

——— Tudományos Diákköri Dolgozat ———

HUSZKA BEÁTA

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

Dr. Perczel András
Szerves Kémiai Tanszék



——— Eötvös Loránd Tudományegyetem ———
——— Természettudományi Kar ——
—— Budapest, 2010 ——

Tartalomjegyzék

Köszönetnyilvánítás.....	3
Rövidítésjegyzék.....	4
I. BEVEZETÉS.....	6
I/1. A fehérjéről általában.....	6
I/2. Térszerkezet és dinamika.....	6
I/3. Fehérjék előállítása.....	7
I/3/1. A szilárdfázisú peptidszintézis (SPPS).....	8
II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	9
II/1. Az exendin-4 és hozzá hasonló fehérjék szintézise szilárdfázison.....	10
II/2. Az <i>in vivo</i> fehérjeexpresszió kísérleti előzményei.....	11
II/3. Fúziós expressziós rendszerek.....	11
II/4. Izotópjelölt fehérjék <i>in vivo</i> előállítása.....	12
II/5. Az exendin-4 térszerkezetének irodalmi előzményei.....	12
II/6. Fehérjék dinamikai vizsgálata relaxációs módszerekkel.....	13
II/7. Az exendin-4 gyógyászati vonatkozása.....	13
III. SAJÁT LABORATÓRIUMI MUNKÁM.....	14
III/1. A DNS-munka.....	14
III/1/1. Az exendin-4 esettanulmánya.....	15
III/2. A fehérje-munka.....	16
III/2/1. Az exendin-4 esettanulmánya.....	17
IV. FEHÉRJE TÉRSZERKEZET ÉS DINAMIKA MEGHATÁROZÁSA NMR-SPEKTROSKÓPIÁVAL.....	18
IV/1. NMR 2D-ben.....	18
IV/2. A Nukleáris Overhauser Effektus (NOE).....	18
IV/3. A mérési körülmények és az adatok értékelése.....	19
IV/4. Homonukleáris spektrumok.....	19
IV/5. Heteronukleáris spektrumok.....	20
V. AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE ÉS KÖVETKEZTETÉSEK.....	20
V/1. Az exendin-4 szerkezeti vizsgálata.....	20
V/2. Az exendin-4 dinamikai vizsgálatai.....	21
V/2/1. Relaxációs-mérések.....	22
V/2/2. HetNOE-mérések.....	23
Összefoglalás.....	24
Abstract.....	25
Irodalomjegyzék.....	26
Felhasznált könyvek.....	27
Egyéb felhasznált irodalom.....	28

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Perczel Andrásnak, az átadott tudást, hogy lehetővé tette munkámat a Szerves Kémiai Tanszéken, valamint, hogy megszerettette velem a fehérjék változatosan gazdag világát.

Hálával tartozom a Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratórium (SzKBL) minden tagjának a kedves fogadtatásért, és a jó hangulatért, amelyben öröm volt dolgozni. Név szerint szeretném kiemelni Pohl Gábort és Stráner Pált, akik megismertették velem a fehérje expressziót és segítettek laboratóriumi munkámat. Külön említést érdemel Rovó Petra, akitől az NMR mérések és a spektrum-elemzések menetét sajátítottam el, valamint segítségemre volt az adatok értelmezésében is.

Szeretnék köszönetet mondani a Biokémiai Tanszékről Dr. Nyitray Lászlónak, akitől a géntechnológia alapjait tanultam meg; valamint a Szerves Kémiai Tanszékről Dr. Mező Gábornak és Dr. Farkas Viktornak, akik a szilárdfázisú peptidszintézis kapcsán voltak segítségemre.

Végül, de nem utolsó sorban hálával tartozom kedves munkatársamnak, Hudáky Ilonának, és barátomnak, Neumann Viktornak, akik hasznos tanácsokkal láttak el dolgozatom kapcsán.

Rövidítésjegyzék

1D-, 2D-NMR	egy ill. két dimenziós NMR mérések
Boc	<i>tert</i> – butiloxikarbonil
^t Bu	<i>tert</i> -butil-éter
DCC	<i>N,N'</i> -diciklohexilkarbodiimid
DCM	diklórometán
DCU	<i>N,N'</i> -diciklohexilurea
DIC	<i>N,N'</i> -diizopropilkarbodiimid
DIEA	<i>N,N</i> -diizopropilmetilamin
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DNS	dezoxiribonukleinsav
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EX4	exendin-4
FDA	Food and Drug Administration (Élelmiszer- és gyógyszerügyi hatóság)
FID	Free Induction Decay (szabad indukciós lecsengés)
Fmoc	9-fluorenilmetoxikarbonil
GLP1	Glucagon Like Peptid-1 (glukagon-szerű peptid-1)
hetNOE	heteronuclear Nuclear Overhauser Effect
HOBt	1-hidroxibenztriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia)
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IDP	Intrinsically Disordered Protein (eredendően rendezetlen fehérje)
IPTG	izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid
Ni-NTA	nikkel-nitrilotriacetát
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (mágneses magrezonancia)
NOE	Nuclear Overhauser Effect (atommagok közötti Overhauser hatás)
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (mag Overhauser hatáson alapuló spektroszkópia)

OD	optical density (optikai sűrűség)
O ^t Bu	<i>terc</i> -butil-észter
Pbf	2,2,4,6,7-pentametil-dihidrobenzofurán-6-szulfonil
PCR	Polimerase Chain Reaction (polimeráz láncreakció)
ppm	part per million (10 ⁻⁶ -od rész)
R1	longitudinális relaxációs ráta
R2	transzverzális relaxációs ráta
RNS	ribonukleinsav
RP-HPLC	Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography (fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia)
rpm	revolutions per minute (1 rpm ≈ 0,01667 Hz) (teljes fordulat / perc)
RT	room temperature (szobahőmérséklet)
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulphate polyakrylamide gel electrophoresis (nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis)
SPPS	Solid phase peptid synthesis (szilárdfázisú peptidszintézis)
T1	spin-mátrix relaxációs időállandó
T2	spin-spin relaxációs időállandó
TAE	tris-acetát-EDTA
TBE	tris-borát-EDTA
TEMED	tetrametil-etiléndiamin
TFA	trifluorecetsav
TFE	trifluoretanol
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy (teljesen korrelált spektroszkópia)
TRIS	trihidroximetil-aminometán
Trt	tritol (trifenil-metil)
UKB	ubikvitin
YUH	Yeast Ubiquitin Hidrolase (élesztő ubikvitin hidroláz enzim)

I. Bevezetés

I/1. A fehérjékről általában

Fehérjének, definíció szerint – azokat a természetes aminosavakból peptid-kötéssel felépülő polimereket nevezzük, amelyek jól meghatározott téralkattal (másodlagos, harmadlagos, esetleg negyedleges szerkezet) rendelkeznek, és ehhez kapcsolódóan valamilyen biológiai funkcióval bírnak. A fehérjemolekulák többsége az anyagcsere folyamatok katalizátoraként működik az élő szervezetben. Az enzimek a szerves kémiai katalizátorokhoz képest jóval hatékonyabbak és specifikusabbak, általában csak egy meghatározott biokémiai reakcióban vesznek részt. Ennek megfelelően rendkívül sok fajtájuk alakult ki az evolúció során. Feladataik ellátása szorosan összefügg a térszerkezetükkel. Emiatt sokáig általánosan elfogadott nézet volt az, hogy a téralkat és funkció elválaszthatatlan egymástól. Napjainkban azonban – az IDP-k (Intrinsically Disordered Protein) felfedezésével – megdőlni látszik ez a paradigma. Az „eredendően rendezetlen fehérjék” ugyanis meg sem kísérelik az időátlagban egységes, „szabályos” téralkatok felvételét, mégis egyedi biológiai funkcióval bírnak.

Emellett más irányba mutató, meglepő fehérje térszerkezeti megfigyelések is születtek az elmúlt évtizedekben. Korábban a kutatók úgy vélték, hogy az 50 aminosavnál rövidebb polipeptideket nem lehet csupán egyetlen téralkattal jellemezni. Főleg az NMR (Nuclear Magnetic Resonance, mágneses magrezonancia) spektroszkópiának köszönhetően ma már ismerünk olyan, mindössze 20-40 aminosavból álló molekulákat, amelyek – noha fehérjének felettébb rövidek, mégis jól definiált térszerkezettel rendelkeznek. Ezek után nem meglepő, hogy szakmai viták tárgyát képezi az a kérdés: mit is nevezhetünk pontosan fehérjének?

