

Received: 2011.11.03  
Accepted: 2012.04.25  
Published: 2012.06.11

## Renaturacja *in vitro* białek zakumulowanych w ciałach inkluzyjnych

### *In vitro* renaturation of proteins from inclusion bodies

Dorota Porowińska, Ewelina Marszałek, Paulina Wardęcka,  
Michał Komoszyński

Zakład Biochemii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

#### Streszczenie

Rekombinowane białka i enzymy dzięki ich heterologicznej ekspresji w prokariotycznych systemach ekspresyjnych są powszechnie wykorzystywane w diagnostyce, medycynie i przemyśle. Wysoki poziom ekspresji obcych białek w komórkach bakteryjnych prowadzi jednak do tworzenia nieaktywnych i nierozpuszczalnych agregatów – ciał inkluzyjnych.

Przywracanie zagregowanym białkom aktywności biologicznej jest procesem skomplikowanym i czasochłonnym. Każde reaktywowane białko wymaga eksperymentalnego ustalenia optymalnych warunków. Wybór procedury i czas jej trwania zależą od rodzaju rekombinowanego białka, jego właściwości oraz czystości ciał inkluzyjnych.

Do reaktywacji białek zakumulowanych w ciałach inkluzyjnych niezbędne są 4 etapy: 1) izolacja ciał inkluzyjnych, 2) rozpuszczenie agregatów, 3) renaturacja i 4) oczyszczanie aktywnych katalitycznie cząsteczek.

Wydajność procesu renaturacji zależy od wielu czynników: fizycznych, chemicznych i biologicznych. Parametry te determinują szybkość procesu, zapobiegają agregacji, wpływają na rozpuszczalność i ułatwiają fałdowanie łańcuchów peptydowych oraz stabilizację fałdowanych cząsteczek.

Do najpowszechniej stosowanych metod renaturacji białek należą: rozcieńczenie, dializa oraz metody chromatograficzne.

#### Słowa kluczowe:

ciała inkluzyjne • refaldowanie • renaturacja • chaperony

#### Summary

Recombinant proteins and enzymes are commonly used in many areas of our life, such as diagnostics, industry and medicine, due to heterologous synthesis in prokaryotic expression systems. However, a high expression level of foreign protein in bacteria cells results in formation of inactive and insoluble aggregates – inclusion bodies.

Reactivation of aggregated proteins is a complex and time-consuming process. Every protein requires experimental optimization of the process conditions. The choice of the refolding method depends on the type of recombinant protein and its physical, chemical and biological properties.

Recovery of the activity of proteins accumulated in inclusion bodies can be divided into 4 steps: 1) inclusion bodies isolation, 2) solubilization of aggregates, 3) renaturation, 4) purification of catalytically active molecules.

Efficiency of the refolding process depends on many physical factors and chemical and biological agents. The above parameters determine the time of the folding and prevent protein aggregation. They also assist the folding and have an influence on the solubility and stability of native molecules.

To date, dilution, dialysis and chromatography are the most often used methods for protein refolding.

**Key words:** inclusion body • refolding • renaturation • chaperones

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=999918>

**Word count:** 3449

**Tables:** –

**Figures:** –

**References:** 49

**Adres autora:** prof. dr hab. Michał Komoszyński, Zakład Biochemii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń; e-mail: michkom@chem.uni.torun.pl

**Wykaz skrótów:** **BMC** – bis-merkaptacetamidocykloheksan; **Chaps** – 3-[(3-Cholamidopropyl)dimetyloamonio]-1-propanosiarczan; **DsbA** – oksydoreduktaza disiarczkowa; **DsbC** – izomeraza disiarczkowa; **DTE** – 1,4-ditioerytytol; **DTT** – 1,4-ditiotreitol; **EDTA** – kwas wersenowy; **EGTA** – kwas etylenoglikol-O-O'-bis(2-aminoetyl)-N,N,N',N'-tetraoctowy; **GSH** – zredukowany glutation; **GSSH** – utleniony glutation; **GuHCl** – chlorowoderek guanidyny; **IB** – ciała inkluzyjne (inclusion body); **NDSB** – sulfobetaina (pozbawiona detergentów); **PDI** – izomeraza disiarczkowa białek; **PEG** – glikol polietylenowy; **PPI** – izomeraza prolinowa cis/trans; **SDS** – dodecylosiarczan sodu; **TCEP** – tris-(2-karboksyetylofosfina).

## 1. WSTĘP

Obecnie stosuje się ponad 100 leków, których źródłem są komórki organizmów żywych, a ponad 1000 takich preparatów jest w fazie badań klinicznych. Przeważająca większość to białka rekombinowane, które stanowiąc mogą nową postać leków wykorzystywanych do leczenia chorób, na które jak dotąd nie ma skutecznego lekarstwa. Wśród nich są schorzenia związane z zaburzeniami genetycznymi, rak, nadciśnienie, czy AIDS. Ponadto ogromnie wzrosło wykorzystanie białek oraz enzymów w diagnostyce, a także w przemyśle spożywczym, tekstylnym, skórzanym i chemicznym [7,29,39]. Wykorzystywanie tych cząsteczek w tak wielu dziedzinach życia jest możliwe dzięki ich syntezy w prokariotycznych i eukariotycznych systemach ekspresyjnych [27,29,41,43]. Komórki ssaków i owadów pozwalają na uzyskanie aktywnych katalitycznie białek mających wszystkie niezbędne modyfikacje potranslacyjne. Jednakże hodowla tych komórek jest czasochłonna i bardzo kosztowna, a ilość uzyskanego produktu jest przeważnie niewielka. Zastosowanie tego rodzaju systemów ogranicza się więc głównie do badań laboratoryjnych. W przeciwieństwie do komórek eukariotycznych, hodowla bakterii jest tania i pozwala uzyskać, w krótkim czasie, duże ilości rekombinowanych białek [4,27,30,31,34,38,39,41,43]. Dużą zaletą komórek prokariotycznych jest bardzo dobrze poznany mechanizm transkrypcji i translacji oraz możliwość zastosowania wielu różnych mutantów [7,27,29,39]. Z tego powodu do produkcji białek, które do aktywności biologicznej nie wymagają potranslacyjnych modyfikacji, najczęściej wykorzystywane są mikroorganizmy (głównie *Escherichia*

