

12. fejezet FEHÉRJE ZÁRVÁNYTESTEK (INCLUSION BODY) FELDOLGOZÁSA

Dr. Pécs Miklós



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem,
Mezőgazdasági Kémiai Technológia Tanszék

(Oktatási célra)

Tantárgyi információk

A biológiai iparok elválasztási műveletei

Biomérnök hallgatók számára

3 + 0 + 0 óra, vizsga, 4 kredit

Előadó: dr. Pécs Miklós egyetemi docens

Elérhetőség: F épület, FE lépcsőház földszint 1
(463-) 40-31

pecs@eik.bme.hu

Írásos segédanyag található a:

<http://intranet.ch.bme.hu> címen

Oktatási segédanyagok/

oktatas/ konyvek/ mezzgaz/ bioelv

2

FEHÉRJE ZÁRVÁNYTESTEK

A rec fehérjéknél gyakran előfordul, hogy a kifejezett fehérje nem oldatban jelenik meg, hanem szilárd szemcséket, zárványokat alkot a sejteken belül. Csak prokariótáknál fordul elő, eukariótáknál nem.
(humán: genetikai betegségek)

E. coli →

Legömbölyített, erősen fénytörő, nagy sűrűségű zárványok.



3

FEHÉRJE ZÁRVÁNYTESTEK

Fehérje előállítási technológiák:

Az emlős sejtekkel aktív, natív fehérjét lehet előállítani, de lassú folyamat, kis koncentráció, drága tápoldat

Baktériumokkal gyorsan, sokat és olcsón lehet termelni, de gyakran zárványként jelenik meg (az viszont tiszta).

A két stratégia verseng, pl. tPA (tissue plazminogén aktivátor, vérrögök feloldásában segít, 527 aminosav, 17 diszulfid híd):

Emlős sejtekkel: Activase, Tenecteplase

*E. coli*val: Retavase, Centocor

4

FEHÉRJE ZÁRVÁNYTESTEK

A zárványképződésnek vannak előnyei is:

- A zárvány tiszta fehérje (>90%), alig kell tisztítani
- Védett a proteázoktól
- Nem károsítja a gazdasejtet.

Nem lehet előre megmondani, hogy melyik fehérjéből lesz zárvány. Nem számít:

- Genetika (host, vektor, génkörnyezet)
- Méret, oldhatóság, szerkezet

5

FEHÉRJE ZÁRVÁNYTESTEK

Fehérje bioszintézis $\begin{cases} \text{folding} \rightarrow \text{natív fehérje} \\ \text{zárvány képződés} \rightarrow \text{IB} \end{cases}$

Ha a folding sebessége kicsi a termeléshez képest, akkor sok fehérje megy a zárványokba.

A prokariótákban a folding azért lassabb, mert a citoplazma redukzív közeg, nem kedvez a diszulfid hidak kialakulásának. Csak a periplazmikus tér oxidatív, ott megy is a folding.

6

FEHÉRJE ZÁRVÁNYTESTEK

A zárványtestek feldolgozásának lépései:

- | | |
|-----------------------------|--------------------------|
| 1. Sejtfeltárás | sejttörmelék |
| 2. Centrifugálás, tisztítás | IB paszta |
| 3. Oldás, szolubilizálás | oldott, unfolded fehérje |
| 4. Folding/refolding | oldott, aktív fehérje |

7

1. Sejteltárás

ld. a 3. fejezetet

Baktériumsejtek feltárása: lizozim + erős mechanikai behatások (ultrahang, nagynyomású homogenizátor)

2. Centrifugálás, tisztítás

A zárványtestek kompakt, nagy sűrűségű részecskék, centrifugálásnál jól ülepednek. A felületen visznek magukkal szennyezéseket → mosással tisztítják (pH=8, 0,2 M NaCl, Triton X100, EDTA, DTT, NaN₃)

8

Oldás, szolubilizálás

Tömör szerkezet, vizes közegben oldhatatlan.

Kaotróp, denaturáló oldószerek: 6 M guanidin HCl, 8 M karbamid.

~ 5 g/l fehérje, 1 – 4 óra.

Puffer: enyhén lúgos közeg, pH ~ 8 (tiolát anionok).

Fémionok: EDTA

Erősen redukív közeg (a diszulfid hidakat bontja): ditiotreitrol, dithioeritrol, redukált glutation, merkaptó-etanol, cisztein, cisztamin.

Tisztítás: ha az IB pasztát jól kimosták, alig szükséges. A foldingnál úgyis felhívul.

9

Folding

A folding („hajtogatás”) a fehérje másodlagos és harmadlagos szerkezetének megfelelő kialakulását jelenti. A szerkezetet rögzítik az intramolekuláris

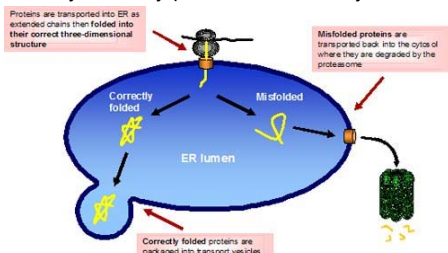
- diszulfid hidak
- másodlagos kölcsönhatások (van der Waals, ionpár)

Az intermolekuláris kapcsolatok hibás szerkezetet eredményeznek.

10

Folding

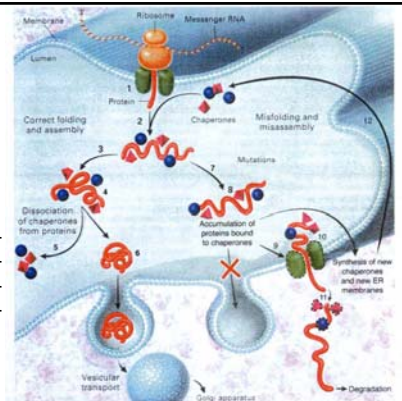
A folding az endoplazmás retikulum belsejében történik. A hibás fehérjéket a sejt proteozómái lebontják.



