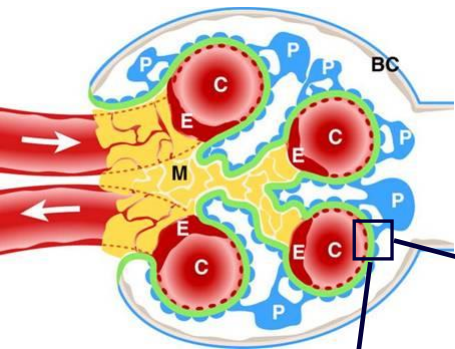


A párválasztás fontossága. A podocin-dimerizáció jótékony és káros hatása a membrán-lokalizációra.

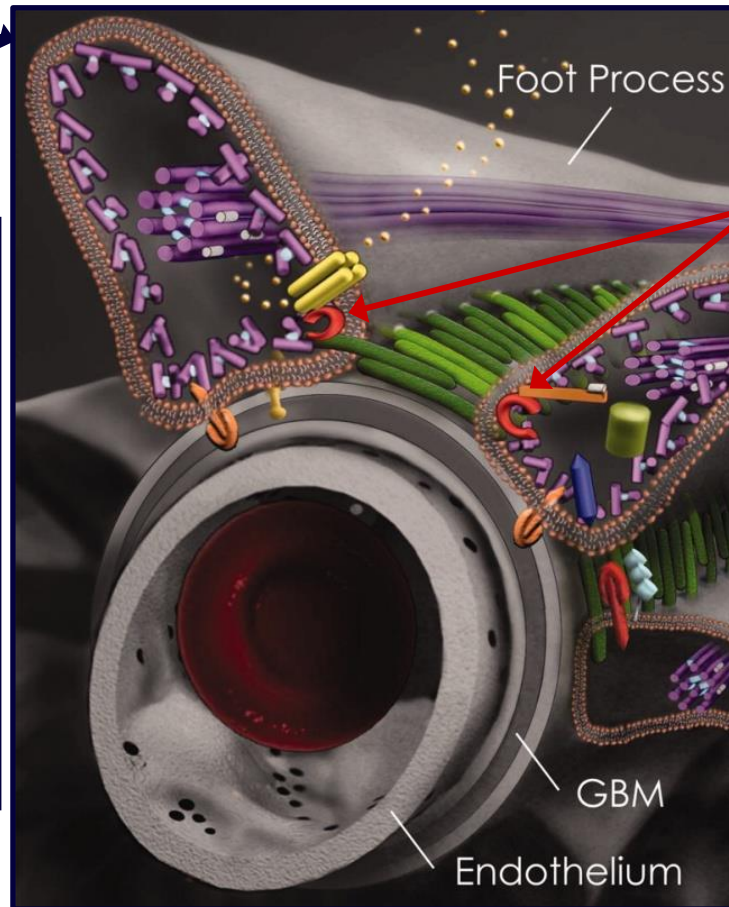
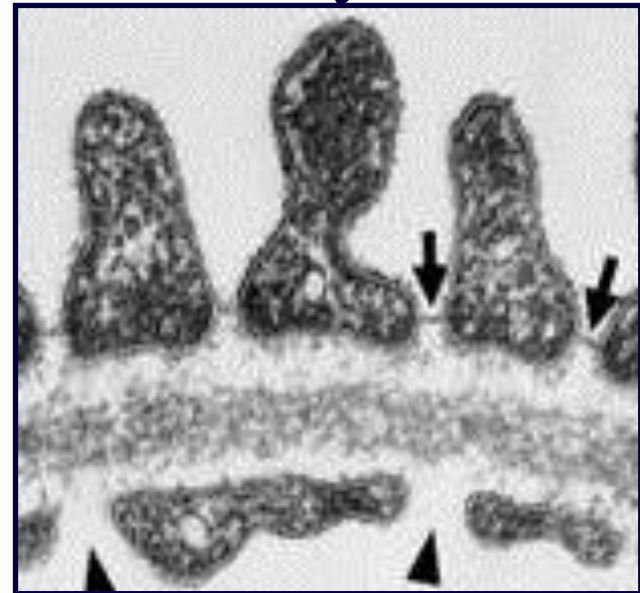
Harmat Veronika, Karancsiné Menyhárd Dóra, Stráner Pál, Tory Kálmán

MTA-ELTE Fehérjemodellező Kutatócsoport
MTA-SE Lendület Nephrogenetikai Kutatócsoport
Semmelweis Egyetem, I. sz. Gyermekklinika
Imagine Institut, Paris

Podocin, a nephrosis szindrómában leggyakrabban mutáns podocyta-fehérje



- a szteroid-rezisztens nephrosis 12-18%-áért felelős
- autoszomális recesszív öröklésmenet



podocin:

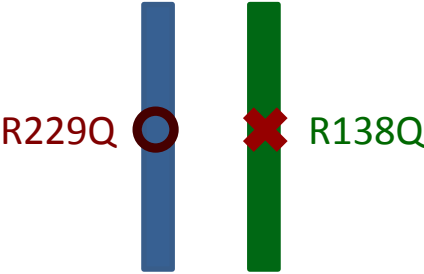
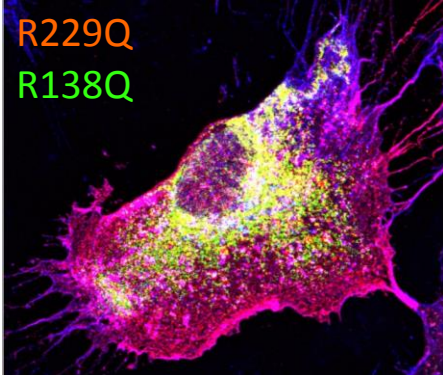
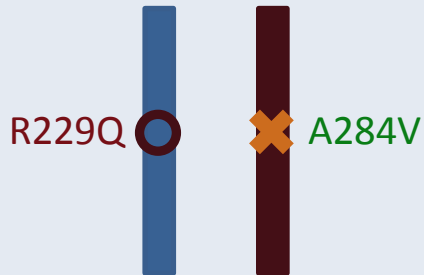
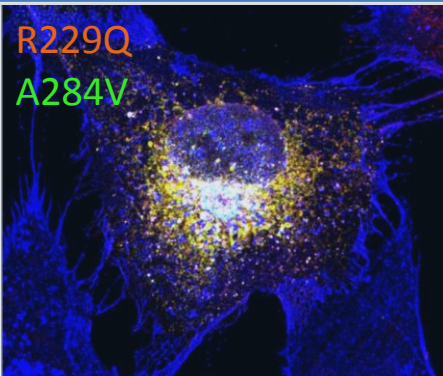
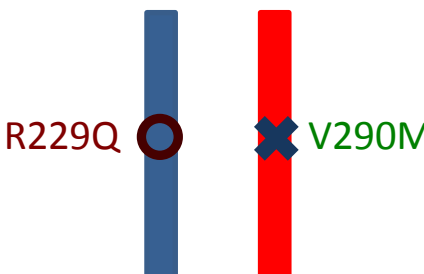
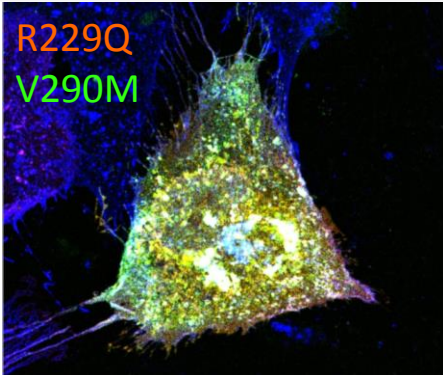
- membrán-asszociált
- részmembrán építőeleme
- stomatin család tagja
- homodimerizálódik

