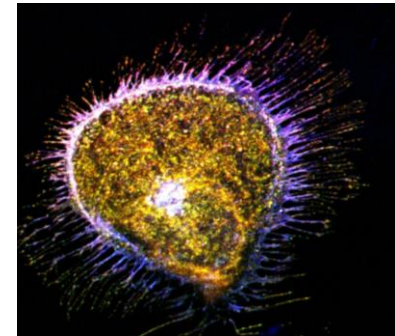
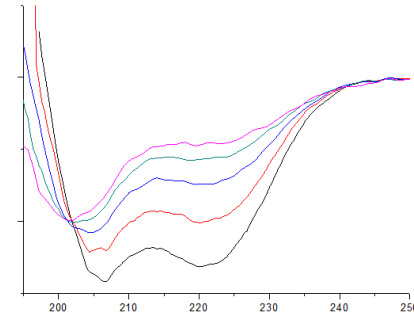
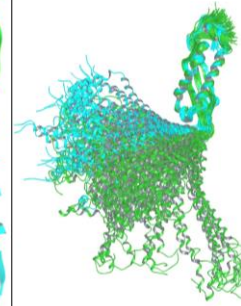
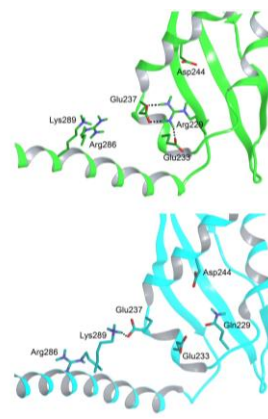


A podocin térszerkezete,

dimerizációja

és membrán-lokalizációja

közötti kapcsolat



Harmat Veronika, Karancsiné Menyhárd Dóra, Stráner Pál, Tory Kálmán

MTA-ELTE Fehérjemodellező Kutatócsoport

Semmelweis Egyetem, I. sz. Gyermekklinika

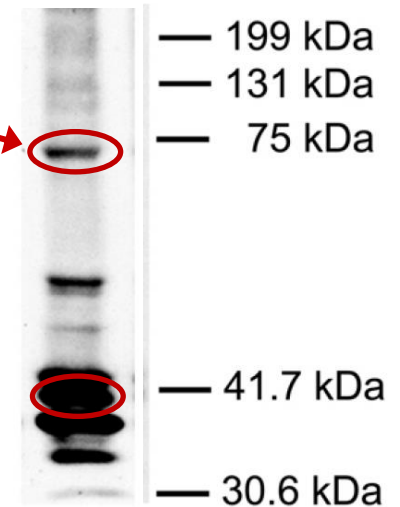
Imagine Institut, Paris

# Podocin, a nephrosis szindrómában leggyakrabban mutáns podocyta-fehérje

- mutációi a szteroid-rezisztens nephrosis szindróma 12-18%-áért felelősek
- kódoló gén: *NPHS2*, autoszomális recesszív öröklésmenet

- podocin:

- membránfehérje
- részmembrán alkotóeleme
- a stomatin-család tagja
- homodimert képez

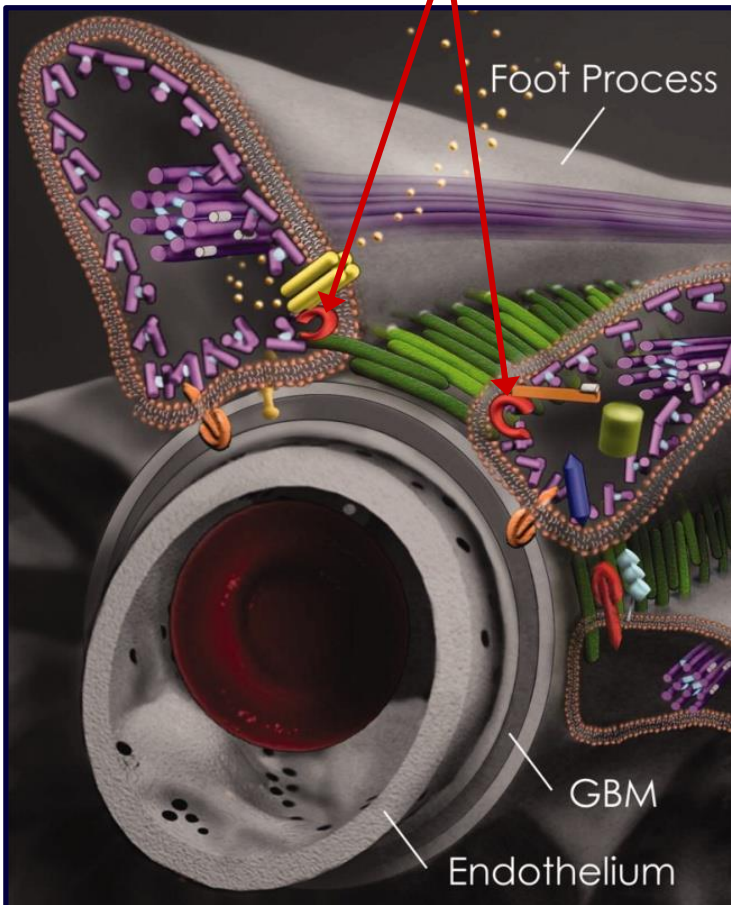


Boute et al, Nat Genet 2000

Möller et al, J Am Soc Nephrol 2009

Schwartz et al, J Clin Invest 2001

Nishibori et al, Kidney Int 2004



## Az *NPHS2* variánsok két különböző súlyosságú betegséget okozhatnak

	<b>korai nephrosis</b>	<b>késői nephrosis</b>
a végstádiumú veseelégtelenség kialakulása	<10 év	3-4. évtized
genotípus	[mutáció];[mutáció]	<b>[p.R229Q];[mutáció]</b> Tsukaguchi et al, J Clin Invest 2002

<b>Allélfrekvencia az átlagpopulációban</b>		
p.R229Q	357/12649	2.7%
<i>NPHS2</i> mutációk	24/13006	0.18%

# A vizsgálataink alapjául szolgáló epidemiológiai ellentmondás

	korai nephrosis	késői nephrosis
a végstádiumú veseelégtelenség kialakulása	<10 év	3-4. évtized
genotípus	[mutáció];[mutáció]	[p.R229Q];[mutáció]
várt prevalencia	1 / 300.000	1 / 10.000
megfigyelt (közölt) családok száma	247	71

30x <

3x >

Az [p.R229Q];[mutáció] asszociáció az esetek többségében nem okozhat betegséget

# Az [p.R229Q];[mutáció] asszociáció bizonyos esetekben nem patogén

	korai nephrosis	késői nephrosis
a végstádiumú veseelégtelenség kialakulása	<10 év	3-4. évtized
genotípus	[mutáció];[mutáció]	[p.R229Q];[mutáció]
várt prevalencia	1 / 300.000	1 / 10.000
megfigyelt (közölt) családok száma	247	71

*Note: In the original image, a red circle highlights the '1 / 10.000' prevalence value for late-stage nephrosis, and a blue arrow points from it to the explanatory text below. Additionally, red symbols are present: a red '<' symbol between the prevalence values, and a red '>' symbol between the number of families.*

Az [p.R229Q];[mutáció] asszociáció az esetek többségében nem okozhat betegséget

**Valóban: beteg gyermekek 7/133 egészséges hozzátartozójában találtunk [p.R229Q];[mutáció] asszociációt**

# A társult mutációk felelősek az R229Q patogenitásáért!

	korai nephrosis	késői nephrosis
a végstádiumú veseelégtelenség kialakulása	<10 év	3-4. évtized
genotípus	[mutáció];[mutáció]	[ <b>p.R229Q</b> ]; [bizonyos 3' mutációk]

mutáns allélok száma

	247 beteg [mut];[mut]		71 beteg [p.R229Q];[mut]	
	<i>n</i>	arány	<i>n</i>	arány
1-6 . exonok	419	85%	8	11%
<b>7-8. exonok</b>	<b>75</b>	<b>15%</b>	<b>63</b>	<b>89%</b>