11

Folding

A folding normális menetét chaperonok (dajkafehérjék) katalizálják.



12

In vitro folding

A foldingot ER és chaperonok nélkül kell végrehajtani.

Lehetséges mellékreakciók →

Az aggregáció megakadályozása érdekében a molekulákat távol kell tartani egymástól → hígítás (másodrendű reakció)

$$\frac{dc}{dt} = k_f c$$

$$\frac{dc}{dt} = k_A c^2$$

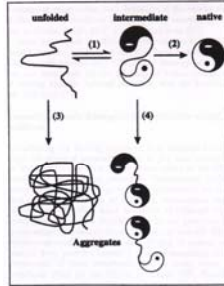


Figure 1. Folding and aggregation during protein renaturation. Correct folding reactions, leading to the native state [(1), (2)], irreversible aggregation reactions, starting from different conformations during the renaturation process [(3), (4)].

13

In vitro folding

A fehérje koncentráció 10-50 mg/l (100 – 500x hígítás)

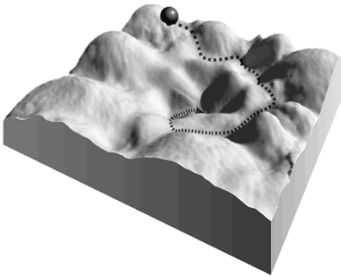
Trükkök:

- lassan engedik be a fehérjeoldatot a folding pufferbe
- több ponton táplálják be
- Több adagban adják hozzá a pufferhez, megvárjuk, amíg az előző adag jórészt átalakul

14

In vitro folding

A fehérje nagyon sokféle alakot vehet fel. Ezek közül csak egy a natív → feltételezik, hogy ez az energiaminimum. Ha elég sokáig „rázzuk”, odatalál a natív formához. Kritikus: a diszulfid hidak helyes kialakítása.



15

In vitro folding

A lehetséges diszulfid hidak száma:

$$n(n-1)/2$$

Elsőre nagy valószínűséggel nem a natív keletkezik → felbontás-újraakötés dinamikus egyensúlyát kell megteremteni → redox-puffer:

1-10 mM –SH és –S–S– vegyület,

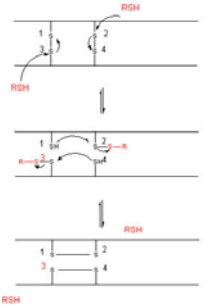
együtt, oxidáló túlsúly, pl.:

Glutation (oxidált > redukált)

Cisztein < cisztin

β-merkaptó-etanol < diszulfidja

Disulfide Shuffling using catalytic (β-mercaptoethanol)



16

In vitro folding

A pufferben még:

pH puffer (pl. 0,1-0,2 M Tris), enyhén lúgos (pH=7,5-8,5),
→ az –SH-k tiolát anionná alakulnak

Kaotrópok kis koncentrációban

Arginin (0,4 – 1 M)

Detergensek (ionos, nemionos, pl. Triton-X)

EDTA (2 – 10 mM) kelátképző

PMSF (~0,1 mM) proteáz-gátló

Esetleg chaperon-hatású molekulák: alkil-karbamid, PEG, lauril-maltozid, CHAPS, ciklodextrinek

+4 – 20 °C, 24-48 óra

17

Egyéb folding technikák

Gélkromatográfia: az oszlopon a tömény kaotróp lemarad, a fehérjék (felhígítva) előre szaladnak. Az aggregátumok mennek legelől (ami szétesik, az lemarad), elválaszthatók.

Egyúttal tisztít is (szennyezések elválnak)

Lassan érdemes csinálni, hogy legyen idő az egyensúly beállítására.

Ha lehet, alkalmazzunk olyan gyantát, ami elválasztja a foldet, az unfoldet és a misfolded alakokat → ezeket vissza lehet vinni, újra hajtogatni.

18

Egyéb folding technikák

Hordozó felületén (matrix assisted folding): a fehérjéket egyik végüknél fogva egy felülethez kötik → nem találkoznak, nincs aggregáció. Kötési lehetőségek:

- erősen ionos szakasz – ioncserélőn
- hexaArg vég – anioncserélőn
- poliHis vég – fémkelát oszlopon

Ráengedik a folding puffert, lassan végbemegy a folding. Leválasztás a kötésnek megfelelő módon:

- sógradiens
- EDTA
- His, imidazol

Tisztít is.

19

Egyéb folding technikák

Dialízis: nem hígítanak, hanem dialízissel fokozatosan csökkentik a kaotróp és a redukáló S-vegyületek koncentrációját → néha jó, de néha kicsapódik

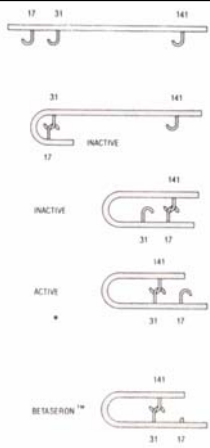
Micellákban és liposzómákban: ha a fehérje molekulák elkülönülten állnak, nincs aggregáció.

Hidrofób kromatográfia: során a fehérje sokszorosan adszorbeálódik-deszorbeálódik az apoláris felületen, ennek során "megtalálja" a jó foldingot

20

In vitro folding

A hibás kötések egy részének kialakulása megakadályozható, ha a nem-kötő Cys helyett Ser-t építenek be.



Folding ellenőrzése

Nehéz ügy, de lehet

- » Enzimaktivitás mérés
- » ELISA
- » Más bioassay
- » Ligand-kötés
- » HPLC
- » Spektroszkópia

22