Boute et al, Nat Genet 2000

Möller et al, J Am Soc Nephrol 2009

Az R229Q podocin csak akkor delokalizált, ha kóros heterodimert képez

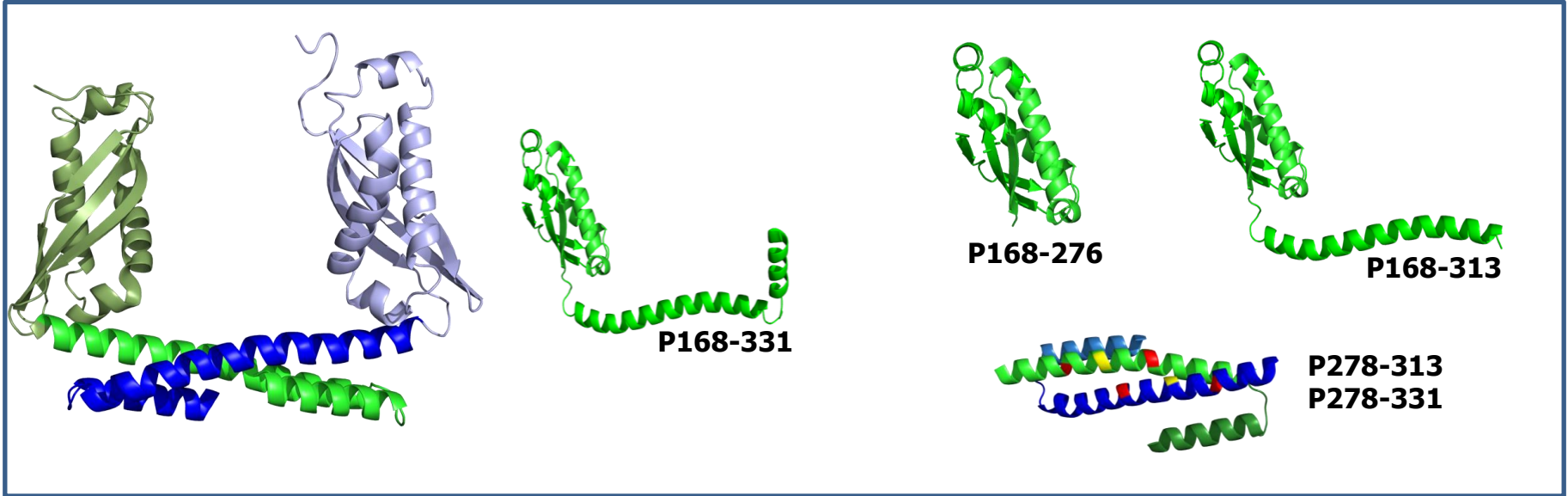
kóros dimerizáció → kóros lokalizáció

genotípus	heterodimerizáció	podocin lokalizáció	klinikai állapot
 <p>R229Q R138Q</p>	nem képez heterodimert	 <p>R229Q R138Q</p>	egészséges
 <p>R229Q A284V</p>	kóros	 <p>R229Q A284V</p>	FSGS
 <p>R229Q V290M</p>	normális	 <p>R229Q V290M</p>	egészséges

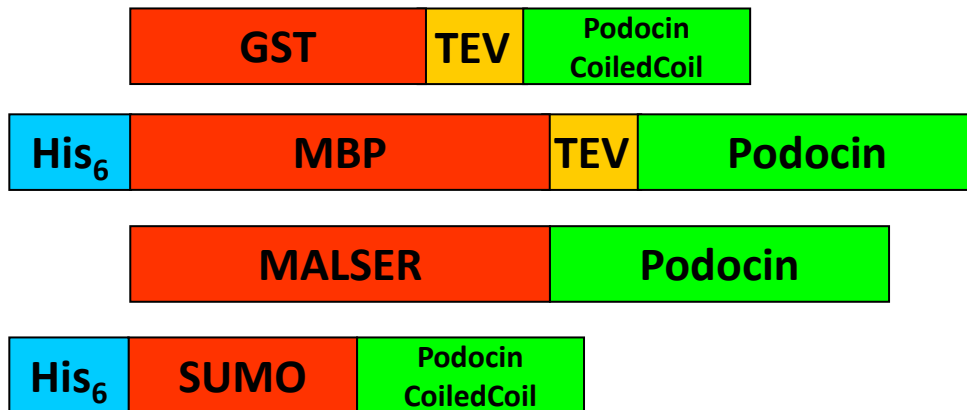
Fél évvel ezelőtt kitűzött céljaink

1. A podocin-dimerek termális stabilitásának meghatározása

Podocin domének előállításása



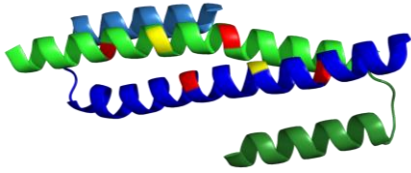
Alkalmazott fúziós rendszerek



➤ Expresszió E. coli rendszerben
 ➤ Cél: nagy mennyiségű fehérje hatékony előállítására szerkezetvizsgálatokhoz:

