofilizálást követően MS-analízisét Szegeden dr. Tóth Gábor laboratóriumában végezték.

#### 2.2.5. Bakteriális expresszió és a fehérjék tisztításának költségszámítása

A DNS-konstrukcióhoz használt vegyszerek, reagensek és enzimek költségszámítása során kizárólag a laboratóriumunkban alkalmazott Thermo Fisher termékek nettó árát vettem alapul, mivel ezek megfelelő minőségűek, továbbá az egyetemi beszerzési sajátosságok miatt ezek voltak a lehető legkönnyebben elérhetőek. A doktori munkám során a klónozást restriktív módon illetve site-directed mutagenézissel végeztem, így a költségszámítás ezt a két módszert mutatja. A számítás során a pET vektorcsalád MCS régiójának restriktív enzimeinek átlagárát vettem figyelembe az enzim-árának meghatározásakor, mivel az egyes enzimek ára jelentősen különbözhet. A reagensek nyers árait a *Függelék* tartalmazza.

A bakteriális expresszió költségszámítása során az egyes tápoldat típusok literre vetített ára mellett a célfehérje tisztításának kromatográfiás a módszerének vegyszerigényét vettem alapul. A vegyszerek, reagensek árának számítása 3 különböző gyártó azonos minőségű vegyszereinek átlagából számoltam (Molar, VWR, Roth), ezeket az adatokat a *Függelék* tartalmazza.

A DNS-konstrukció készítésének és a fehérje expresszió és tisztítás költségszámolásakor a fogyóeszköz- (pipettahegy, centrifugacsövek, stb.) és a rezsijellegű költségek számolását (desztillált víz, energia költségek, készülék-amortizáció) a vegyszerár 20%-ában határoztam meg.

## 2.3. Cell-free expresszió

Az alábbiakban részletezem az *E. coli* alapú cell-free expresszió kivitelezését. A módszert a frankfurti Goethe University-n sajátítottam el egy tanulmányút során, majd ezt követően az MTA-ELTE Fehérjemodellező kutatócsoportban is sikeresen implementáltam. Mivel a módszer előkészítése eltér a publikáltaktól, valamint a hazai infrastruktúrához is alkalmazkodnom kellett, a fejezet több módszerével szemben részletesebben ismertetem.

### 2.3.1. S30 sejtextraktum preparálása

Az S30 extraktum precíz előállítása nélkülözhetetlen a cell-free expresszióhoz. Az alábbiakban az extraktum készítését részletezem, mivel előállításának módja különbözik a publikálttól, valamint később az MTA-ELTE Fehérjemodellező kutatócsoportban ez alapján alkalmaztam. A teljes folyamat 3 napot igényel, amelynek végén az extraktum aktivitásának tesztelése  $Mg^{2+}$ -tesztreakcióval történik.

1 liter LB tápoldatban agar lemezre szélesztett, transzformált BL21(DE3) *E. coli* sejtekből overnight indítókultúrát készítünk, ennek 200 ml-ével indítjuk el másnap a fermentációt (paraméterek ld. **7. táblázat**). A fermentálást 37 °C-on végezzük, folyamatos OD<sub>600</sub> érték monitorozás mellett. Amikor az eléri a 4-4,5-ös értéket, a fermentort lehűtjük 13-16 °C-os hőmérsékletre, majd a sejteket lecentrifugáljuk (4 °C 5000 rpm). A következő lépéseket folyamatosan jégen végezzük.

A sejteket 200-300 ml 1x S30A pufferrel 3-szor mossuk és centrifugáljuk (4 °C, 8000rpm, 10 perc). Az utolsó centrifugálást követően, lemérjük a sejtömeget, és ennek 110%-ának megfelelő S30B pufferrel felszuszpendáljuk a sejteket, majd French press

segítségével tárjuk fel a sejteket. Megjegyzendő hogy más sejt feltárási módszer, pl. ultrahangos sejtroncsoló, nem alkalmas az extraktum elkészítéséhez.

A feltárást követően centrifugáljuk a csapadékot (30000xg, 10 min, 4 °C), továbbiakban a felülúszóval dolgozunk tovább.

**7. táblázat: A fermentáció paramétere**

TB tápoldat (10l)	Összetevő neve		Bemérendő mennyiség	Összeállítás
		Élesztő kivonat		
	Tripton		120g	
	Glicerín		50g	
	Glükóz oldat		198g	1l dH <sub>2</sub> O-ban feloldani, filtersterilizálni
	35mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		48g	1l dH <sub>2</sub> O-ban feloldani és autoklávozni
	144mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		250g	
<b>Fermentor beállítási paraméterek</b>	Kevertetés	Hőmérséklet	Nyomás	Levegőáram
	500 rpm	37 C	1,6 bar	30l/min

A felülúszót 400 mM NaCl koncentrációra állítjuk be 5 M-os törzsoldatból. Vízfürdőben 42 °C-on 45 percig inkubáljuk, majd 5 liter S30C puffer ellenében dializáljuk, először pár órát, majd overnight hidegszobában. Az extraktumot ezt követően centrifugáljuk (30000xg, 30 perc, 4 °C). A felülúszót 200, 400, 800 µl-es aliquótokba osztjuk az extraktumot, miközben folyékony N<sub>2</sub>-ben fagyasztjuk és felhasználásig a -80 °C-os hűtőben tároljuk.

Az extraktum elkészítéséhez az összetevők listáját ld. *Függelék F4. táblázatát*.

**2.3.2. T7 RNS polimeráz előállítása és tisztítása**

A pBA2239 plazmidot használva az enzimet a megfelelő publikáció alapján állítottam elő.<sup>149</sup>

**2.3.3. MSP fehérje előállítása és tisztítása**

Az expresszált MSP fehérje génjét (MSP1E3D1) pET-28b vektor tartalmazta, N-terminális His címke és az MSP fehérje között TEV proteáz hasító hely helyezkedik el. A vektort BL-21(DE3) sejtekbe transzformáltam. A transzformált telepeket tartalmazó lemezről egy telepről induló overnight kultúrát készítettem, a következő nap ebből oltottam be a literes LB tápoldatokat. A sejteket 37 °C-on rázattam, OD<sub>600</sub>=1 értéknél 1 mM IPTG-vel indukáltam. Az indukálási hőmérsékletet 1 óra után 37 °C-ról 28 °C-ra csökkentettem, 4 óra elteltével a sejteket centrifugáltam (10 perc, 6000xg 4 °C). A

fehérjét nemcsak rázató lombikban, hanem fermentorban is letermeltem, ennek paramétereit ld. **7. táblázat**.

A sejteket MSP-C (+1 mM PMSF és 1% (v/v% Triton X-100)) pufferben történő felszuszpendálást követően ultrasonikálással feltártam, majd 30000xg 20 perces 4 °C-s centrifugálást követően a felülúszót 0.45 µm-os szűrőn átszűrtem. A fehérjét Ni-IMAC affinitás kromatográfiával tisztítottam. A 10 ml térfogatú HisTrap oszlop MSP-A-val történő egyensúlyba hozását követően perisztaltikus pumpával vittem fel a fehérjeoldatot az oszlopra. Ezt követően 5-5 oszloptérfogatnyi MSP-B, MSP-C és MSP-D pufferrel mostam. Az elúciót MSP-E pufferrel végeztem, 1,5 ml frakciókat szedve. A frakciók A<sub>280</sub> abszorbanciájának megállapítása után 10% glicerollal egészítettem ki a megfelelőnek vélt frakciókat, SDS-PAGE-hez mintát vettem belőlük és további felhasználásra a -20 °C-on tároltam.

A Nanodisc összeállítása Henrich és munkatársai publikációja alapján történt<sup>150</sup>.

### 2.3.4. Analitikai léptékű Cell-free expresszió

Az analitikai cell-free reakcióhoz az összetevők listáját a **Függelék F2. táblázata**, a törzsoldatok összeállítását a **Függelék F3. táblázata** tartalmazza, a reakció összeállítása egy excel tábla kitöltése alapján történt, erre példa a **13. ábra**.

Mg Screen GLP-1

Einheiten	Konz der Stock-Lösung	Kompon. des RM	Zugabe zum RM [µl]	zugebe Endkonz.	Mg <sup>2+</sup> Anteil [mM]	K <sup>+</sup> Anteil [mM]
µg/ml	10	E.coli lipids	0,0	0,00		
x	1	S30-Extrakt	306,3	0,35	4,9	21
mg/ml	0,9944	Plasmid	13,2	0,015		
U/lul	40	Ribolock	6,56	0,30		
U/lul	3,2	T7-RNA Pol.	10,94	0,040		
mg/ml	40	tRNA E.coli	10,94	0,50		
mg/ml	10	Pyruvat Kinase	3,50	0,04		
%	15	Erj58	0,0	0,00		
mM	25,00	RCVMDE	35,0	1,00		
mM	25,0	AA-Mix	19,3	0,55		
mM	1000	AcP	17,5	20,00		22
mM	1000	PEP	17,5	20,00		67
x	75	NTP	11,7	1,0		
mM	500	DTT	3,9	2,0		
mg/ml	10	Folsäure	9,0	0,10		
x	50	Complete	17,0	1		
x	24	Puffer (H+E)	32,1	1,0		50
mM	1000	Mg(OAc) <sub>2</sub>	9,0	9,1		9,1
mM	4000	KOAc	28,4	130,0		130,0
%	40	PEG8000	40,0	2		
%	10	NaN <sub>3</sub>	4,4	0,05		
		H <sub>2</sub> O	276,1			
			588,7		14,0	
		MIX I Vol.	598,7			
		Volumen RM	875	TOTAL	14	290,0
		aus RM/FM	247,3		mM Mg <sup>2+</sup>	mM K <sup>+</sup>
					(+/- 2mM)	20mM)

Endkonz.	Kompon. des FM	Zugabe zum RM/FM [µl]	zusätzliche Zugabe zum FM [µl]
	S30-Puffer		4025
			173
			36
			144
			46
	Erj58	0,0	
	RCVMDE	495,0	
0,5	AA-Mix	272,3	230
	AcP	247,5	
	PEP	247,5	
	NTP	165,0	
	DTT	49,5	
	Folsäure	125,8	
	Complete	247,5	
	Buffer (H+E)	453,8	
	Mg(OAc) <sub>2</sub>	112,6	
	KOAc	402,2	
	PEG8000	618,8	
	NaN <sub>3</sub>	61,9	
	H <sub>2</sub> O	386,3	509
		846,7	7505
		3497	11500
		12375	
		3497	Volumen
		-247,3	für RM
		3249,9	für FM

FM	MgoAc	14	16	18	20	22	24
	Mix II	1174,7	1174,7	1174,7	1174,7	1174,7	1174,7
	MgoAc	0,0	36,0	72,0	108,0	144,0	180,0
	H2O [µl]	625,3	589,3	553,3	517,3	481,3	445,3
	Volumen[µl]	1800,0	1800,0	1800,0	1800,0	1800,0	1800,0

RM:	MgoAc	14	16	18	20	22	24
	Mix I	88,9	88,9	88,9	88,9	88,9	88,9
	MgoAc	0,0	2,6	5,2	7,8	10,4	13,0
	H2O [µl]	41,1	38,5	35,9	33,3	30,7	28,1
	Volumen[µl]	130,0	130,0	130,0	130,0	130,0	130,0

13. ábra: Cell-free reakció összerakásához használt excel-táblázat

## 2.4. GLP-1R agonisták tesztelése

A heterológ expresszóval előállított Exendin-4 analógokat in vitro INS-1E sejtekkel teszteltem. A mérés módszerét az alábbiakban részletezem.

A folyékony N<sub>2</sub>-ben tárolt sejteket kiolvasztjuk, majd felszaporítjuk a standard protokollok szerint. A kultúrát médiumcserével (~2 naponta) és passzálassal tartjuk fent (~80%-os borítottság). A fagyasztott sejtek 62 passzálsági számúak, az 5. passzálást követően kezdtük el velük a kísérletek végzését.

Ehhez először sejtszámolást végeztünk Trypan-blue festék és Bruker-kamra segítségével. Az összsejtszámot két független számolás átlaga és a megfelelő képlet használatával ( $=n \cdot \text{hígítás} \cdot \text{sejtszuszpenzió\_össztérfogata} \cdot 10^4$ ) állapítottuk meg. A megfelelő sejtszámot tartalmazó szuszpenziót tenyésztő flaskába oltjuk át, az 5. passzálást követően 24 lyukú tesztlemezsre oltjuk őket, hogy a rekeszekbe pipettázott 1ml sejtsuszpenzióban 200-250 ezer sejt legyen. A tesztlemezszen 3 nap után lecseréljük a médiumot, a borítottságot folyamatosan monitorozzuk. Amikor ez eléri a 80 %-ot, a sejteket tesztelésre használjuk fel, a következőképpen: a sejteket glükóz mentes RPMI1640-1 inkubáljuk 2 órát CO<sub>2</sub> inkubátorban. Kétszeri 1-1 ml KRBH puffer mosását követően 0,5 ml KRBH puffert adunk, félórát követően 2,5 mM glükózt adunk hozzájuk. Fél órás inkubációt követően a lepipettázott és centrifugált felülúszót referenciaként használjuk fel.

Újabb kétszeri KRBH pufferrel történt mosást követően glükóz stimuláljuk a sejteket: 0,5 ml KRBH és 15 mM glükózt pipettázunk a sejtekre, majd rekeszenként 20 nM tesztelendő fehérjét adunk hozzájuk (2 rekesz / 1 fehérje) és fél órát inkubáljuk. A felülúszókat lepipettázuk és centrifugáljuk, a felülúszót pedig ELISA mérésre használjuk fel.

Az ELISA mérést a Mercodia kit protokollja szerint végeztük el, az abszorbanciákat microplate readerrel olvastuk ki, a kiválasztott inzulin mennyiségét ezután a standardokhoz viszonyítva állapítottuk meg.

## 2.5. Fehérje-fehérje interakciós és spektroszkópai módszerek

### 2.5.1. CD-spektroszkópia

A közeli és távoli CD spektrumokat egy Jasco J810 típusú spektrofotométer segítségével 1,0 mm úthosszú küvetében vettem fel, az egyes ábráknál található koncentrációkban. A mérések paraméterei a következőek voltak: 185-260 nm hullámhosszak között, 50 nm/perc scan-sebesség, 1nm jelszélesség, 0,2 nm felbontás.

Mindegyik spektrumot 5 mérés átlagából kaptam, alapvonalként a puffer spektrumát kivontam. A hőmérsékletfüggő méréseket Peltier-típusú egység segítségével végeztem. A nyers adatokat aminosavszám függvényében moláris ellipticitásra számoltam át (koncentráció\*aminosavtagszám. A spektrumokat alkalmazásuk függvényében CCA+<sup>157</sup> vagy BestSel predikciós programokkal elemeztem<sup>151</sup>.

### 2.5.2. Fluoreszcens jelölés

Az MBP-Podocin fragmensek jelölése a hivatalos protokoll alapján történt 10x-es koncentráció feleslegben (Alexa Fluor 488 C5 Maleimide and Alexa Fluor 555 C2 Maleimide, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific).

### 2.5.3. FRET mérések

Förster Rezonance Energy Transfer (FRET) effektus a különböző Podocin fragmens-párok között 100 µl-ben 4 µM-os koncentrációban történt a SOTE Biofizikai Intézetében (Schay Gusztáv), a méréseket 3-szor ismételtük.

## **2.6. Molekuladinamika**

A podocin monomer homológia modellje a *Pyrococcus horikoshii* sztomatin (PDB: 3BK6) kristályszerkezete alapján<sup>152</sup> a Schrödinger Suite Prime v3.1 programmal (Schrödinger LLC) készítettem<sup>153,154</sup>. A dimerek antiparallel coiled coil doménjét a CC+ adatbázisában talált legjobb szekvenciailleszkedésű 1VP7 PDB kódú fehérje alapján építettem fel.

A kapott dimer modell molekuladinamikai vizsgálatát a GROMACS programcsomaggal végeztem. A rendszer felépítéséhez 40,000 TIP3P vízmolekulát adtam hozzá, a teljes töltést semlegesként állítottam be, fiziológias sókoncentrációt Na<sup>+</sup> és Cl<sup>-</sup> ionok hozzáadásával állítottam be. Az energiáminimalizálást követően a szimulációt állandó hőmérsékleten és nyomáson végeztem 100 ns időtartamig, amelyből az utolsó 30 ns átlagszerkezeteit vettem össze (b-faktor analízis).

## **2.7. Bioinformatikai elemzések**

A doktori munkában vizsgált fehérjék elsődleges szerkezet analíziseit a tübingeni Max Planck Institute „MPI Bioinformatics Toolkit” segítségével végeztem: ClustalOmega (szekvenciaillesztések)<sup>155</sup>, PCOILS<sup>156</sup>, Marcoil<sup>157</sup> (Coiled coil predikciók), TMHMM<sup>158</sup>. Illetve a rendezetlen régiók predikcióját az IUPred-el végeztem<sup>159,160</sup>.

### **3. Célkitűzések**

1. *NMR alapú ligandum kötődési vizsgálatok céljából a GLP-1 receptor extracelluláris doménjének (nGLP1r) előállítására különböző fúziós rendszerekben.*

Az nGLP1r bakteriális expresszióval történő aktív, három diszulfidhíddal rendelkező konformerjének előállítási protokollja ismert. Azonban az előkísérlek során bebizonyosodott, hogy a kis hatékonyságú renaturálási lépést a laboratóriumunk megfelelő eszközpark hiányában (fermentor, refold-reaktor) nem lehet elvégezni, emiatt alternatív előállítási utat kell keresnünk. Célunk volt az nGLP1r különböző fúziós fehérjékkel történő előállításának optimalizálása, figyelembe véve, hogy az NMR-es vizsgálatokhoz duplán izotópjelölt ( $^{13}\text{C}$  /  $^{15}\text{N}$ ), fúziós partnerétől elválasztott formában lenne szükség.

2. *GLP-1 és Exendin-4, valamint további Trp-kalitka szerkezeti motívummal rendelkező analóg minifehérjék tervezése és előállítása, térszerkezeti- és dinamikai tulajdonságaik felderítése, in vitro bioassay-el aktivitásuk meghatározása.*

A TC5b minifehérje dinamikai tulajdonságainak felderítése érdekében nagymennyiségű, duplán izotópjelölt ( $^{13}\text{C}$  /  $^{15}\text{N}$ ) minifehérjére gazdaságos előállítására volt szükség. Ehhez olyan bakteriális expressziós rendszert kellett alkalmaznunk, amely alkalmas mind a megfelelő hozam elérésére, mind a minifehérje elsődleges szerkezetének megőrzésére. További célunk volt olyan bioaktív inkretin analógok tervezése és előállítása, amelyek aggregációs hajlama kisebb. A GLP-1 és az Ex-4 esetében is kimutatták, hogy vizes oldatban, fiziológiás körülmények között helikális köteggé állnak össze, ami növeli az immunválasz kialakulásának kockázatát. Az elsődleges szerkezet módosítása révén célunk volt egy olyan kompakt téralkat kialakítása, amely nagyobb eséllyel megőrzi natív térszerkezetét és bioaktivitását akár szélsőséges körülmények (pH, hőmérséklet, koncentráció) között is.

3. *Kísérleti eredményekkel alátámasztott, molekuláris modell felállítása a podocin intracelluláris doménjének pontmutációinak SRNS-t okozó, a fehérje- és dimer térszerkezetében bekövetkező változások magyarázatára.*

A klinikai tapasztalatokat alátámasztó genetikai információk alapján az NPHS2 gén 7-es és 8-as exonjainak pontmutációi az Arg229Gln mutációval együttesen SRNS-t okoznak. Homológ fehérjék térszerkezeti adatai és a podocin elsődleges szerkezetének analízise alapján feltételezhetően a dimerizációért egy *coiled coil* kölcsönhatás felelős, amely régiót a gén 7-es és 8-as exonja kódol. Célom volt annak a feltételezésemnek

bizonyítása kísérletes és molekuladinamikai módszerekkel, hogy a *coiled coil* régióban bekövetkező pontmutációk révén a dimer stabilitása csökken, amely a podocin feltételezhető funkciójának, azaz az ultraszűrő fehérjekomponenseinek stabilizálásának gyengülésével, elvesztésével jár.



## 4. Eredmények

### 4.1. Eredmények – Bakteriális expresszió

#### 4.1.1. Eredmények – Bakteriális expresszió: DNS-munka

Az előállítani kívánt különböző típusú fehérjék sikeres expressziójához különböző fúziós partnerek alkalmazása tűnt célszerűnek a tisztítás és a megfelelő téralkat kialakítása céljából. A klónozási idő csökkentése és a fúziós fehérjék hatásainak „screenelése” miatt egy azonos MCS régióval rendelkező expressziós vektorcsaládot (p32FUS – ld. **5. táblázat** és *Függelék F1. ábra*) alakítottam ki. Közös tulajdonsága a pET-32b alapú vektornak, hogy a fúziós fehérje az alapvektor *NdeI* és *BamHI* restrikciós hasítóhelyei közé vannak klónozva, emiatt MCS-régió változatlan marad, továbbá a célfehérje C-terminálisán His-címke alakítható ki.

A disszertációban felhasznált 16 Trp-kalitikás minifehérje (**10. táblázat**) cDNS fragmenseit a p32\_UBQ vektorba különböző technikákkal klónoztam. A vektor ubikvitin kódoló cDNS-e pTKK19-pUBK vektorból származik, azonban az N-terminális His-tag-et követő ubikvitin cDNS-ének 3' klónozó végét módosítottuk, ezáltal a korábbi több lépéses, 5' „tompá” véget igénylő klónozás ideje és megbízhatósága csökkent a „ragadós” vég beépítésével. Emellett közel 40 egyéb Trp-kalitikás minifehérje konstrukciót alakítottam ki, amelyek révén expresszált fehérjék további publikációkban kerülnek / kerültek felhasználásra.

A p32\_UBQ expressziós vektor lehetővé teszi a különböző minifehérjék hatékony termelését azáltal, hogy az ubikvitin N-terminális His-tagjének segítségével hatékonyá tehető a tisztítás, illetve a C-terminálásra klónozott minifehérje az Ubikvitin Hidroláz enzimmel proteolitikusan lehasítható a fúziós partnerről úgy, hogy N-terminálisa nem módosul az enzim hasítóhely miatti további aminosav beépülésével.

Az első klónozott minifehérje a TC5b volt, amelynek kódoló cDNS-ét átfedő oligonukleotidokkal PCR segítségével alakítottam ki. Ezt később templátként alkalmazva végeztem el a több konstrukció kialakítását (ld. **10. táblázat**), többségében restrikciós klónozással. Később lehetőség nyílt a Small Ubiquitin Modifier (SUMO) fúziós partner kipróbálására is, azonban hozamnövekedést nem okozott.

A podocin (**8. táblázat**) és GLP-1 receptor fragmenseit (**9. táblázat**) a ún. p32\_FUS fúziós vektorcsalád megfelelő tagjaiba klónoztam, a vektorok tulajdonságait a **5. táblázat**, a fehérjék további adatait a *Függelék* tartalmazza.

8. táblázat: A podocin intracelluláris doménének vizsgálatához kialakított konstrukciók listája

Konstrukció neve	Fúziós partner (hasítóenzim)	podocin fragmens	Kialakítás módja
p32_GST_CC	GST (TEV proteáz)	272-313	Restr. klónozás
p32_GST_CC_A284V	GST (TEV proteáz)	272-313	SDM
p32_GST_CC_A297V	GST (TEV proteáz)	272-313	SDM
p32_GST_CC_V290M	GST (TEV proteáz)	272-313	SDM
P32_MBP_168-269	MBP(thrombin)	168-269	Restr. klónozás
P32_MBP_168-286	MBP(thrombin)	168-269	Restr. klónozás
P32_MBP_168-286Tfs	MBP(thrombin)	168-304*	SDM
P32_MBP_128-286	MBP(thrombin)	128-286	Restr. klónozás
P32_MBP_153-286	MBP(thrombin)	153-286	Restr. klónozás
P32_MBP_128-313	MBP(thrombin)	128-313	Restr. klónozás
P32_MBP_168-331	MBP(thrombin)	168-331	Restr. klónozás
P32_MBP_168-348	MBP(thrombin)	168-348	Restr. klónozás
P32_MBP_168-383	MBP(thrombin)	168-383	Restr. klónozás

A GLP-1 receptor fragmensei esetében különbséget kellett tenni a *cell-free* és a bakteriális expresszió vektor között, mivel előbbi esetében a tapasztalatok szerint a KYYYK szekvenciárészletet is be kellett építeni.

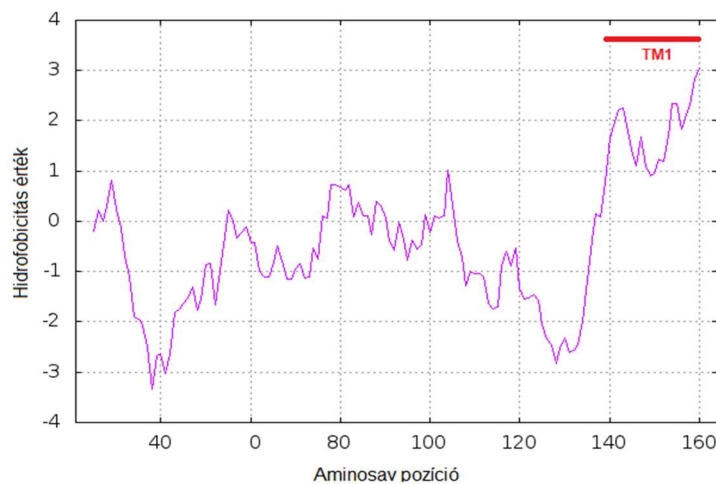
9. táblázat: A GLP-1R vizsgálatához kialakított konstrukciók listája

Konstrukció neve	Fúziós partner (hasítóenzim)	GLP-1R fragmens
nGLP1R_145 nGLP1R_132	N-term His-tag (thrombin)	24-145
R145 R132	-	24-145
MBPtev24-145 MBPtev24-132	N-term MBP (TEV)	24-145 24-132
PMR3	N-term MBP (thrombin), C-term. His-tag	24-145
nsDR145 nsDR132	N-term DsbC és His-tag(thrombin)	24-145 24-132
sDR145 sDR132	N-term DsbC és His-tag(thrombin)	24-145 24-132
GST145 GST132	N-term. GST (TEV)	24-145 24-132
Ubq145 Ubq 132	N-term Ubiquitin	24-145 24-132
Trx145 Trx 132	N-term His-tag és TrxA (thrombin)	24-145 24-132

#### 4.1.2. Eredmények – Bakteriális expresszió – nGLP-1R

A GLP-1 receptor extracelluláris doménének (nGLP-1R) röntgendiffrakcióval nyert, GLP-1 és Exendin-4 ligandumokkal kölcsönhatásban levő térszerkezete már ismert volt a doktori munka kezdetén (PDB: 3C5T), amelyhez a fehérjét *E. coli*-ban állították elő. A szerzőktől beszereztük az expressziós vektort, hogy reprodukálva a publikált előállítási protokolt, NMR spektroszkópiával atomi felbontású szerkezetet nyerjünk, valamint a tervezett Exendin-4 analógokkal a kötődési mechanizmust vizsgáljuk. A publikációikban<sup>88,89</sup> leírt előállítási és tisztítási protokollokat azonban nem sikerült reprodukálnom, kizárólag az ott leírt nGLP-1r inklúziós testbe kerülését (**16/A. ábra**).

Az inklúziós testekbe kerülés fő problémája az azt követő renaturálás bizonytalansága és alacsony hatékonysága. Ennek javítására első lépésként a doménhatárt próbáltam optimalni. A kapott vektor egy N-terminális His-taget, thrombin hasító helyet, valamint az ezt követő 21-145 GLP-1 receptor aminosavszevenciát kódoló cDNS-t tartalmazta. Ennek a szekvenciának probléma-lehetősége a <sup>141</sup>LLFLY C-terminális hidrofób jellegű szekvenciaszakasz<sup>161</sup>, amely feltételezhetően a membránba ágyazódó vagy ahhoz asszociálódó régiót alkot (**14. ábra**). A SignalP predikció<sup>162</sup> alapján a GLP-1 receptor 1-23 közötti szakasz alkotja a szinálszevenciát. Az nGLP-1r publikált térszerkezeteiben, csak a 28-131 aminosavak közötti szakasz szerepel a kristályszerkezetekben. Az Uniprot adatbázis jelenlegi adatai alapján az extracelluláris domént a 28-139 szakasz alkotja – a doktori munka kezdetén 28-145 szekvencia volt megadva. E szempontok miatt alakítottam ki az R132 konstrukciót, amely az GLP-1R 24-132 szekvenciáját kódolja.



**14. ábra:** Az nGLP-1r (24-164) elsődleges szerkezetének hidrofobicitási értékei (Kyte & Doolittle). Látható, hogy a 141-164. pozíció között tapasztalható magas érték az első transzmembrán régióra (TM1 piros vonallal) utal.

További módosítást végeztem a His-tag elhagyásával. Az inklúziós testbe került extracelluláris domén tisztítása során feleslegesnek tűnt alkalmazása. Egyrészt az inklúziós testek izolálását követően tisztítása nem denaturáló Ni-IMAC-el, hanem fordított fázisú HPLC-vel történt tisztításuk, ami lehetővé tette a közvetlen MS-mérést, valamint koncentráltabb, a liofilizált minta tömege alapján meghatározható koncentrációjú<sup>j</sup> redukált nGLP-1r oldat készítését 4M guanidin-hidrokloridban. Másrészt az inklúziós testek redukálását és ezt követő renaturáció folyamatának körülményei (DTT, EDTA, L-Arg) nem tették lehetővé a Ni-IMAC tisztítást. A renaturálást követően a protokolban is leírt ioncsere-kromatográfiával lehetőség maradt a feltekeredett fehérje tisztítására és koncentrálására. További szempont volt a kortikotropin receptor extracelluláris domén<sup>k</sup> előállítása kapcsán az irodalmi példa arra, hogy a His-tag zavarja a megfelelő diszulfidhíd mintázat kialakítását<sup>163</sup>.

A renaturálás az irodalmi példák<sup>j</sup>ból vett módszerekkel, redox pufferben, nagy térfogatba történő kihígítással próbáltam. A refold pufferben az eredeti publikációban szereplő GSH:GSSG arányt megtartottam, az L-Arg koncentrációját 0,5-1,0 M-os koncentrációtartományban próbáltam optimalni. A fehérje végkoncentrációját (mennyiségét) 0,1-0,5 mg/ml-ban határoztam meg. Nem tapasztaltam sem az L-Arg koncentrációjának és a fehérje mennyiségének változtatásának előnyét a natív nGLP-1R mennyiségének növelésében.

A renaturációt követően dialízisre volt szükség, mivel az L-Arg jelenléte zavarta a tervezett kromatográfiás módszereket (Q-IEX, RP-HPLC). A dialízist követően a célfehérje közel 90%-a kicsapódott koncentrációmérés alapján. A csapadékfázist centrifugálással távolítottam el, a szolubilis fázisból Q-IEX és RP-HPLC egymást követő alkalmazásával tisztítottam a célfehérjét. Az R132 konstrukció esetében 30 mg tisztított, redukált nGLP-1r-ből mindössze 0,1 mg tiszta, renaturált receptort sikerült többszöri próbálkozás után előállítanom 1 liternyi gazdag tápoldatból, amelyet tömegspektrometriás és diszulfidhíd-mintázat elemzéssel is alátámasztottak (dr. Tóth Gábor, Szolomájer János – Szeged).

A tömegspektrometriás vizsgálatok azonban két további szennyezőt is kimutattak. Ezen szennyezők tömegspektrometriás vizsgálata kimutatta, hogy renaturáció során a

---

<sup>j</sup> A guanidin zavaró hatása miatt a fehérje mennyiségét nem lehet SDS-PAGE-el megbecsülni, valamint a koncentrációmérési eljárásokat is bizonytalaná teszi.

<sup>k</sup> Szintén B-alszaládba tartozó G-fehérje kapcsolt receptor.

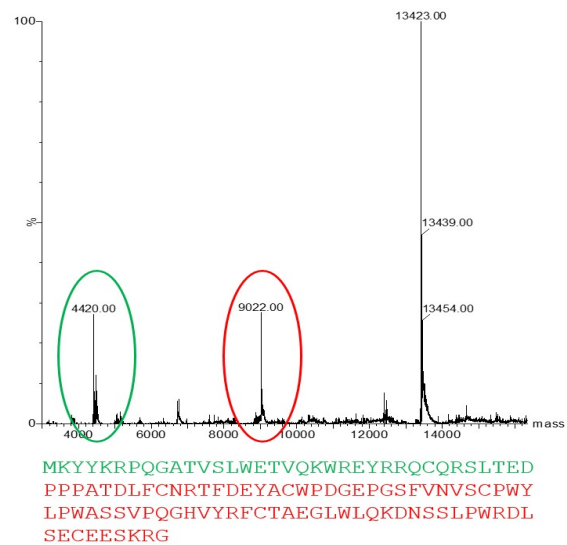
nGLP-1r a **15. ábrán** látható módon bomlik, ami szintén csökkenti a hozamot, továbbá felveti a lehetőségét a fehérje instabilitásának.

A PDB adatbázisában szereplő kis számú (3 db) NMR-spektroszkópiával vizsgált GPCR B1 alcsaládba tartozó extracelluláris térszerkezetek nagyfokú rendezetlen téralkata miatt, valamint az alacsony és bizonytalan hozam miatt új előállítási útvonalakat kerestem annak érdekében, hogy hatékonyabb, tartósan reprodukálható módszerrel sikerüljön nGLP-1r-t előállítanom. Fő szempont volt, hogy elkerüljük a célfehérje inklúziós testbe kerülését, annak nehezebb, körülményesebb kezelhetősége (guanidin-hidroklorid, DTT) miatt.

Emiatt kezdtem neki a fúziós tag-ek vizsgálatának, amelyet kiegészítettem több különböző *E. coli* baktériumtörzs vizsgálatával (BL21(DE3), OrigamiB(DE3), Shuffle(DE3)). A BL-21(DE3) baktériumtörzs citoplazmájának redukzív környezetében nem alakulhatnak ki diszulfidhidas fehérjék, így vizsgálható a fúziós fehérje szolubilizáló funkciója, lehetőség van továbbá chaperone ko-expresszióra. Ezzel szemben az OrigamiB(DE3) és Shuffle(DE3) törzs citoplazmája mutációik révén (trxB, gor) oxidatív, a diszulfidhidak kialakulása lehetséges a citoplazmában. A Shuffle(DE3) sejtek esetében citoplazmatikus DsbC izomeráz, mint chaperone is jelen van.

