

# Uporabnost bakterijskih beljakovinskih agregatov v farmaciji

## Applicability of bacterial protein aggregates in pharmaceutical industry

Špela Jalen, Špela Peternel, Katarina Fidler, Simona Jevševar

**Povzetek:** Bakterija *Escherichia coli* je eden najbolj preučenih mikroorganizmov, ki kljub nekaterim slabostim ostaja eden glavnih organizmov za produkcijo rekombinantnih beljakovin. Ob prekomerni ekspresiji se beljakovine pogosto kopičijo v obliki inkluzijskih teles. Vse več raziskav pa kaže, da kopičenje beljakovin v bakterijah ne pomeni nujno izgube biološke aktivnosti beljakovin, kot je veljalo še nekaj let nazaj, kar lahko koristno uporabimo v procesih izolacije tarčne beljakovine. Poleg tega lahko predstavljajo bakterijski beljakovinski agregati tudi model za preučevanje nastanka konformacijskih bolezni pri ljudeh.

**Ključne besede:** *Escherichia coli*, inkluzijska telesa, neklasična inkluzijska telesa, rekombinantne beljakovine

**Abstract:** Bacteria *Escherichia coli* is genetically well characterized microorganism and frequently used as host organism for recombinant protein production, despite some deficiencies. When overexpressed, homologous as well as heterologous proteins often form inclusion bodies (IBs) in *E. coli*. Recent studies show that aggregation does not necessarily inactivate target protein, as was believed for a long time and this fact can be used as an advantage in recombinant protein production and isolation. Bacterial protein aggregates can also be used as a model for studies of human conformational diseases.

**Key words:** *Escherichia coli*, inclusion bodies, non-classical inclusion bodies, recombinant proteins

## 1 Uvod

Začetki biotehnologije segajo v 70-leta prejšnjega stoletja, ko se je z razvojem rekombinantne tehnologije DNA odprlo novo področje pridobivanja farmacevtskih učinkovin. Biotehnologija rekombinantne DNA nam v teoriji omogoča, da vzamemo katerikoli gen in ga izrazimo v poljubnem organizmu. Na ta način lahko s pomočjo gostiteljskih organizmov pridobivamo uporabne produkte (antibiotike, vitamine, encime...), tudi takšne, ki jih iz naravnih virov ne moremo dobiti v dovolj velikih količinah ali jih ne moremo pridobivati s kemijsko sintezo.

Prva rekombinantna beljakovina, ki se je na tržišču pojavila v začetku osemdesetih, let je bil inzulin, pridobljen v bakteriji *Escherichia coli*. Zdaj pa biofarmacevtiki, definirani kot rekombinantne beljakovine in monoklonska protitelesa ali produkti, ki temeljijo na nukleinskih kislinah (1), predstavljajo že velik del svetovnega farmacevtskega trga, njihov delež pa se še vedno povečuje (2).

## 2 Pridobivanje rekombinantnih beljakovin v bakteriji *Escherichia coli*

Čeprav se danes v biotehnologiji poleg bakterij uporabljajo tudi drugi organizmi, najpogosteje kvasovke, sesalske in insektno celične linije

(3), so bakterije za pridobivanje rekombinantnih beljakovin še vedno zelo zanimive tako v laboratorijskem, kot tudi industrijskem merilu. Odločitev, kateri ekspresijski sistem bomo uporabili, namreč temelji na vrsti željene beljakovine in kompromisu med produktivnostjo, priločnostjo, varnostjo in stroški posameznega sistema (Preglednica 1). Gojenje mikroorganizmov je poceni, uporaba je relativno varna, poleg tega pa lahko z visoko ekspresijskimi sistemi in visoko gostotnimi fermentacijami pridobimo velike količine čistega produkta z relativno nizkimi stroški – tudi do 8,5 g beljakovine inzulinu podoben rastni faktor I (insulin like growth factor-I, IGF-I) na liter fermentacijske brozge, kar predstavlja največjo do sedaj poznano produktivnost (4). *Escherichia coli* (v nadaljevanju *E. coli*) je bakterija, ki se najpogosteje uporablja za produkcijo heteroloških beljakovin.

Večina težav, vezanih na produkcijo evkariontskih beljakovin v bakterijah, se pojavlja zaradi razlik med evkarionti in prokarionti. Težave lahko predstavlja različna frekvenca rabe kodonov pri prokariontih in evkariontih, toksičnost evkariontske beljakovine za gostiteljsko celico, proteazna aktivnost gostitelja in nezmožnost bakterij za posttranslacijske modifikacije beljakovin. Zaradi redukcijskega okolja v citoplazmi pa je pogosto tudi nepravilno zvijanje tarčne beljakovine v citoplazmi (5). Nepravilno zvijanje tarčnih beljakovin v visoko ekspresijskih sistemih pogosto vodi do nalaganja le teh v obliki inkluzijskih teles (v nadaljevanju IT, Slika 1). Kljub