I/2. Térszerkezet és dinamika

A fehérjék térszerkezete hierarchikus szerveződésű. Az egész rendszer alapját a primer szekvencia, vagyis az aminosav-sorrend adja meg, meghatározva ezzel a másodlagos szerkezeteket. A fehérjékben leggyakrabban azonosítható másodlagos szerkezeti elemek, az α -hélixek, a β -redők és a poliprolin II régiók homokonformer*, míg az ún. „visszafordító alegységek”, a kanyarok (turn-ök) és a hurkok (loop-ok) heterokonformer típusúak. (A *-gal jelölt kifejezések magyarázatát az 5. számú függelék tartalmazza.) A másodlagos szerkezeti elemekből szerveződik a harmadlagos struktúra, néhány globuláris fehérje pedig negyedleges

szerkezettel is rendelkezik (*hemoglobin*). A fehérjék téralkatát főként H-kötések, kisebb mértékben diszulfid-hidak, ionos- és hidrofób kölcsönhatások stabilizálják.

Bár a feltekeredés pontos hajtóereje és mechanizmusa részleteiben még vitatott kérdés, az ma már bizonyos, hogy a fehérjéknek a natív térszerkezet elérése egyfajta energiaminimumot jelent. Nem arról van szó azonban, hogy a molekula egy mély potenciálisenergia-gödörbe esne, egyfajta merev, „befagyasztott” formában.

A dinamikai vizsgálatok a fehérjék különböző időskálájú mozgásait célozzák meg. Ezek a következők lehetnek: egymásba ágyazott feltekeredési-, rotációs-, és oldallánc mozgások, valamint a gerincatomok belső dinamikája. Utóbbi az amid kötésekkel érinti elsősorban, időtartamuk tipikusan a pikoszekundum – nanoszekundum időtartományába esik (úgynevezett gyors időskálájú mozgások).

A fehérjék térszerkezetének és dinamikájának tanulmányozására, az egyik leghatékonyabb módszer az NMR-spektroszkópia. Az aminosavakban előforduló ^1H -magnak köszönhetően minden fehérjéről felvehetünk homonukleáris spektrumokat, ám több információt szolgáltatnak a heteronukleáris korreláción alapuló mérések.

I/3. Fehérjék előállítása

A kémikusok a 20. század elejétől kezdve foglalkoznak különböző méretű fehérjék, peptidok laboratóriumi előállításával. A peptidszintézis kezdetben oldatfázisban zajlott, majd az áttörést 1963-ban *Robert Bruce Merrifield* Nobel-díjas ötlete hozta. Ő fektette le az alapját a gyantán történő, szilárdfázisú peptidszintézisnek. Jóval fiatalabb technika a géntechnológiai úton történő fehérjeexpresszió. Ennek során főként baktérium sejtekben (de alkalmazhatnak eukarióta sejt vonalakat is) állítják elő a célfehérjét.

Szilárdfázisú peptidszintézissel általában kisebb méretű, de akár elágazásokat, ciklikus szakaszokat tartalmazó peptidok építhetők fel. További előnye, hogy a húsz természetes aminosavon kívül, bármilyen tetszőleges (β - vagy nem szokványos) aminosav is beépíthető a szekvenciába. Kellő gyakorlattal a módszer időigénye sem túl nagy, ráadásul könnyen automatizálható. Problémát jelenthet azonban, az ha hosszabb peptidet kívánunk előállítani. Tapasztalat szerint ugyanis bizonyos aminosav-szám (~15) után a peptid a gyantán aggregálódik, a kapcsolás hatékonysága romlik. Nagyobb méretű fehérjék esetén a fragmenskondenzáció, vagy másik lehetőségként a génexpresszió jelent megoldást. A

biotechnológiai eljárás végig vizes közegben zajlik, nincs szükség szerves oldószerek, vegyszerek alkalmazására. Legnagyobb előnyét azonban talán az izotópjelölt minták előállításánál érzékelhetjük. Nem kell drága, jelölt, és megfelelő védőcsoporttal ellátott aminosavakat vásárolni, hanem a megfelelő táptalajban nevelve az *E.Coli* baktériumokat, azok jelölt célfehérjét állítanak elő. Időigényét tekintve a komplett DNS- és fehérje-munka minimum 2-2,5 hetet vesz igénybe. Problémák természetesen itt is felmerülhetnek, viszont a kapott fehérje szekvenciális hibát (ha a DNS-konstrukció megfelelő) nem tartalmaz. SPPS-nél előfordulhat, hogy egy fel nem kapcsolódott aminosav miatt nem a kívánt szekvenciát kapjuk. A génexpresszió hátránya, hogy csak lineáris, α -L-aminosavakból felépülő peptideket állíthatunk elő, és nincs lehetőség posztranszlációs módosításra sem.

A kétféle szintézist összevetve tehát láthatjuk, hogy mindkettő figyelemreméltó előnyökkel, és megfontolandó hátrányokkal is rendelkezik. Kisméretű, jelöletlen peptidekre egyértelműen a SPPS, míg nagyobb – akár már 40 aminosavas – izotópjelölt fehérjékre a génexpresszió hatékonyabb módszer.

I/3/1. A szilárdfázisú peptidszintézis (SPPS)

Ahhoz, hogy két aminosavat *in vitro* körülmények között adott szekvenciális sorrendben kapcsoljunk össze, az egyiknek az amino- a másiknak a karboxil-csoportját le kell védeni. A peptidkötés kialakítása után, az újabb tag hozzáadása előtt az egyik védőcsoportot el kell távolítani.

A védőcsoportokkal szembeni alapvető elvárás: könnyen felvihető legyen az aminosavra, a reakció alatt biztosítsa a védelmet, annak befejeztével viszont könnyen hidrolizáljon. Legismertebb aminovédőcsoportok:

- benziloxikarbonil (Z; Cbz)
- *terc* – butiloxikarbonil (Boc)
- 9-fluorenilmetoxikarbonil (Fmoc)

A karboxilcsoport védelme legegyszerűbben észteresítéssel oldható meg, benzil- vagy *terc*-butil-észter formában. A védelem mellett az aktiválás is fontos a peptidek létrehozásánál. Egy amino- és egy karboxilcsoport kondenzációja magától nem megy végbe, az eredményes reakcióhoz kapcsolószerek kellene. Egyik lehetőség az ún. *in situ* aktív észteres kapcsolás. Erre a célra régebben főként DCC/HOBt (*N,N'*-diciklohexilkarbodiimid; 1-

hidroxibenzotirazol) alkalmaztak. Napjainkban a DIC/HOBt (*N,N'*-diizopropilkarbodiimid) – jobb oldékonyága miatt – elterjedtebb.

A szilárdfázisú peptidszintézis során tulajdonképpen az aminosav C-terminálisát egy oldhatatlan védőcsoporttal látják el. Ez sztirol alapú, 1-2% divinil-benzolt tartalmazó kopolimerből álló makropólusú gélmátrix. Az aromás gyűrűkhöz klórmethyl-csoportokat kapcsolnak, ehhez köthető a szekvencia C-terminális tagjának karboxilcsoportja. A kívánt szekvenciának megfelelő aminosavakat a gyantán rögzített, épülő peptidlánchoz kapcsolják. A peptid szintézise tehát a C-terminális felől az N-terminális irányába zajlik. Ahhoz, hogy a reakció 100%-os konverzióval menjen, nagy reagens felesleg (3–7×es) alkalmazására van szükség.

A SPPS két legelterjedtebb stratégiája a Boc/Bzl, illetve a Fmoc/^tBu. A Boc/Bzl technikánál a *tert*-butiloxikarbonil az amino-vég, míg a benzil- vagy ciklohexil típusú védőcsoport az oldalláncok védelmét biztosítja. Előnye, hogy a N-terminális védő Boc enyhén savas (TFA) közegben eltávolítható; a peptid gyantáról való lehasítása, illetve az oldalláncot védő csoport eliminálása viszont erősen savas (HF) körülményeket igényel.