*coli* i *Bacillus subtilis*). Jednak w wielu przypadkach wysoki poziom ekspresji heterologicznych białek w komórkach bakteryjnych prowadzi do ich akumulacji w ciałach inkluzyjnych (inclusion bodies – IB) [4,27,29,31,39,41,43]. Przywrócenie aktywności (reaktywacja, renaturacja, refaldowanie) białkom zgromadzonym w ciałach inkluzyjnych jest procesem skomplikowanym i ustalenie optymalnych warunków tego procesu wymaga przeprowadzenia wielu eksperymentów.

## 2. CIAŁA INKLUZYJNE

Ciała inkluzyjne to nierozpuszczalne i nieaktywne agregaty niesfałdowanych i/lub częściowo sfałdowanych białek. W komórce IB zwykle obecne są w cytoplazmie, w niewielkiej liczbie (przeważnie 1/kom.) [5,33,42]. Powstają w wyniku nieswoistych oddziaływań hydrofobowych i/lub jonowych między łańcuchami białkowymi [11,33,42]. Jednak, wbrew pozorom, są to struktury charakteryzujące się wysokim stopniem organizacji. Zagregowane w ciałach inkluzyjnych białka tworzą liczne, ciasno upakowane struktury β. Powstają zarówno w obrębie pojedynczego łańcucha polipeptydowego, jak również między łańcuchami różnych polipeptydów [11,45,46]. Jest to prawdopodobnie główna przyczyna nierozpuszczalności białek IB, a także ich odporności na proteolityczną degradację [20,33,42]. Ciała inkluzyjne charakteryzują się dużą jednorodnością [5,11,20]. Zawierają 40–90% rekombinowanego białka [3,33,42]. Resztę stanowią zanieczyszczenia, które możemy podzielić na dwie grupy. Pierwszą stanowią białka bakteryjne oddziałujące z nowo syntetyzowanymi polipeptydami. Drugą

grupą zanieczyszczeń są lipidy i białka błon zasocjowane z powierzchnią ciał inkluzyjnych [5,11,20,33].

Tworzenie ciał inkluzyjnych jest procesem złożonym i zależnym od wielu warunków środowiskowych oraz rodzaju ekspymowanych białek. Do najważniejszych czynników, które zwiększają prawdopodobieństwo tworzenia agregatów należą:

- lokalne wysokie stężenie syntetyzowanego białka,
- przejściowa akumulacja białek o całkowicie lub częściowo nieprawidłowej konformacji,
- gromadzenie się fragmentów łańcuchów polipeptydowych powstałych w wyniku proteolitycznej degradacji białek,
- nieprawidłowy proces fałdowania białek,
- brak modyfikacji potranslacyjnych niezbędnych do uzyskania rozpuszczalności przez niektóre białka eukariotyczne,
- hamowanie tworzenia i/lub nieprawidłowe rozmieszczenie mostków disiarczkowych w redukcyjnym środowisku cytosolu bakteryjnego,
- toksyczny wpływ rekombinowanego białka na komórki bakteryjne.

Tworzenie ciał inkluzyjnych jest z pozoru procesem niepożądanym, ale ma także pewne zalety. Agregaty można łatwo i z dużą wydajnością wyizolować z lizatu komórkowego, a to stanowi prostą drogę do oczyszczenia interesującego nas białka [4,33].

### 3. REAKTYWACJA BIAŁEK (REFALDOWANIE)

Renaturacja jest procesem mającym na celu przywrócenie prawidłowej konformacji i aktywności biologicznej zdenaturowanym białkom z ciał inkluzyjnych. Badania dowiodły, że proces ten przebiega wieloetapowo, poprzez tworzenie struktur pośrednich. Motorem napędzającym proces refaldowania są oddziaływania hydrofobowe. W pierwszym etapie tworzone są struktury drugorzędowe, które następnie tworzą bardziej skomplikowane konformacje przestrzenne.

Nie ma uniwersalnej metody reaktywacji. Każde białko wymaga eksperymentalnego ustalenia optymalnych warunków tego procesu. Wybór procedury i czas jej trwania zależy od rodzaju rekombinowanego białka, jego właściwości oraz czystości ciał inkluzyjnych. Wydajność procesu reaktywacji białek jest różna, jednak przeważnie wynosi zaledwie 15–25% całkowitego zagregowanego białka.

Przywracanie aktywności białkom z ciał inkluzyjnych obejmuje 4 etapy:

1. Izolację ciał inkluzyjnych z komórek bakteryjnych i ich oczyszczanie.
2. Rozpuszczenie zagregowanych białek.
3. Renaturację peptydów.
4. Oczyszczanie aktywnych katalitycznie białek.

Najważniejszy jest etap trzeci bowiem od niego zależy skuteczność całego procesu [5,33,47].

#### 3.1. Izolacja i oczyszczanie ciał inkluzyjnych

Duża gęstość ciał inkluzyjnych (większa niż organelli komórkowych) umożliwia ich łatwe izolowanie z lizatów

bakteryjnych poprzez wirowanie. Dla wydajności tego procesu bardzo ważne jest, aby struktura komórek uległa pełnej dezintegracji. W przeciwnym razie podczas wirowania nieuszkodzone komórki będą sedimentowały wraz z ciałami inkluzyjnymi [17,20,30,31,35]. Proces dezintegracji komórek może być prowadzony metodami mechanicznymi, chemicznymi, enzymatycznymi lub ich kombinacjami. Najczęściej stosowane są sposoby mechaniczne: sonifikacja, prasa Frencha i wysokociśnieniowa homogenizacja dla dużych hodowli przemysłowych. Wydajność tych procesów można zwiększyć dodając do zawiesiny bakterii lizozym i EDTA [17,20,30,31,33].