**$P = 1.2 \times 10^{-35}$**

# Az R229Q variáns C-terminális aminosavcserékhez társulva patogén

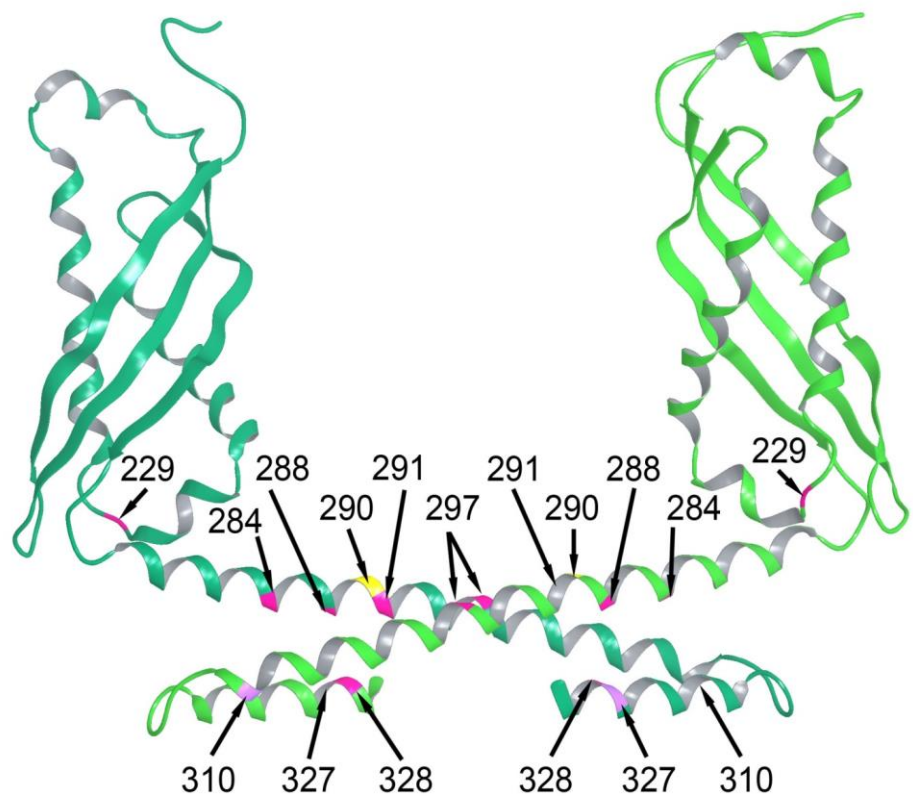
		mutáns allélok száma				p
		247 beteg [mut];[mut]		71 beteg [p.R229Q];[mut]		
		n	százalék	n	százalék	
7. exon	mutációk					
	p.V268Dfs*16	2	0.4%	0		1
	p.V268G	2	0.4%	0		1
	p.L270F	0	0.0%	1	1.4%	0.12
	p.P271L	1	0.2%	0		1
	p.H276L	2	0.4%	0		1
	p.E281A	2	0.4%	0		1
	<b>p.A284V</b>	<b>8</b>	<b>1.6%</b>	<b>26</b>	<b>36.6%</b>	<b>3.3 x 10<sup>-19</sup></b>
	p.R286Tfs*17	20	4.0%	3	4.2%	1
	<b>p.A288T</b>	<b>0</b>		<b>4</b>	<b>5.6%</b>	<b>0.0002</b>
p.K289*	2	0.4%	0		1	
p.V290M	13	2.6%	0		0.39	
<b>p.R291W</b>	<b>1</b>	<b>0.2%</b>	<b>4</b>	<b>5.6%</b>	<b>0.001</b>	
8. exon	p.A295T	0		1	1.4%	0.12
	<b>p.A297V</b>	<b>0</b>		<b>4</b>	<b>5.6%</b>	<b>0.0002</b>
	p.A300P	0		1	1.4%	0.12
	p.A301del	4	0.8%	0		1
	p.L305P	0		1	1.4%	0.12
	p.E310A	0		1	1.4%	0.12
	<b>p.E310K</b>	<b>0</b>		<b>5</b>	<b>7.0%</b>	<b>2.8 x 10<sup>-5</sup></b>
	<b>p.E310V</b>	<b>0</b>		<b>2</b>	<b>2.8%</b>	<b>0.016</b>
	p.A317Lfs*31	7	1.4%	0		1
	p.L321Ffs*27	0		1	1.4%	0.12
	p.R322G	2	0.4%	1	1.4%	0.33
	p.L324EdelinsH	1	0.2%	0		1
	<b>p.L327F</b>	<b>0</b>		<b>3</b>	<b>4.2%</b>	<b>0.002</b>
	<b>p.Q328R</b>	<b>0</b>		<b>2</b>	<b>2.8%</b>	<b>0.016</b>
	p.F344Lfs*4	0		1	1.4%	0.12
	p.L346Yfs*2	0		1	1.4%	0.12
p.P372Ifs*16	1	0.2%	0		1	

# Az 'R229Q-társult mutációk' a helikális régióban találhatóak

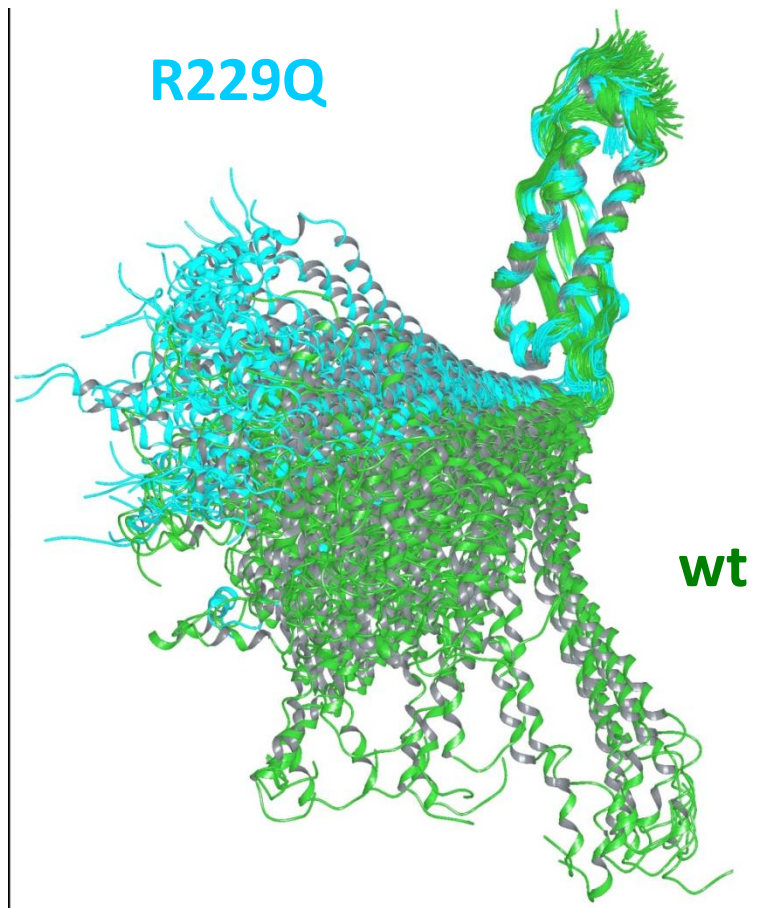
# Az R229Q hatására a helikális régió flexibilitása csökken



homológia-modell alapján számolt régió



A podocin-homodimer szerkezete



A *Pyrococcus horikoshii* stomatin-dimer szerkezete alapján (Yokoyama et al, *J Mol Biol*, 2008)