A Fmoc/^tBu stratégiánál a Fmoc a növekvő polipeptidlánc amino-terminálisát, a *tert*-butil- vagy tritilcsoport pedig az oldalláncot védi. A 9-fluorenilmtoxikarbonil enyhén bázikus; a gyantáról való lehasítás, illetve a ^tBu és Trt elimináció enyhén savas (TFA) közegben hajtható végre. Utóbbi eljárás kíméletesebb körülményeket biztosít az épülő peptidláncnak, kevesebb mellékreakció lép fel alkalmazása esetén. Egyszerűbb eszközigénye miatt is manapság főleg a Fmoc/^tBu módszert alkalmazzák.

Az egyes kapcsolási lépések sikerességét mindig ellenőrizni kell, ninhydrin- detektálással. A módszer akár 1%-nyi szabadon maradt –NH₂-csoportot is képes kimutatni.

II. Irodalmi áttekintés

Az exendin-4 egy 39 aminosavból álló peptid ($M = 4191,63$ g/mol), mely kis mérete ellenére is kompakt harmadlagos térszerkezettel rendelkezik. A molekulát először egy mérges viperaigyék (*Heloderma suspectum*) faj egyedeinek nyálából izolálták (*Eng és mts-i* 1992). Magát a vegyületet ugyan még nem azonosították emlős szervezetekben, viszont nagyfokú hasonlóságot mutat egy, a szénhidrát anyagcsere szabályozásában kulcsfontosságú hormonnal. Ez a 30 aminosavból álló glukagon-szerű peptid-1 (Glucagon-like peptide-1, GLP-1), mellyel az exendin-4 szekvenciálisan közel 53%-ban egyezik meg (*Pohl and Wank*, 1997).

II/1. Az exendin-4 és hozzá hasonló fehérjék szintézise szilárdfázison

Az exendin-4 is különlegességnek számít a fehérjék világában, hogy relatíve kis mérete ellenére kompakt harmadlagos szerkezettel rendelkezik. Léteznek azonban még ennél kisebb, mindössze húsz aminosavból álló minifehérjék. Ezek – a Tc5b és különböző variánsai – tulajdonképpen az EX4 rövidített változatai. Ilyen kisméretű peptidok szintézise szilárd fázisú technikával sem jelent gondot, és találunk is rá példát az irodalomban. *Hudáky Péter* és munkatársai 2008-ban publikáltak egy cikket a Tc5b-ről, melyben a molekula szintézisét is közlik. Ők Fmoc stratégiával állították elő a molekulát, Wang gyantán. Az oldalláncokon az alábbi védőcsoportokat alkalmazták: Asn(Trt), Asp(O^tBu), Arg(Pbf), Glu(O^tBu), Gln(Trt), Lys(Boc), Ser(^tBu), Tyr(^tBu). A C-terminális szerint 4-dimetilaminopiridin jelenlétében DCC/HOBt-vel kötötték a gyantához. A további lépéseknél is kapcsolószerként DCC/HOBt-t vagy DCC-t alkalmaztak. A peptidet a gyantáról – 3% (m/v) dithiothreitol tartalmazó – 95:5 (v:v) TFA-víz elegyével távolították el, szobahőmérsékleten 2,5 óra alatt. A fehérjét jéghideg dietil-éterben kicsapták, majd szűrték, és fordított fázisú HPLC-vel tisztították.

Magának az exendin-4-nek szilárdfázison történő előállítására is van példa az irodalomban. A *Neidigh* és munkatársai által 2001-ben publikált cikkben említik, hogy így szintetizálták a vegyületet. Részletes protokollra azonban ők nem térnek ki. A fenti cikket alapul véve azonban hasonló szintézist az EX4-re is fel lehet vázolni. Célszerű ezt a molekulát is Fmoc stratégiával előállítani (kíméletesebb módszer, mint a Boc/Bzl), és hossza miatt érdemes fragmenskondenzációt alkalmazni. Az exendin-4 aminosavszekvenciája a következő:

H – His-Gly-Glu- Gly-Thr-Phe- Thr-Ser-Asp- Leu-Ser-Lys- Gln-Met-Glu-
Glu-Glu-Ala | Val-Arg-Leu- Phe-Ile-Glu- Trp-Leu-Lys- Asn-Gly-Gly- Pro-Ser-Ser-
Gly-Ala-Pro- Pro-Pro-Ser – OH

Fragmenskondenzációnál célszerű Gly, Pro vagy Ala végű részeket kiépíteni, és ezeket kapcsolni, hisz a módszer mindig racemizáció veszélyt hordoz magában. Egy lehetőség az EX4 esetén, hogy a fehérjét az Ala¹⁶ és Val¹⁷ között „vágjuk el”. Így nagyjából két azonos méretű fragmensünk lesz, és az Ala estén kicsi a racemizáció-veszély is. Mivel karboxil-véggel szeretnénk a peptidet megkapni, alkalmazhatunk Cl-Trt gyantát, melyet DMF-ben duzzasztunk.

Az aminosavak közül a Met és a Trp oldallánca könnyen oxidálódik, ezért is előnyös a Fmoc stratégiát alkalmazni. Az oldalláncok védelmére alkalmazhatjuk a fenti irodalomban megismert példákat. Ezen túlmenően az arginint célszerű Pbf védőcsoporttal ellátni.

A kapcsolás *in situ* aktív észteres módszerrel történhet, ám DCC/HOBT helyett érdemes DIC/HOBT-t alkalmazni a jobb oldhatósági tulajdonságok miatt. (DCC esetén a keletkező diciklohexilurea származék [DCU] rosszul oldódik DMF-ben.) A szintézis a hagyományos protokoll szerint zajlik, melyet az *1.sz. függelékben* ismertettek. Az egyes lépések sikerességét ninhidrines eljárással lehet ellenőrizni.

A gyantáról a peptid lehasítása kétféle módszerrel történhet. Az *N*-terminális fragmenst ecetsav-metanol-DCM elegyével távolítjuk el. Ez enyhébb körülményeket biztosít, melyeknél az oldallánc védőcsoportok még nem hasadnak. A két fragmens kondenzációja után 90-95%-os TFA-val, gyökfogók jelenlétében távolíthatók el az oldallánc védőcsoportok és a kész peptid a gyantáról egy lépésben.

A fehérje feldolgozása a korábban megismert módon történhet, végső tisztításához RP-HPLC használható.

II/2. Az *in vivo* fehérjeexpresszió kísérleti előzményei

Fehérjék előállításának viszonylag olcsó és egyszerű módszere a molekuláris biológiai úton történő szintézis. A géntechnológiai eljárásoknak köszönhetően ma már rutinszerűen be lehet juttatni a célfehérjét kódoló DNS-szakaszt baktériumsejtekbe (nem kórokozó *Escherichia coli* törzsek), amelyek aztán „megtermelik” a kívánt makromolekulát. A prokarióták előnye, hogy igen gyorsan szaporíthatók (számuk exponenciális-növekedést mutat), optimális növekedésükhöz pedig nem igényelnek speciális körülményeket (akár minimál táptalajon, 37 °C hőmérsékleten, normál atmoszférában is „nevelhetők”).

II/3. Fúziós expressziós rendszerek

A „biológiai fehérjeszintézisnek” komoly hátránya, hogy hatékonyan csak nagyméretű molekulákra alkalmazható. Kicsi (20-40 aminosavból álló) fehérjék esetén problémák lépnek fel a riboszómális szintézisnél; általában nem vesznek fel jól meghatározott konformációt az *E. coli* sejtek citoplazmájában, illetve a proteázokkal szemben is kevésbé ellenállóak. *Khono* és munkatársai 1998-ban publikált cikkükben a probléma megoldásaként a fúziós génexpressziós rendszerek alkalmazását javasolták. A módszer lényege, hogy a kisméretű célproteint egy másikkal összekapcsolva (fúziós partner) expresszáltatjuk, majd a tisztításkor utóbbit leemésztjük róla.

A hordozó partnerrel kapcsolatos fontos követelmény, hogy stabil, jól definiált térszerkezettel rendelkezzen, ne legyen túl nagy méretű, és könnyű legyen eltávolítani. Egyik legoptimálisabb fúziós partner az ubivkitin. Ez egy 76 aminosavból álló, 8,5 kDa tömegű fehérje, mely szelektíven hasítható a YUH (Yeast Ubiquitin Hidrolase, élesztő ubikvitin hidroláz) enzimmel.

