

Sameindakennsl og sérsníðaðir griphópar fyrir hreinvinnslu próteina

Hörður Filippusson

Raunvísindastofnun Háskólans, Lífefnafræðistofa, Dunhaga 3, 107 Reykjavík

Vefútgáfa: 8. október 2008

Ágrip – Fjallað er um grundvöll sameindakennsla og hagnýtingu þekkingar á þeim til ýmissa verka, einkum gripgreiningar. Greint er frá upphafi gripgreiningatækninnar og þróun griphópa, einkum með tilliti til notkunar sameindalíkana. Loks er greint frá nokkrum dæmum um smíði og þróun griphópa sem byggðir eru á efnafræði príklórópríazíns.

1. Inngangur

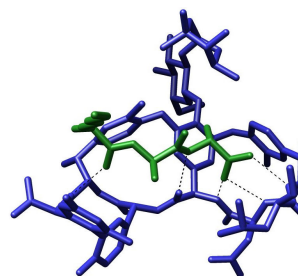
Með sameindakennslum (*e. molecular recognition*) er átt við sértæk tengsl milli tveggja eða fleiri sameinda byggð á ósamgildum tengjum, þ.e. vetnistengjum, girðandi tengjum málma, vatnsfælum tengjum, van der Waals tengjum, π - π -verkunum og rafstöðuhrifum.

Einfalt líkan af sameindakennslum er að finna í kristallabyggingu sambands þrípeptíðsins L-Lys-D-Ala-D-Ala, sem er forstig frumuveggja baktería, og fúkalyfsins vancomýsins (mynd 1). Efnin tengjast með fimm vetnistengjum. Fúkalyfið hindrar myndun frumuveggjar en ekki með því að hindra virkni ensímsins sem notar þrípeptíðið sem hvarfefni við byggingu frumuveggjarins heldur með því að binda hvarfefnið og koma í veg fyrir að það nýtist sem byggingarefni [1]. Slíkt tengi byggist á því að hópar sem tengjast standast á og hæfilegt bil er á milli þeirra. Styrkur slíkra tengja felst í því að þó að hvert tengi (í þessu tilviki vetnistengi) sé tiltölulega veikt (t.d. miðað við samgild efnatengi) vinna vetnistengin fimm saman og mynda sterka heildarbindingu. Fullyrða má að ekkert í lífríkinu hafi jafn mikið grundvallarmikilvægi og sameindakennsl. Allir atburðir í lífi frumu byggjast á því að sameind tengist einni eða fleiri sameindum í stuttan eða langan tíma eftir atvikum. Nægir að benda á eftirfarandi sameindapör: DNA-DNA, DNA-RNA, DNA-prótein, RNA-prótein, RNA-ríbósóm, prótein-prótein, ensím-hvarfefni, ensím-áhrifsefni, mótefni-

mótefnisvaki, sykurefni-lektín. Þannig mætti áfram telja. Öll slík tengsl milli sameinda byggjast á veikum ósamgildum tengjum.

Löngum var litið á tengingar lífsameinda með líkingu við tengsl lykils við skrá, þ.e. statíska tengingu líkt og þegar tveir hlutar púsluspils falla saman. En löngu er ljóst að slík sýn segir ekki alla söguna. Fyrst var ný sýn á tengingu ensíms og hvarfefnis sett fram í hugmyndinni um "induced fit" þar sem gert var ráð fyrir að um leið og hvarfefni binst ensími geti lögun ensímsameindarinnar breyst og lagað sig að hvarfefninu [2]. Breytingar á lögun próteinsameinda af þessum toga eru nú vel þekktar og eiga sér stað víða.

Á síðustu árum hefur athygli manna beinst mjög að tengingu og tengimöguleikum próteina í lifandi frumum. Er reynt að kortleggja sem nákvæmast alla möguleika próteina til tenginga við önnur prótein og



Mynd 1. Kristallabygging þrípeptíðsins L-Lys-D-Ala-D-Ala í tengslum við fúkalyfið vancomycin. Tengingin byggist á fimm vetnistengjum.

greina þau mynstur sem fram koma við það. Þessi nýja áhersla á tengsl sameinda hefur verið kölluð ”interactomics“ og bætist í stóran hóp áherslusviða sem sameinast um viðskeytið ”-omics“ (*genomics, proteomics, metabolomics* etc.) [3].

2. Hagnýting sameindakennsla

Fjöldamargar aðferðir sem notaðar hafa verið um árabíl í lífefnafræði og skyldum greinum byggja beinlínis á sameindakennslum. Nægir að nefna örfá dæmi: Ensím, sem hvetja nær öll efnahvörf í lífandi verum byggja starf sitt á því að þau bera kennsl á og tengjast viðkomandi hvarfefnum með sérhæfðum hætti. Efnagreining með aðstoð ensíma er mikilvægur þáttur í lífefnagreiningu, meðal annars í tengslum við sjúkdómsgreiningar. Mót efni tengjast mót efnavökum á grundvelli sameindakennsla og þau eru áreiðanlega sérhæfðustu efnagreiningartæki sem völ er á þegar um flókin lífefni er að ræða. Genatækni byggir að verulegu leyti á aðferðum sem styðjast við kjarnsýrupör- un sem er ein birtingarmynd sameindakennsla, og má nefna margskonar greiningu erfðaeftnis með kjarnsýrupreifurum sem dæmi. Þannig mætti lengi telja. Í þessari grein verður sjónum beint að *affinity*-tækni sem nefnd hefur verið gripgreining og einkum að aðferðum sem nota má til að hanna og sérsníða efnafræðileg tól sem byggjast á sameindakennslum.

