

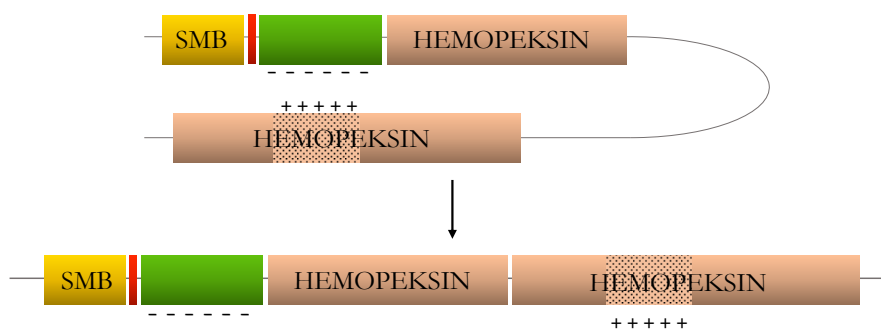
## IZOLACIJA VITRONEKTINA

### UVOD

Vitronektin je 70 kDa velik glikoprotein s tremi glikozilacijskimi mesti, ki ga v krvni obtok izločajo hepatociti. Za razliko od plazemskega vitronektina, ki po krvi potuje v kriptični, monomerni obliki, je vitronektin zunajceličnega matriksa netopen multimere, ki v svoji razviti obliki z izpostavljenimi domenami uravnava delovanje zunajceličnega matriksa.

Vitronektin sestavljajo tri domene: N-končna somatomedinska domena B, centralna hemopeksinska domena, ter C-končna hemopeksinska domena. Med prvima dvema domenama se nahaja vezavno mesto za celične receptorje integrine (zaporedje RGD), preko katerega se vitronektin primarno pritrjuje na integrin  $\alpha V\beta 3$ , druga hemopeksinska domena pa vsebuje heparin-vezavno mesto. Spodaj shematsko prikazuje obe obliki vitronektina in razporeditev domen. Vitronektin se tako v plazmi kot tudi v zunajceličnem matriksu včasih nahaja v cepljeni obliki, do katere pride s cepitvijo za Arg379, pri čemer nastaneta dva fragmenta, povezana z disulfidno vezjo.

Glavna vloga tega glikoproteina je vezava in stabilizacija inhibitorja aktivatorja plazminogena-1, s čimer je uravnavana pericelična proteoliza in fibrinoliza. Poleg vezave integrinov veže vitronektin še različne kolagene, rastne faktorje, kot tudi proteine komplementa in prej omenjene proteine, udeležene v proces fibrinolize, kar nakazuje na njegovo pomembno vlogo v zunajceličnem matriksu pri procesih celične adhezije, proliferacije in migracije. Čeprav je direktna vezava vitronektina na celične receptorje zadostna za pritrjevanje celic na zunajcelični matriks, je povezava stabilizirana še z dodatno interakcijo med heparin-vezavnim mestom vitronektina in heparansulfatnimi proteoglikani na površini celice.



**Kriptična in razvita oblika vitronektina.** Vitronektin sestavljajo 3 domene: domena somatomedin B (SMB, rumena barva) ter dve hemopeksinski domeni (rožnata barva). Med somatomedinsko domeno in prvo hemopeksinsko domeno je povezovalna regija (zelen pravokotnik) s celokupno negativnim nabojem. V plazmi, kjer vitronektin kroži kot kriptičen monomer, se ta regija povezuje s heparin-vezavnim mestom, ki ga sestavljajo bazične aminokislinske druge hemopeksinske domene. Z rdečim pravokotnikom je označen tripeptid RGD, vezavno mesto za integrinske receptorje.

### NAMEN VAJE

Namen vaje je iz plazme izolirati zadostne količine vitronektina za študije glikozilacije proteinov in testov celične adhezije.

## POSTOPEK DELA

Vitronektin bomo izolirali iz govejega seruma, kjer se ta protein nahaja v velikih količinah.

1. Izhajate z 30 ml govejega seruma, ki mu dodate 24 g uree, do 50 ml dopolnite s fosfatnim pufrom (10 mM fosfat pH 7,7, 130 mM NaCl, 5 mM EDTA) in pustite mešati pri sobni temperaturi pol ure.
2. V tem času pripravite heparin sefarozo (Heparin Sepharose 6 Fast Flow). Izhajate iz 3 ml suspenzije, ki jo prenesete v kolono. Sefarozo najprej dobro sperete s 3 V dH<sub>2</sub>O, nato pa še ekvilibirate s fosfatnim pufrom.
3. K serumu z denaturiranimi proteini dodate 1,5 ml v pufru ekvilibrirane heparin sefaroze. Tako pripravljeno suspenzijo pustite mešati nadaljnje pol ure pri sobni temperaturi.
4. V tem času pripravite fosfatni pufer z ureo (10 mM fosfat pH 7,7, 8 M urea, 130 mM NaCl, 5 mM EDTA).
5. Celotno suspenzijo prenesite v 10 ml kolono, nevezano frakcijo zbirate v čašo, gel pa sperete s 5 V fosfatnega pufera z ureo. Po spiranju h gelu dodate 10 ml fosfatnega pufera, kateremu ste dodali 1,5 µl β-merkaptetanola. Nevezani frakciji in frakciji spiranja izmerite absorbanco pri 280 nm.
6. Kolono zaprite in jo pustite stati v tem pufru preko noči pri sobni temperaturi. Po odstranitvi nevezane frakcije kolono še dodatno sperite s 5 V fosfatnega pufera z β-merkaptetanolom, nato pa vezane proteine eluirajte s 500 mM NaCl v fosfatnem pufru z ureo in zbirajte frakcije po 1,5 ml. Sproti merite absorbanco pri 280 nm.
7. Frakcije z največjo vsebnostjo proteinov združite in preko noči dializirajte proti 20 mM pufru HEPES pH 7,5 150 mM NaCl, 2 mM cistein pri 4 °C. Po dializi bomo frakcije skoncentrirali do končnega volumna 1,5 ml, alikvotirali in shranili pri -80 °C. Izmerite absorbanco pri 280 nm.

## REZULTATI

Tabela meritev absorbanco med izolacijo:

Frakcija	Nevezana	Spiranje	Elucija 1	Elucija 2	Elucija 3	Elucija 4	Elucija 5
A <sub>280</sub>							

Meritev absorbanco po dializi in koncentriranju:

Frakcija	Vitronektin
A <sub>280</sub>	