

INŻYNIERIA BIAŁEK TERAPEUTYCZNYCH – ĆWICZENIE II

Chromatografia powinowactwa – oczyszczanie białek

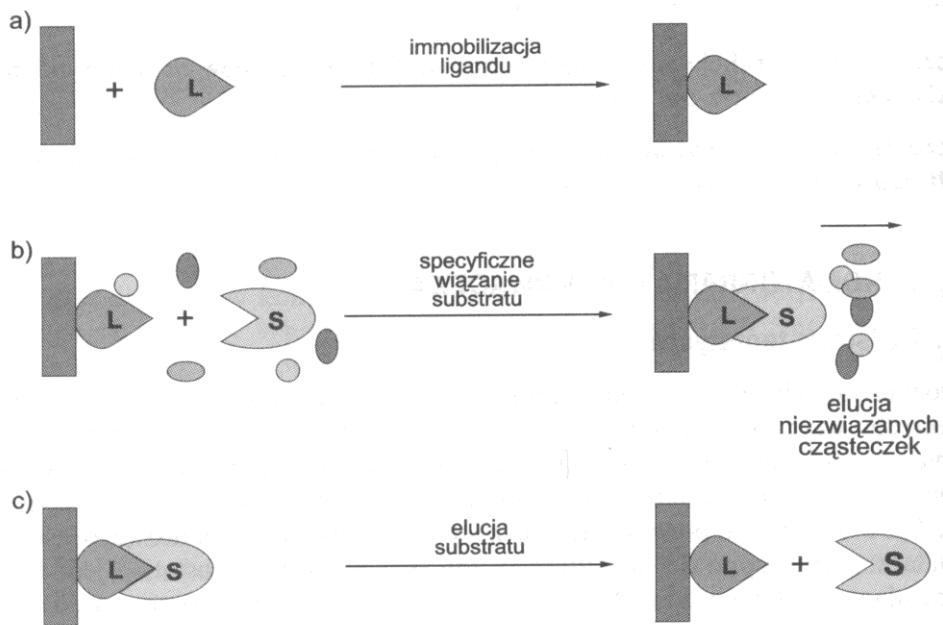
Wprowadzenie

Dla wyjaśnienia budowy i roli poszczególnych struktur subkomórkowych w procesach metabolicznych jest niezbędna ich izolacja, oczyszczenie i dokładna charakterystyka. **Frakcjonowanie organelli komórkowych** polega na homogenizacji, czyli zniszczeniu błon komórkowych na drodze mechanicznej lub chemicznej, rozdzieleniu frakcji wewnątrzkomórkowych w zależności od masy, powierzchni i ciężaru właściwego. Homogenizację przeprowadza się najczęściej na drodze mechanicznej, przez wprowadzenie w ruch zawiesiny komórek lub tkanek, w odpowiednim do tkanki homogenizatorze, tak aby występowały siły tarcia dostatecznie duże do rozerwania dużych błon, lecz zbyt małe do uszkodzenia błon małych organelli komórkowych. Konieczne jest zachowanie odpowiednio niskiej temperatury oraz zastosowanie roztworu izotonicznego z cytoplazmą podstawową i obojętnego chemicznie w stosunku do organelli. W wirowaniu różnicowym zawiesinę podaje się najpierw wirowaniu przy niskich obrotach (40000g) i przez krótki okres czasu (30 min), a następnie zawiesinę nad uzyskanym w ten sposób osadem przenosi się do innej probówki i wiruje się dłużej (60 min) przy większych obrotach (100000g), aby oddzielić cząstki mniejsze. W ten sposób niejednorodną zawiesinę można podzielić na kilka frakcji bardziej jednorodnych - **frakcję cytosolową**, która stanowi supernatant i mikrosomalną, którą jest osad po wirowaniu.