3. Upphaf gripgreiningar

Venjulega er vísað til greinar þeirra Cuatrecasas, Wilchek og Anfinsen frá 1968 [4] sem upphafs gripgreiningar og fyrstu notkunar nafnsins *affinity chromatography*. Raunar má finna örfáar greinar um fyrri tilraunir í sömu veru frá 1953 og 1964-6 [5-7]. En fljótlega tóku margir rannsóknahópar upp tilraunir með gripgreiningu og þróðu hana á ýmsa vegu. Þar voru framarlega Meir Wilchek í Ísrael (sem ásamt öðrum þróaði ýmis afbrigði af gripgreiningu auk þess sem hann var upphafsmaður skyldra tæknisviða eins og *affinity labeling, affinity therapy* og notkun avidin-biotin tengingar í lífefnatækni) [8] og Chris Lowe og Peter Dean í Bretlandi [9]. Segja má að almennt séu þær aðferðir og sú nálgun sem fyrst birtast í gripgreiningu og á öðrum sviðum kyrrsettra lífefna fyrirrennarar flestra nútímataeknibragða í lífefnafræði, þar með talið lífefnanema (*biosensors*), kjarnsýrutækni, efnamælinga með aðstoð mót efna á föstum fasa (*ELISA* og skyldar aðferðir) og örfylkja (*microarrays*) og notkun

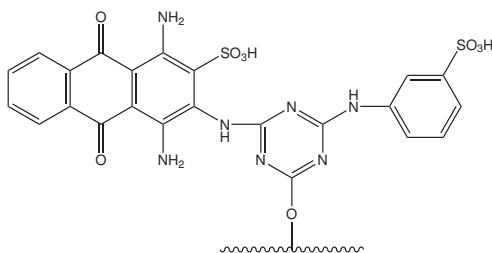
þeirra við sjúkdómsgreiningar, rannsóknir á samspili próteinsameinda og lyfjaprófanir [8].

Í algengasta formi gripgreiningar er griphópur (*affinity ligand*) kyrrsettur á óleysanlegt burðarefni sem pakkað er í súlu sem notuð er á svipaðan hátt og venjuleg krómátógrafíusúla. Munurinn liggur fyrst og fremst í því að í stað tiltölulega ósértækra hrifa (jónaskipti, vatnsfælin hrif) sem ráða tengingu og mismunalausun í krómátógrafíusúlum koma sértæk hrif milli griphóps og viðkomandi próteins.

Þó að fyrstu griphóparnir sem notaðir voru væru flestir byggðir í líkingu við hvarfefni, hindra eða kóensím og því oft einfaldir að gerð voru margir þeirra býsna notadrjúgir. Dæmi um slíkan hóp er benzamidín, sameind sem ber gúanidínóhóp og líkist því hliðarkeðju amínósýrunnar argíníns. Ensímið trypsin klippir peptíðkeðjur næst við argínín- eða lýsínleifar með því að bindast hvarfefninu fyrst um basíska hliðarkeðju argíníns eða lýsíns. Með sama hætti binast ensímið kyrrsettu bensamidíni, en skyld ensím eins og chymotrypsin, sem hefur annars konar bindiset og klippir prótein á öðrum stöðum binast ekki. Bensamidín griphópurinn nýtist því til að greina sundur tvö nauðalík prótein, sem annars yrðu ekki svo auðveldlega aðgreind. Annars konar griphópar voru síðan reyndir fyrir önnur prótein með oft ágætum árangri, t.d. lektín, mót efni og önnur sérhæfð bindiprótein. Stærri sameindir á borð við prótein hafa þó vissa ókosti, einkum hvað varðar stöðugleika við langa notkun og þol gagnvart hreinsun og sæfingu.

4. Gripgreining í lífefnavinnslu

Með tilkomu lífefnaiðnaðar varð hreinvinnsla lífefna í stórum stíl mikilvæg, ekki síst eftir að farið var að framleiða prótein til lækninga í erfðabreyttum lífverum. Í slíkri framleiðslu er af hagkvæmniástæðum mikilvægt að hreinvinnsluferlið sé samsett af sem fæstum vinnsluskrefum (*unit operations*). Því má ná fram með því að auka sértækni hvers skrefs. Gripgreining er eðlilega mjög sértæk og því notuð mjög víða í lífefnavinnslu. Sé ekki tiltækur heppilegur griphópur er stundum farin sú leið með arfbreytt prótein að tengja við genið kjarnsýruröð sem tjáir heppilegt gripsvæði (*affinity tag*). Hin arfbreytta lífvera tjáir þá samsett (*chimeric*) prótein og er viðbótarsvæðið notað til að veiða próteinið sem sóst er eftir. Í iðnaðarframleiðslu er þó oft óæskilegt að breyta

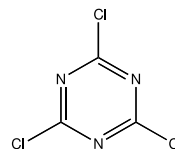


Mynd 2. Cibachron Blue bundið á burðarefni.

próteininu með þessum hætti því breytingin getur truflað eðlilega starfsemi þess.