W celu usunięcia zanieczyszczeń z powierzchni ciał inkluzyjnych wyizolowane IB przemywa się kilkakrotnie buforem zawierającym detergenty (np. Triton X-100, SDS) lub niskie stężenia związków chaotropowych (np. chlorowoderek guanidyny, mocznik). Zbyt wysokie stężenie tych związków może doprowadzić do rozpuszczenia również agregatów [17,30,35,41].

Alternatywnym sposobem izolacji ciał inkluzyjnych z komórek bakteryjnych jest metoda chemiczna opisana przez Falconera i wsp. [17]. Polega na ekstrakcji białek bakteryjnych przez zwiększenie przepuszczalności błony komórkowej z użyciem roztworu mocznika, EDTA i związków ułatwiających tworzenie mostków disiarczkowych. W tych warunkach powierzchnia IB ulega utlenieniu, dzięki czemu nie ulegają one rozpuszczeniu. Istotną wadą tej metody jest to, iż może być stosowana tylko do białek zawierających duże ilości reszt cysteinowych. Niewielka modyfikacja procedury, polegająca na użyciu mieszaniny Triton X-100 i EDTA, pozwala na jej wykorzystanie do izolacji większej liczby białek. Metoda ta jest najczęściej stosowana w preparatyce ciał inkluzyjnych na skalę przemysłową. Umożliwia bowiem wyizolowanie zagregowanych białek bezpośrednio z zawiesiny bakteryjnej. W procesie tym uwalniane są jednak znaczne ilości DNA, co prowadzi do wzrostu lepkości preparatu. Skutkiem tego są problemy z otrzymaniem czystego produktu. Precypitacja DNA za pomocą sperminy lub innych czynników strącających lub degradujących kwas dezoksyrybonukleinowy może rozwiązać ten problem [17].

#### 3.2. Rozpuszczanie ciał inkluzyjnych

Do rozpuszczania ciał inkluzyjnych zwykle stosuje się wysokie stężenia związków denaturujących, takich jak 6M chlorowoderek guanidyny czy 8M mocznik [17,30,31,43]. Częściej stosowany jest GuHCl ze względu na silniejsze właściwości chaotropowe. Roztwory mocznika mogą być zanieczyszczone cyjanianem, który podczas długiej inkubacji w alkalicznym środowisku karbamoiluje wolne grupy aminowe w łańcuchu polipeptydowym. Dodatkowo rozpuszczalność ciał inkluzyjnych w moczniku zależy od pH. Dla każdego białka optimum pH tego procesu ustala się doświadczalnie [30,31,33, 41,43]. W wyniku denaturacji przez chlorowoderek guanidyny lub mocznik zagregowane białka ulegają rozfałdowaniu eksponując hydrofobowe fragmenty łańcucha na zewnątrz cząsteczki. Alternatywną techniką jest tzw. metoda łagodnego rozpuszczania, której celem jest solubilizacja zagregowanych białek bez utraty ich struktury drugorzędowej. Efekt ten uzyskuje się stosując bufory zawierające niewielkie stężenia związków

denaturujących, detergenty (SDS, CTAB, sarkozyl) i/lub argininę, która zapobiega agregacji. Metoda ta pozwala uzyskać w pełni lub częściowo aktywne cząsteczki białek. Dalsze etapy renaturacji są wówczas znacznie łatwiejsze lub w ogóle nie są konieczne. Podobny efekt rozpuszczenia dają bufony o ekstremalnym pH zawierające (lub nie) niskie stężenia związków denaturujących. Takie postępowanie może jednak prowadzić do nieodwracalnych zmian w strukturze białek prowadzących do ich denaturacji [20,31,33].

W procesie rozpuszczania ciał inkluzyjnych stosuje się również związki chelatujące jony metali (EDTA, EGTA) oraz niskocząsteczkowe związki tiolowe ( $\beta$ -merkaptopetanol, 1,4-ditiotreitol (DTT), 1,4-ditioerytrytol (DTE), cysteina). Pierwsze z nich pozwalają uniknąć utleniania cysteiny z udziałem metali. Natomiast związki redukujące rozrywają nieprawidłowo utworzone wiązania disiarczkowe wewnątrz cząsteczek i między łańcuchami. Wiązania te mogą tworzyć się podczas dezintegracji komórek bakteryjnych. Ponadto obecność w ciałach inkluzyjnych proteaz wymaga dodania do mieszaniny ekstrakcyjnej inhibitorów tych enzymów. Zapobiega to lub ogranicza proteolityczną degradację białek podczas procesu rozpuszczania [20,30,41].

Jeśli rekombinowane białko stanowi mniej niż 2–5% całkowitej ilości białek bakteryjnych lub mniej niż 2/3 białek ciał inkluzyjnych zalecane jest przeprowadzenie procesu oczyszczania zdenaturowanych agregatów przed rozpoczęciem renaturacji [41]. Do oczyszczania IB wykorzystuje się różne rodzaje chromatografii (powinowactwa, jonowymienność, sączenie molekularne w warunkach denaturujących), które pozwalają na selektywne wyizolowanie interesującego nas rekombinowanego białka. Oczyszczanie rozpuszczonych polipeptydów przed rozpoczęciem renaturacji nie jest konieczne w przypadku stosowania sączenia molekularnego, jako metody reaktywacji, ponieważ pozwala ona na jednoczesną renaturację i oczyszczanie białka [4,41].

### 3.3. Renaturacja białek ciał inkluzyjnych

W zależności od rodzaju białka renaturacja *in vitro* może trwać od kilku sekund do kilku dni. Proces prawidłowego zwijania łańcucha polipeptydowego konkuruje z procesami denaturacji białek oraz ich agregacją. Przyczyną są oddziaływania międzycząsteczkowe występujące między wyeksponowanymi hydrofobowymi fragmentami łańcuchów polipeptydowych pozbawionych struktury drugo- i trzeciorzędowej. Jest to główny powód niskiej wydajności refaldowania [13,30,32,40]. Ograniczenie agregacji jest więc głównym zadaniem w procesie reaktywacji białek.

