

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO – BIOKEMIJSKI FAKULTET

Nina Fekonja i Helena Goričanec

**Izolacija membranskih proteina pomoću detergenta Tritona X-114
u svrhu analize njihove N-glikozilacije**

Zagreb, 2014.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju
Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc.
dr. sc. Olge Gornik i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u
akademskej godini 2013/2014.

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 1.1 Glikoproteini i glikozilacija | 1 |
| 1.2 Važnost glikozilacije..... | 3 |
| 1.3 Metode za izolaciju membranskih (gliko)proteina i analizu N-vezanih glikana | 3 |
| 2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA..... | 6 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 7 |
| 3.1 MATERIJALI..... | 7 |
| 3.1.1 Soli, kiseline, lužine | 7 |
| 3.1.2 Organske kemikalije..... | 7 |
| 3.1.3 Biološki materijal | 8 |
| 3.1.4 Otopine i puferi | 9 |
| 3.1.5 Pribor | 11 |
| 3.1.6 Laboratorijska oprema..... | 11 |
| 3.2 METODE..... | 12 |
| 3.2.1 Priprema otopine Tritona X-114..... | 12 |
| 3.2.2 Frakcioniranje proteina prema hidrofobnosti pomoću Triton-a X-114..... | 12 |
| 3.2.3 Pročišćavanje proteina pomoću 3 kDa centrifugalnih filtera | 13 |
| 3.2.4 Taloženje proteina | 13 |
| 3.2.4.1 Taloženje proteina acetonom..... | 13 |
| 3.2.4.2 Taloženje proteina kombinacijom otapala kloroform/metanol/voda..... | 13 |
| 3.2.4.3 Taloženje proteina kombinacijom otapala aceton/metanol | 14 |
| 3.2.5 Otpuštanje N-vezanih glikana | 14 |
| 3.2.5.1 Priprema uzorka | 14 |
| 3.2.5.2 Denaturacija | 14 |
| 3.2.5.3 Deglikozilacija | 14 |
| 3.2.6 Obilježavanje glikana..... | 15 |
| 3.2.6.1 Priprema otopine 2-AB-a za obilježavanje..... | 15 |
| 3.2.6.2 Obilježavanje uzoraka s 2-AB | 15 |
| 3.2.7 Pročišćavanje obilježenih glikana | 15 |
| 3.2.7.1 Priprema GHP pločice..... | 15 |

| | | |
|---------|---|----|
| 3.2.7.2 | Pročišćavanje N-glikana obilježenih 2-AB-om | 16 |
| 3.2.7.3 | Elucija N-glikana obilježenih 2-AB-om | 16 |
| 3.2.8 | SDS-PAG elektroforeza | 16 |
| 3.2.9 | Analiza glikana HILIC tehnikom | 17 |
| 4. | REZULTATI..... | 18 |
| 5. | RASPRAVA | 26 |
| 6. | ZAKLJUČCI..... | 28 |
| 7. | ZAHVALE..... | 29 |
| 8. | POPIS LITERATURE | 30 |
| 9. | SAŽETAK | 32 |
| 10. | SUMMARY | 34 |
| 11. | ŽIVOTOPISI..... | 36 |

POPIS SLIKA:

| | |
|---|----|
| <i>Slika 1: Tri glavne skupine N-vezanih glikoproteina [6]</i> | 2 |
| <i>Slika 2: Struktura molekule Tritona X-114</i> | 4 |
| <i>Slika 3: Kromatogram N-glikana dobivenih pročišćavanjem i precipitacijom proteina spin filterima iz uzoraka (aliquot od 100 µl) s različitom količinom THP stanica</i> | 18 |
| <i>Slika 4: Kromatogram N-glikana dobivenih precipitacijom membranskih proteina acetonom (zeleno) i usporedba s N-glikanima solubilnih proteina (crveno).</i> | 20 |
| <i>Slika 5: Kromatogram N-glikana dobivenih precipitacijom membranskih proteina organskim otapalom kloroform/metanol (ljubičasto) i usporedba s N-glikanima solubilnih proteina (zeleno).</i> | 21 |
| <i>Slika 6: Kromatogrami N-glikana otpuštenih s membranskih proteina THP stanica nakon različitih metoda precipitacije proteina: aceton (plavo), kloroform/metanol (zeleno), aceton/metanol (crveno)</i> | 22 |
| <i>Slika 7: Kromatogrami N-glikana dobivenih precipitacijom membranskih proteina kombinacijom organskih otapala kloroform/metanol s različitom početnom količinom stanica (10⁶ stanica - crveno, 4 x 10⁶ stanica - zeleno, 10⁷ stanica - plavo, 2.4 x 10⁷ stanica - ružičasto).</i> | 23 |
| <i>Slika 8: Usporedba kromatograma N-glikana otpuštenih s proteina iz tritonske faze (membranski proteini, crveno) i solubilne faze (zeleno) dobivenih precipitacijom pomoću kloroform/metanola</i> | 24 |
| <i>Slika 9: Gel elektroforeza proteina dobivenih precipitacijom organskim otapalima (Raspored uzoraka definiran je u Tablica 8).</i> | 25 |

POPIS TABLICA:

| | |
|--|----|
| <i>Tablica 1: Popis korištenih anorganskih kemikalija i proizvođači</i> | 7 |
| <i>Tablica 2: Popis korištenih organskih kemikalija i proizvođači</i> | 7 |
| <i>Tablica 3: Popis korištenog biološkog materijala i proizvođači</i> | 8 |
| <i>Tablica 4: Popis korištenih pufera i otopina i način pripreme</i> | 9 |
| <i>Tablica 5: Popis korištenog pribora i proizvođači</i> | 11 |
| <i>Tablica 6: Popis laboratorijske opreme i proizvođači</i> | 11 |
| <i>Tablica 7: Omjer otapala korištenih za gradijentni protok u analizi glikana tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti</i> | 17 |
| <i>Tablica 8: Raspored uzoraka nanesenih na gel za elektroforezu s vrstom frakcije, metodom precipitacije i količinom stanica (T-tritonska frakcija, S-solubilna frakcija, AC-aceton, A/M-aceton/metanol, K/M-kloroform/metanol)</i> | 25 |

1. UVOD

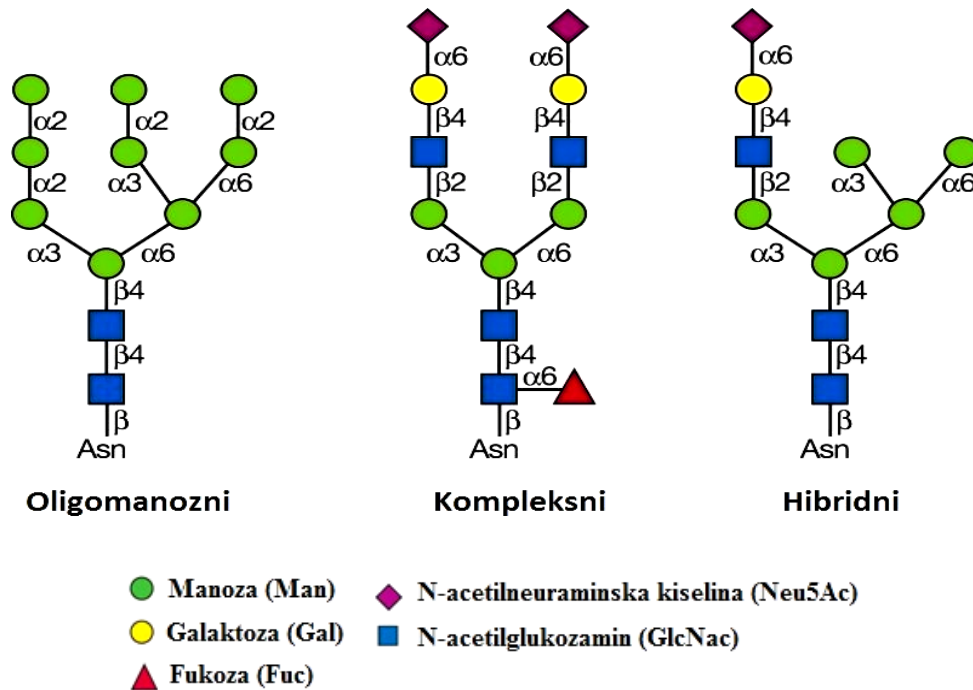
1.1 Glikoproteini i glikozilacija

Glikobiologija je relativno nova grana znanosti koja se bavi proučavanjem glikana odnosno glikokonjugata. U zadnje vrijeme njezin razvoj eksponencijalno raste te joj se pridaje sve veći značaj. Veliki interes za glikoproteine potaknula je činjenica da je većina membranskih, a i citoplazmatskih proteina glikozilirana. Danas znamo da je pravilna glikozilacija proteina ključna za njihove brojne zadaće, poput staničnog signaliziranja, međusobnog prepoznavanja stanica, pravilnog smatanja proteina i sprečavanja njihove razgradnje [5][6].

Glikoproteini su proteini koji na aminokiselinskim ostacima imaju kovalentno vezane oligosaharide, a proces kojim nastaju je glikozilacija. Glikozilacija je visokospecifična posttranslacijska modifikacija katalizirana različitim enzimima iz skupine glikoziltransferaza. Postoje dvije glavne skupine glikoproteina: N-vezani i O-vezani. Glavna razlika među njima je mjesto vezanja oligosaharidnog lanca, kao što i samo ime govori, pa je kod N-vezanih glikoproteina oligosaharidni lanac vezan na dušikov atom bočnog ogranka aminokiseline asparagin, dok se kod O-vezanih veže na kisikov atom bočnog ogranka serina ili treonina. Osim u mjestu vezanja oligosaharidnog lanca glikoproteini se razlikuju i u mjestu i procesu sinteze [5].

Sinteza N-vezanih glikoproteina započinje na membrani endoplazmatskog retikuluma vezanjem oligosaharidnog prekursora na još nedovršene proteine. Takvi proteini, koji će biti glikozilirani, prenose se u toku translacije na membranu ER pomoću signalnog slijeda koji se odmah zatim uklanja. Razgranata struktura oligosaharidnog prekursora sastoji se od tri glukoze, devet manosa i dva N-acetilglukozamina te je vezana za unutrašnju stranu membrane ER preko lipidnog nosača dolikol-fosfata. Uklanjanjem signalnog slijeda s proteina oligosaharid se, posredovanjem enzima oligosaharil transferaze, prebacuje s dolikol-fosfata na bočni lanac asparagina. Bitno je istaknuti da je jedino slijed Asn-X-Thr/Ser supstrat za ovu reakciju (X je bilo koja aminokiselina osim prolina), no nisu svi takvi sljedovi glikozilirani i ne može se iz slijeda aminokiselina pretpostaviti koji će od njih biti glikozilirani. Nakon što je oligosaharid prenesen na protein slijede daljnje modifikacije u nekoliko koraka; u endoplazmatskom retikulumu uklanjaju se tri glukoza i jedan manozni ostatak, a daljnja obrada odvija se u Golgijevu aparatu dodavanjem i oduzimanjem šećernih jedinica. Različitim kombinacijama i dodatnim grananjem ugljikohidratnih jedinica

omogućena je velika raznolikost glikoproteina, no, općenito, N-vezane glikane možemo svrstati u 3 glavne skupine: oligomanozni, kompleksni i hibridni tip (Slika 1).