5. Litunarefni í gripgreiningu

Litunarefni byggð á efnafræði þríklóróþríazíns (*cyanuric chloride*) voru tekin í notkun í textíliðnaði á sjötta áratugnum, einkum undir nöfnunum *Procion* og *Cibachron*. Kostir þessara litunarefna byggðust á því að þau bundust vefþráðum, til dæmis bómullarþráðum (sellulósa) samgildum tengjum og voru því fastari en eldri litunarefni sem bundust vefþráðunum einungis með ásogi. Efnafræði þríazíns gerði það auðvelt að tengja grunnsameindina ýmiss konar arómátískum og oft fjölhringja hópum sem voru mjög fjölbreyttir að lit. Með tilkomu sundurgreiningar próteina í hlaupsúnarsúlum á sjöunda áratugnum var farið að nota dextran með háan mólmasa og litað með litunarefninu Cibachron Blue (mynd 2) sem sporefni til að sýna feril sameinda gegnum súlur og mæla tómarúmmál (*void volume*) þeirra. Það vakti töluverða athygli þegar í ljós kom að kínasar (*kinases*), ensím sem hvetja flutning fosfathóps frá ATP á hvarfefni, bundust bláu dextrani með nokkuð sérhæfðum hætti [10, 11]. Þetta leiddi til þess að farið var að kanna önnur litunarefni með tilliti til hæfni þeirra til að bindast próteinum þannig að þau nýttust sem gríphópar og leiddi til þess sem nefnt er *dye affinity chromatography* [12]. Í mörgum tilvikum er talið að litunarefnin tengist ensímum um bindiset fyrir kóensím eins og ATP eða NADH enda líkindi með byggingu sumra litunarefna og þessara kóensíma. Þó er þetta ekki algilt og varð smám saman ljóst að gríphópur þurfti ekki nauðsynlega að vera af náttúrulegum toga eða að tengjast próteini um náttúrulegt bindiset, svo framarlega sem sameindakennslin voru nægilega sértæk og bindifastinn var af hæfilegri stærð. Það leiddi til þess að farið var að leita leiða til að sníða frá grunni gríphópa með æskilegum eiginleikum.



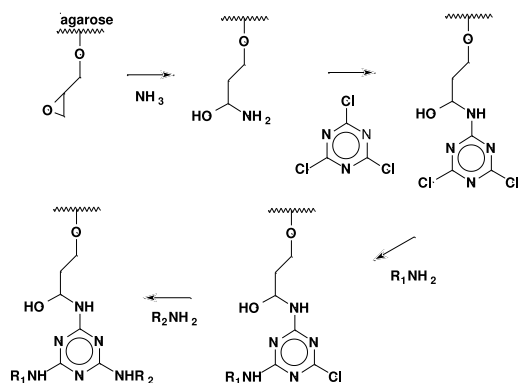
Mynd 3. Þríklóróþríazín eða *cyanuric chloride*. Tengja má prímer eða sekúnder amín við hringinn með skiptihvörfum þar sem farhópurinn er klórjón. Amín hvarfast við fyrstu stöðu við um 0°C, við aðra um 30°C og við þriðju um 80°C.

6. Æskilegir eiginleikar gripefna

Til að vera hæft til notkunar í gripgreiningu er gagnlegt að gripefnið, þ.e. burðarefni ásamt gríphópi, fullnægi vissum skilyrðum hvað varðar eiginleika: Burðarefnið þarf að vara óleysið, auðþakkað í súlu, ódýrt og efnafræðilega og mekanískt stöðugt. Ýmiss efni hafa verið notuð. Algengar eru ýmiss konar sykurefnafjölliður eins og agarósi og sellulósi, en einnig manngerðar fjölliður eins og akrýlfjölliður og stýrenfjölliður, kornað gler og fleira. Bæði burðarefni og gríphópur þurfa að þola þær aðstæður sem ríkja í hreinvinnslu iðnaðarpróteina og próteina til lækninga, þar á meðal hreinsunar- og sæfingaraðstæður, en oft eru notaðar sterkar lútarlausnir til þessara hluta. Gríphópurinn verður að vera fast bundinn svo hann ekki losni af burðarefninu og mengi próteinið sem verið er að hreinvinna. Bindirýmd (*capacity*) gripefnisins þarf að vera nægileg, og þarf helst að mælast í tugum milligramma próteins á hvern millilítra súlu-efnis en til þess þarf að vera hægt að kyrrsetja gríphópa með nægilegri þétni á burðarefnið. Bindifesta þarf að vera af hæfilegri stærð til að próteinið bindist sæmilega fast en sé jafnframt auðlosað frá burðarefninu. Hæfilegur bindifasti, mældur fyrir kyrrsettan gríphóp, er á bilinu 10^3 - 10^8 l mol⁻¹. Allt ferlið þarf að vera hagkvæmt og auðvelt og hægt að skala það upp í iðnaðarframleiðslu.

7. Efnafræði þríazíns og gríphópasníð á föstum fasa

Í kjölfar þess að þríazínlitarefni reyndust gagnlegir gríphópar fylgdu tilraunir til að endurbæta slíka hópa og mynda nýja á grundvelli þekkingar á bindistöðum á próteinum. Efnafræði þríazíns hentar vel til þess að tengja saman mismunandi virka hópa. Á mynd 3 má sjá þríklóróþríazínsameindina eða *cyanuric chloride*. Þetta er sex atóma arómátísk heterósýklisk sameind gerð af þrem kolefnisatómum og þrem nituratómum.



Mynd 4. Smíði þríazíngríphópa á föstum fasa. Agarósa-burðarefni hvarfast við epíklóróhýdrin og myndar epoxíð sem við hvörf með ammóníaki myndar frjálsan amínóhóp. Þríklóróþríazín hvarfast við amínóhópinn við 0°C. Tvö amín eru síðan látin hvarfast við þríazínhringinn, það fyrra við um 30°C en hið síðara við um 80°C. Með kerfisbundnu vali úr safni amína má fá fram safn gripfna, t.d. 100 mismunandi gríphópa með 10 mismunandi amínunum.

