

Chaperonok. A felgombolyodás orvosi és biotechnológiai vonatkozásai.

1. Chaperonok
2. Amiloidózisok és prionbetegségek
3. Inklúziós testek renaturálása

Chaperonok

A chaperonok (dajkafehérjék, chaperon=gardedám)

- más fehérjék nemnatív állapotaihoz kötődnek
- ezeket segítik a natív konformáció elérésében
- általában ATP felhasználásával

Miért van szükség chaperonokra?

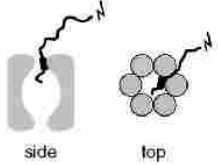

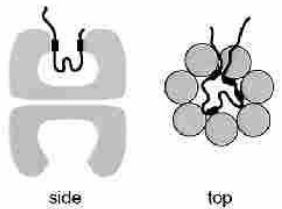

- *In vitro* is számos fehérjét nem tudunk renaturálni
- *In vivo* többféle szituáció teszi szükségessé a chaperonokat:
 - ◆ a fehérjeszintézis során a naszcens polipeptidlánc inkorrekt kölcsönhatásokba léphet saját magával vagy a környezetében lévő molekulákkal (pl. ha az N-terminálisnak a C-terminálissal kellene kölcsönhatásba kerülnie, de a C-terminális még nincs készen)
 - ◆ A membránokon transzlokálódó fehérjéknek részlegesen vagy teljesen legombolyodott állapotban kell átbújniuk a membránon. Szükséges egy mechanizmus, ami erre az időre legombolyodott állapotban tartja, utána lehetővé teszi a felgombolyodást.
 - ◆ Számos fehérje funkciójához hozzátartozik, hogy alegységei disszociáljanak, s amikor kell, újra asszociálódjanak (pl. mikrotubulusok, klatrinburkos vezikulák, DNS-replikáció egyes fehérjéi)
 - ◆ Egyes organellumfehérjék alegységeinek egy része az organellumban, más része a citoplazmában szintetizálódik (pl. Rubisco). Meg kell akadályozni az inkorrekt kölcsönhatásokat, míg az összes alegység egy helyre nem kerül.
 - ◆ Stressz hatására (pl. hő sokk) sok fehérje denaturálódik, aggregálódik. Ebből az állapotból regenerálódni kell.

Példák chaperonokra

Család	Tagok	Egyéb nevek
Chaperoninok	Chaperonin 60	Bakteriális: GroEL (E. coli) Kloroplasztisz: RBP (Rubisco subunit Binding Protein) Mitokondriális: Hsp60 Eukariota citoszol: TRiC
	Chaperonin 10	Bakteriális: GroES Mitokondriális
Hsp70	Hsp68, 72, 73; DnaK BiP, Grp75, 78, 80, Hsc70 KAR2, SSAI-4, stb.	
Hsp90	Hsp83, 87, HtpG	
PapD	PapD, FimC	
GimC	Gim1-6, Gim1, Gim5	

Ezekon kívül még számos család (Hsp100, Hsp90, Hsp40, kis Hsp-k, stb.)

Az egyes chaperonfélések működési módjukban is különböznek.

CHAPERONE	TOPOLOGY OF BINDING	ACTION
Hsp100	 side top	ATP-dependent disaggregation and unfolding for degradation
Hsp90	multi-protein complex	Conformational maturation of steroid hormone receptors and signal transducing kinases
Hsp70 (DnaK)		ATP-dependent stabilization of hydrophobic regions in extended polypeptide segments
Hsp60 (GroEL)	 side top	ATP-dependent facilitation of folding to the native state
Small Hsps (Hsp25, etc.)		Stabilization against aggregation during heat-shock
Calnexin/Calreticulin	?	Folding of glycosylated proteins in the ER in cooperation with glucosyltransferase

A két legjobban jellemzett csoport (csak ezek létfontosságúak, a többi chaperon nem):

- **Hsp70**: nyújtott lánc egy pontjához kötődik, lokálisan hat
- **Hsp60 (chaperoninok)**: kompakt nemnatív állapotot köt, az egészet körülveszi

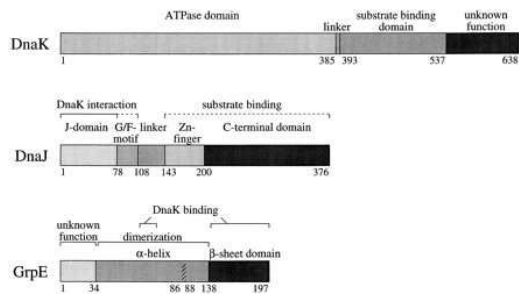
A Hsp70 chaperoncsalád

- Stressz hatására is indukálódik, de normál körülmények között is jelen van
- segíti egyes, újonnan transzlálódott fehérjék felgombolyodását
- segíti fehérjék transzlokációját membránokon
- segíti oligomerek szétszerelődését
- segíti az instabil fehérjék proteolitikus degradációját
- egyes fehérjék (pl. transzkripció faktorok) aktivitását is szabályozza
- Legjobban jellemzett: bakteriális Hsp70: **DnaK**

A Hsp70 hatása

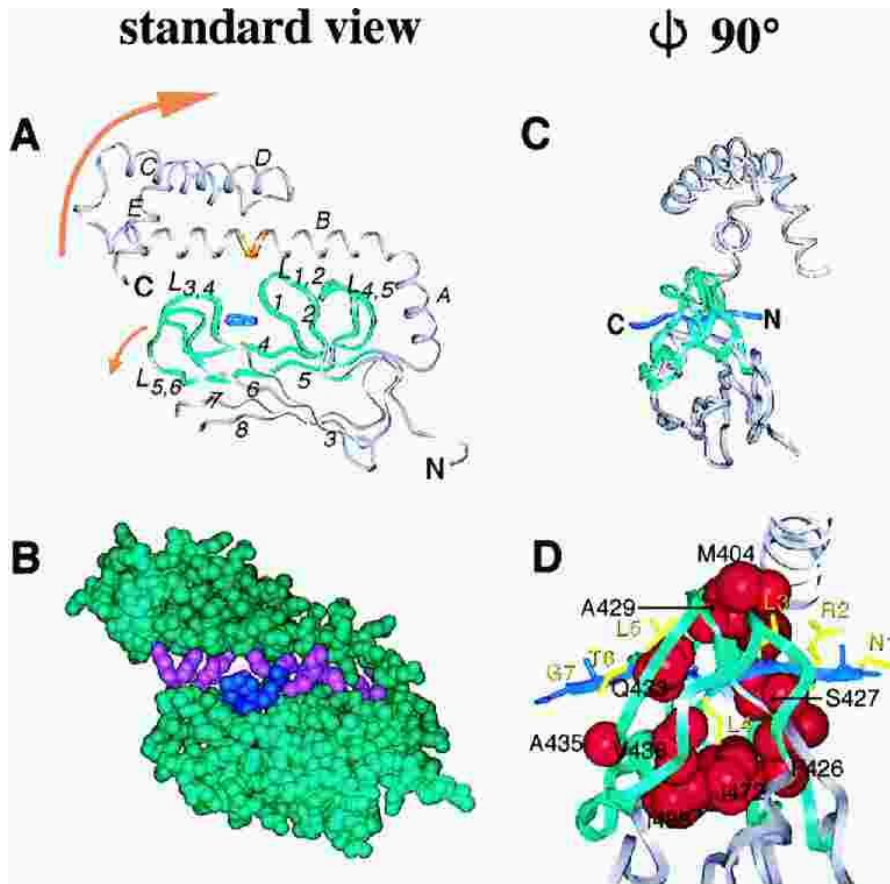
- A nyújtott lánchoz egy ponton kötődik, ezzel megóvjaa a láncot az aggregációtól vagy a felgombolyodástól. ATP hidrolízise szabályozza a disszociációt.