# A patogén dimerek szerkezete kóros

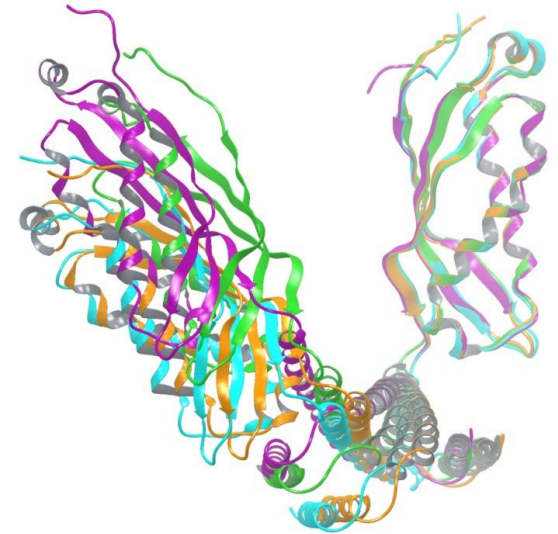
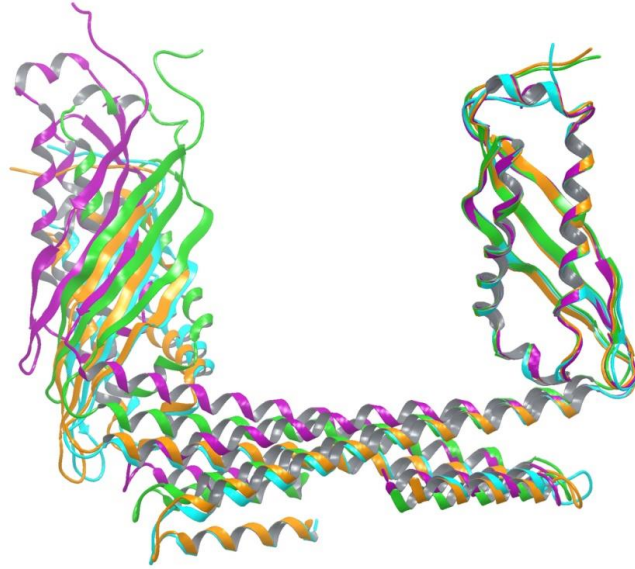
nem patogén dimerek

**podocin**<sup>R229Q/R229Q</sup>

**podocin**<sup>V290M/R229Q</sup>

**podocin**<sup>A284V/wt</sup>

**podocin**<sup>wt/wt</sup>

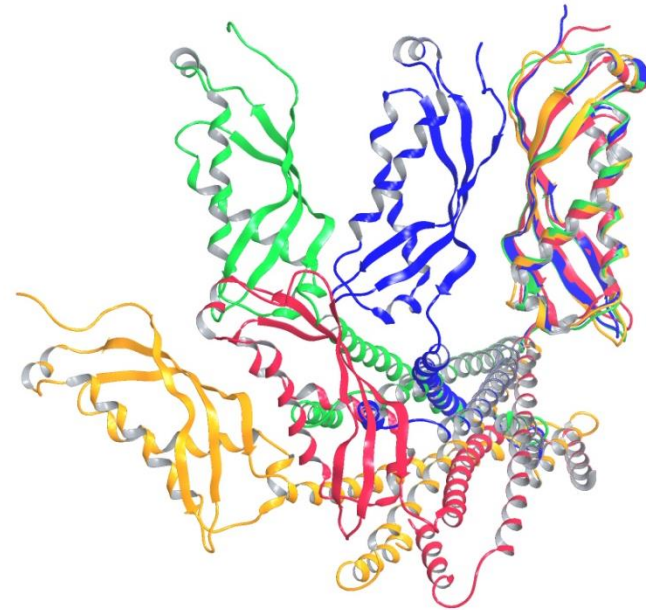
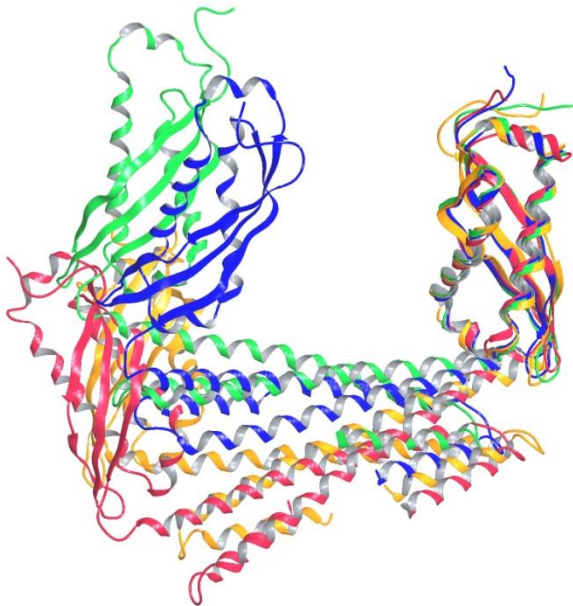


