



BIOZYME ØVELSE 2

PROTEINOPRENSNING OG TEST AF EGET MEDI-
CIN

BIO LINK

FORMÅL OG BAGGRUND

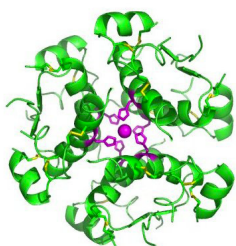
Formålet med øvelsen er at oprense enzymet β -lactamase. Jeres udgangspunkt for denne oprensning er det cellebundefald, der er fremkommet, efter man har overudtrykt enzymet β -lactamase i *Escherichia coli* (*E. coli*) celler. Jeres opgave bliver at udføre det sidste trin (anion affinitetskromatografi) i isoleringen β -lactamasen fra de andre proteiner, som *E. coli* udtrykker.

Herefter skal I teste, om I kan hæmme virkningen af β -lactamase, når I skal teste jeres eget medicin. β -lactamaser er blandt de proteiner, der kan gøre bakterier antibiotika resistente. Derfor skal I nu se, om I kan hæmme virkningen af β -lactamase, således at vi igen kan slå vores bakterier ihjel vha. antibiotika.

FRA BAKTERIE TIL PROTEIN

Alle celler udtrykker proteiner. Hvilke proteiner der udtrykkes, varierer fra celle til celle alt afhængigt af, hvad cellens funktion er. Mængderne proteinerne udtrykkes i vil også ændre sig, alt efter hvor meget der er behov for. For eksempel udtrykker røde blodlegemer primært hæmoglobin, mens nogle celler i maven primært udtrykker enzymer, der kan nedbryde forskellige komponenter i den mad, vi spiser.

I industrielle og forskningsrelaterede sammenhænge kan det være nødvendigt at producere store mængder af et protein



faktaboks 1. Proteinerne kan enten oprenses fra naturlige kilder, såsom celler eller væsker, eller de kan oprenses fra celler, der er fremstillet til at kunne udtrykke store mængder af et protein. I disse tilfælde har man

introduceret nye gener til organismen. Når man introducerer nye gener, kaldes det at **genmanipulere** organismen, og selve det at udtrykke proteinerne kaldes **rekombinant pro-**

Faktaboks 1

DIABETES OG INSULIN

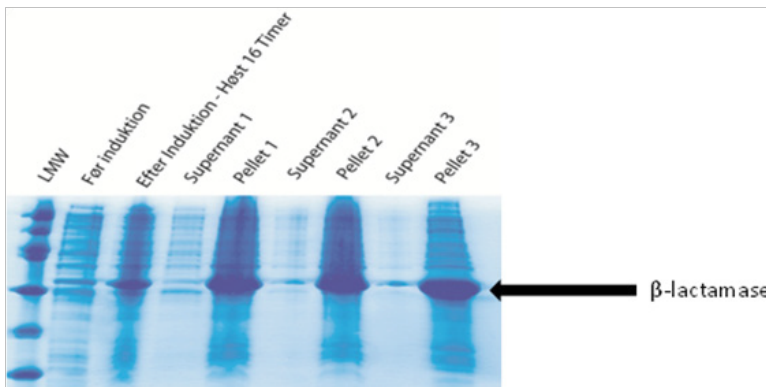
Sygdommen diabetes skyldes, at kroppen ikke kan producere peptidhormonet insulin, eller er blevet resistent overfor hormonet. Insulin er med til at regulere blodsukkeret. Har man insulinresistens eller -mangel, kan det medføre for højt blodsukker. Diabetes kan holdes i skak ved at tilføre kroppen insulin og derved holde et stabilt blodsukker. Da insulin første gang kom på markedet som lægemiddel, blev det udvundet fra oksebugspytkirtler. Uheldigvis var der mange urenheder (andre proteiner og småmolekyler) i okseinsulin, der resulterede i, at patienterne udviklede allergi over for produktet. Derfor begyndte man i midten af 70'erne at isolere det fra svin, da dette gav et renere præparat og færre allergiske reaktioner.