Slika 1: Tri glavne skupine N-vezanih glikoproteina [6]

Oligomanozni tip N-glikana rezultat su ograničenog uklanjanja manoznih i glukoznih ostataka s oligosaharidnog prekursora $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. Kompleksni tip je najčešći, a karakterističan je po tome što su α -3- i α -6-vezane manoze supstituirane N-acetilglukozaminom na koji su dalje vezani drugi šećeri. Hibridni tip je kombinacija prva dva tipa N-glikana, kod kojeg dolazi do procesiranja samo α -1,3- manozne grane, dok α -1,6-grana ostaje nesupstituirana [5][6][7].

Za razliku od N-vezanih glikoproteina, sinteza O-vezanih odvija se samo u Golgijevu aparatu i to dodavanjem pojedinačnih monosaharidnih jedinica na već dovršene polipeptidne lance. Obično nisu jako razgranati i sastoje se od nekoliko monosaharidnih jedinica [5].

Glikoproteine karakterizira velika raznolikost koja proizlazi iz različitosti šećernih komponenti koje se vežu na proteine, ali i iz velikog broja mjesta vezanja istih.

1.2 Važnost glikozilacije

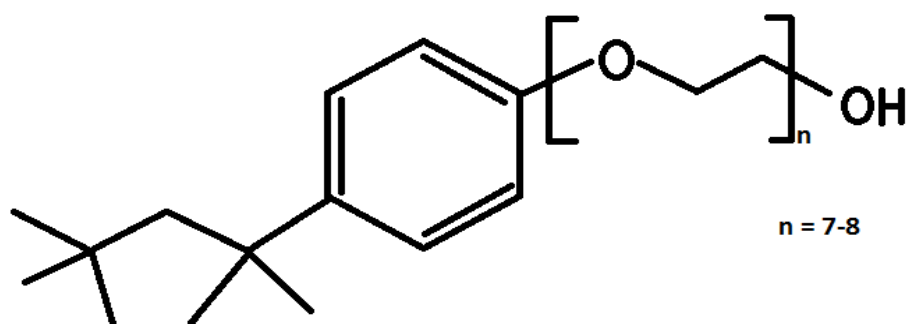
Glikozilacija je najčešća posttranslacijska modifikacija što upućuje na njezinu veliku ulogu. Za razliku od aminokiselina i nukleotida koji se vežu u linearne lance, ugljikohidrati mogu stvarati razgranate strukture čime se eksponencijalno povećava raznolikost takvih molekula. Pravilna glikozilacija ključna je za pravilno smatanje proteina, povećanje stabilnosti nekih proteina, staničnu signalizaciju te usmjeravanje proteina unutar stanice. Kod membranskih glikoproteina posebno je važna velika raznolikost u strukturi koja je posljedica različitih kombinacija vezanja šećera i specifičnost mjesta vezanih glikana budući da oni posreduju u međustaničnom prepoznavanju i adheziji stanica, prepoznavanju receptora te vezanju za receptore. Također, neki glikoproteini na staničnoj površini mogu inducirati imunološku reakciju [7].

Važnost glikozilacije proizlazi i iz činjenice da glikanske strukture u organizmu variraju ovisno o trenutnoj razini ekspresije i intracelularne lokalizacije biosintetskih enzima, važnih u procesima glikozilacije. Prema tome, mnogi glikoproteini se u različitim bolestima mogu koristiti kao važni dijagnostički i prognostički biljezi [4].

1.3 Metode za izolaciju membranskih (gliko)proteina i analizu N-vezanih glikana

Izolacija proteina iz stanične membrane je kompliciran proces. Membranski proteini imaju amfipatski karakter te su zbog toga slabo topljivi u vodenim otopinama, a većina metoda je razvijena upravo za izolaciju u vodi topljivih proteina. Osim hidrofobnog karaktera, sljedeći problem je mala koncentracija membranskih proteina u odnosu na citoplazmatske [13]. Do sada postoji nekoliko metoda izolacije membranskih proteina, primjerice solubilizacija membranskih proteina pomoću 90% mravlje kiseline [16], zatim solubilizacija sa 60% metanolom [17][18] te primjena ionskih i neionskih detergenata [19][20]. Jedna od jednostavnijih metoda izolacije je pomoću detergenta Tritona X-114. Pogodna je zbog relativno niske cijene, jednostavnog uklanjanja surfaktanta te niske toksičnosti [13]. Triton X-114 ili polioksietilen monooktilfenil eter je neionski detergent (Slika 2). Razrijeđena otopina Tritona X-144 je homogena pri 0°C, ali se kod temperatura viših od 20°C odvaja na vodenu fazu i fazu bogatu detergentom. Zapravo se radi o točki zamućenja i ona za ovaj detergent iznosi 23°C. Triton X-114 se koristi za odvajanje hidrofилnih i hidrofobnih proteina nakon razaranja stanice [2]. Integralne membranske proteine karakteriziraju hidrofobne domene koje su u interakciji s hidrofobnim dijelom membranskog dvosloja lipida. Prilikom razaranja stanica neionski detergent zamjenjuje membranske lipide i

stvara micelle s integralnim proteinima membrane. Hidrofilni proteini ne stupaju u interakciju s detergentom pa se kod povišenja temperature odvajaju u vodenu fazu. Temperatura kod koje dolazi do stvaranja micela ovisi o broju hidrofilnih oksietilen jedinica koje su kondenzirane s hidrofobnim oktilfenilnim ostatkom. Pretpostavlja se da se na taj način membranski proteini mogu odvojiti od hidrofilnih staničnih proteina. Iznad temperature kod koje dolazi do zamućenja otopine, odnosno stvaranja micela, dolazi do odvajanja hidrofilne faze, a faza bogata detergentom, koja sadrži hidrofobne membranske proteine, pročišćava se do konačne izolacije čistih membranskih proteina [1].



Slika 2: Struktura molekule Tritona X-114

Za izolaciju membranskih proteina korištene su THP-1 stanice. To su ljudske stanice, monociti izolirani iz periferne krvi jednogodišnjeg muškog djeteta koje boluje od akutne monocitne leukemije. Njima nedostaju površinski i citoplazmatski imunoglobulini. Karakteristika im je da mogu povećati količinu CO₂ kod fagocitoze i mogu se diferencirati u makrofazima slične stanice pomoću DMSO [3].

Budući da se za analizu koriste samo N-glikani, a ne cijeli glikoproteini, treba provesti proces deglikozilacije. To se radi s enzimom PNGaza F. Međutim, obavezno se prije dodatka samog enzima dodaje Igepal koji je neionski detergent da bi neutralizirao SDS, koji je kationski detergent (korišten u postupku denaturacije proteina). Time je osigurano da neće doći do denaturacije enzima. Dobiveni N-glikani nemaju kromofore i ne bi ih se moglo detektirati na kromatografskoj koloni, oni se prije analize obilježavaju s 2-AB otopinom.

Za kvalitativnu i kvantitativnu analizu glikana najčešće se kao metoda koristi tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (eng. High Performance Liquid Chromatography – HPLC) koja može biti spregnuta s masenom spektrofotometrijom kada je potrebna karakterizacija

spojeva [8]. HPLC je precizna i efikasna tehnika, no danas se ipak sve češće koristi „unaprijeđena“ verzija HPLC, a to je tekućinska kromatografija vrlo visoke djelotvornosti (eng. Ultra Performance Liquid Chromatography – UPLC). Principi metode su isti kao kod HPLC, a osnovna razlika između tih dviju metoda je veličina čestica stacionarne faze. Kod UPLC se koriste čestice manje od 2 μm (najčešće 1.7 μm), dok su kod HPLC veličine 3.5 μm . Uz manje čestice koriste se i viši tlakovi, koji dosežu vrijednost od 100 MPa (kod HPLC-a su tlakovi oko 40 MPa) [10]. Primjena vrlo malih čestica stacionarne faze rezultira većom površinom raspoloživom za interakcije te time boljim odjeljivanjem komponenata uzorka, a upotrebom viših tlakova povećan je protok mobilne faze, odnosno brzina eluiranja. Sveukupno je poboljšana rezolucija i osjetljivost analize te je bitno skraćeno vrijeme analize [9][10].

HILIC (eng. HILIC – Hydrophilic interactions liquid chromatography) jedna je od metoda odvajanja malih polarnih molekula na hidrofilnoj stacionarnoj fazi koja je najčešće silikagel modificiran s polarnim funkcionalnim skupinama. Mobilnu fazu čini polarno organsko otapalo mješljivo s vodom poput npr. acetonitrila. U mobilnu fazu se najčešće dodaje amonij acetat ili amonij formijat zbog regulacije pH i ionske jakosti. Oni mogu doprinijeti i polarnosti analita te utjecati na zadržavanje na koloni. Metoda može u relativno kratkom vremenu analizirati obilježene glikanske strukture koje su prisutne u uzorku [21]. Razdvajanje molekula temelji se na razdiobi analita između stacionarne i mobilne faze. Elucija se postiže povećanjem hidrofilnosti mobilne faze, odnosno povećanjem sadržaja vode. Na kraj kolone prve stižu hidrofobnije molekule dok se hidrofilne zadržavaju dulje [22].

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Glikozilacija membranskih proteina igra važnu ulogu u njihovim funkcijama, kako međustaničnom prepoznavanju, tako i interakcijama pojedinih molekula s receptorima na staničnoj površini. Promjene glikozilacije proteina prisutne su u mnogim bolestima pa je njihova analiza važna u razumijevanju patogeneze te otkrivanju novih dijagnostičkih biljega. S obzirom na navedeno, važno je razviti analitičku metodu koja bi omogućila istraživanje glikozilacije membranskih proteina. Dosadašnje metode izolacije i analize glikozilacije ovih proteina pokazale su se nedovoljno reproducibilne. Razlog toga leži u činjenici da se razaranjem stanice i taloženjem proteina dobije precipitat ukupne proteinske frakcije koji sadrži i membranske i unutarstanične (gliko)proteine. Stanični glikoproteini se još uvijek nalaze u procesu postranslacijskih modifikacija i njihova glikozilacija nije završena. To su uglavnom topljivi, hidrofilni proteini. Analizom ukupnog proteinskog precipitata, dakle, ne dobivamo valjanu informaciju o profilu membranskih N-vezanih glikana na osnovu koje možemo donositi zaključke o njihovoj ulozi u raznim (pato)fiziološkim procesima. Stoga je cilj ovog rada prilagoditi metodu izolacije proteina pomoću detergenta Tritona X-114 izolaciji membranskih proteina s ciljem analize njihove N-glikozilacije HILIC-UPLC kromatografijom. Navedena metoda se temelji na razdiobi proteina prema njihovoj hidrofobnosti i omogućuje razdvajanje membranskih (hidrofobnih) proteina od solubilnih (hidrofilnih). Na taj način mogu se zasebno proučavati membranski proteini te njihov glikozilacijski profil. Metoda je u radu optimirana na THP staničnoj liniji.