patogén dimerek

**podocin**<sup>A284V/R229Q</sup>

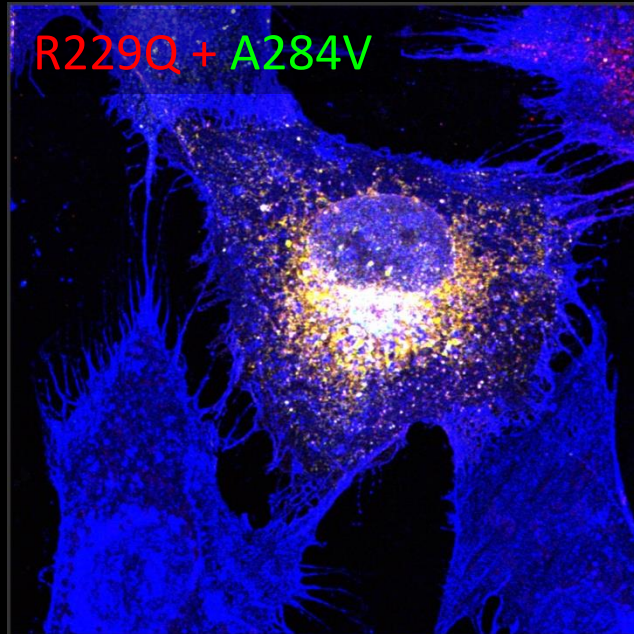
**podocin**<sup>A297V/R229Q</sup>

**podocin**<sup>A284V/A284V</sup>

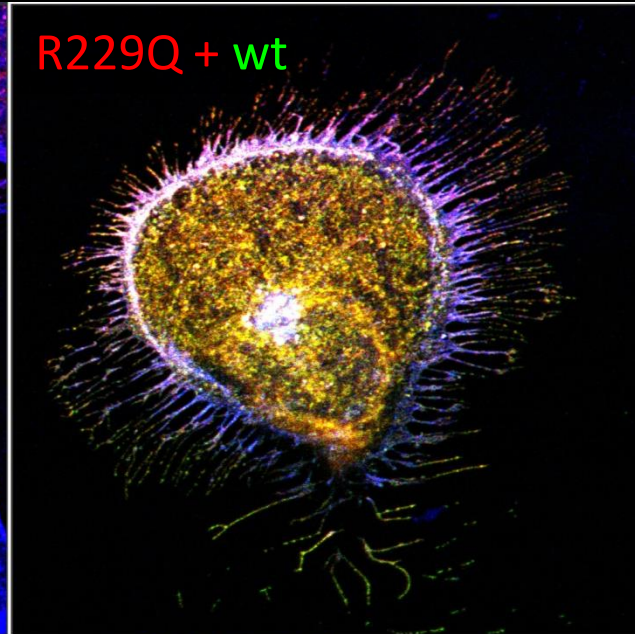


# A patogén dimerek nem jutnak ki a sejtmembránba

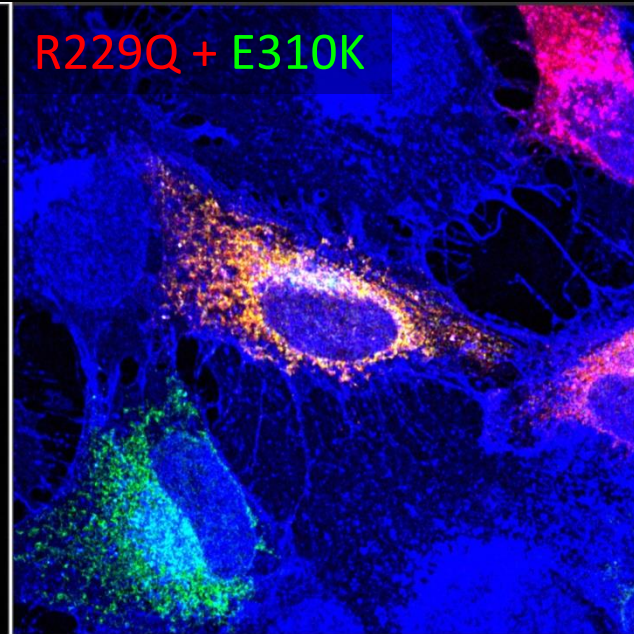
R229Q + A284V



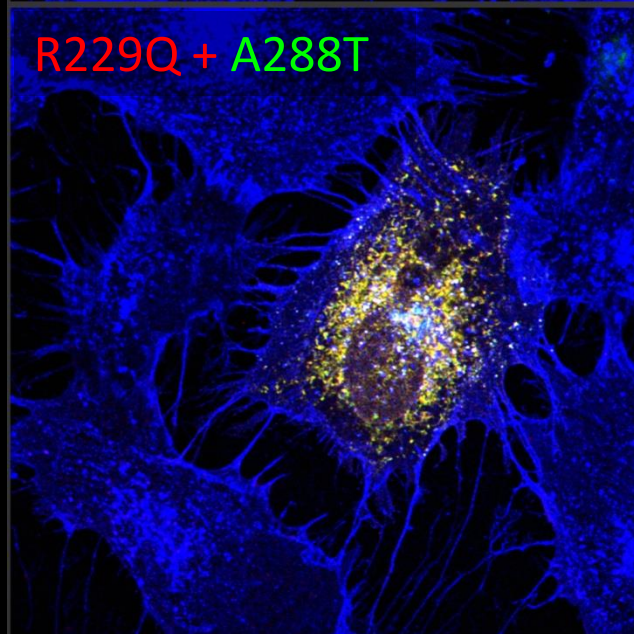
R229Q + wt



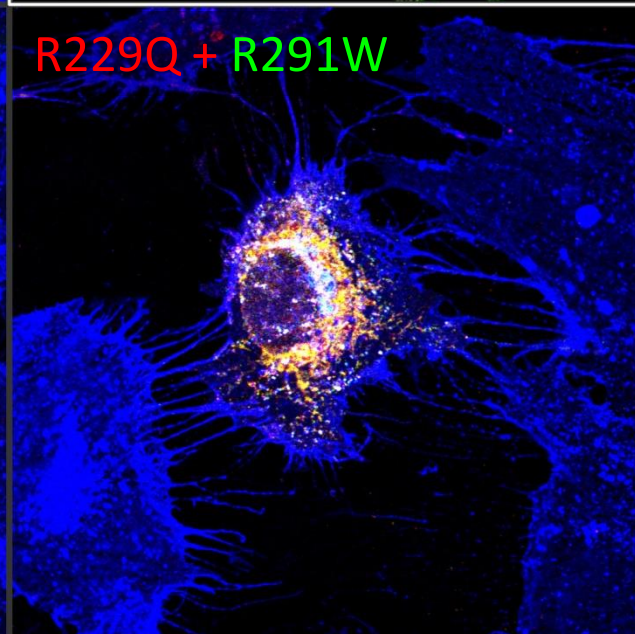
R229Q + E310K



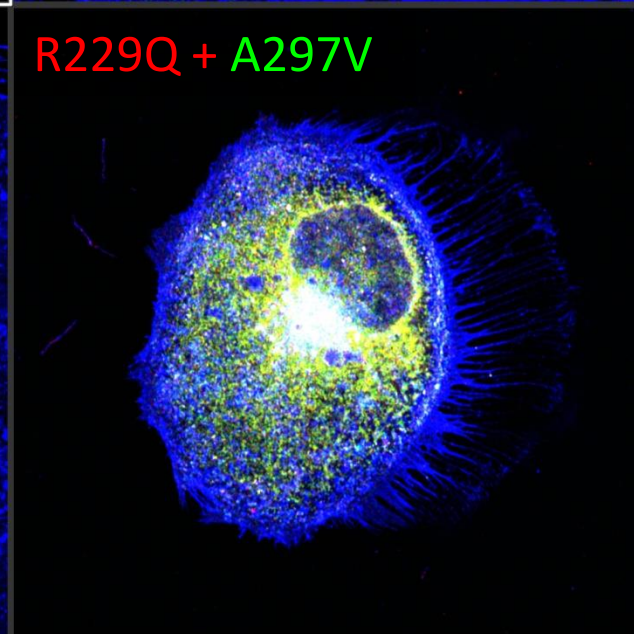
R229Q + A288T



R229Q + R291W



R229Q + A297V



	mutációk	256 beteg[mut];[mut]		89 beteg [Arg229Gln];[mut]		p	az R229Q;mutáció asszociációk patogenitása
		allél frekvencia	% of all (n=512)	allélfrekvencia	% of all (n=87)		
exon 7	p.Val268Asp*16	2	0,4%	0		1	valószínűleg nem patogén
	p.Val268Gly	2	0,4%	0		1	
	p.Leu270Phe	0	0,0%	1	1,1%	0.15	
	p.His276Alafs*8	2	0,4%	0		1	valószínűleg nem patogén
	p.Ala284Val	10	2,0%	28	31,5%	1.5 x 10 <sup>-17</sup>	
	p.Arg286Thrfs*17	20	3,9%	3	3,4%	1	<b>biztosan nem patogén</b>
	p.Ala288Thr	0		4	4,5%	0.0004	
	p.Lys289*	2	0,4%	0		1	valószínűleg nem patogén
	p.Val290Met	13	2,5%	0		0.23	
	p.Arg291Trp	1	0,2%	4	4,5%	0.002	
exon 8	p.Ala297Val	0		6	6,7%	9.1 x 10 <sup>-6</sup>	
	p.A301del	4	0,8%	0		1	
	p.Ala317Leufs*31	7	1,4%	0		0.6	<b>biztosan nem patogén</b>
	p.Leu321Phefs*27	0		1	1,1%	0.15	valószínűleg patogén
	p.Arg322Gly	2	0,4%	2	1,1%	0.38	
	p.Leu324Hisfs*20	1	0,2%	0		1	
	p.Leu327Phe	0		3	3,4%	0.003	
	p.Gln328Arg	0		2	2,2%	0.02	
	p.Phe344Leufs*4	0		13	14,6%	7.5 x 10 <sup>-12</sup>	<b>biztosan patogén</b>
	p.Leu346Tyrfs*2	0		1	1,1%	0.15	valószínűleg patogén
p.Pro372Ilefs*16	1	0,2%	0		1		