Az elválasztási, tisztítási lépések könnyítése érdekében a fúziós fehérjét rendszerint még egy címkével is ellátják. Ez lehet egy hat, nyolc vagy tíz hisztidin aminosavat (His) tartalmazó peptid-szakasz. Segítségével az expressziós termék Ni^{2+} affinitás kromatográfiával tisztítható, szeparálható.

II/4. Izotópjelölt fehérjék *in vivo* előállítása

Az NMR-mérések hatékony kivitelezéséhez szükség lehet a ^1H -n kívül egyéb felesspinű magot tartalmazó fehérje előállítására is.

Az izotópjelölés *in vivo* metodikáját Marley és munkatársai írták le 2001-ben. A ^{13}C és a ^{15}N beépítése a megfelelő izotóppal jelölt glükózt illetve ammónium-kloridot tartalmazó minimál táptalajban való baktériumtenyésztéssel történt. Marley-ék cikkükben erre egy igen hatékony, új módszert mutatnak be.

II/5. Az exendin-4 térszerkezetének irodalmi előzményei

Az exendin-4 NMR-térszerkezetét először Neidigh és munkatársai publikálták 2001-ban. Méréseiket oldatfázisú, és micella-asszociált formájú mintákon végezték. Nemcsak az exendin-4, hanem a GLP-1 konformációját is tanulmányozták. A homonukleáris 2D-s spektrumok (TOCSY és NOESY) segítségével megállapították, hogy mindkét fehérje α -helikális térszerkezettel bír a 7-28 aminosavak közötti szakaszon. A GLP-1 helicitása kevésbé jól definiált, aminek feltételezhetően a receptorhoz való kötődéskor fontos szerep jut (Runge és mts-i., 2007).

Az exendin-4 további szakaszait tekintve megállapítható, hogy az *N*-terminális régió (Ser¹¹-ig) igen mozgékony, nem jellemezhető jól egy szerkezettel. A *C*-terminális vég Gly³⁰-Ser³² között 3_{10} -hélixet, míg Pro³⁶-Pro³⁸ között poliprolin II-hélixet alkot.

A trifluoretanolban felvett spektrumok segítségével Neidigh-ék a fehérje egy különös szerkezeti elemét írták le, amely a triptofán-kalitka nevet kapta. Ez a hidrofób mag, a jelenleg ismert legkisebb térszerkezet-szervező a proteinek világában. Az exendin-4 esetén Leu²¹ és

Pro³⁸ közti részlet rendelkezik egy kompakt harmadlagos fold-dal, mely mintegy „eltemeti” az apoláros Trp²⁵ oldalláncot. A triptofán-kalitka felfedezése rakta le az alapját a minifehérjékkel kapcsolatos kutatásoknak.

A *Neidigh* és munkatársai az exendin-4-re számolt térszerkezetüket a *Protein Data Bank* oldalán tették közzé, **1jry** kód alatt.

II/6. Fehérjék dinamikai vizsgálata relaxációs módszerekkel

Az elmúlt 20 évben rengeteget fejlődtek azon módszerek, melyekkel a fehérjék dinamikai tulajdonságai tanulmányozhatók. A mai modern NMR-készülékekkel – ha rendelkezésünkre áll ¹⁵N vagy ¹³C izotópjelölt minta – lehetőségünk van ún. relaxációs-mérések végrehajtására, melyből következtethetünk a fehérje dinamikájára, elkülöníthetjük a mozgékonyabb és a merevebb régiókat a molekulán belül. Relaxációnak azt a folyamatot nevezzük, amikor a gerjesztő rádiófrekvenciás tér által besugárzott magok (spinek) – a **B₁** tér megszűnését követően – visszatérnek a statikus **B₀** mágneses tér által meghatározott egyensúlyi állapotukba. Az ehhez kapcsolódó longitudinális (spin-mátrix) és transzverzális (spin-spin) relaxációs folyamatok fontosak az amid vektorok dinamikai vizsgálatában. Előbbit a T1, utóbbit a T2 időparaméter jellemzi, melyek reciprocai a relaxációs ráták ($R1 = 1/T1$ és $R2 = 1/T2$). Ezek összefüggésben vannak a molekula gerinc-dinamikájával, azonban az adatokat csak bizonyos megszorításokkal, egyfajta közelítésként szabad interpretálni.

A gyors időskálájú gerincdinamikai mozgásokkal, illetve azok NMR-spektroszkópia vizsgálatával *Jarymowycz* és *Stone* (2006) foglalkozott részletesen. A vizsgálatokhoz a relaxációs paramétereket vették alapul, melyek igen érzékenyek a molekuláris mozgásokra.

A nyers R1 és R2 adatok szekvencia-függő elemzéséből is levonhatók következtetések a fehérje mozgására vonatkozóan. Mélyrehatóbb vizsgálatoknál lehetőség van ezen értékekből különböző közelítő számításokat végezni. Ilyen az ún. spektrális sűrűségfüggvény (időfüggő rotációs korrelációs függvény) elemzése, vagy a Lipari-Szabó modellfüggetlen közelítés.

II/7. Az exendin-4 gyógyászati vonatkozása

Az exendin-4 farmakológiai jelentőségét a már korábban is említett glukagon-szerű peptiddel való szekvenciális és térszerkezetbeli hasonlósága adja. Így került a kettéstípusú cukorbetegség gyógyításával kapcsolatos kutatások látóterébe.

A GLP-1 a vékonybél alsó szakaszának sejtjei által termelt inkretin*, mely serkenti a hasnyálmirigy β -sejtjeinek inzulin szekrécióját. A 2-es típusú (nem inzulin-függő) diabétesz esetén a glukagon-szerű peptid termelődése bizonyítottan csökken. Az exendin-4 a GLP-receptor agonistája*, féléletideje pedig hosszabb az emberi szervezetben. Antidiabetikus hatását a glükóz-függő inzulinszekréció modulálásán, valamint a gyomor ürítés és az étvágy szabályozásán keresztül éri el. Az Amerikai Egyesült Államokban már forgalomban van az exendin-4 szintetikus változata, az exenatide (Byetta néven). A gyógyszer azonban sajnos számos mellékhatással terheli a szervezetet. Az általános rossz közérzet, hányinger, hányás, hasmenés mellett komoly aggodalomra adnak okot a veseelégtelenségek (FDA).

Világszerte folynak kutatások, melyek célja, olyan exendin-4 analógok előállítás, melyek nem váltják ki az említett mellékhatásokat. Ehhez azonban tökéletesen kell ismerni a fehérjék térszerkezetét, dinamikáját, amihez az NMR-spektroszkópia nyújt hathatós segítséget.

III. Saját laboratóriumi munkám

A következő fejezetekben azon biokémiai eljárásokat tekintem át, melyeket az exendin-4 rekombináns DNS-konstrukciójának létrehozásakor, valamint a fehérje expressziójakor végeztem. A DNS-munka műveletei a Biokémiai Tanszéken, míg a fehérje termeltetési és tisztítási lépések a SzKBL 308-as laboratóriumában zajlottak.

III/1. A DNS-munka

Az *in vivo* fehérjeexpresszió első fázisa az ún. rekombináns DNS konstrukció kialakítása. Ennek két fő komponense a vektor és az inszert. A vektor egy olyan „hordozó” DNS, melynek segítségével a célfehérje aminosav sorrendjét kódoló gén (az inszert) bejuttatható a bakteriális sejtekbe.

Vektorként leggyakrabban kisméretű (1-200 kilóbázis), gyűrű alakú DNS-molekulákat, ún. plazmidokat alkalmazunk. Ezek az *E. coli* sejtben önálló megkettőződésre képesek. A vektor DNS enzimatis úton felnyitható, majd a megfelelően előkészített inszerttel összekapcsolható.

A plazmid fontos része az antibiotikum-rezisztencia gén, melynek segítségével ki tudjuk azon baktérium egyedeket válogatni, melyek felvették a rekombináns DNS-t. A szelekció alapja, hogy antibiotikumos lemezen csak ezek maradnak életben.