Specifični ciljevi ovog rada su:

- ❖ Iz staničnih linija THP izolirati membranske proteine pomoću Tritona X-114
- ❖ Optimirati metodu pročišćavanja proteina od detergenta
- ❖ Otpustiti i obilježiti N-vezane glikane s pročišćenih proteina te ih analizirati pomoću HILIC-UPLC kromatografije za profiliranje fluorescentno obilježenih oligosaharida

3. MATERIJALI I METODE

3.1 MATERIJALI

3.1.1 Soli, kiseline, lužine

Tablica 1: Popis korištenih anorganskih kemikalija i proizvođači

| Kemikalije | Proizvođač |
|-------------------------|-----------------|
| Amonijev persulfat | Sigma – Aldrich |
| Dinatrij hidrogenfosfat | Acros Organics |
| EDTA | AnalaR, BDH |
| Kalij dihidrogenfosfat | Sigma – Aldrich |
| Kalij klorid | Sigma – Aldrich |
| Ledena octena kiselina | Merck |
| Natrij klorid | Sigma – Aldrich |

3.1.2 Organske kemikalije

Tablica 2: Popis korištenih organskih kemikalija i proizvođači

| Kemikalije | Proizvođač |
|-------------------|-------------------|
| 2-aminobenzamid | Sigma – Aldrich |
| 2-pikolin boran | Sigma – Aldrich |
| Aceton | Claro-prom d.o.o. |
| Acetonitril (ACN) | J.T.Baker |
| Akrilamid | Sigma |
| Amonijak | Merck |
| Bromfenol plavo | Merck |

| | |
|---|-------------------|
| DMSO (dimetil sulfoksid) | Sigma – Aldrich |
| DTT (ditiotreitrol) | Sigma |
| Gel Mate Blue | Euroclone |
| Glicerol | Sigma |
| Glicin | Sigma |
| Izopropanol | Sigma Diagnostics |
| Kloroform | Riedel-de Haën |
| Metanol | Kemika |
| Mikrokristalinična celuloza | Merck |
| Mravlja kiselina | Merck |
| NP-40 Igepal CA630 (oktil-fenoksi-polietoksi-etanol), detergent | Sigma |
| SDS (Natrij-dodecilsulfat, detergent) | Sigma |
| Sukroza | Sigma |
| Tris | Sigma |
| Triton X-114 | Sigma |

3.1.3 Biološki materijal

Tablica 3: Popis korištenog biološkog materijala i proizvođači

| Biološki materijal | Proizvođač |
|---|-------------------|
| Koktel proteaza inhibitora | Roche |
| PNGaza F 1U/ 400 µl | Prozyme |
| Precision Plus Protein TM All Blue Standard, proteinski marker | BioRad |

| | |
|---------|----------------|
| THP – 1 | ATCC® TIB-202™ |
|---------|----------------|

3.1.4 Otopine i puferi

Tablica 4: Popis korištenih pufera i otopina i način pripreme

| Puferi | Priprema |
|--|---|
| 10xPBS (Phosphate buffered saline) pH=6.6 | Za 1 L pufera: 80.028 g NaCl, 13.832 g Na ₂ HPO ₄ , 2.964 g KH ₂ PO ₄ , 1.976 g KCl, sve otopiti u ultra čistoj vodi |
| 5xPBS (Phosphate buffered saline) | Za 100 ml pufera: Dobiva se iz 10xPBS-a; 50 ml 10xPBS-a uz nadopunu s miliQ vodom do 100 ml. |
| Pufer za nanošenje uzoraka | za 7.5 mL pufera: 1.5 mL 1 M Tris-HCl pH=6.8, 3 mL 1 M DTT, 0.6 g SDS, 0.03 g bromfenol plavog, 2.4 mL glicerola |
| Pufer za elektroforezu 10x | Za 1 L: 144 g glicina, 30.2 g Tris baze, 10 g SDS-a, H ₂ O (dest.) do 1L |
| Triton lysis buffer | Za 1mL pufera: 10 µl 10 mM Tris-HCl pH=7.4, 100 µl 1.5 M NaCl-a, 100 µl 10 mM EDTA, 500 µl 2% tritona u PBS-u, 290µl PBS-a |

| Otopine | Priprema |
|---|---|
| 2% SDS | 0.02 g SDS/1 ml; 2 g na 100 ml |
| 2% triton u PBS-u | Dobiva se iz 10% otopine Triton X-114 (3.2.1) |
| 80% acetonitril | Dobiva se iz 100% acetonitrila, razrjeđivanjem s ultra čistom H ₂ O. |
| Amonij formijat | Dobiva se titracijom mravlje kiseline otopinom amonijaka do pH 4.4 |
| Gel za razdvajanje 12% (elektroforeza) | Za 5 mL: 1.45 ml ultra čiste vode, 2 mL akrilamida, 1.25 mL Tris-a pH=6.8, 50 µl SDS-a, 0.25 mL amonijeva persulfata [11] |
| Gel za sabijanje 3% (elektroforeza) | Za 2 mL: 1.38 mL ultra čiste vode, 0.2 mL akrilamida, 0.25 mL Tris-a pH=8.8, 20 µl SDS-a, 150 µl amonijeva persulfata [11] |
| Otopina za obilježavanje glikana | Za 1 uzorak: 25 µl 30% octene kiseline u DMSO (7.5 µl octene kiseline, 17.5 µl DMSO), 0.48 mg 2-aminobenzamida, 1.12 mg 2-pikolin borana |
| Suspenzija mikrokristalinične celuloze u vodi | 0.1 g/ml, 200 µl celulozne suspenzije po uzorku |

3.1.5 Pribor

Tablica 5: Popis korištenog pribora i proizvođači

| Pribor | Proizvođač |
|--|--|
| 10 kDa filter pločica | Pall |
| Adhezivni filmovi | Mettler Toledo |
| Kolona za kromatografiju | Waters ACQUITY UPLC® BEH Glycan 1.7 µm |
| AcroPrep 96 GHP filter pločice, promjera 0.45 µm, zapremnine 1 ml | Pall |
| Microcon filter (3 kDa) | Milipore |
| Mikrotube za centrifugiranje | Eppendorf |
| PCR pločica od 300 µl | Mettler Toledo |
| Pločice za sakupljanje uzoraka, polipropilen, 1 ml zapremnine, za 96 uzoraka | Waters |
| Nastavci za mikropipete (20 µl, 200 µl, 250 µl, 1000 µl) | Rainin |

3.1.6 Laboratorijska oprema

Tablica 6: Popis laboratorijske opreme i proizvođači

| Pribor | Proizvođač |
|---------------------------------------|-----------------|
| Centrifuga Eppendorf 5804 | Eppendorf |
| Centrifuga Jouan MR23i | Thermo Electron |
| Mikropipete (obične i multikanalne) | Rainin |
| Sonikator UP100H Ultrasonic Processor | Hielscher |

| | |
|----------------------------|------------------------------|
| Tresilica | IKA [®] - Schüttler |
| UPLC Agilent Infinity 1290 | Agilent Technologies |
| Vakuu Manifold | Pall |

3.2 METODE

3.2.1 Priprema otopine Tritona X-114

PBS se ohladi na +4°C i napravi se 2%-tna (w/v) otopina Tritona X-114. Temperatura se mora kontrolirati (mora biti niža od +8°C, a optimalna temperatura je +4°C) zbog toga što je triton topljiv na nižoj temperaturi, dok na višim temperaturama stvara micide. Navedeno svojstvo se koristi za pročišćavanje same otopine jer komercijalno dostupan Triton X-114 nije dovoljno čist.

Nakon potpunog otapanja detergenta, otopina se zagrije na +35°C (termostat). To je temperatura na kojoj Triton X-114 formira micide pa otopina postane mliječno bijela. Temperatura otopine se kontrolira i drži konstantnom na 35°C. Dobivena emulzija centrifugira se na najmanje 5000 x g/10 min na temperaturi od 35°C te se dobiju dvije faze. Donja faza je čista otopina Tritona X-114, a u gornjoj fazi su nečistoće. Koncentracija Tritona X-114 u donjoj fazi je oko 10%.

Donja faza se ohladi na +4°C i čuva u hladnjaku, a prije ekstrakcije se razrijedi 10x s hladnim PBS-om [1].

3.2.2 Frakcioniranje proteina prema hidrofobnosti pomoću Tritona X-114

Za ekstrakciju membranskih i hidrofilnih proteina korištene su THP stanice. Homogeniziraju se s 1 mL Triton lizirajućeg pufera, kojem se dodaje koktel proteaza inhibitora da se spriječi razgradnja proteina, pomoću sonikatora u 4 ciklusa od po 10-15 sekundi. Homogenizirani uzorci se inkubiraju 1 h na 4°C uz blago miješanje, a potom se centrifugiraju 30 min (10 000 x g, 4°C). U talogu zaostanu dijelovi stanica, a čisti supernatant se prenese u nove mikrotubice te se inkubira 5 min na 37°C, nakon čega je vidljivo zamućenje otopine. Uzorci se zatim centrifugiraju 3 min (400 x g, 37°C) da bi se formirale dvije faze, od kojih je vodena gornja, a detergent donja faza. Gornja, vodena frakcija se prenese u novu mikrotubicu i inkubira na ledu, dok se tritonska faza resuspendira s 500 µL hladnog PBS-a i proces separacije ponovi kako bi se dodatno uklonili solubilni proteini eventualno zaostali u fazi bogatoj detergentom (centrifugira se 3 min na 400 x

g, 37°C). Gornja, vodena faza se ukloni i spoji s vodenom fazom dobivenom u prvoj separaciji. Frakcija bogata detergentom resuspendira se s 1,5 mL hladnog PBS-a [13].

3.2.3 Pročišćavanje proteina pomoću 3 kDa centrifugalnih filtera

Za inicijalno pročišćavanje izoliranih proteina korišteni su centrifugalni filteri (Microcon), koji imaju membranski sustav takav da omogućava prolazak česticama manjima od 3 kDa, a zadržava sve čestice molekularne mase iznad 3 kDa. Iz tog razloga će se proteini, koji se nalaze u tritonskoj frakciji, zadržati na membrani, a sam će detergent, čija molekularna masa iznosi 537 Da, proći kroz 3 kDa membranu.

Najprije se Microcon filteri, stavljeni na mikrotubice za centrifugiranje, ispiru pročišćenom vodom: na filter se nanese 100 µl ultračiste vode, filteri se centrifugiraju 20 min, na 10 000 x g, (sobna temperatura), međutim potrebno je paziti da membrana ne ostane potpuno suha. Voda se odbaci.

Odredi se volumen uzorka (tritonske frakcije), doda se isti volumen acetonitrila i tri puta veći volumen pročišćene vode. Uzorci se zatim pažljivo prebace na isprane Microcon filtere te se centrifugira 1 h i 40 min (14 000 x g, sobna temperatura). Nakon toga doda se još 500 µL 20% acetonitrila i ponovno se centrifugira 1 h i 40 min (14 000 x g, sobna temperatura). Microcon filteri se preokrenu, postave na nove mikrotubice i centrifugiraju 3 min na 1000 x g da bi se koncentrat proteina prenio u mikrotubicu za sakupljanje. Dobiveni proteini se osuše na zraku [13].

3.2.4 Taloženje proteina

3.2.4.1 Taloženje proteina acetonom

Aceton se ohladi na -20°C. Uzorcima (tritonskoj i solubilnoj frakciji) se doda 4 puta veći volumen hladnog acetona. Vorteksira se i inkubira 60 min na -20°C. Nakon toga se centrifugira 10 minuta na 15 000 x g, supernatant se pažljivo dekantira. Ostavi se da aceton ispari na zraku oko 30 minuta [14].