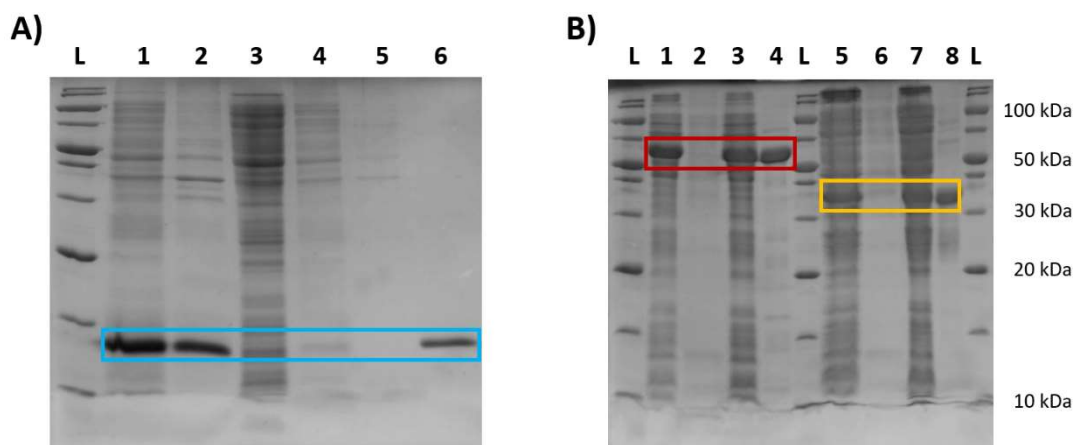
Ha ezen expressziós kísérletek eredményét összesítjük, a szolubilizált előállítást „sikeres” és „sikertelen” esetekre oszthatjuk fel. „Sikertelen” esetek alatt értem a fúziós fehérje túltermelését követő inklúziós testbe kerülését, azaz minden esetben abból történő körülményesnek mondható izolálást és renaturálást igényelt. „Sikeres” esetekben a túltermelést követően a fúziós fehérje oldatban maradt, onnan történhetett az első tisztítási lépés, ami viszont nem feltétlenül jelenti az nGLP-1r célfehérje kialakult a megfelelő diszulfidhid-mintázatát.

Megjegyzendő, hogy a fenti vizsgálatoknak volt egy menetrendje és ezen részlépéseknek időtartama is, valamint hogy az *Előszó*ban említetteknek megfelelően a



**15. ábra:** Az R132 renaturálása során tapasztalt hasadás tömegspektrometriás kimutatása.

munka kezdetén a kutatócsoport expressziós laboratóriumának felszereltsége nem minden esetben tette lehetővé a megfelelő munkavégzést.



**16. ábra.:** SDS-PAGE gélképek az nGLP-1r bakteriális expressziójáról. A) Az R132 konstrukció esetében: 1) Teljes baktérium sejt; 2) Feltárást követő Csapadék frakció, 3) Feltárást követő citoplazmatikus frakció, 4-5) A Csapadék frakció mosása során kapott szolubilis minták, 6) Izolált Inklúziós test; B) MBP-füziós konstrukció expressziója során kapott 1) Teljes baktérium sejt, 2) Feltárást követő csapadék frakció 3) Feltárást követő citoplazmatikus frakció, 4) Ni-IMAC eluátuma a citoplazmatikus frakciónak; DsbC-füziós konstrukció expressziója során kapott 1) Teljes baktérium sejt, 2) Feltárást követő csapadék frakció 3) Feltárást követő citoplazmatikus frakció, 4) Ni-IMAC eluátuma a citoplazmatikus frakciónak.

Ábramagyarázat: Kék keret az A) ábrán: R132-nek megfeleltethető molekulatömeg. A B) ábrán piros kerettel az MBP-füziós nGLP-1R-nek (PMR3 konstrukció), narancssárga kerettel a DsbC-vel fuzionált nGLP-1R-nek (nsDR132 konstrukció) megfeleltethető molekulatömegek (58,59 illetve 38,54 kDa). Az alkalmazott fehérjelétra típusa: Thermo Unsatined BroadRange Ladder.

#### Előállítás inklúziós testbe kerüléssel

Thioredoxin-füzió: Mindhárom expressziós törzs esetében a füziós fehérje inklúziós testbe került, azaz egyrészt a thioredoxin nem fejtette ki chaperone hatását, másrészt a Shuffle(DE3) és OrigamiB(DE3) sejtek esetében a diszulfidhíd kialakítást segítő rendszerek nem működtek. Az ezt követő renaturálás során a füziós fehérje oldatba került, azonban a thrombinos hasítást követően a célfehérje nem volt azonosítható, eltűnt. Hasonló jelenség más csoportoknál is megtörtént<sup>65</sup> (+ szóbeli információ), amelynek oka feltehetőleg a nem megfelelő fold kialakulása, ami miatt a proteáz széthasítja azt. Ez volt sorban az első füzióspartner, amelyet alkalmaztam.

Az ubikvitin, SUMO és GST címke alkalmazása szintén sikertelen volt, esetükben a renaturálást követően sem került a szolubilis fázisba.

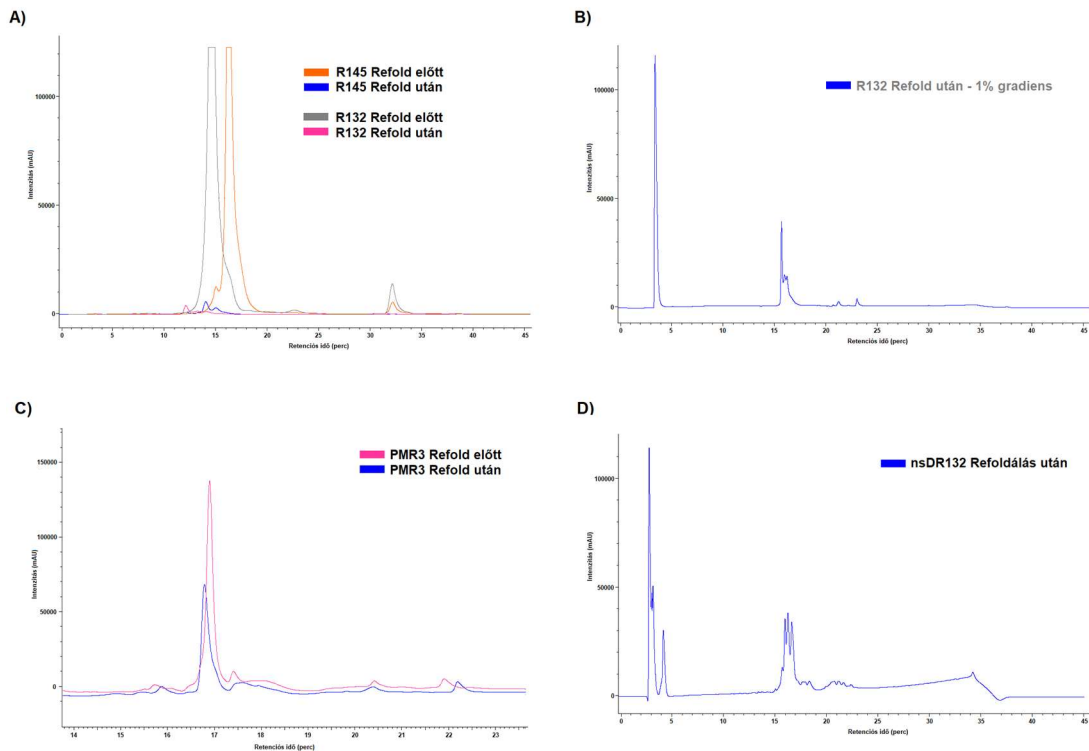
#### Előállítás szolubilis formában

A DsbC és az MBP, mint füziós fehérje szolubilis előállítása a BL21 és Shuffle baktériumtörzsben sikeres volt (**16/B. ábra**), a sejtek feltárást követően a füziós fehérje

oldatban marad, a felülúszó frakcióból kivitelezhető volt az első kromatográfiás tisztítási lépés. Origami sejtekben az MBP-fúziós fehérjéket nem sikerült előállítanom.

*Szolubilis előállítás – Sikeres renaturálás: Megfelelő diszulfidhid mintázat?*

Azaz a kezdeti eredmények azt mutatták, hogy a DsbC illetve az MBP fúziós partnerként történő alkalmazása a célfehérjét oldatfázisba viszi (16/B. ábra), ami egyszerűsíti a további tisztítási lépéseket, azonban nem feltételezi a megfelelő diszulfidhid mintázat kialakulását.



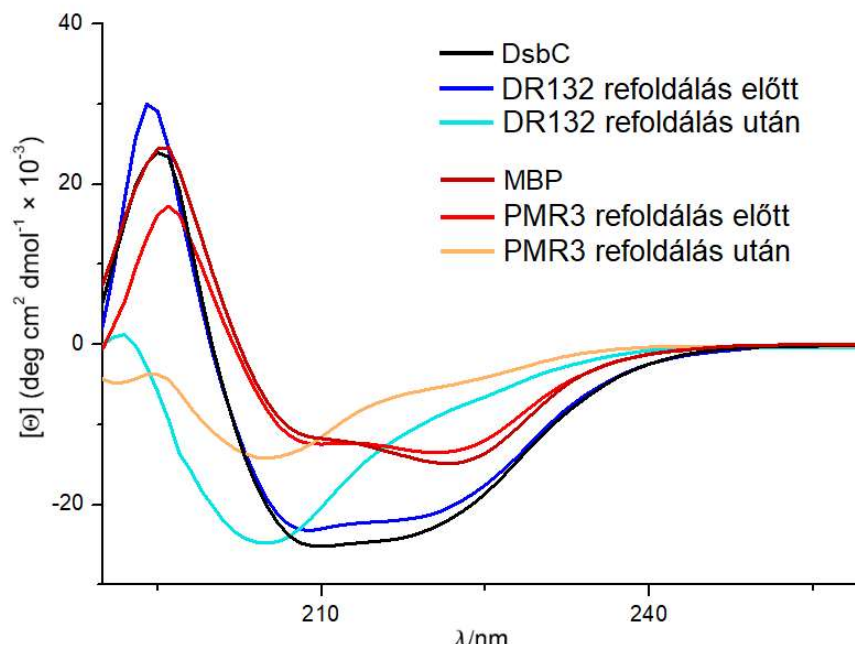
**17. ábra:** A különböző nGLP-1R előállítási módszerek analitikai RP-HPLC kromatogramjai. A) R132 és R145 konstrukció: jól látható, hogy az inklúziós testek (szürke – R132; narancssárga – R145) renaturálását követően a célfehérje (rózsaszín – R132; kék – R145) mennyisége jelentősen csökken; B) R132 renaturált, ioncserével tisztított frakciójának kromatogramja. Jól látható, hogy a 45%-os acetonitrilnél eluálódó célfehérje 3 különböző formában van jelen.; C) MBPtevR145 konstrukció az első tisztítási lépést követően (piros) és az ezt követő renaturáció (kék) után. Ez bizonyítja, hogy a renaturálás során az anyagvesztés (kicsapódás) százaléka jóval kisebb, mint az inklúziós testek renaturációja esetében, valamint, hogy a renaturálás során a fehérje alakja megváltozik (eltérő retenció idő); D) DR132 fehérje kromatogramja renaturációt követően, jól látható a 43-47% acetonitril szint között eluálódó 3 különböző (formájú) célfehérje.

Ha a három baktériumtörzs szerepét vizsgáljuk, meglepő eredmény, hogy a BL21(DE3) törzsben is, reduktív citoplazmában is, szolubilis fázisba kerül a fúziós fehérje, ami azt sejteti, hogy az MBP-nek és a DsbC-nek szolubilizáló vagy chaperone hatása lehet. Az OrigamiB(DE3) alkalmazása több problémát okozott. A DsbC fúziós konstrukció esetében az expresszió több időt vett igénybe, feltehetőleg a pluszként alkalmazott két antibiotikumnak is köszönhetően, valamint az indukciót követően a

fúziós fehérje mennyisége az első tisztítási lépés után is jóval kevesebb volt SDS-PAGE-n, mint Shuffle(DE3) vagy BL21(DE3) baktériumtörzs alkalmazása esetén.

Az első tisztítási lépést (Ni-IMAC) követően az eluált frakciókat méretkizárásos kromatográfiával vizsgálva tapasztalható volt a megfelelő méretű fúziós fehérjének megfelelő csúcs, azonban nagyméretű oligomer forma is jelen volt. Azaz a két fúziós partner szolubilizálja az nGLP-1r célfehérjét, azonban szolubilis aggregátum is létrejön. Emiatt mindenképpen szükséges volt az első tisztítási lépést követően renaturálást végezni. Az ezt követő méretkizárásos kromatográfia vizsgálat alapján az oligomer forma mennyisége csökkent, a megfelelő tömegű fúziós fehérjének megfelelő csúcs intenzitása nőtt.

A renaturálás szükségességét alátámasztja továbbá a fúziós fehérjék renaturálás előtti illetve utáni CD-spektruma is (**18. ábra**). Ahogy a felvett spektrumokból látható,



**18. ábra:** A különböző fúziós fehérjék és fúziós partnerek renaturálás előtti illetve utáni CD-spektrumai (20 °C, 2  $\mu$ M). Az MBP és DsbC fúziós partnerek renaturálás előtti és utáni spektrumai nem különböznek egymástól, ezt az ábrán nem tüntettem fel.

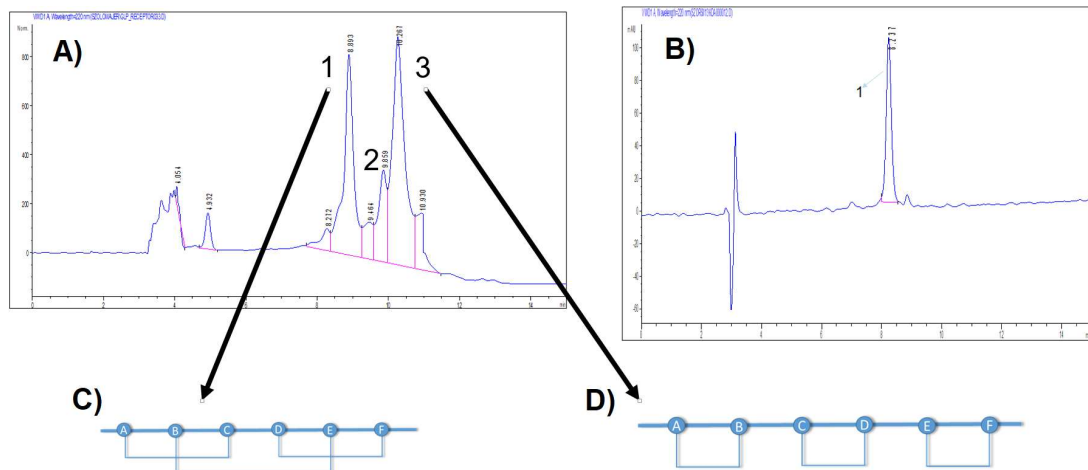
mindkét fúziós partner esetében a renaturálás előtti illetve utáni állapot között jelentős, azonban hasonló, átalakulás következik be. A spektrumok másodlagos szerkezetanalízise alapján (BestSel predikcióval<sup>151</sup>) megállapítható, hogy a többségében helikális tartalmú spektrumok béta-jellegűvé alakulnak át. Mivel a fúziós partnerek (MBP és DsbC) esetében ez a jelenség nem tapasztalható, a fúziós fehérje esetében a renaturálás során történik téralkati átalakulás (szolubilis aggregátum  $\rightarrow$  monomer). Ezt erősíti a



minták analitikai RP-HPLC-vel történő vizsgálata is (17/C. **ábra**), mivel az elúciós profil megváltozik.

A Shuffle(DE3) sejtek, illetve BL-21(DE3) sejtekben ko-expresszált DsbC izomeráz esetében az első tisztítási lépést követően tapasztalható volt, hogy a diszulfidhid-izomeráz is az elúciós frakcióban jelenik meg, azaz aspecifikusan kötődik az affinitás kromatográfia során alkalmazott töltetkez. Két különböző gyártó és alapú gyantán is ugyanezt az eredményt kaptam. Ez előrevetítette, hogy a fúziós fehérje hasítását követően egy második Ni-affinitás kromatográfias lépéssel nem tudom elválasztani a célfehérjét a fúziós partnerétől illetve az esetleg nem emésztett fúziós fehérjéktől.

Felvetődött, hogy a jelenség oka, a DsbC izomeráz aktivitásából ered, azaz a proteolitikus hasítást követően enzimként szubsztrátjához (a célfehérjéhez) köt, és emiatt nem lehet így elválasztani a két fehérjét egymástól. Azonban Shuffle sejtek üres letermelését követően, a genomban kódolt DsbC a sejtek feltárását követően Ni-affinitás kromatográfiával a felülúszó frakcióból eluálható volt, továbbá a fúziós fehérje renaturálását követően is. Emiatt a renaturálást GSH/GSSG redox környezetben végeztem, DsbC izomeráz nélkül.



19. **ábra:** Az előállított, renaturált és tisztított nGLP-1R szolubilis formái.

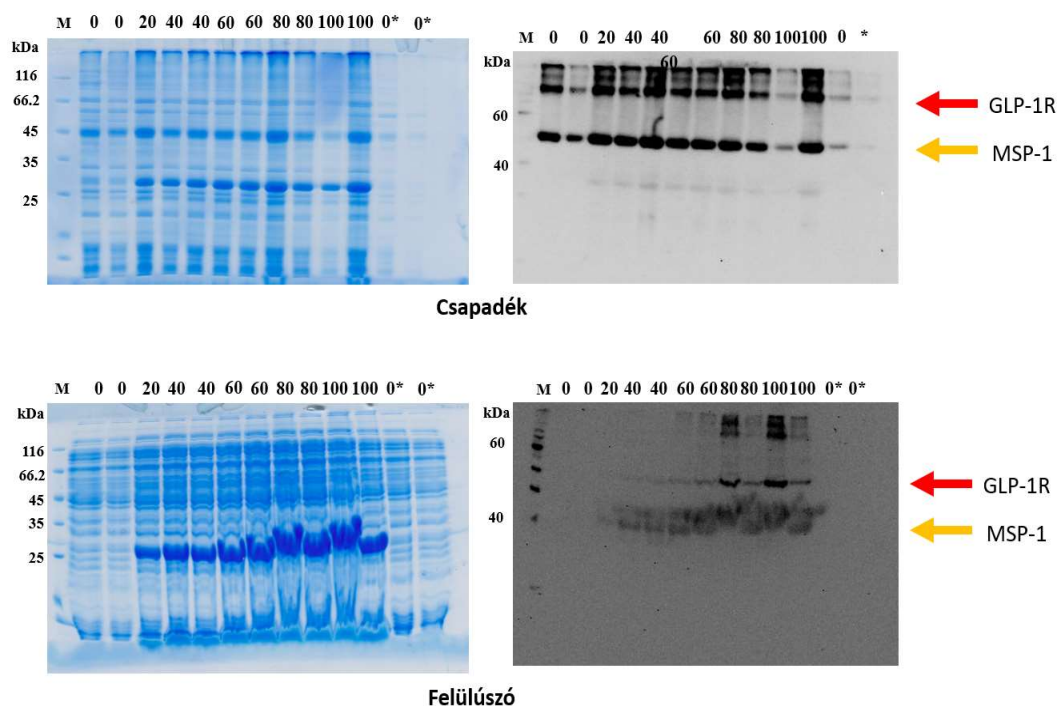
Refoldálást követően DsbC partner esetében analitikai RP-HPLC-vel vizsgálva, több intenzív csúcs jelent meg a kromatogramon (17/D. **ábra**), amelyek SDS-PAGE-el vizsgálva megfeleltethetőek voltak a DsbC-R132 fúziós fehérjének. Feltételezhetően több, különböző alakú, állapotú fehérje kialakulása okozza ezt, emiatt ennek a konstrukciónak alkalmazását a későbbiekben elvettem. Az MBP fúziós partner esetében amilóz-affinitás kromatográfiával tovább tisztítottam a célfehérjét, majd a később

tervezett NMR spektroszkópiai vizsgálatok érdekében proteolitikusan (thrombin / TEV) emésztettem. Az emésztett célfehérjét Ni-affinitás kromatográfiával választottam el fúziós partnerétől, majd RP-HPLC segítségével analizáltam az elúciós és az átesett frakciókat.

Az ún. „Áteső” frakció tartalmazta az nGLP-1R fehérjét, így ezt fordított-fázisú HPLC-vel tisztítva tömegspektrometriás analízisnek vetettük alá. A kapott tömegspektrum igazolta az extracelluláris domén meglétét, a diszulfidhíd-mintázat analízis (**19. ábra** - proteolitikus fragmensekre hasítás, tömegspektrometriás analízis) alapján azonban három különböző diszulfidhíd-mintázatú forma van jelen oldatfázisban. Az előállított célfehérje mennyisége 6 L tápoldatból kiindulva 0,5 mg lett. Azaz az expressziós hozamot összevetve az inklúziós testből renaturálás módszerével nem volt tapasztalható hozamnövekedés, aminek fő oka lehet, a többszörös kromatográfiás lépések, és az ezzel járó veszteségek (10-30% lépésenként). A módszer előnye kétségtelenül annak könnyű kezelhetősége.

#### 4.1.2. Eredmények – Cell-free expresszió

A GLP-1R cell-free expresszióját a frankfurti Goethe Egyetemen Voelker Dötsch kutatócsoportjában végeztem. Célunk volt az extracelluláris doménon kívül egy szolubilis, nanodisc-be ágyazott teljes receptor előállítás, hogy annak ligandumával bekövetkező interakcióját SPR-el vizsgáljuk. Az extracelluláris domén esetében a CF módszerének nyitottságát igyekeztünk kihasználni különböző additívok (redox-környezet, chaperone-ok) hozzáadásával. A teljes GLP-1R esetében az extracelluláris domén diszulfidhídjai miatt is szükség volt ezen additívok hatásának screenelésére, illetve a Nanodisc-be ágyazottságot a különböző fragmensekkel kívántuk tesztelni.



**20. ábra:** A cell-free expressióval előállított GLP-1 receptor SDS-PAGE (balra) és Western Blot (jobbra) eredménye. Piros nyíllal jelölve jól látható, hogy a GLP-1 receptornak megfelelő méretű fehérje a csapadék illetve a felülúszó fázisban is megtalálható

A kísérletekre rendelkezésre álló rövid idő alatt a teljes GLP-1 receptor és fragmenseinek szolubilis, nanodisc-be ágyazott formáját sikeresen előállítottam, amelyek eredményét SDS-PAGE-el és Western Blott-al ellenőriztem (**20. ábra**). Azonban az SPR-vizsgálatok (streptavidin-chip, biotinnal jelölt Exendin-4) nem mutatták ki ligandumhoz kötődését. Ennek oka lehet az extracelluláris domén CF-előállításának negatív eredménye. Bár az nGLP-1R-t sejtmentes előállítás sikeres volt, azonban a különböző körülmények és chaperon-ok alkalmazása ellenére oldatfázisú, megfelelő diszulfidhíd mintázatú fehérje előállítás nem, mivel az csapadék formába került. Azaz a teljes

receptor szolubilis állapotát a nanodisc-be ágyazódás biztosítja, az extracelluláris domén aktív formája ennek ellenére nem alakul ki.

#### 4.1.3. Eredmények – Bakteriális expresszió: Minifehérjék

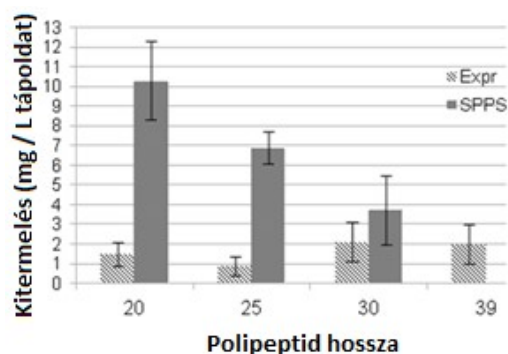
A doktori munkám során megközelítőleg 49 különböző Trp-kalitka motívummal rendelkező minifehérje expressziós vektorát alakítottam ki rekombináns technikákkal, a dolgozathoz kapcsolódóak száma 16. Mindegyik esetében szükséges volt bakteriális expresszióval jelöletlen és izotóp jelzett minta ( $^{15}\text{N}$  és  $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ ) előállítása is az NMR alapú dinamikai mérésekhez. A konstrukciók nevét és felhasználását a **10. táblázat** tartalmazza.

**10. táblázat:** A Trp-kalitkás minifehérjék vizsgálatához kialakított konstrukciók. Felhasználás (Ref. oszlop): 1) Rovó et al. 2013; 2) Rovó et al. 2014; 3) Horváth et al. publikáció alatt

NÉV	Minifehérje szekvenciája	Kialakítási mód	Ref.
<b>TC5b</b>	NLYIQWLKGGPSSGRPPPS	restr. klónozás	1
<b>TC5b_D9E</b>	NLYIQWLKEGGPSSGRPPPS	restr. klónozás, (TC5b)	1
<b>TC5b_D9S</b>	NLYIQWLKSGGPSSGRPPPS	restr. klónozás, (TC5b)	1
<b>TC5b_D9N</b>	NLYIQWLKNGGPSSGRPPPS	restr. klónozás, (TC5b)s	1
<b>H0</b>	RLYIQWLKGGPSSGRPPPS	restr. klónozás, (TC5b_D9E)	2
<b>H5</b>	EEEAVRLYIQWLKGGPSSGRPPPS	restr. klónozás, (H0)	2
<b>H9</b>	SKQMEEEAVRLYIQWLKGGPSSGRPPPS	restr. klónozás, (H5)	2
<b>H10</b>	LSKQMEEEAVRLYIQWLKGGPSSGRPPPS	restr. klónozás, (H9)	2
<b>H11</b>	DLKQMEEEAVRLYIQWLKGGPSSGRPPPS	restr. klónozás, (H9)	2
<b>H19</b>	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLYIQWLKGGPSSGRPPPS	restr. klónozás, (H11 -> H15)	2
<b>EDR</b>	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKDGGPSSGRPPPS	Exendin-4 SDM	2
<b>Exendin-4</b>	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNNGPSSGRAPPSS	Minigén	2
<b>GLP-1</b>	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGR	Minigén	2
<b>H2_CC</b>	CVRLYIQWLKGGPSSGRPPPC	restr. klónozás (H19_CC)	3
<b>H5_CC</b>	EEECVRLYIQWLKGGPSSGRPPPC	restr. klónozás (H19CC)	3
<b>H19_CC</b>	HGEGTFTSDLSKQMEEECVRLYIQWLKGGPSSGRPPPC	H19 SDM	3

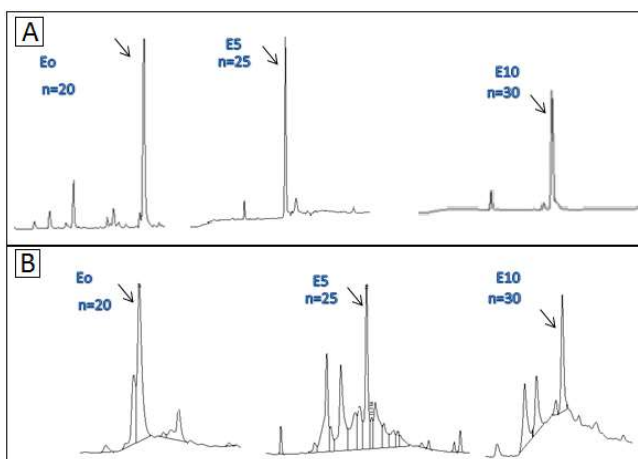
A Trp-kalitkás minifehérjék előállítása *E. coli* bakteriális expressziós rendszerben történt (BL21(DE3)) törzssel. A sejtek feltárását követően a szolubilis fázisban levő fúziós fehérjét Ni-affinitás kromatográfia segítségével tisztítottuk, az eluált frakciók dialízist követő ubikvitin hidroláz proteolitikus hasítása után egy második Ni-affinitás kromatográfia lépéssel elválasztott, az ún. áteső frakcióban levő, minifehérjét reverz fázisú C18-as HPLC segítségével tisztítottuk meg, a frakciók liofilizálását követően a minifehérje tömegét MS-el ellenőriztük.

A különböző hosszúságú minifehérjék előállítása nemcsak bakteriális expresszióval, hanem szilárd fázisú peptidszintézissel (SPPS) is történt, ami lehetőséget adott a termelési hatékonyság (kitermelés, ár) összehasonlítására a két módszer között. A polipeptidek kémiai úton történő szintézisét Szegeden, dr. Tóth Gábor laboratóriumában végezték Boc stratégiát alkalmazva (módszer részletezése ld. Stráner et. al 2015).



21. ábra: A peptidméret hossza és a kitermelés összevetése bakteriális expresszió és szilárd fázisú peptidszintézissel

Szilárd fázisú peptidszintézis esetén megfigyelhető volt, hogy a szintetizálni kívánt polipeptid hosszának növekedésével a melléktermékek száma és mennyisége is nőtt. A H0 és TC5b esetében egymással összemérhető melléktermék mennyiség volt megfigyelhető, amely nőtt a H5, H10, majd a 39 aminosav hosszúságú végtermékek (H19, Exendin-4, EDR, H19\_CC) esetében. A megnövekedő kapcsolási számok miatti melléktermék növekedésével a végtermék RP-HPLC-vel történő tisztítása körülményessé vált, ami miatt a veszteség is nőtt. A polipeptidlánc hosszának közel duplázódása során (20 aminosav → 39 aminosav) emiatt a nyers polipeptid tisztasága közel 90%-ról 20%-ra esett (11. táblázat, 21. és 22. ábra).



22. ábra: A Bakteriális expresszióval (A) illetve SPPS-el (B) előállított peptidek végső RP-HPLC tisztításának kromatogramja. Jól látható, hogy SPPS esetében jóval több a melléktermék.

Ezzel szemben a bakteriális expresszió során a polipeptid láncának növekedésével több melléktermék nem jelent meg, valamint a kitermelés is közel azonos volt (1-3 mg/L LB tápoldat). Ez alól kivétel a H5 minifehérje, amelynek kitermelése mindkét szintetikus módszerrel alacsony. Kimutattuk (részletesebben ld. 4.2.1. alfejezet), hogy a H0 esetében a minifehérje szerkezete destabilizálódik, amelyet a H5 esetében megjelenő EEEAV szekvencia hozzáadása stabilizál. Azonban ennek a szekvenciárészletnek köszönhetően, amely nagyrészt hidrophil glutamin aminosavakból áll, ez a minifehérje már 1-3 mM-os

koncentrációban is aggregálódik, így a peptidszintézis szempontjából ún. „nehéz szekvencia”-nak mondható. Az ezt sorban követő H10 minifehérje esetébe az LSKQM hozzáadott szekvencia már megakadályozza vagy csökkenti az aggregálódást, így a kitermelési hozam visszaáll az 1-3 mg /L-es szintre.

Ez alapján belátható, hogy egy 39 aminosavas polipeptid előállítása már nem feltétlen mutatkozik szerencsésnek szilárd fázisú peptidszintézissel. Alternatívaként hozható a Natív Kémiai Ligáció: a szintetizálni kívánt polipeptidet két fragmens ligálásával kapcsoljuk össze. A kisebb fragmensek szintetizálása a fentiek alapján költséghatékonyabb, azonban a ligálási reakció némileg megnehezíti a dolgot.

**11. táblázat:** A Trp-kalitikás minifehérjék tisztítása során kapott kitermelési hozam értékek

Peptid neve	Expressziós hozam (mg / L)	SPPS hozam (mg)	SPPS hatékonyság (%)	SPPS hozam a teljes mennyiségre (%)
<b>TC5b</b>	2,0±0,5 (1,5±0,5)	13,0±6,0	18	91,5
<b>H0</b>	2,0±0,6 (1,7±0,4)	8,0±5,7	11	80,4
<b>H5</b>	1,1±0,6 (0,75±0,2)	7,1±0,8	4,4	55,6
<b>H10</b>	2,76±1,5 (2,1±0,5)	3,8±2,5	3,7	49,1
<b>H19</b>	2,8±0,8 (2,0±1,2)	3,90±2,8	2,9	N/A
<b>EDR</b>	2,25±1,01 (1,5±0,2)	<1	<1	<20%
<b>Exendin-4</b>	2,45±0,6 (2,3±0,9)	N/A	N/A	N/A

#### 4.1.4. Eredmények – Bakteriális expresszió - Podocin

A podocin atomi felbontású térszerkezetét elsősorban NMR és röntgen kristallográfiai módszerekkel szeretnénk volna felderíteni. A mutációk térszerkezetre gyakorolt hatásának vizsgálata miatt elegendőnek látszott a podocin C-terminális fragmensének (128-383) előállítása. Előzetes eredmények alapján tudtuk, hogy *E. coli*-ban a teljes podocin (1-383 valamint a citoszólikus fragmens (127-383) expressziója is N- illetve C-terminális His-taggal illetve N-terminális GST-taggal sikertelen volt. Irodalmi előzmények azonban a homológ sztomatin (94-202) és a *P. horikoshii* homológ fehérjéjének előállítása GST-taggal illetve tag-nélkül sikeres volt.

A teljes podocin expressziója esetén gond lehet a membránhorgonnyal, így ezt nem is terveztük előállítani, az előzetes eredmények alapján pedig fúziós tagként GST-t és MBP-t alkalmaztunk. Három N-terminális levágást terveztünk (135-; 157-; 168-) és C-terminális levágásokat (-272; -284; -313; -331; -348; -383) fúziós fehérjével történő előállításra (részletesebben ld. *Függelék*). A GST-fúziós fehérjével nem sikerült az első

tisztítási lépés után értékelhető eredményt kapni. Az MBP-fúziós fehérjével a fragmensek előállítása minden esetben sikeres volt.

Az NMR-es térszerkezetvizsgálathoz azonban az MBP-fúziós fehérje túl nagy méretű, emiatt a fúziós partnert proteolitikus hasítással terveztük levágni. Mindegyik konstrukció esetében azonban a hasítást követő azonnali podocin célfehérje kicsapódás lett az eredmény. A thrombin hasító helyet lecseréltem TEV proteáz hasító helyre, annak érdekében hogy a puffer hatását vizsgáljam szélesebb körülmények között – a különböző pufferek nem segítettek (NaP / Tris / HEPES / MOPS), különböző sókoncentrációkban sem (50 / 100 / 150 / 300 mM NaCl). Emiatt az NMR-spektroszkópai vizsgálatokat elvetettük. Kísérleteket folytattunk ezekkel a mintákkal a CDC-re, azaz a carrier-driven-crystallization-re, egyelőre eredmény (kristályképződés) nélkül.

Az egyes fragmens konstrukciók kialakítása nem egyszerre történt. A kezdeti sikertelen kísérletek után került fókuszba a 286Tfs fragmens. Ennek végső, méretkizárásos kromatográfia tisztítási lépése során derült ki, hogy ellentétben a többi fragmensel, nem dimer, hanem monomer formában van jelen. Ennek az eredménynek köszönhetően indítottuk el a FRET-méréseket a különböző fragmensek között, hogy a dimerizációért felelős régiót ki tudjuk mutatni.

#### 4.1.5. Bakteriális expresszió költségszámítása

##### *DNS-konstrukció elkészítésének költségszámítása*

Ahogy a **12. táblázat** látható, egy DNS konstrukció készítéséhez szükséges vegyszerek nettó ára ~6.300 HUF, amely egyszeri költségnek tekinthető, hiszen a készített expressziós vektor a továbbiakban transzformálásra többször felhasználható, expressziós törzsből glicerines stockot készítve a felhasználhatóság szinte végteleníthető. Új minipreparátum készítése ~400 HUF-ba kerül. Az ehhez járuló rezszi-jellegű költségek miatt, az összeg DNS-szekvenálással (nettó 2.000 HUF/db reakció – Biomi kft. 2017.) együtt, nettó ~12.400 HUF –ra tehető (bruttó ~15.800 HUF).