- NMR
- X-ray
- ECD

CD-spektroszkópia: valóban coiled coilt képez a C-terminális régió

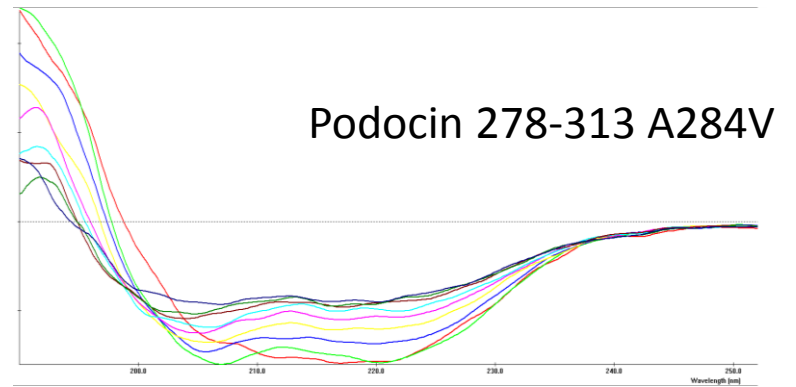
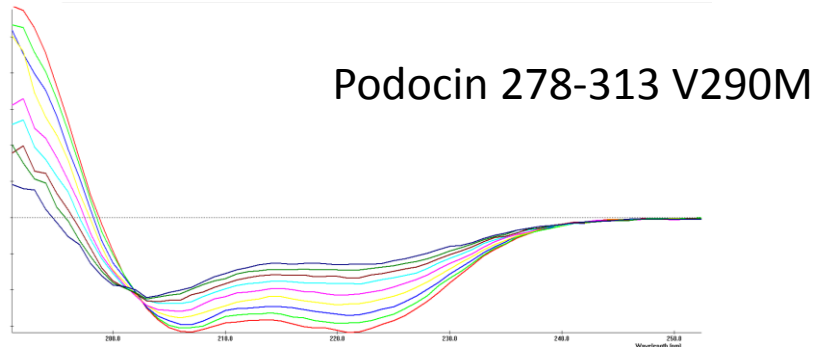
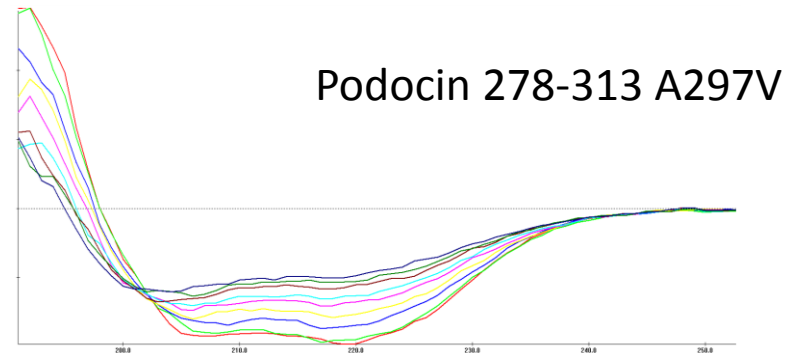
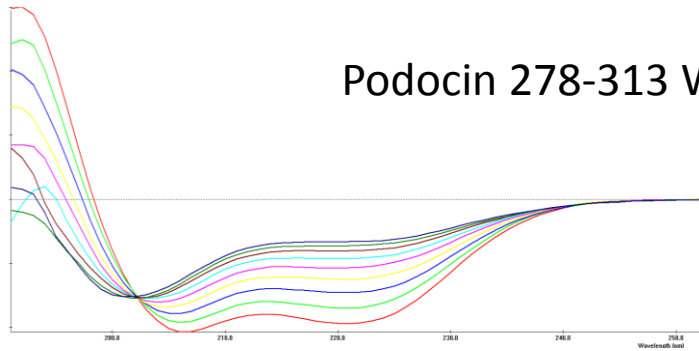


Podocin 278-331:

QYSLAV EAEAQRQAKV RMIAAEAEKA ASES LRMAAE ILS GTPAAVQ LRYLHTLQSL S

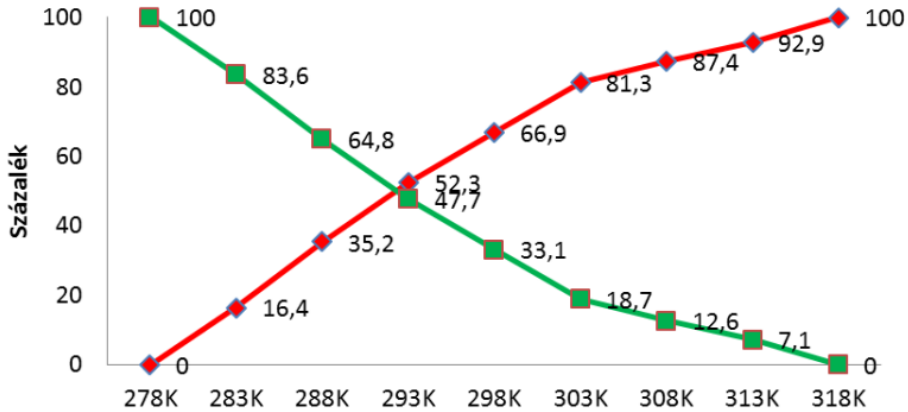
Podocin 278-313:

QYSLAV EAEAQRQAKV RMIAAEAEKA ASES LRMAAE ILS

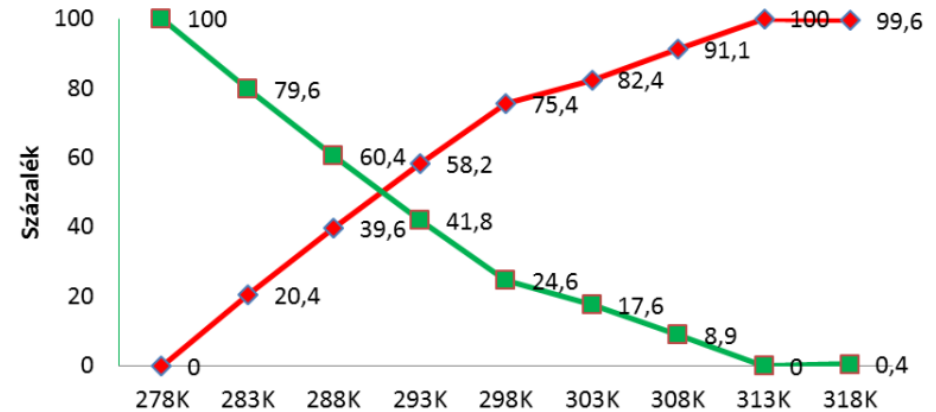


A patogén homodimerek termális stabilitása alacsonyabb

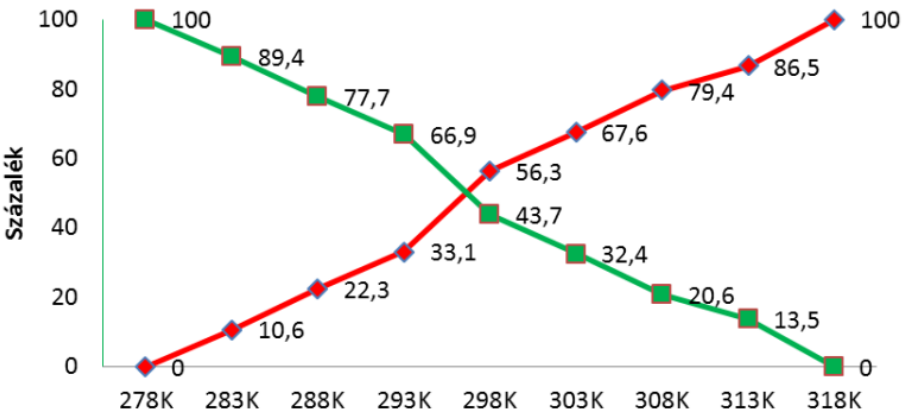
Podocin(278-313)_WT 278-318K CCA %



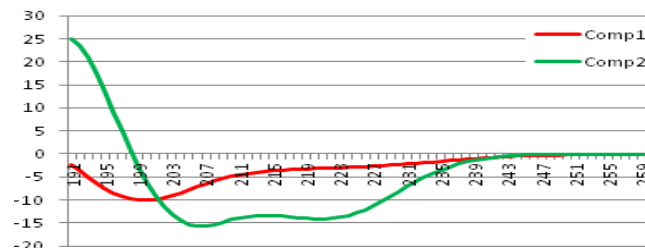
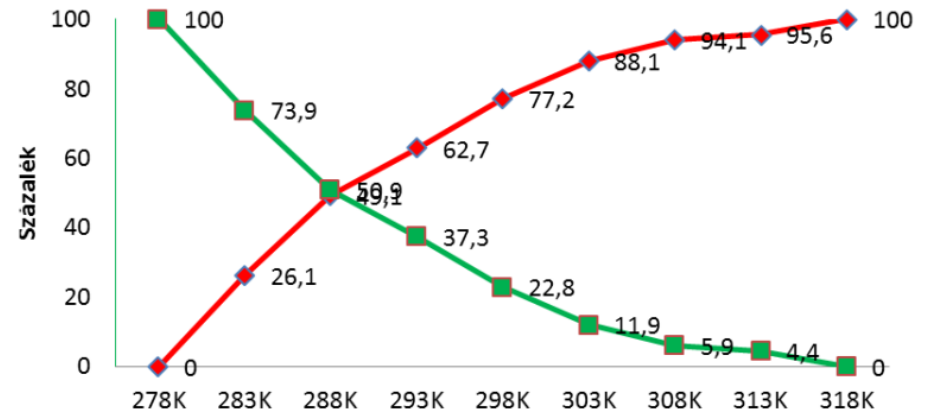
Podocin(278-313)_A297V 278-318K CCA%