3.2.4.2 Taloženje proteina kombinacijom otapala kloroform/metanol/voda

Uzme se alikvot od 100 µL vodene frakcije i isto toliko tritonske frakcije i svaka se zasebno pomiješa s 400 µL metanola, vorteksira te centrifugira 30 s na 9000 x g. Zatim se doda 200 µL

kloroforma, vorteksira i centrifugira 30 s na 9000 x g. Sljedeće se doda 300 μ L vode, snažno se vorteksiraju uzorci te centrifugiraju 1 min na 9000 x g. Gornja vodena faza se pažljivo odstrani. Ponovno se doda 300 μ L metanola, uzorci se promiješaju i centrifugiraju 2 min na 9000 x g. Supernatant se odstrani, a skupljeni proteini se ostave sušiti na zraku [14].

3.2.4.3 *Taloženje proteina kombinacijom otapala aceton/metanol*

Uzme se alikvot od 100 μ L vodene frakcije i isto toliko frakcije bogate detergentom i svaka se zasebno pomiješa s 1,4 mL ledene mješavine aceton/metanol (8:1) te se inkubiraju 90 min na 4°C. Agregirani proteini se istalože centrifugiranjem na 2800 x g, na 4°C, 15 minuta. Supernatant se odbaci, a proteinski precipitat se osuši na zraku [15].

3.2.5 Otpuštanje N-vezanih glikana

3.2.5.1 *Priprema uzorka*

Uzme se pločica za sakupljanje uzoraka od 1 mL te se označi. U tubice s ekstrahiranim, osušenim membranskim proteinima dodaje se 30 μ L 1.33% SDS-a te se 10 μ L (> 100 μ g) svakog uzorka (glikoproteini) prenese pipetom u jažice. Kod pipetiranja, za svaki uzorak uzima se novi nastavak za pipetu da bi se izbjegla unakrsna kontaminacija [12].

3.2.5.2 *Denaturacija*

U svaki uzorak doda se 30 μ L 1,33% SDS-a za denaturaciju proteina te promiješa pipetiranjem. Na pločicu za sakupljanje uzoraka se stavi ljepljiva folija i ostavi inkubirati 10 min na 65 °C. Nakon što je gotova inkubacija, pločica se ostavi 30 min na sobnoj temperaturi da se ohladi. Zatim se doda 10 μ L Igepala u svaki uzorak i promiješa. Igepal se dodaje da bi neutralizirao SDS jer bi u suprotnom SDS denaturirao i PNGazu F koja se dodaje u sljedećem koraku. Pločica s uzorcima ostavi se na tresilici 15 min [12].

3.2.5.3 *Deglikozilacija*

Deglikozilacija se provodi pomoću enzima PNGaze F koja specifično otpušta N-vezane glikane. Prvo se pripremi mješavina enzima tako da se pomiješa 10 μ L 5x PBS-a s 0.5 μ L PNGaze po uzorku, a zatim se u svaki uzorak dodaje 10.4 μ L te mješavine. Pločica za sakupljanje uzoraka se ponovno prekrije ljepljivom folijom i ostavi u inkubatoru na 37°C, 18 sati [12].

3.2.6 Obilježavanje glikana

3.2.6.1 Priprema otopine 2-AB-a za obilježavanje

Otopina za obilježavanje izradi se po propisu (3.1.4) za zadani broj uzoraka. Prije vaganja, 2-pikolin boran stavlja se na sobnu temperaturu. Prvo se izračunata količina octene kiseline doda u određeni volumen DMSO-a kako bi dobili 30% otopinu. Ta 30% octena kiselina u DMSO se dodaje u mikrotubicu u kojoj se nalazi izvagani 2-AB te se vorteksira dok se potpuno ne otopi. Sav sadržaj se prenese u drugu mikrotubicu u kojoj se nalazi izvagani pikolin boran i dobro promiješa [12].

3.2.6.2 Obilježavanje uzoraka s 2-AB

Otopina za obilježavanje se prebaci u kadnicu za reagense radi lakšeg rukovanja. Svakom uzorku doda se po 25 μ l otopine za obilježavanje i smjesa se dobro promiješa pipetom. Pločica se prekrije ljepljivom folijom i tresse 10 min na tresilici, a zatim se stavi u inkubator na 65°C na 2 sata. Izvadi se nakon isteka vremena i ostavi hladiti 30 min na sobnoj temperaturi [12].

3.2.7 Pročišćavanje obilježenih glikana

3.2.7.1 Priprema GHP pločice

Najprije se pripremi suspenzija mikrokristalinične celuloze u vodi (0.1 g/mL). Mikrokristalinična celuloza omogućava pročišćavanje 2-AB obilježenih glikana, budući da se oni zbog svoje hidrofilnosti vežu za celulozu, dok se razna onečišćenja, koja mogu biti prisutna u uzorcima, neće vezati, nego će proći kroz membranu GHP pločice. U svaku jažicu GHP filter pločice dodaje se 200 μ L suspenzije mikrokristalinične celuloze. Ispiranje celuloze provodi se dodavanjem 200 μ L ultrapročišćene vode (u svaku jažicu GHP pločice, uz resuspendiranje), te se voda ukloni pomoću vakuum pumpe, pri čemu tlak ne smije prelaziti 5 inHg. Ovaj postupak ispiranja se ponovi pet puta. U sljedećem koraku se provodi uravnotežavanje celuloze dodavanjem 200 μ L hladnog 80% ACN-a. Acetonitril (ACN) mora biti ohlađen na 4°C kako prilikom nanošenja uzoraka ne bi došlo do obilježavanja same celuloze, koja je također šećer po svome kemijskom sastavu i koja bi kasnije interferirala s kromatografskom analizom. Dodani ACN ukloni se vakuum pumpom (tlak ne smije biti veći od 5 inHg) i cijeli postupak se ponovi tri puta [12].

3.2.7.2 Pročišćavanje N-glikana obilježenih 2-AB-om

Svakom uzorku dodaje se po 300 μ L hladnog (4°C) 100% ACN, smjesa se dobro promiješa pipetiranjem i prebaci na GHP filter pločicu, pri čemu se dobro resuspendira s mikrokristaliničnom celulozom pomoću mikropipete, kako bi se osiguralo što uspješnije vezanje glikana na celulozu. Zatim se acetonitril ukloni pomoću vakuuma, pazeći da tlak ne prijeđe 5 inHg. Slijedi pročišćavanje uzoraka pomoću 80 % ACN-a, na način da se svakom uzorku doda po 200 μ L te se postupak ponovi pet puta. U zadnjem koraku se još jednom dodaje po 200 μ L hladnog 80% ACN u svaku jažicu s uzorkom na GHP pločici te se acetonitril ukloni centrifugiranjem 5 min na 1000 rpm [12].

3.2.7.3 Elucija N-glikana obilježenih 2-AB-om

Ispod GHP pločice se stavi čista pločica za sakupljanje uzoraka zapremnine jažica 1 ml te se označi. U svaku jažicu s uzorcima na GHP pločici se doda 100 μ L ultračiste vode, resuspendira pipetiranjem i stavi 15 min na tresilicu. Nakon toga se pomoću vakuuma skupi prva frakcija eluata u pločicu za sakupljanje uzoraka. Zatim se ponovno doda 100 μ L ultra čiste vode, resuspendira pipetiranjem i stavi 15 min na tresilicu. Nakon završene inkubacije GHP pločica se zajedno s pločicom za sakupljanje uzoraka centrifugira 5 min na 1000 rpm da se skupi druga frakcija eluata. Eluat se zatim prenese u PCR pločicu od 300 μ L i pohrani na -20°C do daljnje analize [12].

3.2.8 SDS-PAG elektroforeza

Sastavi se standardna komora za elektroforezu, pri čemu stakla za elektroforezu moraju biti čista, suha i dobro učvršćena. Najprije se pripremi razdvajajući gel (12% poliakrilamid) (Tablica 4) koji se izlije između stakala za elektroforezu, te se na vrh gela odmah doda izopropanol, kako bi se spriječio pristup zraku koji usporava polimerizaciju. Razdvajajući gel polimerizira u vremenu od 20 – 30 min, ukloni se izopropanol i površina gela se ispere ultračistom vodom. Pripremi se otopina za sabijajući gel (3% poliakrilamid) (Tablica 4) i prenese između stakala za elektroforezu, a između stakala se odmah umetne i češalj za elektroforezu. Nakon polimerizacije sabijajućeg gela, češalj se ukloni, a nastale jažice se dobro isperu vodom [11].

Uzorci se pripreme na način da se 12 μ l uzorka pomiješa s 3 μ l koncentriranog pufera za uzorak (5X), inkubiraju na 95°C 5 min, ohlade i tada su spremni za nanošenje na gel. Stalak s gelom

prebaci se u uređaj za izvođenje elektroforeze te se unutarnja kadica napuni puferom za elektroforezu. Po 15 μ l uzorka nanese se na gel, vanjska kadica se također napuni puferom za elektroforezu te se na uređaj priključe elektrode i pokrene se elektroforeza: 30 min pri naponu od 80 V te 1 h pri naponu od 200 V. Nakon provedene elektroforeze, gel je obojan Gel Mate Blue bojom.

3.2.9 Analiza glikana HILIC tehnikom

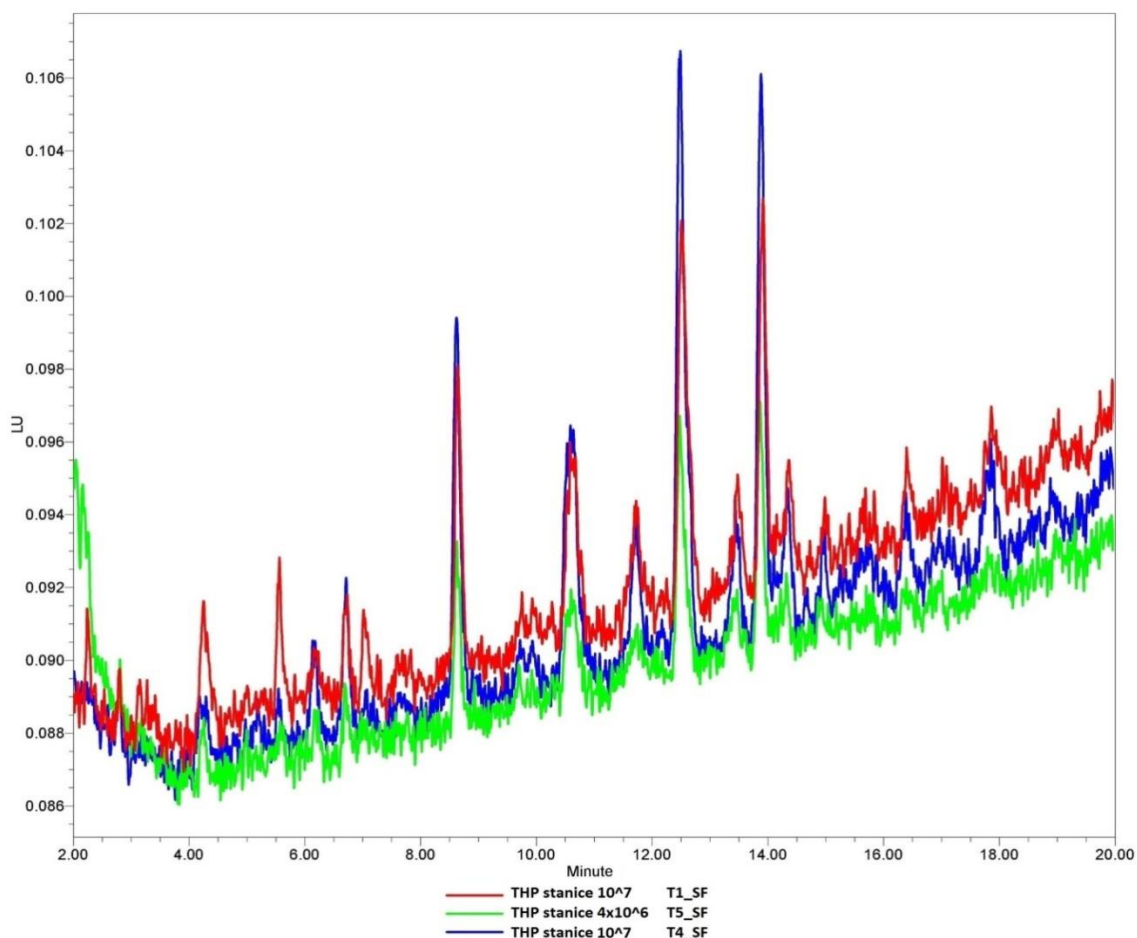
Dobiveni glikani analizirani su tekućinskom kromatografijom vrlo visoke djelotvornosti temeljenom na hidrofilnim interakcijama (1.3). Uzorci za analizu pripremljeni su na način da je 9 μ l eluiranih glikana pomiješano s 21 μ l acetonitrila. Razdvajanje N-glikana je provedeno na Acquity UPLC BEH Glycan koloni. Temperatura kolone iznosila je 25 °C te je korišten gradijentni protok otapala (Tablica 7). Kao otapalo A korišten je 100 mM amonijev formijat, a kao otapalo B acetonitril. Razdvajanje je provedeno tijekom 35 min, a glikani su detektirani fluorescentnim detektorom s valnim duljinama ekscitacije i emisije za 2-AB koje iznose 250 odnosno 428 nm [12].