*12. táblázat: Restriktions klónozással elkészített DNS-konstrukció költségszámítása.*

Összetevő neve	HUF	db	ÁR
<b>Restr. Enzim Átlagár (µl)</b>	269,16	2	538,3225
<b>Pfu polimeráz</b>	234	1	234
<b>dNTP 10mM</b>	31,2	2	62,4
<b>Primer (30bp)</b>	3000	2	6000
<b>DNS tisztító kit</b>	366,3	3	1098,9
<b>T4 DNS Ligáz</b>	247,5	1	247,5
<b>Taq polimeráz</b>	208,00	1,00	208
<b>Site-directed mutagenesis kit (51000 HUF /20 reakció)</b>	2550	1	2550
<b>T4 Polynukleotid kinase</b>	202	4	808
<b>ATP 100mM solution</b>	35,2	10	352

A doktori munka során több esetben pontmutációval (site-directed mutagenesis) alakítottam ki konstrukciókat, ezek ára szekvenálással együtt, ahogy a **12. táblázatból** kikövetkeztethető, közel 13.500 HUF (bruttó 17.145) rezsiköltséggel együtt, azaz a két módszer alapján a DNS –konstrukció elkészítésének átlagköltsége közel 13.000 HUF-nak tekinthető.

##### *Tápanyagok költsége*

A fehérje expresszió és tisztításának költségszámolása során a költségeket leginkább meghatározó tényező a fehérje tisztításának módja, hiszen a táptalaj összetevők állandónak tekinthető.



Ahogy az egyes tápoldatok literre vetített árait tartalmazó **13. táblázatból** látható, a 2YT táptalaj 34 %-al drágább az LB-nél, azonban a kísérletek során nem tapasztaltam ennek megfelelő vagy több végső célfehérje képződést. Az alkalmazott antibiotikumok (jelen esetben kanamycin és ampicillin) átlagosan 78,6 HUF-al, az indukálószer 650 HUF-al emeli a tápoldat literre számolt költségét. Azaz 1 liter LB tápoldat megközelítőleg 1.250, míg 2YT tápoldat 1.500 HUF költséggel jár.

*13. táblázat: Tápoldatok elkészítésének költségszámítása.*

Táptalaj típusa	Költség (l/HUF)		Egyéb összetevők	Költség (l/HUF)
<b>LB</b>	508		Ampicillin	81,7
<b>2YT</b>	770		Kanamycin	75,5
<b>M9</b>	237,3		Indukálószer (1mM)	650
	Jelöletlen	+30,44	2 g Glükóz ( <sup>14</sup> C)	9,84
	<sup>15</sup> NH <sub>4</sub> Cl	+5580	Agar-agar	308
	<sup>15</sup> NH <sub>4</sub> Cl / <sup>13</sup> C-glükóz	+55800		
				Összesített költség 728,6

M9 minimál tápoldat használata során a <sup>15</sup>N és a <sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C izotóp ára jelentősen emeli a költségeket, továbbá itt hozzá kell számolni a protokoll miatt további 1 liter LB tápoldatot. Azaz a <sup>15</sup>N jelölés literre vetített tápoldat ára közel 7.500 HUF, azaz 6-szorosa az LB tápoldatnak, míg kettős jelölés esetén a tápoldat literre számolt költsége megközelítőleg 58.300 HUF. Előbbi esetben 1 liter LB-hez képest közel 10x-esre, kettős jelölés esetében pedig valamivel több mint 100x-osra. Az M9 tápoldat jelöletlen célfehérjék előállítására bár olcsósága (~1.000 HUF) miatt vonzó alternatíva lehetne, a várható hozam csökkenés nem ellensúlyozza ezt.

#### *A célfehérje tisztításának költségei*

A fehérje termelését és a sejtek centrifugálását követően azokat ún. Feltáró (Lízis) pufferekben vesszük fel, majd ezekben tárjuk fel. A pufferek összetételének a későbbi tisztítási folyamatokhoz kell igazítani. A doktori munka során az első tisztítási lépét öt különböző puffer-rendszerben végeztem, amelyek költségvonzatait a **14. táblázat** tartalmazza.

Ahogy látható, a célfehérje szolubilis formában történő izolálása során a PBS, mint lízis puffer alkalmazása a költséghatékony megoldás, ám annak alacsony ionereje nem alkalmas a Ni-affinitás illetve az Amilóz affinitás kromatográfiás tisztításra. Ezekhez a NaPi illetve a Tris pufferek alkalmasak, melyek közül a foszfát puffer közel 40%-al kedvezőbb árú, valamint későbbi felhasználás után az NMR-spektroszkópia során nem

interferál. Hátránya, hogy anioncserével nem kompatibilis (podocin, nGLP-1R pI > 7,3), valamint a fehérje kristályosítás során a csapadékképződés miatt kerülendő. Ezen szempontok miatt a Tris puffer előnyösebb választás.

**14. táblázat:** A sejtízishez alkalmazott pufferrendszerek költségszámítása.

<b>Puffer neve</b>	<b>Összetétele</b>	<b>Ára (HUF/L)</b>	<b>Felhasználás</b>
<b>NaP Feltáró</b>	50 mM NaPi, 300 mM NaCl, 0,1 mM Na-azid, pH 8	186,6	Trp-kalitkás minifehérjék
<b>Tris-IMAC Feltáró</b>	50 mM Tris, 300 mM NaCl, 0,1 mM Na-azid, pH 7,4	303	nGLP-1r
<b>Tris-MBP Feltáró</b>	50 mM Tris, 200 mM NaCl, 1 mM Na-EDTA, 0,1 mM Na-azid, pH 8	295	nGLP-1r, podocin fragmens
<b>PBS</b>	140 mM NaCl, 4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2,7 mM KCl, pH 7,4	88,18	podocin H1 domén
<b>6M Gdn.Hcl</b>	6M Guanidin-hidroklorid	7.356,2	nGLP-1R

Ezen kívül látható, hogy az inklúziós testek izolálására alkalmazott 6M-os guanidin hidroklorid literenkénti ára a legmagasabb, amelyhez ezen felül hozzáadódik, főképp diszulfidhidas fehérjék feloldásához szükséges 100 mM DTT is (~2.610 HUF/g), amelytől többlépéses dialízissel kell megszabadulni a denaturáló Ni-affinitás kromatográfiás tisztítás miatt.

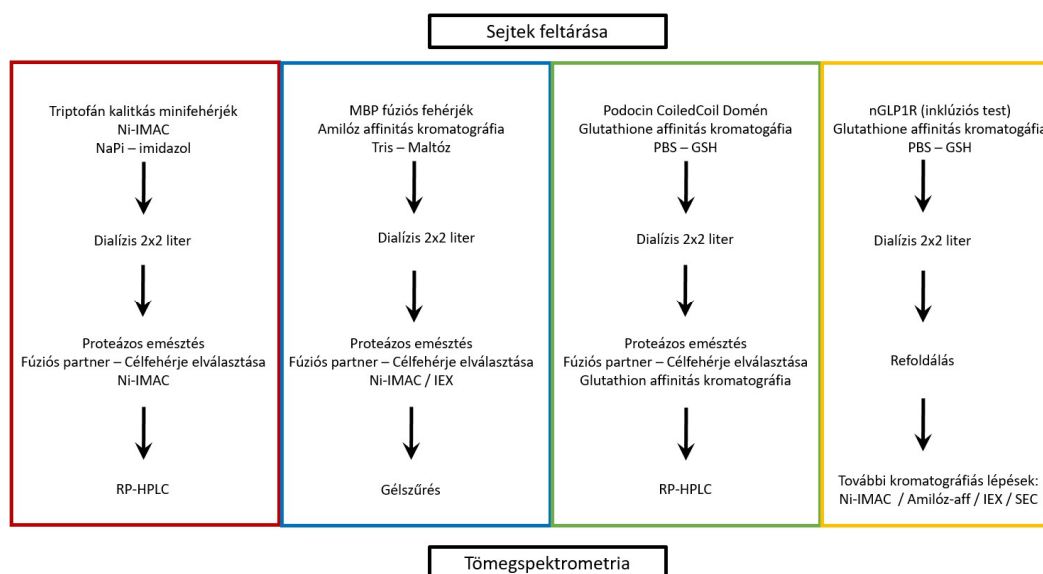
A feltárást követő tisztítási lépések egymásra épülő rendszerével érhetjük el a célfehérje nagy tisztaságban történő előállítását. Az alkalmazott módszerek függvényében a szükséges eluálószeresek ára különböző (**15. táblázat**), amelyek hozzáadódnak az alkalmazott pufferek árához (**16. táblázat**).

A sejtízátumból történő első tisztítási lépések közül a Ni-affinitás kromatográfia a kedvezőbb költség szempontból, azonban érdemes mérlegelni az amilóz illetve a glutathion affinitás kromatográfia alkalmazását a nagyobb tisztaságú célfehérje érdekében, ami akár lehetővé teszi a tisztítási lépések csökkentését, ezáltal a kisebb mértékű célfehérje veszteséget. Közbülső tisztításra alkalmas az ioncsere kromatográfia, amellyel a fúziós partnerétől a célfehérje is elválasztható. Kisebb peptidek esetében erre megoldás a reverz fázisú kromatográfia, azonban ezt a lépést mindenképpen meg kell előznie a fúziós partnertől való elválasztás.

15. táblázat: Az egyes kromatográfiai módszerek esetén a pufferrendszerekhez adandó eluensek költségei.

Kromatográfiai módszer	Eluálószer	Ár (HUF / liter)
Ni-affinitás kromatográfia	250 mM imidazol	464,4
Amilóz affinitás kromatográfia	20mM maltóz	507
Glutathion affinitás kromatográfia	20mM GSH	8.037
Ioncsere kromatográfia	1M NaCl – 50%	114,3
Reverz fázisú kromatográfia	Acetontiril – 50%	1.456
Gélszűrés	50mM NaPi / Tris 50mM NaCl	256,4

A fenti költségeket a célfehérje tisztítására nézve, a **16. táblázat** foglalja össze, azonban mindenképpen fontosabb a célfehérje megfelelő mennyiségben és tisztaságban történő előállítása, mint a költséghatékonyság. Megjegyzendő, hogy az egyes kromatográfiai módszerekhez számolt pufferrendszer literes mennyiségre van számolva, amelyről belátható, hogy nagy mennyiségben termelt célfehérje tisztítására elegendő, valamint egyes esetekben az összetevők kémiai érzékenysége miatt (pl. GSH oxidálódása) literes mennyiség elkészítése kerülendő. További aditívok (DTT, glicerin) tovább emelhetik a költségeket. Azonban a **16. táblázatban** szereplő Összesen értékek jól mutatják a tisztítás költségeinek arányait, különös tekintettel, hogy izotópjelölés esetén a bakteriális expresszióknak nincsen alternatívája. Belátható, hogy peptidek és minifehérjék duplán izotópjelölt formájának 6 liter tápoldatban történő előállításának megközelítő 350.000 HUF-os költsége (tápoldatok 345.000 + tisztítás 4.200) alatta marad szilárd fázisú peptidszintézis költségének.



23. ábra: A sejtek feltárását követő célfehérje tisztításának 4 különböző felvázolt sémája.

**16. táblázat:** A négy különböző tisztítási séma költségvonzata.

<b>Lépés</b>	<b>Minifehérje</b>	<b>Maltóz kötő</b>	<b>Glutathione</b>	<b>Inklúziós test</b>
<b>Sejtfeltárás, első tisztítási lépés</b>	Ni-IMAC (650)	Amilóz (807)	Glutathione (8.125)	denaturáló Ni-IMAC (7.356)
<b>Dialízis (2x2 liter)</b>	(744)	(1.200)	(172)	(29.424)
<b>Második tisztítási lépés / célfehérje elválasztás</b>	Ni-IMAC (650)	Ni-IMAC (650) IEX (414)	Glutathione (8.125)	
<b>Harmadik tisztítási lépés</b>	RP-HPLC (1.456)	Gélszűrés (250)	RP-HPLC (1.456)	
<b>Pufferrendszer összesen</b>	~3.500	~2.900	~9.800	>36.000 (IB izolálás) ~6.380 (további kromatográfia) ~10.000 (renaturálás)
<b>Rezsi jellegű költségek</b>	~700	~3.480	~1.960	~10.476
<b>Összesen</b>	~4.200	~6.380	~10.760	~62.856

## 4.2. Eredmények – Exendin-4 analóg molekulák tervezése, előállítása és vizsgálata

	1	10	20	30	39
<b>Exendin-4</b>	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFI	EWL	KNGG	PSSG	APPPS
<b>TC5b</b>				<b>NLYIQWLK</b>	<b>DGGPSSGR</b> PPPS
<b>E19</b>	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRL	<b>YIQWLK</b>	<b>EGGPSSGR</b> PPPS		
<b>E19_CC</b>	HGEGTFTSDLSKQMEEE	<b>CVRLYIQWLK</b>	<b>EGGPSSGR</b> PPPC		
<b>EDR</b>	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFI	EWL	<b>DGGPSSGR</b> PPPS		
<b>E0</b>				<b>RLYIQWLK</b>	<b>EGGPSSGR</b> PPPS
<b>E5</b>			EEEAVRL	<b>YIQWLK</b>	<b>EGGPSSGR</b> PPPS
<b>E5_CC</b>			EEE	<b>CVRLYIQWLK</b>	<b>EGGPSSGR</b> PPPC
<b>E10</b>			LSKQMEEEAVRL	<b>YIQWLK</b>	<b>EGGPSSGR</b> PPPS

**24. ábra: Exendin-4 és analógjainak szekvenciája.** Az Exendin-4 szekvenciájában aláhúzva azon aminosavak, amelyek a nGLP-1R-hez kötődésben részt vesznek. Pirossal jelölve az eltérő aminosavak az Exendin-4-hez képest, sárgával jelölve a diszulfidhidat alkotó ciszteinek.

Célunk volt olyan bioaktív Exendin-4 analógok tervezése, amelyek szerkezeti stabilitásának növelésével olyan kompakt struktúra alakul ki, amely nagyobb eséllyel őrzi meg natív térszerkezetét, aktív állapotát, akár fiziológias szempontból szélsőséges körülmények között is. A tervezés kiinduló molekulája a TC5b volt, amely egy 20 aminosavas optimalizált Trp-kalitka motívummal rendelkező minifehérje. Az Exendin-4-ből alakítottak ki, levágva annak 19 aminosavát az N-terminálisról és 5 szerkezeti esszenciális aminosavat is módosítottak (**24. ábra**). Az így kapott molekula harmadlagos, globuláris térszerkezettel rendelkezik, vizes oldatban, fiziológias körülmények között, ellentétben az Exendin-4-el, amely 30%-os TFE oldatban viselkedik minifehérjeként.

Első lépésként ezt a 20 aminosavas minifehérjét, egyfajta sapkaként, kapcsoltuk rá az Exendin-4 C-terminálisának analóg régiójára (20-39. pozíció), hogy a Trp-kalitka szerkezeti elem kompaktságával növeljük a peptid hélix-tartalmát (helicitását) és vízdékonyságát (E19 minifehérje). A Trp-kalitka szerkezeti motívum stabilitását terveztük növelni a E5\_CC molekulával, ahol az N-terminális és a C-terminális véget egy diszulfidhíd kapcsolja össze (Cys18-Cys39)<sup>1</sup>. Az így kapott várhatóan stabil molekula „bioaktív”-vá tétele az N-terminális 1-17 közötti szakasz konjugálásával történt (E19\_CC minifehérje).

Ezen a módosítások szerkezetre gyakorolt, belső kölcsönhatásait érintő hatásait ECD és NMR-spektroszkópai módszerekkel vizsgáltunk, nemcsak a teljes molekulára (39 aminosav) nézve, hanem a TC5b (20 aminosav) N-terminálisának folyamatos,

<sup>1</sup> A Triptofán-kalitkás minifehérje esetében az aminosavak számozása a 39 aminosavas peptidméret alapján történik

aminosavankénti hosszabbításával kapott rész molekulákra (11 db) nézve. A szerkezeti különbségek hatását a minifehérjék bioaktivitására *in vitro* inzulin szekréciós teszttel terveztük vizsgálni.

A molekulák egy részét (TC5b, E0, E5, E5\_CC, E10, E19, E19\_CC, EDR, Exendin-4) bakteriális expresszióval állítottam elő jelöletlen és <sup>15</sup>N és/vagy <sup>13</sup>C izotópjelzett formában a szerkezeti vizsgálatokhoz (ECD- és NMR-spektroszkópia) és az *in vitro* teszthez. A további fragmensek előállítására Szegeden dr. Tóth Gábor révén került sor (E1-E4, E6-E9, E11)<sup>m</sup>. Az NMR spektroszkópiai méréseket, asszignációkat, térszerkezet-számlásokat, a dinamikai és diffúziós paraméterek kiértékelését Rovó Petra végezte.

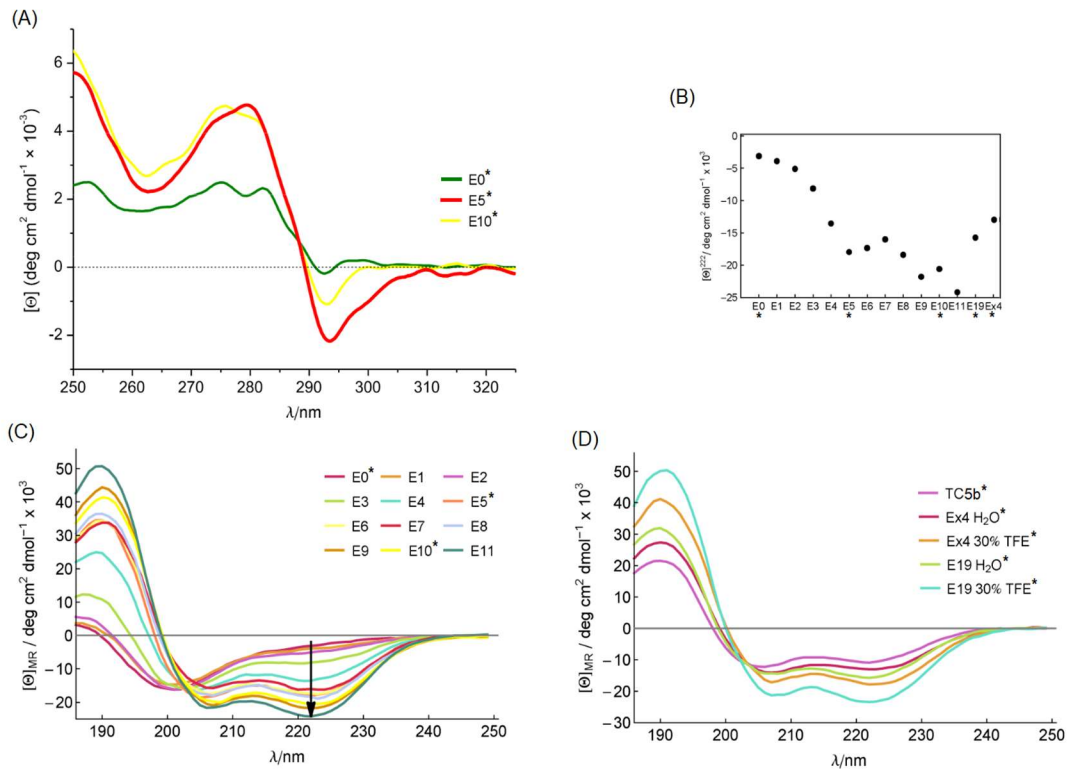
#### 4.2.1. Eredmények – Különböző hosszúságú minifehérjék ECD mérései

A különböző hosszúságú polipeptidek szerkezeti sajátosságait távoli UV tartományban ECD spektroszkópiával vizsgáltuk vízben, az Ex4, EDR és E19 esetében 30% TFE-ben is. A spektrumok összehasonlító analízise nem várt, jelentős szerkezeti változásokat mutat a polipeptidlánc hosszának függvényében (**25. Ábra**). Az TC5b, Exendin-4, EDR és az E4-E19 közötti molekuláknak ECD spektruma C-típusú, amely megfeleltethető az  $\alpha$ -helix vagy  $3_{10}$ -helix tartalommal is.<sup>164165</sup>

Különös módon az E0 esetében U-típusú spektrum tartalom jelenik meg, ami jelzi a molekulák nagyobb rendezetlenségét. Ennek oka az Asn20Arg mutáció destabilizáló hatása, mivel az N-terminális kezdő pozíciójában levő negatív töltésű aminosav oldallánc csökkenti az  $\alpha$ -hélix dipólusát. A E0 szerkezetének rendezetlenné válását alátámasztja a közeli UV tartományban felvett ECD spektruma is, ahol a Tyr22 aromás oldallánc 270-290 nm közötti és a Trp25 aromás oldallancának 280-300 nm közötti hullámhosszon mért intenzitása a E5 és E10 minifehérjéknél tapasztalható képest jelentősen változik, feltehetően azért, mert az Asn20Arg mutáció destabilizáló hatása miatt a két aromás oldallánc közötti  $\pi$ - $\pi$  kölcsönhatás csökken. Ez azt is jelzi, hogy a TC5b harmadlagos, globuláris szerkezete gyengül az Asn20Arg mutáció következtében, további 5 (EEEAV) aminosav konjugálása révén azonban visszaáll, ahogy a E5 és a TC5b spektruma mutatja (**25. ábra**).

---

<sup>m</sup> A tervezett minifehérjék elnevezése (kiv. Exendin-4, EDR): E kezdőbetű és az ezt követő TC5b aminosavtagszámához (20) mint kiindulópont(0) hozzáadott aminosavak száma.



25. ábra: Triptofán-kalitka minifehérjék közeli és távoli ECD spektrumai.

Az E1 minifehérjével kezdődően a helikális (folded) tartalom (C-típusú spektrum) folyamatosan visszaáll a kiinduló minifehérje szintjére (TC5b), ahogy a 222 hullámhosszon mért moláris ellipticitás értékek is jelzik. A rendezettség azonban nem egyenletesen növekszik: a E5, E9 és E11 polipeptidek nagyobb helikaritást mutatnak, mint N-terminálisan hosszabb partnereik (E6, E10, E19). A mérések alapján az E11 minifehérje rendelkezik a legnagyobb helikális tartalommal, a E19 ezzel szemben az E7-hez hasonló topológiájú. Ennek oka feltehetőleg, hogy a E19 további 8 aminosava rendezetlen régiót alkot, amely a receptor aktiválásához nélkülözhetetlen, azonban az ECD-spektroszkópia módszere miatt<sup>n</sup> a teljes molekula szerkezeti lenyomatához hozzáadódik.

A TFE-ben felvett spektrumok összehasonlítása a E19 nagyobb a helikaritás mutat az Ex-4-hez képest, azaz összességében az ECD vizsgálatok megmutatják, hogy az optimalizált Trp-kalitka motívum kétségkívül hozzájárul a teljes molekula fold stabilitásához és az  $\alpha$ -helikális tulajdonság növeléséhez (25. ábra).

<sup>n</sup> A mért ellipticitáshoz a teljes molekula hozzájárul.

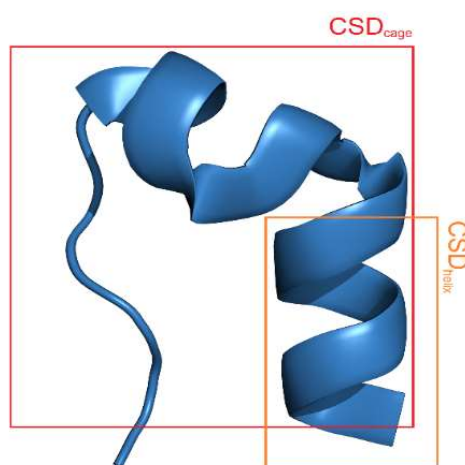
#### 4.2.2. Eredmények – Különböző hosszúságú minifehérjék NMR analízise

Az ECD méréseket homonukleáris NMR mérésekkel kiegészítve hasonló stabilitási különbségeket tapasztaltunk. A  $H\alpha$  kémiai eltolódás értékek érzékenyek a lokális kémiai környezetre, így a fehérjék másodlagos szerkezetére vonatkozó információ nyerhető belőlük. A szignifikánsan magas  $H\alpha$  proton kémiai eltolódás  $\alpha$ -hélix tartalomra, az alacsony érték pedig  $\beta$ -redőre utal. A másodlagos szerkezeti elemek azonosítására a CSD (chemical shift deviation) analízis alkalmas, ahol

$$CSD = \gamma_{obs} - \gamma_{rc},$$

azaz az adott DSS-hez referenciált kémiai eltolódás értékéből kivonjuk a random coil-hoz tartozó értéket.

A Trp-kalitka szerkezeti motívumú minifehérjékre (26. ábra) általánosságban jellemző a nagy kémiai eltolódás különbségek, amelyek a központi triptofán indolgyűrűjének illetve Leu21-Asp28 közötti  $\alpha$ -hélix dipól hatásaiból ered. Ezáltal az asszignált homonukleáris spektrumok kémiai eltolódás értékeinek felhasználásával azok abszolút nagyságának összehasonlítására nyílik lehetőség a Trp-kalitka minifehérjék

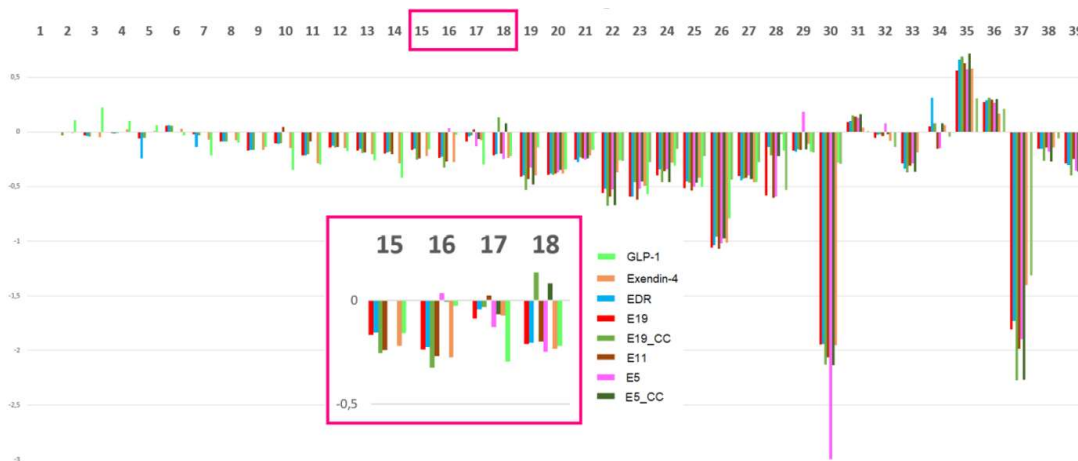


26. ábra: A  $CSD_{cage}$  (piros) és a  $CSD_{helix}$  (narancssárga) értékeit meghatározó régiók

között. A Barua és munkatársai<sup>166</sup> által bevezetett két CSD érték közül (26. ábra):

1.  $CSD_{cage}$  értékkel (Leu26 $H\alpha$ , Gly30 $H\alpha$ 2, Pro31 $H\beta$ 2, Arg35 $H\alpha$ , Pro37 $H\alpha$ , Pro37 $H\beta$ 2, Pro39 $H\delta$ 1, Pro38 $H\delta$ 2, Trp25 $\epsilon$ 1) jellemezhető a Trp-kalitka kompaktsága, azaz a harmadlagos térszerkezet vethető össze a fehérjecsaládon belül. A nagyobb érték jelzi a kompaktabb, feltekeredett állapotot.
2.  $CSD_{helix}$  értékével (Tyr22 $H\alpha$ , Gln24 $H\alpha$ , Trp25 $H\alpha$ , Lys27 $H\alpha$ ) jellemezhető az N-terminális  $\alpha$ -hélix helikalitása, azaz a másodlagos szerkezet vethető össze a fehérjecsaládon belül. A nagyobb érték jelzi a minifehérje nagyobb helicitását.





27. ábra: Triptofán-kalitikás minifehérjék Ha eltolódás értékei, külön keretben kiemelve a 15-18-as linker régió értékei

A E19 molekula NMR adatainak elemzése alapján (27. ábra és 17. táblázat) az Asp9-Glu28 régióban  $\alpha$ -hélix másodlagos szerkezeti elem van a Ha protonok CSD értékei és a régió sűrű (i, i+3) és (i, i+4) NOE kapcsolatai alapján. Ennek ellenére 3 Ha proton esetében (Glu17, Leu21, Gln24) alacsonyabb, egy esetében (Leu26) magasabb kémiai eltolódás érték figyelhető meg környezetéhez képest. A jelenség oka az Leu21, Gln24, Leu26 Ha protonok esetében a szomszédos Trp25 aromás oldallánc zavarás, mivel a térszerkezetben megfigyelhető, hogy a Leu21 és Gln24 protonjai az indol gyűrű síkjában helyezkedik el, miközben az Leu26-é afelett. A Glu17 Ha 13 Å-re van az indol gyűrűtől, azaz egyfajta törésként értelmezhető az  $\alpha$ -hélixben.

Sequence	Chemical Shift Deviations										CSD <sub>Leu</sub>	X <sub>Trp</sub>	22 $\alpha$	24 $\alpha$	25 $\alpha$	27 $\alpha$	CSD <sub>Leu</sub>	X <sub>His</sub>
	26 $\alpha$	30 $\alpha$ 2	31 $\beta$ 3	35 $\alpha$	37 $\alpha$	37 $\beta$ 3	38 $\beta$ 3	38 $\beta$ 2	25His1									
Random coil reference chemical shift	4,23	4,02	2,27	4,62	4,69	2,29	3,74	3,59	10,22			4,60	4,37	4,70	4,36			
TC6b	-0,71	-2,92	0,21	0,30	-1,89	-1,63	-0,56	-0,56	-0,39	9,17	80,58	-0,42	-0,33	-0,44	-0,36	1,55	81,93	
E0	-0,28	-0,90	0,08	0,08	n.d.	n.d.	-0,16	-0,17	-0,17	1,84	16,20	-0,21	-0,23	-0,22	-0,27	0,94	49,50	
E1	-0,31	n.d.	0,09	0,11	n.d.	n.d.	-0,18	-0,21	-0,20	1,09	9,61	-0,24	-0,24	-0,25	-0,28	1,00	52,98	
E2	-0,40	n.d.	0,12	0,14	-0,72	-1,61	-0,25	-0,28	-0,24	3,76	33,08	-0,27	-0,25	-0,28	-0,28	1,08	57,21	
E3	-0,57	-2,11	0,17	0,23	-1,52	-1,59	-0,39	-0,42	-0,36	7,36	64,70	-0,35	-0,28	-0,36	-0,32	1,31	69,15	
E4	-0,82	-2,89	0,19	0,30	-1,99	-1,73	-0,60	-0,61	-0,53	9,64	84,78	-0,48	-0,35	-0,50	-0,41	1,74	91,92	
E5	-0,88	-3,22	0,25	0,35	-2,19	-1,91	-0,63	-0,64	-0,56	10,62	93,33	-0,48	-0,33	-0,51	-0,40	1,72	90,60	
E5_CC	-0,82	-3,43	0,27	0,44	-2,44	-1,77	-0,76	-0,75	-0,71	11,38	100,00	-0,58	-0,44	-0,45	-0,42	1,89	100,00	
E6	-0,90	-3,26	0,25	0,39	-2,21	-1,93	-0,65	-0,69	-0,57	10,84	95,26	-0,50	-0,34	-0,52	-0,40	1,75	92,45	
E7	-0,91	-3,27	0,24	0,40	-2,23	-1,93	-0,66	-0,68	0,00	10,31	90,61	-0,52	-0,35	-0,53	-0,40	1,80	95,25	
E8	-0,91	-3,23	0,24	0,39	-2,23	-1,93	-0,66	-0,69	-0,57	10,83	95,22	-0,52	-0,35	-0,53	-0,41	1,80	94,93	
E9	-0,91	-3,27	0,24	0,40	-2,23	-1,93	-0,65	-0,67	-0,56	10,85	95,35	-0,51	-0,34	-0,53	-0,40	1,78	93,87	
E10	-0,96	-3,30	0,24	0,40	-2,30	-2,02	-0,64	-0,68	-0,56	11,10	97,58	-0,60	-0,37	-0,57	-0,42	1,96	103,33	
E11	-0,91	-3,25	0,24	0,40	-2,20	-1,97	-0,68	-0,64	-0,58	10,88	95,66	-0,53	-0,36	-0,54	-0,42	1,85	97,62	
E19_CC	-1,00	-3,43	0,28	0,47	-2,49	-1,80	-0,86	-0,88	-0,62	11,83	103,97	-0,62	-0,46	-0,46	-0,43	1,97	103,80	
E19	-0,90	-2,98	0,22	0,33	-2,03	-1,77	-0,65	-0,63	-0,58	10,08	88,62	-0,50	-0,39	-0,51	-0,40	1,80	95,30	
EDR	-0,88	-3,05	0,22	0,39	-1,95	-1,76	-0,62	-0,61	-0,46	9,92	87,20	-0,52	-0,34	-0,46	-0,44	1,76	92,82	
Exendin-4	-0,85	-2,68	0,19	0,58	-1,62	-1,37	-0,54	-0,53	-0,46	8,81	77,41	-0,37	-0,37	-0,43	-0,46	1,63	86,11	

17. táblázat: A CSD értékeket meghatározó protonok kémiai eltolódás értékei

A hélix törésének jelensége megfigyelhető a GLP-1 és az Exendin-4 esetében is (28. és 30. ábra). Előbbi esetében a hélixet a 16-20. aminosavak közötti rész osztja ketté, amelyet a Glu16 Ha CSD értéke mutat. Az Exendin-4 N-terminális random coil régióját (His7-Ser14) követő két helikális régiót (N-hélix Ser14-Glu21 és C-hélix Ala25-Gly36)

követi, a közöttük levő linker (Gly22-Ala24) teszi flexibilissé. Az Exendin-4 és a E19 esetében az Glu17 H $\alpha$  magas CSD értéke is erre utal: Asp9-Glu16 (N-hélix) és Ala18-Glu28 (C-hélix) részre osztva a helikális részt. Továbbá megfigyelhető, hogy a C-hélix aminosavai nagyobb H $\alpha$  eltolódási értékeket mutatnak mint az N-hélixé, aminek oka a térszerkezet analízise alapján a C-terminális PPII hélix interakciói a Trp25-el, miközben NOE híjján nincs kapcsolata az N-hélixel (**28. ábra**). A C-hélix és a PPII hélix formálja közösen a TC motívumot (Ala18-Ser39).

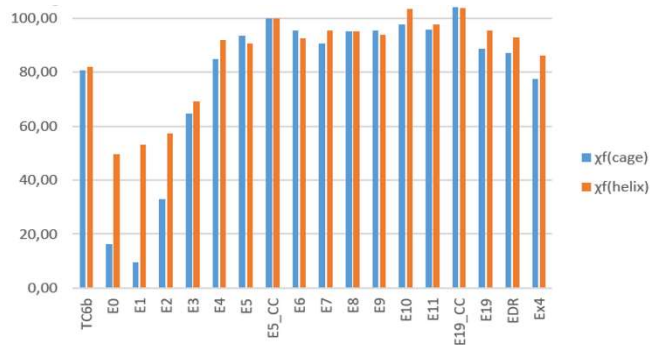


**28. ábra:** A E19 minifehérje NOE-kapcsolatainak hálózata. Jól látható, hogy az N-terminális 1-7. régiója rendezetlen (kevés NOE), valamint az N- és C-hélix közötti linker régió (kevés NOE). Rovó Petra nyomán.