Proces renaturacji składa się z dwu zachodzących jednocześnie etapów. Pierwszy polega na usunięciu nadmiaru związków denaturujących i tiolowych stosowanych podczas rozpuszczania ciał inkluzyjnych. Związki te mogą negatywnie wpływać na proces ponownego faldowania białek [32,41,43,44]. Przed ich usunięciem należy jednak obniżyć pH mieszaniny. Zapobiega to formowaniu się nowych, nieprawidłowych wiązań [5]. Drugi etap to tworzenie optymalnych warunków środowiska (m.in. temperatura, pH, siła jonowa, stężenie białka) do prawidłowego faldowania łańcucha polipeptydowego [32,40,44]. Optymalizacja warunków renaturacji jest konieczna do przywrócenia

prawidłowej konformacji białkom i odzyskania ich aktywności biologicznej [8,17]. Właściwe parametry fizyczne renaturacji, czynniki chemiczne i biologiczne należy dobrać indywidualnie dla każdego białka. Wpływ na to ma: długość łańcucha, punkt izoelektryczny, obecność wiązań disiarczkowych oraz inne właściwości fizyko-chemiczne polipeptydów.

#### 3.3.1. Czynniki fizyczne wpływające na refaldowanie

Podstawowym parametrem, odgrywającym znaczącą rolę w procesie faldowania jest stężenie białka w środowisku renaturacyjnym. Utworzenie prawidłowo zwiniętego łańcucha maleje wraz ze wzrostem stężenia białka. Najczęściej stosuje się stężenia w zakresie 10–100  $\mu\text{g/ml}$  [13,17,41]. Ogranicza to w znacznym stopniu agregację cząsteczek białka i zwiększa wydajność prowadzonego procesu.

Każde białko ma inne optimum temperatury, w którym jest termodynamicznie stabilne [41]. Parametr ten reguluje szybkość procesu renaturacji, a także wpływa na intensywność agregacji białek. Niska temperatura ogranicza tworzenie oddziaływań hydrofobowych między cząsteczkami. Sprzyja to prawidłowemu faldowaniu łańcuchów polipeptydowych. Spowalnia jednak cały proces i przez to wydłuża czas jego trwania [41].

Wydajność reaktywacji w istotny sposób zależy również od pH środowiska, ze względu na jego wpływ na ładunek białek. Od niego zależy stabilność, rozpuszczalność oraz kinetyka tworzenia wiązań disiarczkowych. pH roztworu do renaturacji powinno być o 1–2 jednostki wyższe od punktu izoelektrycznego faldowanego białka. W tych warunkach zwiększa się rozpuszczalność polipeptydów i tym samym zmniejsza ryzyko ich agregacji. Jeśli białko w swojej strukturze zawiera mostki disiarczkowe, optymalne pH powinno zawierać się między 7,5 a 10. Środowisko alkaliczne ułatwia bowiem tworzenie poprawnych wiązań typu -S-S-. Długi czas działania pH niższego od 3,5 lub wyższego od 10,5 może spowodować chemiczne modyfikacje białek [28].

Istotnym czynnikiem wpływającym na poprawność faldowania jest ciśnienie hydrostatyczne. Renaturacja prowadzona przy wysokim ciśnieniu (ok. 3 kbar) w obecności niedenaturujących stężeń  $\text{GuHCl}$  ogranicza akumulację białek i niszczy już utworzone agregaty. Powstałe w ten sposób monomery utrzymują swoją strukturę drugorzędową, a stopniowe zmniejszanie ciśnienia do 1,5–2 kbar pozwala na przyjmowanie natywnych konformacji nawet przy wysokim stężeniu białka [10,17,41].

#### 3.3.2. Czynniki chemiczne wpływające na refaldowanie

W procesie renaturacji białek stosowane są następujące związki chemiczne: aceton, acetamid, cukry i ich pochodne, alkohole o krótkich łańcuchach, rozpuszczalniki organiczne, DMSO, jony (najczęściej  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) i inne kofaktory, detergenty jonowe i niejonowe (Chaps, SDS, Tween 80, Triton X-100, NDBS 201), denaturanty ( $\text{GuHCl}$  i mocznyk) w niskich stężeniach, PEG oraz substraty enzymów. Powyższe związki wpływają na rozpuszczalność zdenaturowanych białek oraz stabilność stanów przejściowych i prawidłowo zwiniętych łańcuchów polipeptydowych. Zwiększa

to wydajność procesu renaturacji. Zaletą stosowania ww. związków jest łatwość ich usunięcia ze środowiska używanego w procesie reaktywacji białek [17,21,32,35].

Związkiem najczęściej używanym do ochrony białek przed agregacją jest 0,4 do 1M L-arginina. Aminokwas ten był stosowany w renaturacji większości dotychczas analizowanych białek. Mechanizm działania Arg nie został jeszcze w pełni poznany. Sądzi się, że arginina ogranicza oddziaływanie białko-białko i białko-powierzchnia, co zmniejsza agregację polipeptydów i ułatwia ich oczyszczanie [6,8,20]. Zmiana rozpuszczalności zdenaturowanego białka w obecności argininy wynika z hydrofobowego oddziaływania tego związku z aminokwasami łańcucha polipeptydowego [1,6]. Grupa guanidynowa argininy oddziałuje z resztami tryptofanu łańcucha polipeptydowego, co prawdopodobnie zwiększa rozpuszczalność białek i zmniejsza ryzyko tworzenia agregatów [1,33].

Detergenty znajdujące się w roztworach do renaturacji również skutecznie zmniejszają agregację białka. NDBS 201, to związek pozbawiony hydrofobowego łańcucha, charakterystycznego dla detergentów, co jest powodem jego używania w renaturacji białek w wysokim stężeniu.

