

Att ändra ett protein

Emilia Johansson

Protein A används i dag för att fånga antikroppar i många industrier där antikroppar renas för att kunna bli läkemedel. Protein A kommer från början från cellväggen av en bakterie, *Staphylococcus aureus*, där den hjälper bakterien att undvika immunförsvaret genom att just binda upp antikropparna. Denna egenskap har man tagit tillvara på och kan t.ex. genom att binda Protein A till agaros kulor använda den för att fånga upp antikroppar. Dock är inte alltid den naturliga formen av Protein A tillräckligt bra för våra moderna reningsförfarande utan små modifikationer behövs ibland för att protein skall bli starkare, eller för att den ska kunna fånga upp ännu fler antikroppar än den gjort för bakterien den kommer ifrån. Då ändringar skall göras i ett protein måste man gå tillbaka till DNA koderna som dikterar hur proteinet skall tillverkas i bakterien. För att underlätta detta arbete används ofta en mycket välkänd bakterie, *Escherichia coli (E.coli)*, som fabrik för att producera den nya varianten av proteinet. DNA baserna läses av i grupper av tre av enzymer i bakterien och översätts till proteinets byggstenar, aminosyror, och genom att ändra i DNA baserna kan vissa aminosyror bytas ut mot andra. Då aminosyror har olika egenskaper, de kan vara stora eller små, vara hydrofila eller hydrofoba, negativt eller positivt laddade, kan man genom att ändra i aminosyrasekvensen påverka proteinet på det sätt man vill. Med hjälp av enzymer kan klippa och klistra i DNA, ändra om i DNA sekvensen och även skapa nya sekvenser. DNA förs sedan in i *E.coli* och sedan gäller det att *E.coli* kan tolka den förändring man genomfört och producera det protein man vill. För att slutresultatet skall gå att använda måste proteinet klarar av att renas från odlingsmediumet och cellrester samt vara stabilt nog för att analysera. Då proteiner viker och veckar sig då de produceras, gäller det att man inte ändrat på några av de aminosyror som är viktiga för denna process. Utan proteinets 3D struktur intakt fungerar sällan proteinet på det sätt man vill och då strukturen av Protein A är viktig i dess förmåga att kunna fånga in antikroppar vill man påverka proteinet utan att störa just denna viktiga struktur. Det kan ibland vara svårt att förutse i förväg vilka konsekvenser en aminosyra förändring kan medföra på hela 3D strukturen av ett protein.

I detta projekt har dels förändringar med avseende på Protein As stabilitet under höga pH förhållanden undersökts och dels förändringar med syfte att få proteinet att binda fler antikroppar designats. En förändring av DNA baserna för att byta en aminosyra till en annan testades för att se om detta skulle stabilisera proteinet då det utsätts för höga pHn. Detta visade sig vara en enkel förändring som producerades utan fel och kunde renas fram samt analyseras med bra resultat. Mer drastiska förändringar, däribland att skapa en större variant av Protein A för att öka antalet bindningsplatser för antikroppar samt att skapa ett linkersegment för att kunna placera de antikroppsbindande delarna längre ifrån varandra, undersöktes. Vissa av dessa varianter lyckades nästan, med fel på några enstaka aminosyror medans de större varianterna vissa visade sig vara svårare, dels att designa på DNA nivå och dels att översätta till en stabil protein produkt.

Examensarbete i biologi, 30 hp, HT 2010

Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala Universitet och GE Healthcare, Uppsala
Handledare: Göran Baurén, GE Healthcare