Ha feltételezzük, hogy minden minifehérje variáns jellemezhető ugyanazzal a topológiával (Trp-kalitka + N-terminális hélix), akkor a két típusú CSD értékről azt is feltételezzük, hogy egyenes arányban állnak egy rendezett (folded) és egy nem-rendezett (unfolded) szerkezeti állapot esetében mért értékekkel. Azaz jellemezhetjük felhasználásukkal a Trp-kalitka motívumú minifehérjék szerkezetének topológiáját, stabilitását az  $\chi^2_{\text{(cage)}}$  és  $\chi^2_{\text{(helix)}}$  értékek bevezetésével. Ezzel egyben azt is feltételezzük, hogy a megfigyelt változások csak az N-terminális hosszabbítás következményei. Referenciapontként a „teljesen rendezett” értéknek (100%) a E5\_CC CSD értékeit, a „teljesen rendezetlen” értéknek (0%) a TC5b\_S20pS CSD értékeit vettük.

Ennek megfelelően elemeztük a különböző hosszúságú variánsok relatív stabilitását (**29. ábra**). Az NMR spektroszkópiai adatok alapján az E10 peptid helikálisabb, mint az E11, ami ellentétes az ECD adatokkal. Ennek oka módszertani: a CD-spektroszkópia által mért ellipticitási értékhez a teljes molekula hozzájárul, a CSD analízis pedig kizárólag a Trp-kalitka motívum helikalitását méri. A két spektroszkópiai analízis mindenesetre megegyezik abban, hogy az E0-től kezdődő hosszabbítás az E11 molekulahosszig megnöveli a teljes helicitás mértékét, az E11-től E19-ig növelés azonban már nem.

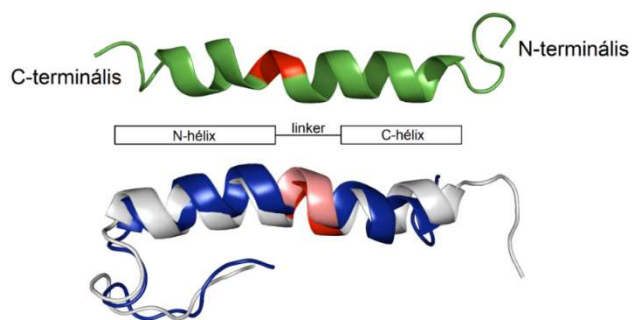
Az E0 peptid esetében az Asn-Arg csere destabilizálja a szerkezetet, mivel negatív töltésű aminosav oldallánc kerül a molekula N-terminálisára, csökkentve a hélix dipólusát. Az ezt követő E1→E3 hosszabbítások esetében a Trp-kalitka fold stabilitása folyamatosan visszaáll, aminosav hozzáépítésenként 5-10%-al nő. A TC5b-nek megfelelő stabilitási index az E4 minifehérje esetébe áll helyre, ekkor kisebb stabilitású E3 N-terminálisán levő Glu16 helyét a Glu17 veszi át és sóhidat alakít ki az Arg20-al. Az E6-E10 hosszabbítások esetében a hélix növelése már nem jár jelentős folded populáció növekedéssel.



**29. ábra:** A Triptofán-kalitkás minifehérjék összesített CSD értékei ( $\chi_f(\text{cage})$ ,  $\chi_f(\text{helix})$ ), amelyek százalékos arányban mutatják a referenciamolekulához (H5\_CC) képest a rendezettséget és helicitást.

Az E19 és Ex4 30% TFE-s mintáinak analízise alapján az E19 esetében a helikalitás és a kompaktság 10%-al nagyobb, mint az Exendin-4-nél. Az E19 vizes és TFE-s mintáinak eredményei között minimális, azt sejteti, hogy a TFE a Trp-kalitka kialakulását indukálja, ha az kevésbé stabil vizes oldatban, ha az kompakt, nincs hatása.

Az E19-nek nincsenek intramolekuláris NOE kapcsolatai a 1His-7Thr szegmens között (28. ábra), valamint a CSD értékek sem utalnak másodlagos szerkezeti elem meglétére, utalva arra, hogy ez egy gyors mozgású régió. Másodlagos szerkezeti elem



**30. ábra:** A GLP-1 (felül, zöld), a H19 (alul, szürke) és az EDR (alul, kék) atomi felbontású térszerkezete. Pirossal illetve halvány rózsaszínnel jelölve a linker régió.

Gly30-Gly34 közötti  $3_{10}$ -hélix, amelyre a  $H\alpha-NH_{i+2}$  NOE-k utalnak (nem  $i+3$  mint  $\alpha$ -hélix esetében). A Lys12 és Glu16 aminosavak közül oldallánci a szemközti aminosavakkal (Asp9 és Arg20) felváltva sóhidat létesítenek az  $\alpha$ -hélix régiójában, amely további szerkezetstabilizáló hatással bír. A térszerkezeti sajátosságaik nagyjából hasonlóak mondható, fő különbség az 5-14 szegmens közötti aminosavak mobilitása: 30% TFE oldatban az  $\alpha$ -hélix az Exendin-4 esetében egy kanyarral előbb kezdődik.

### 4.2.3. Eredmények – Ex-4 és analógjai közötti térszerkezeti különbségek

A módosítások hatásai a tervezett E19 minifehérje esetében összehasonlítva az Exendin-4-el a következők voltak az NMR-spektroszkópiai adatokból nyert atomi felbontású térszerkezet alapján (31. ábra):

- i) A Glu24Gln mutáció csökkenti a Trp25 hidrofób indolgyűrűjének víz-kitettségét, és megakadályozza a nem kívánt elektrosztatikus kölcsönhatást a Gln24 és Glu28 között.

- ii) A Phe22Trp csere miatt az aromás aminosav oldalláncok (22Trp, 25Tyr)  $\pi$ - $\pi$  interakciója nő, továbbá lehetővé válik a kompaktság monitorozása távoli UV tartományban. Több inkretin esetében ebben a pozícióban tirozin van, így feltehetően az oldallánc plusz

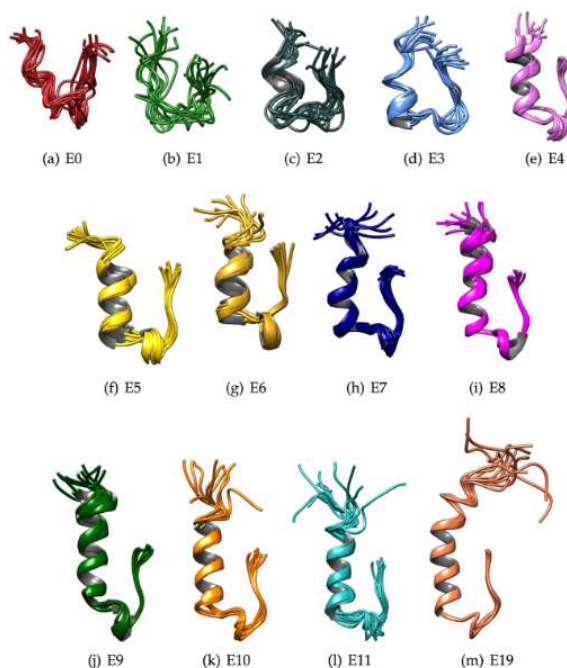
hidroxilcsoportja nem befolyásolja a receptorhoz kötődést.

Mindkét potenciális analóg esetében a megjelenő Glu28-Arg35 sóhíd szerkezetstabilizáló hatása miatt nőtt a helicitás, valamint a pozitív oldalláncú aminosavak növelik a molekula vízdékonyságát.

### 4.2.4. Eredmények – További NMR vizsgálatok

A minifehérjék dinamikáját  $^{15}\text{N}$  jelzett mintákkal heteronukleáris NMR spektroszkópiával vizsgálva megállapítható volt, hogy a His1-Ser8 közötti régió mozgékony, a Asp9-Glu16 régió pedig kisebb belső mozgásokkal rendelkezik.

Irodalmi előzményekből ismert, hogy a GLP-1 és az Exendin-4 oligomer amiloid-szálas struktúrák kialakítására képes fiziológiás körülmények (pH, T) között: a 2 mM-os koncentrációjú Exendin-4 298 K-en vízben trimer, 30%-os TFE oldatban dimer és trimer formaként van jelen. A különböző hőmérsékleten (5, 16, 27 °C), két fajta oldatban ( $\text{H}_2\text{O}$ , 30% TFE) 0,5 mM-os fehérjekoncentrációval elvégzett DOSY NMR-mérések eredményei alapján megfigyelhető volt, hogy az Exendin-4 esetében minden körülmény



31. ábra: A különböző hosszúságú minifehérjék atomi felbontású térszerkezete. Rovó Petra nyomán.

között nagyobb az oligomerizálódás szintje, mint a E19 esetében (**18. táblázat**). Azaz a Trp-kalitka az N-terminális helikális régió stabilizálásával energiagátat képez, hiszen a kompakt térszerkezet kedvezőbb energetikailag. A TFE-s környezet eltolja az energiagátat a multimerizáció felé az N-terminális régió stabilizálásával.

**18. táblázat:** A H19 és EDR minifehérjék diffúziós méréseinek eredménye.

		10% D <sub>2</sub> O / 90% H <sub>2</sub> O			30% TFE-d <sub>2</sub> / 70% H <sub>2</sub> O		
	T (°C)	D <sub>obs</sub> (x10 <sup>-11</sup> m <sup>2</sup> /s)	D <sub>st</sub> (x10 <sup>-11</sup> m <sup>2</sup> /s)	M <sup>app</sup> (kDa)	D <sub>obs</sub> (x10 <sup>-11</sup> m <sup>2</sup> /s)	D <sub>st</sub> (x10 <sup>-11</sup> m <sup>2</sup> /s)	M <sup>app</sup> (kDa)
<b>E19</b>	5	7,44±0,07	12,3±0,12	8,5	3,55±0,05	9,41±0,08	19,0
	16	10,8±0,5	13,3±0,6	6,7	6,05±0,01	11,96±0,02	9,2
	27	16,2±0,4	13,7±0,3	6,1	9,84±0,07	13,8±0,1	6,0
<b>Ex4</b>	5	6,99±0,02	11,56±0,03	10,2	3,25±0,06	8,61±0,11	24,9
	16	10,22±0,06	12,6±0,08	7,9	5,91±0,05	11,69±0,06	9,9
	27	14,3±0,3	12,6±0,3	8,0	9,46±0,06	13,27±0,09	6,8

#### 4.2.5. Eredmények – in vitro bioaktivitás teszt

A különböző hosszúságú és kompaktságú polipeptidek bioaktivitását in vitro emberi INS-1 sejtvonal inzulin szekréciós válasza alapján vizsgáltuk magas (15 mM) glükóz szint mellett.

Első pilot-kísérletként alacsony (2,5 mM) és magas (15 mM) glükóz hatását vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a magas vércukorszinttel 1,6-szoros inzulintermelés párosul, ami 40 ng/ml inzulin szekréciónak felel meg. Kontroll kísérletként a polipeptidek szekréciós hatását alacsony glükózsint mellett is vizsgáltuk, ebben az esetben a vártak megfelelően nem tapasztaltunk inzulin szekréciós szint növekedést. A kísérleteket az adott polipeptidekkel magas (15 mM) glükóz szint mellett végeztük, hogy mérni tudjuk hatásosságukat.

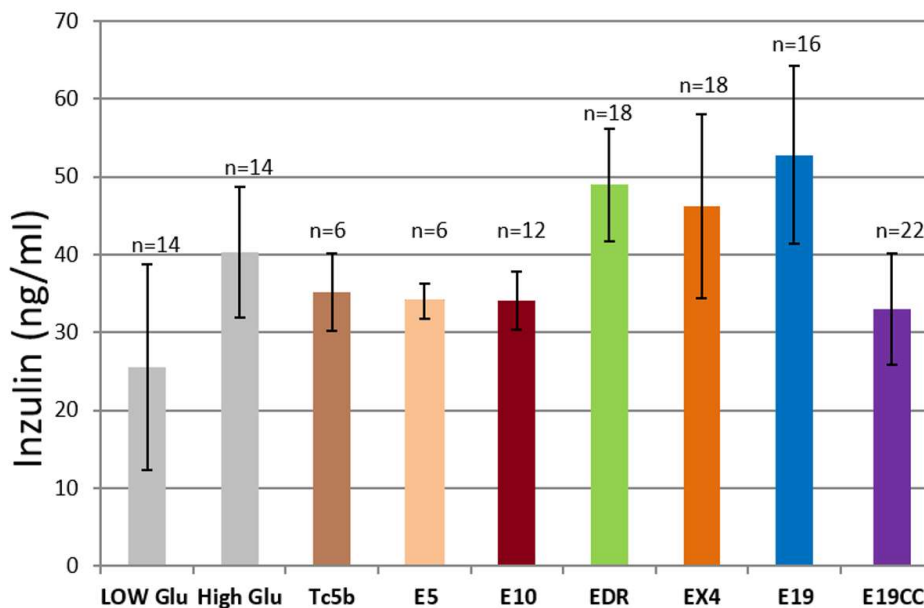
Ha a kapott eredményeket összevetjük a magas vércukorszint esetében kapott kontroll értékekkel, megállapíthatjuk, hogy számos polipeptid (TC5b, E5, E10, E19CC) esetében nem tapasztalható megnövekedett inzulinszekréció, azonban az Exendin-4, EDR, E19 minifehérjék esetében igazolható a bioaktivitás (**32. Ábra**).

A biológiailag nem aktív peptidek közül a TC5b, E5, E10 esetében hiányzik a GLP-1R receptor aktiválásához szükséges N-terminális 9 aminosav, azaz esetükben bár a receptorhoz kötődést a TC5b kivételével nem lehet teljesen kizárni, antagonistaként nem képesek a receptor aktiválására, inzulin termelésre. A E19\_CC esetében a beépített

diszulfidhíd feltételezhetően megakadályozza, illetve jelentősen csökkenti az N-terminális hélix mozgékonyaságát és a minifehérje C-terminálisa is zavarhatja a kötődést, így akadályozva meg a receptor aktiválását.

A három polipeptid közül, bár az inzulin szekréciónak szintje között lehet különbséget tenni, azonban a módszer sajátosságai miatti nagy szórás értékekkel terhelt eredmények inkább arra utalnak, hogy a E19 és az EDR bioaktivitása összevethető az Exendin-4-ével.

Megjegyzendő, hogy utóbbi inzulin-szekréciónak szintje a kísérletünkben használt 100-120 passzás számú INS-1E sejtek esetében alacsonyabb a korábban publikálttal. Ennek oka módszertani is lehet, mivel az rendkívül időigényes (egy kísérletsorozat 4 hetes), sok a bizonytalansága (sejtek állapota, pipettázási hibák, bonyolult kivitelezés). Azonban kísérleteink azt mutatják, hogy a potens fehérjék esetében körülbelül 20%-al nagyobb az inzulin szekréciónak. *In vivo* a  $\beta$ -sejtek inzulin tartalékának csak néhány százaléka választódik el a stimulusra, ennél nagyobb szekréciónak szintje a sejtek integritásának megromlását feltételezné, ami súlyos hipoglykémiahoz vezethet.

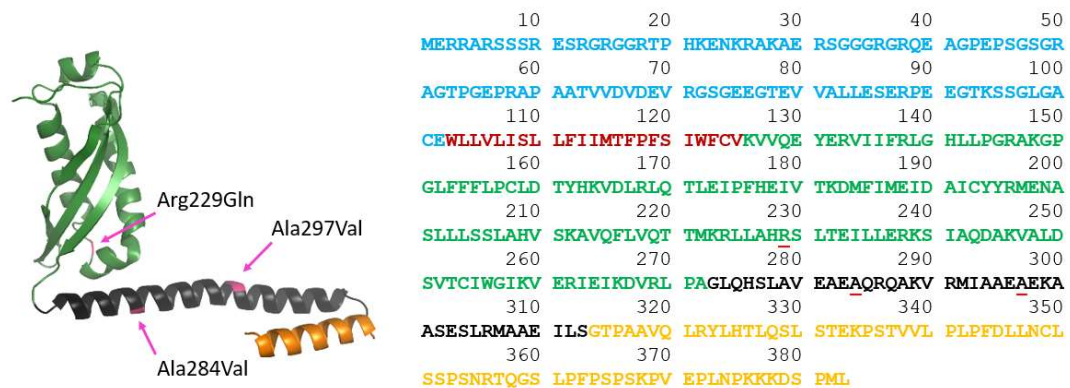


**32. ábra:** A különböző minifehérjék hatása az INS-1E sejtek inzulinszekréciónak szintjére. Látható, hogy a TC5b, E5, E10, E19\_CC esetében nincs számottevő inzulin szekréciónak, míg a H19 és EDR magasabb inzulinszekréciónakot vált ki.

## 4.3. Eredmények - Podocin

### 4.3.1. Podocin szerkezet-funkció összefüggései

A 383 aminosavas podocin fehérjéről jelenleg nincsen atomi felbontású szerkezet, így a szerkezet-funkció összefüggések felderítéséhez homológia modell építésére volt szükség, amihez elengedhetetlen a fehérje elsődleges szerkezetének (33. ábra) bioinformatikai analízise. A különböző predikciós programokkal (ld. *Módszerek*) kapott eredményeket a 33. és 34. ábra foglalja össze. Megállapítható, hogy a podocin intracelluláris N-terminális fragmense (1-102) rendezetlen szerkezetű, az ezt követő transzmembrán horgonyt a 103-125 aminosavak alkotják, amelyet egy szintén intracelluláris C-terminális domén követ (126-383), amely így megfelel az SPFH családra jellemző felépítésnek.

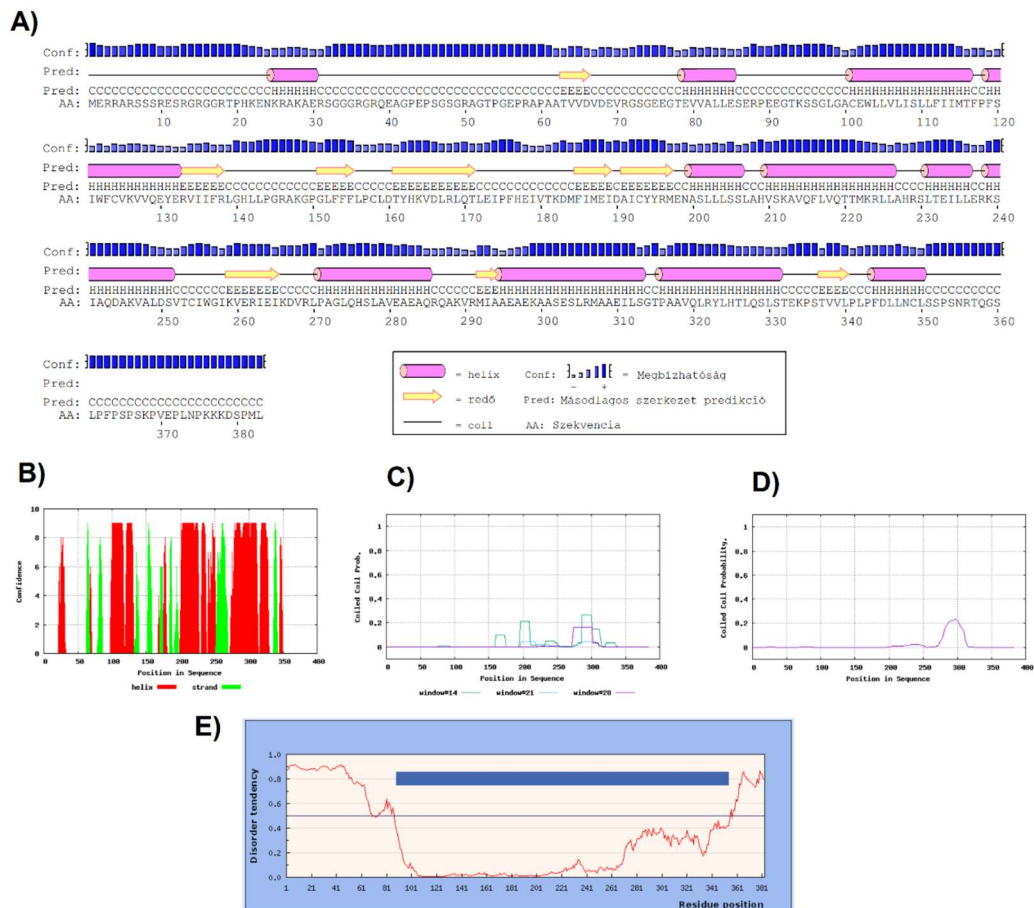


**33. ábra:** A humán podocin modellezett (jobbra) és elsődleges (balra) szerkezete. Utóbbin késsel a rendezetlen régió (IUPred alapján), bordóval a membránhorgony van jelölve (TMHMM alapján). Az ezt követő intracelluláris rész (zöld) az SPFH domén a coiled coil régióval (fekete) együtt. Ezt követi a C-terminális (narancssárga) domén. Részletesebben ld. 31. ábra. Rózsaszínnel aláhúzva az Arg229Gln polimorf, és a miszensz (Ala284Val, Ala297Val) mutációk.

Az SPFH domén a podocin C-terminálisán helyezkedik el (127-272), amelyet a szakirodalom alapján az ebbe a családba tartozó fehérjékhez hasonlóan három helikális szakasz követ. Az első (272-313. aminosavak szakasza – Hélix1), az ún. *coiled coil* domén, amelyet a vizsgált mutációk érintenek. Ezt követi még további két helikális régió (Hélix2 – 317-331; Hélix3 – 344-350). Az ezt követő szekvencia fragmens (351-383) a növekvő rendezetlenség miatt feltehetően harmadlagos szerkezettel nem rendelkezik, amelyet alátámaszt az IUPred predikció is. (34/E. ábra)

A fentiekből következőleg, figyelembe véve, hogy az SRNS kialakulása az exon-7 és 8-at kódoló régiókban bekövetkező mutációkhoz köthető, feltételezhetjük, hogy a dimerizációért a Hélix1 domén (33. ábra, feketével jelölve), *coiled coil* szerkezeti elemet kialakítva, a felelős. A másodlagos szerkezet analízis (PsiPred – 34/A és 34/B. ábra)

ennek a 272-313 aminosavak közötti szakasznak helikális tartalmat jósol, a különböző *coiled coil* régiók kimutatására specializált predikciók (Marcoil, PCOILS) viszont alacsony (~10-20%) valószínűséget jósolnak a *coiled coil* szerkezeti elem meglétének. Az alacsony valószínűségnek oka lehet az érintett szakasz kis (42) aminosavtagszáma. Mivel a *coiled coil* szerkezeti elem tulajdonképpen egy dimer szerkezeti elemként is felfogható, feltételezhetjük, hogy ez a 272-313 aminosavak közötti helikális szakasz a felelős a dimerek kialakításáért. Ezt erősíti, hogy a szakaszt érintő mutációk (Ala284Val



**34. ábra:** Másodlagos szerkezet predikciók eredményei. A) és B) PsiPred másodlagos szerkezet predikció; C) Marcoil coiled coil specifikus predikció; D) PCOILS coiled coil specifikus predikció; E) IUPred rendezetlen szerkezeti elem predikció.

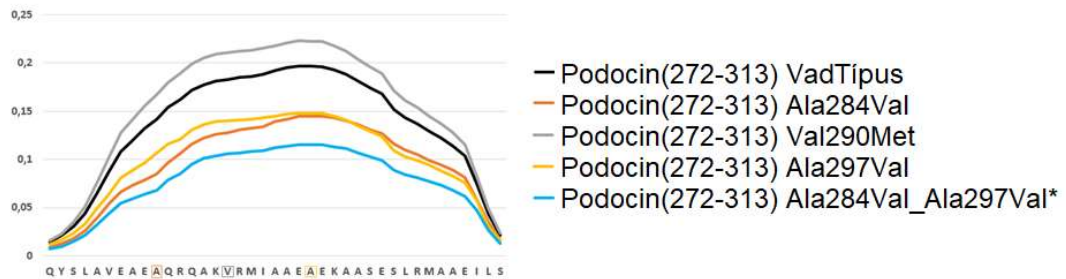
és A297Val) gyengíthetik a két helikális fragmens közötti hidrofób kölcsönhatást a plusz metilén-csoport megjelenése miatt, amit a predikciók is alátámasztanak, ld. **35. ábra**<sup>o</sup>.

A PDB-ben jelenleg két SPFH doménnel rendelkező fehérje atomi felbontású, röntgendiffrakcióval meghatározott szerkezete ismert, az egér eredetű (PDB: 4FVF), illetve a *P. horikoshii* sztomatin (PDB: 3BK6) fehérjéje (**41. Ábra**). Mindkét

<sup>o</sup> Megjegyzendő, hogy ebben az esetben a coiled-coil domént homodimerek alkotják, amely a természetben nem fordul elő.



szerkezetben közös, hogy a kristályszerkezet az intracelluláris globuláris részt mutatja, a 3BK6 esetében azonban a C-terminális helikális domén is megjelenik. Előbbi térszerkezet dimer, utóbbi trimer állapotot mutat, azonban a molekulák N-terminális globuláris részének kölcsönhatása miatt alakul ki a di- vagy trimerizáció, azaz a helikális doménnek térszerkezetek alapján ebben nincs szerepe. Korábbi vizsgálatok kimutatták a podocin esetében a globuláris SPFH-domén és a nephrin kölcsönhatását ezen az N-terminális részen.



**35. ábra:** A podocin 272-313 helikális doménjét érintő mutációk hatása a coiled coil szerkezeti elem meglétének valószínűségére (maximum értéke =1). A kék színnel jelölt CC2\_A284V\_A297V a természetben nem fordul elő.

Emiatt szükségesnek láttuk egy a *coiled-coil* doménnel rendelkező molekuláris modell építését és molekuladinamikai szimulációk futtatását különös tekintettel az SRNS-t okozó néhány fókuszban levő mutáció térszerkezet befolyásoló hatására, valamint kísérletes úton a fehérje előállítására, biofizikai vizsgálatára, valamint atomi felbontású szerkezet-meghatározásra.

#### 4.3.2. A podocin fehérje-fragmensek előállítása

A podocin fehérje előállítása bakteriális expressziós rendszerben történt. Az ismert két homológ fehérje (3BK6 / 1FVF) előállítása GST-fúziós rendszerben végezték, így első lépésként ezeket próbáltam alkalmazni, azonban az expressziók során fehérje nem, vagy csak inklúziós testekben képződött. A fragmenseket (ld. **10. táblázat**) Maltóz-kötő fehérje fúziós rendszerként sikeresen előállítottam és tisztítottam (ld. *Módszerek*).

A thrombinos proteolitikus hasítás során azonban mindegyik podocin fragmens pillanatszerűen kicsapódott az enzim működését követően, ami azt mutatja, hogy az MBP fúziós fehérjeként megvédte a podocin gyors aggregálódását. A podocin oldatfázisban maradását próbáltam az N- és C-terminális domén-határok módosításával, valamint a pufferes körülmények és más additívok hozzáadásával megakadályozni, sikertelenül. Utóbbira a hasítóhelyet TEV proteáz felismerő helyre cserélése révén nyílt lehetőségem.

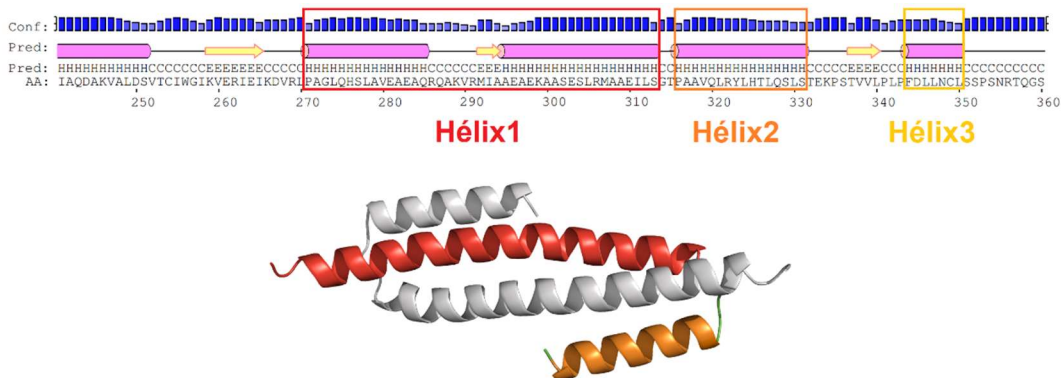
A későbbi FRET vizsgálatok és a Carrier-driven-crystallization érdekében az MBP és a podocin fragmens közötti linker régió hosszát csökkentettem.

A kicsapódás jelenség miatt a közvetlen atomi felbontású szerkezet-meghatározást, mint célt, elvetettük, helyette a fúziós fehérjével együtt próbáltuk a kristályosítási reakció körülményeinek optimalizálását és az interakció vizsgálatát.

Célunk volt továbbá a podocin dimerizációs központjának meghatározása. Ehhez két kísérletsorozatot terveztünk: 1) *A coiled-coil fragmens előállítását és ECD-spektroszkópiával történő vizsgálatát*; 2) *Az intracelluláris fragmensek FRET-alapú vizsgálatát*.

### 4.3.3. A Hélix1 domén vizsgálata

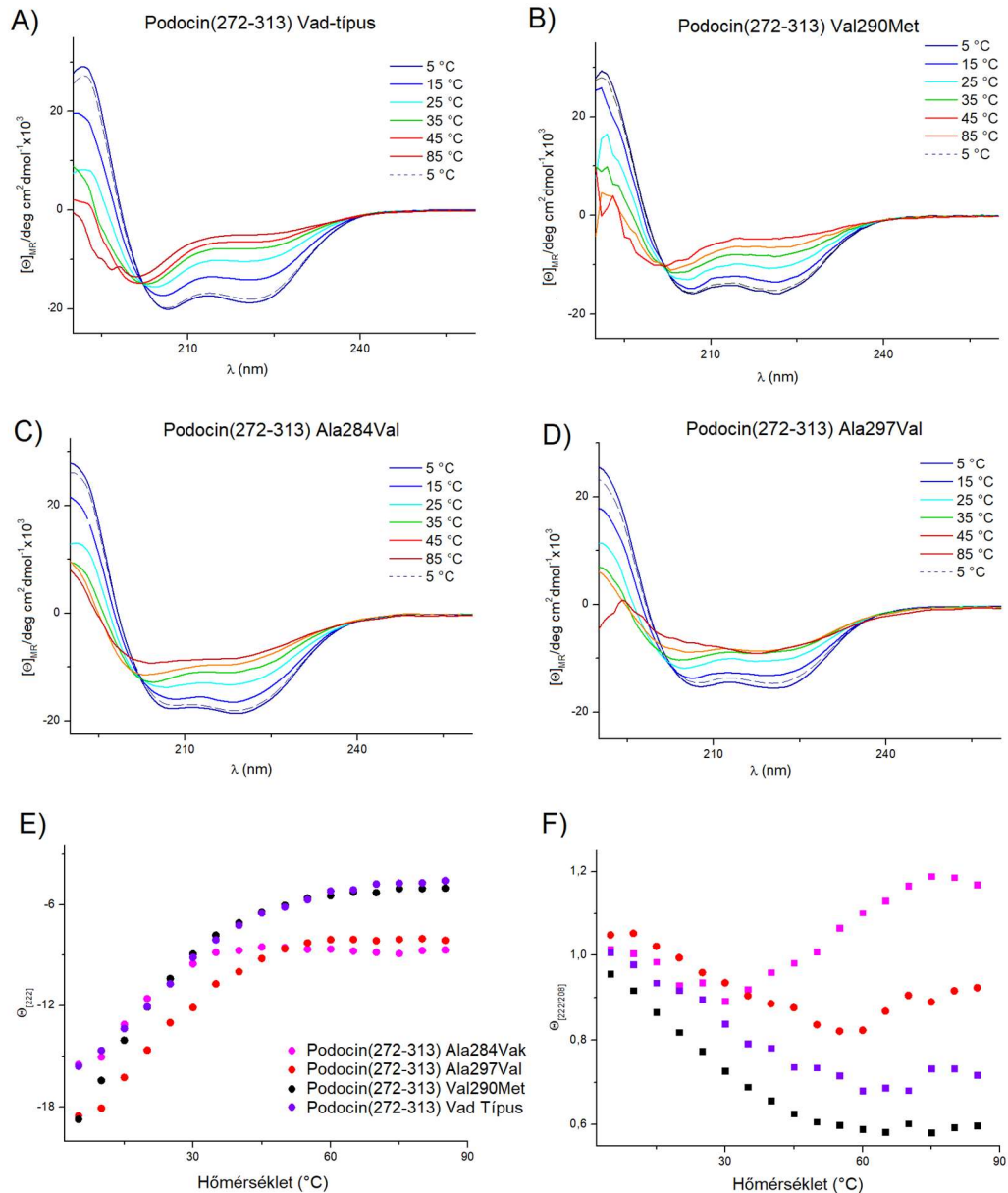
A Hélix1 domént (H1) tartalmazó fragmenst (272-313) GST-fúziós rendszer segítségével sikeresen előállítottam. A pontos koncentráció mérés érdekében, mivel a 272-313 közötti szakasz nem tartalmaz aromás aminosavat, egy tirozint építettem be helyspecifikus mutagenezissel a vad-típusú konstrukció esetében, majd ezt felhasználva alakítottam ki a pontmutánsokat (Ala284Val, Ala297Val, Val290Met). Az RP-HPLC-vel tisztított liofilizált mintákat a megfelelő pufferben távoli illetve hőmérsékletfüggő közeli UV-tartományú CD-spektroszkópiai vizsgálatoknak vettem alá, az 5 °C-onként felvett spektrumokat CCA+ program segítségével komponensekre bontottam.



**36. ábra:** A Podocin(272-313) fragmensének másodlagos szerkezet predikciója (felül), valamint modellezett, antiparallel topológiájú, szerkezete.

Irodalmi előzmények alapján az SPFH fehérjecsalád tagjainak ezen régiója *coiled coil* szerkezeti elemet, azaz egyfajta dimerizációs régiót alkot. A másodlagos szerkezeti predikciók (34/B. ábra és 36. ábra) alapján ez a régió helikális jellegű (Hélix1 régió, pirossal), azonban kis valószínűséggel (~20%) *coiled coil*. A felvett CD-spektrumokra (37. ábra) általánosan jellemző, hogy alacsony hőmérsékleten (5-30 °C) helikális jellegűek, majd ezt követően (35-85 °C) jelenik meg a rendezetlen komponens.

Mindegyik mutáns esetében megfigyelhető volt a 85 °C-ról 5 °C-ra visszahűtés során, hogy a peptid téralkata visszatér a közel eredeti helikális szerkezetébe. A rendezett-rendeztelen átalakulás vizsgálatához CCA+ programmal<sup>167</sup> rendezett (helikális) és rendezetlen komponensre bontottam fel, és a négy különböző peptid esetében megvizsgáltam a komponensek arányát (**38. ábra**).



**37. ábra:** A különböző mutációt hordozó podocin(272-313) fragmensek hőmérsékletfüggő CD-spektrumai: ((A) Vad típus; B) Val290Met; C) Ala284Val; D) Ala297Val) és 220 nm-en mért moláris ellipticitás értékének (E) valamint a 220/208 hullámhosszokon mért moláris ellipticitás érték arányának változása (F) a hőmérséklet függvényében az egyes variánsok esetében.