Chromatografia powinowactwa jest to szczególny typ chromatografii adsorbcyjnej, w której wykorzystuje się wzajemne powinowactwo dwóch różnych substancji. Jedna z nich, chemicznie związana z nierozpuszczalnym nośnikiem i zwana ligandem, specyficznie adsorbuje drugą substancję, znajdującą się w mieszaninie innych związków. Oddziaływanie substancji rozpuszczonej w fazie ruchomej z unieruchomionym ligandem może mieć różny charakter, jak między 1) hormonem a receptorem 2) enzymem a substratem, 3) enzymem a inhibitorem, 4) przeciwciałem a antygenem lub haptenem, 5) komplementarnymi odcinkami kwasów nukleinowych 6) kwasami nukleinowymi a białkami 7) lektynami a cukrowcami, 8) dopełniaczem a przeciwciałami grupy IgG.

Schemat przebiegu chromatografii powinowactwa:

- a) chemiczne wiązanie ligandu ze złożem (immobilizacja ligandu)
- b) specyficzne wiązanie substratu do unieruchomionego ligandu oraz odmycie niespecyficznie zaadsorbowanych cząsteczek białkowych
- c) elucja specyficznie związanego substratu



Związki izolowane metodą chromatografii powinowactwa można eluować również w sposób niespecyficzny, za pomocą buforów o niskim lub wysokim pH (np. bufor octanowy, bufor węglanowy itp.), roztworów o dużej sile jonowej (2,5 M roztwór NaCl) czy związków rozrywających wiązania wodorowe (4-8 M roztwór mocznika, 6 M roztwór guanidyny). Zastosowanie zarówno specyficznych, jak i niespecyficznych eluentów pozwala uzyskać czysty preparat izolowanej substancji.

Jako nośniki w chromatografii powinowactwa są stosowane złoża, które tradycyjnie wykorzystuje się do filtracji żelowej z tym, że przed użyciem konieczna jest odpowiednia ich aktywacja. Są to pochodne dekstranowe (Sephadex), agarozowe (Sepharose, Bio-Gel A) lub poliakrylamidowe (Bio-Gel P). Do aktywacji żeli dekstranowych i agarozowych powszechnie stosuje się reakcję z halogenocyjanami. Oprócz nośników, które można przygotować we własnym zakresie (Sephadex, Sepharose, Bio-Gel A), dostępne są również złoża już przystosowane do chemicznego wiązania ligandu, np. CNBr-activated-Sepharose 4B lub Affi-Gel 10. Rodzaj wiązania między ligandem i nośnikiem zależy zarówno od rodzaju substancji używanej jako ligand, jak i od nośnika. Ugrupowania karboimidowe, powstające podczas

aktywacji żelu bromocyjanem, reagują wyłącznie z grupami aminowymi przyłączanej substancji. Z aktywnym nośnikiem można następnie związać chemicznie wszystkie typy biopolimerów, tj białka, kwasy nukleinowe oraz wielocukrowce zawierające grupy aminowe. Ligandy białkowe wiążą się także za pomocą grup karboksylowych (Glu, Asp), hydroksylowych (Tyr, Ser, Thr), sulfhydrylowych (Cys). Kwasy nukleinowe przyłącza się do nośnika za pośrednictwem reszt fosforanowych lub grup enolowych zasad azotowych, a cukrowce - przez grupy wodorotlenowe reszt cukrowych. W tabeli podano rodzaje nośników oraz reagujące z nimi grupy funkcyjne ligandów.

Tabela 1. Zestawienie najczęściej stosowanych złożeń gotowych do kowalencyjnego wiązania ligandu.

L.p.	Ligand	Grupa funkcyjna ligandu użyta do wiązania z nośnikiem	Nazwa handlowa złoża
1.	Białka, peptydy, aminokwasy, kwasy nukleinowe, polinukleotydy	Aminowa	CNBr-activated Sepharose 4B Activated CH-Sepharose 4B Epoxy-activated Sepharose 6B CH-Sepharose 4B Affi-Gel 10 Affi-Prep 10
2.	Białka, peptydy, aminokwasy	Karboksylowa	AH-Sepharose 4B Affi-Gel 102
3.	Cukrowce	Hydroksylowa	Epoxy-activated Sepharose 6B Affi-Gel Hz
4.	Białka, peptydy, aminokwasy, nukleotydy zawierające siarkę	Tiolowa	Thiopropyl Sepharose 6B Activated Thiol Sepharose 4B Affi-Gel 501
5.	Antybiotyki, hormony, koenzymy, inne małowcząsteczkowe biomolekuły	Grupy dystansowe: aminowa, tiolowa,, hydroksylowa, karboksylowa	CH-Sepharose 4B AH-Sepharose 4B Epoxy-activated Sepharose 6B Activated Thiol Sepharose 4B Thiopropyl Sepharose 6B Affi-Gel 601