Ahhoz, pedig hogy a beépített inszert génterméke meg is jelenjen a sejtben, a vektorban jelen kell lennie transzkripció / transláció iniciátoroknak, valamint ehhez kapcsolódó gátlófehérjéknek (szabályozhatóság, indukálhatóság). A hatékony expresszió érdekében, ugyanis először célszerű egy optimálisan nagy egyedszámú baktérium tenyészetet létrehozni, és ebben termeltetni a fehérjét. Mivel a fehérje szintézis ideje alatt a sejtek osztódása lassul, leáll, egy növesztési-szakaszt kell beiktatni a folyamatba. A gátlófehérjét (represszort) egy megfelelő időpontban, a táptalajba adagolt vegyület (IPTG*, izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid), eltávolítja a DNS-szárlól. Az indukálás után lehetővé válik a génátírás.

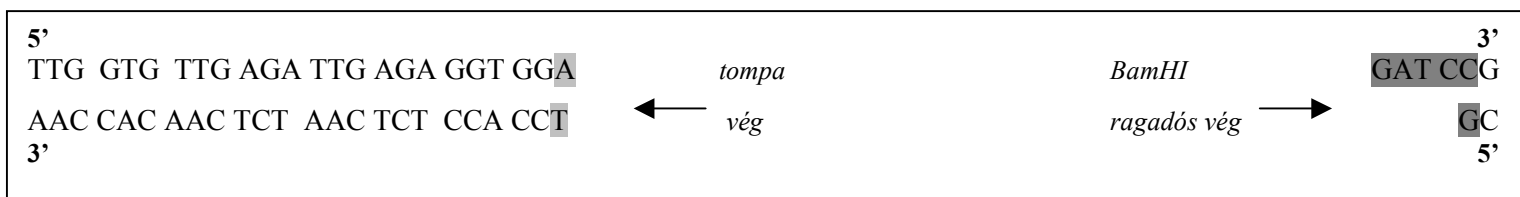
III/1/1. Az exendin-4 esettanulmánya

A célfehérje aminosav sorrendjét – a genetikai kódszótár segítségével – vissza lehet fordítani a nukleinsavak nyelvére. Emlékeztetőül az általam szintetizált exendin-4 aminosav szekvenciája a következő (egyetűs kódokkal):

HGE~~G~~TFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN~~G~~GGPSSGAPPPS

Az ennek megfelelő nukleotid szekvenciát egy minigén* (kisméretű, gyűrű alakú DNS) formájában rendeltük. Ebből hasítottam ki enzimatis úton a célfehérjét ténylegesen meghatározó szakaszt (3×39 bázispárnyi).

A rekombináns DNS-konstrukció létrehozásakor első lépésként a plazmidot, és a minigént is restriktions endonukleázokkal hasítottam. A restriktions enzimek képesek a kétszálú DNS-molekulát „elvágni” (foszfodiészter kötés hidrolízisét katalizálva), ún. palindrom szekvenciáknál, adott bázisok között. A keletkező végek lehetnek tompák (blunt end) vagy ragadósak (sticky end).



1. ábra: a vektor kapcsoló végei

A hasítás után nyert lineáris DNS-darabokon minden esetben a foszfát csoport a dezoxiribóz 5' OH-ján marad, míg a másik érintett nukleotid 3' hidroxil-csoportját szabad formában kapjuk. A későbbi összekapcsoláshoz ez éppen megfelelő. A vektor-inszert összekapcsolást a DNS-ligáz katalizálja, amely – ATP felhasználásával – foszfodiészter kötést létesít a kompatibilis szabad végek dezoxiribózainak 3' OH- és 5' foszfát-csoportjai között. Enzimként az ún. T4-ligázt használtam.

Az elkészült expressziós konstrukciót ezután bejutattam a baktériumokba. A folyamat neve transzformálás, mely során ún. kompetens* sejtekhez adtam a plazmid DNS oldatát, azok pedig – a megfelelő kezelés hatására (*1.sz. függelék*) – felvették azt citoplazmájukba. A transzformálás sajnos sohasem működik 100%-os hatásfokkal. Ahhoz, hogy kiválogassam azon sejteket, melyek felvették a rekombináns DNS-t, a plazmidba beépített Kanamycin* antibiotikum-rezisztencia gént hívtam segítségül. A baktériumokat Kanamycines lemezre szélesztettem, ahol csak azok képesek életben maradni, és szaporodni, melyek ellenállóak a citotoxikumra.

A megfelelőnek ítélt baktérium telepekből steril glicerines stock-ot* is készítem. Ezeket Eppendorfkban $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra fagyasztottam. A későbbi munkák során közvetlenül a stock-ból kentem ki a lemezre.

A DNS-munka során végzett eljárások részletes protokollját, valamint a konstrukció kialakításának menetét az *1. számú függelékben* ismertetem.

III/2. A fehérje-munka

A fehérje-munka részletes protokollját, valamint az SDS-PAGE pontos elvét szintén az *1. számú függelékben* ismertetem.

A fehérje termeltetése során a baktériumokat nagy térfogatú (fél vagy 1 liter) tápoldatban kell szaporítani, növeszteni. Alapvetően kétféle táptalajt lehet használni: a 2YT-t és – izotópjelölt fehérje esetén – a minimált (*2.sz. függelék*). A tápoldatok autokláv-sterilizáltak, és antibiotikumot tartalmaznak (10 mg/l koncentrációban Kanamycin-t). A minimál táptalaj tartalmazza a bevinni kívánt izotópot is, ^{15}N esetén $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, ^{13}C esetén glükóz formájában. Az antibiotikum szerepe kettős: elpusztítja az esetlegesen bekerült idegen mikroorganizmusokat, és megakadályozza azt, hogy a sejtek leadják az expressziós vektort.

IV. A fehérje térszerkezetének és dinamikájának meghatározás NMR spektroszkópiával

A mágneses magrezonancia spektroszkópia legnagyobb előnye, hogy a fehérjéket oldatfázisban, natív körülmények között tanulmányozhatjuk. Az NMR-mérésekhez – a röntgen-krisztallográfiával ellentétben – nem szükséges a mintát kristályosítanunk, így annak dinamikai sajátosságai is tanulmányozhatók (nincsen merev térszerkezetbe kényszerítve). A módszer komoly hátránya, hogy csak kisméretű (~50 kDa-ig) fehérjékre kapunk könnyen (?) értelmezhető képet, ennél nagyobbak vizsgálata már speciális körülményeket igényel.

IV/1. NMR 2D-ben

A biológiai rendszerek NMR vizsgálatára az 1D-s technikák nem alkalmasak, mert a spektrum jelei erősen átfednek, egybeolvadnak. Megoldást a két- illetve ennél magasabb dimenziójú módszerek megjelenése jelentette. Érdeemes ezeknél is minél nagyobb térerősségű mágnezt használni a jobb jeldiszperzitás érdekében.

A 2D-s NMR méréseknél a gerjesztő 90°-os rádiófrekvenciás pulzus, és az interferogram (FID*, Free Induction Decay, szabad indukciós lecsengés) detektálása közé egy ún. kifejlődési időt iktatunk be, melyet a kísérletek során rendre növelünk. Ez alatt különböző pulzusszekvenciák alkalmazásával lehetőséget teremtünk az egymás közelében lévő spinek közötti koherencia kialakulására. Így a spektrumban nemcsak az adott protonról, hanem annak környezetéről is nyerhetünk információt.

A készülék által az idő függvényében detektált FID jelből Fourier-transzformációval nyerjük a frekvencia-függő spektrumot.

A kétdimenziós mérési technikák alapulhatnak azonos (^1H - ^1H) és különböző (^{15}N - ^1H és ^{13}C - ^1H) tömegszámú NMR-aktív magok közötti kölcsönhatáson. Térszerkezet-számoláshoz kis fehérjéknél elegendő a homonukleáris spektrumok felvétele is, míg dinamikai vizsgálatokhoz csak a heteronukleáris típusok alkalmazhatók.