Megvizsgálva az különböző hőmérsékleten felvett spektrumok 220 nm-es hullámhosszon (**37/E. ábra**) mért moláris ellipticitás értékeit, amelyből a helikalitás mértékére következtethetünk, látható, hogy A vad típus és az Val290Met mutáns esetében

a moláris ellipticitás csökkenése egyenletesnek mondható, azonban az Ala284Val és az Ala297Val mutánsok esetében már alacsony hőmérsékleten, 35 °C illetve 50 °C, eléri a közel maximum értéket, azaz a két mutáció hatására a peptidek a helikális jelleget alacsonyabb hőmérsékleten elvesztik. Az irodalom alapján a 222 és 208 hullámhosszakon mér moláris ellipticitás értékek is utalnak coiled coil szerkezeti elemre, amennyiben értéke 1,1-1,2 közötti, valamint hőmérséklet emelés, vagy más denaturáló hatás következtében az arányszám változása nem lineáris. Ahogy a **37/F. ábrán** látható már a vad típus esetében a hányados legmagasabb értéke 5 °C-on 1,01, a spektrumok illetve a CCA+ felbontás alapján stabilabb Val290Met esetében 1,00. A két miszensz mutáns esetében az 5 °C-on mért 222/208 moláris ellipticitás arány valamivel magasabb ennél az értéknél. Az arányszám változása azonban a vad típus és a Val290Met esetében folyamatosan csökkenő, az Ala284Val és Ala297Val esetében pedig 35 °C és 50 °C hőmérsékletektől kezdve emelkedő.

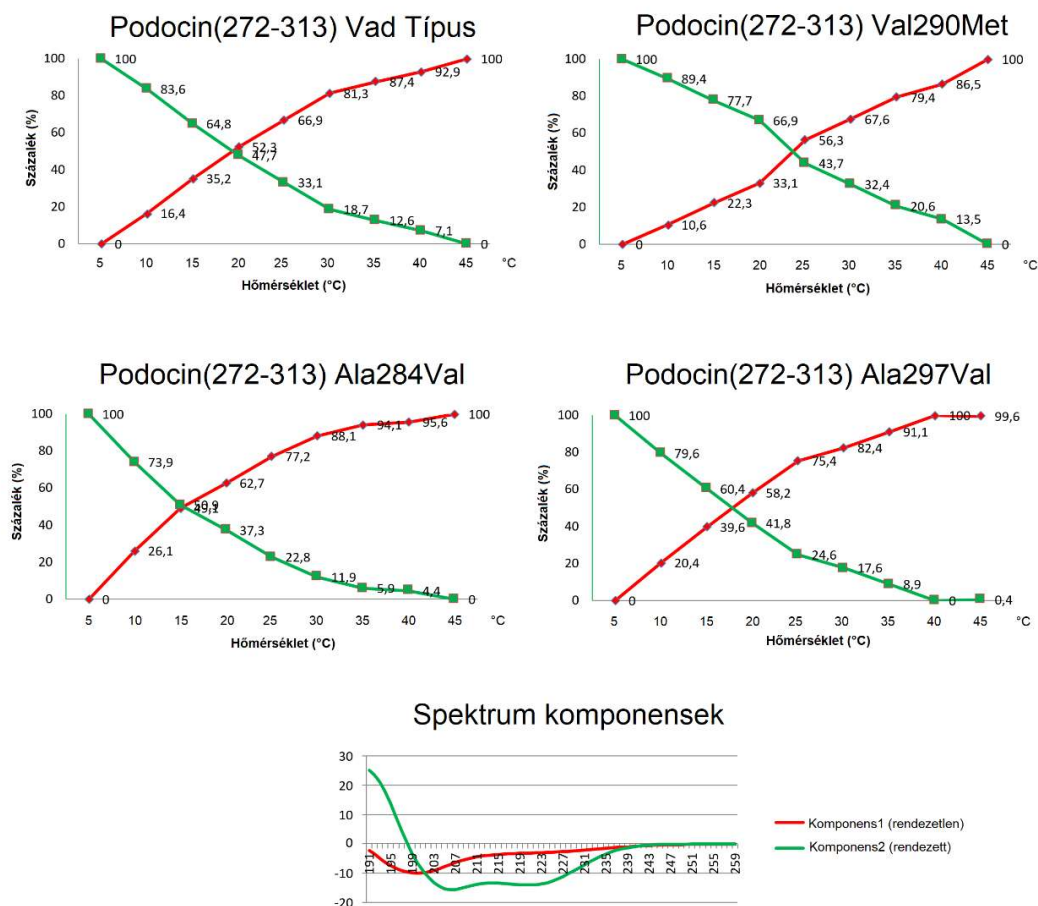
Feltevésünk az volt, hogy a *coiled coil* szerkezeti elemet gyengítő mutációk esetében a szerkezet alacsonyabb hőmérsékleten válik rendezetlenné. A CCA+ program segítségével a CD-spektrumok komponenseikre bonthatók, azaz meghatározható adott hőmérsékleten jelen esetben a rendezett (5 °C-on 100% - **38. ábra** zöld szín) és a rendezetlen (85 °C-on 100% - **38. ábra** piros szín) komponens aránya.

Mivel az arányok változása nem lineáris, emiatt mutáció hatásaként azt a hőmérsékletet vettem, amelyen a rendezetlen szerkezet az 50%-os arányban jelenik meg. A vad típusú fragmens esetében 19,29 °C-on éri el a rendezetlen komponens az 50%-os hányadot, ezzel szemben a Val290Met mutáns esetében ez a hőmérsékleti érték 24,87 °C. A miszensz mutációk közül az Ala284Val mutáns esetében az 50%-os rendezetlen állapot megjelenésének hőmérséklete 15,2 °C, az Ala297Val esetében pedig 17,5 °C. Az eredmények értékelése során azonban figyelembe kell vennünk, hogy a dimerek csak a WT esetében fiziológiásak, a mutációk (Ala284Val, Ala297Val, Val290Met) esetében nem, hiszen sem az Arg229Gln mutáció hatása nincsen jelen a rendszerben, illetve fontosabb, hogy homodimerek alakulnak ki (Ala284Val-Ala284Val) heterodimer forma helyett.

A 272-313 régió dimerizálódásért felelős szerepét MBP-fúziós fehérjeként különböző fragmensek méretkizárásos kromatográfiával elvégzett kísérleteivel is vizsgáltam. A podocin ismert 286Tfs pontmutációjában a Arg286 aminosavtól kezdődően hiányzik a Hélix1 domén, a feltételezett, dimerizációért felelős, *coiled coil* régió, trunkáns változat révén csak 302 aminosav hosszúságú (**Függelék F2. ábra**).

Méretkizárásos kromatográfiával sikerült kimutatnom, hogy az MBP-Podocin(168-313) fragmens dimer, míg az MBP-Podocin(168-286Tfs) fragmens monomer formában van jelen (39. ábra).

Az MBP-Podocin(272-313) illetve MBP-Podocin(272-286Tfs) fúziós fehérjék



**38. ábra:** A különböző Hélix1 pontmutások ECD spektrumainak összetétele. A rendezett (zöld) és a rendezetlen (piros) spektrum-tartalomnak a változása jól mutatja a mutációk hatását a helikális (coiled coil) szerkezetre.

méretkizárásos kromatográfiával végzett kísérletével próbáltam alátámasztani a fragmens dimerizációért felelős szerepét, azonban a kísérlet monomer fúziós fehérje meglétét mutatta.

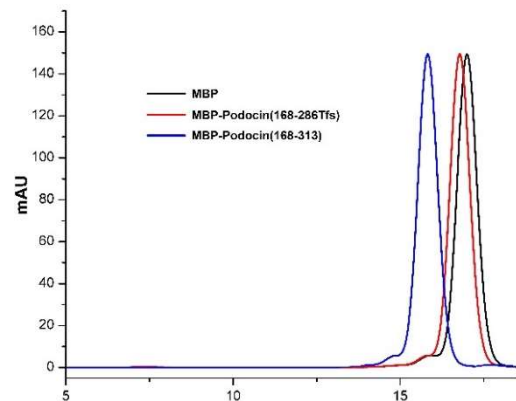
A négy különböző mutáns Hélix1 domént alkotó hélix parallel vagy antiparallel irányát (45. ábra) távoli UV-tartományban felvett CD-spektrummal próbáltam meghatározni. Feltevésem az volt, hogy az N-terminálisan beépített tirozin jelét amennyiben detektálok, a két hélix parallel, ellentétes esetben antiparallel. A spektrumok nem mutatták a tirozin oldallánc jelét, emiatt a két hélix iránya antiparallel. Ezt később FRET vizsgálattal is próbáltuk igazolni.

#### 4.3.4. Intracelluláris fragmensek FRET vizsgálata

A proteolitikus hasítást követő kicsapódás jelensége miatt az atomi felbontású szerkezet-meghatározást elvetettük<sup>p</sup>, így más biofizikai vizsgálatot kerestem annak figyelme bevételével és érdekében, hogy lehetőség legyen heterodimerek gyors és egyszerű, akár kinetikai paramétereiket is mutató módszerrel. Erre a FRET-et találtuk megfelelőnek:

- i) különböző fluoreszcens festékeket (akceptor illetve donor) lehet ciszteinekhez konjugálni;
- ii) az MBP levédi az esetleges N-terminális dimerizációt és nem képez dimereket;
- iii) a módszer gyors, és kinetikai módszerek kiolvasására is alkalmas (nyomás/hőmérséklet – denaturáció hatása). A FRET mérés minta-előkészítése során a méretkizárásos kromatográfia tisztítási lépés pedig lehetőséget biztosított az oligomer formák vizsgálatára.

A fragmensek (8. táblázat) vizsgálata során a MBP-Podocin(168-286) és MBP-Podocin(169-286Tfs) fehérjék esetében választ vártunk az SPFH domén dimerizációjára: amennyiben mindhárom esetben dimer formát kapunk és FRET jelet, abban az esetben számolnunk kell a citoplazmatikus domén N-terminálisának dimerizációra gyakorolt hatásával (45.

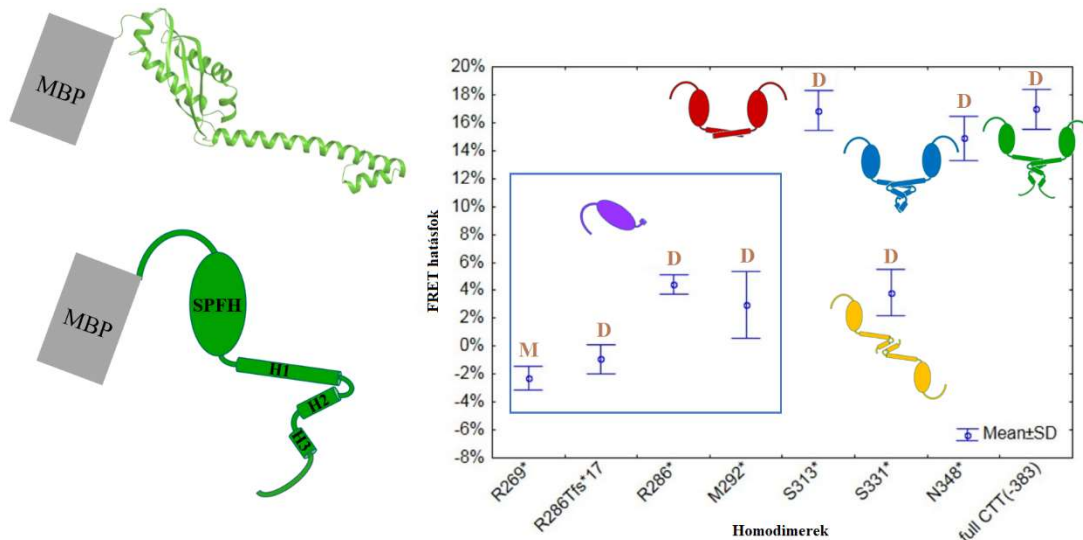


39. ábra: MBP-fúziós podocin fragmensek méretkizárás-kromatogramja. A 168-313 fragmens dimer, míg a 286Tfs monomer formaként van jelen.

ábra). Az eredmények azt mutatják, hogy a MBP-Podocin(168-286) és MBP-Podocin(169-286Tfs) monomer formában van jelen, ennek megfelelően FRET jelet sem kaptunk. A MBP-Podocin(168-286Tfs) és MBP-Podocin(169-313) fragmensek eredményei jól mutatják, hogy a 272-313 szakasz felelős a dimerizálódás kialakulásáért. Ráadásul a teljes MBP-Podocin(168-383) fragmens FRET intenzitása már megfelel az MBP-Podocin(168-313) esetében mért értékkel. Kiugró adatként jelenik meg a várakozással ellentétben az MBP-Podocin(168-331) esetében mért FRET hatásfok csökkenés a csak H1, illetve a H1-H2-H3 doméneket tartalmazó MBP-Podocin(168-313) illetve MBP-Podocin(168-348) értékeihez képest. Ennek magyarázata lehet, hogy H2-es

<sup>p</sup> leszámítva a fúziós fehérje kristályosítást, de ez eredménytelen volt

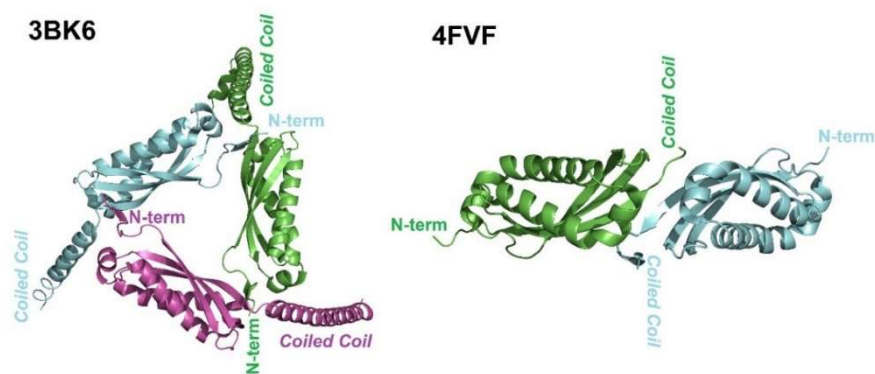
hélix távtartóként funkcionál, ami miatt a dimerizációs hatás gyengül, a dimert alkotó molekulák szabadabban mozognak (rotáció a dimerizációs tengely körül), így a FRET-jelet adó fluoreszcens festékek távolsága a detektálási határra vagy azon kívülre esik, ami a hatásfok csökkenésével jár. A teljes MBP-Podocin(168-383) esetében méretkizárásos kromatográfia alapján megjelenik nagyobb oligomer forma (650kDa) és a dimer csúcs intenzitása is csökken, ez azonban nem feltétlenül jelenti a magasabb rendű oligomer forma megjelenését, lehet melléktermék is.



**40. ábra:** Az MBP-fúziós podocin homodimerek FRET hatásfokának (kék jelölő) és gélzsűrési profiljának (M – monomer; D – dimer) összefoglaló ábrája kiegészítve a megfelelő homodimer (monomer) sematikus rajzával. Az ábra bal oldalán a modellezett podocinból (felül) rajzolt sematikus szerkezeti ábra, jelölve a megfelelő (SPFH, H1, H2, H3) doméneket.

#### 4.3.5. Homológia modellezés

A podocin intracelluláris doménének (153-331) monomer molekuláris modelljét a *P. horikoshii* sztomatin kristályszerkezet (PDB: 3BK6) alapján építettük fel (**41. ábra** és **42. ábra**). Az SPFH domén (153-286) esetében teljes mértékben erre a szerkezetre támaszkodtunk. A 3BK6 szerkezet C-terminálisán levő coiled-coil szerű szerkezet helyett a CC+ coiled-coil adatbázisban szereplő IVP7 struktúrájának megfelelően építettük fel a Hélix1 régióban *coiled coil* szerkezeti elemmel dimerizáldó podocint (**Függelék F1. ábra**). Az ezt követő fiziológias körülményeknek megfelelően paraméterezett molekuladinamikai számolásokat végeztünk 100 ns időtartamig, az utolsó 30 ns átlagszerkezetei analizáltuk.



**41. ábra:** A 3BK6 és 4FVF fehérjék térszerkezete, jelölve az N-terminális és a C-terminális coiled coil domén.

Az 229Arg oldallánc a globuláris fej doménben alakít ki H-híd kölcsönhatást a Glu233 és a Glu237-el vagy az Asp244-el. Az Arg229Gln mutáció révén a Glu233 és a Glu237 oldalláncokkal elveszti ezt a kapcsolatot, emiatt a két aminosav oldallánca átfordul a Hélix1 domén felé, ahol az 288Arg és Lys289 aminosavakkal alakítanak ki kapcsolatot. Emiatt az új elektrosztatikus kölcsönhatásnak köszönhetően azonban a fej – helikális domén kapcsolat merevvé, kevésbé mozgékonyá válik. (44/B. ábra). Ezt a kapott szerkezeti sokaság b-faktor analízise is alátámasztja. A natív podocin esetében a 266-290 aminosavak alkotta peptidgerinc rmsd értéke 1,46 Å (min. 0,4 Å - max. 2,6 Å;

```

Q9NP85|PODO_HUMAN      MERRARSSSRERSRGGRTPHKENKRAKAERSGGGRGRQAEAGPEFSGSGRAGTPGEPRAP
O59180|PSTOM_PYRHO    -----

Q9NP85|PODO_HUMAN      AATVVDVDEVVRSGEETEVVALLESERPEEGTKSSGLGACEWLLVLISLLFIIMTFPFS
O59180|PSTOM_PYRHO    -----MMFATNFFVTSIILLFILI----F
                        : * : : : : * * * * : :

Q9NP85|PODO_HUMAN      IWFCVKVVQYERVVIFRLGHLLPGRAKGPGPLFFFLPCLDTHYKVDLRLQTLLEIPFHEIV
O59180|PSTOM_PYRHO    LSAIKIVKEYERAVIFRLGRVVG--ARGPGLFFIIPIFEKAVIVDLRTQVLDVVPVQETI
                        : . : * : * * * * : * * * * : : * : : * * * * * * * * * * : :
                        |-----|

Q9NP85|PODO_HUMAN      TKDMFIMEIDAICYRMENASLLLSSLAHVSKAVQFLVQTTMKRLLAHRSLTEILLERKS
O59180|PSTOM_PYRHO    TKDNVPRVNAVAVYFRVVDPVKAVTQVKNYIMATSQISQTTLRVIGQAHLDELLSERDK
                        * * * . : : : * : * * : : : : : * . : * * * : : : * * * * * .

Q9NP85|PODO_HUMAN      IAQDAKVALDSVTCIWGIKVERIEIKDVRLPAGLQHSLSLAVEAEAQRQAKVRMIAAEAEKA
O59180|PSTOM_PYRHO    LNMQLQRIIDEATDPWGIKVTAVEIKDVELPAGMQKAMARQAEAERERRARITLAEAEERQ
                        : : : : * * * * * : * * * * * * * * * * : * * * * : : : * * * :
                        |-----|

Q9NP85|PODO_HUMAN      ASESLRMAAEILSGTPAAVQLRYLHTLQSLSTEKPSTVVLPPLFFDLLNCLSSPSNRQTGS
O59180|PSTOM_PYRHO    AAEKLRFAAEIISEHPMALQLRTLQTI SDVAGDKSNVIVLMLPEMLKLFKSLSDAAEAY
                        * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * : :
                        |-----|

Q9NP85|PODO_HUMAN      LPFPSPSKPVEPLNPKKKDSPML
O59180|PSTOM_PYRHO    MKKKEEEK-----
                        : . . . *

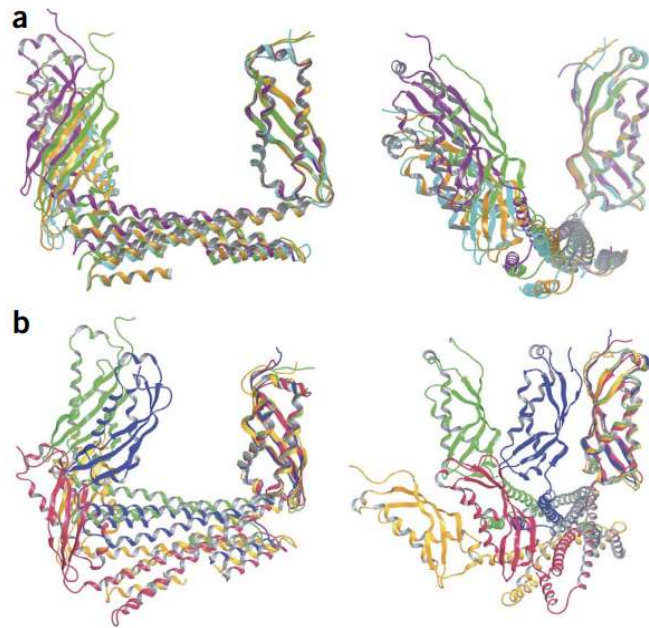
```

**42. ábra:** A humán podocin és a *Pyrococcus horikoshii* sztomatin (3BK6) szekvencia illesztése. A modellezett régiónak 35%-os az azonossága és 65%-os a homológiája a sztomatinhoz képest. Kék sávval jelölve a 3BK6 kristályszerkezetének szekvenciája, zöld sávval a modellezett podociné.



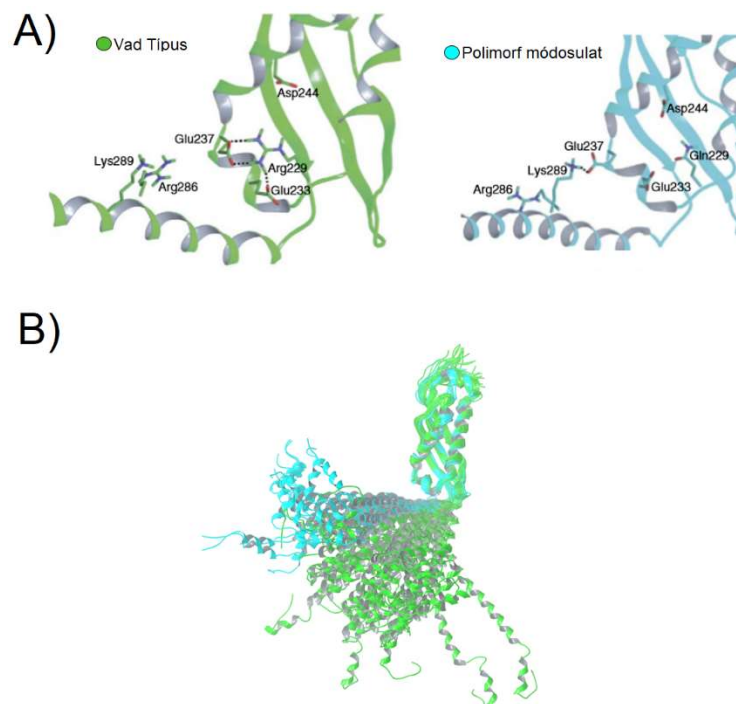
közéérték 1,37 Å), addig a polimorf változaté 0,69 Å (min. 0,23 Å – max. 1,06 Å; közéérték 0,54 Å).

A 43/A. ábrán látható Arg229Gln podocin homodimer (cián) és a [Arg229Gln;Val290Met] heterodimer (narancs) topológiailag hasonló molekuláris elrendezést mutat a vad típus homodimerrel (zöld). Utóbbihoz hasonló



43. ábra: A modellezett podocin szerkezetek egymásra illesztése. A színek magyarázata a szövegben.

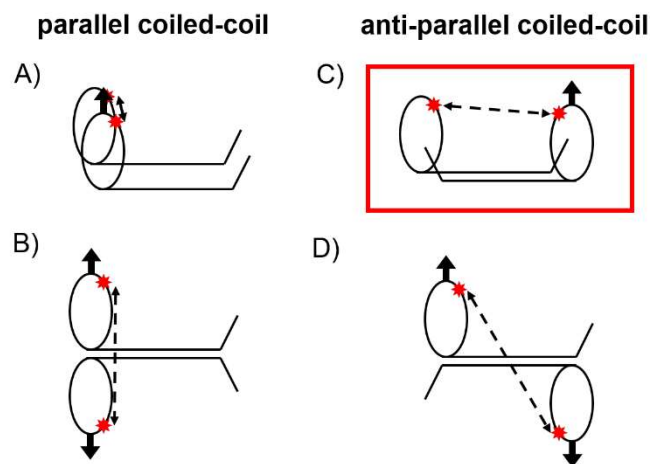
topológiájú az [Ala284Val;VadTípus] heterodimer (lila) is. A kapott térszerkezeteket összehasonlítva a podocin vad-típusú homodimerrel, a fenti sorrendnek megfelelően az attól való eltérésük 2,7 Å, 2,9 Å illetve 3,3 Å (A ábra). Ezzel ellentétben 43/B ábrának



44. ábra: A vad típusú podocin (zöld) Arg229 oldallánca a globuláris fej doménben alakít ki H-híd kölcsönhatást a Glu233 és a Glu237-el vagy az Asp244-el. Az Arg229Gln mutáció (kék) révén a Glu233 és a Glu237 oldalláncokkal elveszti ezt kapcsolatot, emiatt a két aminosav oldallánca átfordul a coiled-coil domén felé, ahol az 288 Arg és Lys289 aminosavakkal alakítanak ki kapcsolatot. Emiatt az új elektrosztatikus kölcsönhatásnak köszönhetően azonban a fej – helikális domén kapcsolat merevvé válik (alsó ábra).

megfelelően az [Ala284Val;Arg229Gln] és az [Ala297Val;Arg229Gln] heterodimerek (piros illetve sárga) és az [Ala284Val;Ala284Val] homodimerek (kék) egészen más, megváltozott topológiájúak. A kapott térszerkezeteket összehasonlítva a podocin vad-típusú homodimerrel, a fenti sorrendnek megfelelően az attól való eltérésük 4,9 Å, 6,9 Å illetve 9,5 Å.

A fehérjelánc gerincének flexibilitása is a fentieknek megfelelő, azaz az Arg229Gln homodimerek illetve az [Arg229Gln; VadTípus] heterodimer esetében közel 30%-al kisebbek a vad típusú homodimerhez képest. A további patogén dimerek, azaz [Ala284V;Arg229Gln] illetve [Ala297V; Arg229Gln] flexibilitása azonban jelentős (140%) eltérést mutat, ami jelzi hogy konformációs állapotuk jelentősen különbözik a vad-típus homodimeréhez képest.



**45. ábra:** A podocin intracelluláris részének (168-383) lehetséges elrendeződési módjai a coiled coil dimerizációt feltételezve. A konjugált Alexa festék pozícióját a csillag jelzi. Az elrendeződések közül a mérési eredmények alapján a C) típusú a valószínű, mivel: 1. A 272-313 fragmens beépített 272Tyr-jai nem adnak jelet a közeli UV tartományban 2. A FRET mérések alapján A) és B) típusú elrendeződés esetében mindegyik vizsgált fragmens esetében kellene jelet kapni 3. D) típus esetében nem kapnánk a távolság nagysága miatt jelet.

## 5. Eredmények megvitatása

### 5.1. Bakteriális expresszió

Rekombináns fehérjék heterológ bakteriális expresszióval történő előállításának és tisztítási módszertanának, folyamatának és alkalmazhatóságának könyvtárnyi méretű szakirodalma van csak az elmúlt évtizedből<sup>5,6,20,27</sup>. Az elvben egyszerű, egymást logikusan követő lépések sora elvezethet a biofizikai vizsgálatokhoz szükséges tisztaságú célfehérje előállításához. A megfelelő baktériumtörzsek kiválasztása, az expressziós vektorok tervezése, a fúziós partnerek kiválasztása, a kromatográfiás módszerek egymásra épülő használata, rutin, kihívásmentes feladatnak tűnhet, ám a gyakorlat sokszor más képet mutat.

Doktori munkám során három különböző jellegű fehérje előállítását oldottam meg. Az első típusba a Triptofán-kalitka szerkezeti motívummal rendelkező minifehérjék tartoznak (**26. ábra**). Az alapmolekula, a TC5b minifehérje (PDB: 1L2Y), mindössze 20 aminosav hosszúságú, mégis harmadlagos szerkezettel rendelkezik, azaz fehérjeként viselkedő molekula<sup>124,125,127</sup>. Kis mérete miatt kiváló modellrendszer a különböző vizsgálati módszerekhez. Kialakítása tervezetten az Exendin-4, 39 aminosavból álló, inzulinszekréciót kiváltó GLP-1 analóg minifehérjéből történt<sup>124,127</sup>. Ezen minifehérjéknek mintegy 42 hosszúságukban és elsődleges szerkezetükben eltérő konstrukcióját készítettem el és állítottam elő sikerrel (**10. táblázat**). Kis méretük (20-39 aminosav-tagszám) révén csak olyan fúziós partnerrel lehet bakteriális úton előállítani őket, amely biztosítja a megfelelő hozamot akár dupla, nem-szelektív izotópjelölés (<sup>15</sup>N / <sup>13</sup>C) esetében is, valamint a fúziós partnerről történő proteolitikus hasítás során a célfehérje elsődleges szerkezete nem módosul.

A második fehérje típusba a három diszulfidhíddal rendelkező, a G-fehérje kapcsolt receptorok B1-es alcsaládjába tartozó GLP-1 receptor extracelluláris doménje tartozik, amelynek mind kristályszerkezete, mind előállításának protokollja elvben ismert volt<sup>70, 72, 82, 83</sup>. A tényleges kísérleti munka során azonban azzal szembesültem, hogy ennek kivitelezése a leírtak szerint nem lehetséges. Számos különböző baktériumtörzset (BL-21, Origami, Shuffle) és fúziós fehérjepartner (Ubikvitin, TrxA, GST, MBP, DsbC) alkalmazását próbáltam ki és kísértem meg, hogy a tervezett NMR-spektroszkópiai vizsgálatokhoz megfelelő tisztaságú, mennyiségű és bioaktív nGLP-1R fehérjét tudjak előállítani.

A harmadik fehérjetípus a különböző, egymáshoz asszociálódó mutációival szteroid rezisztens nefrózist okozó podocin membránfehérje<sup>104,105,106</sup> és citoplazmatikus fragmensei voltak (mintegy 20 eltérő konstrukció), amelyek előállítását, majd tisztítását és biofizikai vizsgálatát sikerrel oldottam meg.

Általában a heterológ bakteriális expresszió során a fúziós partner szerepe többrétű. Kiválasztásának elsődleges szempontja a hozam növelése, a tisztítási folyamat megkönnyítése és a célfehérje szolubilis, aktív formájának előállítása<sup>19, 24</sup>. A Trp-kalitka szerkezeti motívummal rendelkező minifehérjék előállítása során a kisméretű ubikvitin (~8,5 kDa) fúziós partnerfehérje választásának oka elsősorban a célmolekulák kis mérete (2-4 kDa) miatt a hozamnövelésben, a fúziós fehérje és célfehérje tömegarányában keresendő. Alkalmazásának fő előnye, hogy a fúziós partner C-terminálisán a specifikus ubikvitin-hidroláz proteolitikus hasítása nem változtatja meg a Trp-kalitka szerkezeti motívummal rendelkező minifehérje elsődleges szerkezetét.

Ezen minifehérjék előállítási protokollját - a közel 40 sikerrel elkészített variáns esetében - egységes szemléletben optimaltam: a 2-4 mg jelöletlen, 1-3 mg <sup>13</sup>C- és/vagy <sup>15</sup>N-jelölt fehérjét a tápoldat 1 literére vetített mennyisége esetében stabilan és reprodukálható módon tudtam előállítani (**11. táblázat**). Míg az alapmolekula, TC5b, és a hosszabb ún. E\*-minifehérjék kompakt, globuláris téralkattal rendelkeznek, addig a sorozat rövidebb elemei, az E0-E3 minifehérjék nagyfokú rendezetlensége miatt ezek tisztítása jelentős hozam különbséget eredményez.

Doktori munkámban összevettem a bakteriális expresszió és a szilárd fázisú peptidszintézis költségvonzatát, mivel kisebb méretű peptidek (fehérjék) esetében a <sup>15</sup>N és/vagy <sup>13</sup>C izotópjelölés esetében előbbi módszer alternatívát jelent. A rövidebb (10-25 aminosavas) jelöletlen fehérjék esetében a szilárdfázisú peptidszintézis költséghatékonyabb, az ennél nagyobb méretű minifehérjék esetében, illetve ott ahol a natív kémiai ligáció alkalmazása szükséges, a bakteriális expresszió előnyösebb technikának mutatkozott. Doktori dolgozatomban ezt a költségszámítást kitejesztettem a bakteriális expresszió előállítási (tápoldat, izotóp) (**13. táblázat**), és tisztítási költségeire is (**14-15. táblázat**), tekintettel a különböző fúziós rendszerek által meghatározott kromatográfiás módszerekre (**16. táblázat**).

Mind a mintegy 100 aminosav hosszúságú nGLP-1R, mind a hosszabb podocin fehérjék esetében a kiválasztott fúziós fehérjék alkalmazását elsősorban a célfehérje, valamint a fúziós fehérje vízoldhatósága indokolta. A célfehérjék gyenge szolubilitása, illetve az ebből fakadó izolálási és feltekeredési nehézségek indokolták a különböző

fúziós partnerek beépítését és megválasztását, hiszen közvetlenül egyik fehérje sem volt bakteriális expresszióval előállítható.

Az nGLP-1r előállítási protokollja a doktori munka kezdetén ismert volt, továbbá az azt kódoló vektor mellé Steffen Runge is ugyanezt a protokollt<sup>82</sup> adta át számomra. Az ott leírtakat követve az nGLP-1r előállítása csak többszöri próbálkozásra sikerült úgy, hogy nemcsak a célfehérje kódoló szakaszt kellett módosítani (His-tag eltávolítás, domén-határ optimalás), hanem tulajdonképpen a teljes előállítási protokollt is. A fő problémát az jelenti, hogy az nGLP-1r aktivitásához elengedhetetlen a megfelelő diszulfidhíd mintázat – az azokat alkotó 6 cisztein miatt bakteriális rendszerben termelve az nGLP-1r denaturált formában inklúziós testbe kerül. Ezek izolálását követő *in vitro* renaturálási folyamat pedig körülményes és alacsony hatásfokú.

További nehézséget jelentett, hogy a G-fehérje kapcsolt receptorok B1-es alcsaládjába tartozó hasonló előállítási leírások (inklúziós test – *in vitro* renaturáció)<sup>62, 63, 64</sup> alapján a célfehérje termelése 10 literes fermentálással, majd ezt követő preparatív léptékű (~700g sejt pellet) tisztítási lépésekkel és renaturálási folyamattal történt, amelyhez az eszközök nem álltak rendelkezésre (ld. *Előszó*). A hagyományos rázatóban előállított 1 liter LB tápoldatból 5 gramm sejt pelletéből izolált 30-40 mg inklúziós testből előállított redukált nGLP-1r-ből előállított natív diszulfidhíd mintázatú fehérje mennyisége 0,6 mg volt. Problémát okoz azonban a célfehérje instabilitása és spontán bomlása (**15. ábra**). A módszer körülményessége és bizonytalansága miatt más, alternatív utat kellett keresnem, a később tervezett izotópjelölés (<sup>15</sup>N és <sup>13</sup>C) miatt<sup>9</sup>, amelyet a fúziós fehérjék alkalmazása jelentett.

