



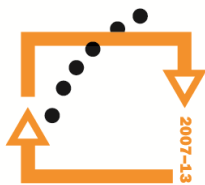
evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



**OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost**

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Protilátkami modifikované částice pro izolaci zinek vázajících proteinů

Ing. Soňa Křížková, Ph.D.

24. 2. 2012

Reg.č.projektu: CZ.1.07/2.3.00/20.0148

Název projektu: Mezinárodní spolupráce v oblasti "in vivo" zobrazovacích technik



- Paramagnetické částice
- Protilátky proti těžkým kovům
- Immunoglobuliny
- Způsoby imobilizace protilátek na povrch paramagnetických částic
- Zinkové proteiny
- Immunoseparace Zn-proteinů z bakteriálního lyzátu
- Immunoseparace Zn-proteinů z krevní plasmy

...0m

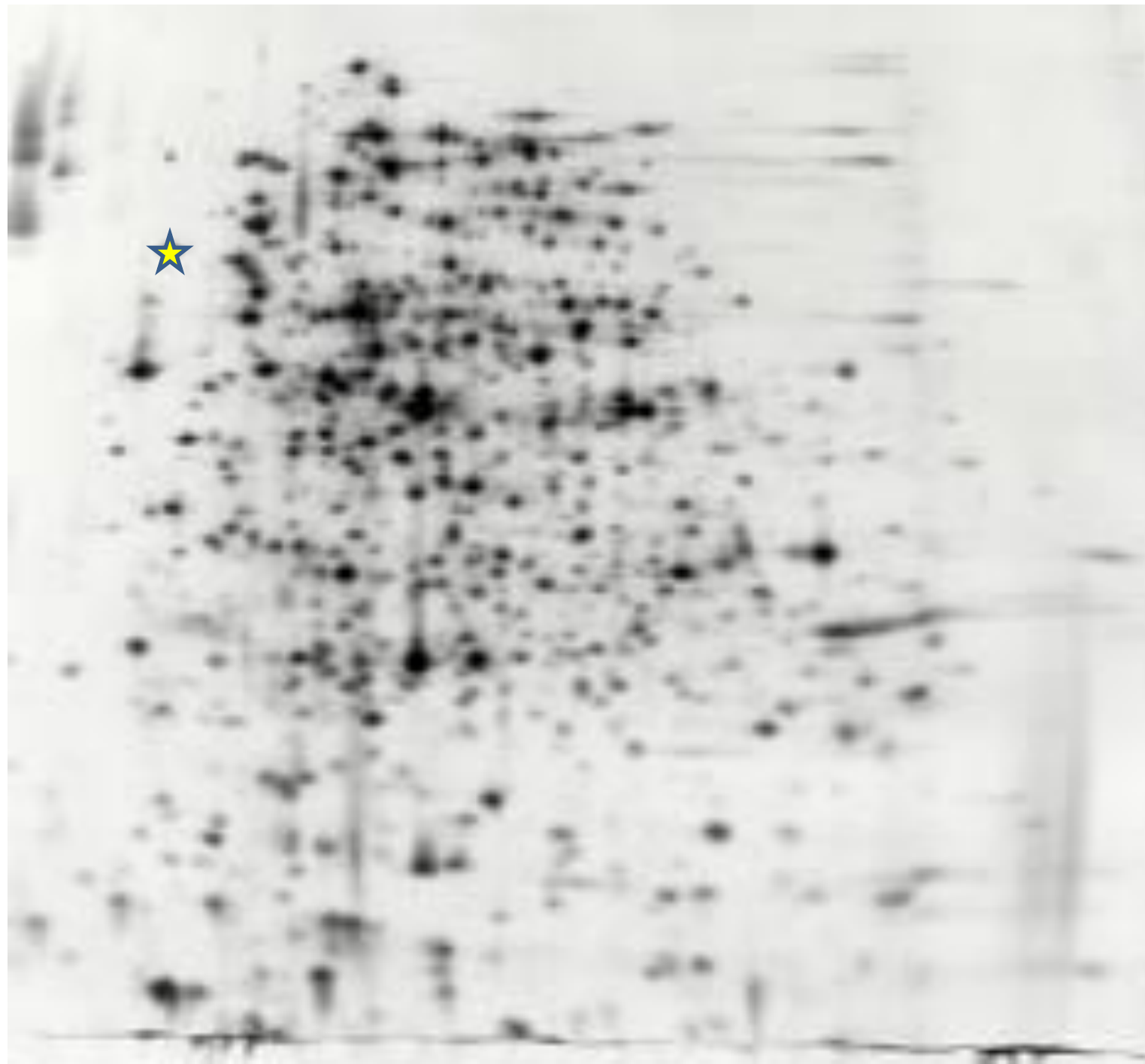
...om

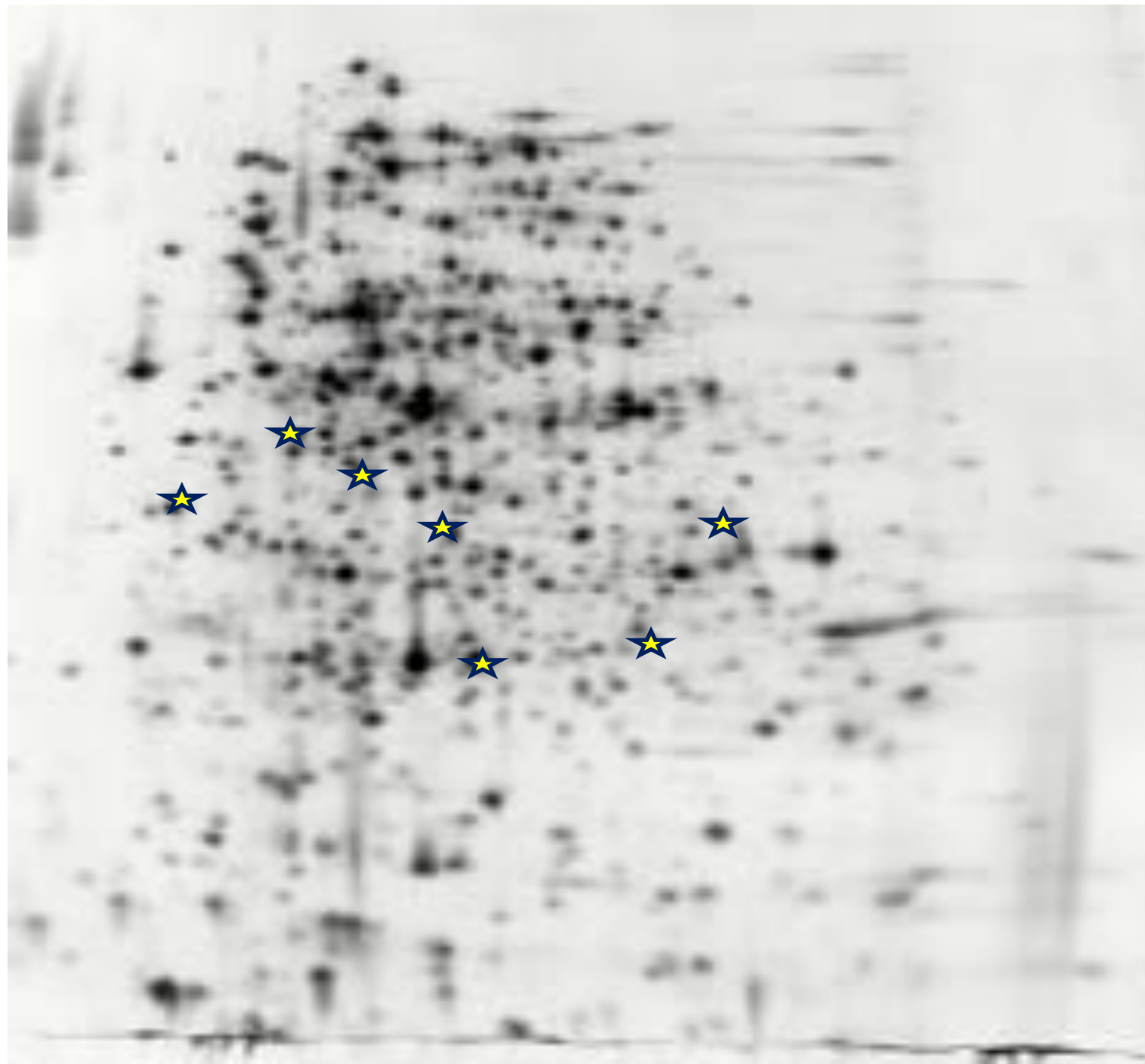
- Genom
- Proteom
- Metallom
- Peptidom
- chemoproteom
- Metabolom
- Transkriptom
- miRNom
- Lipidom
- Glykom
- Interaktom
- Degradom
-cca 100 „-omů“
- Soubor molekul s podobnými vlastnostmi v organismu
- Biom