IV/2. A Nukleáris Overhauser Effektus (NOE)

Az NMR-es fehérje-térszerkezet meghatározás során olyan molekulán belüli atomkapcsolatokat térképezünk fel, melyek a szekvencia alapján nem lennének triviálisak. Ehhez az egymással skalárisan nem csatolt, ám megfelelő térbeli közelségben lévő NMR-

aktív magok dipól-dipól kölcsönhatását használjuk ki. A jelenséget felfedezője – Albert Overhauser – után Nukleáris Overhauser Effektusnak (NOE) nevezték el. A NOE mérések során egy kiválasztott proton jelét rádiófrekvenciás térrel besugározzuk, majd a szelektív telítést követően 90°-os nemszelektív pulzust alkalmazva detektáljuk a FID jelet. A lecsatolt protontól megfelelő (< 6 Å) távolságra lévő ¹H-k jelintenzitása megváltozik azon τ idő alatt, mely a telítési és az észlelési pulzusok között telik el.

A dipól-dipól keresztrelaxáció nemcsak protonok, hanem pl. a ¹H-¹⁵N magok között is fellép. Ez a heteronukleáris NOE mérések alapja.

IV/3. A mérési körülmények és az adatok értékelése

A fehérjék vizsgálata nagy koncentrációjú, semleges kémhatású (pH~7) vizes oldatban zajlik. Az exendin-4 esetén 4,2 mg mintát oldottam fel 500 µl H₂O és 30 µl D₂O elegyében. Hozzáadtam még 8 µl Na-azid-DSS-víz elegyet is. A DSS (2,2-dimetil-2-szilapentán-5-szulfonát) protonjai adják a referencia 0 ppm jelet, a deutérium pedig ahhoz szükséges, hogy a mágneses tér külső zavarásából adódó frekvencia-ingadozásokat korigálja a készülék.

A fehérje-mérések egy része trifluoretanolt tartalmazó közegben történik. A TFE a másodlagos szerkezeti elemek stabilitását növeli* (*Nelson & Kallenbach*, 1986). Így könnyebben értelmezhető spektrumot kapunk, kevesebb átfedő csúccsal.

IV/4. Homonukleáris spektrumok

A fehérje térszerkezet meghatározásának első lépése az egyes aminosavakhoz tartozó spinrendszerek azonosítása, majd ezt követi a szekvenciális asszignáció. A polipeptid-lánc kötésrendszeréből következően az egyes aminosavak oldalláncai külön spinrendszert alkotnak, közöttük skaláris csatolás nem lép fel. Bizonyos esetekben még az oldalláncon belül is több csoportot különíthetünk el (His, Phe, Trp, Tyr).

A spinek közötti skaláris csatoláson alapuló főbb homonukleáris spektrumok a COSY (COrelated SpectroscopY) és a TOCSY (TOtal COrelated SpectroscopY). A COSY méréseknél az egymással indirekt (geminális vagy vicinális) csatolásban lévő hidrogénmagokról kapunk információt, míg TOCSY esetén az egy spinrendszerhez tartozó protonok adnak keresztcsúcsot. A jelek a diagonálison kívül helyezkednek el, a megfelelő kémiai eltolódású helyen (ezek értékei aminosavakra lebontva megtalálhatók a *Biological Magnetic Resonance Data Bank* honlapján).

A szekvenciális asszignáció a Nukleáris Overhauser Effektuson alapuló NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spektroszkópia) spektrumok alapján végezhető el. Ebben az egymáshoz képest 6 Å távolságon belül lévő protonok adnak keresztcsúcsot (a skaláris csatolás nem feltétel). A polipeptidláncban általában az i -edik aminosav amid-hidrogénje (HN_i) „látja” az $i-1$ -edik alfáját ($\text{H}\alpha_{(i-1)}$).

Az atomi szintű térszerkezeti információ főleg a NOESY spektrumokban van kódolva. A NOE-csúcsokhoz egyfajta távolság jellegű kényszerfeltétel rendelhető, melyeket bemeneti fájlként kell megadnunk egy szerkezetszámoló programnak. Ez aztán molekuladinamikai szimulációkat végez, eredményként pedig konformációk sokaságát adja.

IV/5. Heteronukleáris spektrumok

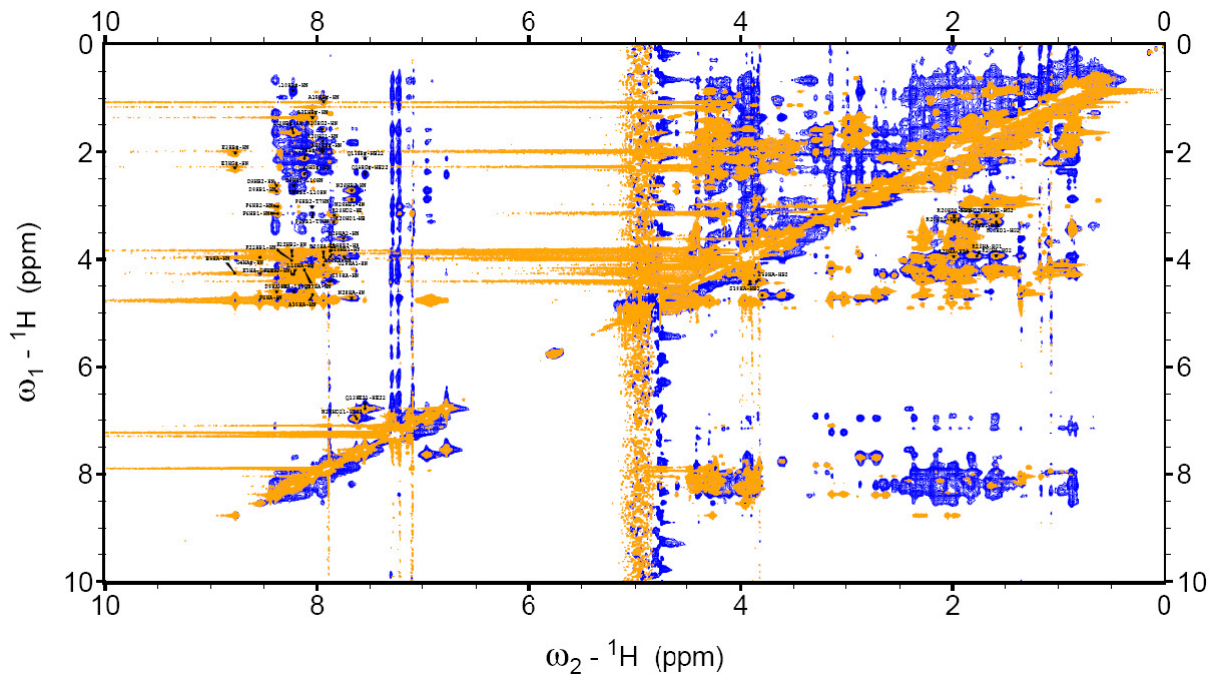
Ha olyan fehérjével dolgozunk, mely a ^1H -n kívül is tartalmaz feles spinű atommagot (^{13}C , ^{15}N izotópjelölt), lehetőségünk van proton-heteronuklid korreláción alapuló spektrumok felvételére is. A HSQC (Heteronuclear Single-Quantum Coherence) spektrumok segítségével az egymással kötésben lévő ^1H - ^{15}N csúcsai azonosíthatók, azaz elsősorban a peptidlánc amid-protonjai asszignálhatók.

A mágneses térben való gerjesztés hatására a rendszer egy magasabb energiaállapotba jut, melynek időtartama véges, előbb-utóbb a spinek alapállapotba relaxálnak. A relaxációs idők a molekula szerkezetétől, oldatbeli és belső mozgásaitól is függenek, így a fehérje térszerkezeti, dinamikai méréseknél nélkülözhetetlenek. A heteronukleáris spektrumfelvételek egy része a T1 és T2 relaxációs időállandó detektálásán alapul. A T1-HSQC méréseknél a heteroatom longitudinális (spin-mátrix), míg T2-HSQC esetén transzverzális (spin-spin) relaxációs idejét határozzuk meg. A spektrumok jelhozzárendelését a HSQC-k alapján végezhetjük.