Az nGLP-1r előállítása során általam alkalmazott DsbC és MBP, mint fúziós partner, lehetővé teszi az extracelluláris domén közvetlen szolubilis formájának előállítását. Mindkét fúziós partner esetében azonban ez az első forma szolubilis aggregátum volt, amely bár megkönnyítette, valamint csökkentette a költségét a minták kezelésének, de az ún. renaturálási lépést szükségessé tette. A DsbC esetében az így létrejövő szolubilis aggregátumok renaturálási lépése során, feltehetően a fúziós fehérje aktív diszulfid-izomeráz funkciója miatt, a proteolitikus hasítást követően az nGLP-1r-t nem tudtam izolálni.

---

<sup>9</sup> M9 tápoldatban kevesebb előállítható inklúziós test (~10 mg/ L tápoldat), illetve az izotópok ára (1 literhez szükséges <sup>15</sup>N-NH<sub>4</sub>Cl 5500 HUF, <sup>13</sup>C-Glükóz 55.000 HUF). Grace és munkatársai által publikált eredmények alapján a kettős izotópjelölés elengedhetetlen<sup>62,63,64</sup>.

Ezzel szemben az MBP oldatfázisban tartotta az átmeneti állapotú – (tekintettel az *E. coli* redukív citoplazmájára) redukált állapotú vagy különböző diszulfidhíd mintázattal rendelkező – fúziós fehérjék aggregátumát. Ez a keverék a renaturálás után, a redox környezetnek köszönhetően monomer formába alakítható, éppen a fúziós partner „passzív” chaperone szerepe miatt. Maga a fúziós partner fehérje teszi lehetővé a célfehérje számára a natív térszerkezet kialakulását azáltal, hogy megakadályozza a feltekeredési folyamat során a rosszul feltekeredett térszerkezetű fehérjék kicsapódását és aggregációját.

Megjegyzendő, hogy a helyesen feltekeredett nGLP-1r vízoldható, sőt további két eltérő diszulfidhíd mintázatú formája is stabil, ezek mindegyikét fordított fázisú HPLC-vel sikerült elválasztanom egymástól. Az így előállított célfehérje mennyisége az inklúziós testekből renaturált módszeréhez képest valamivel magasabb (~ 1 mg), ráadásul a kiindulási fúziós fehérjéhez képest a módszer jobb hatásfokú. A módszer nehézségét a többlépéses kromatográfiás tisztítási lépések jelentik, amelyek növelik a veszteséget.

Ezzel szemben a podocin esetében a fúziós partner elsődleges szerepe a natív konformer oldatban tartása. A kialakított intracelluláris podocin fragmensek esetében az MBP fúziós partner megakadályozza a podocin *N*-terminálisánál bekövetkező aggregációt, amely jelenség miatt a célfehérje közvetlenül nem állítható elő. A fúziós partner azonban lehetővé teszi a podocin natív téralkatának, az intracelluláris fragmensének *C*-terminálisán bekövetkező dimerizációját, így e komplex rendszer biofizikai vizsgálata is megvalósíthatóvá vált.

Doktori munkám során sikeresen alkalmaztam és előállítottam oldatfázisban a sejtmentes expresszió módszerével a teljes GLP-1 G-fehérje kapcsolt receptort (**20. ábra**). Ugyanakkor kimutattam, hogy a bakteriális (S30) alapú *cell-free* rendszer nem alkalmas a három diszulfidhidat tartalmazó nGLP-1r aktív formájának előállítására. Bár a teljes receptort *nanodisc*-be ágyazott formában sikerült izolálnom, a kötődésvizsgálatok ebben az esetben sikertelenek voltak.

## 5.2. Exendin-4 analóg minifehérjék biofizikai vizsgálata

A spektroszkópiai mérések kiinduló molekulája az Exendin-4-ből kialakított TC5b volt, amely 20 aminosav hosszú, térszerkezeti stabilitásra optimált Trp-kalitka motívumú fehérje<sup>124, 125</sup>. Ezt a harmadlagos szerkezettel rendelkező, önmagában már globuláris tulajdonságokkal bíró ún. minifehérjét egyfajta *C*-terminális szerkezetstabilizáló „sapkaként” kapcsoltam rá az Exendin-4 *N*-terminális hélikális-

régiójára (1-19. aminosavak), hogy a rendszer egészének mind a vízdékonyságát, mind a térszerkezeti stabilitását fokozni tudjam (**24. ábra**). Így terveztem meg és alakítottam ki az E19, az Exendin-4-hez hasonlóan 39 aminosav hosszúságú minifehérjét. Ennek a módosításnak több, a térszerkezet belső kölcsönhatásait kedvezően érintő hatása volt, amelyeket a közeli- és távoli-UV tartományba eső ECD-spektroszkópiával, homo-, és heteronukleáris-, valamint diffúziós NMR mérésekkel vizsgáltunk. Sikeres spektroszkópiai vizsgálatainkat nemcsak a 39-aminosavas teljes fehérjére, hanem az ennél rövidebb TC5b *N*-terminálisának folyamatos hosszabbításával előállított további fehérjékre (E0-E19) is kiterjesztettük és elvégeztük.

Az ECD mérések (**25. ábra**) és az NMR-adatokból származó CSD analízis (**27. ábra**) eredményeit összevetve, a számolt térszerkezeteket elemezve megállapítottuk, hogy a E19 hélix tartama vizes oldatban nagyobb, mint az az Exendin-4 esetében mérhető. Ennek oka a fehérje *C*-terminálisán levő optimált Trp-kalitka szerkezeti motívum. A Glu28-Arg35 sóhíd növeli a térszerkezet globuláris jellegét és termostabilitását, a hidrofób mag kompaktabbá válik a Glu24Gln mutáció és a Trp-kalitka motívum kialakítása miatt megnövekedett 22Tyr és 25Trp aminosavak aromás oldalláncai közötti  $\pi$ - $\pi$  interakciók miatt. Az EDR fehérje nagyobb helikalitást mutat a kialakított Asp28-Arg35 sóhíd miatt, mint az az eredeti Exendin-4 esetében mérhető (**27. és 30. ábra**), ahol ez a kölcsönhatás hiányzik. Diffúziós NMR méréseink rávilágítottak arra, hogy a H19 az Exendin-4-el ellentétben fiziológias körülmények között jobban ellenáll (**19. táblázat**), az inkretinekre általánosan is jellemző, aggregációnak. Ez utóbbi megfigyelés szintén rávilágít a Trptofán-kalitka térszerkezeti motívum molekula térszerkezetét stabilizáló képességére.

A TC5b-t és E19 közé eső számos lánchosszabbított minifehérje (pl. E0, E1, E2, ...E10, E11) ECD-spektroszkópiai vizsgálata során megállapítottuk, hogy a C-típusú CD bázisspektrum relatív spektrális hozzájárulása nagy, azaz helikális / rendezett téralkatot mutatnak. A legkisebb minifehérje térszerkezetét (TC5b) ugyan destabilizálja annak *N*-terminális aminosavának cseréje az Exendin-4 ugyanezen pozíciójú aminosavára (Asn20Arg mutáció - E0), ám a globulárisan önrendezett téralkat már a peptidlánc hosszabbítása során az 5 aminosavval hosszabb E5 minifehérje esetében „újra” kialakul (+EEEEAV szekvencia). Az ezt követő, folyamatosan hosszabbított variánsok helikális téralkata az E11-es minifehérjéig (31 a.s.) közel egyenletesen nő. Az ennél is hosszabb minifehérjék (E19, EDR, E19\_CC) esetében azonban tovább már nem növekszik a rendezettség a kiroptikai spektroszkópiai adatok szerint. Ezt a megfigyelésünket

támasztotta alá mind a CSD adatok elemzéséből, mind az  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY NMR-spektrumokból nyert távolságadatokat alapján számolt térszerkezetekből levonható következtetések is. Megfigyeltük továbbá, hogy a Glu17 aminosav egy „töréspontnak” tekinthető a minifehérjék helikális részében (**29. ábra**). Ez az aminosav egyfajta összekötő („linker”) szerepet tölt be, összekötve a receptor kötés szempontjából fontos Asn9-Glu16 (*N*-hélix) és Ala18-Glu28 (*C*-hélix) darabokat. Bár az Exendin-4 kristályszerkezetének elemzése alapján a teljes hélix „egybefüggő”  $\alpha$ -hélix jellegű, oldatfázisban több inkretinnek, így a GLP-1-nek megfelelő Exendin-4 és E19 fehérjékben is ez a térszerkezeti monotonitás megtörik. Az így létrejövő két helikális darab közül a *C*-terminális felelős az extracelluláris doménhez kötődésért, ennek segítségével pozicionált az *N*-terminális hélix és a GLP-1 receptor transzmembrán régiójának kölcsönhatása indítja el a receptor intracelluláris oldali transzmembrán régiójának konformációváltását, amely végső soron aktiválja a receptort.

A fent említett minifehérjék közül többet is vizsgáltam *in vitro* bioaktivitás mérésével INS-1 sejtvonalakon, inzulin szekréciós válaszadó-képességük alapján (**32. ábra**). Az irodalmi adatoknak megfelelő aktivitást mértünk az Exendin-4 és a tervezett E19 és EDR minifehérjék esetében is. A TC5b, E5, E10 minifehérjék esetében, nem mértünk inzulin szekréciót, mivel a receptor két-lépéses aktiválásához (*two-domain binding modell*) szükséges *N*-terminális rendezetlen téralkatú szakasz (1-8. aminosavak) hiányzik. A két lépéses aktiválás modelljét megerősíti, hogy az E19\_CC esetében sem tapasztaltam inzulin-szekréciót. A 39 aminosav hosszú E19\_CC fehérje esetében beépített Ala15Cys-Ser39Cys diszulfidhíd kialakításával csökken az *N*-terminális hélix belső mozgékonyága, melyet a CSD-analízis során kapott kémiai eltolódás értékek változása, valamint a számolt térszerkezeti adatok is alátámasztanak. A hélix mobilitásának csökkenése megakadályozza a *C*-terminális hélix pozicionálását, így a molekula nem képes a receptor aktiválására.

### **5.3. A podocin dimerizációjának biofizikai vizsgálata**

Jelenleg a 383 aminosav hosszú podocin membránfehérjéről nem áll rendelkezésre atomi felbontású térszerkezet, így a szteroid rezisztens nefrózis (SNRS) kialakításáért felelős fehérje térszerkezet-funkció összefüggések felderítéséhez homológia modellezést követő *in silico* molekuláris modell építésére volt szükségünk (**33., 43. és 44. ábra**). A másodlagos fehérje szerkezet analízisével megállapítottuk, hogy a podocin membránhorgonyának *C*-terminálisát követő globuláris, ún. SPFH doménjét



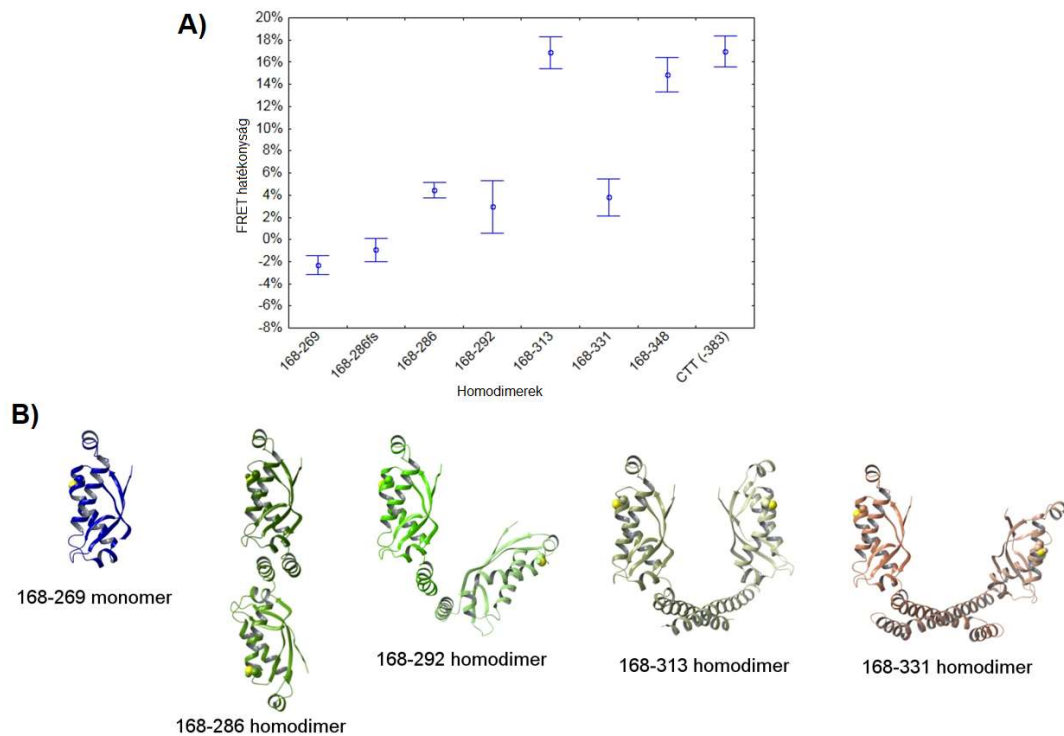
(124-282) egy három helikális szegmensre tagolódó ún. CTT domén (Hélix1: 283-313; Hélix2: 317-331; Hélix3: 340-355), valamint egy rendezetlen régió (356-383) követi (**34. ábra**). Az SRNS-t okozó egyik mutáció (Arg229Gln) ez alapján az SPFH-domént érinti, míg az ehhez asszociálódó miszensz mutációk (pl. Ala284Val, Ala297Val) az exon-7 illetve -8 által kódolt Hélix1 szakaszt érinti. Utóbbi régióknak megfelelő szekvencia szakaszt más, ugyanebbe a családba tartozó fehérjék esetén (pl. Sztomatin, SLP-1; -2; -3) *coiled coil* szerkezeti elemként azonosítottuk bioinformatikai predikciók alkalmazásával.

A podocin monomer molekuláris modelljét a *P. horikoshii* sztomatin kristályszerkezete alapján építettük fel. Az SPFH domén esetében teljes mértékben erre a szerkezetre támaszkodtunk (47%-os homológia). A 3BK6 PDB azonosítójú szerkezet C-terminálisán levő helikális régió helyett, a CC+ adatbázisban szereplő 1VP7 PDB kódú *coiled coil* szerkezetű fehérjének megfelelően építettük fel a Hélix1 domént, amelyet a dimerizációért felelős, *coiled coil* szerkezetet alkotó régióknak feltételeztünk. Ezt követően alakítottuk ki a homo- és megfelelő heterodimereket (vad típus, Arg229Gln, Ala284Val, Ala297Val, Val290Met mutánsok), majd a fiziológias körülményeknek megfelelő MD számolások alapján átlagszerkezeteket állítottunk elő.

A molekuladinamikai eredményekből megállapítottam, hogy a vad típusú monomer podocinban a 229-es arginin oldallánca, a globuláris „fej” doménben legalább két hidrogén híddal van stabilizálva (Glu233/Glu237, Asp244). Az SRNS betegek körében gyakori Arg229Gln polimorf mutáció miatt a Glu233 és a Glu237 aminosavakkal kialakított kölcsönhatás megszűnik, a két glutaminsav oldallánc átfordul a Hélix1 domén felé és kölcsönhatást alakít ki az Arg288 és Lys289 aminosavakkal (**44. ábra**). A kialakuló új elektrosztatikus kölcsönhatások révén a globuláris fej – Hélix1 domén flexibilis kapcsolat merevvé válik, a vad típusú molekulához képest ( $b\text{-faktor}_{\text{peptidgerinc}}: 0,40 - 2,6 \text{ \AA} - \text{középérték } 1,37 \text{ \AA} - \text{rmsd } 1,46 \text{ \AA}$ ) a peptidgerinc mozgékonyasága ( $b\text{-faktora}$ ) az rmsd érték alapján  $0,69 \text{ \AA}$ -re csökken ( $b\text{-faktor}_{\text{peptidgerinc}}: 0,23 \text{ \AA} - 1,06 \text{ \AA} - \text{középérték } 0,54 \text{ \AA}$ ). Ez a változás a vad típusú homodimer, illetve bizonyos (Val290Met) mutánsok térszerkezetét / topológiáját nem változtatja meg. Azonban a Hélix1 domént érintő miszensz mutációk esetében (Ala284Val, Ala297Val) a heterodimerek topológiája jelentősen sérül. Ez a térszerkezeti változás alátámasztja azt, hogy az Arg229Gln mutáció megváltozott módú dimerizációt okoz, ami révén feltételezhető az Arg229Gln és további miszensz mutánsokból felépülő heterodimer komplexek visszatartása (retenciója) a citoplazmában.

Molekuláris modellünk feltételezése, hogy a podocin intracelluláris részének dimerizációs helye a 272-313 régió (Hélix1 domén). A homológ SPFH családba tartozó fehérjék esetében ezt a régiót korábban *coiled coil* doménként azonosították. A *coiled coil* térszerkezet egyfajta dimerizációs szerkezeti elemként is felfogható, hiszen két, egymáshoz hidrofób varrattal összekapcsolódó helikális régióról van szó. A predikciók azonban a podocin ezen szakasza esetében, a teljes molekulára nézve a legnagyobb értékkel, csak 20%-os valószínűséggel jósoltak *coiled coil* régiót (**36/C és 36/D. ábra**).

Bakterális expresszió során sikeresen előállított podocin 272-313 fragmensek ECD-spektrumai alapján megállapítottam, hogy hidegen és szobahőmérsékleten (5-25 °C) a vad típusra és az Ala284Val és Ala297Val mutánsokra a helikális CD-spektrum a jellemző (**37. ábra**). Itt a 222/208 hullámhosszokon mért moláris ellipticitás értékek aránya megfeleltethető a *coiled coil* régiókra általában jellemző ~1 értékkel. A hőmérséklet emelésével (25-85 °C) a fehérje fragmensek rendezetlen térszerkezetűvé válnak. 5 °C-ra visszahűtve a rendszert, az eredeti helikális téralkatukat ismét felveszik, azaz a (széttekeredett, rendezetlen szerkezetű) monomerek *coiled coil* dimerré alakulnak (rendezett szerkezet). A mutációk (Ala284Val, Ala297Val) esetében ez a rendezett – rendezetlen térszerkezeti átalakulás a vad-típushoz képest alacsonyabb hőmérsékleten



**46. ábra:** A) A különböző podocin fragmensek homodimereinek FRET hatékonysága. B) A podocin fragmens homodimerek feltételezett térszerkezete, amely alapján magyarázható a 168-286 esetében a méretkizárásos kromatográfia, a 168-331 esetében a FRET-mérés eredménye.

megy végbe (**38. ábra**). Ez a megfigyelés alátámasztja ezen mutációk *coiled coil* téralkatot destabilizáló hatását a hidrofób oldalláncuk hosszának növelésével. Ez a destabilizáló hatás párosulva az Arg229Gln mutációval megmagyarázza az MD-számítások során kapott heterodimerek „sérült” térszerkezetét.

A bakteriális expresszió során az intracelluláris podocin fragmenseket (**8. táblázat**) csak a maltóz-kötő fehérjével fuzionáltatva sikerült előállítanom a doménhatár-optimalizációs kísérleteim ellenére. Mivel a proteolitikus hasítást követően a podocin fragmensek szinte pillanatszerűen kicsapódtak, a fehérje intracelluláris részének atomi felbontású térszerkezet-meghatározást el kellett vetnünk. Mivel az MBP monomer nem tartalmaz az Alexa festék konjugálásához szükséges ciszteineket, így a teljes intracelluláris podocin dimerizációért felelős régióját *in vitro* FRET vizsgálattal terveztük kimutatni.

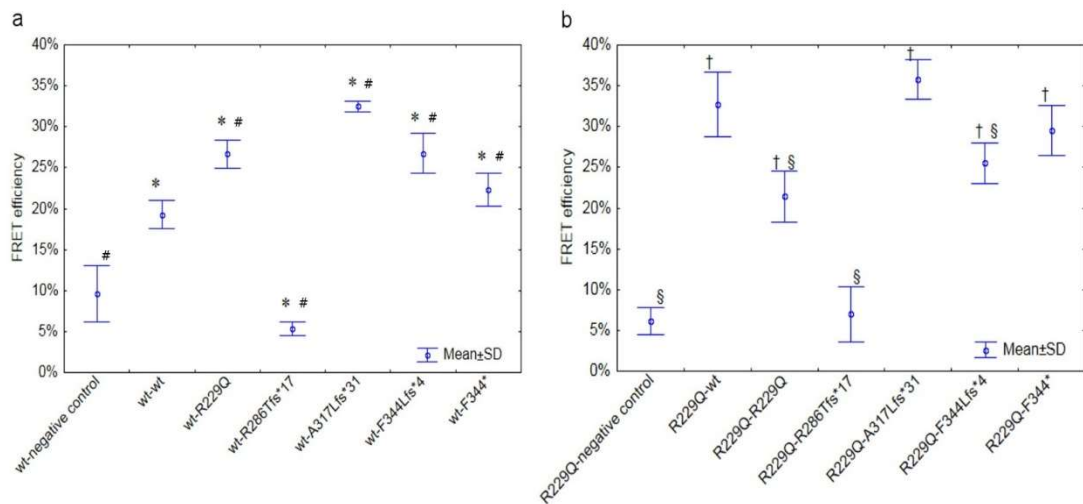
A fragmensek FRET-analízise során a MBP-Podocin(168-269; -286; -286Tfs; -292; -313; -313; -348; -383) fúziós fehérjék esetében kísérleti adatokkal szeretnénk volna alátámasztani azt a feltételezésünket, hogy a podocin dimerizációjáért a CTT doménen belül egy meghatározott régió a felelős. Amennyiben mindegyik vizsgált esetben méretkizárásos kromatográfiával dimer formát kapunk és FRET jelet mérünk, akkor számolnunk kell a citoplazmatikus domén *N*-terminálisának dimerizációjával is. A méréseket vad típusú heterodimerekkel végeztük, ahol a teljes intracelluláris domént tartalmazó MBP-Podocin(168-383) kölcsönhatását mutattuk ki a különböző hosszúságú fragmensekkel **40. és 46. ábra**).

Eredményeink azt mutatják, hogy a MBP-Podocin(168-269), és a MBP-Podocin(168-286Tfs) forma monomer formában van jelen, ezzel összhangban nem is mértem FRET-jelet. Ezzel szemben az MBP-Podocin(168-286) méretkizárásos kromatográfia alapján homodimert képez, azonban csak alacsony hatásfokú FRET-jelet mértem a teljes hosszúságú MBP-Podocin(168-383)-nal szemben.

A további MBP-Podocin fragmensek (168-292; -313; -331; 348; -383) a gélszűrési kromatográfia adatai szerint homodimer formát vesznek fel. E fragmensek közül az MBP-Podocin(168-292; -313; -348; -383) a teljes hosszúságú fragmenssel szemben FRET jelet ad. Ennek mértéke az MBP-Podocin(168-383) homodimer esetében megfelel az emlős sejtes expresszióval előállított natív podocin(1-383) esetében mért értékekkel (Balogh Eszter eredménye, **47. ábra**). Az MBP-Podocin(168-313) heterodimerének FRET-jelének hatékonysága már eléri a MBP-Podocin(168-383) esetében mért értékeket. Különös módon az MBP-Podocin(168-331) FRET jele alacsony,

az MBP-Podocin(168-348) esetében mért érték viszont már megfeleltethető a Hélix1-et illetve a teljes hosszúságú homodimer esetében mért értékekkel.

A fenti eredmények alapján megállapítható, hogy a podocin C-terminálisának dimerizációjáért a Hélix1(286-313) és a Hélix3(332-348) régiók felelősek. Az MBP-Podocin(168-331) esetében mért alacsony FRET-jel feltételezhetően a Hélix2 régió távtartó funkciója miatt alakul ki. A hosszabb fragmensek esetében a méretkizárásos



**47. ábra:** Emlős sejtes expresszióból származó podocin minták FRET-méréseinek eredményei (Balogh Eszter és Mikó Eszter eredményei). Látható, hogy a WT-WT homodimer FRET hatásfoka alacsonyabb, mint a WT-R229 esetében mért eredmény, továbbá, hogy a WT-WT hatásfoka megfeleltethető a bakteriális úton előállított megfeleltethető MBP-Podocin(168-383) esetében mért értékkel (46/A ábra).

kromatográfia alapján megjelenik a nagyobb oligomer forma (650kDa) és a dimer csúcsintenzitása csökken. Ezek a megfigyelések azonban nem feltétlenül jelentik a magasabb rendű oligomer formák megjelenését, lehet ugyanis ezek csupán melléktermékek.

Összefoglalva tehát sikerült kísérleti adatokkal bizonyítani, hogy valóban a molekuláris modellünk alapját képező 272-313 aminosavak közötti régió felelős a podocin dimerizációjáért. Méréseink alapján megállapítható, hogy a dimerizáció *in vitro* is megtörténik, nem szükséges hozzá az *in vivo* lipid-raft asszociáció, az emlős és bakteriális eredetű minták eredményei összeegyeztethetőek egymással. Kimutattuk továbbá a dimerizációért felelős régiókat (Hélix1 és Hélix3) a CTT-doménen belül. Az MBP-Podocin(168-286Tfs) esetében kimutatott monomer forma alátámasztja azt az új feltételezést, amely szerint a podocin dimerizációja nem feltétlenül szükséges funkciójának betöltéséhez. A podocin-nefrin kölcsönhatás ugyanis ebben az esetben is kialakul, sérült homo- vagy heterodimer podocinok esetén ezzel ellentétben nem alakul

ki a dimerizáció képességének elvesztése miatt, a frameshift mutációt hordozók esetében a betegség csak jóval 14 éves koruk után alakul ki.

Ezen felül kísérleti adatokkal alátámasztottuk, hogy, amely CD méréseink alapján nagyfokú helikalitást mutat, amely jelenség utalhat a *coiled coil* térszerkezeti elem meglétére / kialakulására. Indirekt bizonyítékok (CD, FRET) alapján azt is meg tudtam állapítani, hogy a *coiled coil*-t alkotó hélixek antiparalel irányúak, ami alátámasztja a molekuláris modellünk helyességét.

## Összefoglalás

A különböző fehérjék előállítása céljából a heterológ bakteriális expresszió robosztus, könnyen kezelhető rendszer. Ez a biotechnológiai eljárás, kiegészítve a fúziós fehérjék eszköztárával, lehetővé teszi egy-egy célfehérje nagy mennyiség történő előállítását biofizikai és szerkezetvizsgálati célokra. Doktori munkám során a II-es típusú cukorbetegség, illetve a szteroid-rezisztens nefrózissal szoros összefüggésben levő, három különböző jellegű fehérje előállítását és vizsgálatát végeztem el.

A G-fehérje kapcsolt receptorok B1-es alcsaládjába tartozó GLP-1 receptor peptidligandumával (GLP-1) analóg Exendin-4 agonistaként képes a receptorhoz kötődve vércukorszinttől független inzulinszekréción kiváltani. Azonban az inkretin peptidhormonokra jellemző alacsony felezési idő és aggregálódási hajlam miatt szükségesnek láttuk további olyan analógok tervezését és előállítását, melyek tágabb pH és hőmérsékleti tartományban is képesek megőrizni a bioaktivitáshoz szükséges térszerkezetüket, illetve monomer formájukat.

Kiindulópontként az Exendin-4-ből kialakított, harmadlagos térszerkezettel rendelkező triptofán-kalitka szerkezeti motívummal rendelkező minifehérjét (TC5b) használtam fel. *N*-terminálisához a receptor aktiválásához szükséges helikális szerkezetű polipeptid részt (Exendin-4\_1-19) konjugálva alakítottam ki az E19 minifehérjét. Az Glu28Asp mutációval (EDR) a 28-as és 35-ös pozíciójú aminosavak által kialakított sóhid hatását, az Ala18Cys-Ser39Cys mutációkkal, azaz egy diszulfidhíddal, rendelkező E19\_CC kialakításával a molekula C-terminálisán levő Trp-kalitka kompakttá tételével terveztem vizsgálni a molekulák térszerkezeti és bioaktivitásának összefüggéseit. Az NMR- és CD-spektroszkópiai adatok alapján megállapítottuk, hogy a konjugált *N*-terminális hélixnek (1-19) nagy szerepe van a Trp-kalitka térszerkezeti elem megőrzésében, és termostabilizálásában. Megállapítottam továbbá, hogy a diszulfidhíd beépítésével bár a molekula C-terminális globuláris doménje a legnagyobb fokú kompaktságot mutatja, az emiatt bekövetkező mozgékonyág-csökkenés a molekula helikális részén drasztikusan csökkenti a bioaktivitást, feltehetően a receptor két-lépéses aktiválási mechanizmusának sérülése miatt. Megállapítottam továbbá, hogy az általam tervezett E19 és EDR minifehérjék az Exendin-4-hez képest kisebb aggregációs hajlammal rendelkeznek, amely nagyobb inzulinszekréciónal hatással párosul.

A tervezett spektroszkópiai kötődésvizsgálathoz szükséges natív diszulfidhíd-mintázattal rendelkező GLP-1 receptor extracelluláris doménjének előállítását a publikált

protokoll alapján nem sikerült tisztított formában előállítanom. Az inklúziós testként történő izolálást követően az nGLP-1r renaturációja, azaz a megfelelő diszulfidhíd mintázatú forma *in vitro* redox rendszerben történő kialakítása, alacsony hatásfokú. Különböző fúziós partnerek és expressziós rendszerek szerepét és hatását vizsgáltam meg annak megfelelő renaturációja érdekében. A fehérjét ezen az úton már sikerrel előállítottam, azonban azt is megállapítottam, hogy 3 különböző diszulfidhíd-mintázatú forma keveréke / egyensúlya jellemzi azt oldatban.

A szteroid-rezisztens nefrózist okozó podocin mutációk a fehérje és a dimerek térszerkezetére, topológiájára gyakorolt hatását atomi felbontású szerkezet hiányában *in silico* módszerekkel és spektroszkópai módszerekkel vizsgáltam. A molekulamodellezéssel felépített vad típusú és mutáns homo- és heterodimerek molekulamodellezése és dinamikai vizsgálatai során megállapítottam, hogy a betegséget okozó Arg229Gln polimorf mutáció fő hatása a helikális domén mozgékonyságának csökkenése, a misszensz mutációké pedig a dimerizációs régióban bekövetkező hidrofób kölcsönhatás gyengülése. Ezek együttesen vezetnek a letális hatású podocin dimerek kialakulásához.

A podocin helikális doménének CD-spektroszkópai vizsgálata során, kiegészítve NMR, FRET és méretkizárásos kromatográfia eredményekkel, kísérleti eredményekkel is igazoltam, hogy a podocin 272-313 régiója dimer, antiparallel *coiled coil* térszerkezeti elemet alkot, illetve hogy a misszensz mutációk a két helikális szál közötti kölcsönhatást gyengítik. A helikális régió dimerizálódásért felelős szerepét és a régióit az intracelluláris domén fragmenseinek *in vivo* FRET kölcsönhatás-vizsgálata során igazoltam.

## **Summary**

The production of different proteins using a heterologous bacterial expression system is a robust, easy-to-use method. This biotechnological process, supplemented with advantages of the fusion proteins, allows the production of a target protein in large amounts, suitable for biophysical and structural studies. During my doctoral work, I solved and optimized the production of three types of proteins closely related to type II diabetes and steroid-resistant nephrosis, then investigated their biophysical properties.

Exendin-4, an analogue of the GLP-1, the ligand of the B1 G-protein coupled receptors subfamily member GLP-1R, is responsible for activating the glucose independent insulin secretion pathway. However, due to its short half-life and high aggregation tendency under physiological conditions, we considered to design additional Exendin-4 analogs, which are capable of preserving their structure and monomeric bioactive form in a broader pH and temperature range.

As a starting point, the smallest miniprotein (TC5b) was conjugated with the N-terminal fragment of Exendin-4 (Exendin-4\_1-19) to preserve the tertiary structure of the TC5b and its receptor activating properties (E19 miniprotein). In the case of EDR miniprotein a new salt bridge was introduced via the designed Glu28Asp and Ala35Arg mutations. In the E19\_CC variant, a disulfide bridge was evolved by the Ala18Cys-Ser39Cys mutations, to decrease the flexibility of the N-terminal helix and make the tryptophan cage motif more compact.

It was found, based on the NMR and ECD spectroscopic data, that the conjugated N-terminal helix (1-19) plays a major role in the conservation and thermostability of the tryptophan cage structure. It was also confirmed that the designed disulfide bridge (E19\_CC) decreases the mobility of the N-terminal helical part and shows the highest degree of compactness, increasing its thermal stability. However these structural modifications drastically reduced its bioactivity. On the other hand, diffusion NMR data revealed that the E19 and EDR miniproteins show lower aggregation tendencies than Exendin-4, coupled with a higher insulin secretion effect.

The production of the extracellular domain of the GLP-1 receptor (GLP-1R) with the native disulfide pattern - required for the proposed spectroscopic binding assay - was unsuccessful by following the published protocol. After isolation of the protein in an inclusion body, the refolding of native GLP-1R, using a redox system was inefficient. The effect and impact of various fusion protein partners were studied for achieve the



proper refolded state of native nGLP-1r. The protein was successfully produced using Maltose Binding Protein as a fusion protein, but it was also found that the soluble form is a mixture of 3 different disulfide-patterned conformers and unfortunately the native conformer is self-cleavable, thus unstable.

The effect of pathogenic podocin mutations on the structure of the protein was investigated using *in silico* methods, such as homology modelling, molecular dynamics simulations, and also by spectroscopic methods. Homology modelling was carried out using the structure of stomatin (~53% sequence homology). Molecular dynamics simulations revealed, that the polymorphic Arg229Gln mutation decreases the flexibility between the cytoplasmatic globular and helical domain. The associated disease-causing mutations in the helical domain lead to the formation of distorted dimer and oligomer structures. These findings provide a model for understanding the structural details of the patho-mechanism of the studied mutations.

With CD spectroscopic examination of the helical segment of podocin, complemented by NMR, FRET and size exclusion chromatographic measurements of various constructs, the *in silico* results were proved. We found, that the 272-313 region of podocin has a central role in the dimerization of podocin. We showed that it forms an antiparallel coiled coil like structure, and that the associated missense mutations weaken the hydrophobic interaction between the two helical fibers. The dimerization regions at the C-terminal part of the protein were also verified with *in vitro* FRET interaction assay of intracellular domain fragments.