I slut-80'erne kom det første humane (menneske) insulin på markedet. Dette insulin var ikke isoleret fra humane bugspytkirtler, men derimod fra gærceller. Gærens DNA var blevet ændret til at kode for humant insulin. At udtrykke insulinen **rekombinant** i gærceller gjorde det muligt at isolere insulinen bedre fra andre proteiner og småmolekyler. Dermed fik man et renere og mere koncentreret produkt, og patienterne fik færre allergiske reaktioner.

tein ekspression. Proteiner der produceres på denne måde, kaldes også **rekombinante proteiner**. Bakterien *E. coli* bliver ofte brugt til produktion af rekombinante proteiner, da det er nemt at efterligne de vækstbetingelser som *E. coli* foretrækker. Derudover er det let at introducere nye gener i *E. coli* ved hjælp af plasmider.

I denne øvelse skal I udføre det sidste trin i oprensningen af enzymet **β -lactamase** (læs mere om β -lactamase på side 6). Jeres udgangspunkt for oprensningen er et dialyseprodukt (beskrevet længere nede) af et *E. coli* proteinbundfald. Hvorledes dette bundfald har fundet vej fra levende celle til jer, kan ses på gelektroforesen i **figur 1**, og er yderligere beskrevet nedenfor.

De følgende afsnit beskriver de trin af proteinoprensningen, som ligger forud for en anion affinitets-kromatografi, som er det trin, I skal hjælpe os med.



Figur 1. Gelektroforese der viser oprensningen af β -lactamase. De blå bånd på gelen repræsenterer proteiner. LMW er en standard blanding af proteiner med kendt molekylstørrelse. Ud fra denne kan man omtrent bestemme størrelsen af proteinerne i de andre baner. I banerne "Før induktion" og "Efter induktion" ses det, at et blå bånd dukker op ved proteinets molekylvægt, altså er det lykkedes at introducere genet for β -lactamase i *E. coli* cellerne. I banerne "Pellet 1-3" ses et klart, tykt, blå bånd der svarer til molekylvægten af β -lactamase. Dette indikerer, at β -lactamasen er tilstede i disse fraktioner. De andre blå bånd repræsenterer de proteiner, vi skal have fjernet fra opløsningen. Pellet henviser til bundfaldet og supernatant til væskefasen efter centrifugering. Altså kan vi se, at β -lactamasen findes i bundfaldet efter centrifugering.

PROTEINOPRENSNING

Efter proteinet er blevet overudtrykt i bakteriecellen, skal det adskilles fra resten af bakteriens proteiner, membraner og organeller, dvs. proteinet skal isoleres. Når man taler om at isolere et protein, taler man som regel om at oprense det.

Den oprensningstype der virker bedst på det enkelte protein afhænger af, hvilket protein man arbejder med – nogle proteiner kan oprensnes på få dage, mens andre tager flere uger. Det protein I skal arbejde med, er en β -lactamase, og det kan oprensnes i løbet af relativt kort tid. Nedenfor gennemgås de oprensningstrin, som er blevet udført for at få det dialyseprodukt, hvorfra I skal oprense det rene β -lactamase enzym.

SONIKERING OG CENTRIFUGERING

Forudgående er bakteriecellerne blevet groet op, og proteinet er blevet overudtrykt inde i cellerne. Herefter er cellerne blevet **sonikeret** tre gange og **centrifugeret** (se hhv. **faktaboks 1** og **2**).

Faktaboks 2

SONIKERING & CENTRIFUGERING

Når man har udtrykt sit protein i en organisme, bliver det på et tidspunkt nødvendigt at slå cellerne i stykker for at få proteinet ud, så man kan arbejde med det.

Her kan man eksempelvis benytte sig af ultralyd, der er så kraftig, at det ryster cellens membran fra hinanden. Denne metode kaldes **sonikering**.

