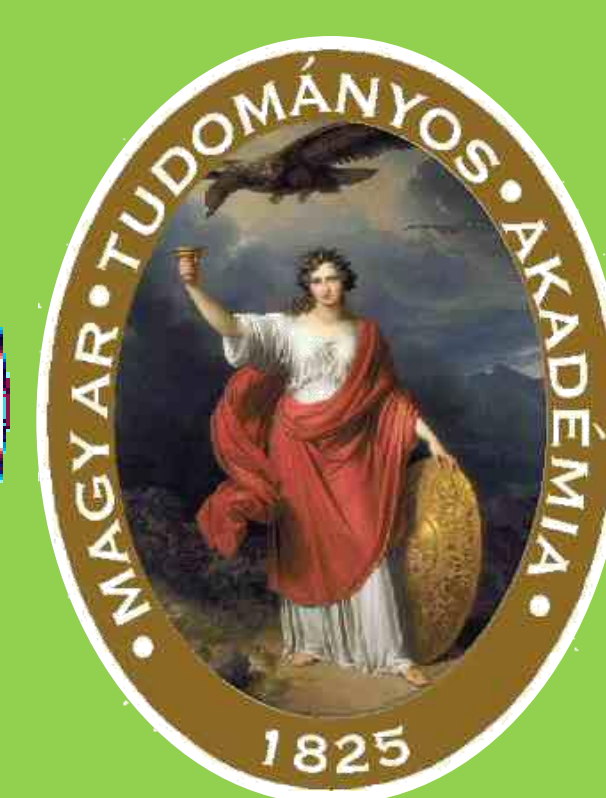




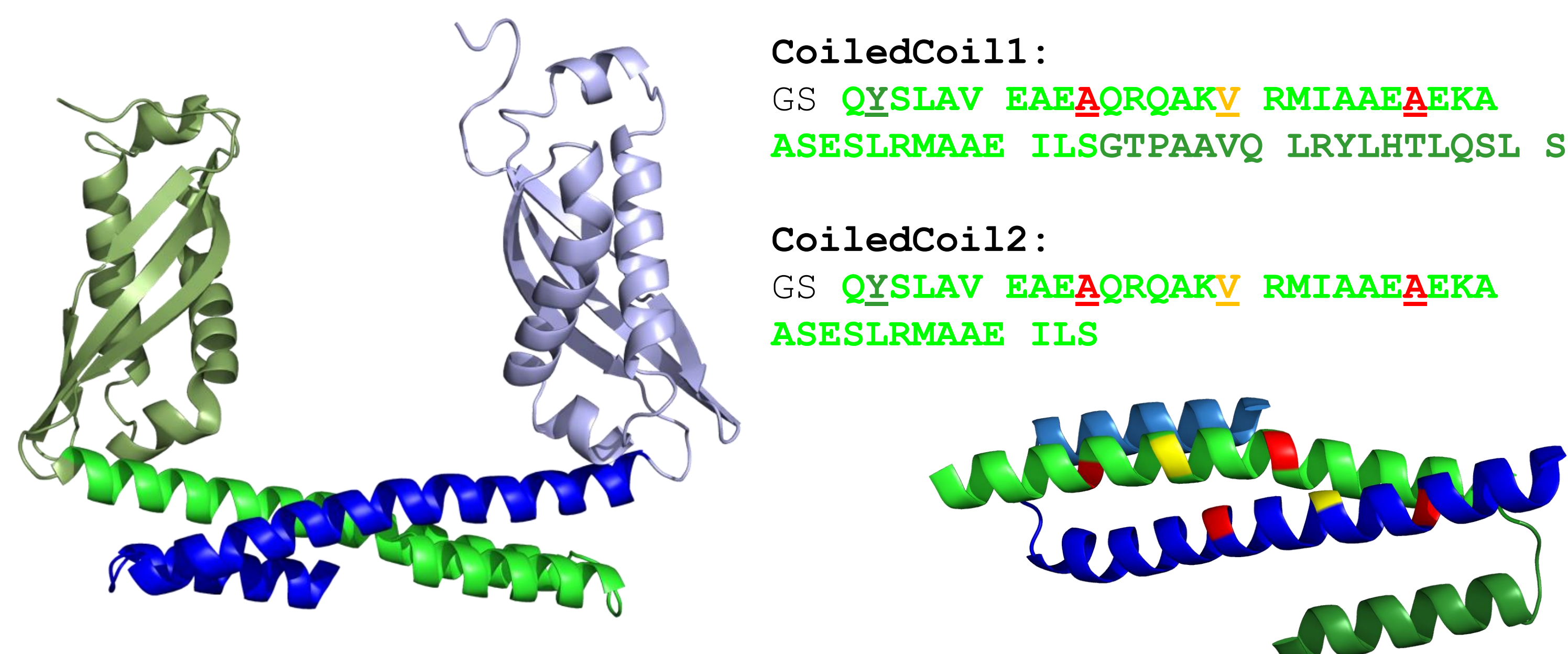
Ultramélyhűtő használata a podocin szerkezetvizsgálatában