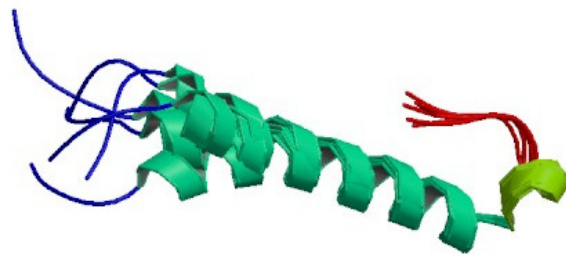
V. Az eredmények értékelése és következtetések

V/1. Az exendin-4 szerkezeti vizsgálata

Az exendin-4-ről felvett homonukleáris spektrumok, sok átfedő csúcsot tartalmaznak, melyek meglehetősen nehezen asszignálhatók. A TOCSY-spektrumoknál egy másik probléma is felmerült: bizonyos jelek hiányoztak. Próbálkoztunk a mérési körülmények optimalizálásával, de sajnos nem sikerült a *Neidigh*-ék által publikált szerkezetet reprodukálni.

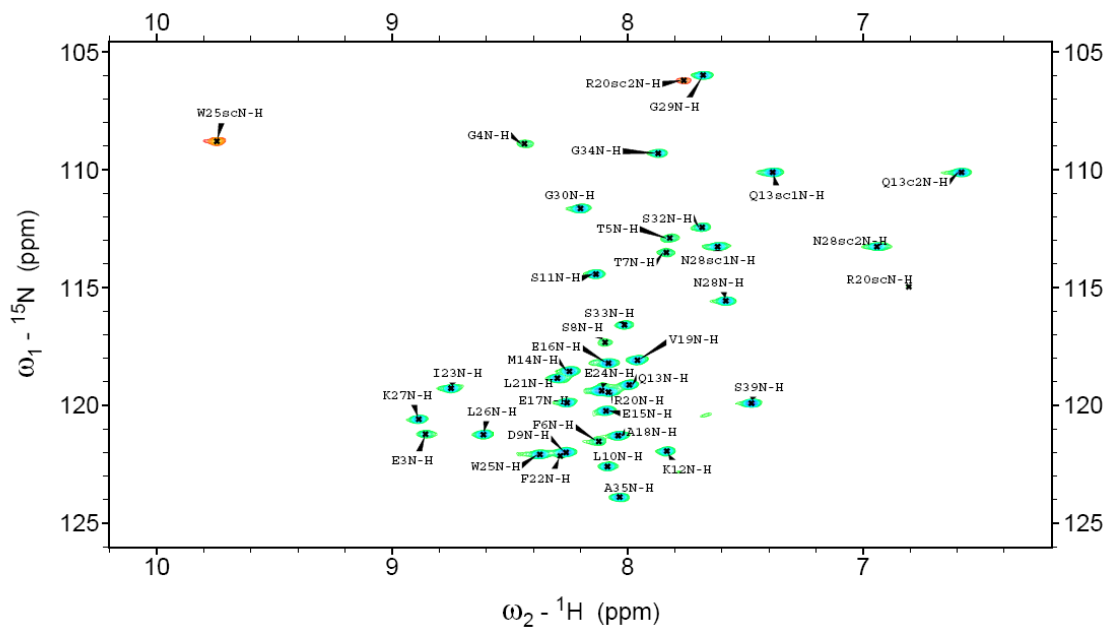


2. ábra: az exendin-4 TOCSY és NOESY spektruma 300 K-en, 0% TFE-ben



3. ábra: az exendin-4 szerkezete a PDB alapján

V/2. Az exendin-4 dinamikai vizsgálatai

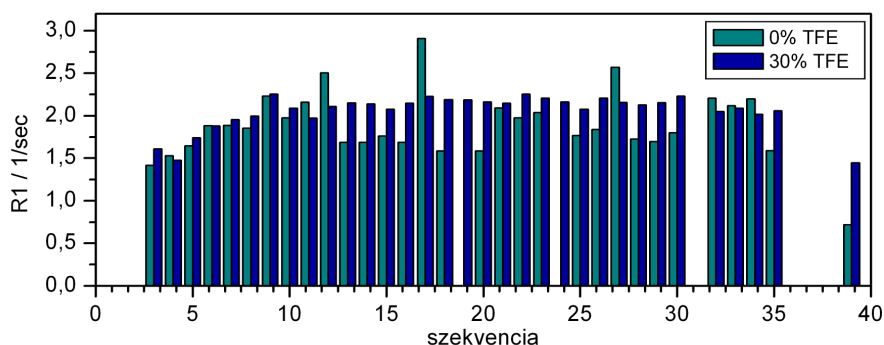


4. ábra: az exendin-4 HSQC spektruma 312 K-en, 30% TFE tartalmú oldatban

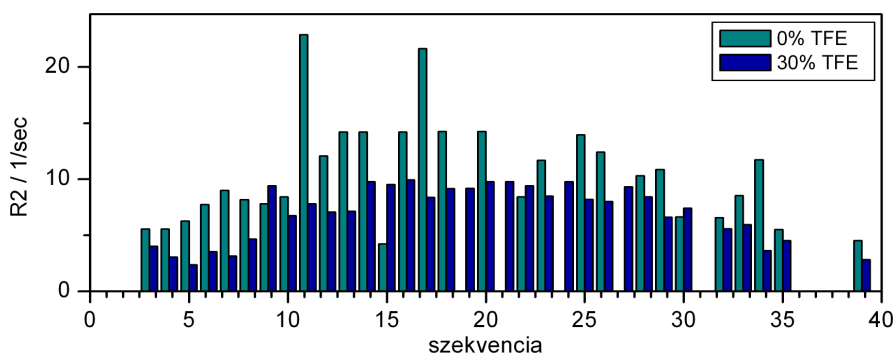
V/2/1. Relaxációs-mérések

Az exendin-4 dinamikai vizsgálatait a T1, T2 relaxációs és a heteronukleáris NOE spektrumok alapján végeztem. A csúcsok asszignációját követően a Sparky programmal kiszámoltattam a relaxációs időparamétereket. A T1 és T2 értékeket valamint ezek reciprokát (R1 és R2 [1/sec] egységekben). Általánosan elmondható az, hogy minél mozgékonyabb egy szegmens, annál gyorsabban relaxál, tehát R1 és R2 értékei nagyobbak lesznek.

Az exendin-4-re számolt relaxációs adatok alapján megállapítható, hogy a molekula *N*-terminális régiója (kb. a Ser¹¹-ig), valamint a *C*-terminusa igen erőteljes szegmensmozgásokkal bír. Ez összhangban van a korábban publikált adatokkal. A középső szakasz *Neidigh*-ék szerint merevebb helikális struktúrával rendelkezik, amit az R1 paraméterek alacsonyabb értékei támasztanak. Az R2 értékek viszont ebben a régióban kiugróan magasak. Itt tehát valami perturbálja a relaxációt, de nem zárható ki a molekula aggregációja sem (ez még további vizsgálatokat igényel).



5. ábra: a longitudinális relaxációs ráták

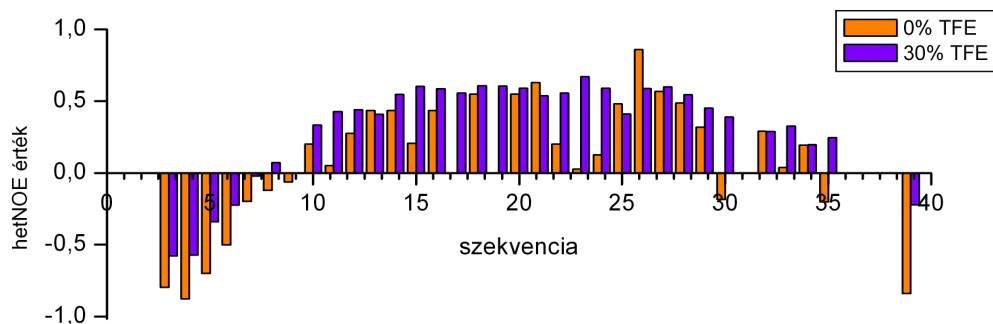


6. ábra: a transzverzális relaxációs ráták

V/2/2. HetNOE-mérések

A heteronukleáris keresztrelaxációs spektrumok elemzéséből is levonhatunk következtetéseket a fehérje dinamikai viselkedésére vonatkozóan.