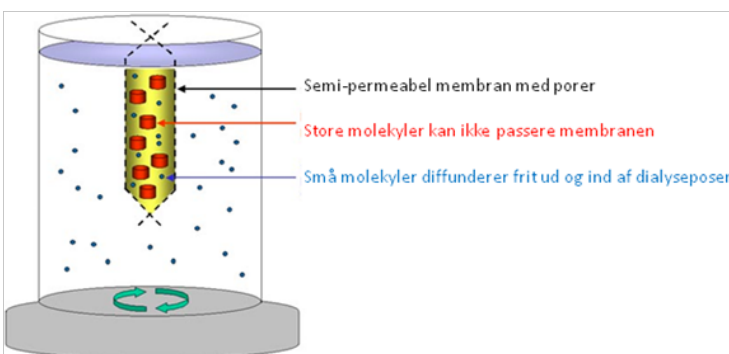
Efter sonikeringen skiller man de større og faste fragmenter fra væsken ved at **centrifugere** sonikatet. Der er nu enten mulighed for, at proteinet er i opløsning, eller at det er aggregeret til inclusion bodies.

Den β -lactamase I skal arbejde med, er ikke i opløsning, når cellerne ødelægges ved sonikering. Derimod folder de forkert og samler sig i en **aggregeret** form, der er så stor, at den er synlig i mikroskop. Disse aggregater kaldes **inclusion bodies** eller på dansk 'inklusionslegemer'. Når cellerne efterfølgende centrifugeres, vil β -lactamasen derfor være i bundfaldet (se **figur 1** og **faktaboks 2**). I bundfaldet vil der også findes membranfragmenter, cellekerner og store organeller såsom mitokondrier, lysosomer og peroxisomer. For at få β -lactamasen i opløsning kan man tilføje en høj koncentration af **urea** til sin opløsning, da det udfolder proteinet.

DIALYSE

For at opnå korrekt foldet β -lactamase efter man har bragt det i opløsning, er det nødvendigt at sænke koncentrationen af urea langsomt. Her benyttes en membran med porestørrelser (huller), der er nøje afstemt efter størrelsen på det protein, man arbejder med. Dette tillader ureaen at diffundere ud i den omgivne buffer, uden at koncentrationen af protein i opløsningen indeni membranen falder, **figur 2**.

Denne metode kaldes **dialyse**.

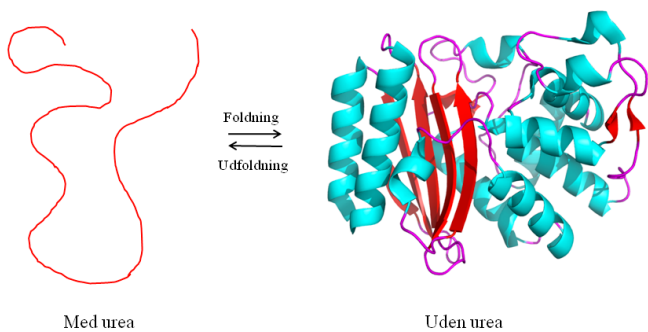


Figur 2. En dialyse er baseret på *passiv diffusion*. En proteinblanding kommer i en semi-permeabel membranpose. I denne membranpose kan kun de molekyler, der er små nok til at passere ud gennem hullerne (porerne) i posen diffundere ud i den omkringværende opløsning. Dette vil medføre, at kun de molekyler der er for store til at passere gennem porerne, vil forblive i posen.

Figuren er taget fra <http://www.ucl.ac.uk/~ucbcdab/enzpur/amso4.htm>

Under dialysen indstiller der sig en ligevægt for urea mellem den væske, der er uden for og inden i dialyseposen, således at koncentrationen er lige så stor inde i dialyseslangen som uden for dialyseslangen. Derfor er det vigtigt, at voluminet uden for slangerne er meget større end voluminet inden i poserne, hvor proteinet befinder sig. På den måde bliver koncentrationen af urea meget lavere. Koncentrationen af protein inden i slangen falder ikke, da porerne ikke er store nok til, at β -lactamasen kan komme ud af dialyseposen. Alle mindre molekyler, såsom små proteiner, urea- og vandmolekylerne, vil kunne diffundere frit, mens β -lactamasen bliver tilbageholdt i dialyseslangen.