Tablica 7: Omjer otapala korištenih za gradijentni protok u analizi glikana tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

| Vrijeme (min) | Otapalo A (%) | Otapalo B (%) |
|---------------|---------------|---------------|
| 0.00 | 30 | 70 |
| 24.81 | 47 | 53 |
| 25.50 | 70 | 30 |
| 32.50 | 30 | 70 |
| 35.00 | 30 | 70 |

4. REZULTATI

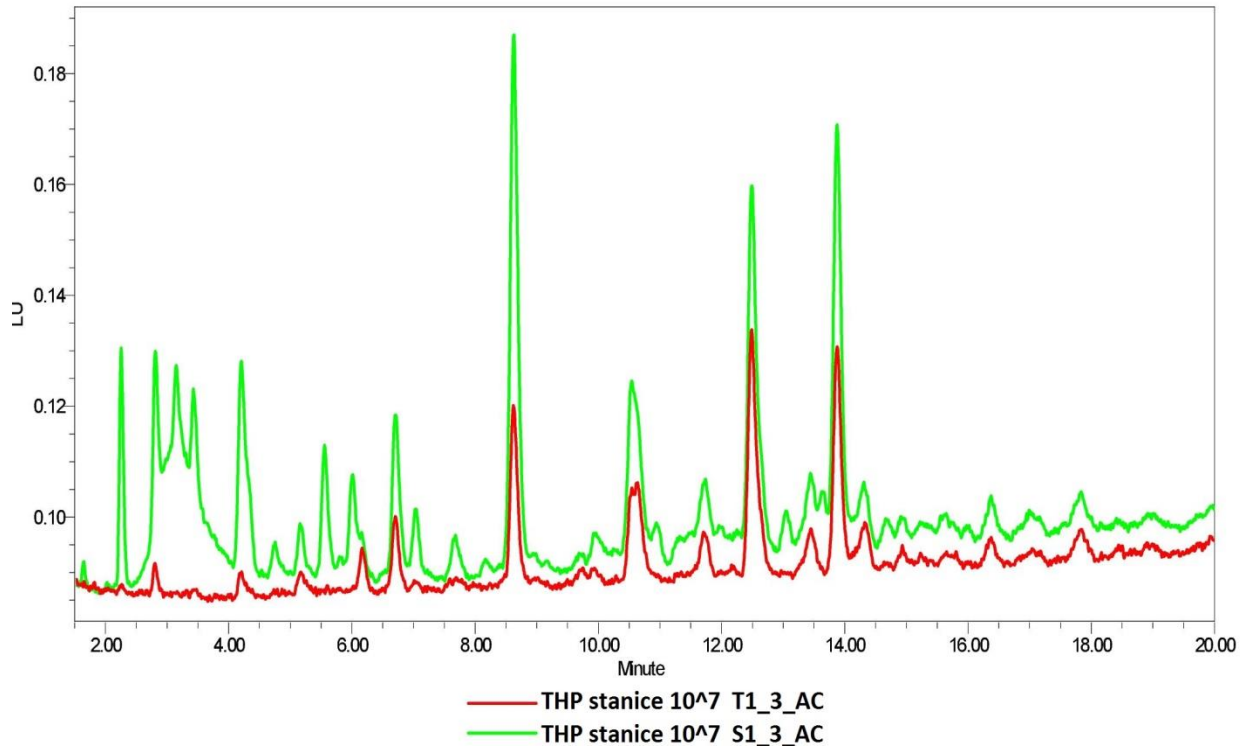
U postupku izolacije membranskih proteina u radu su korištene THP stanice u količini 10^7 i 4×10^6 stanica. Proveden je postupak ekstrakcije membranskih i hidrofилnih proteina s Tritonom X-114 (3.2.2). Nakon točke zamućenja dobiju se dvije faze, gornja frakcija sadrži hidrofилne proteine topljive u vodi, dok donja faza sadrži Triton X-144 u obliku micela s hidrofobnim membranskim proteinima. U daljnjem koraku pristupilo se pročišćavanju i precipitaciji proteina iz donje tritonske frakcije od detergenta pomoću spin filtera (3.2.3). Dobiveni proteini se u sljedećem koraku deglikoziliraju (3.2.5.3), a 2-AB obilježeni N-glikani izoliraju (3.2.7) te analiziraju UPLC-om (3.2.9) (Slika 3).



Slika 3: Kromatogram N-glikana dobivenih pročišćavanjem i precipitacijom proteina spin filterima iz uzoraka (aliquot od $100 \mu\text{l}$) s različitom količinom THP stanica

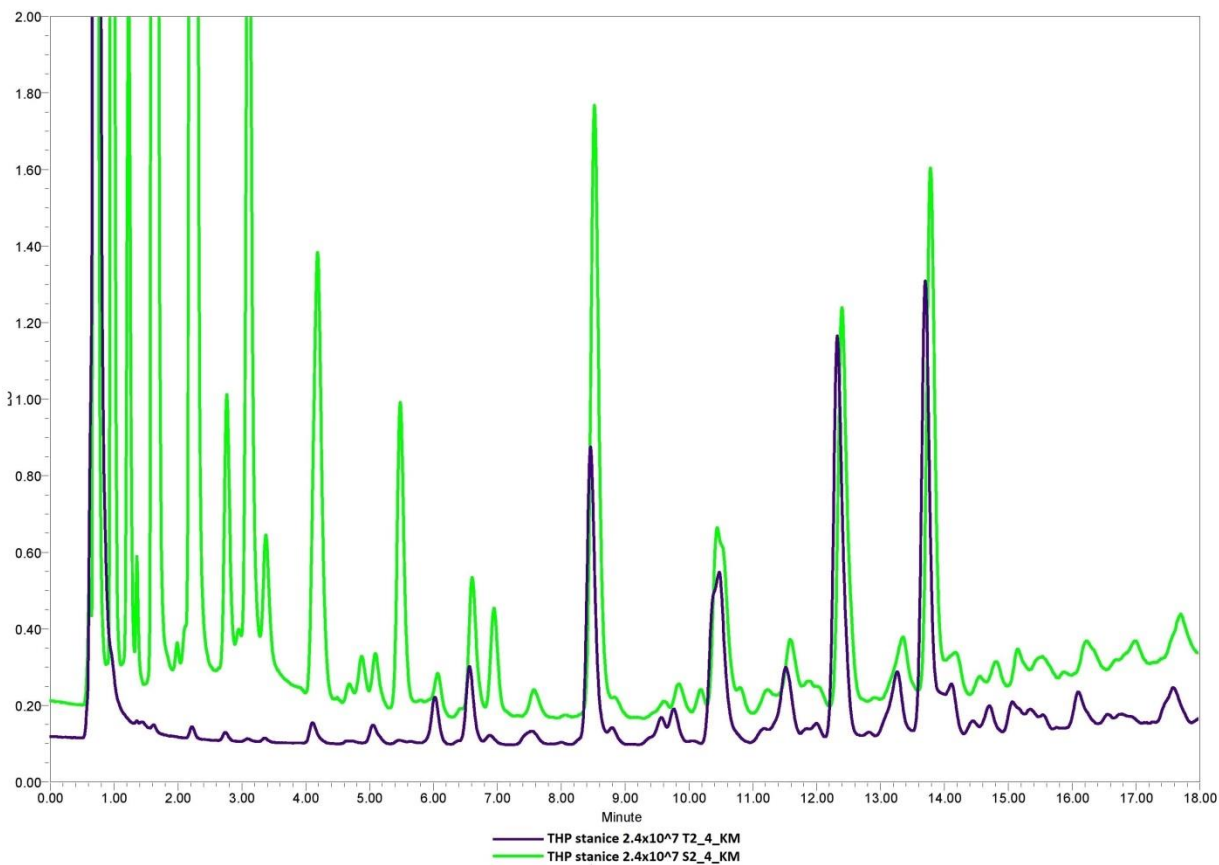
Dobiveni intenziteti su malo iznad razine šumova iz čega proizlazi da je dobivena koncentracija N-glikana, a time i proteina premala za pouzdanu interpretaciju. Bez obzira na male površine pikova ipak se vidi razlika u intenzitetu pika kod različitih koncentracija stanica. Metoda ima potencijala, jer su proteini uspješno pročišćeni od detergenta, međutim za pouzdanije rezultate potrebne su veće koncentracije proteina. Iz tog razloga sljedeća korištena metoda je metoda precipitacije proteina s acetonom (3.2.4.1). Pretpostavka je bila da će ta metoda rezultirati većim prinosom hidrofobnih proteina.

U ovoj metodi (3.2.4.1) također su korištene THP stanice (10^7 i 4×10^6). Nakon provedenih metoda 3.2.5-3.2.7 izolirani N-glikani su analizirani UPLC-om (3.2.9). Dobiveni kromatogram pokazuje da metoda precipitacije proteina s acetonom zaista daje bolji, zadovoljavajući prinos proteina. Na kromatogramu je prikazana usporedba kromatografskih pikova proteina, odnosno N-glikana iz tritonske faze i istih iz solubilne faze. Vidljiva je razlika u površinama, ali i položaju i učestalosti pikova što nam govori o različitom stupnju glikozilacije, ali i samom broju glikoziliranih proteina (Slika 4). Dobiveni kromatogrami odgovaraju i teorijskoj podlozi kako su glikani membranskih proteina razgranatije strukture od glikana na proteinima u solubilnoj frakciji.