Chromatografia kowalencyjna jest to szczególny przypadek chromatografii powinowactwa. Chromatografia kowalencyjna znalazła szczególne zastosowanie w przypadku izolowania cząsteczek zawierających grupy tiolowe. U podstaw tego rodzaju chromatografii powinowactwa leży możliwość utworzenia kowalencyjnego wiązania między cząsteczkami, które zawierają grupy tiolowe, z wolnymi grupami tiolowymi znajdującymi się w obrębie złoża. Wiązanie takie jest spontaniczne i odwracalne.

Innym wariantem chromatografii powinowactwa jest **chromatografia chelatująca**. U podstaw tego rodzaju chromatografii powinowactwa leży możliwość odwracalnego wiązania (chelatowania) jonów metali przez specjalnie przygotowany nośnik. Jony metali (Zn, Cu, Cd, Hg, Co lub Ni) związane ze złożem mogą z kolei specyficznie adsorbować peptydy i białka wykazujące do nich powinowactwo. Jako nośnik stosuje się zwykle złożo Epoxy-activated Sepharose 6B, do którego można trwale przyłączać ligand chelatujący jony, np. kwas iminodioctowy, albo gotowe złożo Chelating Sepharose 6B, które ma związany z powierzchnią ligand zdolny do tworzenia kompleksów chelatowych z jonami metali.

S-Transferazy glutationowe

Transferazy glutationowe (GST) [EC 2.5.1.18.] stanowią rodzinę wielofunkcyjnych białek, które działają jako ważne enzymy detoksykacyjne oraz wewnątrzkomórkowe białka wiążące, pełniąc funkcję transportowe. Jako enzymy katalizują one reakcje sprzęgania między nukleofilowym zredukowanym glutationem i dużą liczbą związków elektrofilowych. Ponadto wiążą one liczne związki, których nie metabolizują (niestabilne ligandy) i sugeruje się, że działają jako białka magazynujące oraz wewnątrzkomórkowego transportu dla związków, które mają ograniczoną rozpuszczalność w wodzie. Transferazy glutationowe występują powszechnie w świecie żywych organizmów. Znalaziono je wśród większości tlenowych mikroorganizmów, u wszystkich badanych dotąd zwierząt i roślin. Najwyższe stężenia tych enzymów wykazują tkanki ssaków, gdzie na przykład stanowią one 5% i ponad 10% zawartości wszystkich białek cytosolowych wątroby człowieka i szczura, odpowiednio. Inaktywacja związków kancerogennych zachodząca przy udziale GST polega na tworzeniu kwasów merkapturowych, które są następnie wydalane z moczem. W pierwszym etapie następuje enzymatyczne przeniesienie przez transferazy glutationowe aktywnej grupy kancerogenu (zawierającej elektrofilowy atom N,S,C) na nukleofilową grupę tiolową zredukowanego glutationu frakcji cytosolowej wątroby i nerek. Takie koniugaty glutationu usuwane są aktywnie z komórek lub ulegają kolejnym przekształceniom poprzez enzymatyczną hydrolizę. Odłączona zostaje reszta γ -glutamylowa przez γ -glutamylotranspeptydazę i w dalszej kolejności reszta glicynowa przez dipeptydazę. Powstały koniugat cysteinowy ulega N-acetylacji. Produktem jest kwas premerkapturowy, który w słabo kwaśnym środowisku samorzutnie przechodzi w kwas merkapturowy. GST wykazują też niekatalityczne właściwości w detoksykacji szkodliwych substancji. Wysoce reaktywne elektrofilowe metabolity związków kancerogennych (np. niektóre metabolity benzo[a]pirenu jak: 3-hydroksy-benzo[a]piren, dihydrodiol w pozycjach 4,5-, 7,8-, 9,10-) mogą bez udziału