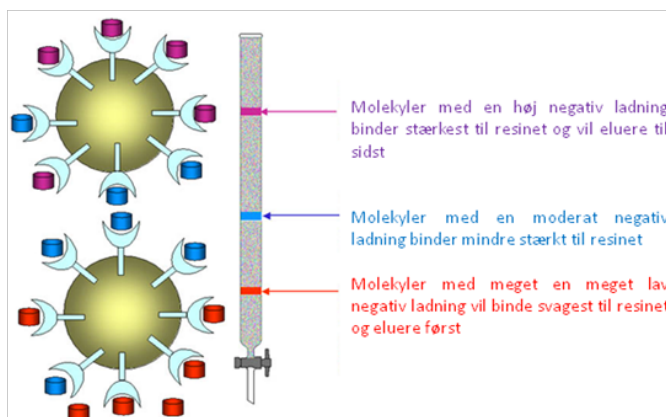
Når ureaen langsomt diffunderer ud, og koncentrationen falder, vil proteinet folde tilbage i sin oprindelige form, eller det der kaldes **proteinets native konformation**, figur 3. Derfor kaldes dialyse også refoldning, hvis formålet med dialysen er at få proteinet til at folde korrekt.



Figur 3. Urea denaturering og refoldning til den native konformation. Til venstre ses en repræsentation af et urea-udfoldet protein. Under dialysen vil urea-molekylerne diffundere ud af dialyseposen og blive erstattet af buffer uden denaturant. Det vil medføre en langsom refoldning til den native konformation, som er repræsenteret til højre.

ANION AFFINITETSKROMATOGRAFI

Efter dialysen formodes β -lactamasen at være korrekt foldet. Desværre består opløsningen ikke kun af β -lactamase på dette tidspunkt. Der vil også være mange andre proteiner til stede, som naturligt bliver udtrykt af *E. coli*. Endnu et oprensningstrin er derfor påkrævet for at oprense proteinet. Det er dette trin, I skal udføre, når I besøger BioLink.



Figur 4. Anionbytter. En anionbytter består af et resin, der selektivt binder til anioner repræsenteret som kugler med "fangearme". I denne figur har de lilla molekyler en meget negativ ladning, de blå har en medium negativ ladning, og de røde molekyler har en mindre negativ ladning. På en anionbytter vil en blanding af de lilla, blå og røde molekyler blive udvasket (*elueret*) efter forskellige mængder af udvaskningsbuffer. Først vil de røde molekyler udvaskes, så vil de blå og så de lilla. På den måde kan man let isolere molekyler med forskellige ladninger fra hinanden på en anionbytter.

Figuren er fra <http://www.ucl.ac.uk/~ucbedab/enzpur/ionX.htm>

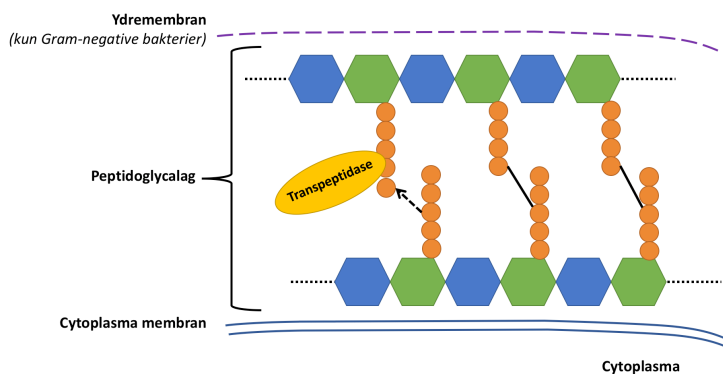
Da β -lactamasen netto har en negativ ladning, benyttes et trin, der adskiller molekyler afhængigt af deres ladning. Dette oprensningstrin består i at filtrere proteinopløsningen gennem et materiale (en **resin**), der selektivt binder negativt ladede molekyler (**anioner**). Jo mere negativt ladet molekylet er, jo stærkere binder det til resinen, **figur 4**. Denne type filtrering kaldes også en **anion bytning** eller **anion affinitetskromatografi**, da den holder fast i anioner.