# Az R229Q-val nem patogén, C-terminális trunkáns podocinok várhatóan gyenge komplexet képeznek

Az R229Q-val patogén misszensz mutációk

vad podocin



p.R286Tfs\*17



nem patogén az R229Q-val

p.A317Lfs\*31

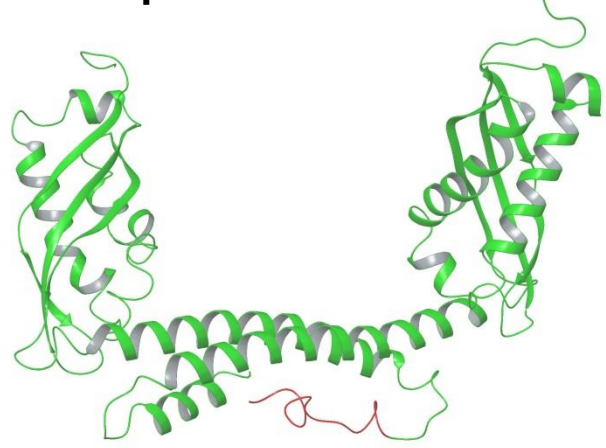


nem patogén az R229Q-val

p.R286Tfs\*17

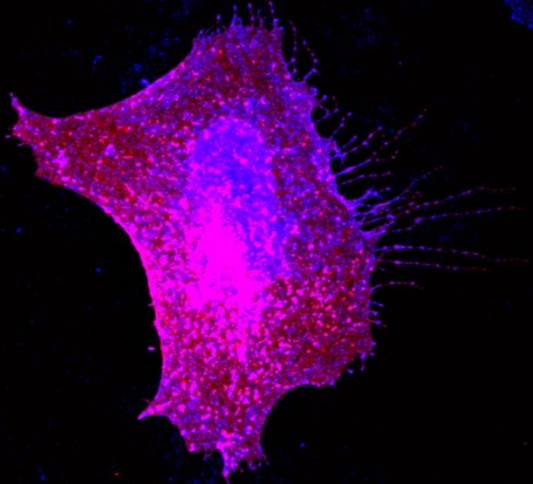


p.A317Lfs\*31

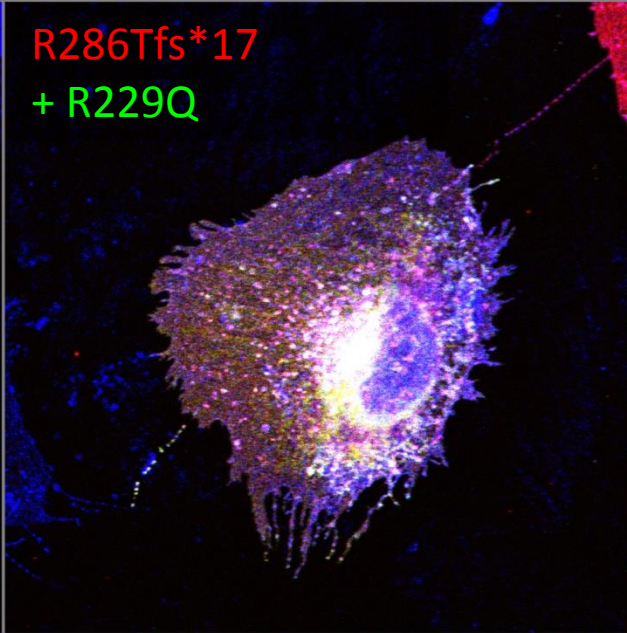


# Az R286fs mutáns podocin valóban nem kolokalizálódik más podocinokkal

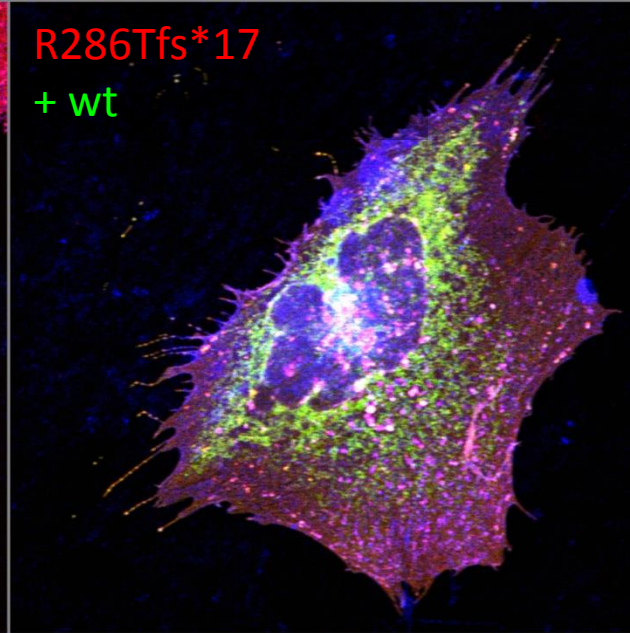
R286Tfs\*17



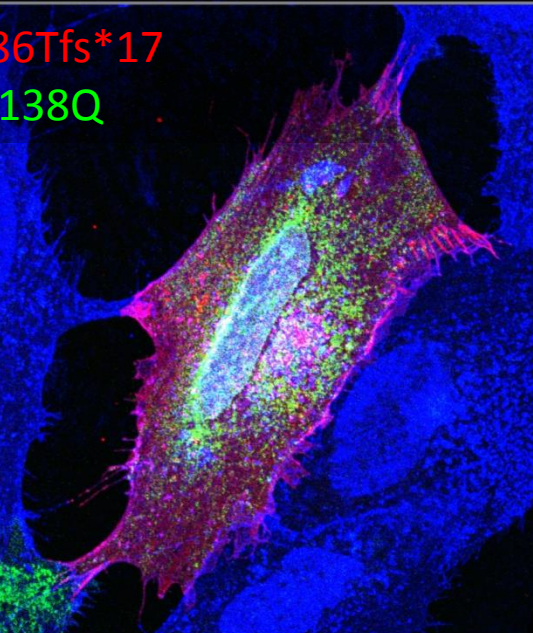
R286Tfs\*17  
+ R229Q



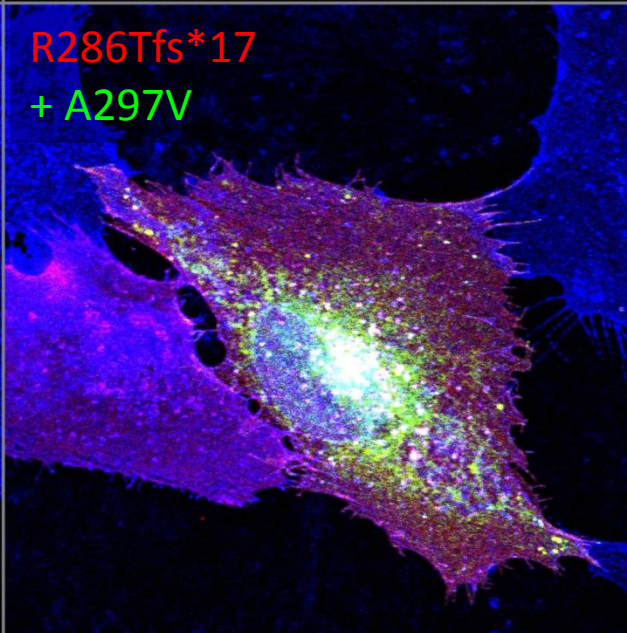
R286Tfs\*17  
+ wt



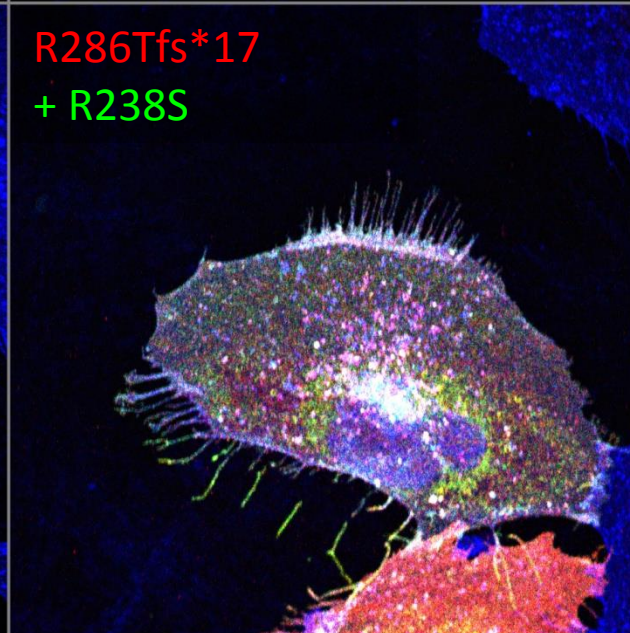
R286Tfs\*17  
+ R138Q



R286Tfs\*17  