Klórátóm er tengt við hvert kolefnisatóm og þar liggur hvarfgirni sameindarinnar, m.a. gagnvart amínunum. Tengja má þrímer aða sekúnder amín við hringinn með skiptihvörfum þar sem farhópurinn er klórjón. Amín hvarfast við fyrstu stöðu við um 0°C, við aðra um 30°C og við þriðju um 80°C. Þessi mismunandi hvarfgirni gerir kleift að raða amínsamböndum inn á þríazínhringinn nánast að vild og skapa þannig sameindir með fjölbreytilega byggingu, svipaðar litunarfnum en valdar með tilliti til bindihæfni frekar en litar. Slíkar sameindir geta því borið margvíslega virka hópa í mismunandi afstöðu til hvers annars.

Heppilegast er að smíða slíka hópa á föstum fasa því það auðveldar og flýtir fyrir aðgreiningu milli-stigsefna. Einfalt er að láta eitt efni hvarfast á föstu yfirborði, skola síðan umframhvarfefnum burt í síu og láta næsta efni hvarfast og þannig koll af kalli. Mynd 4 sýnir hvernig gríphópur er byggður upp á agarósa-burðarefni. Nánari skýringar eru í myndatexta.

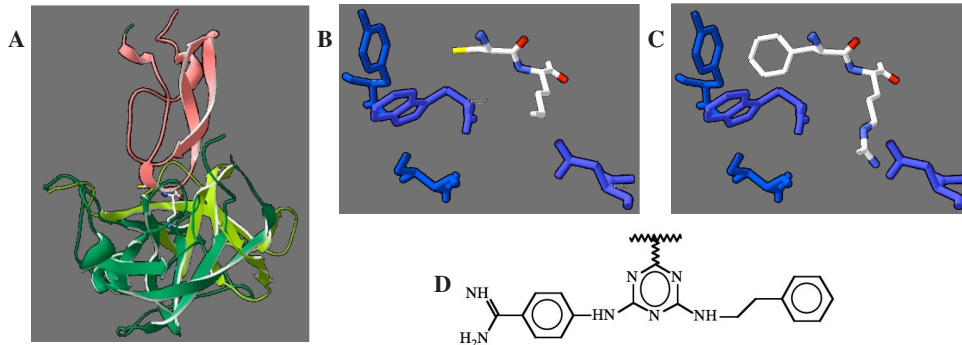
8. Notkun sameindalíkana við hönnun gríphópa

Þær miklu upplýsingar um byggingu fjölmargra próteina sem nú eru aðgengilegar frá Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) eru undirstaða þess að hægt er að skoða einstök prótein og finna á þeim hugsanlega bindistaði. Bankinn geymir upplýsingar um þrívíddarhnit einstakra atóma í

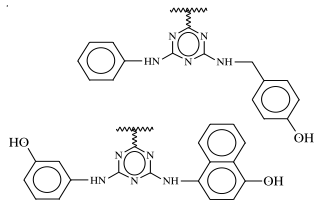
próteinsameindum, byggðar á rannsóknum á próteinkristöllum með röntgengeislagreiningu. Með sérstökum forritum (*molecular graphics*) er unnt að draga upp þrívíddarlíkan af viðkomandi próteinsameind, skoða einstaka mögulega bindistaði á próteininu og máta við hugsanlega gríphópa (*docking*). Svipuð aðferðafræði hefur verið notuð við hönnun lyfja (til dæmis hindra fyrir tiltekin ensím) og er meginmunurinn sá að við lyfjahönnun er gerð krafa um meiri bindifestu en æskileg er fyrir gríphópa. Lyf þarf að bindast viðfangspróteini fastar og varanlegar en gríphópur sem þarf að vera hægt að losa frá próteininu með mildum aðferðum. Í lyfjaiðnaði hafa miklar vonir verið bundnar við uppgötvun nýrra lyfja með slembiefnasmíð (*combinatorial chemistry*) þar sem tiltölulega fá hvarfefni eru samtengd með mismunandi hætti til að fá fram þúsundir nýrra efna til virkniprófunar.

Fyrsta stig í svokallaðri lífherminni (*biomimetic*) smíði gríphópa á grunni þríazíns felst í því að kanna þrívíddarlíkan próteinsins. Ef til er líkan af próteininu í tengslum við annað prótein eða bindihóp, hvarfefni, hindra eða áhrifsefni (*allosteric effector*) getur það auðveldað verkið mjög því að þá er unnt að herma eftir náttúrulegum sameindakennslum með einhverjum hætti. Að öðrum kosti verður að styðjast við frjálsa hönnun gríphóps byggða á þekkingu hönnuðar á því hvernig sameindakennsl eru í náttúrunni. Í báðum tilvikum má hafa not af prófunarforritum (*docking*) til að máta gríphópa við próteinið og meta bindigetun og bindifestu. Í þeim dæmum sem lýst verður hér á eftir er um að ræða peptíðahermun (*peptidomimetics*) þar sem gríphópar eru smíðaðir sem líkja eftir tilteknu peptíði sem tekur þátt í sameindakennslum milli tveggja próteina.