Efter man har ført sin prøve gennem resinen, vil ens eget protein være bundet fast til resinen. Man er nu interesseret i at få det ud igen. Man vasker derfor proteinet af resinen igen (**eluerer**) ved at tilsætte en saltholdig buffer. Denne buffer vil indeholde mange små negativt ladede molekyler, der udkonkurrerer proteinets binding til resinet. Jo større negativ ladning proteinet bærer, jo stærkere vil det også binde til resinet. Dermed vil det også kræve tilsvarende store mængder af salt for at eluere. Omvendt, jo mindre negativ ladning proteinet har, jo mindre salt skal der til. Positivt ladede proteiner vil ikke binde til søjlematerialet. Efter dette trin vil størstedelen af de andre proteiner og celledele være sorteret fra, og β -lactamasen kan anses som oprenset.

β -LACTAMASER OG ANTIBIOTIKA RESISTENS

β -lactamaser er en gruppe af bakterielle enzymer, som kan medføre antibiotika resistens ved at klippe visse typer af antibiotika i stykker.

Antibiotika bruges til at bekæmpe bakterielle infektioner. **β -lactam antibiotika** virker ved at hæmme de enzymer, der er ansvarlige for dannelse af bakteriens cellevæg. Disse enzymer hedder **transpeptidaser**. Mere præcist virker transpeptidase ved at koble sidekæderne på såkaldte peptidoglycaner til hinanden, og således danne et netværk af peptidoglycankæder, der gør bakteriens cellevæg stærk, **figur 5**. Ved at hæmme transpeptidaserne stoppes celledelingen og bakterien dør.

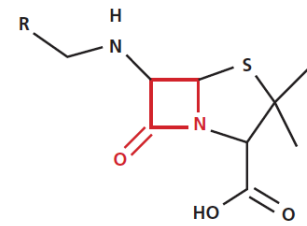


Figur 5. Peptidoglykanlaget er en struktur, der gør bakteriernes cellevæg ekstra stærk. Laget består af krydsbundede peptidoglykaner, dvs. polysaccharidkæder (blå/grøn) krydsbundet mellem deres peptid-sidekæder (orange). Transpeptidase enzymerne virker ved at binde en specifik aminosyre rest i en peptidsidekæde, hvilket tillader en bestemt aminosyre rest i en anden sidekæde at angribe det første peptid, resulterende i at Transpeptidase slipper og en binding mellem peptidsidekæderne er dannet.

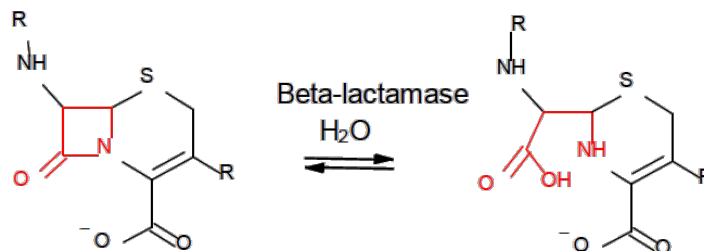
β -lactam antibiotika, der bl.a. inkluderer penicilliner, virker ved at binde i det aktive site på transpeptidase og således inaktivere enzymet. Dette medfører, at cellevæggen i bakterien svækkes, og cellen vil bryde (**lysere**) ved celledeling. Den funktionelle struktur i β -lactam antibiotika er en β -lactam-ring, det er denne del af antibiotikummet som binder til transpeptidase og således inaktiverer enzymet, **figur 6**.

Mutationer af de bakterielle gener for enzymklassen β -lactamaser har givet bakterierne et forsvar mod β -lactam antibiotika. En β -lactamase

katalyserer hydrolysen af β -lactam-ringen ved et nukleofilt angreb på carbonyl carbon, **figur 7**. Der ved åbnes den firleddede ring. Når β -lactam-ringen først er hydrolyseret, har antibiotikummet mistet dets virkning, og kan derfor ikke længere hæmme transpeptidaserne, **faktaboks 3**.



Figur 6. Grundstrukturen af penicilliner. R er den del af penicillinen, der kan variere. β -lactam-ringen er fremhævet i rød.



Figur 7. Hydrolyseringen af β -lactam ringen, katalyseret af β -lactamase.

Det er ikke alle bakterier med β -lactamaser, der udgør en sygdomstrussel, såkaldte **patogene bakterier**. Vi ved dog, at alle patogene bakterier har β -lactamaser.

