

# **Protokoll Versuch C2**

Rückfaltungsscreens für Tyro3

**Gruppe 8**

Susanne Duncker und Friedrich Hahn

## Versuch C2: Rückfaltungsscreens für Tyro3

### Ziel des Versuchs

Wird ein Fremdprotein in E. coli überexprimiert reichert sich dieses in Inclusion Bodies an. Die Produktion eines Protein in Inclusion Bodies hat die Vorteile, dass dort das Protein in relativ großer Menge und Reinheit vorzufinden ist und außerdem leicht von den restlichen Proteinen der Zelle abgetrennt werden kann. Diese Vorteile sind aber nutzlos, wenn es kein Verfahren gibt, das gewünschte Protein, welches aggregiert in den Inclusion Bodies vorliegt, in seine native Faltung zu bekommen. In diesem Versuch werden für diese Rückfaltung sechs verschiedene Ansätze bezüglich ihres Vermögens das Tyro3-D1D2-Fragment (Wildtyp) aus Versuch C1 korrekt zu renaturieren untersucht. Dies erfolgt über einen Proteaseverdau, da native Proteine weniger empfindlich für proteolytischem Abbau sind.

### Durchführung

Die Rückfaltungslösungen werden folgendermaßen für alle Gruppen angesetzt (50ml Ansätze):

#### Lösung 1 (leicht basischer pH)

- 1 ml 1M Tris/HCl pH 8.0
- 49 ml H<sub>2</sub>O

#### Lösung 4 (reduzierende Bedingungen)

- 1 ml 1M Tris/HCl pH 8.0
- 60.6 mg L-Cystein
- ad 50 ml H<sub>2</sub>O

#### Lösung 2 (hohe Salzkonzentration)

- 1 ml 1M Tris/HCl pH 8.0
- 1.46 g NaCl
- ad 50 ml H<sub>2</sub>O

#### Lösung 5 (Chaotropes Additiv)

- 1 ml 1M Tris/HCl pH 8.0
- 4.36 g Arginin
- ad 50 ml H<sub>2</sub>O

#### Lösung 3 (oxidierende Bedingungen)

- 1 ml 1M Tris/HCl pH 8.0
- 15.4 g Glutathion reduziert
- 3.1 g Glutathion oxidiert
- ad 50 ml H<sub>2</sub>O

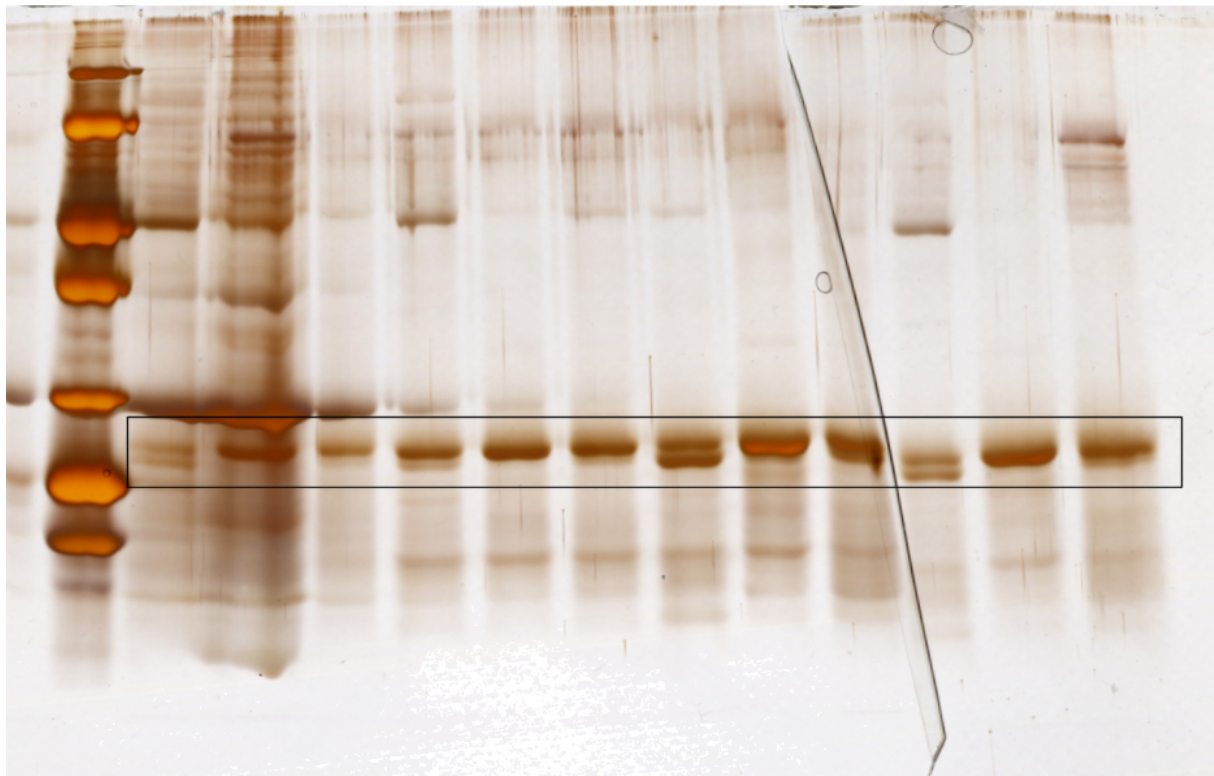
#### Lösung 6 (divalente Kationen)