Að lokinni frumhönnun gríphóps er hann ásamt ýmsum tilbrigðum við hann smíðaður með slembiaðferð á agarósa-burðarefni. Lítið slembisafn líkra gríphópa, gjarnan nokkrir tugir hópa, er þannig myndað. Frumathuganir á bindihæfni hvers bindiefnis eru gerðar, til dæmis í 0,5 - 1,0 ml örsúlum. Með þeim hætti má á stuttum tíma finna hvort tiltekinn gríphópur bindur viðkomandi prótein eða ekki og ef hann bindur, hversu auðvelt er að losa próteinið af gripsúlunni aftur. Ef niðurstöður eru neikvæðar er hönnunin endurtekin og endurbætt og nýir gríphópar smíðaðir, að öðrum kosti er valinn sá hópur eða hópar sem líklegastir eru, smíðaðir í meira magni og þaulprófaðir í stærri súlum við raunaðstæður.



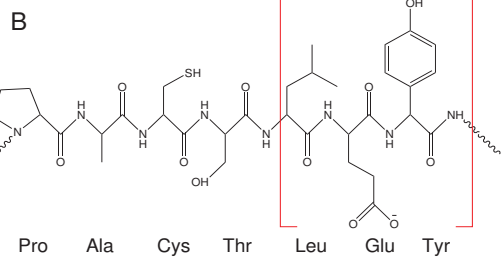
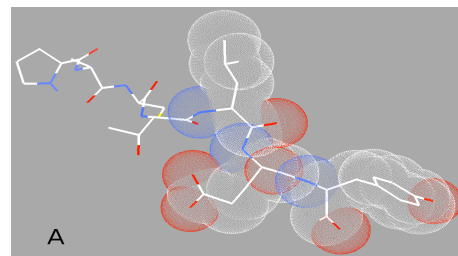
Mynd 5. A: Borðalíkan af þrívíddarbyggingu ensímsins kallikreins í tengslum við próteinhindra (bovine pancreatic trypsin inhibitor); **B:** helstu aminosýrur ensíms (blár litur) og hindra (hvítur litur, bláir N-hópar, rauðir O-hópar, gulur þróllhópur) sem taka þátt í tengingu próteinanna tveggja; **C:** líkan þar sem fenólhópur er settur í stað þróllhóps í hindranum til að bæta tenginguna við vatnsfælinn vasa í ensíminu; **D:** gríphópur sem líkir eftir tengihluta hindrans.



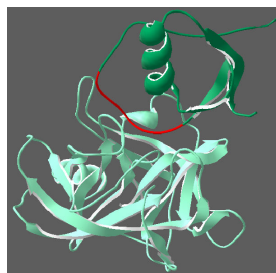
Mynd 6. Gríphópar hannaðir í líkingu við Prótein A úr *S. aureus* til að binda immunoglobulín G.

9. Peptíðhermun – nokkur dæmi

Ofangreind aðferðafræði var notuð af vísindamönnum við Cambridgeháskóla til að smíða gríphóp fyrir ensímið kallikrein [13]. Þetta ensím er einn próteinasa sem kljúfa kínínogen og mynda kínín og tekur einnig þátt í blóðstorknun. Kallikreinensím eru m.a. rannsókuð sem mögulegir *biomarkers* fyrir krabbamein. Þrívíddarbygging kallikreins er þekkt og einnig bygging complex þess með trypsinhindra úr nautabrisi (*pancreatic trypsin inhibitor*) (mynd 5). Hvarfstöð

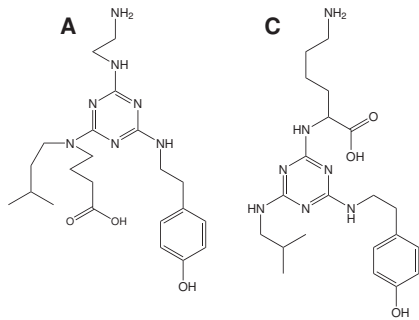


Mynd 8. A: Líkan af þrívíddarbyggingu heptapeptíðs snertiflata hindra við ensím. **B:** Byggingarformúla sama peptíðs. Á báðum myndum er þrípeptíðið Leu-Glu-Tyr sem tekið var til hermunar auðkennt sérstaklega.



Mynd 7. Borðalíkan af byggingu ensímsins elastasa úr hvítum blóðkornum í tengslum við próteinhindra (*turkey ovomucoid inhibitor – domain 3*); heptapeptíð úr byggingu hindrans sem myndar tengingu við ensímið er litað rautt.

kallikreins er lík ýmsum öðrum skyldum próteinös-um og í botni hennar er neikvætt hlaðin aspartatleif (S1 samkvæmt venjulegri merkingu próteinasa). Á móti henni kemur P1-leif hindrans sem er lýsín en þegar um hvarfefni er að ræða er vitað að ensímið kys heldur aminosýruna argínín á þessum stað. Næsta aminosýra á hindranum er systein í stöðu P2 en vit- að er að kallikrein kys heldur rúmfrekan vatnsfælinn hóp á þessum stað því að á ensíminu er vatnsfælinn fleyglaga vasi sem myndast af aminosýrunum tryptofan-215 og týrósín-99. Með það í huga að skipta út þessum aminosýrum var hannaður gríphópur