A hetNOE értékeket – a spektrum csúcsainak asszignációja után – úgy nyerjük, hogy a valódi spektrum jeleinek integrálját és a referenciáét (erősítés nélküli) elosztjuk egymással. A hányadost – mely egynél kisebb értékeket vehet csak fel – ábrázoltam a szekvencia függvényében. A negatív hetNOE érték a molekula gyors mozgására utal, míg merevebb szerkezet esetén pozitív eredményt kapunk.



7. ábra: az exendin-4 heteronukleáris NOE értékei

A fent bemutatott diagramok egyikén sem szerepelt adat a 31. valamint 36-38. aminosavakra. Ezek ugyanis prolinok, amelyeknek nincs amid-protonjuk a peptid-láncban.

Összefoglalás

Munkám során az exendin-4 (EX4) minifehérjét állítottam elő génexpressziós 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% trifluoretanolt 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 szekvenciafüggő 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.

Abstract

During my laboratory work I prepare the exendin-4 miniprotein (EX4) with gene expression, and study the structural and dynamical properties of it by NMR spectroscopy.

Exendin-4 is a natural, 39-residue peptide, isolated from the saliva of a lizard, called *Heloderma suspectum*. It shares 53% sequence identity to a mammalian incretin hormone, glucagon-like-peptide-1 (GLP-1). GLP-1 plays an important role in the carbohydrate metabolism. The analogue EX4 also binds and activates the GLP-1 receptor; stimulates the glucose-dependent insulin secretion. Therefore it can serve as a potential anti-diabetic agent for the treatment of type 2 *Diabetes Mellitus*.

Because of the 39 amino acids and the isotope labelling, the standard solid phase peptid synthetic protocol's cost/benefit ratio wasn't appropriate. That's why I preferred gene expression.

Exendin-4 was prepared in *Escherichia coli* competent cells. Because of its small size, it was co-expressed with ubiquitin, in a fusion system. The EX4-UBK fusion system contains a hexahistidine-tag attached to the *N*-terminus. It enables simple separation and purification via Ni²⁺ affinity chromatography. The removal of the ubiquitin moiety is easily feasible with YUH protease.

I used RP-HPLC (C18 stationary phase) for the final purification step. The elution buffer contained distilled water, acetonitrile and trifluoroacetic acid.

I prepared exendin-4 both in natural and ¹⁵N enriched from for the latter NMR dynamical studies.

The samples for the NMR measurements were dissolved in distilled water (containing 5% D₂O). I recorded both homonuclear ¹H-¹H TOCSY -NOESY and heteronuclear ¹H-¹⁵N NOE, T1 and T2 relaxation spectra. Due to the high number of overlapping peaks in TOCSY-NOESY spectra the structure determination were not feasible. Hence I rather used former published assignments of the exendin-4. From the heteronuclear spectra I could define the relaxation parameters (T1, T2) and hetNOE values. They represent that the *N*-terminal part of the molecule (about the first ten amino acids) and the *C*-terminus from Gly³⁰ have robust motion, unlike the middle part (Ser¹¹-Lys²⁷), which is more rigid because of its helicity.

During my further studies I'm going to analyse the dynamical properties of exendin-4 and perform measurements to structure evaluation. In the future I would like to continue my biochemical laboratory work, preparing recombinant DNA constructions and expressing other proteins *in vivo*.

Irodalomjegyzék

- [1.] Andersen, N.H.; Brodsky, Y.; Neidigh, J.W.; Prickett, K.S. (2002): Medium-Dependence of the Secondary Structure of Exendin-4 and Glucagon-like-peptide-1. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **10**: 79-85
- [2.] Eng, J.; Kelinman, W.A.; Singh, L.; Singh, G.; Raufmann, J-P. (1992): Isolation and Characterization of Exendin-4, an Exendin-3 Analogue, from *Heloderma suspectum* Venom. *The Journal of Biological Chemistry* **267**: 7402-7405
- [3.] Hudáky, P.; Stráner, P.; Farkas, V.; Váradi, Gy.; Tóth, G.; Perczel, A. (2008): Cooperation between a Salt Bridge and the Hydrophobic Core Triggers Fold Stabilization in a Trp-Cage Miniprotein. *Biochemistry* **47**: 1007-1016
- [4.] Jarymowycz, V.A.; Stone, M.J. (2006): The Fast Scale Dynamics of Protein Backbones: NMR Relaxation Methods, Applications, and Functional Consequences. *Chemical Reviews* **106**: 1624-1671
- [5.] Kohno, T.; Kusunoki, H.; Sato, K.; Wakamatsu, K. (1998): A new general method for biosynthesis of stable isotope-enriched peptides using a decahistidine-tagged ubiquitin fusion system: An application to the product of mastoparan-X uniformly enriched with ^{15}N and $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$. *Journal of Biomolecular NMR* **12**: 109-121
- [6.] Marley, J.; Lu, M.; Bracken, C. (2001.): A method for efficient isotopic labeling of recombinant proteins. *Journal of Biomolecular NMR* **20**: 71-75
- [7.] Neidigh, J.W.; Fesinmeyer R.M.; Prickett K.S.; Andersen, N.H (2001): Exendin-4 and Glucagon-like-peptide-1: NMR Structural Comparisons in the Solution and Micelle-Associated State. *Biochemistry* **40**: 13088-13200
- [8.] Pauly, R.P.; Roche, F.; Wermann, M.; McIntosh, C.H.S.; Pederson, R.A.; Demuth, H-U. (1996): Investigation of Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide-(1-42) and Glucagon-like Peptide-1-(7-36) Degradation in Vitro by Dipeptidyl Peptidase IV

Using Matrix-assisted Laser Desorption / Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry. *The Journal of Biological Chemistry* **271**: 23222-23229

- [9.] Pohl, M.; Wank, S.A. (1997): Molecular Cloning of the Helodermin and Exendin-4 cDNAs in the Lizard. *The Journal of Biological Chemistry* **273**: 9778-9784
- [10.] Runge, S.; Schimmer, S.; Oschmann, J.; Schiødt, C.B.; Knudsen, S.M.; Jeppesen, C.B.; Madsen, K.; Lau, J.; Thøgersen, H.; Rudolph, R. (2007): Differential Structural Properties of GLP-1 and Exendin-4 Determine Their Relative Affinity for the GLP-1 Receptor N-terminal Extracellular Domain. *Biochemistry* **46**: 5830-5840
- [11.] Studier, F.W.; Moffatt, B.A. (1986): Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology* **189**: 113-130
- [12.] Thornton, K.; Gorenstein, D.G. (1994): Structure of Glucagon-like-peptide (7-36) in dodecylphosphocoline micelle as determined by 2D NMR. *Biochemistry* **33**: 3532-3539
- [13.] Winkler, G.; Cseh, K. (2004): A glukagon szerű peptid (GLP-1) részvétele a szénhidrát-anyagcsere szabályozásában, receptoragonistái és analógjai potenciális helye a 2-es típusú diabetes mellitus jövőbeni terápiájában. *Diabetologia Hungarica* **12(3)**:187-197

Felhasznált könyvek

- [1.] Bálint M.: Molekuláris biológia I., Műszaki Könyvkiadó, Budapest (2006)
- [2.] Hollósi M.; Laczkó I.; Asbóth B.: Biomolekuláris kémia I., Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest (2005)

- [3.] Perczel A.; Laczkó I.; Hollósi M.: Peptidek térszerkezet vizsgálata (A kémia újabb eredményei 1994), Akadémiai Kiadó, Budapest (1994)
- [4.] Timothy D.W. Claridge: High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry, Tetrahedron Organic Chemistry, Volume 27. (second edition, 2009)

Egyéb felhasznált irodalom

- [5.] Szalontai G.: Mágneses magrezonancia-spektroszkópia – Egy- és kétdimenziós módszerek a kémiai szerkezetkutatásban (egyetemi jegyzet), Veszprémi Egyetem NMR Laboratórium, Veszprém (2003)
- [6.] Gáspári Z.: Kisméretű szerinproteáz-inhibitorok vizsgálata NMR-spektroszkópai és bioinformatika módszerekkel (doktori értekezés), ELTE TTK Szerves Kémiai Tanszék, Budapest (2003)
- [7.] dr. Tőke O.: Mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópia a fehérjekutatásban (jegyzet), MTA Kémiai Kutatóközpont Szerkezeti Kémiai Intézet