Kofaktory, takie jak jony cynku i miedzi, mogą stabilizować białka już na poziomie intermediatów ich fałdowania [20].

Równie istotnym procesem jak działania antyagregacyjne jest zapewnienie odpowiednich warunków do tworzenia mostków disiarczkowych. Białka, które mają liczne wiązania typu -S-S- wymagają środowiska zawierającego związki utleniające i redukujące. Pozwala to na prawidłowe formowanie ww. wiązań w fałdujących cząsteczkach. Najprostszym sposobem utleniania białek jest wykorzystanie tlenu atmosferycznego w obecności metali, jako katalizatorów. Najczęściej stosowane są pary związków tiolowych, np. GSH/GSSH, DTT/GSSH oraz cysteina/cystyna w stężeniu 5–15 mM. Jednocześnie stosunek ilościowy postaci zredukowanej do utlenionej nie powinien przekraczać 1:1 lub 5:1 [4,20,33,41]. Stwierdzono, że bardziej skutecznym od omawianych wyżej związków w tworzeniu natywnych mostków disiarczkowych jest BMC, który naśladuje działanie izomerazy disiarczkowej (PDI). W refałdowaniu białek niezawierających w cząsteczce wiązań typu -S-S- stosuje się TCEP. Związek ten jest nietiolowym reduktorem działającym znacznie silniej niż powszechnie używany DTT. Zapobiega on formowaniu wewnątrz cząsteczki nieswoistych wiązań disiarczkowych, które mogą zaburzać prawidłową konformację białka [36].

### 3.3.3. Zastosowanie czynników biologicznych do refałdowania *in vitro*

W laboratoriach coraz częściej tworzy się warunki, które naśladują proces fałdowania białek *in vivo*. W tym celu wykorzystuje się białka opiekuńcze (chaperony) i inne białka wspomagające proces fałdowania (foldazy) [17,43]. W komórkach odgrywają one zasadniczą rolę w procesie fałdowania nowo syntetyzowanych białek, ułatwiając łańcuchom polipeptydowym przyjęcie prawidłowej konformacji. Białka opiekuńcze ograniczają nieswoiste oddziaływania w obrębie łańcuchów polipeptydowych i między nimi [15]. Uczestniczą również w właściwej dystrybucji białek

w komórce oraz reaktywacji już zagregowanych polipeptydów. Dodatkowo białka opiekuńcze uczestniczą w translokacji białek poprzez membrany oraz chronią białka komórkowe w sytuacjach stresowych poprzez hamowanie ich agregacji [2,14,15,20,24,25,26,49].

#### a) Białka opiekuńcze – chaperony

W procesie renaturacji białek najczęściej wykorzystywane są chaperony bakteryjne: GroEL/GroES, DnaK/DnaJ/GrpE i ClpA/ClpB [4].

W zależności od pełnionej funkcji, białka opiekuńcze możemy podzielić na dwie grupy. Pierwszą stanowią białka, które wiążąc się do nieprawidłowo zwiniętych polipeptydów, zapobiegają ich agregacji. Są to tzw. „holder chaperones”, do których należą IbpA i IbpB. Do drugiej grupy należą „folder chaperones”, m.in. systemy DnaK/J i GroEL/ES, które uczestniczą w formowaniu właściwej konformacji polipeptydów. Zastosowanie białek opiekuńczych w procesie renaturacji ogranicza wysoki koszt (niezbędne jest ich wysokie stężenie) oraz konieczność ich usunięcia z roztworu po zakończeniu renaturacji. Dlatego stosowanie chaperonów w procesach na dużą skalę jest mało opłacalne [22,31]. Odmienne zestawy białek opiekuńczych mogą w różny sposób wpływać na proces fałdowania różnych białek, tak więc ich wybór należy ustalić eksperymentalnie [22].

Wysoki koszt stosowania chaperonów można obniżyć immobilizując je na stałych nośnikach i/lub wykorzystując tzw. sztuczne chaperony (np. cyklodekstrynę) [17,41]. Ułatwia to i przyspiesza izolację oraz oczyszczanie produktów renaturacji, a także umożliwia ponowne użycie unieruchomionych białek. Cyklodekstryna pozwala na wykorzystanie detergentów do rozpuszczania ciał inkluzyjnych. Tworzą odwracalne kompleksy z hydrofobowymi łatkami na powierzchni zdenaturowanych białek, zapobiegając ich agregacji i zwiększając w ten sposób wydajność procesu renaturacji. Mimo wyżej wymienionych zalet, reaktywacja z zastosowaniem immobilizowanych sztucznych chaperonów jest mniej wydajna niż w przypadku rozpuszczalnych form tych cząsteczek [37].

#### b) Inne białka wspomagające proces fałdowania – foldazy

Podczas gdy chaperony sprzyjają odpowiedniemu fałdowaniu, foldazy mogą ułatwiać ten proces. Enzymy te wspomagają m.in. tworzenie i rozmieszczenie mostków disiarczkowych w obrębie fałdujących cząsteczek białka. Do najczęściej wykorzystywanych foldaz w refałdowaniu należą: izomeraza prolinowa cis/trans (PPI), oksydoreduktaza disiarczkowa (DsbA), izomeraza disiarczkowa (DsbC) oraz izomeraza disiarczkowa białek (PDI) [4,48].

#### c) Propeptydy

Innym sposobem zwiększania wydajności refałdowania jest wykorzystanie tzw. propeptydów. Są to fragmenty łańcucha białkowego zwykle umiejscowione między sekwencją sygnałową, a dojrzałą częścią łańcucha białkowego. *In vivo* propeptydy wspomagają proces prawidłowego zwijania się białek. Badania *in vitro* wykazały, że

propeptydy mogą zwiększać wydajność refaldowania zarówno, gdy są syntetyzowane wraz z łańcuchem polipeptydowym, jak i wtedy, gdy są oddzielnie dodawane do buforu renaturacyjnego [41].

