

ANALYTICKÁ ULTRACENTRIFUGACE

Jména:

Datum:

Úlohy:

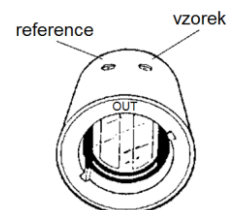
- A) Stanovení oligomerního stavu proteinu a jeho hydrodynamických vlastností**
B) Stanovení agregátů ve vzorcích monoklonálních protilátek

Přístrojové vybavení:

- analytická ultracentrifuga Beckman Coulter ProteomeLab XL-I vybavená ABS a IF optikou
- titanový rotor An-60
- dvousektorové centrifugační cely s eponovým centerpiecem a křemennými sklíčky
- kalibrační cely (tzv. counterbalance)

Pracovní postup:

- 1) Nařeďte vzorky na požadované koncentrace.
- 2) Podle příloženého schématu sestavte centrifugační cely. Použijte dvousektorové cely s eponovými centerpiecy (max. rychlost 42000 rpm) a křemenná skla, která jsou vhodná pro práci s absorbanční optikou (ABS). Sestavené cely utáhněte ve stojanu pomocí momentového klíče na 120 palců.
- 3) Plnicími otvory pipetujte do příslušných sektorů cel po 430 μ l reference a 420 μ l vzorku. Utěsněte plnicí otvory a uzavřete je pomocí mosazných šroubků.
- 4) Vyvažte měřicí cely a kalibrační cely (counterbalance) tak, aby rozdíl protilehlých cel v rotoru byl nejvýše 0,5 g a kalibrační cely byla lehčí než naproti ní ležící měřicí cely.
- 5) Umístěte cely do rotoru - měřicí cely do pozic 1-3, counterbalance do pozice 4 - a to tak, aby ryska vespod cely odpovídala risce na rotoru a plnicí otvory směřovaly do středu rotoru. V případě counterbalance musí být šipka na její horní straně orientována ve směru působení odstředivé síly.
- 6) Umístěte rotor do komory přístroje, připevněte optické rameno (monochromátor), komoru uzavřete a na ovládacím panelu spusťte vakuum (tlačítko VACUUM).
- 7) Jakmile poklesne vakuum pod hodnotu 50 mikronů, nastavte na ovládacím panelu centrifugy následující parametry: teplota 20° C, rychlost 0 rpm a stiskněte tlačítko START.
- 8) Temperujte vzorky při požadované teplotě po dobu 1 hodiny.
- 9) Na počítači spusťte ovládací software a nastavte tyto parametry měření: mód pro sedimentační rychlost, rychlost 42000 rpm, vlnová délka 280 nm, teplota 20° C, 40 skenů po šestiminutových intervalech. Ostatní parametry ponechte ve výchozím nastavení. Spusťte měření.
- 10) Vyhodnoťte získaná data.



A) STANOVENÍ OLIGOMERNÍHO STAVU PROTEINU A JEHO HYDRODYNAMICKÝCH VLASTNOSTÍ

V první části této úlohy bude Vaším úkolem určit **oligomerní stav** vybraného proteinu pomocí metody sedimentační rychlosti. Jako vzorek Vám bude sloužit protein AFL z plísně *Aspergillus fumigatus*. AFL patří mezi tzv. lektiny (sacharidy-vázající proteiny) a pro účely cvičení byl připraven v rekombinantní formě v bakteriích *Escherichia coli*. Získané výsledky budete porovnávat s výsledky z gelové permeační chromatografie (GPC), pomocí které byla oligomerizace proteinu AFL rovněž studována. Cílem této úlohy je demonstrovat výhody analytické ultracentrifugace v porovnání s ostatními technikami, které mohou v některých případech produkovat nepravdivé nebo nejednoznačné výsledky.