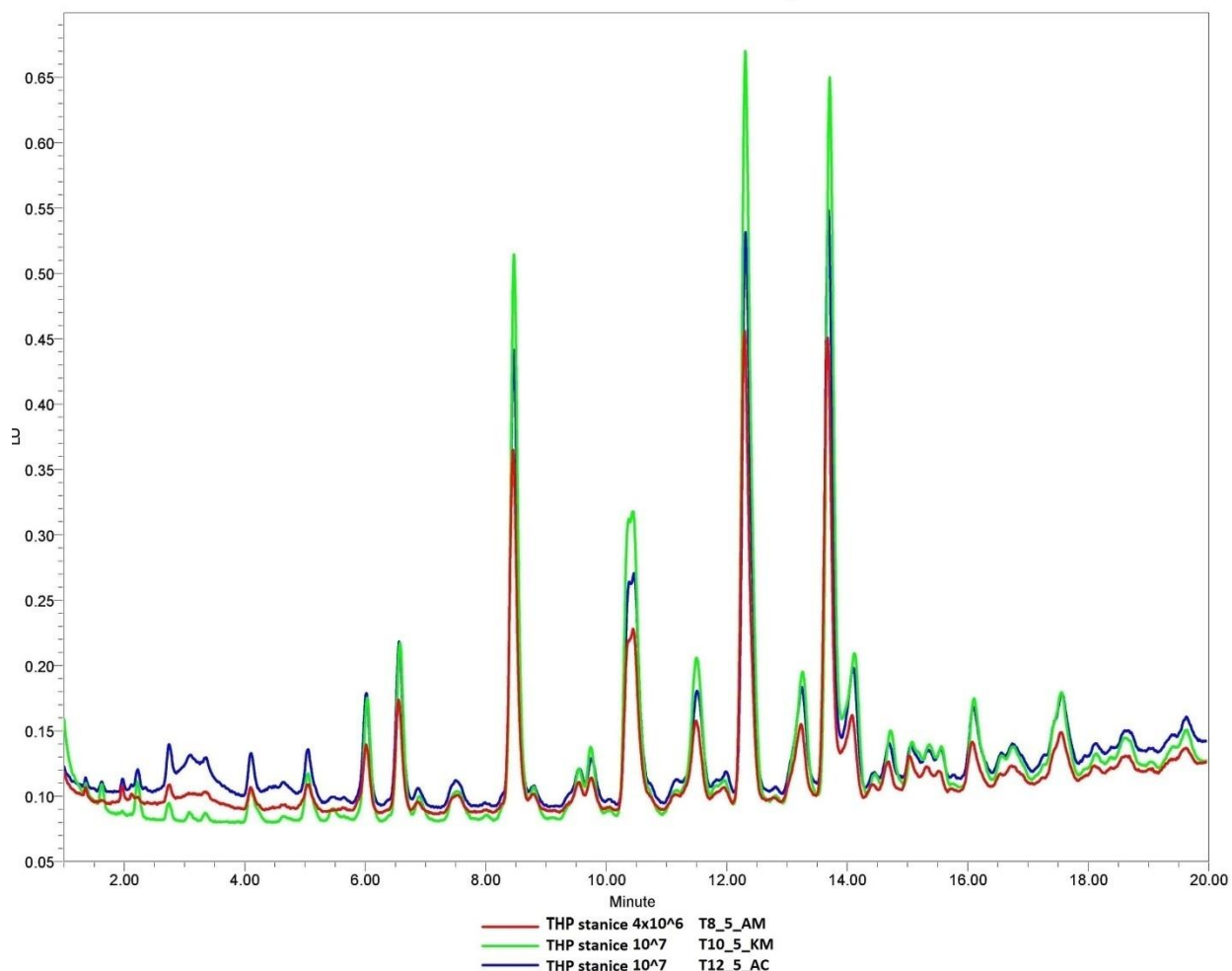
Slika 4: Kromatogram N-glikana dobivenih precipitacijom membranskih proteina acetonom (zeleno) i usporedba s N-glikanima solubilnih proteina (crveno).

U sljedećem koraku provedena je precipitacija proteina pomoću različitih kombinacija organskih otapala. Metoda je izvedena dva puta. U prvom pokušaju je propis 3.2.2 malo modificiran. Nakon prvog centrifugiranja uzorka i pojave supernatanta, isti je prebačen u tubicu za centrifugiranje u kojoj je bilo 100 μ L otopine sukroze. Njezina uloga je fizički odvojiti tritonsku i vodenu fazu. Korištene su tri različite kombinacije organskih otapala (acetan (3.2.4.1), kloroform/metanol/voda (3.2.4.2) i acetan/metanol (3.2.4.3)) s ciljem da se postignu još bolji rezultati. Svaka metoda rađena je s različitim kombinacijama od tri moguća broja THP stanica (4×10^6 , 10^7 i 2.4×10^7). Izolacijom N-glikana (3.2.5-3.2.7.3) i analizom s UPLC-om (3.2.9) dobiven je kromatogram na kojem se može uočiti da kombinacija kloroform/metanol, u usporedbi s hidrofilnim proteinima, daje najveći prinos N-glikana (Slika 5).



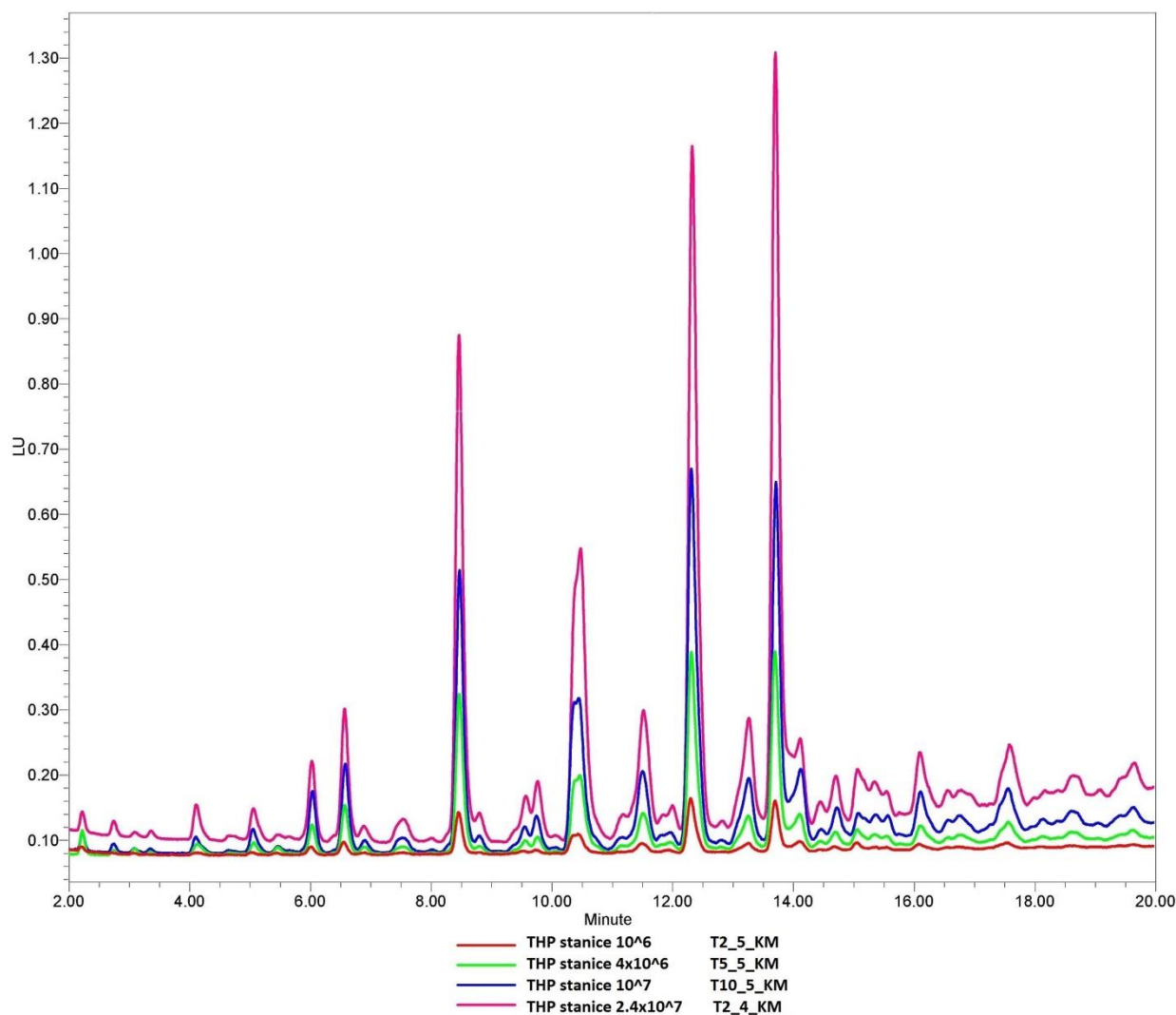
Slika 5: Kromatogram N-glikana dobivenih precipitacijom membranskih proteina organskim otapalom kloroform/metanol (ljubičasto) i usporedba s N-glikanima solubilnih proteina (zeleno).

Drugi put THP stanice bile su tretirane na isti način, međutim jedina je razlika to što je postupak ponovljen bez dodatka sukroze. Rezultati kromatografije nisu odstupali od prethodnih, štoviše pokazalo se da razdvajanje frakcija bez sukroze daje vrlo zadovoljavajuće količine proteina. Ako se usporede kromatogrami različitih kombinacija organskih otapala može se primjetiti da i dalje kombinacija otapala kloroform/metanol daje najveći prinos proteina, odnosno N-glikana, ali i kromatogram najbolje razlučivosti (Slika 6).



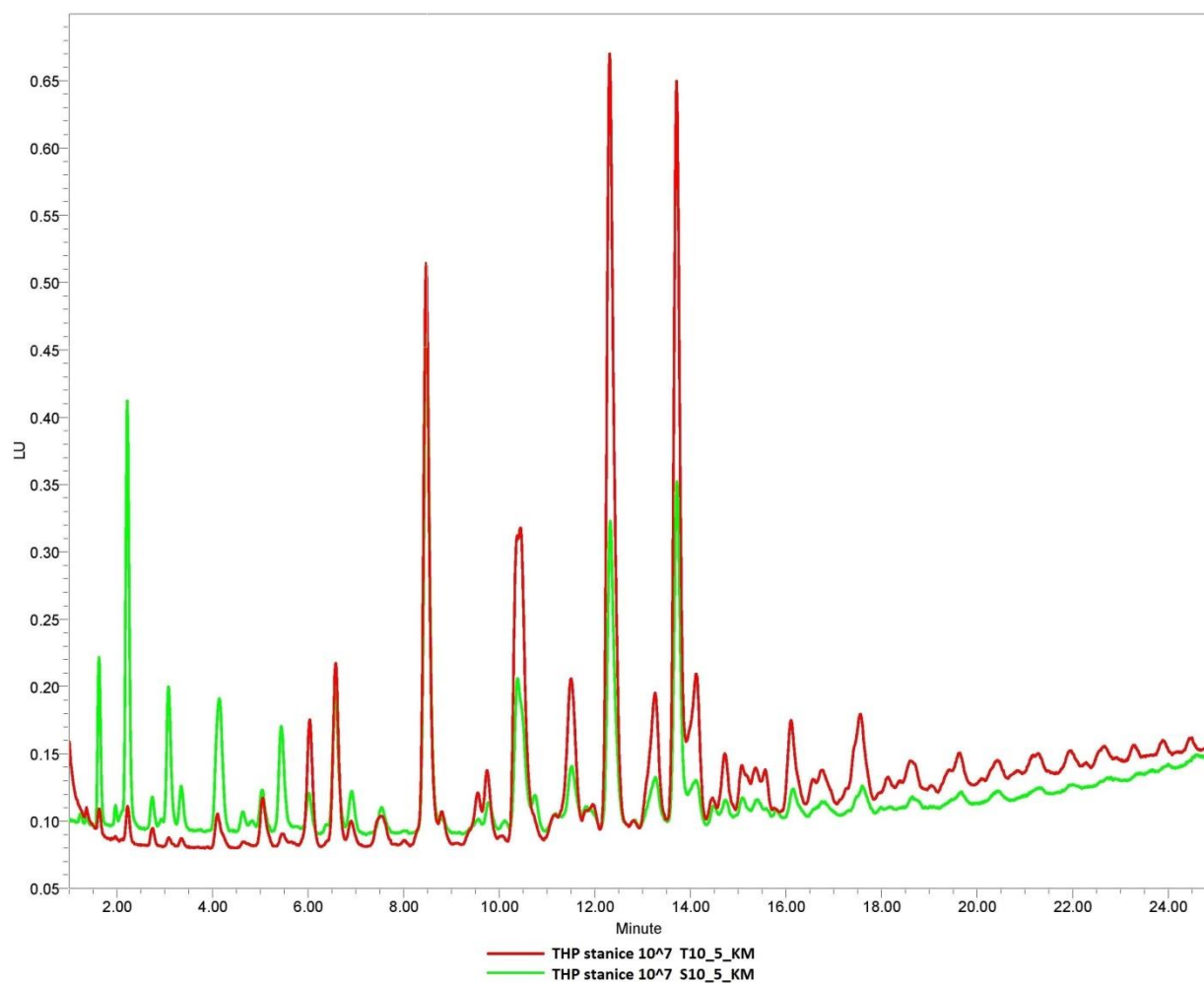
Slika 6: Kromatogrami N-glikana otpuštenih s membranskih proteina THP stanica nakon različitih metoda precipitacije proteina: aceton (plavo), kloroform/metanol (zeleno), aceton/metanol (crveno)