Harmat Veronika
ELTE Kémiai Intézet,
MTA-ELTE Fehérjemodellező Kutatócsoport

Tory Kálmán
SOTE I. sz. Gyermekgyógyászati Klinika
Genetika Munkacsoport

A podocin a vese glomeruláris filtrációs rendszerének fontos alkotóeleme. Mutációi autoszomális recesszíven öröklődő nefrózist okoznak. Együttműködésünk egyik célja a podocin variánsok eltérő működését magyarázó szerkezeti alapok megértése. Az ultramélyhűtő lehetővé teszi az NMR és CD spektroszkópiai és krisztallográfiai vizsgálatok számára előállított nagyszámú fehérjeminta, valamint a DNS-konstrukciók és fehérjeminták előállításához nélkülözhetetlen baktériumsejtek tárolását.

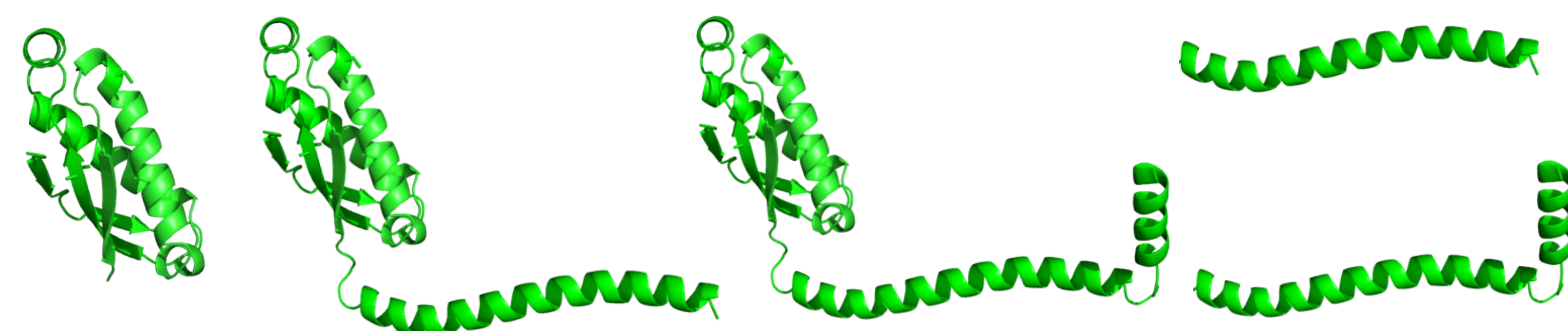


A podocin-homodimer globuláris SPFH doménjének (szürkészöld és szürke) és coiled-coil (zöld és kék) doménének homológiamodellje

Az első vizsgált mutációk (piros: patogén, sárga: ártalmatlan) helye a coiled-coil régióban