ANALYTICKÁ ULTRACENTRIFUGACE - METODA SEDIMENTAČNÍ RYCHLOSTI

Pro vyhodnocení měření sedimentační rychlosti a správnou interpretaci dat je potřeba znát hustotu a viskozitu použitého solventu a parciální specifický objem studované makromolekuly. Tyto veličiny se dají stanovit experimentálně, obvykle je ale možné je s dostatečnou přesností predikovat na základě známého složení pufru (hustota, viskozita), respektive aminokyselinového složení proteinu (parciální specifický objem).

Stejně tak je možné při znalosti aminokyselinové sekvence predikovat maximální hodnotu sedimentačního koeficientu (s_{\max}) pro různé oligomerní stavy proteinu (monomer, dimer, ...). Hodnota s_{\max} udává nejvyšší možný sedimentační koeficient, jakého může částice o dané hmotnosti nabývat. Tuto hodnotu sedimentačního koeficientu by mohla částice mít pouze v případě, že by se jednalo o dokonale hladkou ideální kouli, což je nereálné. Srovnání teoretických hodnot s_{\max} s experimentálně stanoveným sedimentačním koeficientem lze využít k určení, o jaký oligomerní stav molekuly se jedná.

Následující hodnoty budete potřebovat pro vyhodnocení dat z analytické ultracentrifugace. Proved'te jejich predikci v programu Sednterp..

pufr:

hustota: ρ (20° C) = g/cm³
viskozita: η (20° C) = P (Poise, 1 P = 0,1 Pa·s)

protein: AFL

```
STPGAQQVLFRTGIAAVNSTNHLRVYFQDVYGSIRESLYEGSWANGTEKNVIGNAKLGSFVAATSKELEKHIRVYTLTEGN  
TLQEFAYDSGTGWYNGGLGGAKFQVAPYSCIAAVFLAGTDALQLRIYAQKPDNTIQEYMWNGDGWKEGTNLGGALPGTGI  
GATSFRTYTDYNGPSIRIWFQTDLKLVRAYDPHKGWY PDLVTIFDRAPPRTAIAATSFGAGNSSIYMRIFYVNSDNTI  
WQVCWDHKGKGYHDKGTITPVIQGGSEVAIISWGSFANNPDLRLYFQNGTYISAVSEWVWNRHAGSQLGRSALPPA
```

molekulová hmotnost (monomer) = kDa
parciální specifický objem: \bar{v} (20° C) = ml/g
 s_{\max} (monomer) = S s_{\max} (dimer) = S s_{\max} (trimer) = S

Naměřená data ze sedimentačně-rychlostního experimentu vyhodnoťte v programu Sedfit [1]. Pro vyhodnocení použijte následující nastavení:

model: kontinuální distribuce sedimentačních koeficientů $c(s)$, distribuce od 0,5 do 15 S, rozlišení 150, hladina spolehlivosti regularizace 0,70, při fitování nechte optimalizovat pozici menisku, baseline, frikční poměr a odstraňte TI (time-independent) šum.

V protokolu ukažte naměřená sedimentační data s proloženými křivkami, zbytkový graf a kontinuální distribuci $c(s)$. Obrázky vygenerujte v programu GUSSE (University of Southwestern Medical School, Texas). Do protokolu dále uveďte stanovenou hodnotu sedimentačního koeficientu proteinu AFL za testovaných podmínek. Je vzorek homogenní?

$s =$ S

Je vzorek homogenní?

Jaká je hodnota sedimentačního koeficientu proteinu AFL za standardních podmínek?