glutationu wiązać się niekowalencyjnie poprzez nukleofilową grupę samego enzymu. Ten sposób wychwytywania elektrofilowych cząsteczek lipofilowych umożliwia ich transport w obrębie komórki i wydalanie na zewnątrz. Transferazy glutationowe wyizolowane z cytoplazmy komórek ssaków są dimerami a mikrosomalne trimerami o masie cząsteczkowej podjednostek 25kD i 17kD, odpowiednio. Każda podjednostka składa się z dwóch domen, których miejsca aktywne spełniają różne funkcje. Domena I odpowiada za polarną interakcję (w tzw. miejscu G) między glutationem i enzymem, a domena II wiąże elektrofilowy substrat (w tzw. miejscu H). W wyniku porównania pierwszorzędowych struktur izoenzymów GST stwierdzono większą zmienność w domenie II, co prawdopodobnie wiąże się, z różnymi właściwościami katalitycznymi. W obrębie danej klasy enzymy mogą występować w formie hetero- i homodimerów. Istnieje wiele form transferaz glutationowych, a każda z nich ma określone cechy takie jak:

- szeroką i nakładającą się specyficzność substratową,
- właściwości immunochemiczne,
- aktywność katalityczną.

Dalsze cechy różnicujące rodzinę transferaz glutationowych to:

- homologia sekwencji aminokwasów,
- lokalizacja na chromosomie,
- punkt izoelektryczny,
- specyficzność tkankowa.

Te podobieństwa i różnice doprowadziły do wyłonienia następujących klas enzymów cytozolowych: α (GST A), μ (GST M), π (GST P), θ (GST T), κ (GST K), ζ (GST Z), oraz formy mikrosomalnej (MIC 1). Homologia sekwencji aminokwasów w tej samej klasie wynosi ponad 50% (zwykle ponad 75%), a pomiędzy klasami 25-30% niezależnie od gatunku ssaka.

Transferazy glutationowe człowieka oprócz wykazywania specyficzności tkankowej różnią się dystrybucją w tkankach płodowych i tkankach ludzi dorosłych, wykazują także zróżnicowanie międzypersoniczne. Charakterystyczny dla każdej tkanki skład izoenzymów GST oraz aktywność katalityczna mogą zmieniać się w rozwoju osobniczym pod wpływem czynników endogennych (hormony, interferon) i egzogennych (kancerogeny i specyficzne induktory). Ilościowe i jakościowe różnice w dystrybucji izoenzymów są ważne dla wrażliwości tkanki na kancerogeny.

Izoenzymy klasy α ulegają silnej ekspresji w wątrobie, nerkach i tkankach nadnerczowych, z kolei nie wykazują ekspresji w płucach, mózgu, erytrocytach i łożysku na żadnym etapie rozwoju. Izoenzymy klasy μ są grupą najpowszechniej ulegającą ekspresji. Ich obecność potwierdzono w wątrobie, mózgu, płucach, sercu, śledzionie, nerkach, mięśniach szkieletowych, żołądku, śluzówce jelit i limfocytach, a brak w wątrobie płodowej i nadnerczach. Izoenzymy klasy π występują w większości narządów, z wyjątkiem wątroby. Jednakże w wątrobie i nadnerczach płodowych główną formą GST jest izoenzym klasy π . Dla stosunkowo niedawno wydzielonej klasy θ GST, potwierdzono ekspresję w wątrobie i erytrocytach. Cytoplazma wątroby szczura zawiera przynajmniej 6 głównych klas transferaz o określonych właściwościach enzymatycznych. Wątroba myszy zawiera 3 główne transferazy, a ludzka zawiera od jednej do kilku podstawowych form. Transferazy glutationu podobnie jak większość enzymów I i II fazy biotransformacji również wykazują polimorfizm. Spośród transferaz glutationowych polimorfizm genetyczny wykazują enzymy należące do klas M1, M3, P1 i T1. Częstość polimorfizmu zmienia się wraz z rasą. I tak zmniejszająca się kolejność przypadków GST M1 null jest następująca: Malezyjczycy 64%, Chińczycy 63%, biali Amerykanie 50%, Indianie i Amerykanie pochodzący z Afryki 20% .