Doménszerkezet



- **ATPáz domén:** N–terminális, 44 kDa
- **szubsztrátkötő domén:** 25 kDa, két részdoménből áll:
 - ◆ tulajdonképpeni **szubsztrátkötő domén:** 15 kDa
 - ◆ **C–terminális domén:** 10 kDa, kevésbé konzerválódott

DnaK fehérje szubsztrátkötő doménje és NRLLLTG peptid komplexe

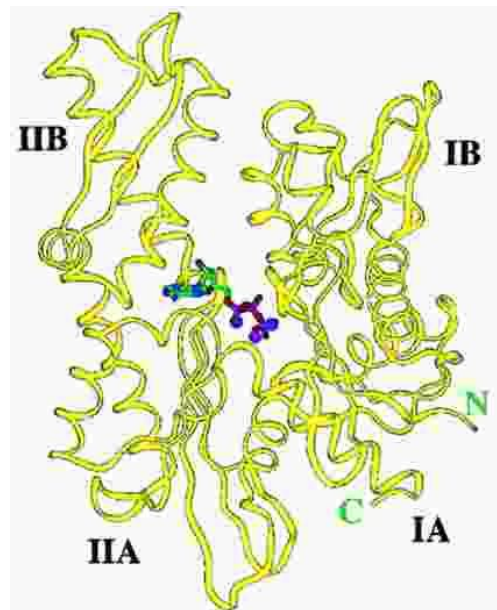


- Két négyszálú béta–lemez egymás fölött, ezek fölött néhány hélix
- a felső béta–lemez négy hurkot bocsát ki, kettő képezi a *szubsztrátkötő zsebet*, ami egy 5x7 angström keresztmetszetű csatorna
- A B hélix fedészerűen ráborul a hurkokra, a csatorna tetejét képezve
- A hélix egy ponton fel tud nyílni, szabaddá téve a zsebet
- A peptid nyújtott, mintegy átszúrja a fehérjét, három középső hidrofób oldallánca és a végeken lévő egyéb oldallancok lépnek csak kölcsönhatásba a fehérjével
- A csatorna végei negatív töltésűek

Mit köt a DnaK?

- Konszenzusmotívum: 2–4 hidrofób oldallánc, melyek végein egyéb, de nem savas oldallánc van.
- Ilyen motívum minden fehérjében átlag 36 aminosavanként előfordul

A DnaK ATPáz doménje



- Két nagy, globuláris szubdomén, közöttük mély hasadék, ez a nukleotidkötő zseb

A DnaK két állapota

- ATP-kötött állapot: a fehérjeszubsztrát-kötő csatorna nyitva van, szubsztrát szabadon kötődhet, ill. leválhat
- ATP nélküli (azaz nukleotid nélküli vagy ADP-kötött) állapot: a fehérjeszubsztrát-kötő csatorna zárva van, szubsztrát be van zárva (ha van)

A mechanikai munka keletkezésének mechanizmusa, az ATPáz doménről a szubsztrátkötő doménre az információ átvitelének mikéntje nem tisztázott

Kochaperonok

A DnaK önmagában is működik, de nem elég hatékony. Két *kochaperon* segíti: **DnaJ** és **GrpE**. Együtt több százszorosára növelik a DnaK turnoverjét.

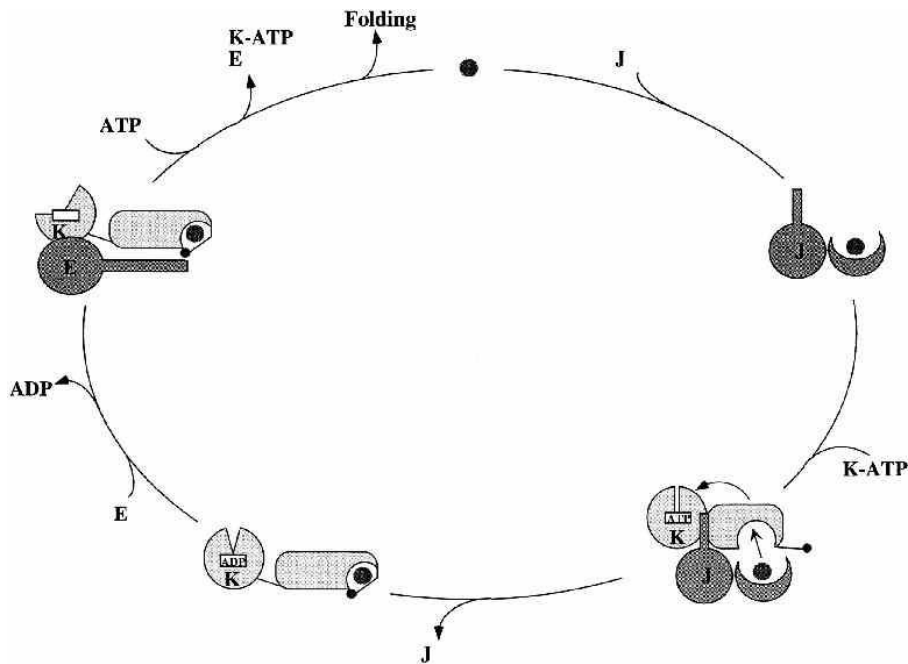
DnaJ

- *J domén*: N-terminális 80 aminosav
- Maga is képes a peptidszubsztrátot kötni, azt a DnaK-nak át tudja adni
- A DnaK ATPáz aktivitását stimulálja

GrpE

- A DnaK ATPáz doménjéhez köt, serkenti az ADP disszociációját.