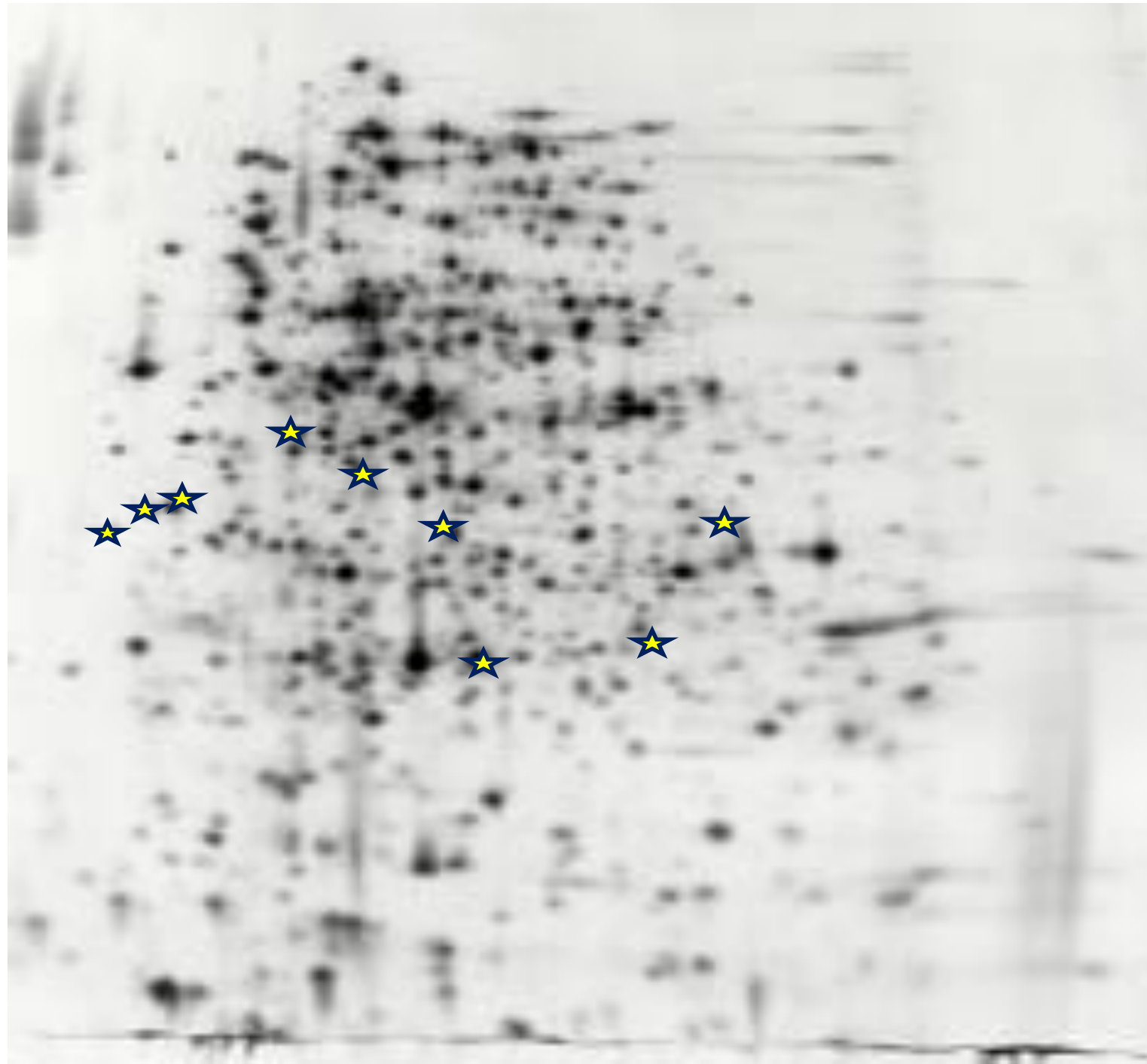
...omika

- Genomika
- Proteomika
- Metallomika
- Peptidomika
- chemoproteomika
- Metabolomika
- Transkriptomika
- miRNomika
- Lipidomika
- Glykomika
- Interaktomika
- Degradomika
-cca 100 „-omik“
- Separační metody
- Frakcionační metody
- Detekční metody
- Bioinformatické metody



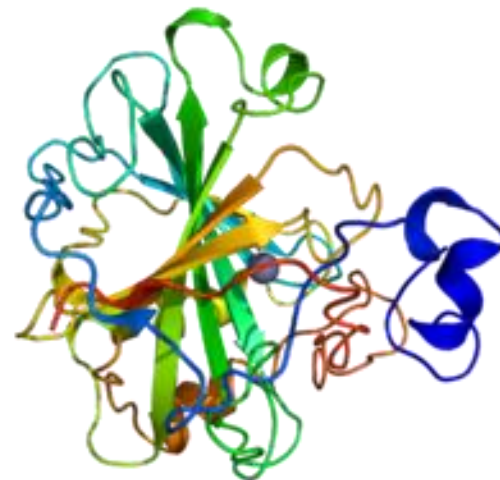






Zinkové proteiny

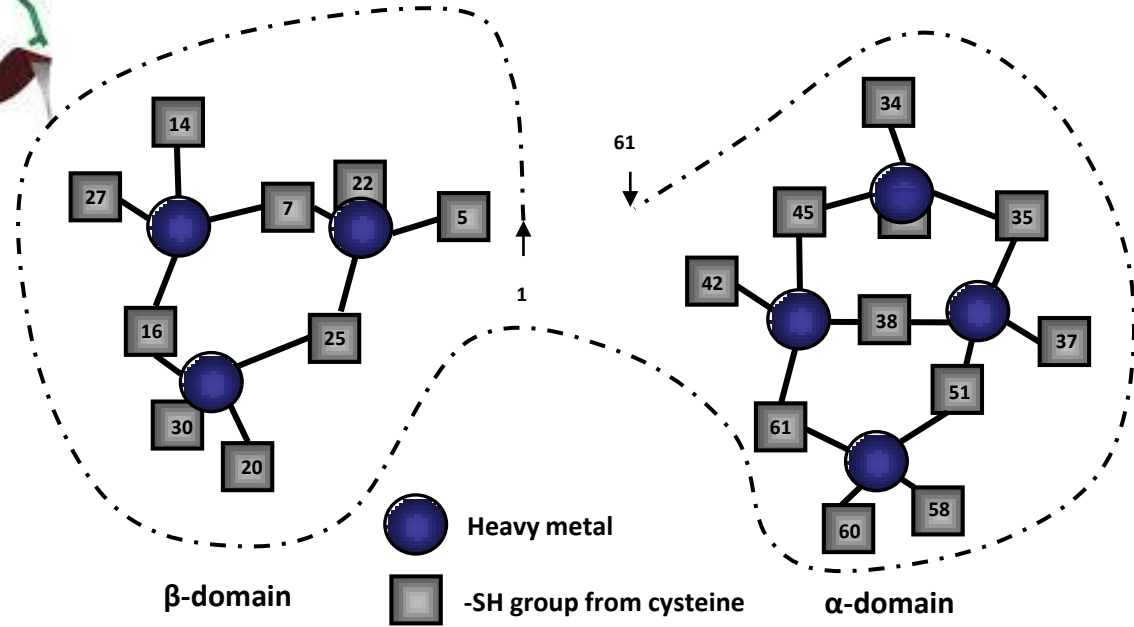
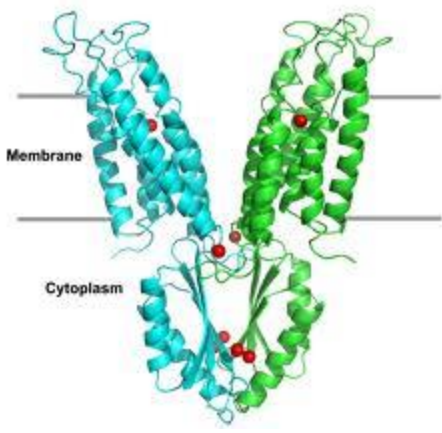
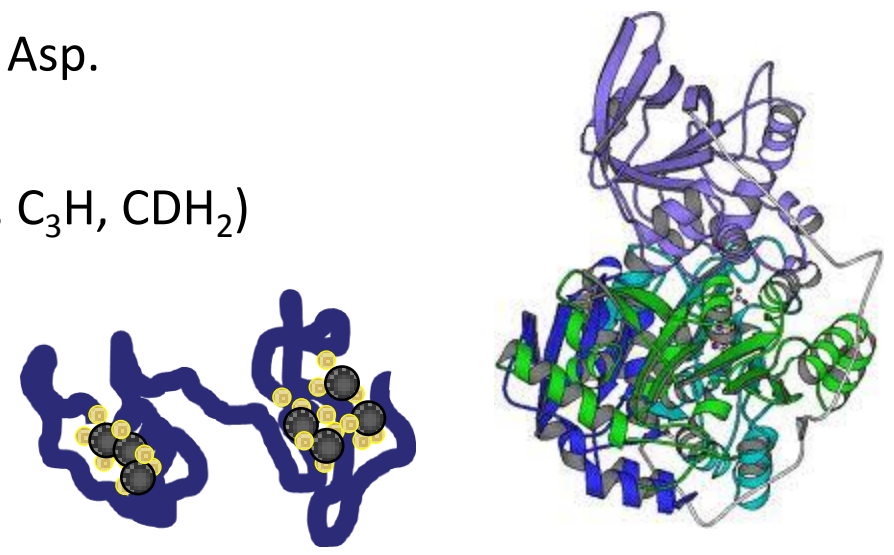
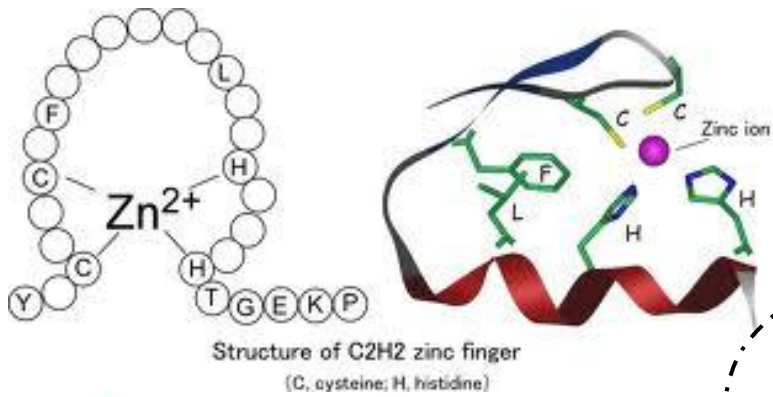
- Bioinformatika – 2800 Zn-vazebných proteinů v lidském proteomu (~10 %)
- Nejstarší Zn-protein: karbonát anhydrasa (EC 4.2.1.1), objeven v roce 1939
- Skladovací funkce
 - Albumin. metalothioneiny
- Metaloenzymy
 - Matrixové metaloproteinasy, Zn-dependentní proteasy, karboxypeptidasa, akonitasa, všechny enzymové třídy
- Transkripční faktory
 - Zinkové prsty
- Strukturní proteiny
- Regulační proteiny
 - Metalothioneiny
- Signální proteiny
- Přenašeče
- DNA reparace, replikace, translace



Karbonát anhydrasa (EC 4.2.1.1)

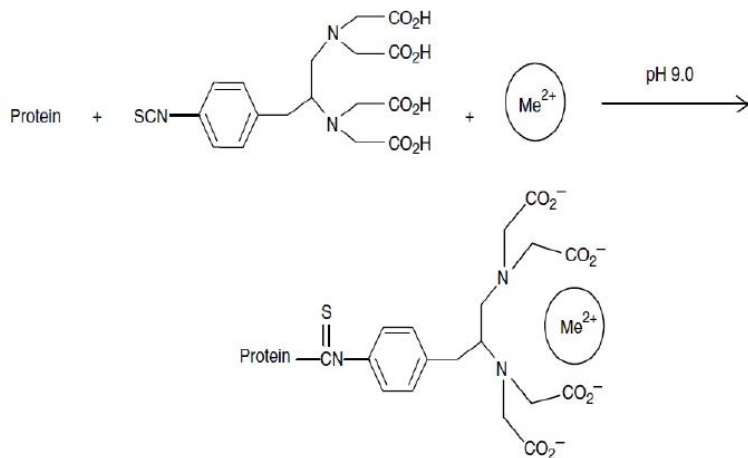
Způsob vazby Zn(II) v proteinech

- Nespecifický, převážně přes Cys, His, Asp.
- Aktivní místo enzymů
- Specifické domény (zinkové prsty, C₄, C₃H, CDH₂)
- Na povrchu × uvnitř proteinu
- Stálá × přechodná