Gen GST M1 odgrywa istotną rolę w detoksykacji elektrofilowych metabolitów PWA. Zaobserwowano związek między występowaniem null GST M1 a wrażliwością na choroby takie jak rak płuc lub rak pęcherza zależny od palenia. Benzo[a]piren jest głównym składnikiem dymu tytoniowego i jego kancerogeny metabolit (+)-anti-7,8-dihydrodiol-9,10- epoksyd jest dobrym substratem dla GST M1.

Dane dotyczące zależności polimorfizmu enzymów z wrażliwością na choroby są ciągle gromadzone, ale związek przyczynowy między substratami wykorzystywanymi przez poszczególne produkty genu i chorobami związanymi z polimorfizmem tego genu wciąż nie jest wyjaśniony.

Metody stosowane do badania ekstraktów tkankowych S-transferaz glutationu obejmują albo bezpośrednio analizę immunochemiczną albo rozdział izoenzymów i ich identyfikację oraz ocenę ilościową poprzez oznaczanie zawartości białka lub aktywności enzymatycznej.

Metody immunochemiczne zwłaszcza stosujące przeciwciała monoklonalne pozwalają na dokładne oznaczenie izoenzymów GST, ale poważną trudnością jest uzyskanie przeciwciał, które byłyby w stanie rozróżnić między wysoce homologicznymi białkami i jak dotychczas nie zostały opisane monospecyficzne przeciwciała zdolne do zidentyfikowania wszystkich opisanych już podjednostek. Metody stosujące rozdział izoenzymów również nie są idealne.

Główną ich wadą jest to, że trudno jest ocenić wszystkie straty jakie występują na poszczególnych etapach wchodzących w skład danej procedury.

Obecnie do oczyszczania izoenzymów GST stosuje się chromatografię powinowactwa wykorzystując preparaty S-heksyloglutathione-Sepharose albo GSH-Sepharose jako adsorbenty. Uzyskane eluaty poddaje się następnie rozdzielowi za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej stosując kolumny z odwróconą fazą lub jonowymiennej chromatografii f.p.l.c. (fast protein liquid chromatofocusing) na anionitach i kationitach. Identyfikację oraz wyznaczenie mas cząsteczkowych rozdzielonych frakcji przeprowadza się za pomocą ogniskowania izoelektrycznego, filtracji żelowej na kolumnach z Sephadexem lub elektroforezą na żelu poliakryloamidowym. Ostatnio dla oceny czystości i określenia mas cząsteczkowych izoenzymów GST zaproponowano technikę jonizacji przez rozpylanie w polu elektrycznym w połączeniu ze spektrometrią masową (elektrospray ionization mass spektrometry ESI/MS).

Przebieg ćwiczenia:

1. Oczyszczanie GST metodą chromatografii powinowactwa przy zastosowaniu sefarozy 4B sprzężonej z glutationem (Glutathione Sepharose 4B)

Zasada metody:

Do oczyszczania GST wykorzystywano chromatografię powinowactwa przy zastosowaniu sefarozy 4B sprzężonej z glutationem (Glutathione Sepharose 4B).

Odczynniki:

- Bufor A:
 - 150 mM KCl
 - 50 μ M fluorek fenylometylosulfonowy
 - 1 mM EDTA
 - 2 mM ditiotreitrol (DDT)
 - 10 mM bufor fosforanowy (K_2HPO_4/KH_2PO_4), pH 7.0
- Bufor B:
 - 5 mM GSH
 - 1 mM DTT
 - 50 mM Tris-NaOH pH 9.1
- Sefaroza 4B sprzężona z glutationem
- Buforowany roztwór soli fizjologicznej (PBS)

Postępowanie:

0,5 ml sefarozy sprzężonej z glutationem przemyć w probówce 5-10 objętościami roztworu PBS. Uzyskaną zawiesinę wirować przy 500 g przez 5 minut, nadsącz odrzuć, a do osadu dodać 0,5 ml buforu A, mieszać i wirować przy 500 g przez 5 minut. Po przemyciu do sefarozy dodać 0,1 ml frakcji i inkubować przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Następnie próby wirować, nadsącz odrzucić, a do osadu dodać 0,5 ml buforu A. Po dokładnym wymieszaniu, wirować. Po przemyciu buforem A do osadu dodać 0,5 ml buforu B, inkubować 10 minut w temperaturze pokojowej i wirować. Nadsącz (eluat) przenieść do czystej probówki typu Eppendorf.