**Preglednica 1.** Pregled pogosto uporabljenih ekspresijskih sistemov (Povzeto po 3).

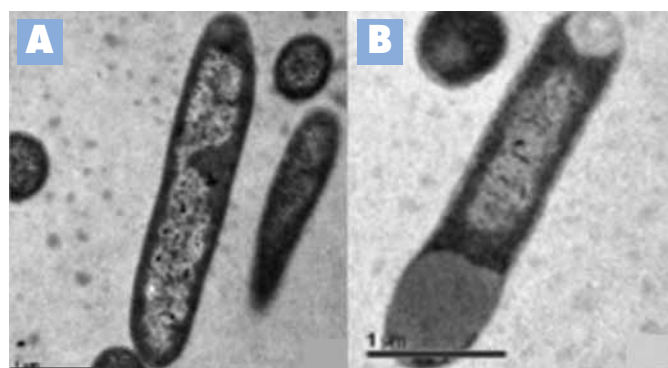
**Table 1.** Expression systems in common use (3).

Ekspresijski sistem	Stroški	Produktivnost	Varnost	Posttranslacijske modifikacije		
				Zvijanje beljakovin	Glikozilacija	Biološka zdravila na tržišču
<i>E. coli</i> in druge bakterije	Nizki	Visoka	Varna	Pogosto potrebno ponovno zvijanje	-	+
Kvasovke	Nizki	Nizka-visoka	Varna	Pogosto potrebno ponovno zvijanje	+ (visoko manozna)	+
Insektne celice	Visoki	Nizka-visoka	Manj varna	Pravilno zvijanje	+	-
Sesalske celice	Visoki	Nizka	Manj varna	Pravilno zvijanje	+	+

nekaterim znanim prijemom za zmanjšanje tvorbe IT (koekspresija molekularnih spremljevalcev, zmanjšanje temperature gojenja), IT še vedno predstavljajo ozko grlo pri pridobivanju beljakovin v bakterijah. Poznavanje mehanizmov tvorbe IT pa je pomembno tako za biotehnologijo, kot za razumevanje nastanka in razvoja nekaterih boleznih ljudi in živali. Agregacija beljakovin v obliki amiloidnih fibril ali plakov v centralnem živčnem sistemu in različnih perifernih tkivih namreč vodi v več kot dvajset degenerativnih boleznih, kot so Alzheimerjeva bolezen, Parkinsonova, prionske bolezni, sistemske amiloidoze ipd (6). Kljub temu, da mehanizem poteka neurodegenerativnih boleznih še ni popolnoma znan, pa je zelo verjetno, da amiloidne fibrile oz. njihovi bolj toksični prefilbrilirani agregati, prekinajo celično homeostazo kalcijevih ionov, kar vodi v apoptozo živčnih celic. Razumevanje mehanizmov nastanka IT na modelnih beljakovinah v *E. coli* bi lahko pripomoglo k razvoju novih načinov zdravljenja, saj so nedavno pokazali podobnosti med amiloidogenezo in formacijo inkluzijskih teles (7, 8).

### 3 Klasična inkluzijska telesa

Inkluzijska telesa lahko nastajajo v citoplazmi ali periplazemskem prostoru. Tvorila naj bi se zaradi stresnih razmer v okolju celice. Višja



**Slika 1:** Bakterije *E. coli* brez inkluzijskih teles pod elektronskim mikroskopom (A). Bakterija *E. coli* pod elektronskim mikroskopom. Inkluzijsko telo je vidno kot odebelitev in drugačna gostota celice (B).

**Figure 1:** *E. coli* cell without inclusion bodies viewed under transmission electron microscope (A). Inclusion body is seen as slightly expanded and optically denser structure in *E. coli* cell viewed under transmission electron microscope (B).

temperatura gojenja bakterijskih celic, višje koncentracije soli v gojišču in manjše prezračevanje povečajo razmerje netopnih in topnih tarčnih beljakovin (9). Večina literarnih podatkov obravnava IT kot netopne agregate, ki nimajo biološke aktivnosti (10-12). Sestavljena so predvsem iz nepravilno ali delno zvite tarčne beljakovine, poleg tega pa so vanje vključene tudi citoplazmatske beljakovine, beljakovine zunanje membrane, fosfolipidi in celo nukleinske kisline (13). Inkluzijska telesa so dobrodošla, kadar je beljakovina toksična za celico, v njih pa naj bi bila tudi delno zaščitena proti gostiteljskim proteazam, čeprav nekatera literatura navaja, da so tudi inkluzijska telesa lahko podvržena proteolitični aktivnosti gostitelja (14).

Nekateri vplivi, ki sprožijo nastanek IT, so že poznani, a mnogo pojavov še ni raziskanih (15). Pogosto navajajo, da so glavni vzrok za agregacijo medsebojne interakcije med hidrofobnimi površinami novo nastajajočih intermediatov, to je beljakovin, ki še niso zavzele končne nativne konformacije (16).