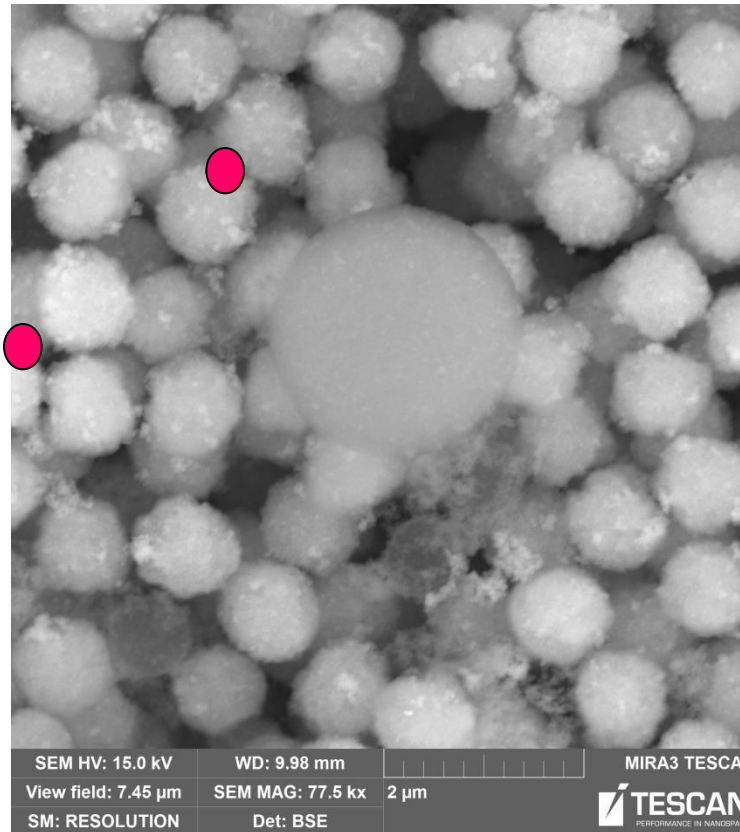
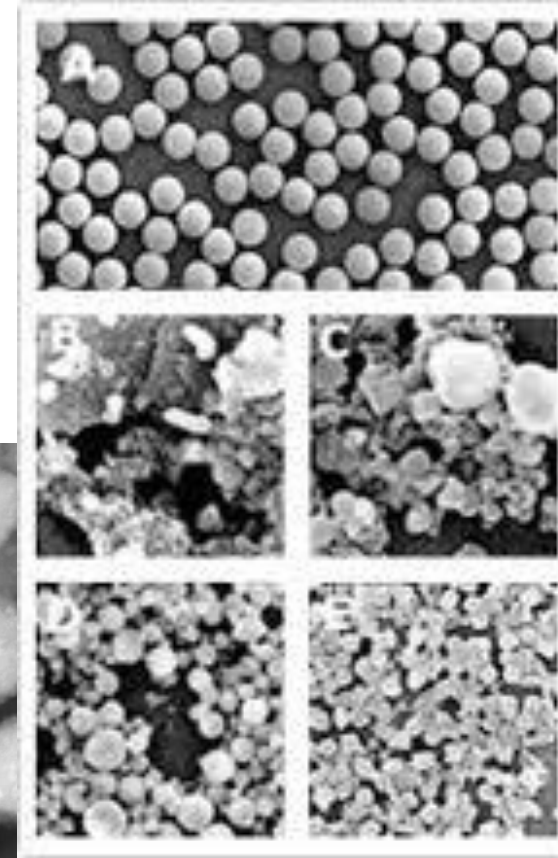
Protilátky proti těžkým kovům

- Hapteny (velikost, orientace)
- Komplexy s proteiny (BSA nebo KLH)
- Stanovení těžkých kovů (ELISA, biosensory), imunolokalizace těžkých kovů
- Slepíčí protilátky



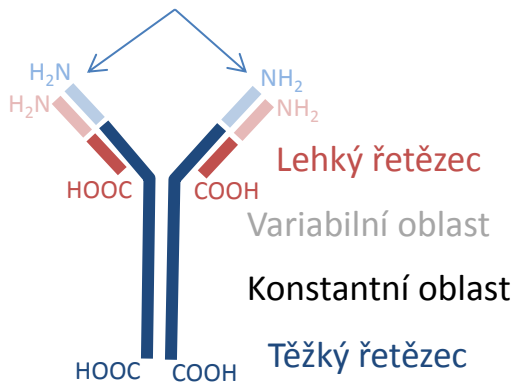
Paramagnetické částice

- Magnetizovatelné
- Polystyren pokrytý polyurethanem
- Průměr 1.08 μm
- Modifikovaný povrch
- Nemodifikovaný povrch
- Velikost
- Tvar porozita
- Stabilita

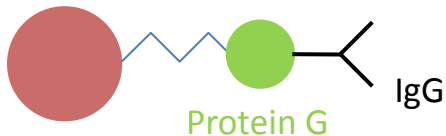
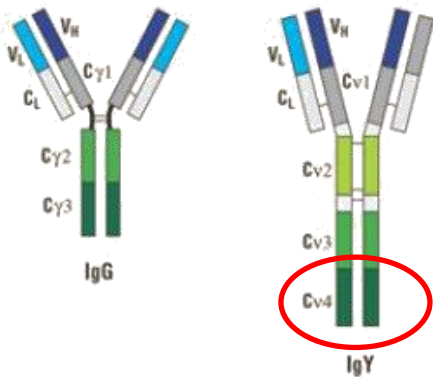


Struktura imunoglobulinů:

Vazebné místo pro antigen



Rozdíl mezi savčími a ptačími imunoglobuliny:



Paramagnetická částice

| Species | Ig Subclass | Protein A | Protein G |
|--------------|------------------|-----------|-----------|
| Human | IgG1, IgG2, | +++ | +++ |
| | IgG4 | + | +++ |
| | IgG3 | - | - |
| | IgD | + | - |
| | IgD | + | + |
| | Fab | + | - |
| | ScF _v | | |
| Mouse | IgG1 | + | ++ |
| | IgG2a, IgG2b, | +++ | +++ |
| | IgG3 | - | - |
| | IgM | | |
| Rat | IgG1 | + | ++ |
| | IgG2a | - | +++ |
| | IgG2b | - | + |
| | IgG2c | +++ | +++ |
| | IgG1 | + | +++ |
| Goat | IgG1 | + | +++ |
| | IgG2 | +++ | +++ |
| Sheep | IgG1 | + | +++ |
| | IgG2 | +++ | +++ |
| Cow / Bovine | IgG1 | + | +++ |
| | IgG2 | +++ | +++ |
| Horse | IgG(ab) | + | - |
| | IgG(c) | + | - |
| | IgG(T) | - | +++ |
| Rabbit | Total Ig | +++ | +++ |
| Dog | Total Ig | +++ | + |
| Cat | Total Ig | +++ | + |
| Pig | Total Ig | +++ | + |
| Guinea pig | Total Ig | +++ | + |
| Chicken | Total Ig | - | - |

+++: strong binding, ++: medium binding, +: weak binding, -: no binding.

Způsoby imobilizace molekul na povrch paramagnetických částic

- Modifikovaný povrch

- Kovalentní imobilizace

- Tosyl
 - Karboxyl
 - Amin
 - Epoxid

- Nekovalentní imobilizace

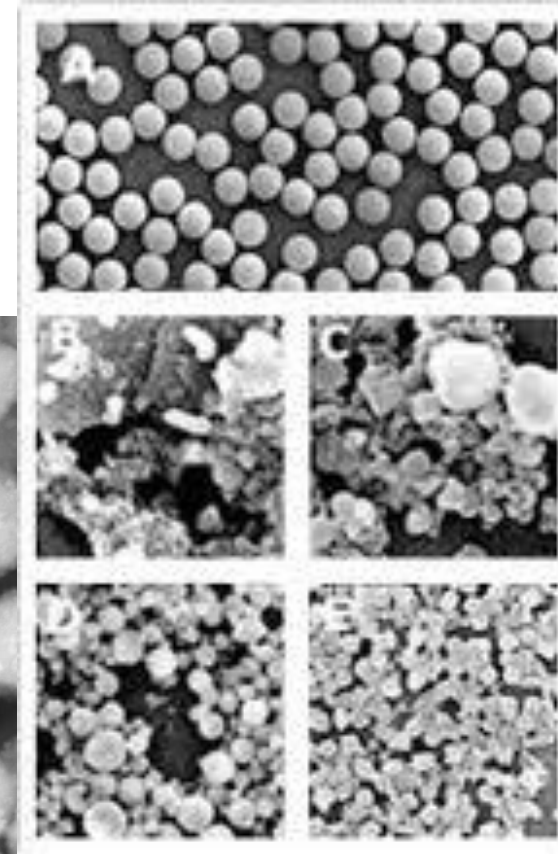
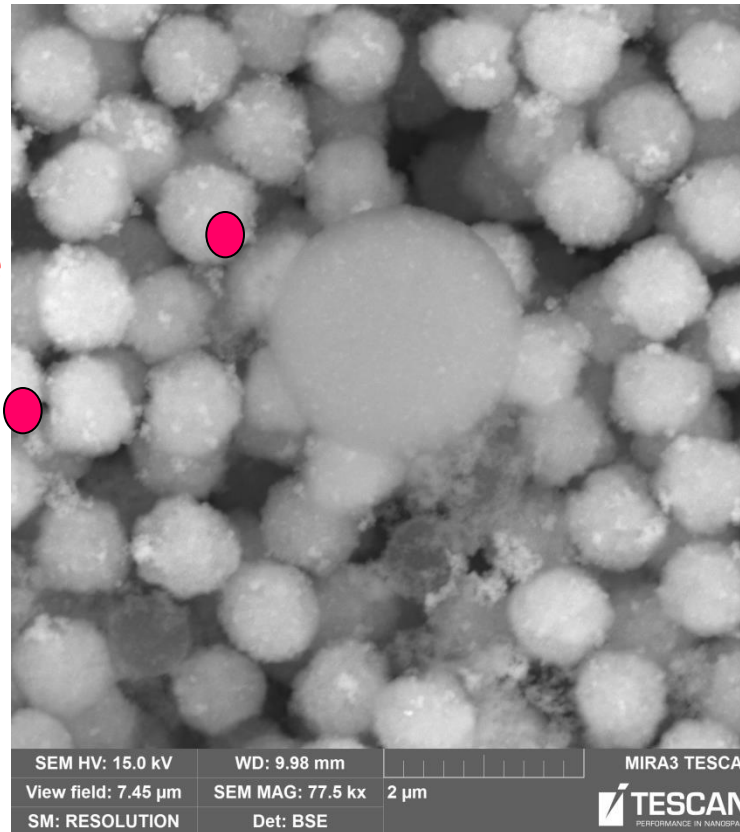
- Avidin/Streptavidin
 - Protein G/protein A
 - His-tag (IMAC)
 - náboj