2. Oznaczanie białka we frakcji cytozolowej oraz w eluatach zebranych w probówkach Eppendorf metodą Lowry (rozcieńczenie w eluacie 1X , rozcieńczenie we frakcji cytozolowej 10x)

Zasada metody:

W metodzie tej wykorzystuje się czułą reakcję jaką dają wiązania peptydowe i aminokwasy aromatyczne z odczynnikiem Folina-Ciocalteu. Przebiega ona w dwóch etapach:

I etap – reakcja biuretowa wiązań peptydowych z miedzią w środowisku zasadowym

II etap – redukcja kwasu fosfomolibdenowego i fosforowolframowego do odpowiednich tlenków przez miedź związaną z białkiem oraz przez aromatyczne aminokwasy występujące w białku: tyrozynę i tryptofan.

Wykonanie:

Składnik	Próba przed oczyszczaniem	Próba po oczyszczeniu	Próba wzorcowa	Próba ślepa
Eluat	-	150 µl	-	-
Fracja cytozolowa	150 µl	-	-	-
Woda destylowana	-	-	-	150 µl
Roztwór wzorcowy białka (0.1 mg/ml)	-	-	150 µl	-
Odczynnik C (zasadowy r-r CuSO ₄)	770 µl	770 µl	770 µl	770 µl
Próby pozostawić na 10 min inkubacji w temperaturze pokojowej				
Odczynnik Folina-Ciocalteu	77 µl	77 µl	77 µl	77 µl

- Zawartość wszystkich probówek należy dokładnie wymieszać, pozostawić na 10 min w ciemnym miejscu. Odczytać wartość absorbancji prób badanych oraz wzorcowej względem próby ślepej przy $\lambda=750\text{nm}$.
- Obliczyć stężenie białka w analizowanych próbach wg następującego wzoru:

$$C_{\text{białka}} [\text{mg/ml}] = (A_{\text{bad}} / A_{\text{wz}}) \times \text{stęż. wzorca (0.1 mg/ml)} \times \text{rozcieńczenie próby}$$

Zakres stężenia białka oznaczanego metodą Lowry'ego: 0.01-0.5 mg/ml

3. Oznaczanie aktywności S-transferaz glutationowych (GST) w cytosolu oraz w eluacie metodą z CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzenem)

Zasada metody:

Podstawą pomiaru aktywności GST są zmiany absorbancji zachodzące w wyniku reakcji sprzężania 1-chloro-2,4-dinitrobenzenu z glutationem.

Odczynniki:

1. 40 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB)
2. 20 mM glutation (GSH)
3. 0,2 M bufor fosforanowy o pH 6,5.

Schemat oznaczenia:

SKŁADNIKI REAKCJI	PRÓBA BADANA [ml]	PRÓBA KONTROLNA [ml]
Bufor fosforanowy	1,0	1,0
Woda destylowana	0,45	0,5
GSH	0,5	0,5
Fracja cytozolowa/eluat	0,05	0,05
CDNB	0,05	-

Reakcję zapoczątkowuje dodanie CDNB. Pomiaru absorbancji dokonuje się przy pomocy spektrofotometru w czasie 1 minuty od chwili zapoczątkowania reakcji w temperaturze 30°C przy długości $\lambda=340\text{nm}$ wobec próby kontrolnej.

Aktywność GST wyraża się ilością nmoli CDNB sprzężonego z glutationem w ciągu 1 minuty w przeliczeniu na 1mg białka we frakcji cytosolowej.

Obliczenia

$$\text{Akt}_{\text{GST}} [\text{nmol/min/mg}] = \Delta A \times 19,792 \times 1000 / \text{stęż. białka (mg/ml)}$$

19,792-molowy współczynnik absorbancji

4. Określenie efektywności oczyszczania GST z wykorzystaniem techniki chromatografii powinowactwa