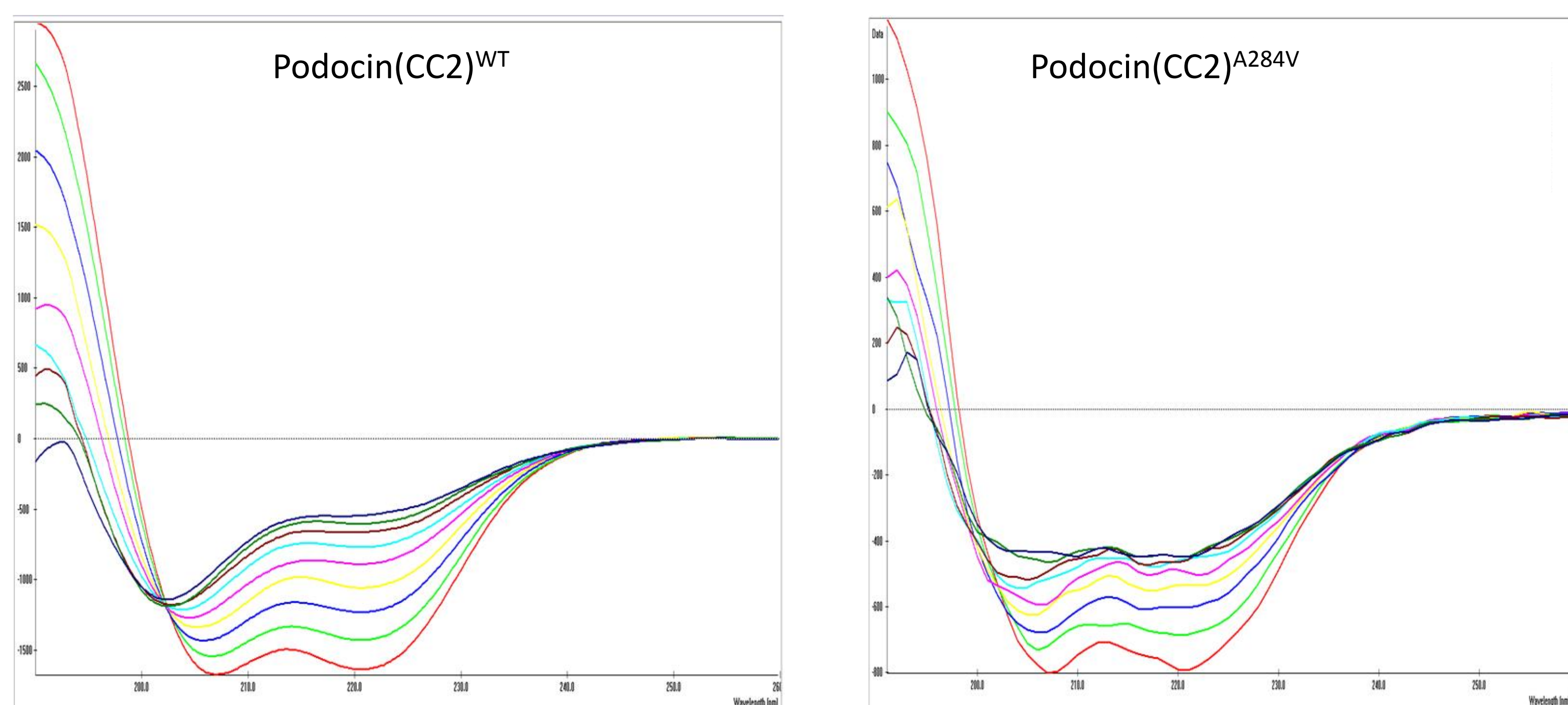
A vizsgált mutációk a podocin oligomerizációjáért felelős coiled-coil régiót érintik. Célunk, hogy a különböző podocin variáns oligomerek szerkezeti és dinamikai jellemzése által megértsük ezek eltérő sejtbeli viselkedésének szerkezeti alapjait. A globuláris doménen található R229Q mutációval kombinációban patogén és ártalmatlan mutációk hatását is vizsgáljuk.