- Nemodifikovaný povrch

- Velikost

- Tvar porozita

- Stabilita



Kovalentní immobilizace

- Výhody: organická chemie (kovalentní vazba). Buď přes N- nebo C-konec. Za určitých podmínek možnost recyklace.
- Nevýhody: organická chemie (reagencie). Kovalentní vazba. Orientace, interference se stabilizátory, možná denaturace, delší proces.
- Epoxyskupina
- Karboxylová skupina
- Aminoskupina
- Tosylová skupina

figure 1. Direct covalent binding to Dynabeads® M-270 Epoxy

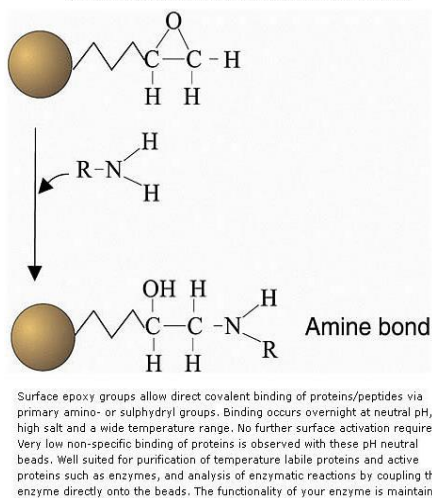


figure 1. Covalent binding to Dynabeads® M-270 Carboxylic Acid

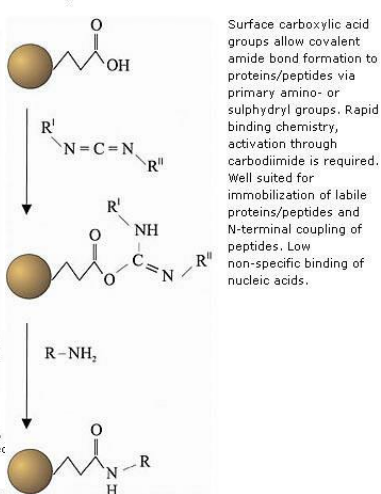


figure 1. Direct covalent binding of proteins and peptides to Dynabeads® M-280 Tosylactivated

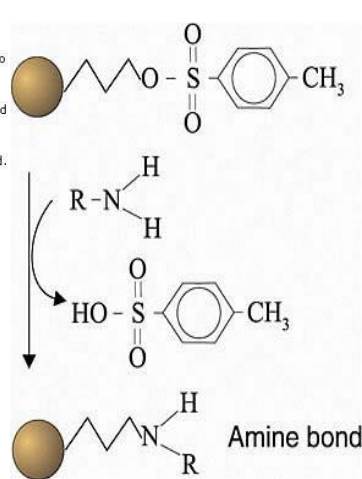
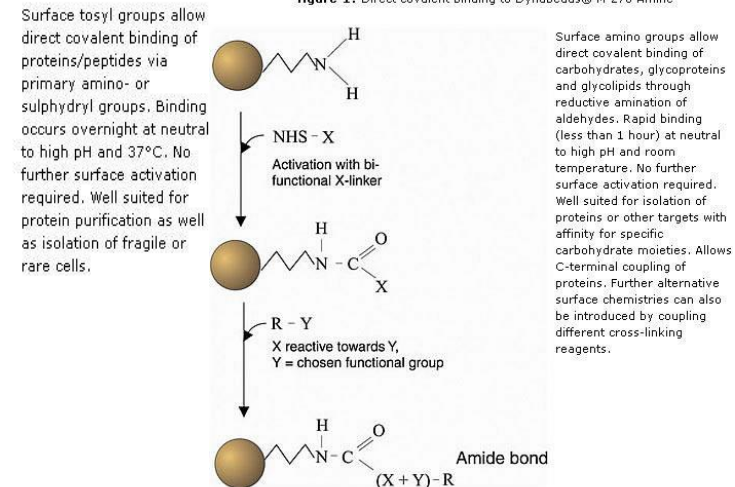


figure 1. Direct covalent binding to Dynabeads® M-270 Amine

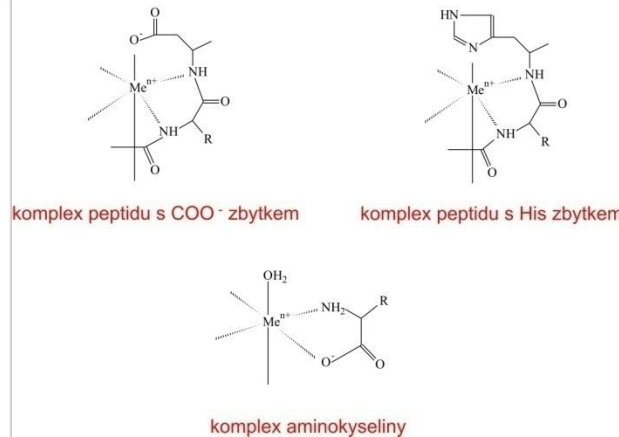
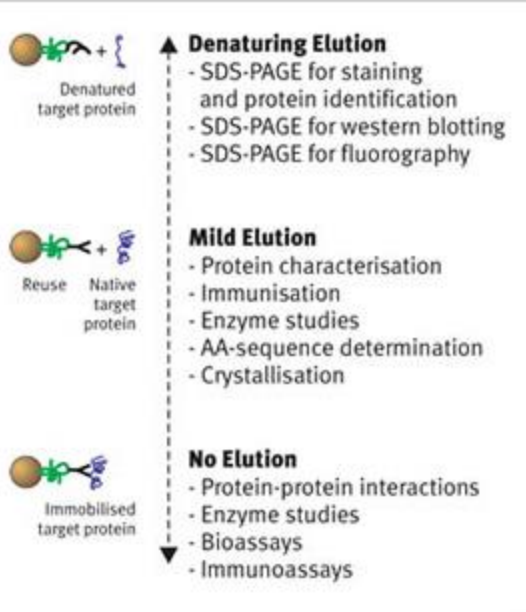
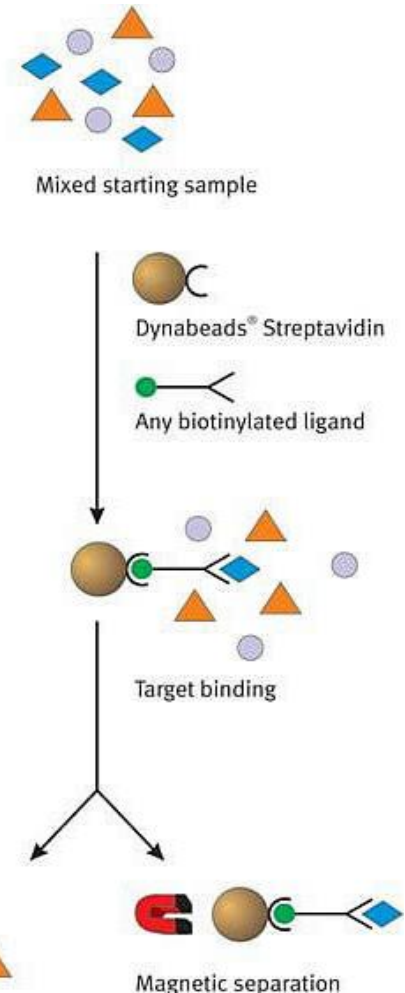


Nekovalentní immobilizace

- Výhody: biochemie/fyzikální chemie. Rychlejší. Více definované. Specifita. Reagencie.
- Nevýhody: biochemie/fyzikální chemie. Stabilita. Potřeba určitých struktur/vlastností (doména, biotinylace, histidinová kotva), náboj.
- Protein A, G
- Avidin, Streptavidin
- IMAC (histidinová kotva)
- náboj

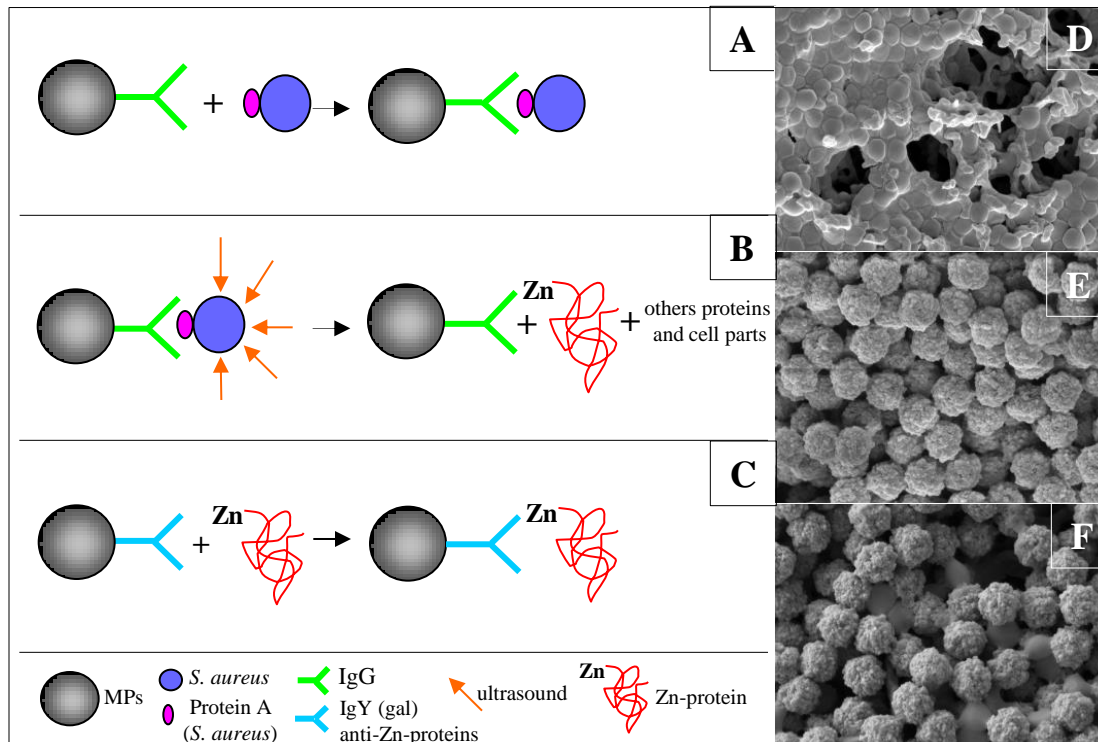
figure 1. Direct or indirect capture?

Depending on your specific application and target molecule, the direct or indirect capture method is applied. In the direct approach, the Dynabeads® are simply coated with the target-specific ligand and then added to the sample. For some applications, using a pre-coupled ligand for direct capture allows you to reuse the beads and thus further reduce sample preparation costs. In the indirect approach, the probe/ligand is allowed to bind to the target in suspension prior to addition of the Dynabeads®. An indirect approach can be of benefit when the concentration of your target is low, the specific affinity is weak or the binding kinetics is slow.



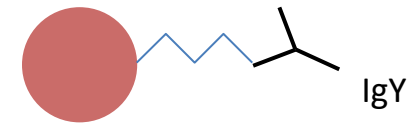
Imunoseparace bakterií a následná imunoextrakce Zn-proteinů

- *Staphylococcus aureus* kultivovaný v přítomnosti $ZnCl_2$
- Proteiny obsahující Zn(II) jsou spojeny s patogenitou a rezistencí k ATB (MRSA fenotyp)
- Schema procesu:



Imobilizace slepičích protilátek na povrch částic

- Přes tosyl-skupinu (sulfonyl ester)
- Interference s azidem sodným proti bakteriální kontaminaci
- Odstranění NaN_3 (centricon cut off 50 K)
- 1000 ug ligandu na 25 mg beads
- Acidifikace na pH = 2.5 15 min
- Výměna pufru (amicon 50 K)
- pH = 9.5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 24 hod 37°C
- Blokování 0.5 % BSA, Tween-20 14 hod.