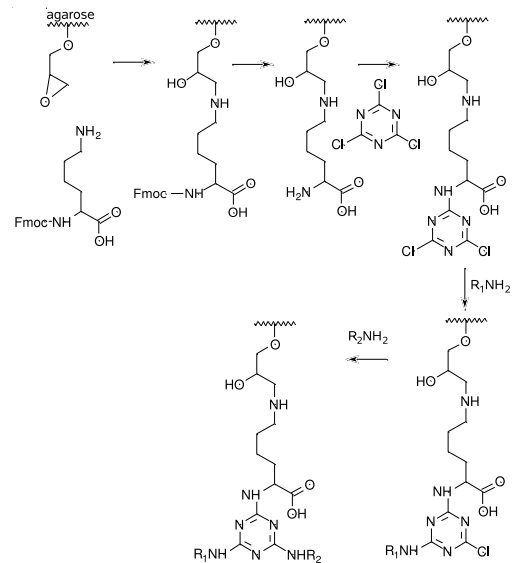


Mynd 9. Tvær hugsanlegar gerðir gríphópa sem fullnægja því skilyrði að hafa leucínlíkan hóp, karboxýlhóp og fenólhóp. Amínóhópur sem snýr upp á myndinni er sá hópur sem tengjast mundi burðarefninu.

sem sýndur er á mynd 5 og reyndist hafa heppi-lega bindifestu og góða sérhæfni. Í þessu tilviki tilheyrði þrívíddarbyggingin sem farið var eftir komplex ensímsins með trypsinhindra en ekki sérhæfðu bindi-próteini fyrir kallikrein. Þrátt fyrir það gaf góða raun að styðjast við þessa byggingu þó að laga þyrfti hönnunina að því sem vitað var um hvarfstöð ensímsins út frá annars konar tilraunum, nefnilega sérhæfni þess gagnvart hvarfefnum.

Annað dæmi um peptíðhermun frá sömu rannsóknastofu er smíði gríphóps fyrir mótefni, immúnóglóbúlín G (IgG) [14]. Velþekkt bindi-prótein fyrir IgG er prótein A úr bakteríunni *Staphylococcus aureus* (SpA). Prótein A er mikið notað sem gríphópur fyrir IgG en hefur sömu annmarka og önnur prótein að vera óstöðugt við hreinsunar- og sæfingarastæður sem gripefni þurfa að þola við framleiðsluastæður. IgG eru hins vegar mjög mikilvæg iðnaðarprótein þar eð mótefni, ekki síst einstofna mótefni, eru einn helsti vaxtarbroddur í lyfjaframleiðslu (svokölluð "líftækni-lyf"). Þrívíddarbygging Fc-hluta IgG í komplex með B-hnykli (*B-domain*) SpA er þekkt [15]. Próteinin tvö snertast á fremur stóru svæði, um 400 \AA^2 og um 32 amínósýrur taka þátt í tengingunni en tengingin er að meginstofni til vatnsfælin. Við könnun á byggingu komplexins var valið að líkja eftir tveim amínósýrum á SpA sem tengjast inn í grunnan vatnsfælinn vasa á IgG. Niðurstaðan varð gríphóparnir tveir á mynd 6.

Seinni gríphópurinn, með kyrrsetningarpéttni 15 mmól á gramm burðarefnis, hafði bindirýmdina 20 mg próteins á gramm burðarefnis, bindifasta $10^5 - 10^6 \text{ l mol}^{-1}$ og er honum var beitt til að hreinvinna IgG úr nautgripaplasmu fékkst prótein sem var 98% hreint IgG.

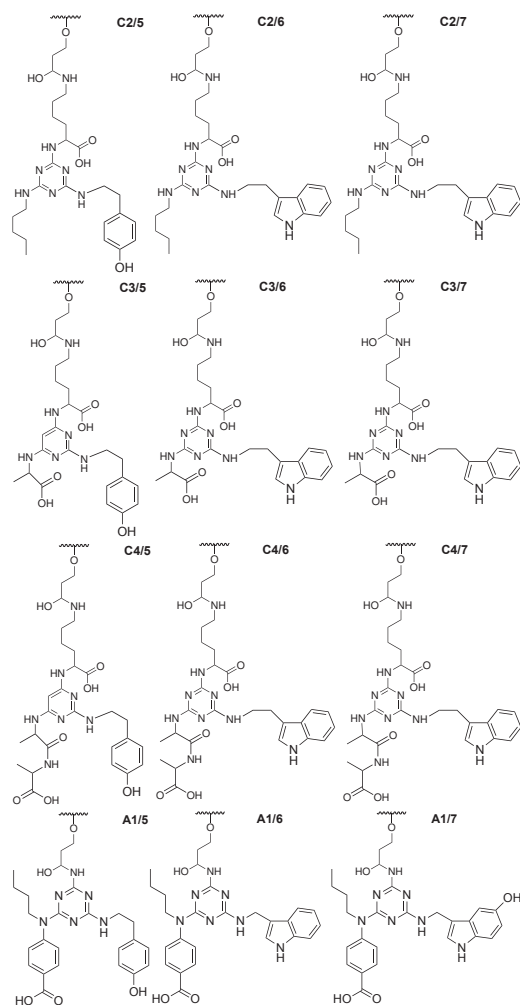


Mynd 10. Smíði gríphópa af C-gerð. Byrjað er á því að festa amínósýruna lýsín sem er Fmoc-varin á α -amínóhópnum til þess að einungis ϵ -tenging eigi sér stað (Fmoc=9-Fluorenylmethoxycarbonyl).