A DnaK rendszer működése

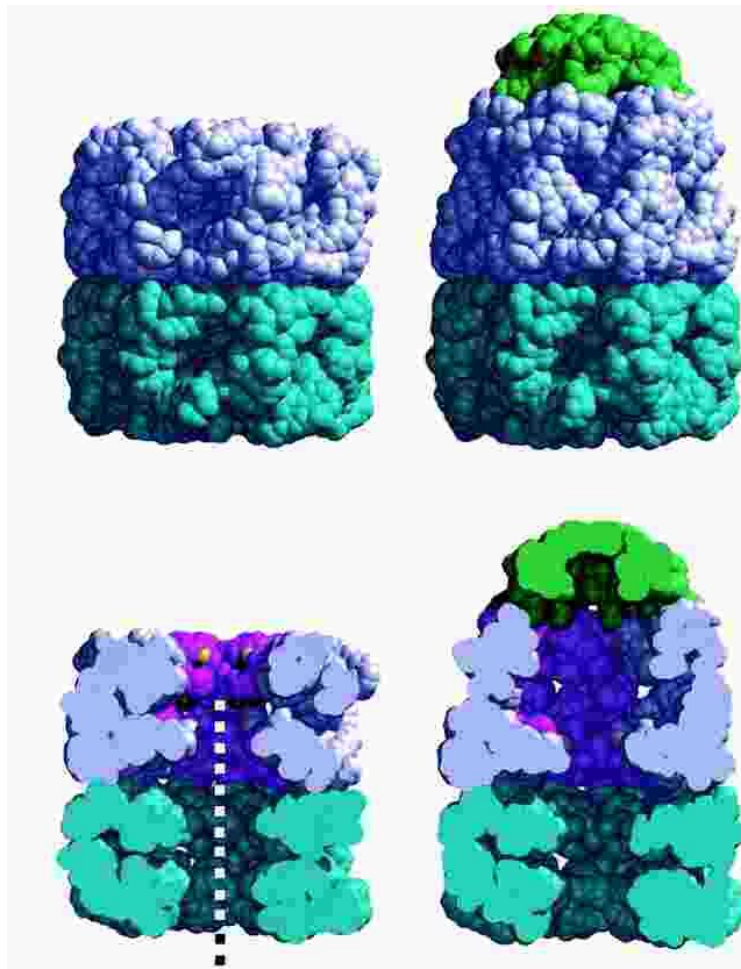


1. A DnaJ megköti a szubsztrátot [a DnaK–ATP is megkötheti]
2. A DnaJ a J doménjével kötődik a DnaK–ATP ATPáz doménjéhez, átadja a szubsztrátkötő doménnek a szubsztrátot, és elősegíti az ATP hidrolizálását
3. Megtörténik az ATP hidrolízise. A szubsztrátkötő zseb bezárul, a DnaJ leválik
4. Jön a GrpE és letaszítja az ADP–t
5. Az ADP helyére bejön egy ATP. A zseb felnyílik, a szubsztrát kiszabadul. A GrpE leválik. Kezdődhet a ciklus előlről.
 - ◆ Általában többször ismétlődik a szubsztrát kötése és disszociációja
 - ◆ A disszociált szubsztrát lehetőségei:
 - ◇ felgombolyodik
 - ◇ aggregálódik
 - ◇ visszaköt a Hsp70–hez
 - ◇ más chaperonhoz köt

A Hsp60 chaperoncsalád (chaperoninok)

- ◆ Chaperonin: kezdetben egy olyan csoportnak adták a nevet, amit prokariotákban, valamint mitokondriumokban és kloroplasztiszokban találtak. Később eukariota citoplazmában is felfedezték.
- ◆ Stressz hatására indukálódik, de normálisan is sok van belőle
- ◆ segíti a fehérjék felgombolyodását, főleg "misfolded" ("félregombolyodott") állapotból
- ◆ segíti az oligomerizációt (a monomerek helyes felgombolyodásának elősegítésével)
- ◆ E. coliban GroEL, GroES: életfontosságú fehérjék
- ◆ GroEL: az E. coli összes fehérjéjének felét köti legombolyodott állapotban
- ◆ fehérjeszintézisnél és membrántranszportnál is kötődik a polipeptidekhez
- ◆ Kloroplasztiszban: RBP Rubisco Binding Protein: hozzákötődik a Rubisco nagy alegységeihez, amíg a kis alegységek meg nem érkeznek a citoplazmából
- ◆ Legjobban jellemzett: E. coli GroEL, GroES

A GroEL/ES szerkezete

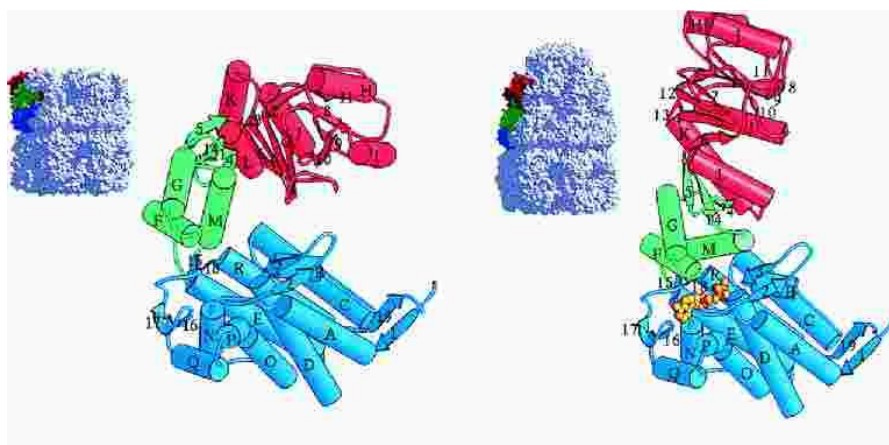


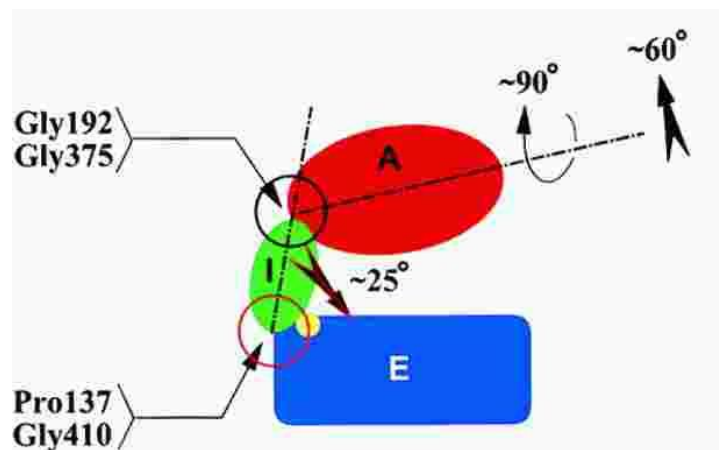
- ◆ GroEL: 2x7 alegységből álló, gyűrű alakú komplex, közepén nagy üreggel
- ◆ GroES: 7 db, 10 kDa alegységből álló gyűrű

Két fő állapot:

- ◆ **peptidfogadó** állapot (ábra bal oldal): az üreg nyitott a külvilág felé, belső hidrofób felszíne köti a szubsztrátfehérjét
- ◆ **felgombolyodás-aktív** állapot (ábra jobb oldal): ATP-kötés és a GroES sapka bekötődése révén jön létre. Az üreg megnő, a GroES kupolája lezárja. Az üreg falának jellege megváltozik (inkább hidofil lesz). Az üregben lévő fehérje felgombolyodik.