+ A297V



R286Tfs\*17  
+ R238S



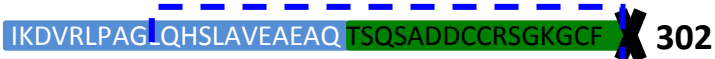
# A 321fs mutáció várhatóan erősebb komplexet képez az R229Q podocinnal

Az R229Q-val patogén misszensz mutációk

natív podocin



p.R286Tfs\*17



nem patogén az R229Q-val

p.A317Lfs\*31



nem patogén az R229Q-val

p.L321Ffs\*27

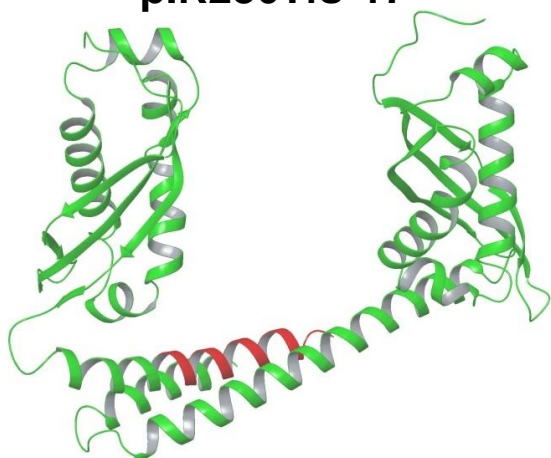


patogén az R229Q-val

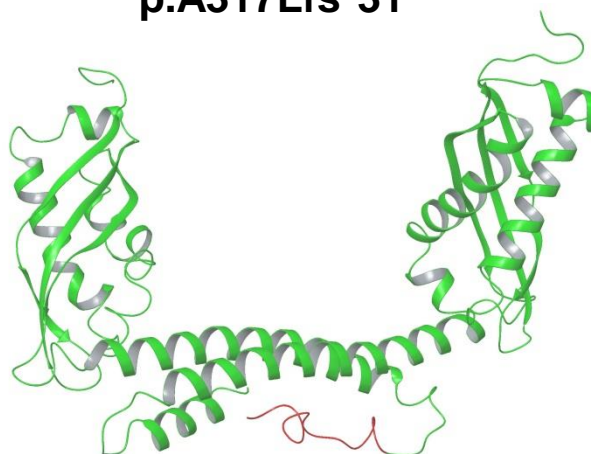
nem helikális - gyenge komplex R229Q-val

helikális - erősebb komplex R229Q-val

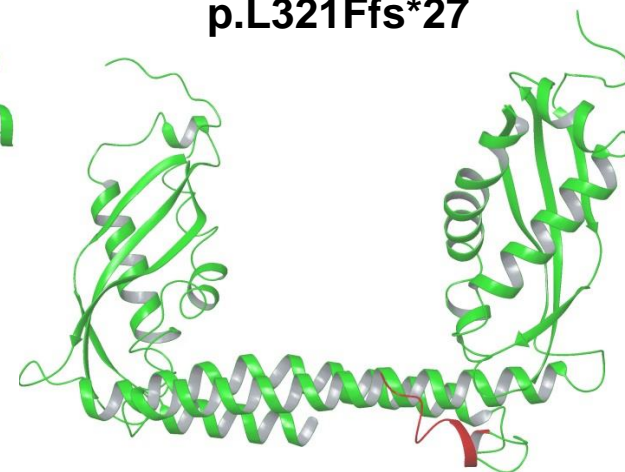
p.R286Tfs\*17



p.A317Lfs\*31



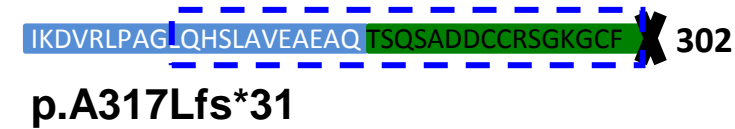
p.L321Ffs\*27



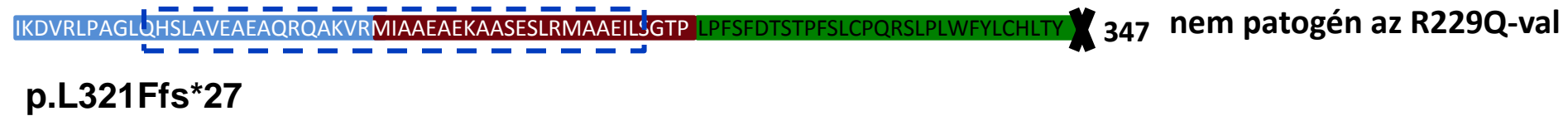
# A 344fs mutáció a harmadik hélixben lévő aminosavakat érinti