Podczas syntezy *in vivo* lub tuż po jej zakończeniu wiele białek jest transportowanych przez dwuwarstwową błonę. Proces ten można naśladować stosując trójfazowy system refaldowania. Fazę górną stanowi roztwór organiczny oddzielony od buforu do renaturacji (faza dolna) za pomocą oleju parafinowego (faza środkowa), który pełni rolę „membrany”. W takim układzie zdenaturowane białko dodaje się do fazy górnej i poprzez wirowanie zmusza do przejścia przez warstwę parafiny do fazy dolnej [41].

#### 4. TECHNIKI RENATURACJI

W ostatnich latach opracowano wiele metod renaturacji białek izolowanych z ciał inkluzyjnych. Do najpowszechniej stosowanych należą:

- refaldowanie przez rozcieńczenie,
- metoda dializy,
- renaturacja białek związanych z fazą stałą.

Procesy te polegają na fizycznym oddzieleniu cząsteczek fałdowanych łańcuchów polipeptydowych. Pozwala to na redukcję oddziaływań białko-białko, co zmniejsza agregację i w efekcie zwiększa odzysk aktywnych cząsteczek [19,33]. Wybór metody zależy od skłonności białka do agregacji oraz kinetyki refaldowania [4].

##### 4.1. Renaturacja metodą rozcieńczenia

Jest to najprostsza i zarazem najczęściej stosowana metoda renaturacji białek. Polega ona na silnym rozcieńczeniu roztworu zdenaturowanych ciał inkluzyjnych buforem do refaldowania. Umożliwia to prawidłowe fałdowanie łańcuchów polipeptydowych i przyjęcie natywnej konformacji. Gwałtowne obniżenie stężenia związków denaturujących, w których rozpuszczone zostały ciała inkluzyjne oraz znaczne obniżenie stężenia renaturowanego białka (do 1–10 µg/ml) zapobiegają powstawaniu wewnątrz- i międzycząsteczkowych oddziaływań i tym samym agregacji [17,19,44]. Odpowiednia temperatura oraz czas trwania jego reaktywacji pozwalają na uzyskanie prawidłowo sfałdowanych i aktywnych katalitycznie białek.

Metoda ta jest czasochłonna, a ze względu na bardzo niskie stężenia białka mało wydajna. Wymaga użycia dużych zbiorników, ogromnej ilości buforu, a po renaturacji wielu dodatkowych etapów zagęszczania i oczyszczania białka. Wiąże się to z wysokimi kosztami [19,31]. Z tych powodów reaktywacja przez rozcieńczenie z powodzeniem stosowana jest w warunkach laboratoryjnych, jednak nie stosuje się jej na skalę przemysłową [17,19,23,31].

Odmianą refaldowania przez rozcieńczenie jest tzw. renaturacja pulsacyjna. Polega na dodawaniu do buforu renaturacyjnego zdenaturowanych i rozpuszczonych IB nie jednorazowo, ale małymi porcjami [20,31,33]. Odstępy czasowe między kolejnymi porcjami dodawanego białka muszą być ustalone doświadczalnie. Zakłada się, że mała ilość zdenaturowanego białka łatwiej przyjmuje natywną konformację, a prawidłowo zwinięte cząsteczki nie tworzą

agregatów z niesfałdowanymi peptydami. Ten sposób prowadzenia renaturacji umożliwia znaczne zwiększenie końcowego stężenia białka w buforze do refaldowania [41].

Alternatywą do wyżej opisanej metody jest tzw. odwrotne rozcieńczenie. W metodzie tej bufor renaturujący jest dodawany do zdenaturowanych białek. Prowadzi to do jednoczesnego, stopniowego obniżania tak stężenia refoldowanych białek, jak i związków denaturujących [9].

##### 4.2. Renaturacja metodą dializy

W metodzie tej zdenaturowane białko dializowane jest do buforu renaturującego zawierającego czynniki sprzyjające prawidłowemu fałdowaniu łańcuchów polipeptydowych. Podczas tego procesu stężenie denaturanta jest stopniowo zmniejszane, co umożliwia przyjęcie przez białka właściwej konformacji [4,40].

Dializa nie wymaga użycia dużych ilości buforów, a stosowane stężenia białka mogą być znacznie wyższe niż w przypadku rozcieńczenia. Przez to metoda ta może być znacznie wydajniejsza od omawianej poprzednio. Jednak zbyt szybkie usuwanie związków denaturujących i/lub zbyt wysokie stężenie denaturowanych białek mogą sprzyjać agregacji niesfałdowanych lub częściowo sfałdowanych cząsteczek [4,31,44]. Dobór parametrów zależy od rodzaju białka i powinien zostać wyznaczony eksperymentalnie. Ponadto wydajność renaturacji może obniżyć również nieswoista adsorpcja białek na membranie dializacyjnej [19,31,41].

Odmianą powyższej metody jest dializa roztworu białka do serii buforów o malejącym stężeniu składników denaturujących [4]. Takie stopniowe i powolne obniżanie stężenia denaturantów zmniejsza ryzyko agregacji niesfałdowanych łańcuchów polipeptydowych, jednak znacznie wydłuża czas prowadzonego procesu.