Átkapcsolás a két állapot között





- ◆ A GroEL alegység 3 doménből áll: apikális (a csúcsnál), ekvatoriális (a komplex középvonala felé eső), köztes (a kettő között)
- ◆ Az átkapcsolásnál nagyszabású doménmozgások történnek:
 - ◇ A köztes domén 25 fokkal lehajlik, bezárva az alatta az ekvatoriális doménben lévő ATP-t
 - ◇ Az apikális domén 65 fokkal felhajlik, azaz nagyban megemelődik, s eközben hossz tengelye körül is 90 fokkal elfordul
- ◆ Az üreg térfogata kétszeresére nő
- ◆ Teljesen megváltozik az üreg falának a jellege, a szubsztrátfehérje leválik a falról

A két gyűrű együttműködése

- ◆ Az egyik gyűrűben az ATP-k bekötődése (7 db!) kiváltja a másik gyűrűben az ES sapka és az ADP-k disszociációját
- ◆ Az ES kötése az egyik gyűrűhöz erősen gátolja egy másik ES kötését a másik gyűrűhöz
- ◆ Egy gyűrűn belül az ATP-k kötése kooperatív, a másik gyűrű ATP-kötését viszont hátráltatja

Az ATP-kötés és az ATP-hidrolízis szerepe

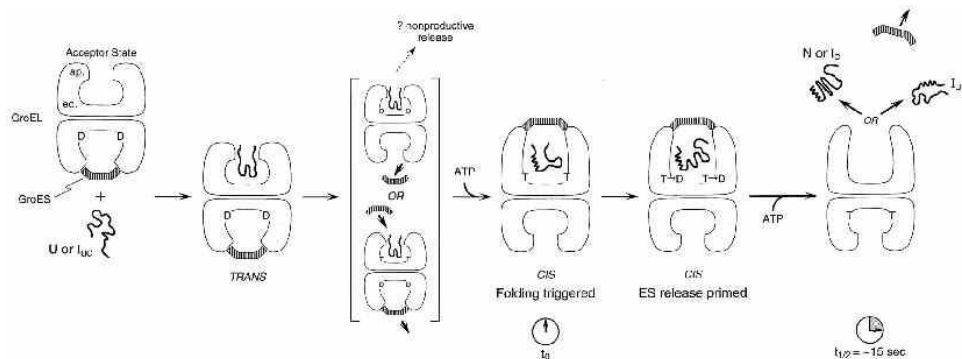
- ◆ ATP-kötés:
 - ◇ a GroES kötéssel együtt ez idézi elő az átkapcsolást a felgombolyodás-aktív állapotba, azaz a nagyléptékű doménmozgásokat
 - ◇ a másik gyűrűnél kiváltja a GroES és az ADP-k leközdését
- ◆ ATP-hidrolízis:
 - ◇ meggyengíti a GroES kötését, hogy az később leválhasson
 - ◇ ezáltal továbblépteti a "gépet" a következő állapotba

Időtartamok (23 Celsius-fokon)

- ◆ Az üregbe bekötődik a felgombolyítandó fehérje
- ◆ Kötődik az ATP és a GroES
- ◆ 1 másodperc múlva megtörténik az átkapcsolás, a szubsztrátfehérje leválik az üreg faláról és elkezd felgombolyodni
- ◆ 5–10 másodperc múlva megtörténik az ATP hidrolízise
- ◆ A szubsztrátfehérje még további 10–15 másodpercet tölt a zárt üregben, próbál gombolyodni (összesen kb. 20 másodperce van)
- ◆ ezután megtörténik a GroES leközdése, a szubsztrátfehérje távozik

Hatékonyság: több mint 90%-ban sikeres felgombolyítás

A működés sémája



- ◆ Valószínűleg kétütemű működés (hol az egyik, hol a másik üreg dolgozik)

Nyitott kérdések

- ◆ Milyen konformációban kötődik a szubsztrátfehérje? (Valószínűleg részlegesen felgombolyodott, félregombolyodott, olvadt gombóc jellegű)
- ◆ A kötődés növeli-e a szubsztrát legombolyodottságát?
- ◆ Az átkapcsoláskor a doménmozgás tovább gombolyítja-e le a szubsztrátot? (Vsz. igen)
- ◆ Miután a szubsztrát levált a csatorna faláról, kölcsönhatásba lép-e még vele, vagy úgy érzékeli, hogy semmi sincs körülötte (végtelen higítás)?
- ◆ Ha többször átmegy a szubsztrát a chaperonon, közben fejlődik-e az állapota, vagy mindig ugyanabból az állapotból indul?
- ◆ Egyáltalán: mi történik a szubsztrát konformációjával az egész folyamatban?

Felgombolyodási betegségek: amiloidózisok

- ◆ **Amiloid**: rostos fehérjelerakódások (extra- vagy intracellulárisak), melyek betegségekkel járnak együtt
- ◆ **Amiloidózisok**: Lassan kialakuló, degeneratív betegségek
- ◆ Sok esetben azonosították a rostos lerakódások fő fehérjekomponensét:

Betegségek

Fehérje	Betegség
ABri	Familial British dementia
alpha-Synuclein	Parkinson-kór
A-beta (amiloid béta-peptid)	Alzheimer-kór
Gelsolin	Finnish-type familial amyloidosis
Huntingtin	Huntington-kór
IAPP (islet amyloid polypeptide)	Type II diabetes
Immunoglobulin V _L domain	Light-chain amyloidosis
Lysozyme	Hereditary systemic amyloidosis
Medin	Aortic medial amyloid
SAA (serum amyloid A)	Secondary systemic amyloidosis
Tau	Alzheimer-kór, frontotemporal dementia
TTR (transthyretin)	Senile systemic amyloidosis, familial amyloid polyneuropathy

- ◆ A rostok jellemzően "kereszt-béta" szerkezetűek: a hossz tengelyre merőleges béta-szálakat tartalmaznak

- ◆ A betegségek okai valószínűleg a lerakódások (a betegségre való hajlamot fokozó mutációkról több esetben kimutatták, hogy növelik az adott fehérje rostképző hajlamát)
- ◆ A résztvevő fehérjék sokfélék, natív szerkezetük között nincs hasonlóság

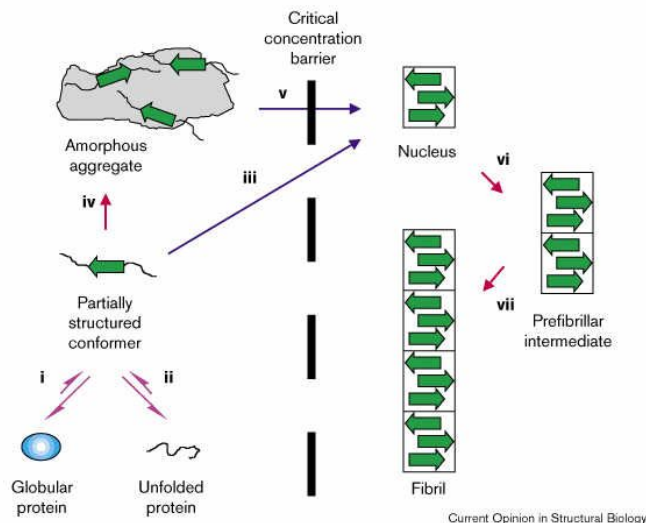
A rostképződés részlegesen fel-, ill. legombolyodott állapotból indul

- ◆ Több globuláris fehérjéről (lizozim, TTR, V_L) kimutatták: részlegesen le kell gombolyodniuk a rostképzéshez
- ◆ A fokozott rostképződést okozó mutációk ált. destabilizálják a natív konformációt, növelve a részlegesen felgombolyodott állapot populációját
- ◆ Több fehérjéből sikerült részlegesen denaturáló körülmények között rostképződést kiváltani
- ◆ Legombolyodott állapotban a legstabilabbak a következő peptidekn: amiloid béta peptid (A–béta), IAPP, alfa–synuclein, tau. Az A–béta és a IAPP esetében kimutatták: a rostképződést megelőzi egy olvadt gombóc jellegű, a natívnál jóval több másodlagos szerkezetet tartalmazó állapot átmeneti jelentkezése