Az előállított fehérjekonstrukciók:
globuláris (SPFH) domén, SPFH-CC1, SPFH-CC2, CC1, CC2
Felhasznált fúziós rendszerek: lizozim, MBP és GST



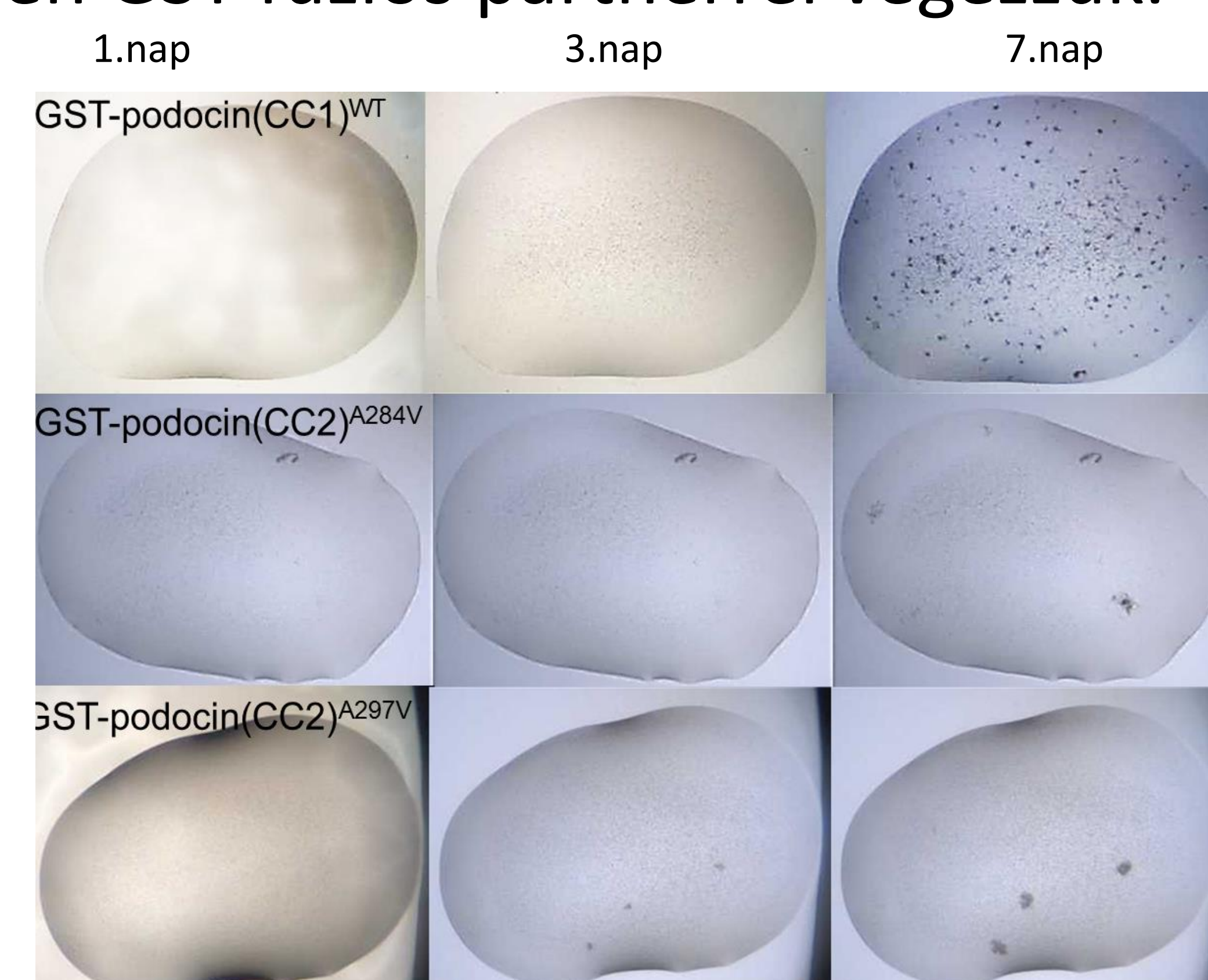
Vizsgálati módszerek: CD és NMR spektroszkópia, krisztallográfia