Faktaboks 3

HYDROLYSE OG HYDROLASER

Når et molekyle **hydrolyseres**, spaltes det i to under tilstedeværelse af et vandmolekyle (af latin, hydro = vand og lysere = spalte/kløve). Et enzym der katalyserer en hydrolyse hedder en **hydrolase**. Den spontane hydrolyse (uden enzym) af β -lactamer er meget langsom. For at have bedre chancer for at overleve antibiotika har visse bakterieceller derfor udviklet enzymer, der kan hydrolysere β -lactam-stofferne, før de når at gøre skade. Disse enzymer hedder **β -lactamaser**. β -lactamaser er altså en underklasse af hydrolaserne.

For at bekæmpe patogene bakterier forsøger man konstant at udvikle nye typer af antibiotika. Patogene bakterier er desværre i stand til at forsvare sig mod sådanne tiltag ved at tilpasse de gener, der koder for β -lactamaser. Herved tilpasses de proteiner, der bliver udtrykt til at kunne nedbryde disse nye antibiotika. En sådan tilpasning sker enten ved hjælp af mutationer i det β -lactamase gen, bakterien allerede har eller ved genoverførsel af plasmider fra en bakterie til en anden (**horisontal gentransfer**). De nye muterede β -lactamaser har en ændret substratprofil, hvorved bakterier hurtigt kan tilpasse sig nye miljøer. Bakteriernes primære forsvar mod antibiotika er altså dannelsen af nye β -lactamaser.

I øvelsen *Test jeres eget medicin* er det netop reaktionen i figur 7, I skal forsøge at forhindre, ved at finde et "medicin", som kan hæmme β -lactamase, således at vores antibiotika forsat kan virke mod bakterierne.

FREMGANGSMÅDE

ANION AFFINITETSKROMATOGRAFI

I får udleveret dialysatet indeholdende β -lactamasen og andre proteiner. I skal nu isolere β -lactamasen fra de andre proteiner i dialysatet ved selv at udføre et anion affinitetskromatografi-trin:

- 1. Fjern de to låg fra anionbytteren** (søjlen der indeholder positivt ladet **resin**), så ethanolen drypper ud. Sørg for at der ikke er noget ethanol tilbage ovenover resinet (der ses som et hvidt lag), før I går videre til trin 2.
- 2. Rens søjlematerialet for kontaminering** ved at tilføje **1500 μ L (1,5 mL) buffer B** til søjlen. Lad buffer B dryppe helt igennem.
- 3. Rens søjlematerialet for chloridioner** ved at tilføje **1500 μ L (1,5 mL) buffer A** til søjlen. Lad buffer A dryppe helt igennem.
- 4. Tilsæt 2000 μ L (2 mL) enzym-mix** (dialysatet) til søjlen.
I skal nu vente, til dialysatet er dryppet ned i kolben. I får udleveret enzym-mix når I nærmer jer dette trin, og mixen skal afleveres til øvelseslæreren efter brug, så den kan komme tilbage på køl.
- 5. Fjern proteiner der binder svagt til resinet** ved at tilføje **1500 μ L (1,5 mL) vaskebuffer**.
- 6. Eluér og opsaml β -lactamasen i et eppendorfrør** ved at tilføje **1500 μ L (1,5 mL) buffer B**. Det er vigtigt at I opsaml eluatet i et rør og ikke lader det dryppe ned i bægerglasset. Skriv navn og dato på røret og indlever det til øvelseslæreren.
- 7. Hæld ca 3 mL ethanol på søjlen** og lad ca 10 dråber dryppe ud. Sæt til sidst låg på i bund og top.

BUFFERE & OPLØSNINGER

- **Buffer A:** 50 mM Tris-HCl pH 7, 1 mM EDTA
- **Buffer B:** 50 mM Tris-HCl pH 7, 1 mM EDTA, 0,5 M NaCl
- **Vaskebuffer:** 50 mM Tris-HCl pH 7, 1 mM EDTA, 20 mM NaCl
- **Enzym-mix:** dialysat indeholdende β -lactamase og andre proteiner
- **20% ethanol**

MATERIALER

- Anionbyttersøjle indeholdende **sapharose beads** (jeres resin)
- 200 mL bægerglas til at opfange gennemløb
- 2 mL eppendorfrør til at opsamle β -lactamase i
- 3x autopipetter og tilhørende spidser: p20, p200 og p1000