Podocin(278-313)_V290M 278-318K CCA%



Podocin(278-313)_A284V 278-318K CCA%



Fél évvel ezelőtt kitűzött céljaink

2. A trunkáns podocinok membrán-lokalizációjának számítása

A frameshift mutációk hatása a helikális régiók aminosav-szekvenciájára

Az R229Q-val patogén misszensz mutációk

natív podocin



p.R286Tfs*17



nem patogén az R229Q-val

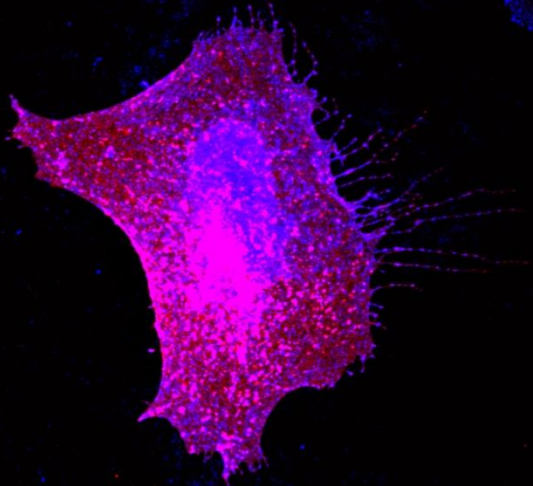
p.F344Lfs*4



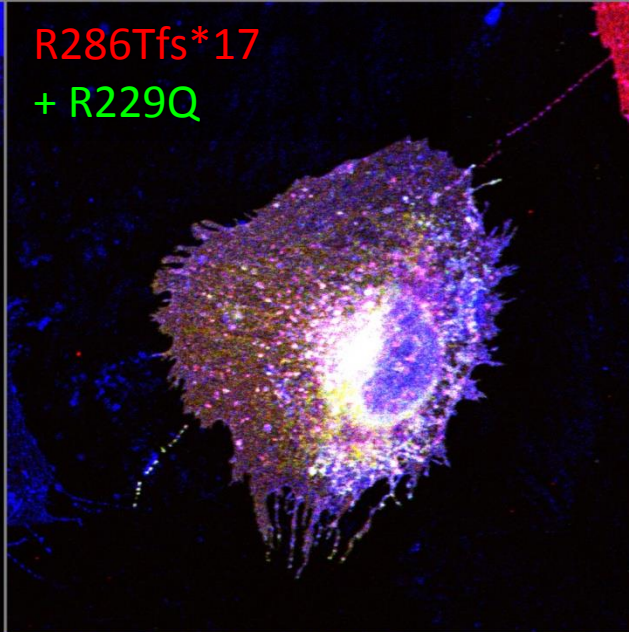
patogén az R229Q-val

Az R286fs mutáns podocin nem kolokalizálódik más podocinokkal

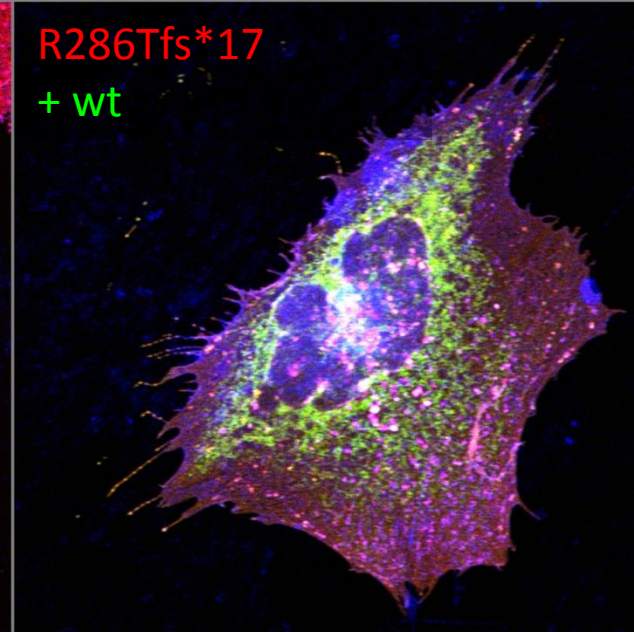
R286Tfs*17



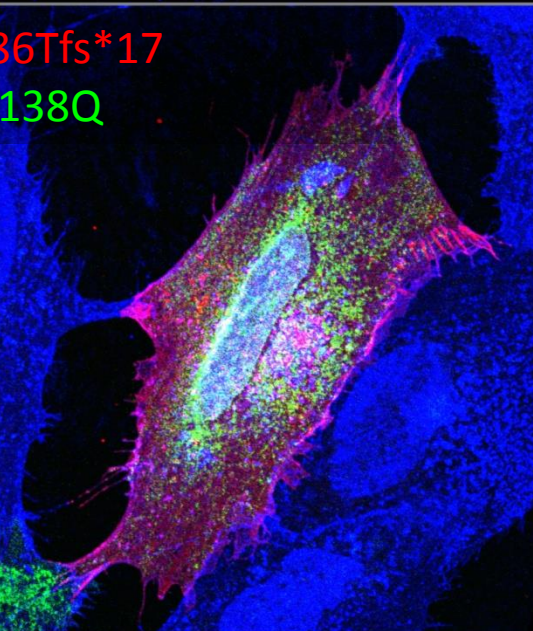