Az R229Q-val patogén misszensz mutációk

natív podocin



nem patogén az R229Q-val



nem patogén az R229Q-val

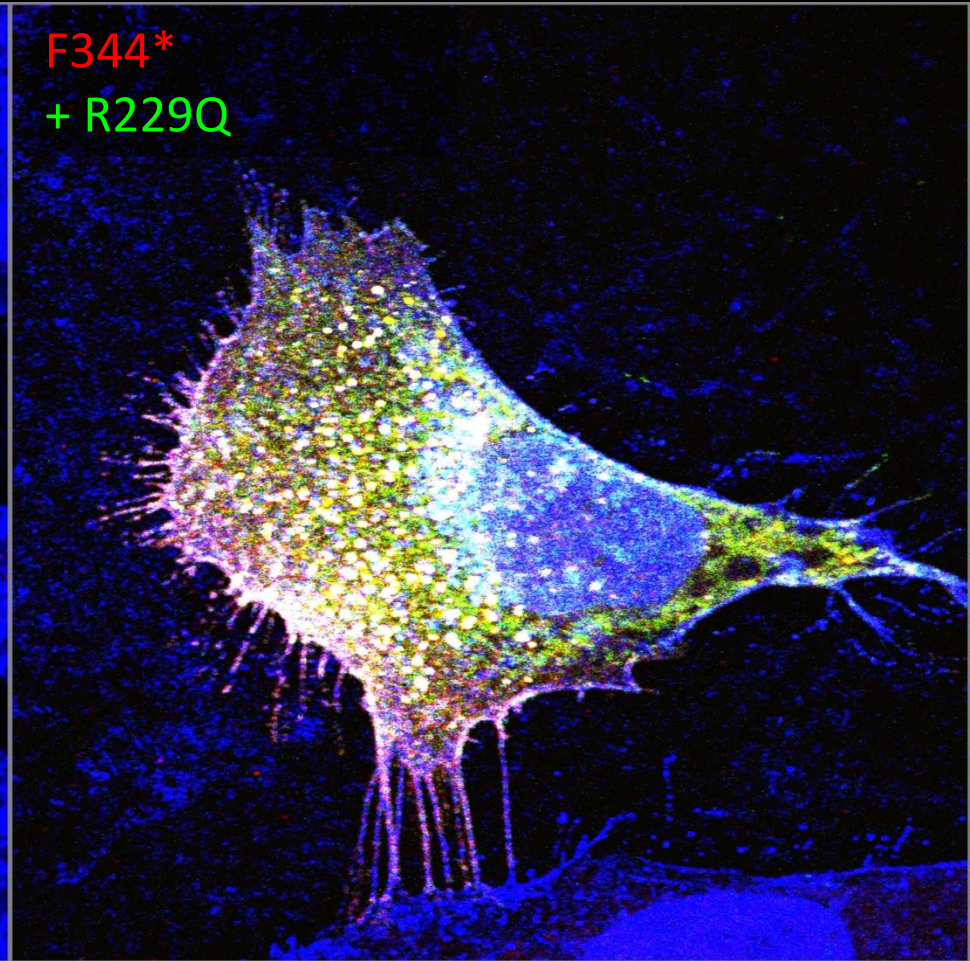
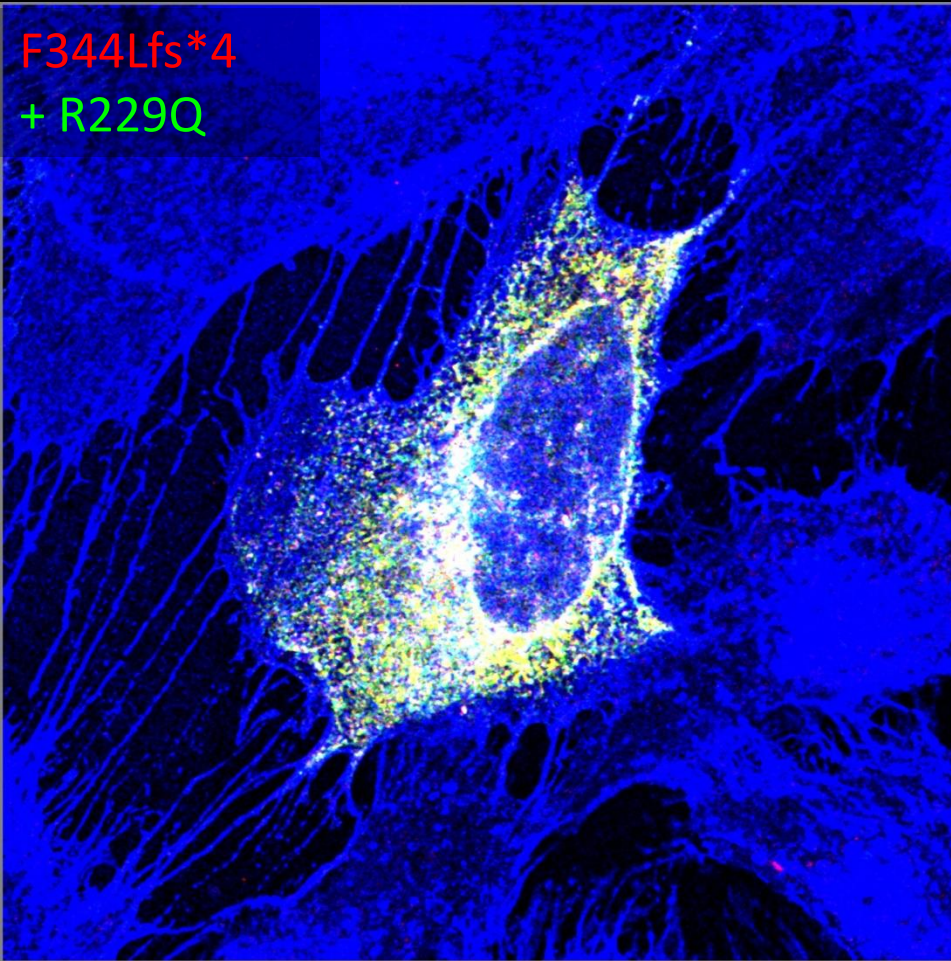


patogén az R229Q-val



patogén az R229Q-val

# A 344fs podocin R229Q podocinra gyakorolt hatásáért az LTY szekvencia felelős



p.F344Lfs\*4

265 291 292  
IKDVRLPAGLQHS�AVEAEAQRQAKVRMIAAAEAKAASESLRMAAEILSGTPAAVQLRYLHTLQSLSTEKPSTVVLPLP LTY X

p.F344\*

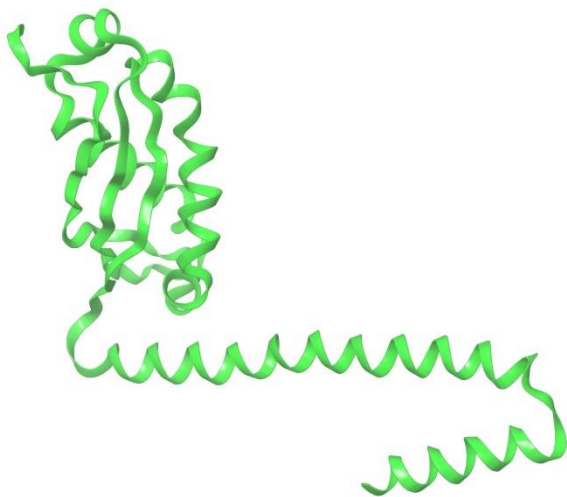
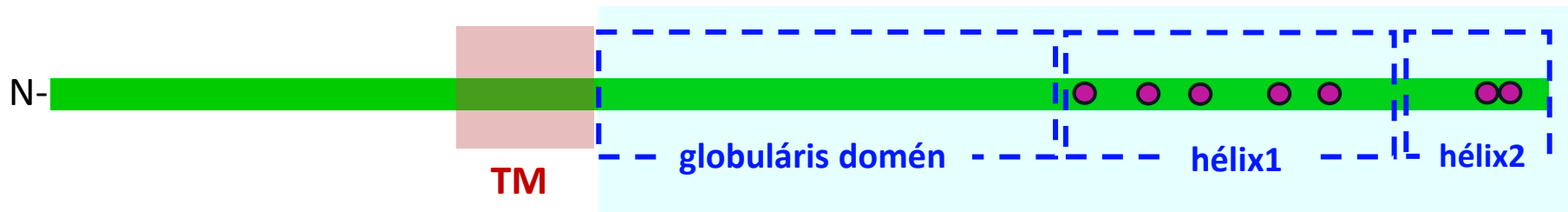
265 291 292  
IKDVRLPAGLQHS�AVEAEAQRQAKVRMIAAAEAKAASESLRMAAEILSGTPAAVQLRYLHTLQSLSTEKPSTVVLPLP X



A patogén dimerek stabilabb komplexet képeznek-e?