10. Gríphópur fyrir elastasa - hönnun, smíði og prófun

Þriðja dæmið um peptíðhermun er verkefni unnið að hluta í Cambridge og að hluta við Raunvísindastofnun Háskólans [16]. Þó ágætir gríphópar hafi verið þekktir fyrir sérínpróteinasana trypsin og chymotrypsin var svo ekki í tilviki elastasa. Skýringin var að elastasi klýfur peptíðtengi næst einföldum amínósýrum eins og leucíni og hliðarkeðjur þeirra virka ekki vel sem gríphópar. Til að komast framhjá þessum vanda var beitt peptíðhermun. Þrívíddarbygging elastasa er þekkt og einnig bygging elastasa í komplex með próteinhindra, OMTKY-3 (*turkey ovomucoid third domain*) (mynd 7) [17]. Snertiflötur þessara tveggja próteina er um 7 amínósýrur, heptapeptíð (mynd 8), á hindranum, sem fellur inn í hvarfstöð ensímsins. Valið var að líkja eftir þessu svæði fremur en einhverju svæði á yfirborði ensímsins vegna þess að elastasar hafa mismnandi yfirborðseinkenni en hvarfstöðv-arsvæðið er svipað í þeim öllu. Gríphópur sem líkir eftir hvarfstöðvartengingu hindrans er því líklegri til að binda annars ólíka elastasa.

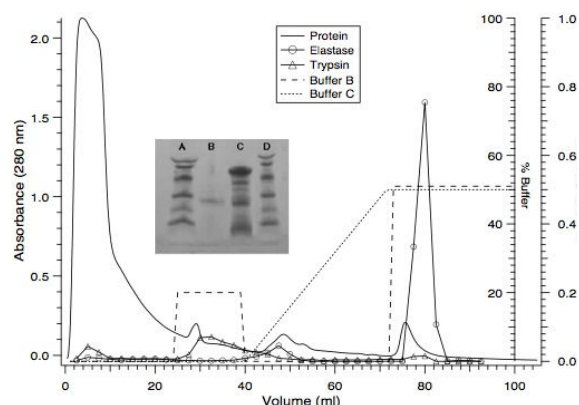
Þrípeptíð var valið til hermunar. P1-leifin er leusín sem fellur að sérhæfnisseti ensímsins, P1'-leifin glútamat í OMTKY er aðili að vetnistengi en gæti tengst asparagínleif á ensíminu og P2'-leifin vís-



Mynd 11. Safn 12 gríphópa sem smíðaðir voru. Amínin í R1 stöðu voru 4-(butýlamínó)benzósýra, pentýlamín, alanín og alanýlalanín. Amínin í R2 stöðu voru týramín, tryptamín og 5-hýdroxytryptamín.

ar á ísóleusín leif á ensíminu. Þetta benti til að smíða nætti gríphóp sem bæri eftirfarandi einkenni: Leusínlíkan hóp, karboxýlhóp og fenól eða týrósínhóp.

Mynd 9 sýnir tvo hugsanlega gríphópa sem fullnægja þessum skilyrðum. Hóp af gerð A má smíða eins og mynd 4 sýnir. Þar er epoxýhópur á burðarefninu látinn hvarfast við ammoníak og mynda amínóhóp sem þríklórþríazín getur síðan tengst við. Bæði leusínlíkur hópur og karboxýlhópur eru fengnir með tengingu við sekúndert amín en fenólhópur eða týrósínhópur með tengingu við þrímert amín með arómatískan hóp. Hóp af gerðinni C má smíða með því að



Mynd 12. Hreinvinnsla elastasa úr útráttarlausn úr svínabrisi með gripgreiningu á gríphóp C4/6. Útráttarlausn í buffer er hlaðið á gripgreiningarsúluna og hún skoluð með sama buffer til að losna við prótein sem ekki bindast. Saltlausn er dælt um súluna (strikalína), þá tekur við stigull eþýlenglýkóls (punktalína) og loks saltlausn aftur. Elastasi (opin tákn) losnar í viðurvist salts og eþýlenglýkóls. Innfellt rafráttarmynstur: A og D: Mólmassastaðlar. C: Útráttarlausn. B: Elastasalosunartoppur.

nota α -verndað lýsín í stað ammoníaks en það leggur þá jafnframt til karboxýlhópinn og verður millistykki (*e. spacer*) sem færir gríphópin lengra frá burðarefninu (mynd 10). Hinir hóparnir tveir fást síðan með tengingu við þrímert amín.

Lítið slembisafn gríphópa var smíðað (mynd 11). Til að prófa bindigetu gripefnanna var hvert þeirra sett í 1 ml súlu og fersk útráttarlausn úr svínabriskirtli í buffer var sett á súlurnar. Þær voru síðan skolaðar með buffer, natríumklóríðlausn í buffer (til að losa um salttengi), eþýlenglýkóllausn (til að losa um vatnsfælnitengi) og loks með lausn er innihélt bæði salt og eþýlenglýkól í buffer. Hugmyndin var að gríphópur sem bundinn væri ensíminu um bæði salttengi (um karboxýlhópin) og vatnsfælin tengi (um leusínlíka hópinn og fenól/týrósín hópinn) mundi einungis láta ensímið laust ef báðar tegundir tengja væru rofnar samtímis. Gríphóparnir reyndust allir binda ensímið allvel en létu það laust með mismunandi hætti (niðurstöður ekki sýndar).

Gríphópurinn C4/6 var valinn til frekari skoðunar. Mynd 12 sýnir tilraun til hreinvinnslu elastasa úr svínabrisi á stærri súlu sem hlaðin var gripefni C4/6. Súlan reyndist binda ensímið með sérvirkum hætti og losa það einungis við skolun með lausn sem innihélt bæði eþýlenglýkól og salt (sjá myndatexta). Kyrrsettir

griphópar voru 25 $\mu\text{mol/g}$ af burðarefni, bindirýmd var 21 mg/g, bindifasti var $1,7 \times 10^4 \text{ l mol}^{-1}$, hreinsun var 19,4-föld og hreinleiki próteinsins 90%.