R286Tfs*17
+ R229Q



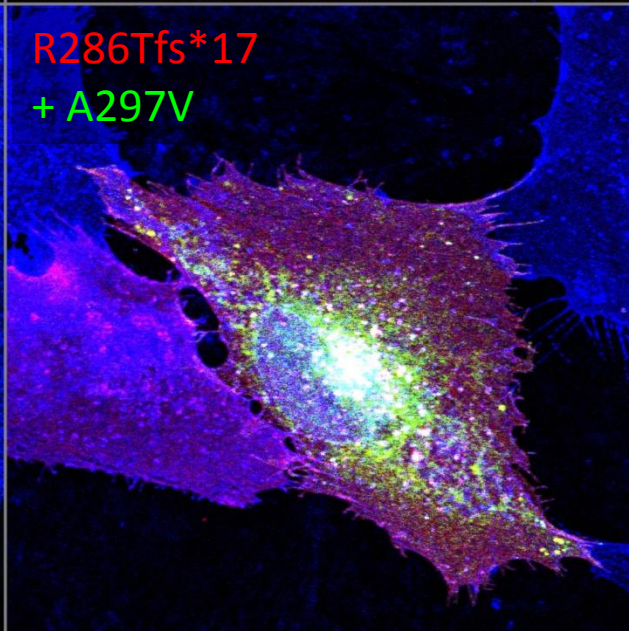
R286Tfs*17
+ wt



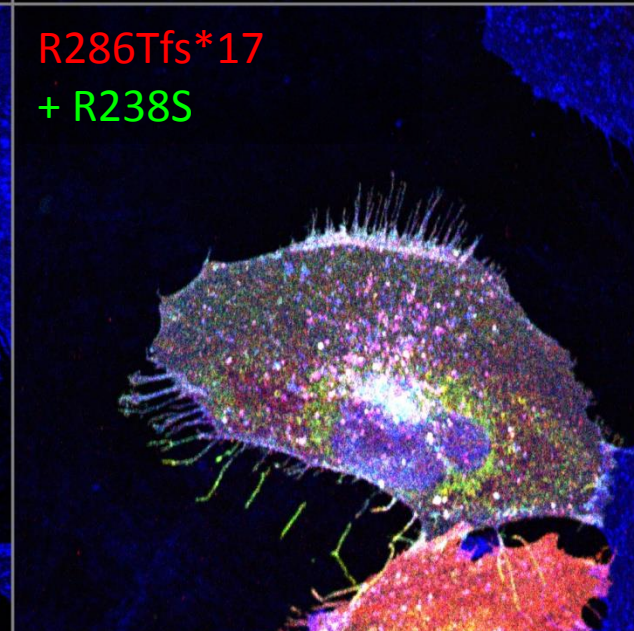
R286Tfs*17
+ R138Q



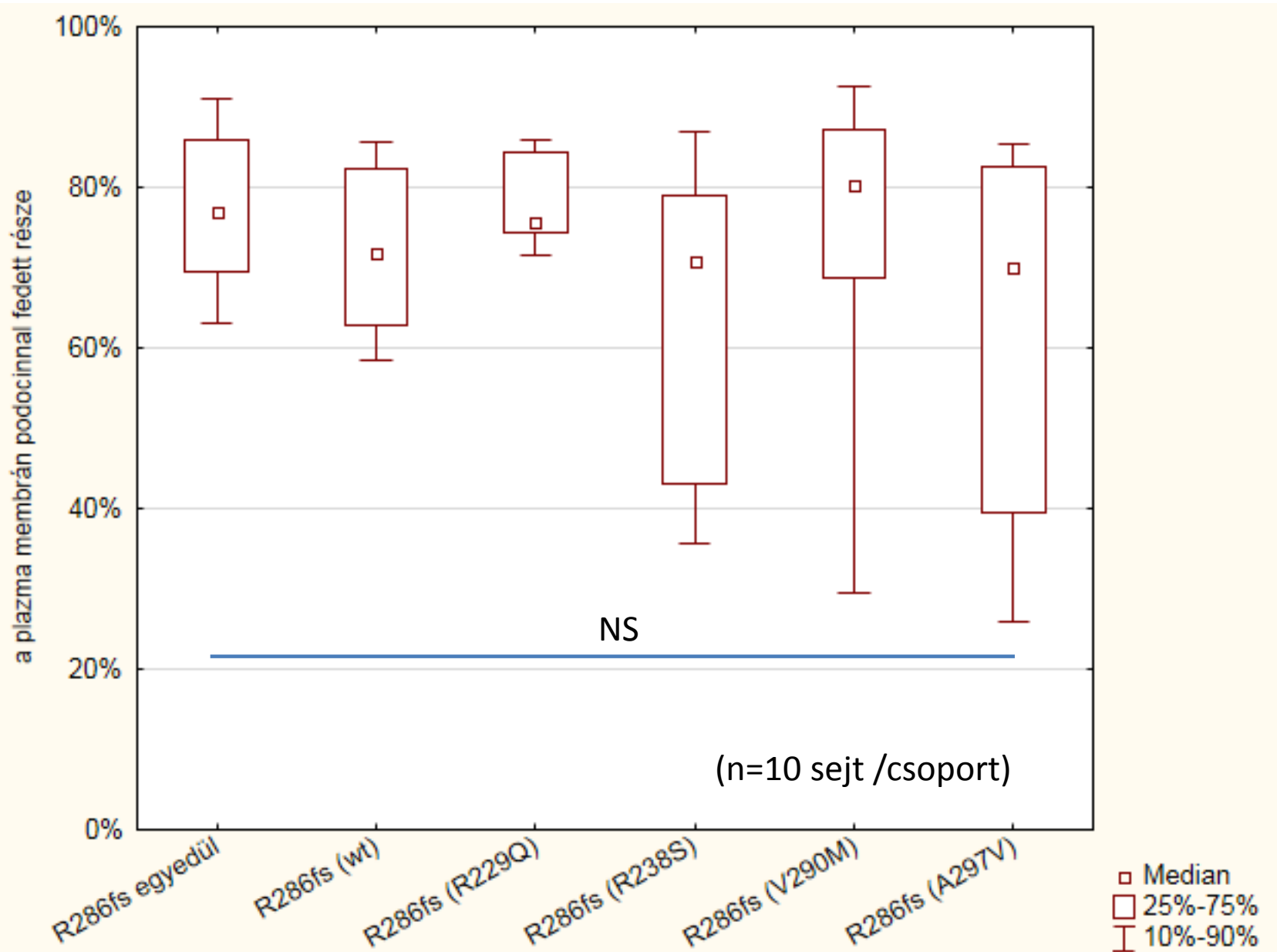
R286Tfs*17
+ A297V



R286Tfs*17
+ R238S



Az R286fs podocin membrán-lokalizált a koexpresszált mutációtól függetlenül



Dimerizálódik-e az R286fs podocin?

Az R229Q-val patogén misszensz mutációk

natív podocin



p.R286Tfs*17



nem patogén az R229Q-val

nem dimerizálódik



dimerizálódik

- egyik helikális régiója sem ép
- az R229Q-val nem patogén, pedig a kritikus régiót érinti a fs szekvencia
- nem kolokalizálódik más podocin variánsokkal