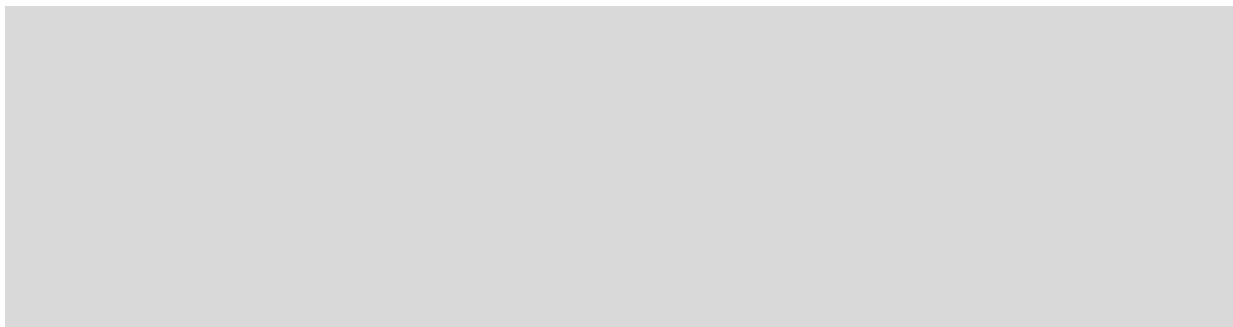
$s_{20,v} =$ S (program Sednterp)

Srovnání stanovené $s_{20,v}$ s teoretickými hodnotami s_{max} predikovanými pro jednotlivé oligomery může být použito pro **odhad kvartérní struktury proteinu**, jak je ilustrováno na níže uvedeném příkladu. Poměr $s_{max}/s_{20,v}$ je roven **oměru frikčních koeficientů f/f_0** a v této formě se užívá pro vyjádření toho, jak moc se liší tvar studované částice od tvaru ideální koule o totožné hmotnosti. Hodnota f/f_0 je nejmenší pro částice blízké svým tvarem kouli (vždy je ale vyšší než 1) a zvyšuje se spolu s protáhlostí částice, flexibilitou nebo neuspořádaností. Dává nám tak částečnou informaci o tvaru molekuly. f/f_0 pro globulární proteiny se obvykle pohybuje v rozmezí 1,2-1,4, vyšší hodnoty (1,5-1,8) často odpovídají glykosylovaným nebo výrazně protáhlým proteinům, ještě vyšší hodnoty (např. 2,3) jsou pak pozorované u proteinů s neuspořádanou strukturou.

Uvažujme například protein o hmotnosti 50,8 kDa, pro který stanovíme sedimentační koeficient v PBS pufru 5,65 S. Hodnota $s_{20,v}$ po korekci ke standardním podmínkám činí 6,00 S. Tato hodnota je výrazně vyšší, než hodnota s_{max} pro monomer (4,72 S), což svědčí o existenci větší částice (dimer, trimer, ...). Pravděpodobně se tedy jedná o dimer (s_{max} 7,49 S), pro který vychází frikční poměr 1,25, hodnota typická pro globulární částice. V případě trimeru (s_{max} 9,81 S), by se už muselo jednat o výrazně protáhlou částici ($f/f_0 = 1,63$).

Analogicky se pokuste určit, jaká je kvartérní struktura proteinu AFL a uveďte, co vypovídá poměr f/f_0 o tvaru molekuly (jedná se o globulární protein nebo něco jiného?). Své rozhodnutí zdůvodněte.

V případě pochyb (ve smyslu kompaktní monomer/protáhlý dimer) můžete přihlídnout k molekulové hmotnosti stanovené ze Svedbergovy rovnice (viz níže).



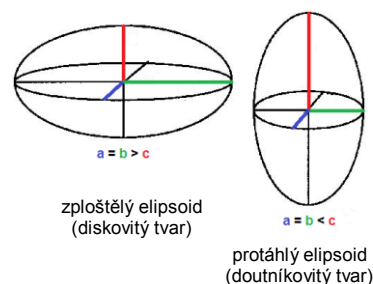
Alternativní přístup umožňuje výpočet molekulové hmotnosti přímo. Metoda sedimentační rychlosti dokáže stanovit jak sedimentační, tak i difúzní koeficient, a jejich dosazením do Svedbergovy rovnice (při znalosti \bar{v} , ρ) lze vypočítat molekulovou hmotnost makromolekuly. Přesnost stanovení se však liší případ od případu a zejména pro malé částice (výrazný vliv difúze) a heterogenní vzorky může být takto stanovená molekulová hmotnost poměrně nepřesná.

$$M = \frac{sRT'}{D(1-\bar{v}\rho)}$$

Jaká je molekulová hmotnost proteinu AFL vypočítaná ze Svedbergovy rovnice? (Ctrl+M v Sedfitu)

M = kDa

Na základě dat získaných metodou sedimentační rychlosti je možné provést **hydrodynamické modelování** a získat tak určité informace o rozměrech proteinu. Nejjednodušší hydrodynamická analýza spočívá v aproximaci tvaru proteinu k rotačním elipsoidům (protáhlý/zploštělý elipsoid), případně válci. V současnosti už existuje také celá řada sofistikovanějších modelů zohledňujících rozmanité tvary proteinů.