Proteolízis és rostképződés

- ◆ Számos amiloidogén fehérje egy nagyobb lánc proteolitikus fragmentuma (pl. A–béta, ABri, medin, gelsolin).
- ◆ A proteolízisre való érzékenységet megnövelő mutációk növelik a peptid mennyiségét → nő a rostképződés valószínűsége

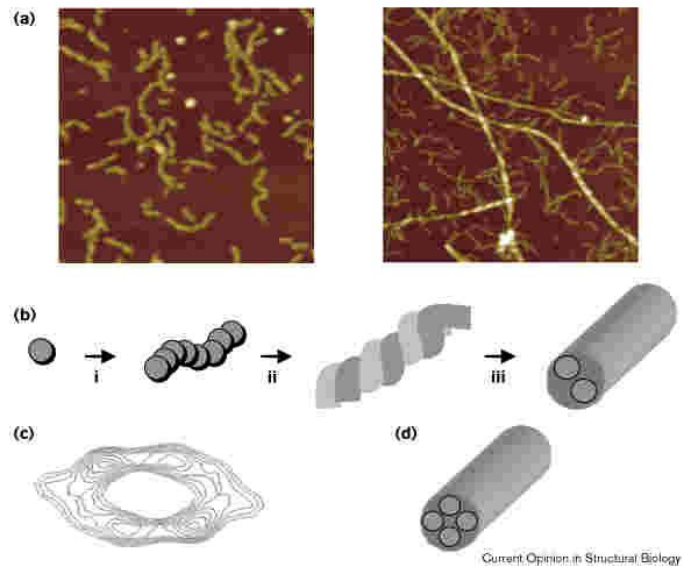
A rostképződés mechanizmusa: nukleációfüggő oligomerizáció



- ◆ Globuláris fehérjéből vagy legombolyodott fehérjéből részleges szerkezetű amiloidogén intermedier keletkezik
- ◆ A némi béta–szerkezetet is tartalmazó intermedier rendezetlen, amorf aggregátumokat képezhet, vagy
- ◆ ha a koncentráció meghalad egy kritikus értéket, akkor rendezett önasszociáció révén béta–lemezes nukleuszt képez
- ◆ a béta–lemez növekedésével a szerkezet növekszik, oligomer, majd fibrillum jön létre

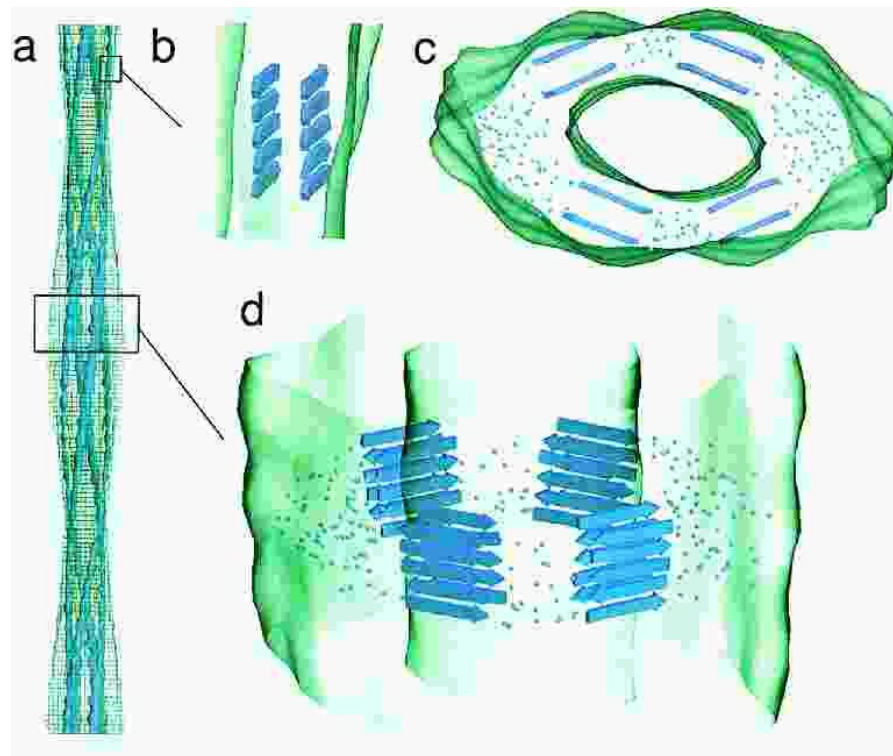
Protofibrillumok

- ◆ A fibrillum ált. nem monomerek hozzáadásával növekszik, hanem
- ◆ hosszabb–rövidebb **protofibrillumok** jönnek létre, s ezek állnak össze
- ◆ Elektronmikroszkópos kép: azt mutatja, hogy a protofibrillumok gyöngsorszerűek, gömböcskékből állnak
- ◆ Több protofibrillum összecsavarodhat, így állnak össze fibrillummá



bal: gyöngyszerű protofibrillumok; jobb: kész fibrillumok is

A rostok 3D szerkezete



- ◆ Egy vastag rost több szálból (protofilamentumból) állhat
- ◆ Sokféle morfológia lehet (egyenes, görbült, csavart, nem csavart, stb.)

Fehérje	Morfológia	Méreték (nm)
Acylphosphatase	Egyenes	d = 3–5
alpha-Synuclein (wild-type, A53T, A30P)	Egyenes, csavart	d=10, h=8–10, d=10–19, d=12
IAPP	Egyenes vagy kissé görbe, csavart	h=5.2, p=49, h=6.8, p=25
Abeta42	Egyenes	d = 7–10
CspB (residues 1–22)	Egyenes	d = 10

Gelsolin (residues 173– 243)	Egyenes vagy kissé görbe	d = 18–23
Immunoglobulin V _L domain	Egyenes	d = 5
Lithostathine (residues 12– 144)	Egyenes, sima	d = 30–50
Medin (residues 286– 293)	Egyenes	d = 7
P22 tailspike beta–helix domain	Görbe, csavart	d = 50
SAA (residues 1– 11)	Pálcika– vagy szalagszerű, csavart	d = 4–7

(h: magasság, d: átmérő, p: tengely menti periodicitás)

További kutatási irányok

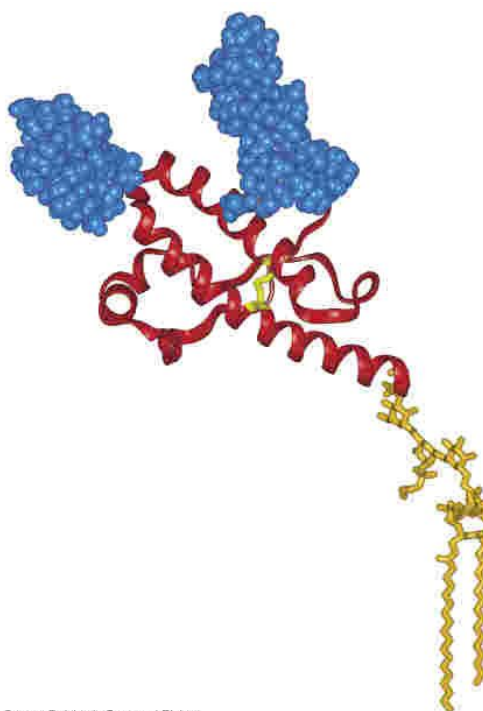
- ◆ A rostképződés in vivo mechanizmusa
- ◆ A környezet hatása (hőmérséklet, ionerősség, pH, redoxpotenciál)
- ◆ A felületek hatása (membránok közelsége)
- ◆ A betegség kialakulása (milyen káros hatása van a rostoknak, a protofibrillumoknak, stb.)