##### 4.3. Renaturacja z zastosowaniem chromatografii kolumnowej

Do renaturacji rekombinowanych białek izolowanych z ciał inkluzyjnych stosuje się również chromatografię. Początkowo metoda ta była wykorzystywana tylko wtedy, gdy inne sposoby (rozcieńczenie lub dializa) były nieskuteczne. Obecnie ten sposób renaturacji białek jest stosowany coraz częściej. Istotą reaktywacji na kolumnie jest związanie zdenaturowanych polipeptydów z wybranym złożem chromatograficznym. Pozwala to na fizyczne oddzielenie od siebie cząsteczek zdenaturowanego białka o wysokiej hydrofobowości. Następnie, w celu usunięcia substancji denaturującej z kolumny, przemywa się ją buforem do renaturacji [17,31,43,44]. Modyfikacją tej metody jest zastosowanie chromatografii z malejącym gradientem stężenia denaturanta przy jednoczesnym rosnącym stężeniu buforu renaturacyjnego. Stopniowe wymywanie substancji chaotropowej zapobiega ponownej agregacji białek i sprawia, że renaturacja przebiega w łagodnych warunkach. Końcowym etapem procesu jest wymywanie sfałdowanego białka z kolumny za pomocą czynników wykazujących wyższe powinowactwo do nośnika [4,16,41].

Podstawową zaletą renaturacji białek na kolumnie jest fizyczny rozdział niesfałdowanych i częściowo sfałdowanych

cząstek związanych z nośnikiem [19,31,33,44]. Umożliwia to prowadzenie całego procesu przy znacznie wyższych stężeniach białka niż w przypadku wcześniej opisanych metod. Przerzeczna separacja poszczególnych intermediatów zapobiega oddziaływaniom o charakterze białko-białko i tym samym zmniejsza agregację i zwiększa wydajność procesu [16,19]. Dodatkowo poprawnie sfałdowane cząsteczki są oddzielane od agregatów, które mogą zostać poddane renaturacji powtórnie, zwiększając końcowy odzysk zrenaturowanych białek [16]. Ponadto refaldowanie na kolumnie pozwala na jednoczesne oczyszczanie preparatu, dlatego możliwe jest nakładanie surowych, nieoczyszczonych homogenatów komórkowych [12,17,41]. Dodatkowym atutem tej metody jest możliwość automatyzacji i łatwe zwiększenie skali całego procesu, co może mieć znaczący wpływ na jego wykorzystanie na skalę przemysłową.

Do najczęściej stosowanych technik renaturacji z udziałem chromatografii należą: sączenie molekularne oraz chromatografie: jonowymienna, hydrofobowa i powinowactwa. Najpowszechniej stosuje się nośniki jonowymiennie,

głównie ze względu na ich dużą pojemność wiązania białek oraz możliwość dokładnej kontroli procesu.

## 5. PODSUMOWANIE

Ciała inkluzyjne są bogatym źródłem wielu białek wykorzystywanych w medycynie i eksperymentach naukowych. Ograniczeniem szerokiego stosowania tych białek jest brak wydajnych i uniwersalnych metod ich renaturacji. Każde rekombinowane białko wymaga indywidualnego określenia optymalnych parametrów renaturacji, które umożliwią prawidłowe fałdowanie łańcucha polipeptydowego. Techniki skojarzone z „sztucznymi chaperonami” (cyklodekstrynami) pozwalają na stosunkowo szybkie i precyzyjne opracowanie metod formowania poprawnej struktury białek.

Naszym zdaniem z przedstawionych wyżej procedur renaturacji najbardziej przyszłościowe są metody wykorzystujące chromatografię, które pozwalają na oczyszczenie w tym samym eksperymencie, poprzez separację, białek poprawnie zwiniętych od zdenaturowanych.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Arakawa T., Ejima D., Tsumoto K., Obeyama N., Tanaka Y., Kita Y., Timasheff S.N.: Suppression of protein interactions by arginine: a proposed mechanism of the arginine effects. *Biophys. Chem.*, 2007; 127: 1–8
- [2] Ben-Zvi A., De Los Rios P., Dietler G., Goloubinoff P.: Active solubilization and refolding of stable protein aggregates by cooperative unfolding action of individual Hsp70 chaperones. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 37298–37303
- [3] Cabrera L.D., Bottomley S.P.: Protein expression and refolding – a practical guide to getting the most out of inclusion bodies. *Biotechnol. Annu. Rev.*, 2004; 10: 31–50
- [4] Cabrera L.D., Chow M.K., Bottomley S.P.: A practical guide to protein expression and refolding from inclusion bodies. *Biotechnology*, 2004; 10: 1–15
- [5] Carrió M.M., Villaverde A.: Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. *J. Biotechnol.*, 2002; 96: 3–12
- [6] Chen J., Liu Y., Wang Y., Ding H., Su Z.: Different effects of L-arginine on protein refolding: Suppressing aggregates of hydrophobic interaction, not covalent binding. *Biotechnol. Prog.*, 2008; 24: 1365–1372
- [7] Chou C.P.: Engineering cell physiology to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007; 76: 521–532
- [8] Chow M.K., Amin A.A., Fulton K.F., Whisstock J.C., Buckle A.M., Bottomley S.P.: REFOLD: an analytical database of protein refolding methods. *Protein Expr. Purif.*, 2006; 46: 166–171
- [9] Clark E.D.: Protein refolding for industrial processes. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2001; 12: 202–207
- [10] Crisman R.L., Randolph T.W.: Refolding of proteins from inclusion bodies is favored by a diminished hydrophobic effect at elevated pressures. *Biotechnol. Bioeng.*, 2008; 102: 483–492
- [11] Fahner B., Lilie H., Neubauer P.: Inclusion bodies: formation and utilization. *Adv Biochem. Eng. Biotechnol.*, 2004; 89: 93–142
- [12] Fan X., Xu D., Lu B., Xia J., Wei D.: Refolding and purification of rhNTA protein by chromatography. *Biomed. Chromatogr.*, 2009; 23: 257–266
- [13] Georgiou G., Valax P., Ostermeier M., Horowitz P.M.: Folding and aggregation of TEM  $\beta$ -lactamase: Analogies with the formation of inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Protein Sci.*, 1994; 11: 1953–1960
- [14] Goloubinoff P., Mogk A., Zvi A.P., Tomoyasu T., Bukau B.: Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999; 96: 13732–13737
- [15] Hendrick J.P., Hartl F.U.: The role of molecular chaperones in protein folding. *FASEB J.*, 1995; 9: 1559–1569
- [16] Hutchinson M.H., Chase H.A.: Adsorptive refolding of histidine-tagged glutathione S-transferase using metal affinity chromatography. *J. Chromatogr. A.*, 2006; 1128: 125–132
- [17] Jungbauer A., Kaar W.: Current status of technical protein refolding. *J. Biotechnol.*, 2007; 128: 587–596
- [18] Kędzierska S.: Rola białek opiekuńczych *Escherichia coli* w ochronie komórki bakteryjnej przed nieodwracalną agregacją białek indukowaną termicznie. *Postępy Biochem.*, 2005; 51: 146–153
- [19] Li M., Su Z.G., Janson J.C.: *In vitro* protein refolding by chromatographic procedures. *Protein Expr. Purif.*, 2004; 33: 1–10
- [20] Lilie H., Schwarz E., Rudolph R.: Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1998; 9: 497–501
- [21] Mannall G.J., Titchener-Hooker N.J., Dalby P.A.: Factors affecting protein refolding yields in a fed-batch and batch-refolding system. *Biotechnol. Bioeng.*, 2007; 97: 1523–1534
- [22] Marco A., Deuerling E., Mogk A., Tomoyasu T., Bukau B.: Chaperone-based procedure to increase yields of soluble recombinant proteins produced in *E. coli*. *BMC Biotechnol.*, 2007; 7: 32
- [23] Middelberg A.P.: Preparative protein refolding. *Trends Biotechnol.*, 2002; 20: 437–443
- [24] Mogk A., Schlieker C., Friedrich K.L., Schönfeld H.J., Vierling E., Bukau B.: Refolding of substrates bound to small Hsps relies on a disaggregation reaction mediated most efficiently by ClpB/DnaK. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 31033–31042
- [25] Mogk A., Tomoyasu T., Goloubinoff P., Rüdiger S., Röder D., Langen H., Bukau B.: Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. *EMBO J.*, 1999; 18: 6934–6949
- [26] Nam S.H., Walsh M.K.: Characterization of interaction between *Escherichia coli* molecular chaperones and immobilized caseins. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 2003; 33: 321–339
- [27] Nuc P., Nuc K.: Produkcja rekombinowanych białek w *Escherichia coli*. *Postępy Biochem.*, 2006; 52: 448–456
- [28] Qoronfleh M.W., Hesterberg L.K., Seefeldt M.B.: Confronting high-throughput protein refolding using high pressure and solution screens. *Protein Expr. Purif.*, 2007; 55: 209–224
- [29] Rai M., Padh H.: Expression systems for production of heterologous proteins. *Curr. Sci.*, 2001; 80: 1121–1128
- [30] Rudolph R., Lilie H.: *In vitro* folding of inclusion body proteins. *FASEB J.*, 1996; 50: 49–56
- [31] Sahdev S., Khattar S.K., Saini K.S.: Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Mol. Cell. Biochem.*, 2008; 307: 249–264
- [32] Seckler R., Jaenicke R.: Protein folding and protein refolding. *FASEB J.*, 1992; 6: 2545–2552