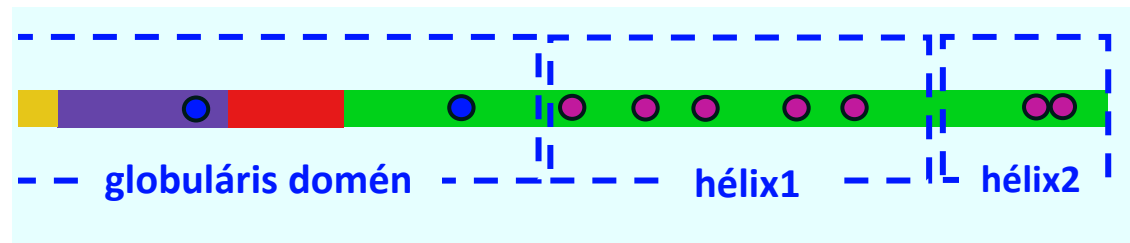
# A podocin expressziója

1. intracelluláris domének expressziója *E. coli* rendszerben
2. megfelelő konstrukció(k) kialakítása – fúziós tag-ek
3. expresszió optimalizálása, tisztítási protokoll kidolgozása



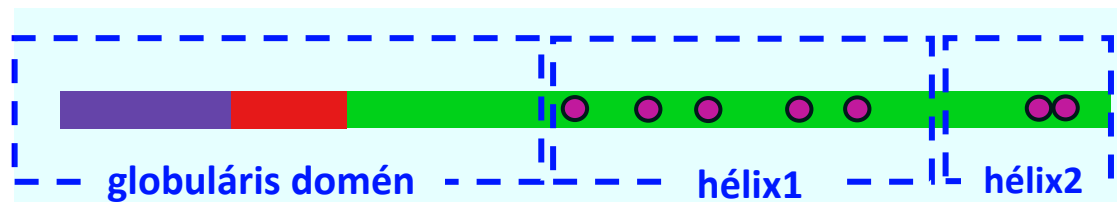
## A teljes modellezett szakasz előállítása sikertelen

- 2 szabad cisztein → pontmutáció → szerin
- aggregálódó, rendezetlen részek elhagyása

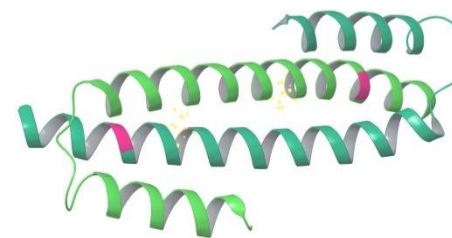
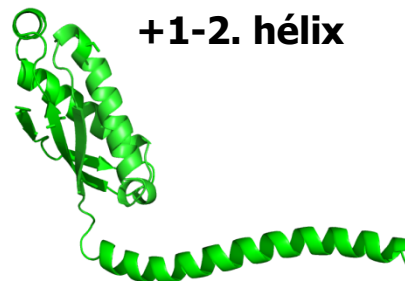
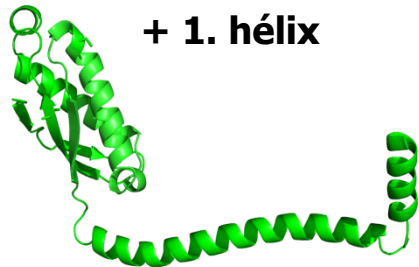


TYHKVDLRLQ TLEIPFHEIV TKDMFIMEID AICYYRMENA SLLSSLAHV SKAVQFLVQT TMKRLLAHRS LTEILLERKS  
IAQDAKVALD SVTCIWGIKV ERIEIKDVRL PAGLQHSLAV EAEAQRQAKV RMIAAEAEAKA ASESLRMAAE ILSGTPAAVQ  
LRYLHTLQSL

# Podocin dimerizáció – expresszió, tisztítás, spektroszkópai vizsgálatok



**globuláris**



globuláris domén + coiled-coil szakasz

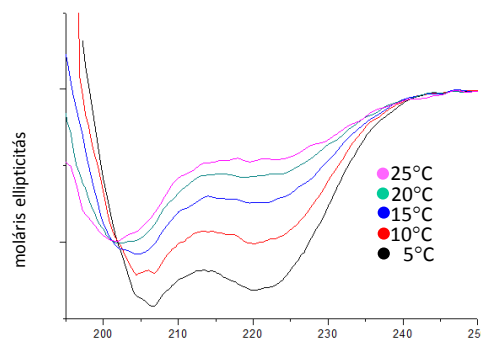
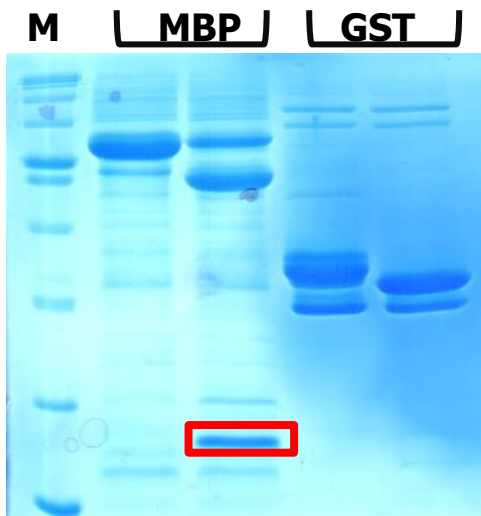
előállítás MBP fúziós rendszerrel

jelenleg: tisztítás optimalizálása, pontmutánsok kialakítása

coiled-coil szakasz

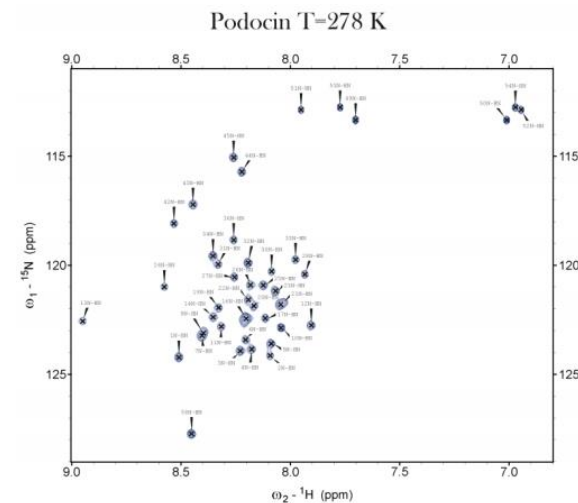
előállítás GST fúziós rendszerrel

jelenleg: NMR, ECD, GFC



**ECD:**

coiled-coil, mutáció-  
függő termális stabilitás



**NMR:** anti-parallel, coiled-coil dimer

# *Folyamatban lévő vizsgálatok*

- A trunkáns podocinok membrán-lokalizációjának számítása
- Az endocytosis gátlása révén annak eldöntése, hogy a kóros podocin-dimerek internalizálódnak, vagy ki sem jutnak a membránba
- A podocin-dimerek termális stabilitásának meghatározása CD-spektroszkópiával
- A podocin-dimerek struktúrájának vizsgálata NMR-rel és krisztallográfiával



# Köszönjük!



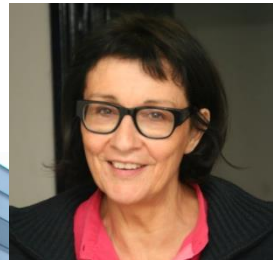
MTA-ELTE Fehérje-  
modellező Kutatócsoport  
és  
Szerkezeti Kémia és  
Biológia Laboratórium

## Inserm

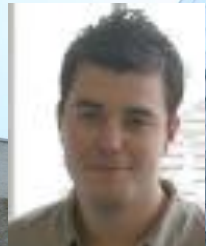
Institut national  
de la santé et de la recherche médicale



Christelle Arrondel



Corinne Antignac



Fabien Nevo



Géraldine Mollet



Stéphanie Woerner



András Perczel



Harmat Veronika



K Menyhárd Dóra



Pál Stráner



Andrea Kerti



imagine  
INSTITUT DES MALADIES GÉNÉTIQUES