Felgombolyodási betegségek: Prionbetegségek

- ◆ Prionbetegség: ez is amiloidózis, de fertőző
- ◆ Transmissible spongiform encephalopathies (átvihető szivacsos agyvelőelváltozások), TSE
- ◆ marha: BSE, ember: Creutzfeldt–Jakob (CJD), Gerstmann–Straussler–Scheinker (GSS), fatal familial insomnia (FFI)

A prionok tulajdonságai

- ◆ Normális, celluláris forma: **PrP^C**
 - ◇ központi idegrendszerben (nyirokszövetben, ideg–izom kapcsolatnál)
 - ◇ funkciója nem ismert
 - ◇ glikozilált sejtfelszíni fehérje, glikolipid horgony tartja



Current Opinion in Structural Biology

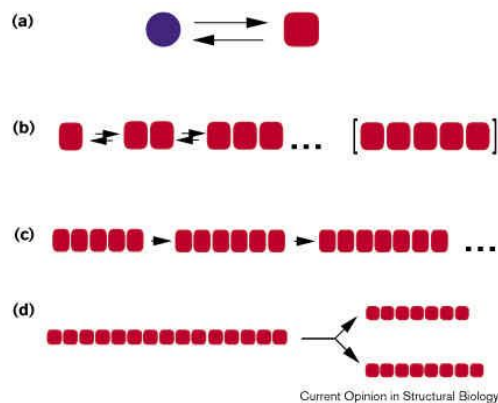
(NMR–szerk. alapján, 124–231 aminosavak, a többi rendezetlen)

- ◆ Kóros ("scrapie") forma: PrP^{Sc}
 - ◇ csak konformációban tér el a PrP^{C} -től
 - ◇ önasszociáció révén stabil aggregátumokat képez
 - ◇ senki sem tisztította még meg
 - ◇ konformációja nem ismert
 - ◇ ellenáll a proteínáz K kezelésnek

Mi a fertőző ágens?

- ◆ Hipotézis: maga a PrP^{Sc} fertőzhet
 - ◇ nukleinsav-mentes fertőző kivonatokat lehet készíteni
 - ◇ \rightarrow "protein-only" hipotézis
- ◆ Különvélemények: nem a PrP^{Sc} (egyres kísérleti eredmények)

A terjedés modellje



- ◆ (a) egyensúly a PrP^{C} és a PrP^{Sc} között (utóbbi ritka)
- ◆ (b) a PrP^{Sc} monomerek gyengén és reverzibilisen asszociálódnak, míg ki nem alakul egy stabil, fertőzőképes mag
- ◆ (c) a kritikus méret elérése után a monomerek már irreverzibilisen asszociálódnak hozzá a lánchoz, ami tovább növekszik
- ◆ (d) a fertőző részecske kisebb, stabil darabokra törve "szaporodik"

Másik modell: a PrP^{C} átalakul egy köztes, PrP^* állapotba, ehhez hozzáköt a PrP^{Sc} és öntőformaként szolgálva átalakítja PrP^{Sc} -vé.

Mindkét modell megmagyarázza, hogy a prionbetegség a következő módokon alakul ki:

- ◆ a priongén öröklött mutációja miatt a PrP^{C} kevésbé stabil, könnyebben átalakul PrP^{Sc} -vé
- ◆ Kívülről bevitt PrP^{Sc} (táplálékkal vagy orvosi beavatkozásnál)
- ◆ Szomatikus mutáció
- ◆ Ritkán: spontán átalakulás

Felgombolyodási kísérletek

- ◆ Élettani körülmények között gyors, kétállapotú átmenet
- ◆ Savas pH-n (pH=4) jelentős egyensúlyi intermedier, túlnyomórészt béta-szerkezetű, rostokká aggregálódik, ellenáll a proteínáz K-nak. Ez lehet a PrP^{Sc} felé vezető állapot.

Nyitott kérdések

- ◆ Valóban a prion a fertőző ágens?
- ◆ Mi pusztítja el a sejteket?

Egyéb felgombolyodási betegségek

Hibás felgombolyodás miatt az aktív fehérje hiánya által okozott betegségek:

- ◆ **Sarlósejtes vérszegénység:** A hemoglobin béta alegységében Glu6–Val pontmutáció miatt a deoxigenált hemoglobin oldhatósága csökkent, rostos precipitátumokat képez. Sarló alakú vörösvérsejtek.
 - ◆ **Juharszirup–vizelet:** az elágazó láncú aminosavak lebontását végző mitokondriális alfa ketoacid dehidrogenáz enzimkomplex egyes részeiben fellépő pontmutáció miatt az enzimkomplex nem szerelődik össze, ezért lebomlik. Anyagszerezavar alakul ki.
 - ◆ **Fenilketonuria:** fenilalanin hidroxiláz enzim pontmutációi miatt az enzim könnyen aggregálódik, a fenilalanin felhalmozódik.
 - ◆ **Kollagénnel kapcsolatos betegségek:** mutációk miatt csontfejlődési, ízületi, bőrproblémák, stb.
 - ◆ **Cisztikus fibrózis:** az esetek 70%–ában a CFTR fehérjében (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) a Phe–508 deléciója okozza. A mutáció miatt a CFTR nem gombolyodik fel jól, ezért nem hagyja el az endoplazmás retikulumot és nem épül be a helyére, a hámsejtek membránjába, ahol kloridionokat kellene transzportálnia. Ez többek között tüdőfertőzésekhez vezet.
 - ◆ **A p53 tumorszupresszor fehérje mutációi:** a p53 DNS–kötő fehérje, a károsodott sejtek programozott sejthalálának kivitelezésében vesz részt. Egyes mutációk miatt nem gombolyodik fel jól, ekkor a rák keletkezésének valószínűsége megnövekszik, az emberi rákfajták felénél ez megfigyelhető.
 - ◆ **Szerpinekkel kapcsolatos betegségek:** a szerpinek bizonyos típusú szerin proteáz inhibitorok. Aktív formájuk metastabil, mutációk miatt rögtön a stabilabb inaktív állapot alakulhat ki. Pl. véralvadási betegségek, bizonyos tüdőbetegségek hátterében ez áll.
 - ◆ **Hályogok:** károsodott krisztallin (szemlencsefehérje) aggregációja miatt
-

Inklúziós testek renaturálása

- ◆ Rekombináns fehérjék sokszor inaktív, insolubilis formában termelődnek (idegen környezet miatt)
- ◆ Renaturáció: Sok milliárd dolláros biznisz