TEST JERES EGET MEDICIN

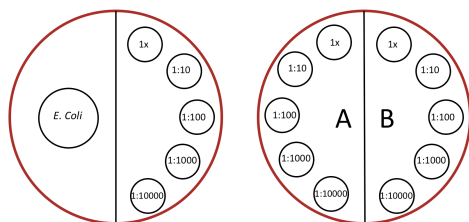
I denne del af øvelsen får I udleveret 2 agarplader indeholdende ampicillin, der er et β -lactam antibiotikum. I skal lave to forsøg; et kontrolforsøg og en test af jeres eget ”medicin”. I kontrolforsøget skal I først og fremmest teste, om bakterierne (*E. coli*) dør, når de vokser på agar indeholdende ampicillin. Derudover skal I teste, hvilke koncentrationer af β -lactamase, der er i stand til at ”tilføre” *E. coli* resistens. Dvs. I tester, om I ved at tilføje β -lactamase på agarpladen kan nedbryde ampicillin, således at bakterierne kan gro på pladen. Til sidst skal I teste, om I kan hæmme virkningen af β -lactamase, således at bakterierne dør, selvom der er β -lactamase tilstede.

MATERIALER

- 2 agarplader
- 1x β -lactamase stamopløsning
- 4 eppendorfrør
- *E. coli* bakterier
- 20 μ L pipette & tilhørende spidser
- 200 μ L pipette & tilhørende spidser
- Tris-HCl buffer
- Betingelser (evt. medbring selv)

1. Gør jeres agarplader klar

I får udleveret 2 agarplader. Den ene er til jeres kontrolforsøg, den anden er til at teste jeres medicin/betingelser. På bunden af pladen skal I lave nedenstående inddeling:



2. Lav en fortyndingsrække for β -lactamase

β -lactamase stamopløsningen (1x) fortyndes i Tris-HCl buffer.

I skal ende ud med følgende 5 fortyndinger: 1x, 1:10, 1:100; 1:1000 og 1:10.000.

Fortyndingerne laves i Eppendorf rør.

3. Tilføj betingelser og enzym

5 μ L af jeres betingelse A tilføjes til hver af de 5 markerede cirkler vha. en pipette

5 μ L af jeres betingelse B tilføjes til hver af de 5 markerede cirkler vha. en pipette

5 μ L β -lactamase (i den angivne koncentration) dryppes ovenpå betingelsen med pipette

4. Tilføj *E. coli*

5 μ L *E. coli* bakterier dryppes nu ovenpå β -lactamase og betingelser (i hver cirkel)

5. Pladerne skal inkubere 1-3 dage

Inkuberingstiden afhænger af, om pladerne står ved stuetemperatur (2-3 dage) eller i en inubater ved 37°C (1 døgn).

SPØRGSMÅL TIL ØVELSEN

Nedenstående spørgsmål er tænkt som efterbehandlingsmateriale til efter jeres besøg hos os.

SPØRGSMÅL TIL ØVELSEN

1. Hvad betyder det, at et protein denaturerer? Hvorfor tror I, at inklusionslegemerne er opløselige i urea?
2. Er det bedst at vælge en membran med porer, der er større eller mindre end det protein, man arbejder med, når man skal dialysere? Hvorfor?
3. Hvilken ladning har molekyleerne i resin, som benyttes til anion affinitetschromatografi?
4. Hvorfor tror I, det er muligt at eluere proteinet med en saltholdig buffer?
5. Hvad er forskellen på de 3 buffere, og hvorfor brugte I den ene frem for den anden i de forskellige trin? (fx Vaskebuffer og så Buffer B efter proteinet var tilføjet til resin).
6. Hvor rent er jeres β -lactamase efter anionbytningen sammenlignet med før dette trin?
7. Hvad var jeres hypotese til de valgte betingelser i sidste del af øvelsen?
8. Hvilke fejlkilder kan der være i det sidste forsøg? (Særligt én er vigtig!)
9. Kunne I evt. tilføje endnu et kontrolforsøg for at tjekke for foreslåede fejlkilder i spørgsmål 8?