A CC domén hőstabilitásának ECD spektroszkópiai vizsgálatával kimutattuk, hogy az A284V, A297V, V290M mutációk jelentős hőstabilitás-csökkenést okoznak.



A vad típusú és A284V podocin CC2 278K (piros) és 318K (sötétékék) között mért hőmérsékletfüggő ECD spektrumai

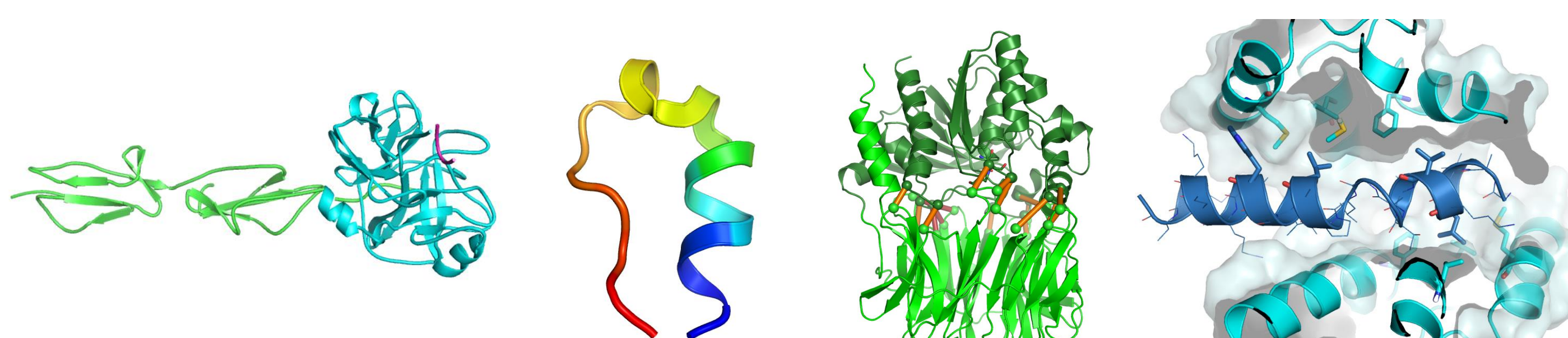
A vad típusú, A284V és A297V podocin CC doménje fehérjekrisztallográfiai vizsgálatát a kristályosodási hajlam növelése érdekében GST fúziós partnerrel végezzük.



Podocin GST-CC kristályosításakor (előzetes szűrés) képződött mikrokristályok

Tervek, folyamatban lévő további vizsgálatok

- Az NMR vizsgálatok kiterjesztése más konstrukciókra.
- További mutációk hatásának vizsgálata
- A globuláris domént is tartalmazó fragmentumok kristályosítása



Az ultramélyhűtő használata más együttműködésekben (DNS konstrukciók, sejtek és/vagy tisztított fehérjeminták tárolása)

- A GLP-1 receptor és kölcsönható peptidek (exendin-4 származék minifehérjék) szerkezetvizsgálata
- Malária és emlős kalmodulin komplexeinek szerkezetvizsgálata (Liliom Károly, MTA TTK)
- MASP-2 peptid inhibitoraival alkotott komplexek szerkezetvizsgálata (Gál Péter, MTA TTK, Pál Gábor, ELTE Biokémiai Tanszék, Mező Gábor, MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport)
- Oligopeptidázok szerkezetvizsgálata