Inklúziós testek



Inklúziós testek *E. coliban*

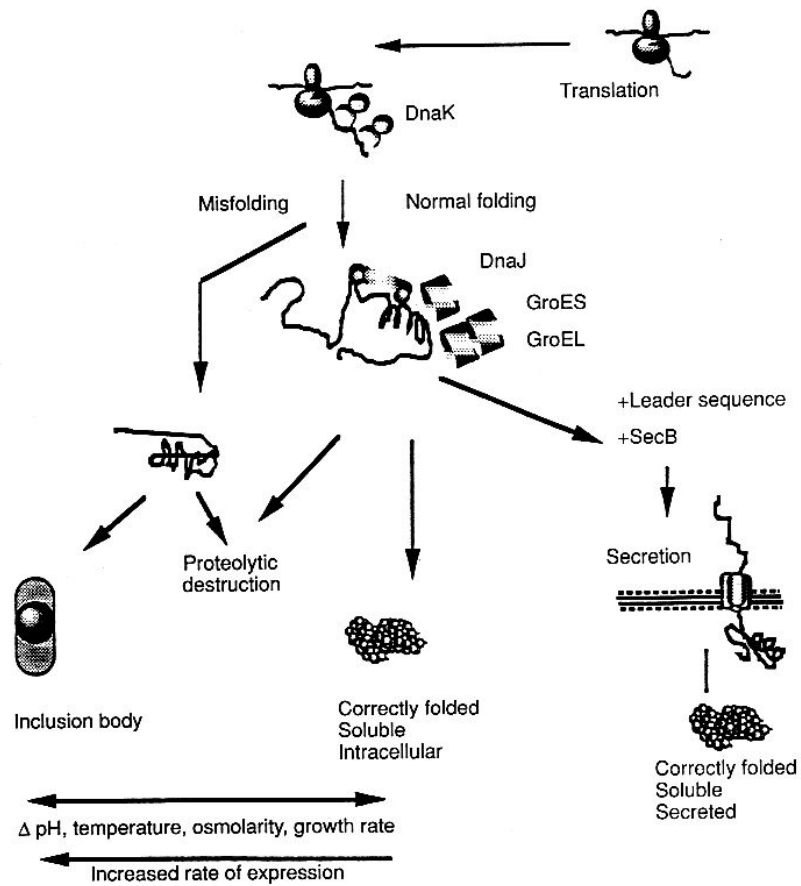
- ◆ 0,2–1,5 mikron átmérőjűek
- ◆ igen tömörek, enyhén porózusak

- ◆ nem hasonlítanak az amorf fehérjeprecipitátumokra, inkább már-már kristályszerűek
- ◆ ritkán kristály is létrejön

Szerkezetük

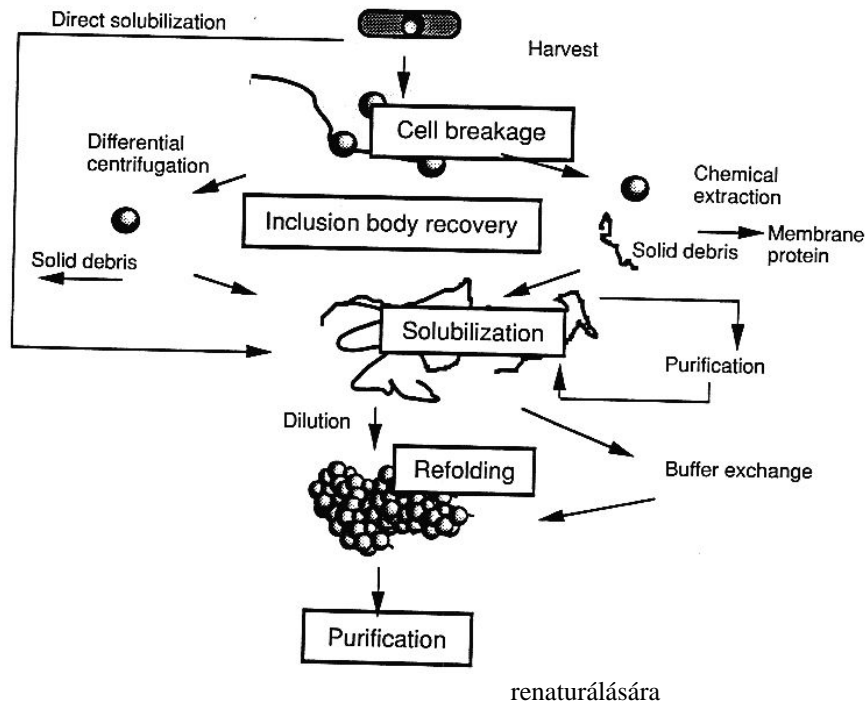
- ◆ Félregombolyodott fehérjék aggregátumai
- ◆ Sokszor nagymértékben natívszerű a szerkezet (doménaggregátumok?): enzimaktivitás is részben megmaradhat

Képződésüket befolyásoló tényezők



- ◆ nincs egyszerű összefüggés semmilyen tényezővel
- ◆ fizikai tulajdonságok: fehérje töltésével pozitív korreláció
- ◆ gazdasági és élettani sajátosságai, fermentációs körülmények
- ◆ Kulcs: a tenyésztés hőmérséklete (alacsonyabb hőmérsékleten ált. kisebb az inklúziótest-képződés)
- ◆ pH, ozmolaritás, cukrok: direkt vagy indirekt módon befolyásolnak
- ◆ termelés intenzitása növeli
- ◆ sokkhatások: hő sokkfehérjék termelése révén befolyásolnak

Az inklúziós testek kinyerése



Stratégiák inklúziós testek

A sejtek feltárása

- ◆ A fermentációs oldatot lehűtjük, a sejteket lecentrifugáljuk vagy leszűrjük meghatározott pufferben
- ◆ bármilyen módszer használható a feltárásra: az inklúziós testek igen ellenállóak
- ◆ nagynyomású homogenizátor: 400 bar nyomással egy kis nyíláson át lapos felületre spriccel, stb.
- ◆ a sejtek kijuthatnak a légtérbe, ez veszélyes lehet, ezért gyakran előzőleg megölik őket (benzil-alkohol, oktánsav, kloroform, toluén, stb.)

Az inklúziós testek elválasztása

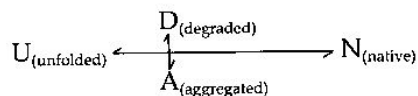
- ◆ Centrifugálás
 - ◇ folyamatos üzemű, átfolyós, ipari centrifugában
 - ◇ az átfolyási sebesség ügyes beállításával vagy ismételt reszuszenzióval és újracentrifugálással >90% tisztaság érhető el
- ◆ Szűrés
 - ◇ rossz hatékonyságú, a szűrőmembrán hamar tönkremegy

Szelektív kémiai extrakció

- ◆ Ha sejtörmelék maradt a frakcióban, akkor abban membránfehérjék is vannak, ettől meg kell szabadulni
- ◆ kezelés: kelátképző (EDTA), detergens (Triton X), 2M urea, stb.

