

Az exendin-4 minifehérje „élete” a DNS-től az NMR-ig

Huszka Beáta, I. évf. vegyész MSc.

ELTE TTK Kémiai Intézet, Szerves Kémiai Tanszék

Témavezető: **Dr. Perczel András** egyetemi tanár
ELTE TTK Kémiai Intézet, Szerves Kémiai Tanszék

Munkám során az exendin-4 (EX4) minifehérjét állítottam elő génexpresszós úton, és tanulmányoztam térszerkezetét valamint dinamikáját és NMR-spektroszkópia segítségével.

Az exendin-4 egy viperagyík (*Heloderma suspectum*) nyálából izolált, 39 aminosavból álló fehérje, mely analóg egy szénhidrát anyagcserét befolyásoló inkretinnel, a glukagon-szerű peptiddel (GLP-1). Az 53%-os szekvenciális, és térszerkezetbeli hasonlóság miatt kötődik a GLP-1 receptorhoz, és serkenti az inzulin-, valamint gátolja a glukagon-szekréción. Így a fehérje potenciális terápiás szernek tekinthető a kettestípusú diabéteszben.

A klasszikus szilárdfázisú peptid-szintetikus protokoll ilyen méretű fehérjénél – különös tekintettel a ^{15}N -jelölt változatnál – sem időben, sem anyagiakban nem lett volna kifizetődő. Ezen túlmenően minden bizonnyal csak kis kitermeléssel tudtam volna dolgozni. Az említett okok miatt választottam a génexpressziós utat.

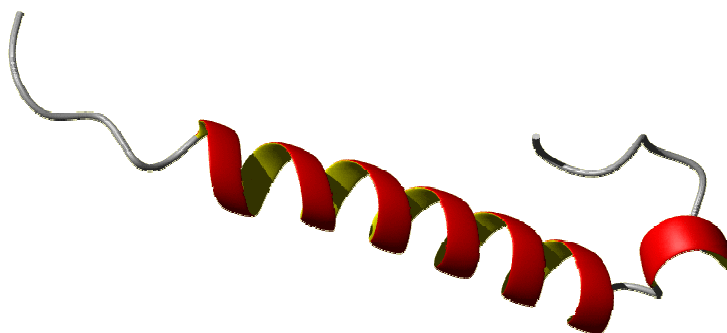
Az exendin-4 *in vivo* előállításához *Escherichia coli* sejteket alkalmaztam. A fehérjét kis mérete miatt ubikvitin fúziós rendszerben termeltem. Az *N*-terminálison elhelyezkedő ubikvitin egy hisztidin címkével van ellátva, így a tisztításokhoz Ni^{2+} affinitás kromatográfiát használtam. A fúziós partnert YUH (élesztő ubikvitin hidroláz) enzimmal emésztettem le.

Az exendin-4 végső tisztítását RP-HPLC-vel végeztem, C18-as kolonnán, TFA-t is tartalmazó víz-acetonitril gradiens elúcióval.

A fehérjét normál- és a dinamikai mérésekhez szükséges ^{15}N - jelölt formában is elkészítettem.

Az NMR mérések vizes közegben illetve 30% trifluoretanol tartalmazó oldatban zajlottak, 500 MHz-es készüléken. A jelöletlen exendin-4-ről homonukleáris ^1H - ^1H TOCSY és NOESY, a ^{15}N izotópjelöltről T1, T2 relaxációs, valamint heteronukleáris ^1H - ^{15}N NOE spektrumokat vettem fel. A TOCSY-NOESY spektrumok jeldiszperzitása vizes közegben nem volt megfelelő, így fehérje térszerkezetét tekintve főleg irodalmi előzményekre támaszkodtam. A heteronukleáris spektrumokból nyert T1, T2 és hetNOE adatok szekvencia-függő elemzéséből megállapítottam, hogy a molekula eleje (első 10 aminosav), és vége (Gly³⁰-tól) igen erőteljes szegmensmozgásokkal bír, míg a középső Ser¹¹-Lys²⁷ szakasz merevebb a helikális szerkezetnek köszönhetően.

További céljaim közt szerepel az exendin-4 mélyebbre ható dinamikai elemzése, illetve szerkezetének meghatározása. A későbbiekben pedig szeretnék megvizsgálni más molekulákat, melyeket magam állítok elő rekombináns DNS technikával, és *in vivo* fehérje expresszióval.



Az exendin-4 minifehérje molekulája