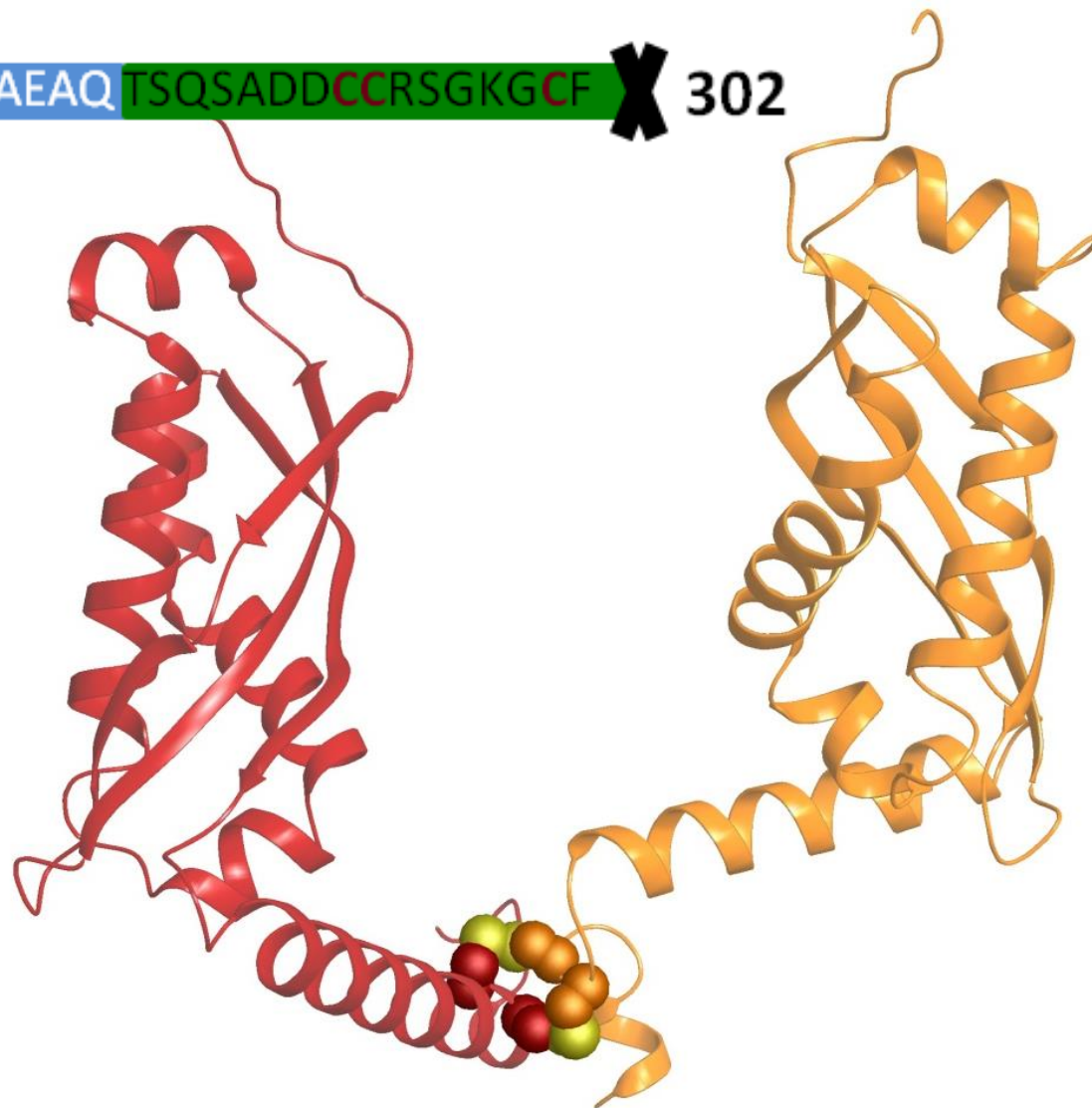


- membrán-lokalizált
- klinikailag hypomorph

Dimerizálódik ő, de kizárólag magával, diszulfid-hidak révén

p.R286Tfs*17

IKDVRLPAGLQHSLAVEAEAQ TSQSADDCCRSKGKCF X 302



A 344fs mutáció a harmadik hélixet alkotó aminosavakat érinti

Az R229Q-val patogén misszensz mutációk

natív podocin

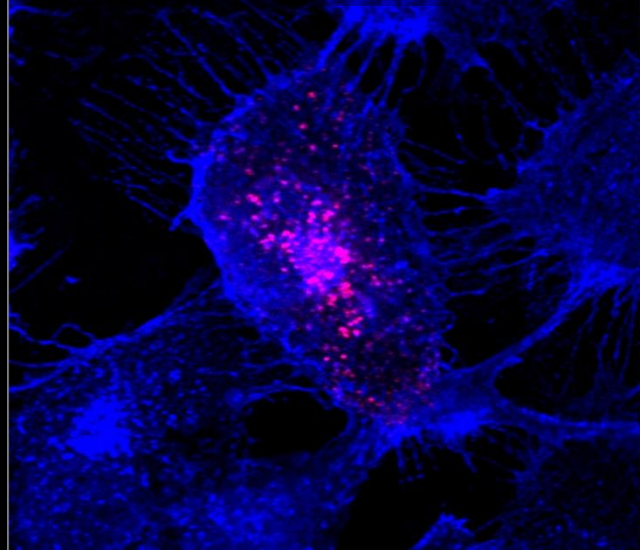


p.F344Lfs*4

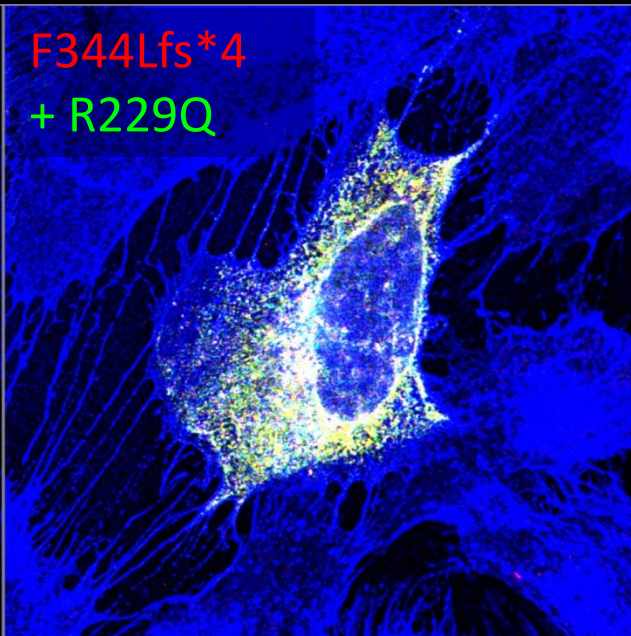


A 344fs podocin nem membran-lokalizált,
de lehet az, ha membrán-asszociált podocinnal együtt fejezzük ki!