## Függelék

F1. táblázat: NPHS2 gén allélgyakoriságai

	Mutáció	Paciensek [Arg229Gln];[mut]		Paciensek [mut];[mut]		p
		Allél gyakoriság	% (n=71)	Allél gyakoriság	% (n=498)	
<b>exons 1-6</b>	p.Lys126Ilefs*7	1	1,4%	0		0.12
	p.Arg138Gln <sup>a</sup>	5	7,0%	171	34,3%	9.0E-06
	p.Gln215*	1	1,4%	6	1,2%	1
	p.Arg238Ser <sup>a</sup>	1	1,4%	3	0,6%	0.41
	all the other mutations in exons 1-6 (n=53 types) <sup>b</sup>	0		245	49,2%	1.7E-19
<b>exon 7</b>	p.Val268Asp*16	0		2	0,4%	1
	p.Leu270Phe	1	1,4%	0		0.12
	p.Pro271Leu	0		1	0,2%	1
	p.His276Leu	0		2	0,4%	1
	p.His276Alafs*8	0		2	0,4%	1
	p.Glu281Ala	0		2	0,4%	1
	<b>p.Ala284Val</b>	<b>26</b>	<b>36,6%</b>	<b>8<sup>c</sup></b>	<b>1,6%</b>	<b>2.7E-19</b>
	p.Arg286Thrfs*17	3	4,2%	20	4,0%	1
	p.Ala288Thr	4	5,6%	0		0.0002
	p.Lys289*	0		2	0,4%	1
	<b>p.Val290Met</b>	<b>0</b>		<b>13</b>	<b>2,6%</b>	<b>0.38</b>
	p.Arg291Trp	4	5,6%	1	0,2%	0.001
	c.873+2T>A	0		1	0,2%	1
c.873+5G>A	0		2	0,4%	1	
<b>exon 8</b>	c.874-1G>C	0		2	0,4%	1
	p.Ala295Thr	1	1,4%	0		0.12
	<b>p.Ala297Val</b>	<b>4</b>	<b>5,6%</b>	<b>0</b>		<b>0.0002</b>
	p.Ala300Pro	1	1,4%	0		0.12
	p.Ala301del	0		4	0,8%	1
	p.Leu305Pro	1	1,4%	0		0.12
	p.Glu310Ala	1	1,4%	0		0.12
	p.Glu310Lys	5	7,0%	0		0.00002
	p.Glu310Val	2	2,8%	0		0.015
	p.Glu310 total					4.1E-8
	p.Ala317Leufs*31	1	1,4%	7	1,4%	1.0
	p.Leu321Phefs*27	1	1,4%	0		0.12
	p.Arg322Gly	1	1,4%	2	0,4%	0.33
	p.Leu324GludelinsHis	0		1	0,2%	1
	p.Leu327Phe	3	4,2%	0		0.002
	p.Gln328Arg	2	2,8%	0		0.015
	p.Phe344Leufs*4	1	1,4%	0		0.12
p.Leu346Tyrfs*2	1	1,4%	0		0.12	
p.Pro372Ilefs*16	0		1	0,2%	1	
<b>Total:</b>		71	100%	498	100%	

**F2. táblázat:** Cell-free reakció összetevőinek listája

Összetevő neve	Rövidítés	Gyártó	Katalógusszám
Acetyl Phosphate (litium potassium salt)	AcP	Fluka	1409
Adenosine-5'triphosphate (disodium salt)	ATP	Roche	127523
Bond-Breaker TCEP Solution, neutral pH	TCEP	Pierce	77720
Complete (EDTA free)	Complete	Roche	11873580001
Cytidine-5'triphosphate (disodium salt)	CTP	Fluka	30320
Folsav	FA	Sigma	F-7878
Guanosine-5'triphosphate (disodium salt)	GTP	Fluka	51120
Posphoenolpyruvic acid (monopotassium salt)	PEP	Applichem	A2271,0005
Polyethylenglycol 8000	PEG8000	Sigma	P-4463
Pyruvate Kinase (from rabbit muscle)	PK	Roche	109045
SUPERase Inhibitor	RNAasin	Ambion	AM2696
tRNA <i>E. coli</i>	tRNA	Roche	109550
Uridine-5'triphosphate (trisodium salt)	UTP	Fluka	94370
20 L-amino acids	AA	Fluka	LAA21

**F3. táblázat:** Cell-free reakció törzsadatainak összetétele

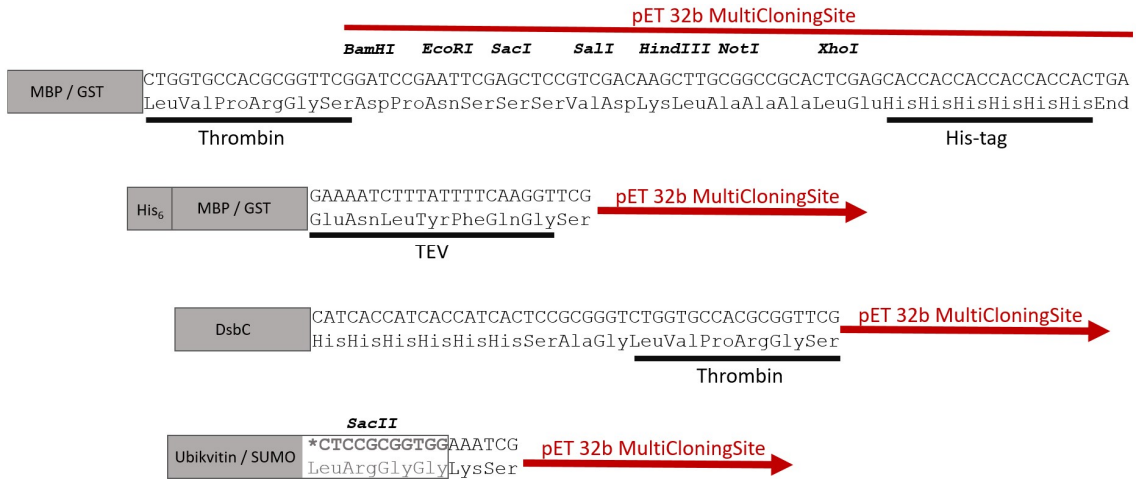
Összetevő neve	Törzsoldat koncentráció	Mw	Törzsoldat végtérfogat	Bemérendő összetevő	Megjegyzések
tRNS	40 mg/ml		1 ml	40 mg	
AcP	1 M	184,1	1 ml	184 mg	pH 7 (+10 µl 10M KOH)
PEP	1 M	206,1	1 ml	206 mg	pH 7 (+235 µl 10M KOH)
PK	10mg /ml				
ATP	360 mM	605,2	1 ml	218 mg	pH 7 (+117 µl 5M KOH)
GTP	240 nM	567,1	1 ml	136 mg	pH 7 (+36 µl 5M KOH)
CTP	240 nM	527,1	1 ml	127 mg	pH 7 (+72 µl 5M KOH)
UTP	240 nM	550,1	1 ml	132 mg	pH = (+33 µl 5M KOH)
NTP-mix	75x		4 ml		nukleotidok egyenlő térfogatokban
FA	10 mg/ml	511,5	1 ml	10 mg	
HEPES-KOH	2,5 M	238,3	10 ml	5,958 mg	pH 8 (+1350 µl 10M KOH)
Mg(oAc)2	2M	214,4	10 ml	4,288 mg	Filterszűrés 0,22µm
KoAc	4 M	98,13	10 ml	3,925 mg	Filterszűrés 0,22µm
PEG 8000	40%		10 ml	4,000 mg	
NaN3	10%	65,91	1 ml	100 mg	
Complete	50x		1 ml	1 tablettá	
Aminosav kiv. Tyr	100 mM		15 ml		Minden aminosav vízben oldva, kivéve Trp 100 mM pH 8 HEPES puffer
Tirozin	20 mM			181,2 mg	
Aminosav mix	4 mM		50ml		2 ml törzsoldatokból
Plusz aminosavak	16,7 mM		24 ml		4 ml az aminosav törzsoldatokból: RCWMDE

**F4. táblázat:** Az S30 extraktum elkészítéséhez szükséges törzsoldatok, pufferek.

<b>x40 S30 A/B (Törzs)</b> 40m0M Tris-acetát, pH 8,2	<b>x1 S30A (washing buffer)</b> +6 mM b- merkaptóctanol	<b>x40 S30C (Törzs)</b> 400mM Tris-acetát	<b>x1 S30C (dialízis puffer)</b> +0,5mM DTT
<b>560mM Mg(OAc)2</b> <b>2,4M KCl</b>	x1 S30B (lízis puffer) +1mM DTT +1mM PMSF	560mM Mg(OAc)2 2,4M KOAc	

**F5. táblázat:** Különböző cégek által forgalmazott vegyszerek nettó árai (2017)

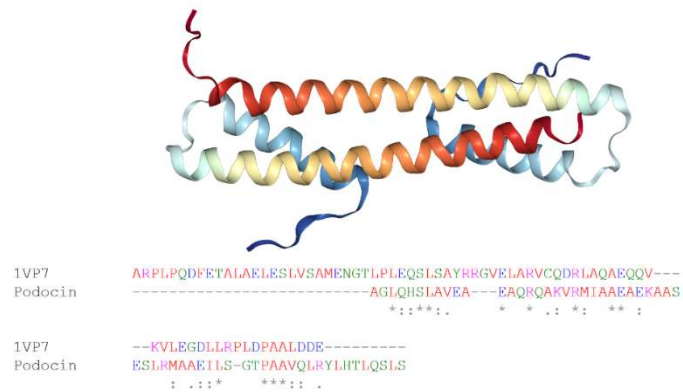
	VWR			Roth			MOLAR			ÁTLAG
	g	HUF	g/HUF	g	HUF	g/HUF	g	HUF	g/HUF	g/HUF
Tripton	500	10200	20,40	500	25963	51,93	500	9800	19,60	30,64
Élesztő	500	7140	14,28	500	22630	45,26	500	7450	14,90	24,81
NaCl	1000	4290	4,29	1000	5177	5,18	1000	890	0,89	3,45
Agar	500	13700	27,40	500	18290	36,58	1000	25000	25,00	29,66
K2HPO4	500	22500	45,00	1000	9706	9,71	500	13440	26,88	27,20
KH2Po4	1000	9690	9,69	1000	9610	9,61	1000	3500	3,50	7,60
KCl	1000	16800	16,80	1000	724	0,72	1000	1500	1,50	6,34
Na-azid	100	8720	87,20	100	6634	66,34	100	6732	67,32	73,62
NaH2PO4	1000	19700	19,70	500	4743	9,49	1000	1950	1,95	10,38
Na2HPO4	1000	23900	23,90	500	684	1,37	1000	1910	1,91	9,06
SDS	100	21600	216,00	100	11176	111,76	1000	2400	2,40	110,05
NaOH	1000	18800	18,80	500	4511	9,02	1000	1200	1,20	9,67
Tris	500	22000	44,00	500	8835	17,67	1000	12950	12,95	24,87
HCl	1000	1105	1,11	1000	1400	1,40	1000	870	0,87	1,13
Na-EDTA	500	14500	29,00	100	6169	61,69	1000	2200	2,20	30,96
Maltose	100	8260	82,60	100	6572	65,72	100	9530	95,30	81,21
GSH	50	85100	1702,00	25	27187	1087,48	25	29952	1198,08	1329,19
Glicerín	1000	7680	7,68	1000	4200	4,20	1000	10752	10,75	7,54
Glicin	1000	21900	21,90	1000	6700	6,70	1000	6500	6,50	11,70
Ampicillin	25	45500	1820,00	10	24614	2461,40	10	28740	2874,00	2385,13
Kanamycin	25	244000	9760,00	10	35030	3503,00	10	42670	4267,00	5843,33
Imidazol	1000	35600	35,60	1000	27296	27,30	1000	18900	18,90	27,27
IPTG	100	86500	865,00	50	144770	2895,40	50	128640	2572,80	2111,07
Glükóz	1000	8390	8,39	1000	6325	6,33	1000	1870	1,87	5,53



**F1. ábra:** p32FUS vektorcsalád MCS régiójának sematikus ábrája



**F2. ábra:** Podocin R286Tfs variáns C-terminálisának elsődleges szekvenciája



**F3. ábra:** Podocin Hélix1 doménének és a kiinduló szerkezetének (1VP7) szekvenciaillesztése

# Alkalmazott táptalajok, pufferek összetétele:

## Tápadatok

*2YT táptalaj (1 l):* 10 g Élesztő kivonat, 16 g Tripton, 5g NaCl, pH 7,5

*LB médium (1 l):* 5 g Élesztő kivonat, 12 g Tripton, 10 g NaCl, pH 7,5

*Minimál táptalaj (1 l):* 970ml H<sub>2</sub>O ban feloldunk 1 g 15NH<sub>4</sub>Cl-t. Sterilizálás után hozzáadjuk a következőket:

- 25 ml 10x minimál oldat (1l: 68 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 30 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 g NaCl)
- 250 µl 1 M MgSO<sub>4</sub> (filtersterilizett)
- 1000 µl antibiotikum (filtersterilizett)
- 3,25 ml 30%-os cukor (filtersterilizett - 13C forrás lehet)
- 125µl CaCl<sub>2</sub> (filtersterilizett)

## Pufferek:

### Ni-IMAC

*Natív Feltáró puffer:* 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 0,5 mM Na-azid, pH 7,8

*Natív Elúciós puffer:* 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 0,5 mM Na-azid, 250 mM imidazol, pH 7,8

*Tris-IMAC puffer:* 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol, 0,5 mM Na-azid, pH 7,6

*Tris-IMAC Elúciós puffer:* 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 250 mM imidazol, 0,5 mM Na-azid, pH 7,6

### GST-kromatográfia:

*PBS:* 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

*GST Elúciós puffer:* 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM DTT, 20 mM GSH, pH 8

### Amilóz-kromatográfia

*MBP Binding puffer:* 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM Na-EDTA, pH 7,6

*MBP Elúciós puffer:* 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1mM Na-EDTA, 20 mM Maltóz, pH 7,6

### További pufferek:

*Podocin Tris puffer:* 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,6

*Thrombin emésztési puffer:* 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,8

*Q-IEX A-puffer:* 25 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 7,6

*Q-IEX B-puffer:* 25 mM Tris, 1000 mM NaCl, pH 7,6

### Inklúziós Test izoláló pufferrendszer

*IB1-puffer (sejtek felvétele):* 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol, 0,5 mM Na-azid, pH 7,6

*IB2-puffer (csapadék felvétele):* IB1 + 1% Triton-X 100

*IB3-puffer (csapadék felvétele):* 50 mM Tris, 200 mM NaCl, 20 mM imidazol, 0,5 mM Na-azid, pH 7,6

### Refold puffer

*Fúziós partner esetében:* 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1mM GSSG, 10 mM GSH, 10 mM Na-EDTA, pH 8,5

*Fúziós partner nélkül:* 50 mM Tris, 1000 mM L-Arg, 150 mM NaCl, 1mM GSSG, 10 mM GSH, 10 mM Na-EDTA, pH 8,5

# Előállított fehérje szekvenciák és adataik

## 1. GLP-1R (Uniprot P43220)

10 20 30 40 50 60  
MAGAPGPLRL ALLLLGMVGR AGPRPQGATV SLWETVQKWR EYRRQCQRSL TEDPPPATDL  
70 80 90 100 110 120  
FCNRTFDEYA CWPDGEPSF VNVSCPWYLP WASSVPQGHV YRFCTAEGWL LQKDNSSLPW  
130 140 150 160 170 180  
RDLSECEESK RGERSSPEEQ LLFLYIIYTV GYALSFSALV IASAILLGFR HLHCTRNYIH  
190 200 210 220 230 240  
LNLFASFILR ALSVFIKDAAL KWMYSTAAQ QHQWDGLLSY QDSLSCRLVF LLMQYCVAAN  
250 260 270 280 290 300  
YYWLLVEGVY LYTLAFAVSL SEQWIFRLYV SIGWGVPLLF VVPWGIVKYL YEDEGCWTRN  
310 320 330 340 350 360  
SNMNYWLIIR LPILFAIGVN FLIFVRVICI VVSKLKANLM CKTDIKCRLA KSTLTLIPLL  
370 380 390 400 410 420  
GTHEVIFAFV MDEHARGTLR FIKLFTLSF TSFQGLMVAI LYCFVNNEVQ LEFRKSWERW  
430 440 450 460  
RLEHLHIQRD SSMKPLKCPT SSLSSGATAG SSMYTATCQA SCS

Szignálszekvencia, Extracelluláris domén

## Kialakított nGLP-1r konstrukciók

### nsDR132

MADDAAIQQT LAKMGIKSSD IQPAPVAGMK TVLTNSGVLY ITDDGKHIIQ GPMYDVSGTA PVNVTNKMML KQLNALEKEM  
IVYKAPQEKH VITVFTDITC GYCHKLHEQM ADYNALGITV RYLAFFPRQGL DSDAEKEMKA IWCAKDKNKA FDDVMAGKSV  
APASCDVDIA DHYALGVQLG VSGTPAVVLS NGTLVPGYQP PKEMKEFLDE HQKMTSGKGS TSGSGHHHHH HSAGLVPRGS  
RPQGATVSLW ETVQKWREYR RQCQRSLTED PPPATDLFCN RTFDEYACWP DGEPSGFVNV SCPWYLPWAS SVPQGHVYRF  
CTAEGWLWQK DNSSLPWRDL SECEESKRG

Aminosavak száma	Molekulatömeg	pI	Ext. koef. ox(red)
349	38544,66	6,11	62505 (61880)

### PMR3

MKIEEGKLVI WINGDKGYNG LAEVGKFEK DTGIKVTEH PDKLEEKFPQ VAATGDGPD IFWAHDREFG YAQSGLLAEI  
TPDKAFQDKL YPFTWDAVRY NGKLIAYPIA VEALSIIYNK DLLPNPPKTW EEIPALDKEL KAKGSALMF NLQEPYFTWP  
LIAADGGYAF KYENGYDIK DVGVDNAGAK AGLTFLVDLI KNKHMNADTD YSIAEAAPNK GETAMTINGP WAWSNIDTSK  
VNYGVTVLPT FKGQPSKPFV GVLSAGINAA SPNKELAKEF LENYLLTDEG LEAVNKDKPL GAVALKSYEE ELAKDPRIAA  
TMENAQKGEI MPNIPQMSAF AASGRQTVDE ALKDAQTNSS SNNNNNNNN NLGPGAALVP RGSDDPRPQG ATVSLWETVQ  
KWREYRRQCQ RSLTEDPPPA TDLFCNRTFD EYACWPDGEP GSFVNVSCPW YLPWASSVPQ GHVYRFCTAE GLWLQKDNSS  
LPWRDLSECE ESKRGERSSP EQLLFLYLE HHHHHH

Aminosavak száma	Molekulatömeg	pI	Ext. koef. ox(red)
526	58590,6	5,24	112675 (112300)

### MBPtevR145

MHHHHHHEEG KLVIWINGDK GYNGLAEVGK KFEKDTGIKV TVEHPDKLEE KFPQVAATGD GPDIIFWAHD RFGGYAQSGL  
LAEITPDKAF QDKLYPFTWD AVRYNGKLIYA YPIAVEALS IYNKDLLPNP PKTWEEIPAL DKELKAKGKS ALMFNLQEPY  
FTWPLIAADG GYAFKYENGK YDIKDVGVND AGAKAGLTFV VDLIKNKHMN ADTDYSIAEA AFNKGETAMT INGPWAWNSI  
DTSKVNYGVT VLPTFKGQPS KPFVGVLSAG INAASPNKEL AKEFLENYLL TDEGLEAVNK DKPLGAVALK SYEEELAKDP  
RIAATMENAQ KGEIMPNIPO MSAFYAVRT AVINAASGRQ TVDEALKDAQ TNSENLYFQG SRPQGATVSL WETVQKWREY  
RRQCQRSLTE DPPPATDLFC NRTFDEYACW PDGEPGSFVN VSCPWYLPWA SSVQGHVYR FCTAEGWLWQ KDNSSLPWRD  
LSECEESKRG ERSSPEEQLL FLY

Aminosavak száma	Molekulatömeg	pI	Ext. koef. ox(red)
503	56355,45	5,18	114165 (113790)

## MBPtevR132

MHHHHHHEEG KLVIWINGDK GYNGLAEVKG KFEKDTGIVK TVEHPDKLEE KFPQVAATGD GPDIIFWAHD RFGGYAQSGL  
LAEITPDKAF QDKLYPFTWD AVRYNGKLIYA YPIAVEALS IYNKDLLPNP PKTWEEIPAL DKELKAKGKS ALMFNLQEPY  
FTWPLIAADG GYAFKYENGG YDIKDVGVND AGAKAGLTFL VDLIKNKHMN ADTDYSIAEA AFNKGETAMT INGPWAWNSI  
DTSKVNYGVT VLPTFKGQPS KPFVGVLSAG INAASPKNEL AKEFLENYLL TDEGLEAVNK DKPLGAVALK SYEEELAKDP  
RIAATMENAQ KGEIMPNIQ MSAFWYAVRT AVINAASGRQ TVDEALKDAQ TNSENLYFQG SRPQGATVSL WETVQKWREY  
RRQCQRSLTE DPPPATDLFC NRTRFDEYAC PDGEPGSEFN VSCPWYLPWA SSVPGHVVYR FCTAEGWLQ KDNSSLPWRD  
LSECEESKRG

Aminosavak száma	Molekulatömeg	pI	Ext. koef. ox(red)
490	54762,67	5,27	112675 (112300)

## R132

MKYYKGSRPQGATVS LWETVQKWRE YRRQCQRSLT EDPPPATDLF CNRTRFDEYAC WPDGEPGSEFN NVSCPWYLPW  
ASSVPQGHVY RFCTAEGWLQ QKNSSLPWR DLSECEESKRG

Aminosavak száma	Molekulatömeg	pI	Ext. koef. ox(red)
110	12806,20	5,11	44835 (44460)

## R145

MKYYKGSRPQGATVS LWETVQKWRE YRRQCQRSLT EDPPPATDLF CNRTRFDEYAC WPDGEPGSEFN NVSCPWYLPW  
ASSVPQGHVY RFCTAEGWLQ QKNSSLPWR DLSECEESKR GERSSPEEQ LFLY

Aminosavak száma	Molekulatömeg	pI	Ext. koef. ox(red)
124	14456,02	4,88	46325 (45950)

## nGLP1R 145 (Steffen Runge)

MRRPQGA TVSLWETVQK WREYRRQCQR SLTEDPPPAT DLFCNRTFDE YACWPDGEPG SEFNVSCLPWY  
LPWASSVPQG HVYRFCTAEG LWLQKDNSSL PWRDLSECEE SKRGERSSPE EQLLFLYLEH HHHHH

Aminosavak száma	Molekulatömeg	pI	Ext. koef. ox(red)
135	15820,43	5,43	46325 (45950)

## 2. Podocin (Uniprot Q9NP85)

10 20 30 40 50 60 70  
MERRARSSSR ESRGRGGRTPE HKENKRAKAE RSGGGRGRQE AGPEPSGSGR AGTPGEPRAP AATVVDVDEV  
80 90 100 110 120 130 140  
RGSGEEGTEV VALLESERPE EGTKSSGLGA CEWLLVLISL LFIIMTFPFS IWFCVKVQVE YERVIIIFRLG  
150 160 170 180 190 200 210  
HLLPGRAGKP GLFFFLPCLD TYHKVDLRLQ TLEIPFHEIV TKDMFIMEID AICYRMENA SLLSSLAHV  
220 230 240 250 260 270 280  
SKAVQFLVQT TMKRLLAHRS LTEILLERKS IAQDAKVALD SVTCIWGIKV ERIEIKDVRL PAGLQHS LAV  
290 300 310 320 330 340 350  
EAEQRQAKV RMIAAEAEKA ASESLRMAAE ILSGTPAAVQ LRYLHTLQSL STEKPSTVVL PLPFDLLNCL  
360 370 380  
SSPSNRTQGS LPFPSPSPKV EPLNPKKDS PML

Podocin 1A, Podocin 2A 100, Podocin 3A, Helix1 domén, Hélix2 domén,  
Hélix3 domén

R229Q, A284V, A297V, V290M

Aminosavak száma	Molekulatömeg	pI	Ext. koef. ox(red)
383	42200,8	8,95	24325 (23950)



## Kialakított podocin konstrukciók (p32Mthr és p32GSTtev vektor)

Intracelluláris fragmensek (24 dbkonstrukció):

N-term: 135-, 156-, 168-

C-term: -269, -272, 286, -313, -331, -344, -348, -383

Helix1 domén fragmens (4db konstrukció):

Kialakított pontmutációk: A284V, V290M, V297V, A284V-A297V

Szekvencia:

GSLQYSLAVEAEAQQRQAKVRMIAAAEKAASESLRMAAEILSGTPAAVQLRRLHTLQSS

Aminosavak száma	Molekulatömeg	pI	Ext. koef. ox (red)
42	4479,1	5,16	1490

## 3. A fúziós fehérjék adatai

### GST

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKE  
RAEISMLEGAVLDIRYGVSR IAYSKDFETLKVDFLSKLPMLKMFEDRLCHKTYLNGDHSVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMLCLDAFPKL  
VCFKKRIEAIPIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPKSDLVPR

Aminosavak száma	Molekulatömeg	pI	Ext. koef. ox (red)
224	26166,4	6,10	43110 (42860)

### MBP

MKIEEGKLV I W I N G D K G Y N G L A E V G K K F E K D T G I K V T V E H P D K L E E K F P Q V A A T G D G P D I I F W A H D R F G G Y A Q S G L L A E I T P D K A F Q D  
K L Y P F T W D A V R Y N G K L I A Y P I A V E A L S L I Y N K D L L P N P P K T W E E I P A L D K E L K A K G S A L M F N L Q E P Y F T W P L I A A D G G Y A F K Y E N G K  
Y D I K D V G V D N A G A K A G L T F L V D L I K N K H M N A D T D Y S I A E A A F N K G E T A M T I N G P W A W S N I D T S K V N Y G V T V L P T F K G Q P S K P F V G V L S  
A G I N A A S P N K E L A K E F L E N Y L L T D E G L E A V N K D K P L G A V A L K S Y E E E L A K D P R I A A T M E N A Q R G E I M P N I P Q M S A F W Y A V R T A V I N A A  
S G R Q T V D E A L K D A Q T N S S N N N N N N N N L G P G A A L V P R

Aminosavak száma	Molekulatömeg	pI	Ext. koef. ox (red)
391	42788,4	5,14	66350

### DsbC

M A D D A A I Q Q T L A K M G I K S S D I Q P A P V A G M K T V L T N S G V L Y I T D D G K H I I Q G P M Y D V S G T A P V N V T N K M L L K Q L N A L E K E M I V Y K A P Q E  
K H V I T V F T D I T C G Y C H K L H E Q M A D Y N A L G I T V R Y L A F P R Q G L D S D A E K E M K A I W C A K D K N K A F D D V M A G K S V A P A S C D V D I A D H Y A L G  
V Q L G V S G T P A V V L S N G T L V P G Y Q P P K E M K E F L D E H Q K M T S G K G S T S G S G H H H H H S A G L V P R

Aminosavak száma	Molekulatömeg	pI	Ext. koef. ox (red)
238	25699,42	6,44	17670 (17420)

### Ubikvitin

M G H H H H H H H H H S S G H I D D D D K H M Q I F V K T L T G K T I T L E V S S D T I D N V K S K I Q D K E G I P P D Q Q R L I F A G K Q L E D G R T L S D Y N I Q K E S  
T L H L V L R L R G G

Aminosavak száma	Molekulatömeg	pI	Ext. koef. ox (red)
99	11323,6	6,48	1490

## ADATLAP

### a doktori értekezés nyilvánosságra hozatalához\*

#### I. A doktori értekezés adatai

A szerző neve: *Stráner Pál*

MTMT-azonosító: ... 10035388

A doktori értekezés címe és alcíme: *Rekombináns párválasztási technikák: T2DM és SRNS betegségekben szerepet játszó fehérjék és peptidok előállítása és biofizikai vizsgálata*

DOI-azonosító<sup>46</sup>: 10.15476/ELTE.2018.138.....

A doktori iskola neve: *ELTE TTK Biológia Doktori Iskola*.

A doktori iskolán belüli doktori program neve: *Szerkezeti biokémia doktori program...*

A témavezető neve és tudományos fokozata: *dr. Perczel András, PhD, egyetemi tanár....*

A témavezető munkahelye: *ELTE TTK Kémiai Intézet.....*

#### II. Nyilatkozatok

##### 1. A doktori értekezés szerzőjeként

a) hozzájárulok, hogy a doktori fokozat megszerzését követően a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban. Felhatalmazom a Természettudományi kar Dékáni Hivatali Doktori, Habilitációs és Nemzetközi Ügyek Csoportjának ügyintézőjét, hogy az értekezést és a téziseket feltöltse az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba, és ennek során kitöltse a feltöltéshez szükséges nyilatkozatokat.

b) kérem, hogy a mellékelt kérelemben részletezett szabadalmi, illetőleg oltalmi bejelentés közzétételéig a doktori értekezést ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;

c) kérem, hogy a nemzetbiztonsági okból minősített adatot tartalmazó doktori értekezést a minősítés (*dátum*)-ig tartó időtartama alatt ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;

d) kérem, hogy a mű kiadására vonatkozó mellékelt kiadó szerződésre tekintettel a doktori értekezést a könyv megjelenéséig ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban, és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban csak a könyv bibliográfiai adatait tegyék közzé. Ha a könyv a fokozatszerzést követően egy évig nem jelenik meg, hozzájárulok, hogy a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban.

##### 2. A doktori értekezés szerzőjeként kijelentem, hogy

a) az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba feltöltendő doktori értekezés és a tézisek saját eredeti, önálló szellemi munkám és legjobb tudásom szerint nem sértem vele senki szerzői jogait;

b) a doktori értekezés és a tézisek nyomtatott változatai és az elektronikus adathordozón benyújtott tartalmak (szöveg és ábrák) mindenben megegyeznek.

3. A doktori értekezés szerzőjeként hozzájárulok a doktori értekezés és a tézisek szövegének plágiumkereső adatbázisba helyezéséhez és plágiumellenőrző vizsgálatok lefuttatásához.

Kelt: 2018. 06. 20.

  
.....  
a doktori értekezés szerzőjének aláírása

\*ELTE SZMSZ SZMR 12. sz. melléklet

## Irodalomjegyzék

- <sup>1</sup>Sezonov G, Joseleau-Petit D, D'Ari RJ Escherichia coli physiology in Luria-Bertani broth. *Bacteriol.* 2007 Dec; 189(23):8746-9.
- <sup>2</sup>Lee SY High cell-density culture of Escherichia coli. *Trends Biotechnol.* 1996 Mar; 14(3):98-105.
- <sup>3</sup>Bentley WE, Mirjalili N, Andersen DC, Davis RH, Kompala DS *Biotechnol Bioeng.* Plasmid-encoded protein: the principal factor in the "metabolic burden" associated with recombinant bacteria. 1990 Mar 25; 35(7):668-81.
- <sup>4</sup>Pope B, Kent HM High efficiency 5 min transformation of Escherichia coli. *Nucleic Acids Res.* 1996 Feb 1; 24(3):536-7.
- <sup>5</sup>Gopal GJ, Kumar A. Strategies for the production of recombinant protein in Escherichia coli. *Protein J.* 2013 Aug;32(6):419-25.
- <sup>6</sup>Furlong J, Meighan M, Conner J, Murray J, and Clements J B Methods for improved protein expression using pET vectors. *Nucleic Acids Res.* 1992 Sep 11; 20(17): 4668.
- <sup>7</sup>Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW, Crosa JH, Falkow S Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene.* 1977; 2(2):95-113.
- <sup>8</sup>Studier FW, Moffatt BA Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.* 1986 May 5; 189(1):113-30.
- <sup>9</sup>Tabor S Expression using the T7 RNA polymerase/promoter system. *Curr Protoc Mol Biol.* 2001 May; Chapter 16: Unit 16.2. 1.
- <sup>10</sup>del Solar G, Giraldo R, Ruiz-Echevarría MJ, Espinosa M, Díaz-Orejas R Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998 Jun; 62(2):434-64.
- <sup>11</sup>Burgess RR. Refolding solubilized inclusion body proteins. *Methods Enzymol.* 2009;463:259–82.
- <sup>12</sup>Tang W., Sun Z.Y., Pannell R., Gurewich V., Liu J.N., An efficient system for production of recombinant urokinase-type plasminogen activator, *Protein Expr. Purif.* 11 (1997) 279–283.
- <sup>13</sup>Shi S., Xue J., Fan K., Kou G, Wang H., Guo Y., Preparation and characterization of recombinant protein ScFv(CD11c)-TRP2 for tumor therapy from inclusion bodies in Escherichia coli, *Protein Expr. Purif.* (2005)
- <sup>14</sup>Rajan S.S., Lackland H., Stein S., Denhardt D.T., Presence of an Nterminal polyhistidine tag facilitates stable expression of an otherwise unstable N-terminal domain of mouse tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in Escherichia coli, *Protein Expr. Purif.* 13 (1998) 67–72.
- <sup>15</sup>Sun Q.M., Chen L.L., Cao L., Fang L., Chen C., Hua Z.C., An improved strategy for high-level production of human vasostatin 120–180, *Biotechnol. Prog.* 21 (2005) 1048–1052
- <sup>16</sup>Chant A., Kraemer-Pecore C.M., Watkin R., Kneale G.G., Attachment of a histidine tag to the minimal zinc Wnger protein of the Aspergillus nidulans gene regulatory protein AreA causes a conformational change at the DNA-binding site, *Protein Expr. Purif.* 39 (2005) 152–159
- <sup>17</sup>Fonda I., M. Kenig, V. Gaberc-Porekar, P. Pristovaek, V. Menart, Attachment of histidine tags to recombinant tumor necrosis factor alpha drastically changes its properties, *Sci. World J.* 15 (2002) 1312–1325.
- <sup>18</sup>Mayer A., Sharma S.K., Tolner B., Minton N.P., Purdy D., Amlot P., Tharakan G., Begent R.H.J., Chester K.A., Modifying an immunogenic epitope on a therapeutic protein: a step towards an improved system for antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT), *Br. J. Cancer* 90 (2004) 2402–2410.
- <sup>19</sup>Uhlén M, Forsberg G, Moks T, Hartmanis M, Nilsson B Fusion proteins in biotechnology. *Curr Opin Biotechnol.* 1992 Aug; 3(4):363-9.
- <sup>20</sup>Makrides SC. Strategies for achieving high-level expression of genes in Escherichia coli. *Microbiol Rev.* 1996;60:512–538.
- <sup>21</sup>Gerdes HH, Kaether C. Green fluorescent protein: Applications in cell biology. *FEBS Lett.* 1996;389:44–47.
- <sup>22</sup>Smith DB. Generating fusions to glutathione S-transferase for protein studies. *Methods Enzymol.* 2000;326:254–270
- <sup>23</sup>Nilsson J, Stahl S, Lundeberg J, Uhlen M, Nygren PA. Affinity fusion strategies for detection, purification, and immobilization of recombinant proteins. *Protein Expr Purif.* 1997b;11:1–16.
- <sup>24</sup>Terpe K. Overview of tag protein fusions: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2003;60:523–533.
- <sup>25</sup>Kuliopulos A, Walsh CT. Production, purification, and cleavage of tandem repeats of recombinant peptides. *J Am Chem Soc.* 1994;116:4599–4607.