Paramagnetická částice

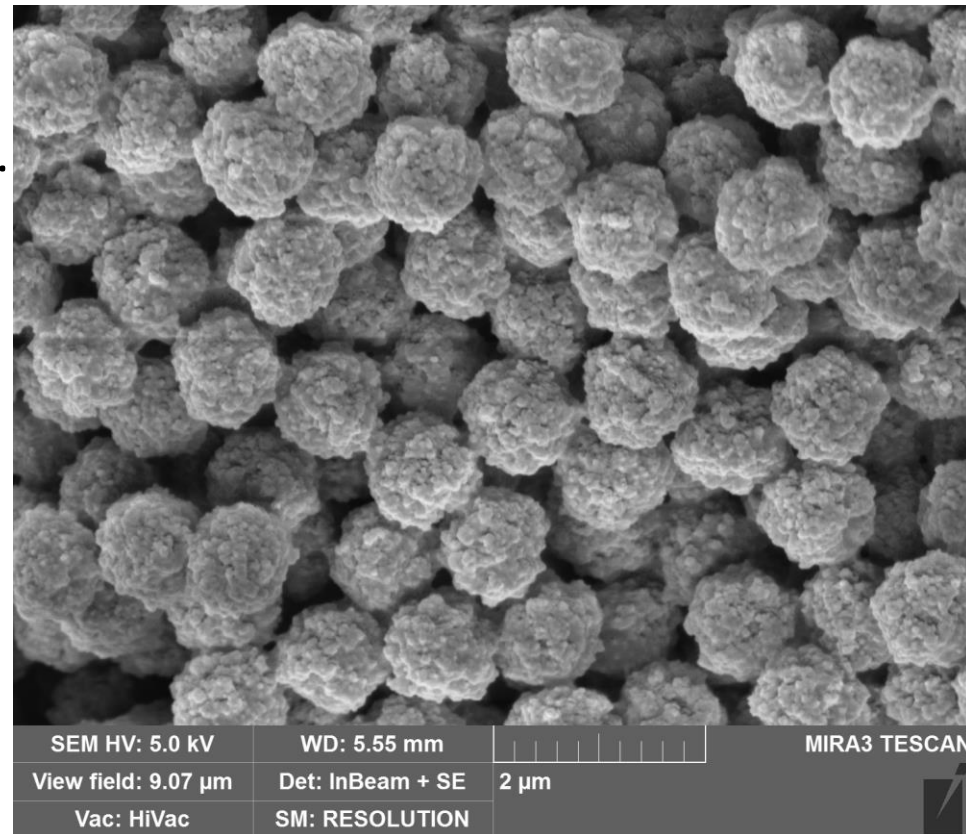
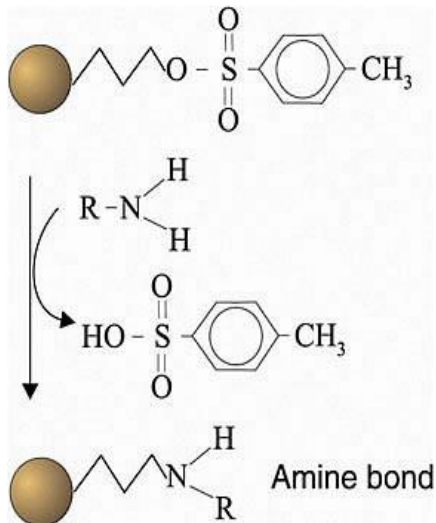


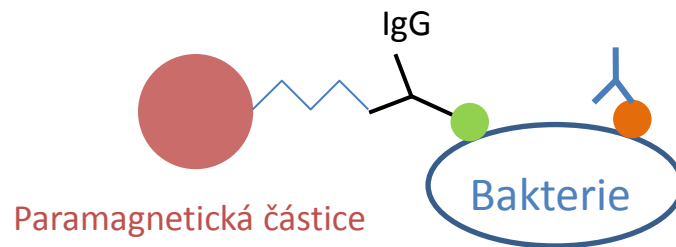
figure 1. Direct covalent binding of proteins and peptides to Dynabeads® M-280 Tosylactivated



Surface tosyl groups allow direct covalent binding of proteins/peptides via primary amino- or sulphhydryl groups. Binding occurs overnight at neutral to high pH and 37°C. No further surface activation required. Well suited for protein purification as well as isolation of fragile or rare cells.

Imobilizace lidských IgG na povrch paramagnetických částic:

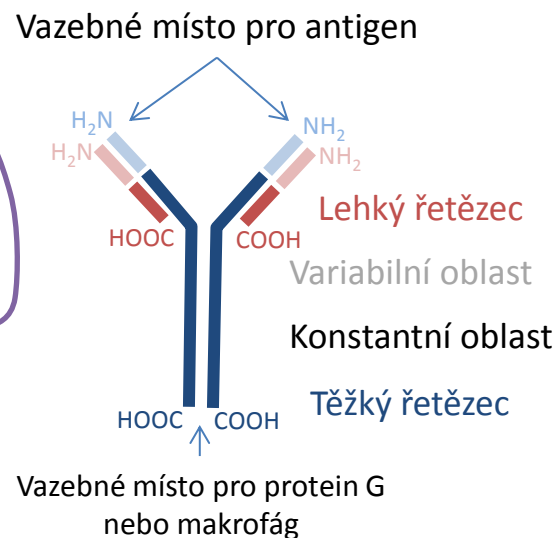
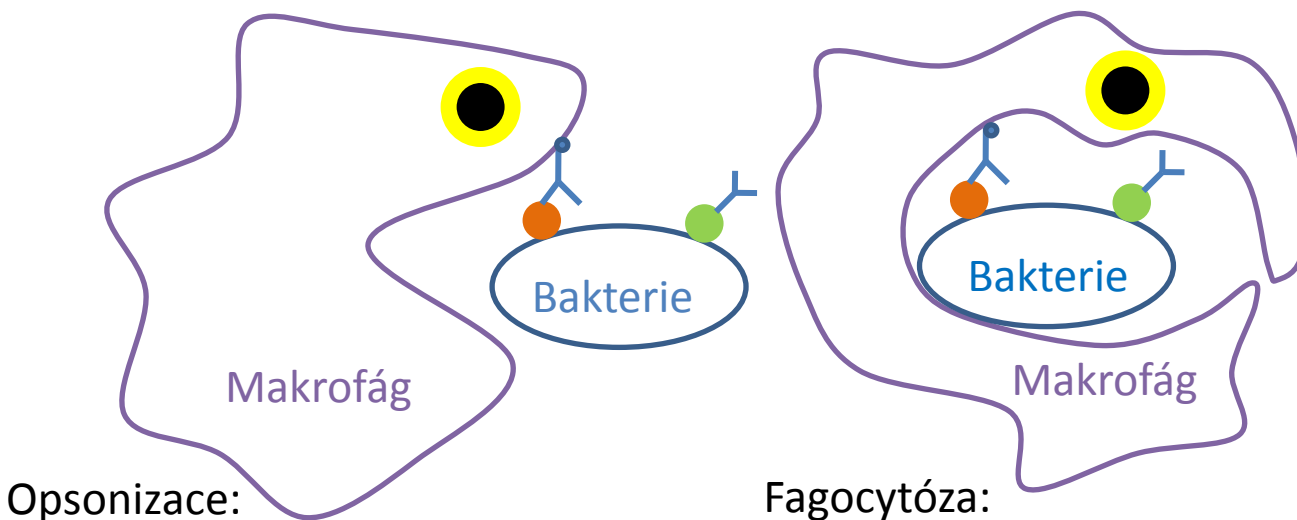
- Stejný typ, stejný postup
- *S. aureus* má povrchový protein A (antigen), který je schopen vazby (téměř) jakýchkoli imunoglobulinů
- Existuje i protein G (*Streptococcus*)
- Využíváno pro imobilizaci protilátek
- (Téměř) specifická imunoextrakce (x *Streptococcus*)
- Extrakce z média, příp. směsné kultury, nabohacující kultivace