Bitno je uočiti da bez obzira na prinos proteina, sve tri kombinacije otapala daju kromatogram jednakog glikanskog profila. Ta činjenica je važna jer nam potvrđuje da je glikanski profil dosljedan. Nadalje, uspoređeni su kromatografski pikovi N-glikana koji su izolirani kombinacijom otapala kloroform/metanol, ali s različitom početnom količinom THP stanica (10^6 , 4×10^6 , 10^7 , 2.4×10^7). Jasno se vidi da je s povećanjem broja stanica veći prinos N-glikana (Slika 7).



Slika 7: Kromatogrami N-glikana dobivenih precipitacijom membranskih proteina kombinacijom organskih otapala kloroform/metanol s različitom početnom količinom stanica (10^6 stanica - crveno, 4×10^6 stanica - zeleno, 10^7 stanica - plavo, 2.4×10^7 stanica - ružičasto).

Usporedbom kromatograma N-glikana otpuštenih s proteina iz tritonske i solubilne frakcije (Slika 8), vidi se da su u tritonskoj frakciji prisutni glikoproteini s kompleksnijim glikanskim strukturama (dovršeni glikoproteini), dok u solubilnoj fazi ima više proteina sa strukturno jednostavnijim N-vezanim glikanima.

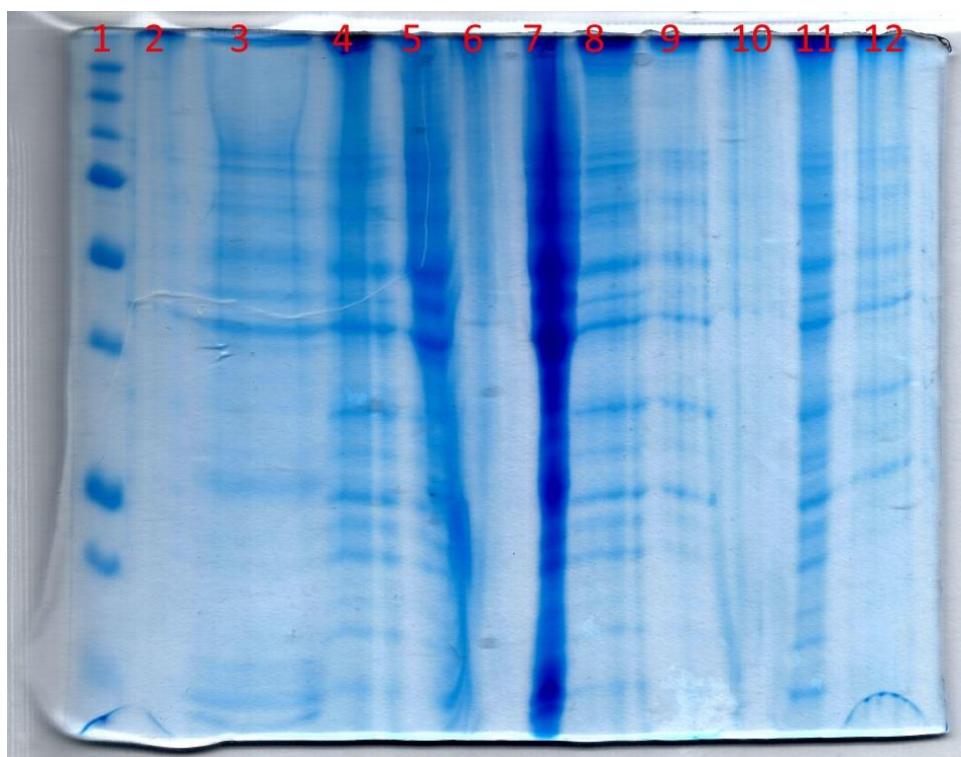


Slika 8: Usporedba kromatograma N-glikana otpuštenih s proteina iz tritonske faze (membranski proteini, crveno) i solubilne faze (zeleno) dobivenih precipitacijom pomoću kloroform/metanola

Kako bi se dobio uvid u uspješnost izolacije proteina i njihovog pročišćavanja od suviška detergenta (koji bi utjecao na uspješnost elektroforetskog razdvajanja i posljedičnu analizu) provedena je SDS-PAG elektroforeza. Naneseni su uzorci i tritonske i solubilne faze dobiveni iz različitih količina stanica precipitacijom s organskim otapalima (Slika 9). Može se primijetiti da veća količina stanica daje više proteina što je u pravilu popraćeno većim intenzitetom odijeljenih vrpci. Kad se usporede tritonska i solubilna faza istog uzorka, solubilna faza ima veći intenzitet vrpci, tj. više proteina što je i pretpostavka budući da u citoplazmi ima više proteina nego što ih ima na membrani.

Tablica 8: Raspored uzoraka nanesenih na gel za elektroforezu s vrstom frakcije, metodom precipitacije i količinom stanica (T-tritonska frakcija, S-solubilna frakcija, AC-aceton, A/M-aceton/metanol, K/M-kloroform/metanol)

| br.uzorka | frakcija | metoda precipitacije | količina stanica |
|-----------|-------------------|----------------------|------------------|
| 1 | proteinski marker | - | - |
| 2 | T | AC | 10^6 |
| 3 | S | AC | 10^6 |
| 4 | T | A/M | 10^7 |
| 5 | S | A/M | 10^7 |
| 6 | T | K/M | 10^7 |
| 7 | S | K/M | 10^7 |
| 8 | T | A/M | 10^7 |
| 9 | T | A/M | 10^7 |
| 10 | T | K/M | 4×10^6 |
| 11 | T | K/M | 4×10^6 |
| 12 | T | AC | 10^7 |



Slika 9: Gel elektroforeza proteina dobivenih precipitacijom organskim otapalima (Raspored uzoraka definiran je u Tablica 8)

5. RASPRAVA

Cilj ovog rada je bio optimirati metodu kojom će se izolirati isključivo membranski proteini stanica te analizirati njihov glikozilacijski profil. Istraživanje je provedeno na THP stanicama primjenom metode izolacije membranskih proteina pomoću Tritona X-114 (1.3, 3.2.2), a za razdvajanje i detekciju glikana upotrijebljena je HILIC-UPLC metoda (1.3). Ovaj pristup bilo je potrebno optimirati jer mnoge metode glikozilacije staničnih proteina zapravo ne daju reproducibilne i smislene rezultate. One često uključuju i izolirane solubilne proteine koji se još mogu nalaziti u procesu glikozilacije. Da bi se uopće moglo pristupiti otpuštanju N-vezanih glikana i njihovoj analizi, prethodno je bilo potrebno izolirane glikoproteine pročistiti od suviška detergenta. Pročišćavanje je važno zbog kasnije analize glikozilacije HILIC-UPLCom. Također, prije stavljanja uzoraka na kolonu treba ih ispirati acetonitrilom i vodom da bi se riješili suviška boje (2-AB). U svrhu pročišćavanja od detergenta isprobano je više metoda kako bi se ustanovilo koja od njih daje najveći prinos čistih proteina te kromatograme većih intenziteta pikova i bolje razlučivosti.

Prva je bila ispitana metoda s 3 kDa centrifugalnim filterima (3.2.3). Tom metodom su proteini relativno dobro pročišćeni od detergenta, međutim u samom postupku uzimaju se male količine uzorka te je zbog toga prinos proteina vrlo malen. Nadalje, intenziteti kromatografskih pikova su malo iznad razine šumova (Slika 3) iz čega se ne može donijeti nedvojbeni zaključak o glikozilaciji prisutnih proteina. Stoga, da bi se dobili bolji i pouzdaniji rezultati, izolirane membranske proteine potrebno je ukoncentrirati, što je pokušano s različitim kombinacijama organskih otapala.

U prvotnom pokušaju precipitacije izoliranih proteina s acetonom (3.2.4.1) dobiveni su nešto veći intenziteti pikova, međutim uzeti su jednako mali alikvoti uzorka te dobiveni kromatogrami još uvijek nisu mjerodavni.

Sljedeće se pristupilo precipitaciji s acetonom (3.2.4.1) i kombinacijom organskih otapala (aceton/metanol (3.2.4.3) i kloroform/metanol (3.2.4.2)), ali cijele tritonske i solubilne frakcije, te je ta metoda pokazala najviše potencijala. Na kromatogramima se vide pikovi zadovoljavajućih intenziteta (višestruko intenzivniji od prethodnih) na temelju kojih bi se mogli donijeti zaključci o glikanskom profilu ispitivanih glikoproteina, a SDS-PAGE je

pokazao da su proteini dobro pročišćeni od tritona (Slika 9). Između navedenih kombinacija organskih otapala, metoda s kombinacijom kloroform/metanol ipak se izdvaja kao učinkovitija od ostalih (Slika 6).

Sve metode pokazale su dosljednost glikanskog profila što se vidi preklapanjem kromatograma različitih početnih količina uzorka (Slika 7) te različitih metoda precipitacije (Slika 6). Spomenuta činjenica je važna jer ukazuje na istovjetnost rezultata. Također, jasno se vidi da na intenzitet pikova ima utjecaj količina stanica uzetih u analizu (Slika 7). Što je veći broj stanica, veći je prinos proteina (time i N-glikana), a to rezultira intenzivnijim kromatografskim pikovima.

Metodom u kojoj se kombiniraju organska otapala postignuto je dobro pročišćavanje od suviška detergenta i zadovoljavajući prinos samih proteina te se može reći da kao takva ima potencijala za širu primjenu. Međutim, ta metoda je primijenjena i pokazala se učinkovita samo na THP stanicama pa bi svakako trebalo ispitati njezinu primijenjivost (s jednakom pouzdanošću) na druge stanice. Također, primijećeno je da intenzitet pikova ovisi o broju stanica, no moguće je da bi i neki drugi parametri, koji u ovom radu nisu promatrani, mogli također imati utjecaja.