Samskonar tilraunir með gripefni C4/5 sýndu að það gripefni hentaði til að vinna elastasa úr útdráttarlausn úr skúflöngum þorsks. Hreinsun ensímsins var í þessu tilviki 34,4-föld og ensímið nánast fullhreinsað.

11. Niðurlag

Hér hefur verið stiklað á stóru um hagnýtingu þekkingar á sameindakennslum í gripgreiningu lífefna. Þau dæmi um smíði lífherminna griphópa sem lýst var sýna að með því að beita tiltölulega einfaldri efnafraði ásamt þekkingu á þrívíddarbyggingu próteina og tengslum þeirra við önnur prótein má smíða sér nothæf tæki til hreinvinnslu þessara próteina. Rökvis lífhermin hönnun efnasambanda með hjálp sameindagrafískra tölvuforrita ásamt þægilegri og skilvirkri efnasmíðaraðferð er hægkvæm leið til að fá fram griphópa til nota í lífefnatekni og lífefnavinnslu.

Heimildir

- [1] Knox, J.R. and R.F. Pratt, Different Modes of Vancomycin and D-Alanyl-D-Alanine Peptidase Binding to Cell-Wall Peptide and a Possible Role for the Vancomycin Resistance Protein. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1990, **34**(7), p. 1342-1347.
- [2] Koshland, D.E., The Key-Lock Theory and the Induced Fit Theory. *Angewandte Chemie-International Edition*, 1995, **33**(23-24), p. 2375-2378.
- [3] Cesareni, G., et al., Comparative interactomics. *FEBS Letters*, 2005, **579**(8), p. 1828-1833.
- [4] Cuatrecasas, P., M. Wilchek, and C.B. Anfinsen, Selective Enzyme Purification by Affinity Chromatography. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1968, **61**(2) p. 636-643.
- [5] Lerman, L.L., A Biochemically Specific Method for Enzyme Isolation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1953, **39**(4): p. 232-236.
- [6] Arsenis, C. and D.B. McCormick, Purification of Liver Flavokinase by Column Chromatography on Flavin-Cellulose Compounds. *The Journal of Biological Chemistry*, 1964, **239**(9), p. 3093-3097.
- [7] Arsenis, C. and D.B. McCormick, Purification of Flavin Mononucleotide-dependent Enzymes by Column Chromatography on Flavin Phosphate Cellulose Compounds. *The Journal of Biological Chemistry*, 1966, **241**(2), p. 330-334.
- [8] Wilchek, M., My life with affinity. *Protein Science*, 2004, **13**(11), p. 3066-3070.
- [9] Lowe, C.R. and P.D.G. Dean, *Affinity Chromatography*. 1974, London: John Wiley and Sons.
- [10] Kopperschlager, G., et al., Some kinetic and molecular properties of yeast phosphofructokinase. *FEBS Letters*, 1968, **1**(3), p. 137-141.
- [11] Haeckel, R., et al., Purification and allosteric properties of yeast pyruvate kinase. Hoppe-Seyler's. *Z. Physiol Chem*, 1968, **346**, p. 699-714.
- [12] Dean, P. and W. DH, Protein purification using immobilized triazine dyes. *J Chromatogr*, 1979, **165**(3), p. 301-319.
- [13] Burton, N.P. and C.R. Lowe, Design of Novel Affinity Adsorbents for the Purification of Trypsin-like Proteases. *J Molecular Recognition*, 1992, **5**, p. 55-68.
- [14] Li, R., et al., Design, synthesis and application of a Protein A mimetic. *Nature Biotechnology*, 1998, **16**, p. 190-195.
- [15] Deisenhofer, J., Crystallographic Refinement and Atomic Models of a Human Fc Fragment and Its Complex with Fragment-B of Protein-a from *Staphylococcus-Aureus* at 2.9-Å and 2.8-Å Resolution. *Biochemistry*, 1981, **20**(9), p. 2361-2370.
- [16] Filippusson, H., L.S. Erlendsson, and C.R. Lowe, Design, synthesis and evaluation of biomimetic affinity ligands for elastases. *J Molecular Recognition*, 2000, **13**(6), p. 370-381.
- [17] Bode, W., et al., X-Ray Crystal-Structure of the Complex of Human-Leukocyte Elastase (Pmn Elastase) and the 3rd Domain of the Turkey Ovomuroid Inhibitor. *Embo Journal*, 1986, **5**(10), p. 2453-2458.

Summary: This article deals briefly with the principles of molecular recognition and their application to different tasks, in particular to affinity separations. The origins of affinity technology and the development of affinity ligands are reviewed, especially with respect to the use of molecular models. Finally some examples are given of the synthesis and development of affinity ligands based on the chemistry of trichlorotriazine.

Um höfundinn: Hörður Filippusson lauk BSc prófi í lífefnafræði frá Háskólanum í St. Andrews í Skotlandi árið 1968 og PhD prófi frá sama skóla árið 1971. Hann er prófessor í lífefnafræði við raunvísindadeild Háskóla Íslands.

Hörður Filippusson
Raunvísindastofnun Háskólans, Lífefnafræðistofa
Dunhaga 3, 107 Reykjavík

hfil@hi.is
Móttékin: 19. febrúar 2008