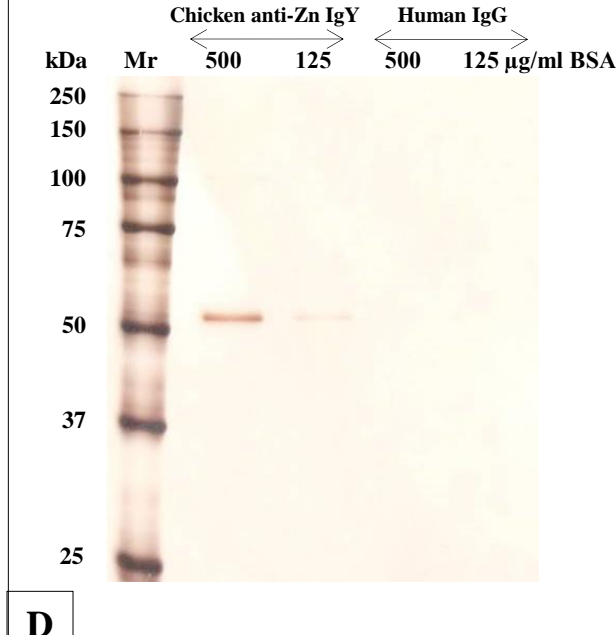
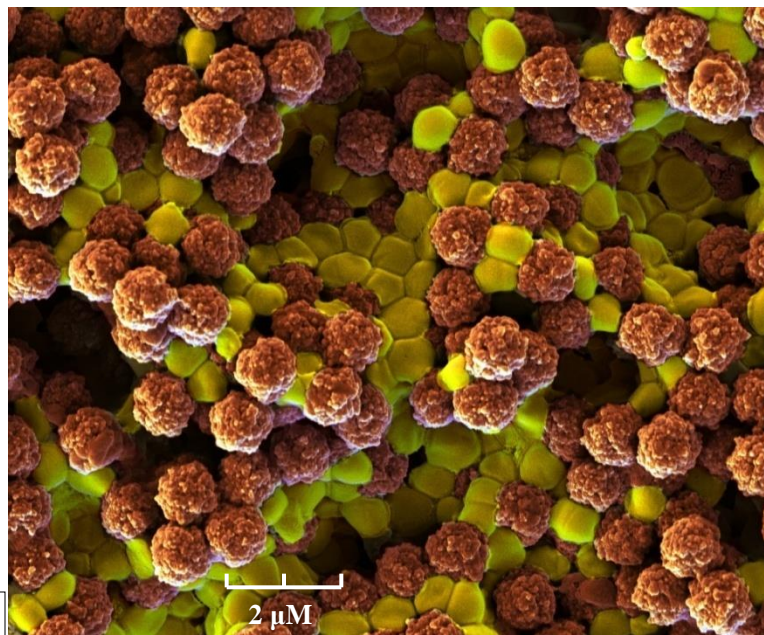
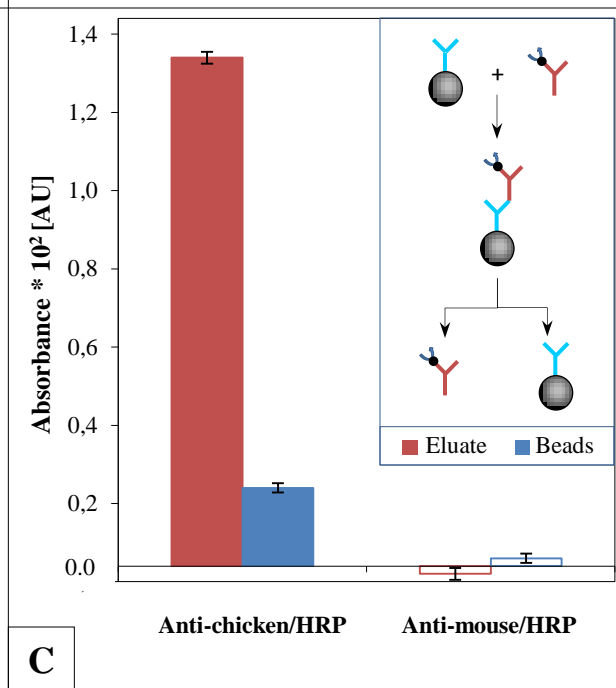
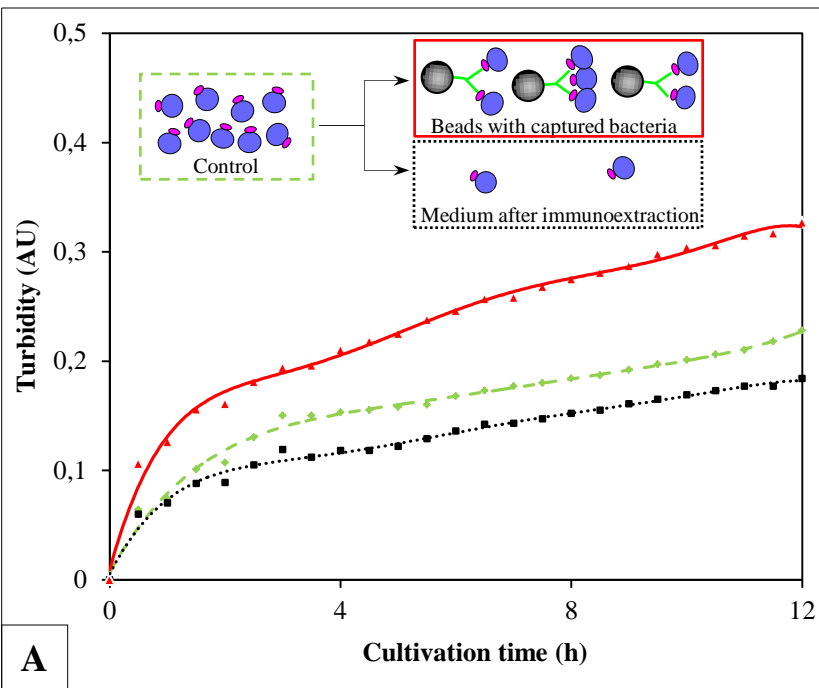
● Povrchový antigen ● Protein G — Specifický imunoglobulin — Nespecifický imunoglobulin

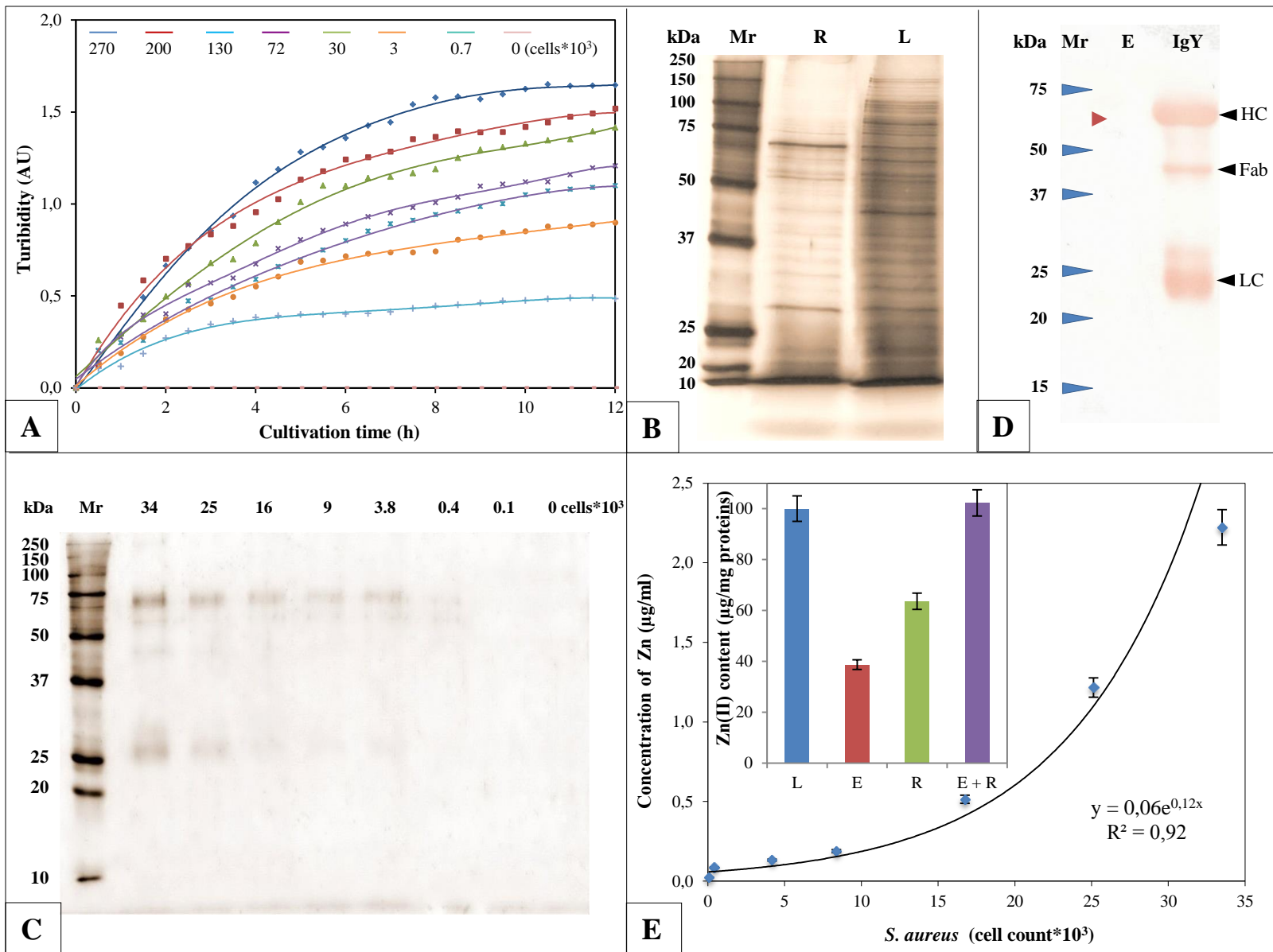
Proč lidské imunoglobuliny?

- **Bakteriální superantigeny.** Zn-proteiny
- MSCRAMM proteiny (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules)
- **Funkce:** vazba imunoglobulinů, které dále nejsou rozeznávány složkami imunitního systému.
- Obrana proti imunitní odpovědi hostitele (opsonizace, fagocytóza)
- **Protein A**, 56 kDa, *Staphylococcus* ssp.
- **Protein G**, 65 kDa, *Streptococcus* ssp.
- **Protein A/G**, 50.5 kDa, rekombinantní fúzní protein.
- **Protein L**, 76 kDa, *Peptostreptococcus* ssp.



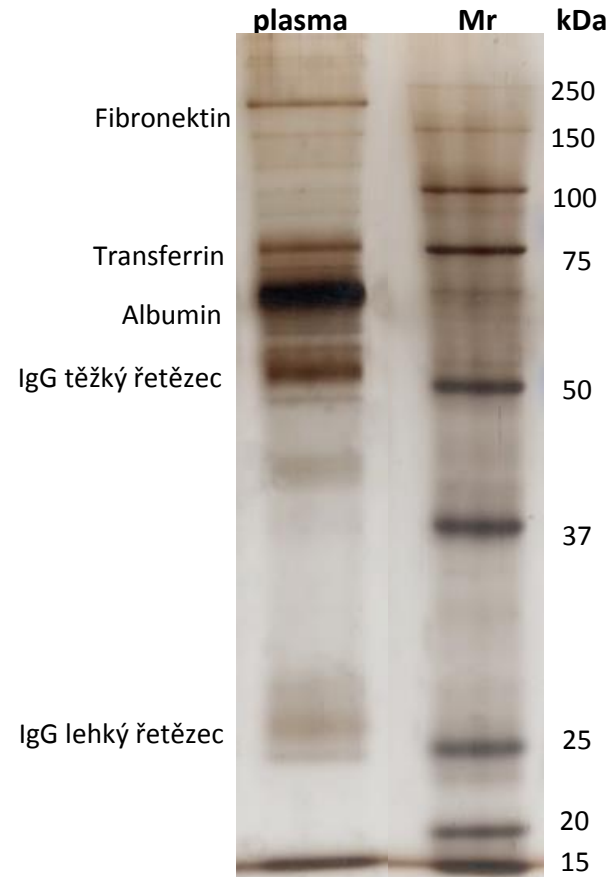
● Povrchový antigen ● Protein G ● Receptor pro imunoglobulin — Imunoglobulin





Krevní plasma

- Celkem přibližně 300 proteinů, z toho 10 % (možná až 30 %) obsahuje Zn(II)
- Krevní plasma × krevní sérum
- Hlavní Zn-vazebné proteiny v krevním séru
 - albumin
 - α 2-makroglobulin
 - transferin
 - ceruloplasmin
 - IgG, IgA, IgM
 - komplement C4
 - haptoglobin
 - prealbumin
 - c-reaktivní protein
 - α 1-antitrypsin
 - α 1-9.5S glykoprotein
- Nádorová onemocnění
- Zn status
- Zánětlivá onemocnění
- Deprese
- Imunitní poruchy
-