6. ZAKLJUČCI

Ispitivanjem na THP stanicama optimirana je metoda koja uključuje upotrebu Tritona X-114, a koja za cilj ima izolaciju isključivo membranskih proteina kako bi se mogla analizirati njihova glikozilacija. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Primjenom Tritona X-114 moguće je uspješno izolirati membranske proteine te ih odvojiti od solubilnih, a izolirane proteine je od suviška detergenta moguće pročistiti kombinacijama organskih otapala.
2. U pročišćavanju proteina od suviška detergenta najboljom se pokazala kombinacija otapala kloroform/metanol. Ona je u konačnici rezultirala najboljim prinosom glikana te kromatogramima najbolje razlučivosti.
3. Ponavljanim otpuštanjima N-glikana s glikoproteina pročišćenih navedenom metodom i njihovom analizom pomoću HILIC-UPLC dobiveni su kromatogrami jednakih glikanskih profila što upućuje na njihovu dosljednost i ponovljivost metode. Ovi kromatogrami se kao takvi mogu koristiti za analizu prisutnih glikana.
4. Intenzitet pikova ovisi o količini stanica uzetih u analizu. Postoji proporcionalna ovisnost inteziteta kromatografskih pikova o broju stanica, odnosno što je više stanica, više je izoliranih membranskih proteina te time i veća količina N-vezanih glikana.

7. ZAHVALE

Koristimo ovu priliku kako bismo se zahvalile mentorici doc. dr. sc. Olgi Gornik na pruženoj mogućnosti izrade te samoj realizaciji izrade ovog rada pod njenim vodstvom. Na isti način srdačno se zahvaljujemo na uloženom vremenu, iskazanom trudu i iskrenoj želji za naš uspjeh i daljnji nastavak znanstvene karijere.

Zahvaljujemo se i mag. pharm. Tamari Pavić na iznimno korisnim savjetima prilikom rada u laboratoriju, kojima smo usavršile naš rad i stručnim odgovorima na brojna pitanja koja smo postavljale tijekom rada.

Zahvaljujemo se svim djelatnicima Zavoda za biokemiju i molekularnu biologiju na iskazanoj susretljivosti i pomoći.

8. POPIS LITERATURE

- [1] Bordier, C., (1981), Phase separation of integral membrane protein in Triton X-114 solution, *J. Biol. Chem.*, 256, 1604-1607.
- [2] Triton X-114, Sigma- Aldrich product information <raspoloživo na: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Product_Information_Sheet/1/x114pis.pdf> [pristupljeno: 14.04.2014.]
- [3] THP-1 cells <raspoloživo na: <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/TIB-202.aspx#generalinformation>> [pristupljeno: 17.04.2014.]
- [4] Axford, J. (2001), The impact of glycobiology on medicine, *Trends Immunol.*, 22(5), 237–239.
- [5] Cooper, G. M., Hausman R. E., (2004), Stanica-molekularni pristup, 3rd ed., Medicinska naklada Zagreb, 305 – 307.
- [6] Varki, A. et al., (1999), *Essentials of Glycobiology*, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- [7] Lodish, H. et al., *Molecular cell biology*, New York, W. H. Freeman, 594 - 596.
- [8] Analysis of 2-aminobenzamide (AB) labeled glycans using HPLC with fluorescence detection <raspoloživo na: <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/111143-TN109-HPLC-2-Aminobenzamide-Glycans-09Sept2011-LPN2898.pdf>> [pristupljeno: 18.04.2014.]
- [9] High performance liquid chromatography – HPLC <raspoloživo na: <http://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/hplc.html>> [pristupljeno: 18.04.2014.]
- [10] Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): An Introduction <raspoloživo na: <http://www.spectroscopyonline.com/spectroscopy/data/articlestandard//lgcg/242005/164646/article.pdf>> [pristupljeno: 18.04.2014.]
- [11] Laemmli U.K., (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227(5259), 680-5
- [12] Menni, C. et al. (2013) Glycosylation of Immunoglobulin G: Role of Genetic and Epigenetic Influences., *PLoS ONE* 8(12)

- [13] Shevchenko, G. et al, (2010), Cloud-Point Extraction and Delipidation of Porcine Brain Proteins in Combination with Bottom-Up Mass Spectrometry Approaches for Proteome Analysis, *J. Proteome Res.*, 9 (8), 3904
- [14] Wessel, D., Flugge, U.I., (1984), A method for quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids, *Anal. Biochem.*, 138, 141-143
- [15] Mastro, R., Hall, M., (1999), Protein delipidation and precipitation by tri-n-butylphosphate, acetone, and methanol treatment for isoelectric focusing and two dimensional gel electrophoresis, *Anal. Biochem.* , 273, 313-315
- [16] Washburn, M. P. et al., Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology, *Nat. Biotechnol.* 2001, 19, 242-247
- [17] Blonder, J. et al., Enrichment of integral membrane proteins for proteomic analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 2002, 1, 351–360.
- [18] Blonder, J et al., Proteomic profiling of differentiating osteoblasts. *Expert Rev. Proteomics* 2006, 3, 483–496.
- [19] Nagaraj, N et al., Detergent-based but gel-free method allows identification of several hundred membrane proteins in single LC-MS runs. *J. Proteome Res.* 2008, 7, 5028–5032.
- [20] Chen, P. et al., Proteomic analysis of rat hippocampal plasma membrane: characterization of potential neuronal-specific plasma membrane proteins. *J. Neurochem.* 2006, 98, 1126–1140.
- [21] Buszewski B. et al (2011), Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique, *Anal Bioanal Chem.*, 402(1): 231–247
- [22] Boersema P. J. et al (2008), Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics, *Anal Bioanal Chem.*, 391:151-159

9. SAŽETAK

Nina Fekonja i Helena Goričanec

Izolacija membranskih proteina pomoću Tritona X-114 u svrhu analize njihove N-glikozilacije

Glikozilacija membranskih proteina važna je za mnoge njihove funkcije, kako međustanično prepoznavanje, tako i interakcije pojedinih molekula s receptorima na staničnoj površini. Kako bi se bolje razumjeli ovi procesi u mnogim fiziološkim i patofiziološkim stanjima, važno je posjedovati pouzdanu analitičku metodu koja bi omogućila istraživanje glikozilacije membranskih proteina. Dosadašnje metode izolacije i analize glikozilacije ovih proteina pokazale su se nedovoljno reproducibilnima zbog prisustva unutarstaničnih proteina koji često nose nedovršene glikanske strukture. Stoga je cilj ovog rada bio optimirati metodu izolacije isključivo membranskih proteina pomoću detergenta Triton X-114 te analizirati njihovu N-glikozilaciju tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti koja se bazira na hidrofilnim interakcijama. U tu svrhu korištene su stanice iz THP stanične linije. Ključni korak bio je pročišćavanje izoliranih proteina od suviška detergenta te je isprobano nekoliko metoda kako bi se ustanovilo koja od njih daje najbolje rezultate. Izolirani membranski proteini pročišćavani su pomoću 3 kDa centrifugalnih filtera (koji propuštaju male čestice detergenta, a zadržavaju proteinske molekule) ili upotrebom različitih organskih otapala koja su precipitirala proteine. Organska otapala koja su bila korištena su aceton, kombinacija aceton/metanol i kloroform/metanol.

Rezultati koji su dobiveni nakon pročišćavanja pomoću spin-filtera nisu bili zadovoljavajući jer, iako je uzorak bio pročišćen od detergenta, intenziteti pikova na kromatogramu glikozilacijskog profila bili su praktički u razini šuma samog instrumenta. Kao takvi ne mogu se koristiti za pouzdanu interpretaciju. Bolje rezultate pokazale su metode s organskim otapalima. One su dale jače intenzitete pikova i kromatograme bolje razlučivosti. Ovaj pristup pokazao je dobru ponovljivost te da je količina stanica uzetih u analizu u konačnici proporcionalna intenzitetu kromatografskih pikova.

Ovim radom dizajnirana je metoda izolacije membranskih proteina te analize njihove N-glikozilacije. Postojanje ove metode važno je u studiranju razumijevanja mnogih fizioloških i patofizioloških procesa u organizmu u kojima stanična glikozilacija igra važnu ulogu.

Ključne riječi: N-glikani, membranski proteini, Triton X-114, precipitacija otapalima, HILIC-UPLC

10. SUMMARY

Nina Fekonja i Helena Goričanec

Isolation of Membrane Proteins with Triton X-114 in Order to Analyze Their N-glycosylation

Glycosylation of membrane protein is important for many of their functions, for the intracellular recognition, and the interactions of molecules with receptors on the cell surface. In order to better understanding these processes in many physiological and pathophysiological conditions, it is important to have reliable analytical method that would enable the study of membrane protein glycosylation. Previous methods of isolation and analysis of membrane proteins glycosylation have not shown reproducible results because of the intracellular proteins presence, which often carry incomplete glycan structures. Therefore, the aim of this study was to optimize the method of isolation of membrane proteins only with detergent Triton X-114 and analyze their N-glycosylation with HILIC-UPLC which is based on hydrophilic interactions. For this purpose used cells are taken from the THP cell line. A key step was the purification of isolated proteins from excess of detergent, therefore several methods were tested to determine which one gives the best results. The isolated membrane proteins were purified by using the 3 kDa centrifugal filter (leaks small particles of detergent, and retains the protein molecule), or by using different organic solvents which precipitated proteins. Organic solvents which have been used are acetone, combinations of acetone/methanol and chloroform/methanol.

The results obtained after purification by spin-filters have not been satisfactory because, although the sample was purified from detergent, intensities of peaks in the chromatogram of glycosylation profiles were very alike to the noise level of the instrument. Therefore, they can not be used for reliable interpretation. Methods with organic solvents have shown better results. Their analysis gave a stronger intensities of peaks and chromatograms with better resolution. It shows that the amount of cells taken in the analysis affects the intensity of the chromatographic peaks.

This project has designed a method of isolation of membrane proteins and analysis of their N-glycosylation. The existence of these methods is important to understand many physiological

and pathophysiological processes in the body where cellular glycosylation plays an important role.

Key words: N-glycans, membrane proteins, Triton X-114, precipitating solvents, HILIC-UPLC

11. ŽIVOTOPISI

Nina Fekonja rođena je 1992. godine u Zürichu. Osnovnoškolsko obrazovanje završila je u Nedelišću kraj Čakovca. Srednju školu, smjer opća gimnazija, završila je u Gimnaziji Čakovec u Čakovcu. Farmaceutsko-biokemijski fakultet u Zagrebu, smjer farmacija, upisala je 2010. godine. Redovita je studentica četvrte godine s vrlo dobrim uspjehom. U slobodno vrijeme uči kineski jezik na Konfucijevom institutu Sveučilišta u Zagrebu.

Helena Goričanec rođena je 1991. godine u Čakovcu. Osnovnoškolsko obrazovanje završila je u Hodošanu kraj Preloga. Srednju školu, smjer prirodoslovno-matematička gimnazija, završila je u Gimnaziji Čakovec u Čakovcu. Farmaceutsko-biokemijski fakultet u Zagrebu, smjer farmacija, upisala je 2010. godine. Redovita je studentica četvrte godine s vrlo dobrim uspjehom.