Jaký je Stokesův poloměr proteinu AFL (poloměr hypotetické kulovité částice se stejným difúzním koeficientem jako analyzovaný vzorek)? Jaké by byly rozměry protáhlého elipsoidu, jemuž by byl náš protein hydrodynamicky ekvivalentní? Použijte program Sednterp (Tellerova metoda).

Stokesův poloměr: $R_s =$ nm

parametry protáhlého elipsoidu: poměr os a/b:
 $2a =$ nm
 $2b =$ nm

ANALYTICKÁ ULTRACENTRIFUGACE - METODA SEDIMENTAČNÍ ROVNOVÁHY

Jak bylo zřejmé v předchozí části úlohy, při interpretaci výsledků získaných metodou sedimentační rychlosti se musí brát v úvahu jak hmotnost sedimentující částice, tak i její tvar. Naproti tomu metoda sedimentační rovnováhy je metoda absolutní a umožňuje **stanovení molekulové hmotnosti** přímo. Vzhledem k časové náročnosti (měření trvá několik dní) není možné experiment sedimentační rovnováhy ve cvičení prakticky provést a molekulovou hmotnost proteinu AFL tak určíte z dat, která Vám na vyhodnocení poskytneme.

Měření sedimentační rovnováhy proteinu AFL bylo prováděno při teplotě 20° C v šestisektorové cele naplněné 110 μ l vzorku AFL a 120 μ l reference. Vzorky byly postupně centrifugovány při rychlostech 7800 rpm, 13300 rpm a 23000 rpm a data byla sbírána vždy po ustavení rovnováhy při vlnové délce 280 nm.

Na to, abyste mohli vyhodnotit data, budete opět potřebovat znát některé hodnoty. Pro jejich predikci použijte znovu program Sednterp.

puf: 20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4

hustota: ρ (20° C) = g/cm³

protein: AFL, koncentrace: mg·ml⁻¹

molekulová hmotnost (monomer) = kDa

parciální specifický objem: \bar{v} (20° C) = ml/g

Proveďte vyhodnocení dat získaných metodou sedimentační rychlosti v programu Sedphat [2]. Pro vyhodnocení použijte následující nastavení:

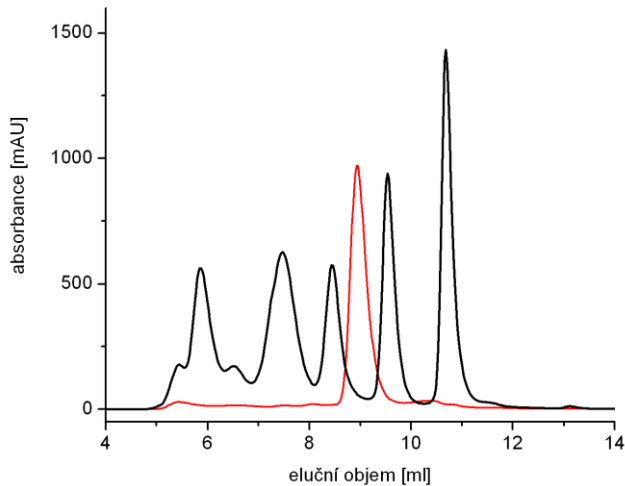
model: „species analysis“ (jedna sedimentující částice), při fitování nastavte pozici menisku i dna jako fixní hodnoty, fitujte pouze baselinu, případně TI šum.