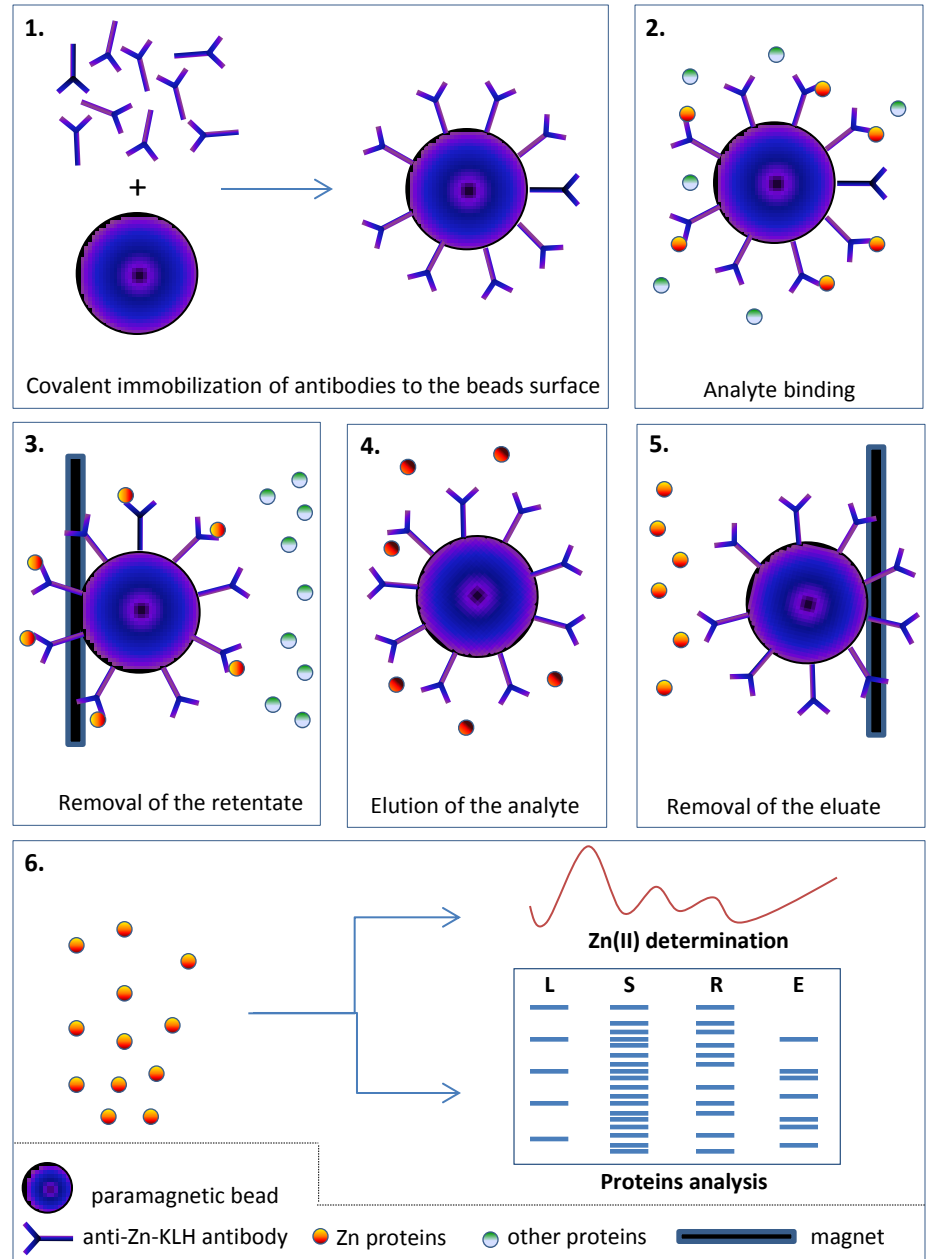
Imunoextrakce Zn-proteinů z krevní plasmy:

-Optimalizace

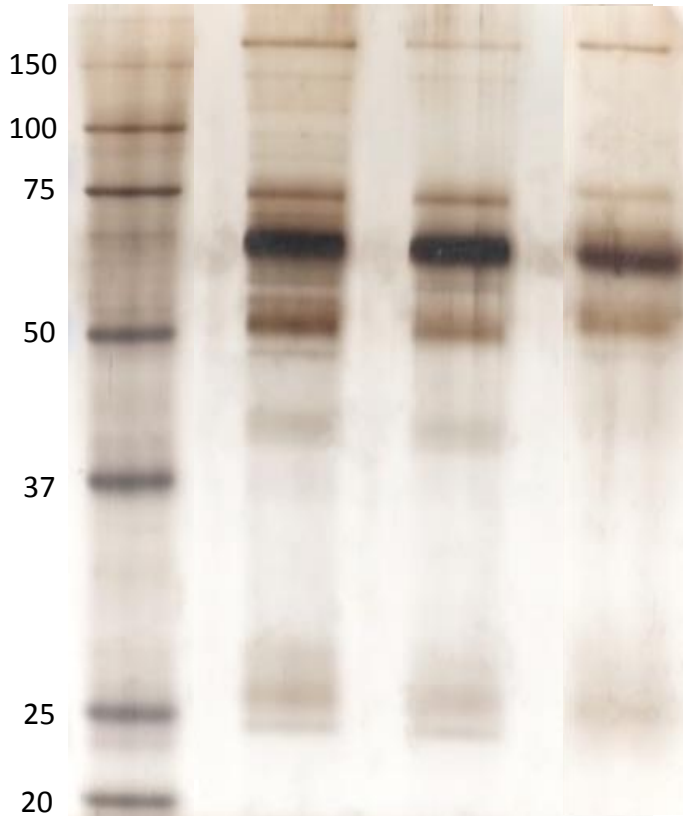
-pH elučního roztoku, množství vzorku a částic, čas a teplota extrakce a eluce, eluční pufr

-SDS-PAGE extrahovaných proteinů

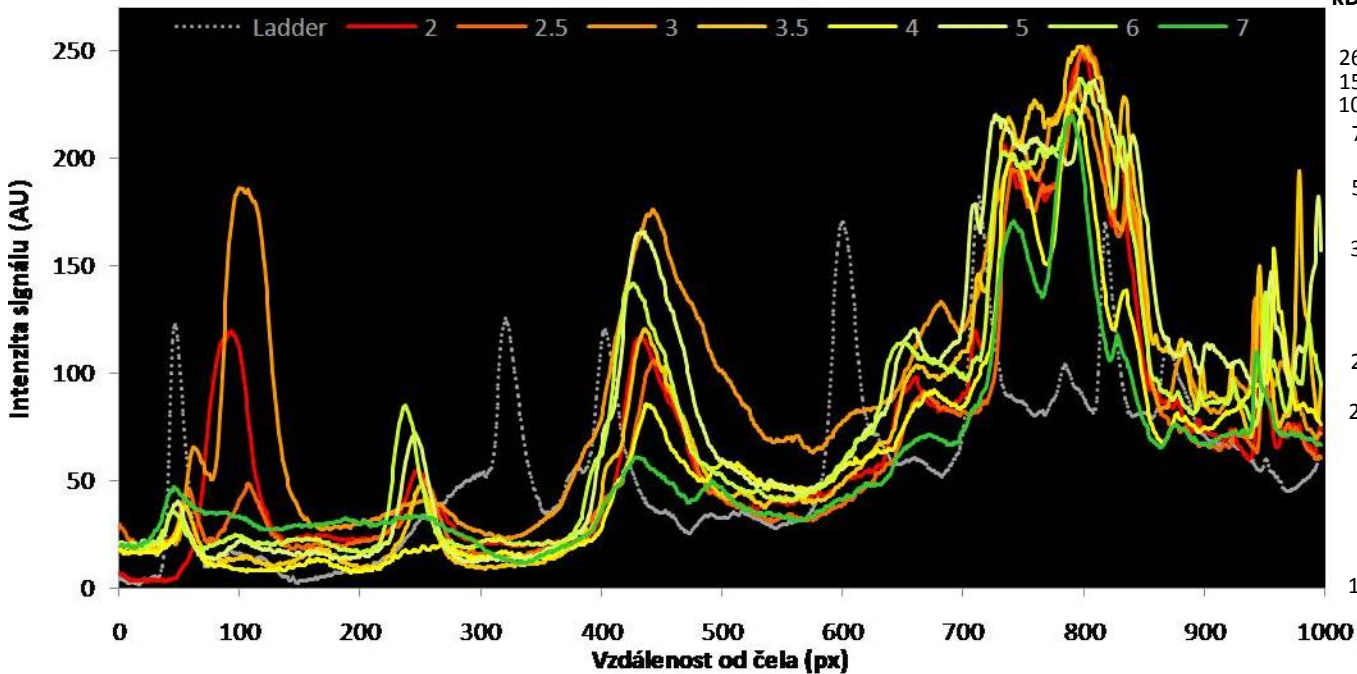
-Stanovení a bilance Zn(II)