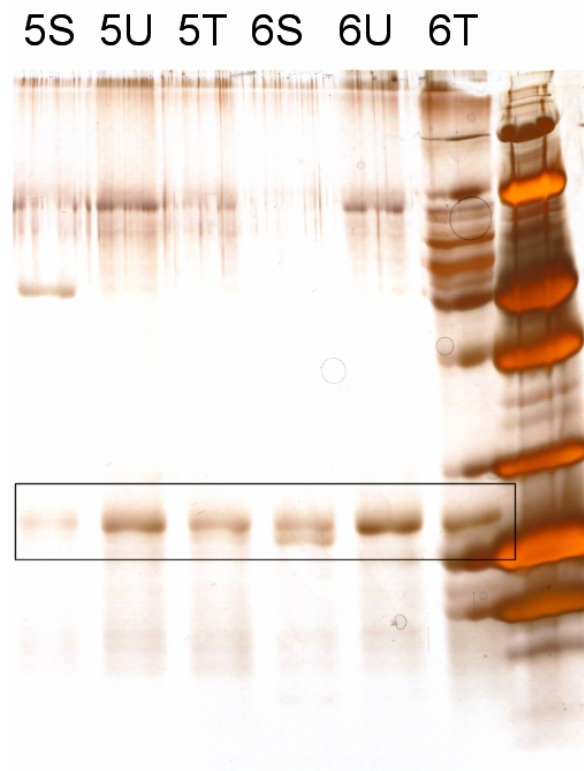
- 1 ml 1M Tris/HCl pH 8.0
- 10 ml 10 mM MgCl<sub>2</sub>
- 1 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub>
- 38 ml H<sub>2</sub>O

Der pH-Wert der Lösungen wird für 4°C auf pH 8.0 eingestellt.

Zu den gekühlten Rückfaltungslösungen werden je 50 µl der auf 1mg/ml eingestellten Proteinlösung dazupipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach werden die Lösungen ebenfalls über Nacht in einem MS-Dialysator mit 20 mM Tris/HCl pH 8.0 bei 4°C dialysiert. Danach wird durch Zentrifugation möglicherweise ausgefallenes Protein entfernt und der Überstand auf 500 µl konzentriert. Für jeden der sechs Rückfaltungsansätze werden zwei Verdaus angesetzt. Dafür werden je 100 µl der Proteinlösung mit entweder 1 µl Subtilisin oder Thermolysin für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wird dann mit 10 µl PMSF-Lösung (100 nM in Isopropanol) gestoppt. Die 12 Proben werden eingedampft und anschließend in 20 µl Probenpuffer aufgenommen und davon 15 µl auf das Gel geladen. Nach Beendigung des Gellaufs wird dieses mit Silbernitrat gefärbt. Die Auftragung ist folgendermaßen: Subtilisinverdaus (S), Unverdaut (U), Thermolysin (T)

1S 1U 1T 2S 2U 2T 3S 3U 3T 4S 4U 4T





In den markierten Bereichen befindet sich das Tyro3-Fragment so wie auch gegebenenfalls eines der Abbauprodukte, welches etwas weiter läuft. In den Bahnen ohne Proteinase ist dort nur eine Bande zu sehen. Generell sind die Unterschiede nicht sehr ausgeprägt, sowohl zwischen den Verdauungsansätzen als auch im Vergleich zur unbehandelten Probe. Auch die verschiedenen Rückfaltungsansätze sind vom Ergebnis sehr ähnlich. Subtilisin scheint generell besser zu funktionieren als Thermolysin, da man in fast allen Ansätzen mit Subtilisin zwei Banden erkennen kann. Nach den Gelen zu urteilen sind die Ansätze 2 und 5 am wenigsten verdaut, somit würden hohe Salzkonzentrationen und chaotropes Additiv die Faltung unterstützen. Da aber die Daten aber uneindeutig sind ist diese Einschätzung eher spekulativ.

Man würde erwarten, dass hohe Salzkonzentrationen eher stören auf die Faltung wirken sollten, da die Ionen mit dem Protein um das Lösungsmittel konkurrieren und auch in ihrer physiologischen Umgebung niedrigere Salzkonzentrationen herrschen. Oxidierende Bedingungen müssten bei Immunglobulindomänen die Ausbildung der intramolekularen Disulfidbrücken fördern. Reduzierende Bedingungen würden folglich hinderlich wirken. Chaotrope Substanzen in nicht-denaturierenden Konzentrationen sollten die Faltung unterstützen. Bivalente Kationen können, wenn sie als Cofaktor gebunden werden, ebenfalls nützlich sein. Dies ist bei diesem Protein aber wohl nicht der Fall.