V protokolu ukažte naměřená sedimentační data s proloženými křivkami a zbytkový graf. Obrázky vygenerujte opět v programu GUSSE. Do protokolu dále uveďte stanovenou molekulovou hmotnost proteinu. Jaký oligomerní stav protein AFL zaujímá a jak se procentuálně liší stanovená molekulová hmotnost od hodnoty vycházející ze sekvence?

molekulová hmotnost: kDa

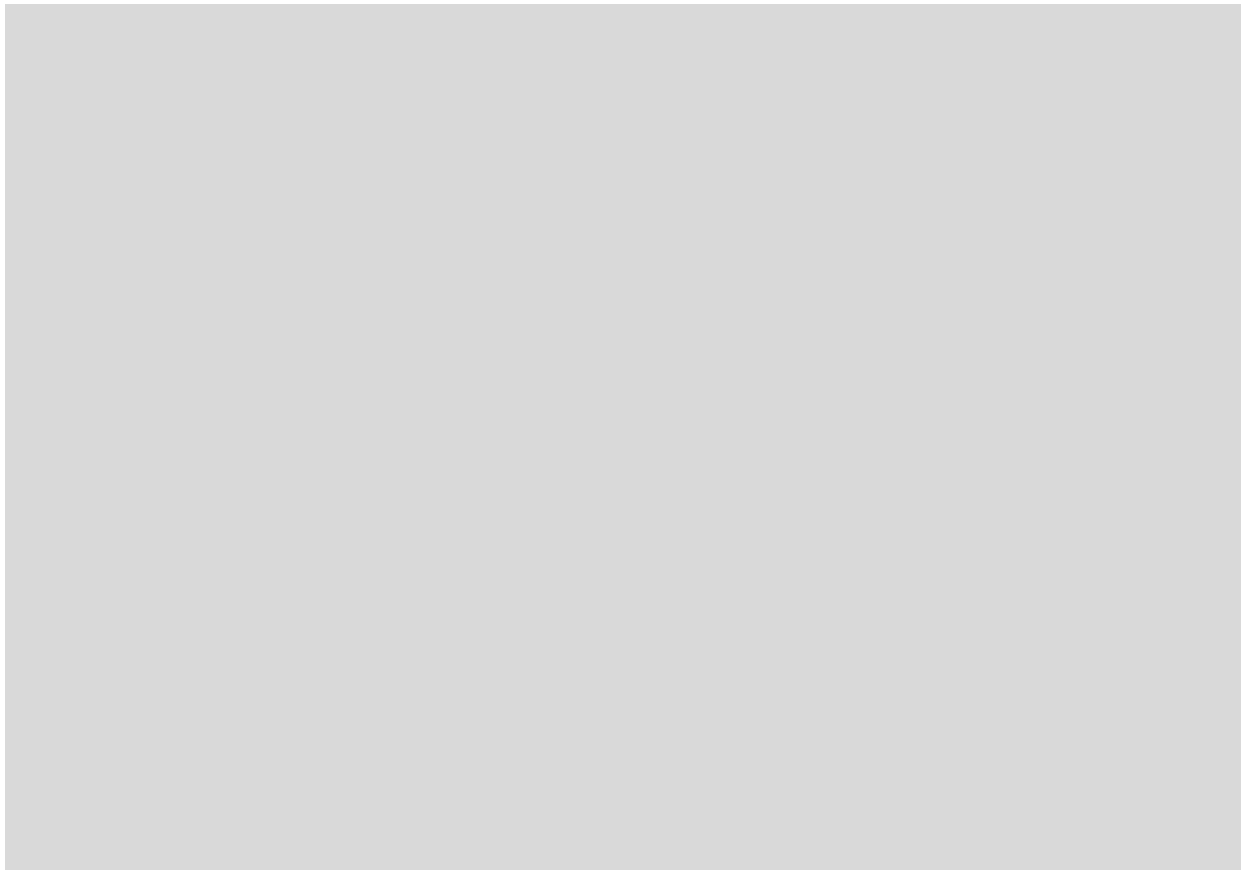
SROVNÁNÍ S VÝSLEDKY GELOVÉ PERMEAČNÍ CHROMATOGRAFIE (GPC)