A biológiailag aktív fehérje kinyerése

- ◆ Az inklúziós testben a fehérjéket erős nemkovalens erők tartják össze
- ◆ Első lépés ált. a szolubilizáció, ami teljes denaturálást jelent
- ◆ ezután visszagombolyítás
- ◆ Mellékreakciók: aggregáció + degradáció (proteázszennyezéstől):



- ◆ empirikus receptek vannak, amelyek a felgombolyodás mechanizmusa szempontjából semmit nem mondanak

Szolubilizáció

- ◆ **Detergens** (Pl.: SDS, n-lauryl-sarcosine)
 - ◇ Előnyök:

- aggregáció kevésbé fordul elő
- harmadlagos szerk és aktivitás megmaradhat
- ◇ Hátrányok:
 - hozzákötődik a fehérjéhez és nehéz eltávolítani
 - megzavarja a későbbi ioncserélő és hidrofób tisztítási lépéseket
- ◆ **Kaotrop oldószerek** (guanidin–hidroklorid, urea)
 - ◇ koncentráció: kb. amennyinél a fehérje legombolyodik
 - ◇ GdmCl: drága
 - ◇ urea: olcsó, de cianátot képezhet, ami módosítja a fehérje aminocsoportjait (az ureaoldat ioncserélésével és aminopuffer használatával kivédhető)
- ◆ **Extrém pH-k**
 - ◇ olcsó
 - ◇ sok fehérjét irreverzibilisen módosíthat
- ◆ **Szolubilizáló keverékek**
 - ◇ Urea + kaotrop sók/ecetsav/dimetilszulfon/lúg/2-amino-2-metil-1-propanol, stb. : sikerrel alkalmazták pár esetben

Renaturáció

Tisztítás: ált. nem érdemes refolding (visszagombolyítás) előtt tisztítani

Legfontosabb: aggregáció megakadályozása:

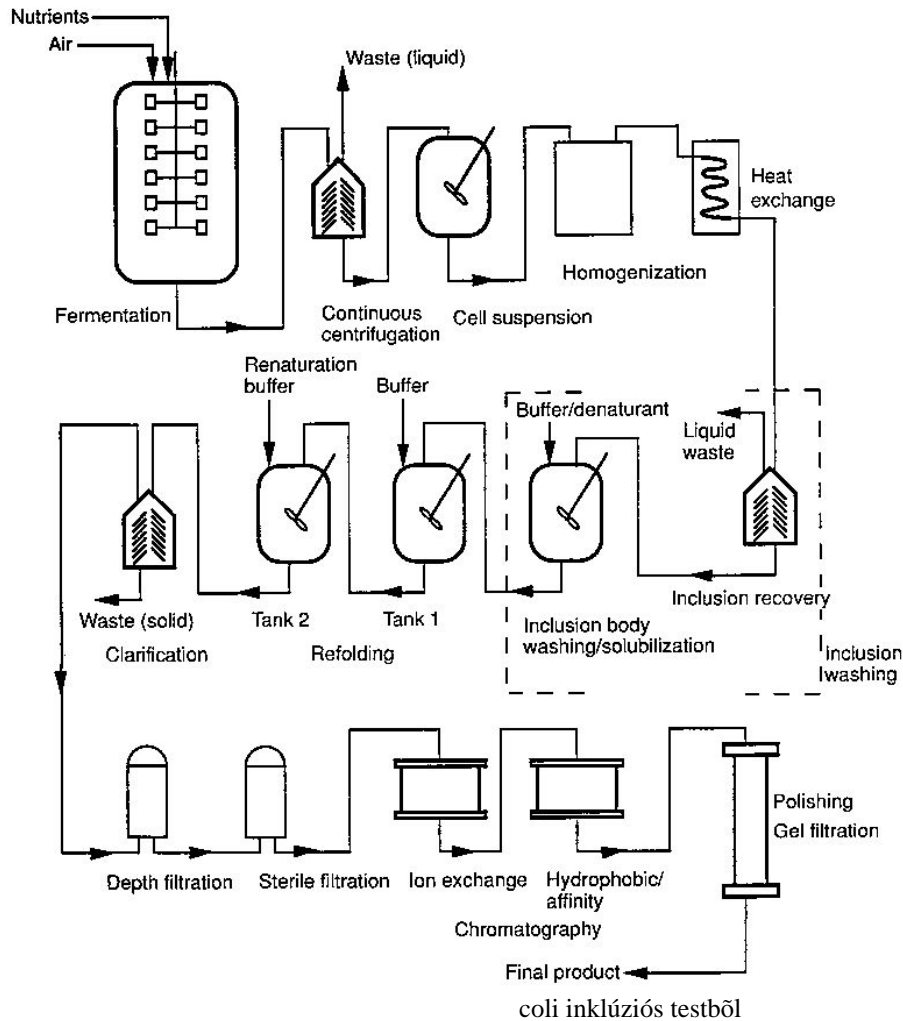
- ◆ Alacsony fehérjekoncentráció mellett egy lépésben hígítás. Egyes fehérjéknél nagy hígítás kell → nagy költség
- ◆ Hígítás két szakaszban: előbb közepes denaturálószer-koncentrációra, majd teljesen. Nagyon függ a fehérje- és denaturálószer-koncentrációktól: sok játszadozás
- ◆ Aggregációsökkentő pufferadalekok: pl. arginin, glicin, polietilén-glikol
- ◆ Kémiai módosítás: pl. citrakonilálás az aminocsoportokat negatív töltésűre változtatja, a fehérje polianionná válik, ez megakadályozza az aggregációt, a módosítás reverzibilis
- ◆ Kovalens, reverzibilis immobilizálás pl. Sepharose oszlopra
- ◆ puffertartalmú micellákba zárjuk a fehérjemolekulákat (egyenként), majd a micellákat szerves oldószerben diszpergáljuk

A diszulfidhidak képződésének elősegítése

- ◆ **Levegő**
 - ◇ olcsó, ezért gyakran használt
 - ◇ ha a fehérje nem közel natív konformációjú, akkor félregombolyodott állapotok keverékét kapjuk
 - ◇ lassú
 - ◇ diszulfidhidban nem résztvevő ciszteinek zavarnak
- ◆ **Diszulfidcsere**
 - ◇ Redoxpuffer-rendszer, 5:1 vagy 10:1 arányban redukált és oxidált tiollal
 - ◇ 1mM GSH és 0,2mM GSSG nagyon jó, de drága
 - ◇ ciszteint, DTT-t, merkaptotetanolt, ciszteamint tartalmazó keverékek
- ◆ **A tiolcsoportok védelme**
 - ◇ diszulfidhidas aggregátumok elkerülésére
 - ◇ nagy koncentrációban oxidálószerrel adunk az oldathoz, minden tiolcsoport vegyes diszulfidot képez
 - ◇ így tisztítjuk, majd a végső fázisban tesszük redoxpufferbe

Ipari méretekben történő renaturáció

- ◆ A laboratóriumi eljárásból indulunk ki
- ◆ Elsősorban költségcsökkentés a cél: pufferek, reagensek, stb. lecserélése olcsóbbra
- ◆ Eljárás egyszerűsítése, lépések sorrendjének megváltoztatása (kevesebb puffercsere, stb.)



Fehérje nagyüzemi kinyerése E.

Az inklúziós test tulajdonságai igen kedvezőek a tisztítás szempontjából (ellenálló, homogén, nagy sűrűségű, stb.)

De: Problémát okoz (az inklúziós testeket használó eljárás nem működik):

- ◆ Szekrécióval együtt poszttranszlációs módosítást igénylő fehérjék (pl. eritropoetin glikozilálása)
- ◆ Nagy molekulatömegű (>30 kDa), többdoménés, 4 diszulfidhídnál többet tartalmazó fehérjék
- ◆ Nagy molekulatömegű, heterooligomer fehérjék, pl. antitestek