



12. fejezet

FEHÉRJE ZÁRVÁNYTESTEK (INCLUSION BODY) FELDOLGOZÁSA

Dr. Pécs Miklós



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem,
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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 →

Legöbolyított, erősen fénytörő, nagy sűrűségű zárványok.




BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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, ugyanazt kétféle úton is elő lehet állítani.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék


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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék


FEHÉRJE ZÁRVÁNYTESTEK

Fehérje bioszintézis

- folding → natív fehérje
- zárvány képződés → IB

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

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1. Sejtfeltárás

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 szennyezőseket → mosással tisztítják (pH=8, 0,2 M NaCl, Triton X100, EDTA, DTT, Na₂S₂O₄)



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 (tíolat anionok).

Fémionok: EDTA

Erősen redukzív közeg (a diszulfid hidakat bontja): ditiotreitól, redukált glutation, merkaptó-etanol, cisztein, cisztamin.

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



Folding

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

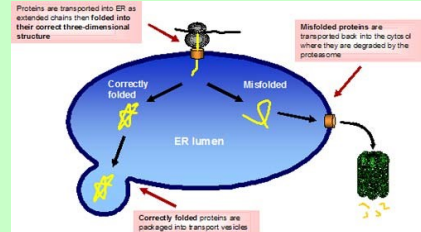
- diszulfid hidak
- másodlagos kölcsönhatások (van der Waals, ionpár)

Az intermolekuláris kapcsolatok hibás szerkezetet eredményeznek.



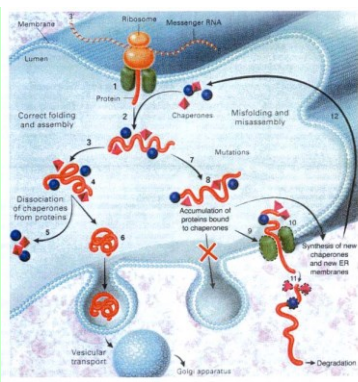
Folding

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



Folding

A folding normális menetét chaperonok (dajkafehérjék) katalizálják.



In vitro folding

Prokariótákban a foldingot ER és chaperonok nélkül kell végrehajtani.

Lehetséges melléreakciók →

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

$$\frac{dc}{dt} = k_f c \quad \frac{dc}{dt} = k_d c^2$$

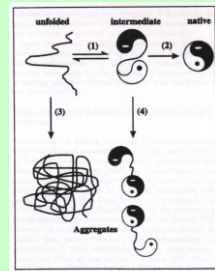


Figure 1. Folding and aggregation during protein renaturation. Correct folding reactions, leading to the native state [(1), (2)], irreversible aggregation reactions, starting from different conformations during the renaturation process [(3), (4)].



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



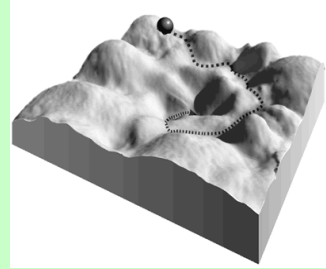
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

In vitro folding

A fehérje nagyon sokféle alakot vehet fel. Ezek közül csak egy a natív → feltételezik, hogy ez az energiaminimum. Ha elég sokáig „ráz-zuk”, odatalál a natív formához.

Kritikus: a diszulfid hidak helyes kialakítása.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

14

In vitro folding

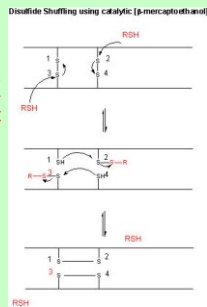
A lehetséges diszulfid hidak száma:
 $n \times (n-1) / 2$

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

1-10 mM –SH és –S–S– vegyület, egymás mellett, oxidáló túlsúly, pl.:
Glutathion (oxidált > redukált)

Cisztein < cisztin

β-merkaptó-etanol < diszulfidja



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

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)

Detergens (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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

16

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 folded, az unfolded és a misfolded alakokat → ezeket vissza lehet vinni, újra hajtogatni.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18

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.

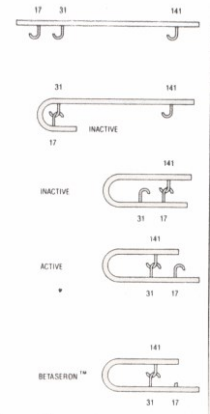


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

19

In vitro folding

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Folding ellenőrzése

Nehéz ügy, de lehet

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

21