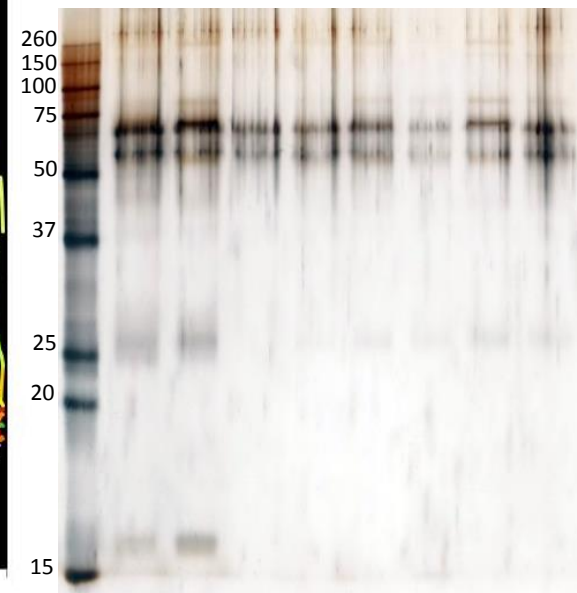
kDa Mr plasma retentát Zn-proteiny



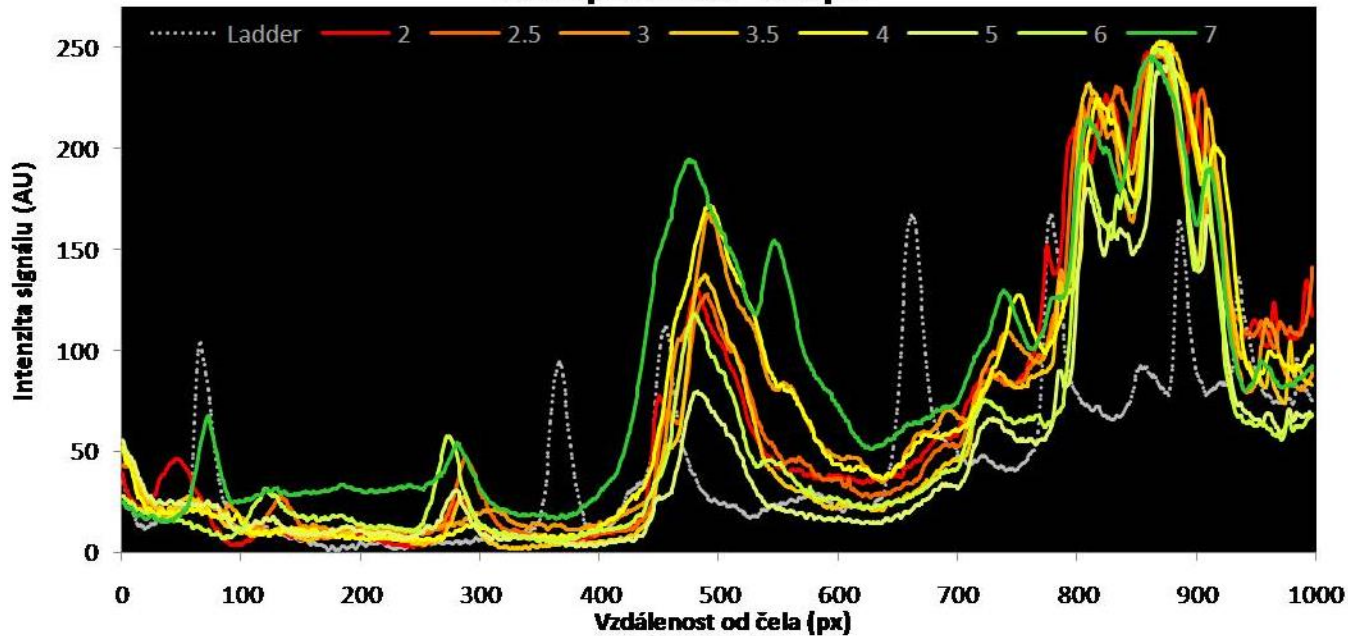
Přímá eluce - vliv pH



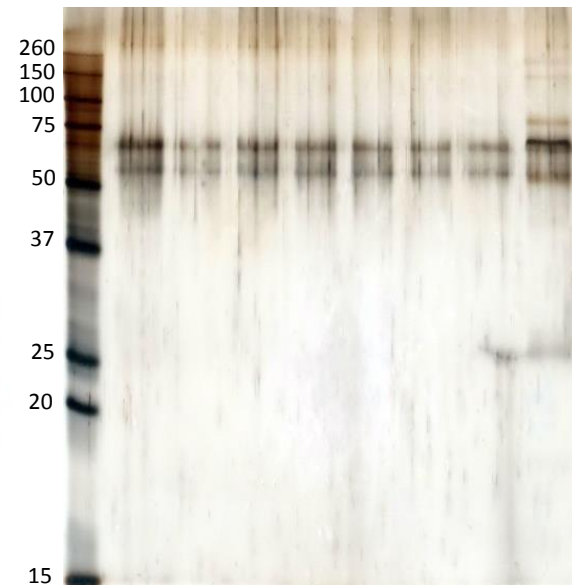
kDa Mr 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 5.0 6.0 7.0

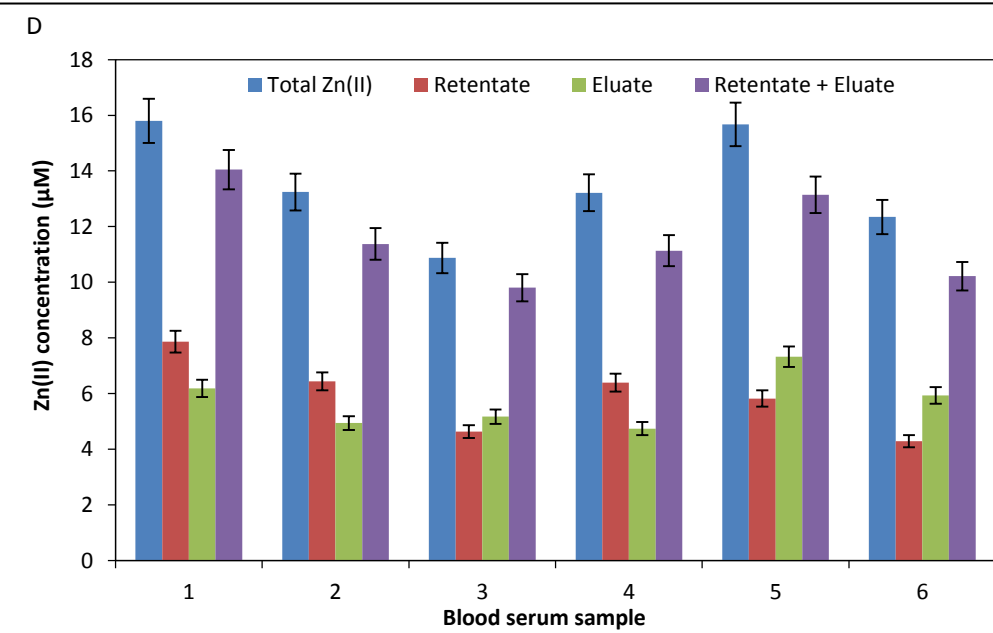
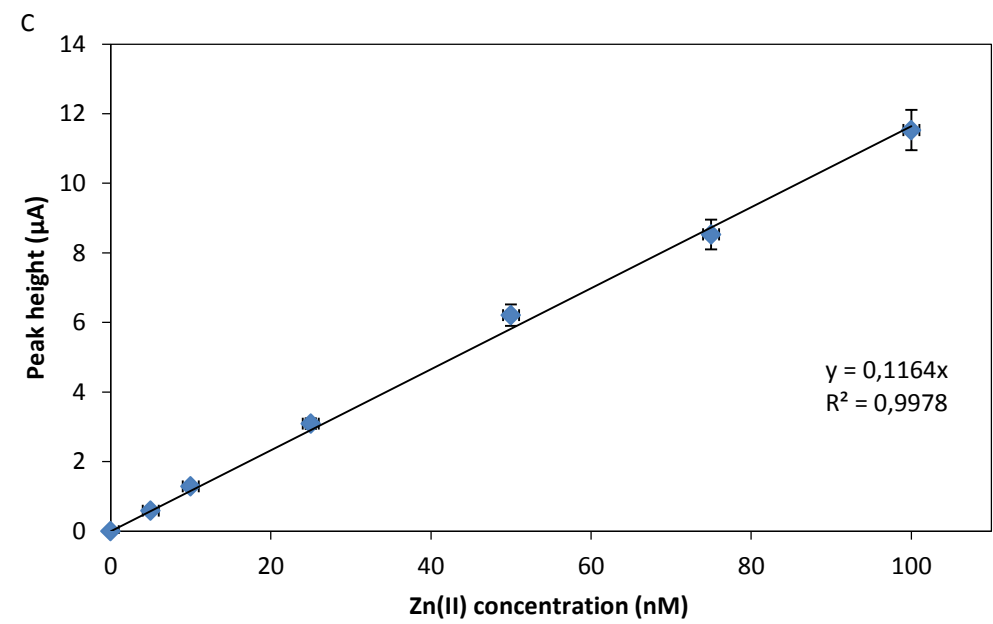
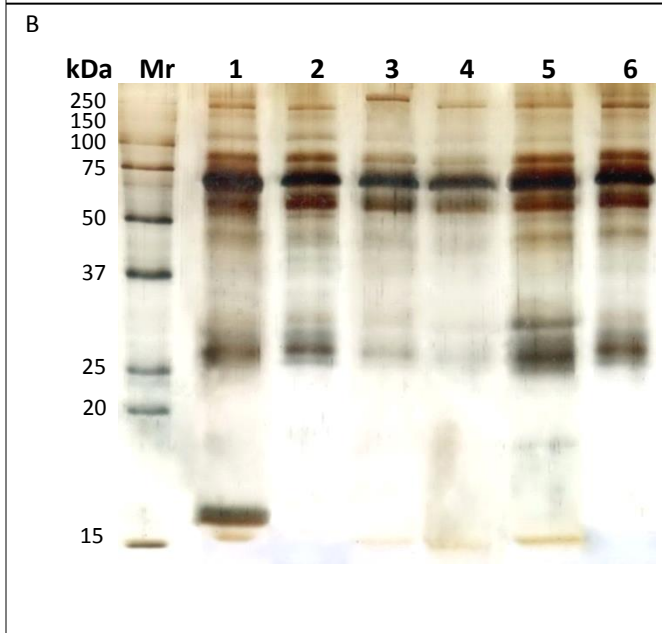
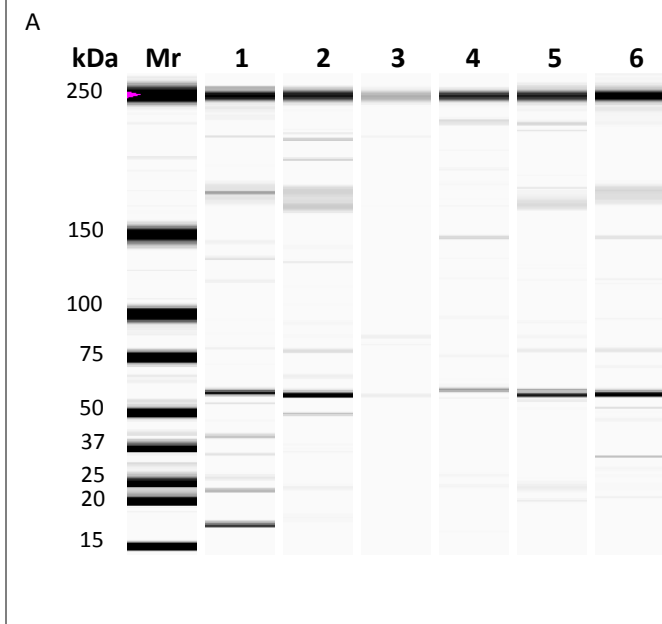


Postupná eluce - vliv pH



kDa Mr 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 5.0 6.0 7.0

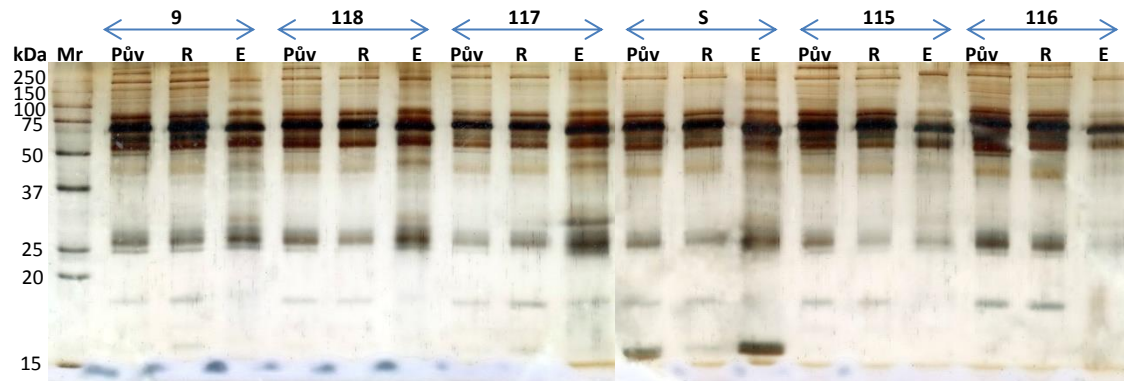




Shrnutí:

- Rychlý a senzitivní způsob izolace proteinů z biologické matrice
- Preparativní
- Použitelné pro následnou proteomickou analýzu
- Miniaturizace
- Automatizace

Děkuji za pozornost!



Tato práce byla financována ze zdrojů: CEITEC CZ.1.05/1.1.00/02.0068, NANOSEMED GA AV KAN208130801, Liga proti rakovině 2012, NanoBioTECell GACR P102/11/1068.