- [33] Singh S.M., Panda A.K.: Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J. Biosci. Bioeng.*, 2005; 99: 303–310
- [34] Staroń A., Grabowska A., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Nadprodukcja i oczyszczanie rekombinowanych, heterologicznych białek w komórkach *Escherichia coli*. *Postępy Mikrobiol.*, 2008; 47: 83–95
- [35] Swartz J.R.: Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2001; 12: 195–201
- [36] Swope Willis M., Hogan J.K., Prabhakar P., Liu X., Tsai K., Wei Y., Fox T.: Investigation of protein refolding using a fractional factorial screen: A study of reagent effects and interactions. *Protein Sci.*, 2005; 14: 1818–1826
- [37] Świętnicki W.: Folding aggregated proteins into functionally active forms. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2006; 17: 367–372
- [38] Tate C.G., Haase J., Baker C., Boorsma M., Magnani F., Vallis Y., Williams D.C.: Comparison of seven different heterologous protein expression systems for the production of the serotonin transporter. *Biochim. Biophys. Acta*, 2003; 1610: 141–153
- [39] Terpe K.: Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006; 72: 211–222
- [40] Tsumoto K., Ejima D., Kumagai I., Arakawa T.: Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expr. Purif.*, 2003; 28: 1–8
- [41] Vallejo L.F., Rinas U.: Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Micro. Cell. Fact.*, 2004; 3: 1–12
- [42] Ventura S., Villaverde A.: Protein quality in bacterial inclusion bodies. *Trends Biotechnol.*, 2006; 24: 179–185
- [43] Villaverde A., Carrió M.M.: Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnol. Lett.*, 2003; 25: 1385–1395
- [44] Vincentelli R., Canaan S., Campanacci V., Valencia C., Maurin D., Frassinetti R., Scappucini-Calvo L., Bourne Y., Cambillau C., Bignon C.: High-throughput automated refolding screening of inclusion bodies. *Protein Sci.*, 2004; 13: 2782–2792
- [45] Wang L.: Towards revealing the structure of bacterial inclusion bodies. *Prion*, 2009; 3: 139–145
- [46] Wang L., Maji S.K., Sawaya M.R., Eisenberg D., Riek R.: Bacterial inclusion bodies contain amyloid-like structure. *PLoS Biol.*, 2008; 6: e195
- [47] Wulfson A.N., Tikhonov R.V., Pechenov S.E.: A general approach to renaturation of recombinant proteins produced as inclusion bodies. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 2001; 380: 329–331
- [48] Zhao T.J., Ou W.B., Xie Q., Liu Y., Yan Y.B., Zhou H.M.: Catalysis of creatine kinase refolding by protein disulfide isomerase involves disulfide cross-link and dimer to tetramer switch. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 13470–13476
- [49] Ziętkiewicz S., Krzewska J., Liberek K.: Successive and synergistic action of the Hsp70 and Hsp100 chaperones in protein disaggregation. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 44376–44383

---

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.