- 
- <sup>26</sup>Bornhorst JA, Falke JJ. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods Enzymol.* 2000;326:245–254
- <sup>27</sup>Stevens RC. Design of high-throughput methods of protein production for structural biology. *Structure Fold Des.* 2000;8:R177–R185.
- <sup>28</sup>Lilius G, Persson M, Bülow L, Mosbach K Metal affinity precipitation of proteins carrying genetically attached polyhistidine affinity tails. *Eur J Biochem.* 1991 Jun 1; 198(2):499-504.
- <sup>29</sup>Derewenda ZS The use of recombinant methods and molecular engineering in protein crystallization. *Methods.* 2004 Nov; 34(3):354-63.
- <sup>30</sup>Bucher MH, Evdokimov AG, Waugh DS Differential effects of short affinity tags on the crystallization of *Pyrococcus furiosus* maltodextrin-binding protein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2002 Mar; 58(Pt 3):392-7.
- <sup>31</sup>Braun P, Hu Y, Shen B, Halleck A, Koundinya M, Harlow E, LaBaer Proteome-scale purification of human proteins from bacteria. *JProc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Mar 5; 99(5):2654-9.
- <sup>32</sup>Edwards AM, Arrowsmith CH, Christendat D, Dharamsi A, Friesen JD, Greenblatt JF, Vedadi M Protein production: feeding the crystallographers and NMR spectroscopists. *Nat Struct Biol.* 2000 Nov; 7 Suppl():970-2.
- <sup>33</sup>Waugh DS Making the most of affinity tags. *Trends Biotechnol.* 2005 Jun; 23(6):316-20.
- <sup>34</sup>Smith DB, Johnson KS Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene.* 1988 Jul 15; 67(1):31-40.
- <sup>35</sup>Creighton, T.E. Protein folding coupled to disulphide bond formation. *Biol. Chem.* 1997, 378, 731–744.
- <sup>36</sup>Narayan, M.; Welker, E.; Wedemeyer, W.J.; Scheraga, H.A. Oxidative folding of proteins. *Acc. Chem. Res.* 2000, 33, 805–812.
- <sup>37</sup>Gething, M.-J.; Sambrook, J.F. Protein folding in the cell. *Nature* 1992, 355, 33–45.
- <sup>38</sup>Gilbert, H.F. Protein disulfide isomerase and assisted protein folding. *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 29399–29402.
- <sup>39</sup>Gilbert, H.F. Protein, disulfide isomerase. *Methods Enzymol.* 1998, 290, 26–50.
- <sup>40</sup>Inaba K. Disulfide bond formation system in *Escherichia coli*. *J Biochem.* 2009 Nov;146(5):591-7.
- <sup>41</sup>Banaszak K, Mechin I, Frost G, Rypniewski W. Structure of the reduced disulfide-bond isomerase DsbC from *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2004 Oct;60(Pt 10):1747-52.
- <sup>42</sup>Maina CV, Riggs PD, Grandea AG 3rd, Slatko BE, Moran LS, Tagliamonte JA, McReynolds LA, Guan CD An *Escherichia coli* vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein. *Gene.* 1988 Dec 30; 74(2):365-73.
- <sup>43</sup>Sun P, Tropea JE, Waugh DS (2011) Enhancing the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli* by using hexahistidine-tagged maltose-binding protein as a fusion partner. *Methods Mol Biol* 705: 259–274.
- <sup>44</sup>Kapust RB, Waugh DS (1999) *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci* 8: 1668–1674.
- <sup>45</sup>Lountos GT, Tropea JE, Zhang D, Jobson AG, Pommier Y, et al. (2009) Crystal structure of checkpoint kinase 2 in complex with NSC 109555, a potent and selective inhibitor. *Protein Sci* 18: 92–100.
- <sup>46</sup>Zhang YB, Howitt J, McCorkle S, Lawrence P, Springer K, et al. (2004) Protein aggregation during overexpression limited by peptide extensions with large net negative charge. *Protein Expr Purif* 36: 207–216.
- <sup>47</sup>Fox JD, Kapust RB, Waugh DS (2001) Single amino acid substitutions on the surface of *Escherichia coli* maltose-binding protein can have a profound impact on the solubility of fusion proteins. *Protein Sci* 10: 622–630.
- <sup>48</sup>Fox JD, Routzahn KM, Bucher MH, Waugh DS (2003) Maltodextrin-binding proteins from diverse bacteria and archaea are potent solubility enhancers. *FEBS Lett* 537: 53–57.
- <sup>49</sup>Nomine Y, Ristriani T, Laurent C, Lefevre JF, Weiss E, et al. (2001) Formation of soluble inclusion bodies by hpv e6 oncoprotein fused to maltose-binding protein. *Protein Expr Purif* 23: 22–32.
- <sup>50</sup>Ahn JY, Choi H, Kim YH, Han KY, Park JS, et al. (2005) Heterologous gene expression using self-assembled supra-molecules with high affinity for HSP70 chaperone. *Nucleic Acids Res* 33: 3751–3762.
- <sup>51</sup>Shaki-Loewenstein S, Zfania R, Hyland S, Wels WS, Benhar I (2005) A universal strategy for stable intracellular antibodies. *J Immunol Methods* 303: 19–39.
- <sup>52</sup>Bach H, Mazor Y, Shaky S, Shoham-Lev A, Berdichevsky Y, et al. (2001) *Escherichia coli* maltose-binding protein as a molecular chaperone for recombinant intracellular cytoplasmic single-chain antibodies. *J Mol Biol* 312: 79–93.
- <sup>53</sup>Kim CW, Han KS, Ryu KS, Kim BH, Kim KH, et al. (2007) N-terminal domains of native multidomain proteins have the potential to assist de novo folding of their downstream domains in vivo by acting as solubility enhancers. *Protein Sci* 16: 635–643.

- <sup>54</sup>Hewitt SN, Choi R, Kelley A, Crowther GJ, Napuli AJ, et al. (2011) Expression of proteins in *Escherichia coli* as fusions with maltose-binding protein to rescue non-expressed targets in a high-throughput protein-expression and purification pipeline. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 67: 1006–1009.
- <sup>55</sup>Shih YP, Kung WM, Chen JC, Yeh CH, Wang AH High-throughput screening of soluble recombinant proteins. *Protein Sci* 11: 1714–1719. (2002)
- <sup>56</sup>Hammarstrom M, Hellgren N, van Den Berg S, Berglund H, Hard T Rapid screening for improved solubility of small human proteins produced as fusion proteins in *Escherichia coli*. *Protein Sci* 11: 313–321. (2002)
- <sup>57</sup>Arnau J, Lauritzen C, Petersen GE, Pedersen J. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expr Purif.* 2006 Jul;48(1):1-13.
- <sup>58</sup>Waugh DS, An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags, *Protein Expression and Purification*, Vol80, Issue 2, 2011, 283-293
- <sup>59</sup>Raran-Kurussi S, Cherry S, Zhang D, Waugh DS Removal of Affinity Tags with TEV Protease. *Methods Mol Biol.* 2017;1586:221-230..
- <sup>60</sup>Majerle A, Kidric J, Jerala R Production of stable isotope enriched antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: An application to the production of a <sup>15</sup>N-enriched fragment of lactoferrin Andreja Majerle, Jurka Kidric & Roman Jerala *Journal of Biomolecular NMR*, 18: 145–151, 2000.
- <sup>61</sup>Gizachew, D., Moffett, D.B., Busse, S.C., Westler, W.M., Dratz, E.A. and Teintze, M. (1998) NMR studies on the conformation of the CD4 36-59 peptide bound to HIV-1 gp120. *Biochemistry*, 37, 10616–10625.
- <sup>62</sup>Kohno, T., Kusunoki, H., Sato, K. and Wakamatsu, K. (1998) A new general method for the biosynthesis of stable isotope-enriched peptides using a decahistidine-tagged ubiquitin fusion system: an application to the production of mastoparan-X uniformly enriched with <sup>15</sup>N and <sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C. *J. Biomol. NMR*, 12, 109–121
- <sup>63</sup>Lagerström MC, Schiöth HB. *Nat Rev Drug Discov.* 2008 Apr;7(4):339-57. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery.
- <sup>64</sup>Couvineau A, Laburthe M. The family B1 GPCR: structural aspects and interaction with accessory proteins. *Curr Drug Targets.* 2012 Jan;13(1):103-15.
- <sup>65</sup>Monaghan P, Woznica I, Moza B, Sundberg EJ, Rosenblatt M. Recombinant expression and purification of the N-terminal extracellular domain of the parathyroid hormone receptor. *Protein Expr Purif.* 2007 Jul;54(1):87-93.
- <sup>66</sup>NMR structural characterization of a minimal peptide antagonist bound to the extracellular domain of the corticotropin-releasing factor1 receptor. Mesleh MF, Shirley WA, Heise CE, Ling N, Maki RA, Laura RP. *J Biol Chem.* 2007 Mar 2;282(9):6338-46. Epub 2006 Dec 27.
- <sup>67</sup>*Protein Expr Purif.* 2013 Mar;88(1):107-13. doi: 10.1016/j.pep.2012.11.019. Epub 2012 Dec 13. Bacterial expression and purification of a heterodimeric adrenomedullin receptor extracellular domain complex using DsbC-assisted disulfide shuffling. Hill HE1, Pioszak AA.
- <sup>68</sup>*Protein Expr Purif.* 2012 Mar;82(1):116-24. doi: 10.1016/j.pep.2011.11.015. Epub 2011 Dec 14. Isolation of *Metarhizium anisopliae* carboxypeptidase A with native disulfide bonds from the cytosol of *Escherichia coli* BL21(DE3). Austin BP1, Waugh DS.
- <sup>69</sup>Bazarsuren A, Grauschopf U, Wozny M, Reusch D, Hoffmann E, Schaefer W, Panzner S, Rudolph R. In vitro folding, functional characterization, and disulfide pattern of the extracellular domain of human GLP-1 receptor. *Biophys Chem.* 2002 May 2;96(2-3):305-18..
- <sup>70</sup>Schröder-Tittmann K, Bosse-Doenecke E, Reedt-Runge S, Ihling C, Sinz A, Tittmann K, Rudolph R. Recombinant expression, in vitro refolding, and biophysical characterization of the human glucagon-like peptide-1 receptor. *Biochemistry.* 2010 Sep 14;49(36):7956-65.
- <sup>71</sup>Pioszak AA, Parker NR, Suino-Powell K, Xu HE. Molecular recognition of corticotropin-releasing factor by its G-protein-coupled receptor CRFR1. *J Biol Chem.* 2008;283:32900–32912.
- <sup>72</sup>Grace CR, Perrin MH, Gulyas J, Rivier JE, Vale WW, Riek R. NMR structure of the first extracellular domain of corticotropin-releasing factor receptor 1 (ECD1-CRF-R1) complexed with a high affinity agonist. *J Biol Chem.* 2010;285:38580–38589.
- <sup>73</sup>Grace CR, Perrin MH, DiGrucchio MR, Miller CL, Rivier JE, Vale WW, Riek R. NMR structure and peptide hormone binding site of the first extracellular domain of a type B1 G protein-coupled receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:12836–12841.
- <sup>74</sup>Grace CR, Perrin MH, Gulyas J, DiGrucchio MR, Cattle JP, Rivier JE, Vale WW, Riek R. Structure of the N-terminal domain of a type B1 G protein-coupled receptor in complex with a peptide ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:4858–4863.

- <sup>75</sup>Kumar, S., Pioszak, A., Zhang, C., Swaminathan, K., Xu, H.E. Crystal Structure of the PAC1R Extracellular Domain Unifies a Consensus Fold for Hormone Recognition by Class B G-Protein Coupled Receptors. (2011) *Plos One* 6: e19682-e19682
- <sup>76</sup>Ter Haar, E., Koth, C.M., Abdul-Manan, N., Swenson, L., Coll, J.T., Lippke, J.A., Lepre, C.A., Garcia-Guzman, M., Moore, J.M. Crystal Structure of the Ectodomain Complex of the CGRP Receptor, a Class-B GPCR, Reveals the Site of Drug Antagonism. (2010) *Structure* 18: 1083-1093
- <sup>77</sup>Johansson E, Lerche Hansen J, Kruse Hansen AM, Shaw AC, Becker P, Schäffer L, and Reedtz-Runge S Type II Turn of Receptor-bound Salmon Calcitonin Revealed by X-ray Crystallography *J Biol Chem.* 2016 Jun 24; 291(26): 13689–13698.
- <sup>78</sup>Parthier C, Kleinschmidt M, Neumann P, Rudolph R, Manhart S, Schlenzig D, Fanghänel J, Rahfeld JU, Demuth HU, Stubbs MT. Crystal structure of the incretin-bound extracellular domain of a G protein-coupled receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:13942–13947.
- <sup>79</sup>Ravn, P., Madhurantakam, C., Kunze, S., Matthews, E., Priest, C., O'Brien, S., Collinson, A., Papworth, M., Fritsch-Fredin, M., Jermutus, L., Bentham, L., Gruetter, M., Jackson, R.H Structural and Pharmacological Characterization of Novel Potent and Selective Monoclonal Antibody Antagonists of Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide Receptor..(2013) *J.Biol.Chem.* 288: 19760-19772
- <sup>80</sup>Runge, S., Thogersen, H., Madsen, K., Lau, J., Rudolph, R. Crystal Structure of the Ligand-bound Glucagon-like Peptide-1 Receptor Extracellular Domain (2008) *J.Biol.Chem.* 283: 11340-11347
- <sup>81</sup>Hennen, S., Kodra, J.T., Soroka, V., Krogh, B.O., Wu, X., Kastrup, P., Orskov, C., Ronn, S.G., Schluckebier, G., Barbateskovic, S., Gandhi, P.S., Reedtz-Runge, S. Structural insight into antibody-mediated antagonism of the Glucagon-like peptide-1 Receptor. (2016) *Sci Rep* 6: 26236-26236
- <sup>82</sup>Underwood CR, Garibay P, Knudsen LB, Hastrup S, Peters GH, Rudolph R, Reedtz-Runge S. Crystal structure of glucagon-like peptide-1 in complex with the extracellular domain of the glucagon-like peptide-1 receptor. *J Biol Chem.* 2010;285:723–730.
- <sup>83</sup>Lau, J., Bloch, P., Schaffer, L., Pettersson, I., Spetzler, J., Kofoed, J., Madsen, K., Knudsen, L.B., McGuire, J., Steensgaard, D.B., Strauss, H.M., Gram, D.X., Knudsen, S.M., Nielsen, F.S., Thygesen, P., Reedtz-Runge, S., Kruse, T. Discovery of the Once-Weekly Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) Analogue Semaglutide. (2015) *J.Med.Chem.* 58: 7370-7380
- <sup>84</sup>Koth CM, et al. Molecular basis for negative regulation of the glucagon receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109:14393–14398.
- <sup>85</sup>Hennen, S., Kodra, J.T., Soroka, V., Krogh, B.O., Wu, X., Kastrup, P., Orskov, C., Ronn, S.G., Schluckebier, G., Barbateskovic, S., Gandhi, P.S., Reedtz-Runge, S. Structural insight into antibody-mediated antagonism of the Glucagon-like peptide-1 Receptor. (2016) *Sci Rep* 6: 26236-26236
- <sup>86</sup>Jazayeri, A., Dore, A.S., Lamb, D., Krishnamurthy, H., Southall, S.M., Baig, A.H., Bortolato, A., Koglin, M., Robertson, N.J., Errey, J.C., Andrews, S.P., Teobald, I., Brown, A.J., Cooke, R.M., Weir, M., Marshall, F.H. Extra-helical binding site of a glucagon receptor antagonist. (2016) *Nature* 533: 274-277
- <sup>87</sup>Sun C, Song D, Davis-Taber RA, Barrett LW, Scott VE, Richardson PL, Pereda-Lopez A, Uchic ME, Solomon LR, Lake MR, Walter KA, Hajduk PJ, Olejniczak Solution structure and mutational analysis of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide binding to the extracellular domain of PAC1-RS. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:7875–7880.
- <sup>88</sup>Pioszak AA, Harikumar KG, Parker NR, Miller LJ, Xu HE. Dimeric arrangement of the parathyroid hormone receptor and a structural mechanism for ligand-induced dissociation. *J Biol Chem.* 2010;285:12435–12444.
- <sup>89</sup>Pioszak AA, Parker NR, Gardella TJ, Xu HE. Structural basis for parathyroid hormone-related protein binding to the parathyroid hormone receptor and design of conformation-selective peptides. *J Biol Chem.* 2009;284:28382–28391.
- <sup>90</sup>Dual, Hla-B27 Subtype-Dependent Conformation of a Self-Peptide Hulsmeier, M., Fiorillo, M.T., Bettosini, F., Sorrentino, R., Saenger, W., Ziegler, A., Uchanska-Ziegler, B. (2004) *J.Exp.Med.* 199: 271
- <sup>91</sup>Yokoyama, S. Protein expression systems for structural genomics and proteomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7, 39–43 (2003)
- <sup>92</sup>Klammt, C. Löhr F, Schäfer B, Haase W, Dötsch V, Rüterjans H, Glaubitz C, Bernhard F. High level cell-free expression and specific labeling of integral membrane proteins. *Eur. J. Biochem.* 271, 568–580 (2004).
- <sup>93</sup>Elbaz, Y., Steiner-Mordoch, S., Danieli, T. & Schuldiner, S. In vitro synthesis of fully functional mRf, a multidrug transporter, and study of its oligomeric state. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 1519–1524 (2004).
- <sup>94</sup>Shimada, Y., Wang, Z.Y., Mochizuki, Y., Kobayashi, M. & Nozawa, T. Functional expression and characterization of a bacterial light-harvesting membrane protein in *Escherichia coli* and cell-free synthesis systems. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 1942–1948 (2004).
- <sup>95</sup>Shirokov, V.A., Kommer, A., Kolb, V.A. & Spirin, A.S. Continuous-exchange protein-synthesizing systems. *Methods of Molecular Biology* 19–57 Humana Press, (2007).

- <sup>96</sup>Kigawa, T. & Yokoyama, S. A continuous cell-free protein synthesis system for coupled transcription–translation. *J. Biochem. (Tokyo)* 110, 166–168 (1991)
- <sup>97</sup>Klammt, C. Schwarz D, Löhr F, Schneider B, Dötsch V, Bernhard F. Cell-free expression as an emerging technique for the large scale production of integral membrane protein. *FEBS J.* 273, 4141–4153 (2006).
- <sup>98</sup>Zubay, G. In vitro synthesis of protein in microbial systems. *Annu. Rev. Genet.* 7, 267–287 (1973).
- <sup>99</sup>Klammt, C., Schwarz, D., Dötsch, V. & Bernhard, F. Cell-free production of integral membrane proteins on a preparative scale. *Methods of Molecular Biology* 57–79 Humana Press, (2007).
- <sup>100</sup>Schwarz D, Junge F, Durst F, Frölich N, Schneider B, Reckel S, Sobhanifar S, Dötsch V, Bernhard F. Preparative scale expression of membrane proteins in *Escherichia coli*-based continuous exchange cell-free systems. *Nat Protoc.* 2007;2(11):2945-57.
- <sup>101</sup>Kim, D.M. & Swartz, J.R. Prolonging cell-free protein synthesis with a novel ATP regeneration system. *Biotechnol. Bioeng.* 66, 180–188 (1999).
- <sup>102</sup>Ahn, J.H. et al. Cell-free synthesis of recombinant proteins from PCR-amplified genes at a comparable productivity to that of plasmid-based reactions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 1346–1352 (2005).
- <sup>103</sup>Cai Y, Liu Y, Culhane KJ, DeVree BT, Yang Y, Sunahara RK, Yan ECY Purification of family B G protein-coupled receptors using nanodiscs: Application to human glucagon-like peptide-1 receptor. *PLoS One.* 2017 Jun 13;12(6):e0179568.
- <sup>104</sup>Machuca E, Benoit G, Nevo F, Tête MJ, Gribouval O, Pawtowski A, Brandström P, Loirat C, Niaudet P, Gubler MC, Antignac C. Genotype-phenotype correlations in non-Finnish congenital nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2010 Jul;21(7):1209-17.
- <sup>105</sup>Hinkes BG, Mucha B, Vlangos CN, Gbadegesin R, Liu J, Hasselbacher K, Hangan D, Ozaltin F, Zenker M, Hildebrandt F; Nephrotic syndrome in the first year of life: two thirds of cases are caused by mutations in 4 genes (NPHS1, NPHS2, WT1, and LAMB2). *Pediatrics.* 2007 Apr;119(4):e907-19.
- <sup>106</sup>Syed Raza Shah, Areeba Altaf, Mohammad Hussham Arshad, Anum Mari, Sahir Noorani, Eraj Saeed, Areesh Amir Mevawalla, Zaiyn Ul Haq, Muhammad Ehsan Faquih Use of Cyclosporine Therapy in Steroid Resistant Nephrotic Syndrome (SRNS): A Review *Global Journal of Health Science; Vol. 8, No. 4; 2016*
- <sup>107</sup>Santín S, Bullich G, Tazón-Vega B, García-Maset R, Giménez I, Silva I, Ruíz P, Ballarín J, Torra R, Ars E. Clinical utility of genetic testing in children and adults with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011 May;6(5):1139-48.
- <sup>108</sup>Elisabeth M. Hodson, Jonathan C. Craig Therapies for steroid-resistant nephrotic syndrome *Pediatr Nephrol* (2008) 23:1391–1394 doi: 10.1007/s00467-008-0792-3
- <sup>109</sup>Sadowski CE, Lovric S, Ashraf S, Pabst WL, Gee HY, Kohl S, Engelmann S, Vega-Warner V, Fang H, Halbritter J, Somers MJ, Tan W, Shril S, Fessi I, Lifton RP, Bockenhauer D, El-Desoky S, Kari JA, Zenker M, Kemper MJ, Mueller D, Fathy HM, Soliman NA; Hildebrandt F. A single-gene cause in 29.5% of cases of steroid-resistant nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2015 Jun;26(6):1279-89.
- <sup>110</sup>Santín S, Bullich G, Tazón-Vega B, García-Maset R, Giménez I, Silva I, Ruíz P, Ballarín J, Torra R, Ars E. Clinical utility of genetic testing in children and adults with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011 May;6(5):1139-48.
- <sup>111</sup>Boute N, Gribouval O, Roselli S, Benessy F, Lee H, Fuchshuber A, Dahan K, Gubler MC, Niaudet P, Antignac C. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet.* 2000 Apr;24(4):349-54. Erratum in: *Nat Genet* 2000 May;25(1):125.
- <sup>112</sup>Kálmán Tory, Dóra K. Menyhárd, Stéphanie Woerner, Fabien Nevo, Olivier Gribouval, Andrea Kerti, Pál Stráner, Christelle Arrondel, Evelyne Huynh Cong, Tivadar Tulassay, Géraldine Mollet, András Perczel, Corinne Antignac; Mutation-dependent recessive inheritance of NPHS2-associated steroid-resistant nephrotic syndrome; *Nat. Genet.* 46:299–304 (2014)
- <sup>113</sup>Roselli S, Gribouval O, Boute N, Sich M, Benessy F, Attié T, Gubler MC, Antignac C. Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm area. *Am J Pathol.* 2002 Jan;160(1):131-9.
- <sup>114</sup>Morrow IC, Parton RG. Flotillins and the PHB domain protein family: rafts, worms and anaesthetics. *Traffic.* 2005 Sep;6(9):725-40.
- <sup>115</sup>Roselli S, Gribouval O, Boute N, Sich M, Benessy F, Attié T, Gubler MC, Antignac C. Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm area. *Am J Pathol.* 2002 Jan;160(1):131-9.
- <sup>116</sup>Huber TB, Simons M, Hartleben B, Sernetz L, Schmidts M, Gundlach E, Saleem MA, Walz G, Benzing T. Molecular basis of the functional podocin-nephrin complex: mutations in the NPHS2 gene disrupt nephrin targeting to lipid raft microdomains. *Hum Mol Genet.* 2003 Dec 15;12(24):3397-405.
- <sup>117</sup>Duncan T. Browman, Maja B. Hoegg, Stephen M. Robbins, The SPFH domain-containing proteins: more than lipid raft markers, *Trends in Cell Biology*, Volume 17, Issue 8, 2007, Pages 394-402,
- <sup>118</sup>Goodman MB, Ernstrom GG, Chelur DS, O'Hagan R, Yao CA, Chalfie M (2002) Gain-of-function mutations in the MEC-4 DEG/ENaC sensory mechanotransduction channel alter gating and drug blockade. *Nature* 415:1039–1042.

- <sup>119</sup>O'Hagan R , Chalfie M , Goodman MB (2005) The MEC-4 DEG/ENaC channel of *Caenorhabditis elegans* touch receptor neurons transduces mechanical signals. *Nat Neurosci* 8:43–50.
- <sup>120</sup>Huang M , Gu G , Ferguson EL , Chalfie M (1995) A sztomatin-like protein necessary for mechanosensation in *C. elegans*. *Nature* 378:292–295.
- <sup>121</sup>Benzing T (2004) Signaling at the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol* 15:1382–1391.
- <sup>122</sup>Huber TB., Schermer B, Müller RU, Höhne M, Bartram M, Calixto A, Hagemann H, Reinhardt C, Koos F, Kunzelmann K, Shirokova E, Krautwurst D, Harteneck C, Simons M, Pavenstädt H, Kerjaschki D, Thiele C, Walz G, Chalfie M and Benzing T Podocin and MEC-2 bind cholesterol to regulate the activity of associated ion channels *PNAS* 2006 November, 103 (46) 17079-17086
- <sup>123</sup>Schwarz K, Simons M, Reiser J, Saleem MA, Faul C, Kriz W, Shaw AS, Holzman LB, Mundel P.J Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *Clin Invest.* 2001 Dec;108(11):1621-9.
- <sup>124</sup>Reiser J, Polu KR, Moller CC, Kenlan P, Altintas MM, Wei C, Faul C, Herbert S, Villegas I, Avila-Casado C (2005) *Nat Genet* 37:739–744.
- <sup>125</sup>Winn MP , Conlon PJ, Lynn KL, Farrington MK, Creazzo T, Hawkins AF, Daskalakis N, Kwan SY, Ebersviller S, Burchette JL (2005) *Science* 308:1801–1804.
- <sup>126</sup>Freichel M, Vennekens R, Olausson J, Stolz S, Philipp SE, Weissgerber P, Flockerzi V(2005) *J Physiol* 567:59–66.
- <sup>127</sup>A. R. Meloni, M. B. DeYoung, C. Lowe & D. G. Parkes, GLP-1 receptor activated insulin secretion from pancreatic  $\beta$ -cells: mechanism and glucose dependence *Diabetes, Obesity and Metabolism* 15: 15–27, 2013.
- <sup>128</sup>Yokoshiki H, Sunagawa M, Seki T, Sperelakis N ATP-sensitive  $K^+$  channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells the American Physiological Society (1998) 0363-6143/98
- <sup>129</sup>Lavoisier S. Ramos, Jonathan Hale Zippin, Margarita Kamenetsky, Jochen Buck, and Lonny R. Levin Glucose and GLP-1 Stimulate cAMP Production via Distinct Adenylyl Cyclases in INS-1E Insulinoma *J. Gen. Physiol.* Vol. 132 No. 3 329–338, 2008.
- <sup>130</sup>Xiao YF, Nikolskaya A, Jaye DA, Sigg DC Glucagon-like peptide-1 enhances cardiac L-type  $Ca^{2+}$  currents via activation of the cAMP-dependent protein kinase A pathway *Cardiovascular Diabetology* 2011, 10:6
- <sup>131</sup>Mann KV, Raskin P Exenatide extended-release: a once weekly treatment for patients with type 2 diabetes *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* 2014:7 229–239
- <sup>132</sup>Neidigh, J. W., Fesinmeyer, R. M., and Andersen, N. H. (2002) Designing a 20-residue protein *Nat. Struct. Biol.* 9, 425– 430
- <sup>133</sup>Hudáky, P., Stráner, P., Farkas, V., Váradi, G., Táth, G., and Perczel, A. (2008) Cooperation between a salt bridge and the hydrophobic core triggers fold stabilization in a Trp-cage miniprotein *Biochemistry* 47, 1007– 1016
- <sup>134</sup>Thorens, B., Porret, A., Buhler, L., Deng, S. P., Morel, P., and Widmann, C. (1993) Cloning and functional expression of the human islet GLP-1 receptor. Demonstration that exendin-4 is an agonist and exendin-(9–39) an antagonist of the receptor *Diabetes* 42, 1678– 1682
- <sup>135</sup>Neidigh, J. W., Fesinmeyer, R. M., Prickett, K. S., and Andersen, N. H. (2001) Exendin-4 and glucagon-like-peptide-1: NMR structural comparisons in the solution and micelle-associated states *Biochemistry* 40, 13188– 13200
- <sup>136</sup>Adelhorst, K., Hedegaard, B. B., Knudsen, L. B., and Kirk, O. (1994) Structure-activity studies of glucagon-like peptide-1 *J. Biol. Chem.* 269, 6275– 6278
- <sup>137</sup>Doyle, M. E., Theodorakis, M. J., Holloway, H. W., Bernier, M., Greig, N. H., and Egan, J. M. (2003) The importance of the nine-amino acid C-terminal sequence of exendin-4 for binding to the GLP-1 receptor and for biological activity *Regul. Pept.* 114, 153– 158
- <sup>138</sup>Donnelly, D. (2012) The structure and function of the glucagon-like peptide-1 receptor and its ligands *Br. J. Pharmacol.* 166, 27– 41
- <sup>139</sup>Braun, W., Wider, G., Lee, K. H., and Wüthrich, K. (1983) Conformation of glucagon in a lipid-water interphase by  $^1H$  nuclear magnetic resonance *J. Mol. Biol.* 169, 921– 948
- <sup>140</sup>Thornton, K. and Gorenstein, D. G. (1994) Structure of glucagon-like peptide (7–36) amide in a dodecylphosphocholine micelle as determined by 2D NMR *Biochemistry* 33, 3532– 3539
- <sup>141</sup>Venneti, K. C. and Hewage, C. M. (2011) Conformational and molecular interaction studies of glucagon-like peptide-2 with its N-terminal extracellular receptor domain *FEBS Lett.* 585, 346– 352
- <sup>142</sup>Alana, I., Parker, J. C., Gault, V. A., Flatt, P. R., O'Harte, F. P. M., Malthouse, J. P. G., and Hewage, C. M. (2006) NMR and alanine scan studies of glucose-dependent in-sulinotropic polypeptide in water *Biol. Chem.* 281, 16370– 16376
- <sup>143</sup>Mann R, Nasr N, Hadden D, Sinfield J, Abidi F, Al-Sabah S, de Maturana RL, Treece-Birch J, Willshaw A, Donnelly D. Peptide binding at the GLP-1 receptor. *Biochem Soc Trans.* 2007 Aug;35(Pt 4):713-6



- <sup>144</sup>Fowler, S. B., Poon, S., Muff, R., Chiti, F., Dobson, C. M., and Zurdo, J. Rational design of aggregation-resistant bioactive peptides: Reengineering human calcitonin Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102, 10105–10110(2005)
- <sup>145</sup>Poon, S., Birkett, N. R., Fowler, S. B., Luisi, B. E., Dobson, C. M., and Zurdo, J. (2009) Amyloidogenicity and aggregate cytotoxicity of human glucagon-like peptide-1 (hGLP-1) Protein Pept. Lett. 16, 1548–155
- <sup>146</sup>Hudson, F. M. and Andersen, N. H. (2004) Exenatide: NMR/CD evaluation of the medium dependence of conformation and aggregation state Biopolymers 76, 298–308
- <sup>147</sup>Rosenberg, A. S. (2006) Effects of protein aggregates: An immunologic perspective AAPS J. 8, E501–E507
- <sup>148</sup>Austin BP, Waugh DS Isolation of Metarhizium anisopliae carboxypeptidase A with native disulfide bonds from the cytosol of Escherichia coli BL21(DE3).Protein Expr Purif. 2012 Mar;82(1):116-24.
- <sup>149</sup>Li, Y., Wang, E. & Wang, Y. A modified procedure for fast purification of T7 RNA polymerase.Protein Expr. Purif.16, 355–358 (1999).
- <sup>150</sup>Henrich E, Dötsch V, Bernhard F. Screening for lipid requirements of membrane proteins by combining cell-free expression with nanodiscs. Methods Enzymol. 2015;556:351-69.
- <sup>151</sup>Miconai A, Wien F, Kernya L, Lee YH, Goto Y, Réfrégiers M, Kardos J. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Jun 16;112(24):E3095-103.
- <sup>152</sup>Brand J, Smith ES, Schwefel D, Lapatsina L, Poole K, Omerbašić D, Kozlenkov A, Behlke J, Lewin GR, Daumke O. A sztomatin dimer modulates the activity of acid-sensing ion channels. EMBO J. 2012 Aug 29;31(17):3635-46.
- <sup>153</sup>Jacobson, M. P.; Pincus, D. L.; Rapp, C. S.; Day, T. J. F.; Honig, B.; Shaw, D. E.; Friesner, R. A., A Hierarchical Approach to All-Atom Protein Loop Prediction,Proteins: Structure, Function and Bioinformatics, 2004, 55, 351-367
- <sup>154</sup>Jacobson, M. P.; Friesner, R.A.; Xiang, Z.; Honig, B., "On the Role of Crystal Packing Forces in Determining Protein Sidechain Conformations," J. Mol. Biol., 2002, 320, 597-608
- <sup>155</sup>Zimmermann L, Stephens A, Nam SZ, Rau D, Kübler J, Lozajic M, Gabler F, Söding J, Lupas AN, Alva V. A Completely Reimplemented MPI Bioinformatics Toolkit with a New HHpred Server at its Core. J Mol Biol. 2017 Dec 16.
- <sup>156</sup>Lupas A. (1996) Prediction and Analysis of Coiled-Coil Structures. Methods Enzymol 266:513-525.
- <sup>157</sup>Delorenzi M., Speed T. (2002) An HMM model for coiled-coil domains and a comparison with PSSM-based predictions. Bioinformatics 18(4):617-625.
- <sup>158</sup>A. Krogh, B. Larsson, G. von Heijne, and E. L. L. Sonnhammer.Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes.Journal of Molecular Biology, 305(3):567-580, January 2001.
- <sup>159</sup>Dosztányi Zs, Csizmók V, Tompa P and Simon I J. The Pairwise Energy Content Estimated from Amino Acid Composition Discriminates between Folded and Intrinsically Unstructured Proteins Mol. Biol. (2005) 347, 827-839.
- <sup>160</sup>Dosztányi Zs, Csizmók V, Tompa P and Simon I IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content Bioinformatics (2005) 21, 3433-3434.
- <sup>161</sup>Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein.J Mol Biol. 1982 May 5;157(1):105-32.
- <sup>162</sup>H Nielsen, D In Kihara: Predicting Secretory Proteins with SignalP Protein Function Prediction Methods in Molecular Biology vol. 1611 pp. 59-73, 2017.
- <sup>163</sup>J Klose,N Wendt,S Kubald,E Krause,K Fechner,M Beyermann,M Bienert,R Rudolph, S Rothemund Hexa-histidin tag position influences disulfide structure but not binding behavior of in vitro folded N-terminal domain of rat corticotropin-releasing factor receptor type 2a Protein Sci. 2004 13(9): 2470–2475.
- <sup>164</sup>Greenfield NJ.Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. Nat Protoc. 2006;1(6):2876-90.
- <sup>165</sup>Greenfield NJ.Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. Anal Biochem. 1996 Mar 1;235(1):1-10.
- <sup>166</sup>Barua B, Lin JC, Williams VD, Kummeler P, Neidigh JW, Andersen NH. The Trp-cage: optimizing the stability of a globular miniprotein. Protein Eng Des Sel. 2008 Mar;21(3):171-85.
- <sup>167</sup>Jákli I, Perczel A.The inherent flexibility of peptides and protein fragments quantized by CD in conjunction with CCA+. J Pept Sci. 2009 Nov;15(11):738-52. doi: 10.1002/psc.1169.