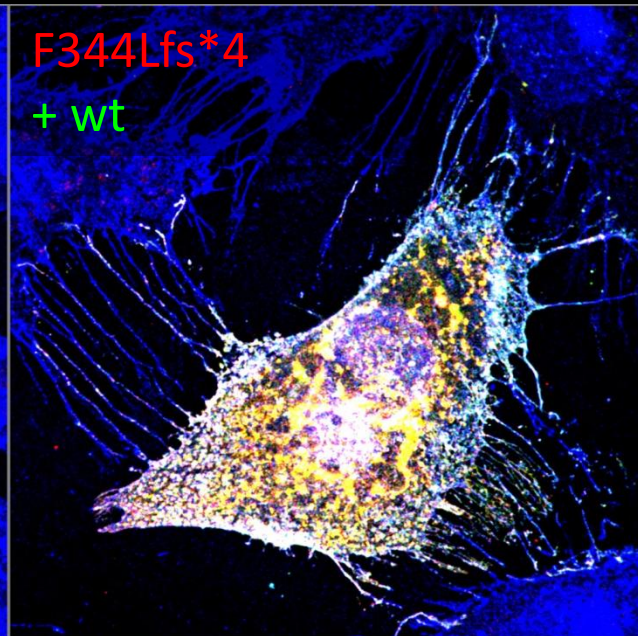
F344Lfs*4



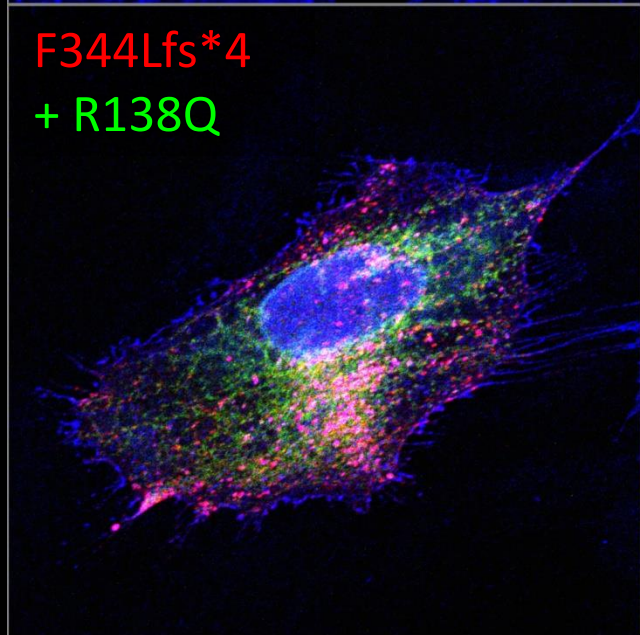
F344Lfs*4
+ R229Q



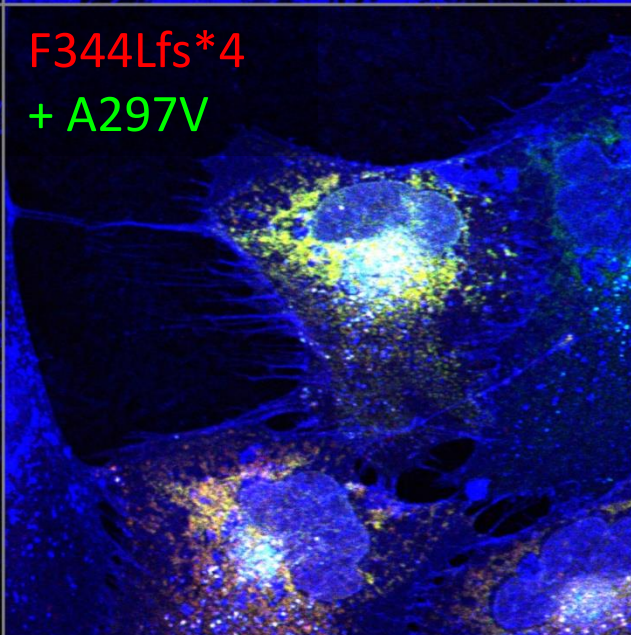
F344Lfs*4
+ wt



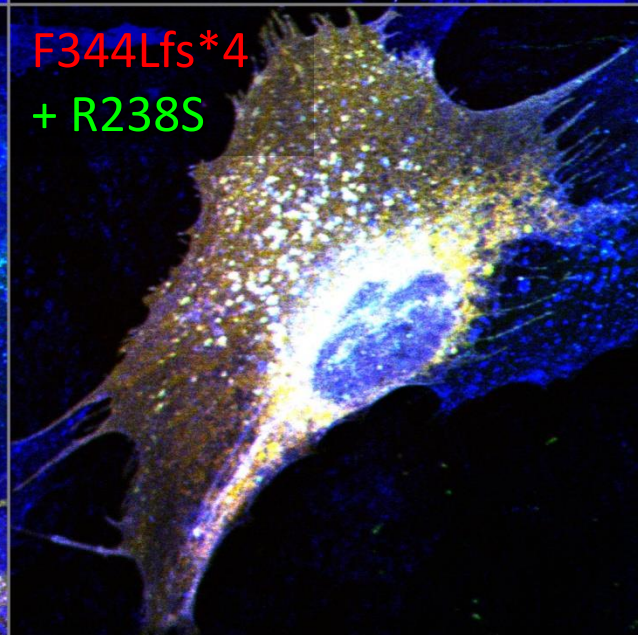
F344Lfs*4
+ R138Q



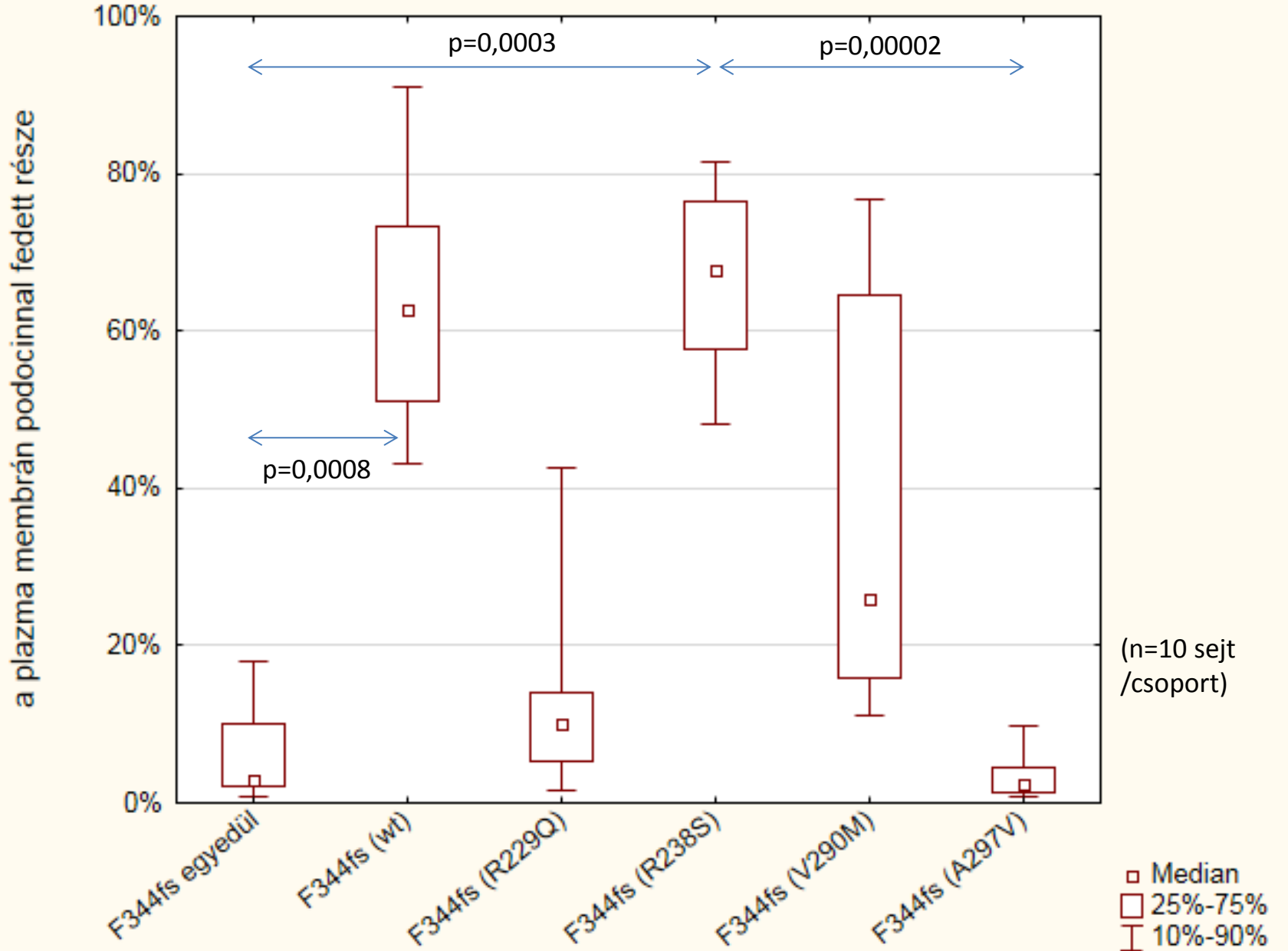
F344Lfs*4
+ A297V



F344Lfs*4
+ R238S



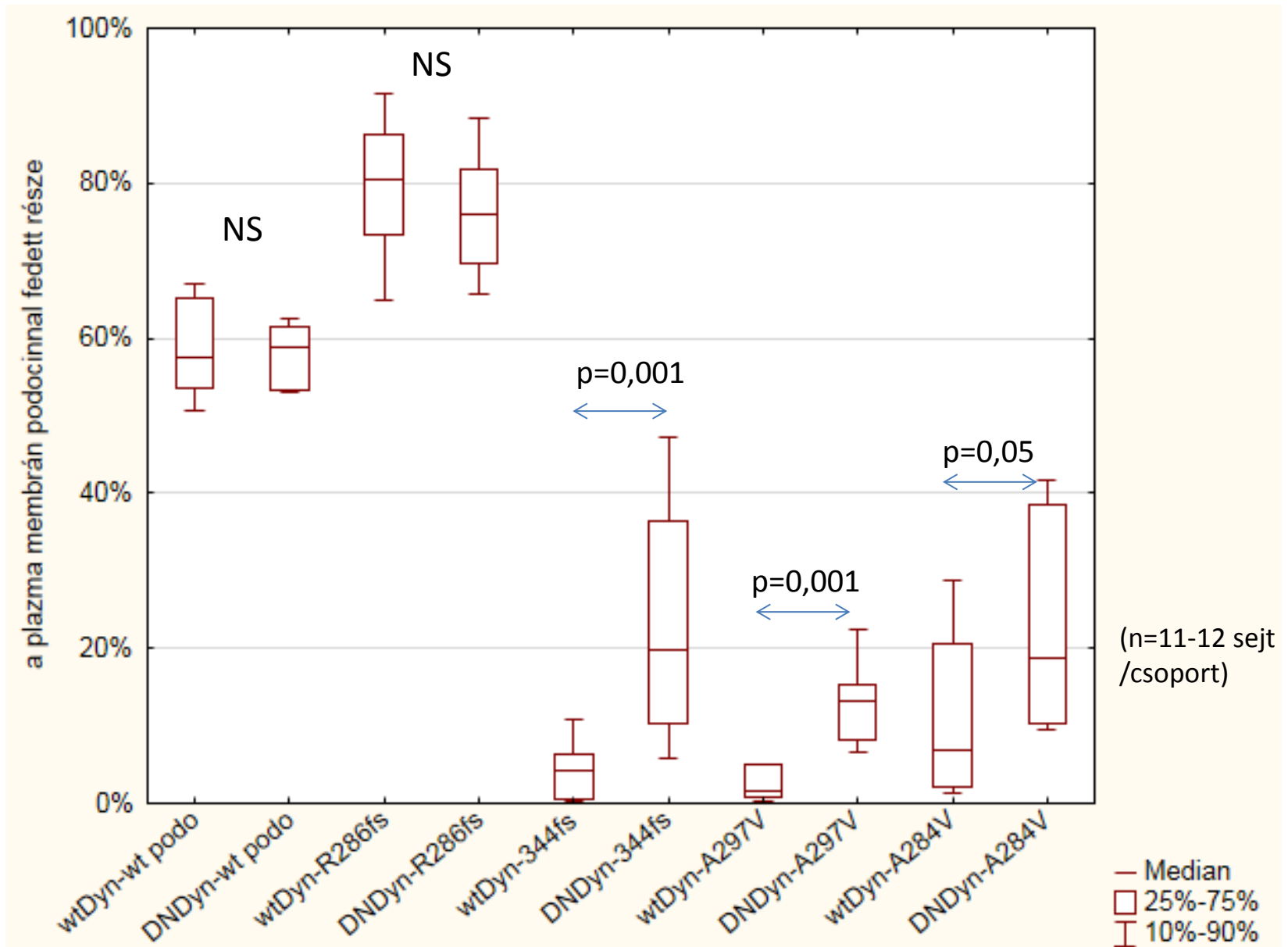
A 344fs podocin nem membrán-lokalizált, de lehet az, ha membrán-asszociált podocinnal együtt fejezzük ki!



Fél évvel ezelőtt kitűzött céljaink

3. Az endocytosis gátlása révén annak eldöntése, hogy a kóros podocin-dimerek internalizálódnak, vagy ki sem jutnak a membránba

A nem membrán-lokalizált mutáns podocin fehérjék internalizálódnak



Fél évvel ezelőtt kitűzött céljaink

4. A podocin-dimerek struktúrájának megismerése krisztallográfiával

Kristályosítási előkísérletek eredményei

1.nap

3.nap

7.nap

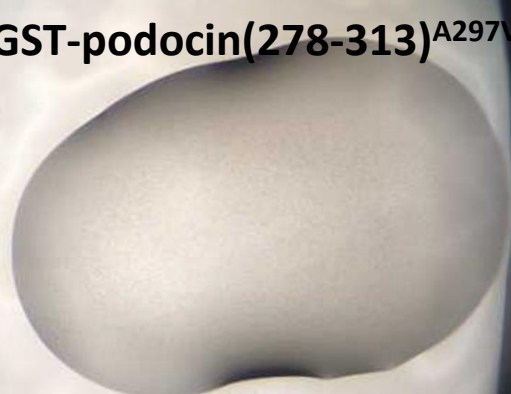
GST-podocin(278-331)^{WT}