Vzorek proteinu AFL byl analyzován gelovou permeační chromatografií na koloně Biosilect 250-5 (Biorad). Měření bylo prováděno za stejných podmínek jako v případě analytické ultracentrifugace (stejně složení pufru a teplota) Záznam průběhu měření a tabulka retenčních objemů **vzorku** a **standardů** jsou uvedeny níže.



	molekulová hmotnost [kDa]	eluční objem [ml]
thyroglobulin	670	5,90
γ-globulin	158	7,46
ovalbumin	44	8,47
myoglobin	17	9,52
vitamin B12	1,35	10,67
AFL	neznámá	8,93

Na základě výše uvedených údajů proveďte vyhodnocení měření GPC. Do protokolu uveďte graf kalibrační závislosti, rovnici regresní přímky a vypočítanou molekulovou hmotnost proteinu AFL. V případě odlehlosti některého z kalibračních bodů tento bod v kalibraci zanebejte. Na jaký oligomerní stav proteinu AFL výsledky GPC poukazují? V případě, že se výsledky analytické ultracentrifugace a GPC liší, pokuste se zdůvodnit proč.



B) STANOVENÍ AGREGÁTŮ VE VZORCÍCH MONOKLONÁLNÍCH PROTILÁTEK

Druhá část úlohy je zaměřena na **analýzu agregátů** a měla by tvořit přesah do aplikované sféry. U biofarmaceutik je tvorba agregátů hlavní cestou jejich degradace, která může výrazně ovlivňovat bioaktivitu, farmakokinetiku a imunogenicitu daného léčiva, a musí proto být při vývoji proteinových farmaceutik důsledně sledována. V této části úlohy stanovíte metodou sedimentační rychlosti zastoupení agregátů u dvojice vzorků monoklonálních protilátek, z nichž jeden byl vystaven nepříznivým podmínkám (skladování při teplotě 37° C po dobu několika měsíců + několik cyklů zmrazení/rozmrazení).

testované protilátky: myší IgG1 protilátky proti lidskému leptinovému receptoru

Naměřená data ze sedimentačně-rychlostního experimentu vyhodnoťte v programu Sedfit [1]. Pro vyhodnocení uvažujte hodnotu parciálně-specifického objemu protilátky 0,734 ml/g a molekulovou hmotnost monomeru přibližně 150 kDa (hodnoty udávané v literatuře pro IgG1 protilátky). Pro jednoduchost uvažujte složení PBS pufru (hustota a viskozita při 20° C 1,0053 g/cm³ a 0,010188 P). Použijte následující nastavení:

model: kontinuální distribuce sedimentačních koeficientů c(s), distribuce od 0,5 do 50 S, rozlišení 200, hladina spolehlivosti regularizace 0,70, při fitování nechte optimalizovat pozici menisku, baseline, frikční poměr a odstraňte TI (time-independent) šum.

V protokolu ukažte naměřená data s proloženými křivkami a zbytkovými grafy „stresovaných“ a „nestresovaných“ protilátek a srovnání jejich kontinuálních distribucí c(s) (program GUSI). Použijte vhodné zvětšení, aby byly v distribuci vidět agregace protilátek..

vzorek „stresovaných“ protilátek:

vzorek „nestresovaných“ protilátek:

srovnání c(s) distribucí „stresovaných“ a „nestresovaných“ protilátek:

V grafu znázorněte, jakým částicím odpovídají jednotlivé píky (např. monomer, dimer nebo jiný oligomerní stav proteinu; fragmenty, agregáty).

Rozdíly mezi vzorkem „stresovaných“ a „nestresovaných“ proteinů stručně okomentujte.

REFERENCE:

1. Schuck, P. (2000) Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and Lamm Equation modeling. *Biophys J* 78: 1606-1619.
2. Schuck, P. (2003) On the analysis of protein self-association by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation. *Anal Biochem* 320: 104-124.