GST-podocin(278-313)^{A284V}



GST-podocin(278-313)^{A297V}

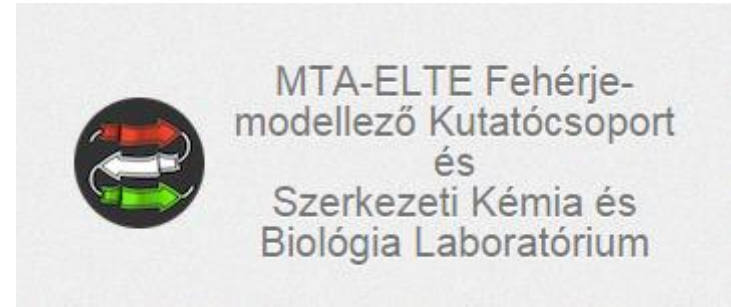


Összefoglalás

- instabil párok → nem maradnak a membránban
- kovalens kötések alapuló dimer → erősebben membrán-lokalizált, mint a vad
- trunkáns C-terminális podocin internalizálódik, de ezt egy C-terminális régióban ép podocinnal való oligomerizáció képes megakadályozni

Egy podocin variáns lokalizációját a korábban megfigyelt káros hatás mellett jó irányban is befolyásolhatja a társuló podocin variáns.

A podocin membrán-lokalizációja a dimer stabilitásának és a C-terminális régió legalább egyik monomerben való épségének a függvénye.



Inserm

Institut national
de la santé et de la recherche médicale

Köszönjük.



Christelle Arrondel



Corinne Antignac



András Perczel



Harmat Veronika



K Menyhárd Dóra



Pál Stráner



Géraldine Mollet



Stéphanie Woerner



imagine
INSTITUT DES MALADIES GÉNÉTIQUES