#### 3.1 Pridobivanje rekombinantnih beljakovin iz inkluzijskih teles

Inkluzijska telesa so zelo primerna za izolacijo rekombinantnih beljakovin, saj jih je lahko ločiti od ostalih nečistot (ostanki celic, topna frakcija beljakovin) s centrifugiranjem, hkrati pa s tem opravimo že prvi korak čiščenja. Zato se veliko bioloških zdravil pridobiva s pomočjo *E. coli* v obliki IT (Preglednica 2), kljub temu da je pridobivanje biološko aktivne beljakovine iz IT zahteven in drag postopek, izkoristki pa so pogosto slabi. Sprva je potrebno raztapljanje IT v močnih denaturantih, nato pa sledi renaturacija in kromatografsko čiščenje beljakovine. Izolirana inkluzijska telesa speremo, raztopimo in z renaturacijo poskušamo vzpostaviti pravilno strukturo beljakovine. Renaturacijske pogoje je potrebno določiti eksperimentalno za vsako beljakovino posebej, kar predstavlja največjo težavo pri čiščenju IT. Opisanih je več postopkov za izboljšavo priprave IT. Večjo čistost IT dosežemo s pomočjo spiranja - inkluzijska telesa spiramo z nizkimi koncentracijami denaturantov (gvanidijev klorid, urea) ali detergentov (SDS, Triton X-100) (17). Večinoma raztapljamo inkluzijska telesa v močnih denaturantih (gvanidijev klorid ali urea v visokih koncentracijah), lahko pa tudi z detergenti, pri visokem pH, z visokim hidrostatskim tlakom v kombinaciji z reducentom ali v nizkih koncentracijah denaturantov. Drug zanimiv pristop je optimizacija centrifugiranja, ali zaporedna večkratna homogenizacija, ki naj bi tudi privedla do večje čistosti IT (18, 19). Pri renaturaciji moramo odstraniti denaturant in reducent ter

vzpostaviti disulfidne mostičke z redoks sistemom, ki zagotavlja oksidativno okolje (20).

**Preglednica 2:** Nekatera biološka zdravila, pridobljena iz *E. coli* v obliki inkluzijskih teles (32).

**Table 2:** Examples of biopharmaceuticals produced in *E. coli* in form of inclusion bodies (32).

Inkluzijska telesa v <i>E. coli</i>	
Biološko zdravilo <sup>a)</sup>	
tkivni plazminogeni aktivator	( <i>angl.</i> Tissue Plasminogen activator)
rh inzulin in analogi r humani rastni hormon	( <i>angl.</i> Human Growth Hormone)
h paratiroidni hormon	( <i>angl.</i> Parathyroid hormone)
rh granulocitne kolonije stimulirajoči faktor	( <i>angl.</i> Granulocyte colony stimulating factor)
r interferon $\beta$ -1b in $\gamma$ -1b	

<sup>a)</sup> rh: rekombinantni humani, r: rekombinantni, h: humani

## 4 Neklasična inkluzijska telesa

Dolgo časa je prevladovalo mnenje, da so IT netopni delci znotraj celice, ki se ves čas odlagajo kot nereaktivna usedlina. V zadnjem času opredeljujejo IT kot bolj plastične strukture (9), saj ugotavljajo, da so tudi beljakovine v IT lahko substrat za proteaze, posebej pri nekaterih stresnih pogojih (14). Najnovejša poročila pa celo nakazujejo, da gre za podobne strukture, kot so jih opisali pri amiloidih, ki so jih našli v evkariontskih celicah (21).

Vendar v IT ne najdemo vedno samo nepravilno zvith, biološko neaktivnih beljakovin in njihovih razgradnih produktov, ampak tudi biološko aktivne, torej pravilno zvite beljakovine (22). Do nedavnega je bilo le nekaj literarnih podatkov, ki so nakazovali to možnost (23-25). Novejša literatura je sicer opozarjala, da je treba pretehtati možnost pojava pravilno zvith polipeptidov v inkluzijskih telesih, medtem ko so že dolgo nazaj odkrili, da izkazuje netopna  $\beta$ -galaktozidaza v IT, ki so nastala ob visokem izražanju le-te v *E. coli*, tretjino specifične encimske aktivnosti  $\beta$ -galaktozidaze, ki se pojavlja v topni frakciji (24). Nekoliko kasneje so drugi avtorji opazili podobno visoko encimsko aktivnost IT pri visokem izražanju endoglukanaze iz *Clostridium thermocellum* v *E. coli* (23). V zadnjem času pa tudi druge skupine opažajo pravilno zvite strukturno in funkcijsko različne beljakovine v inkluzijskih telesih (26, 27). Prisotnost biološko aktivnih encimov v IT pa se lahko poleg lažje izolacije koristno izrabi tudi tako, da se suspenzija IT uporabi kot katalizator v bioprocusu (26).

Najpogosteje dokazujejo pravilno zvijanje beljakovin v IT s pomočjo primerjave spektrov pravilno zvite beljakovine in beljakovine, ki se nahaja v inkluzijskih telesih. Podatke pridobijo s tehniko imenovano infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo (FT-IR spektroskopija) (28, 29).

## 4.1 Prednosti neklasičnih inkluzijskih teles

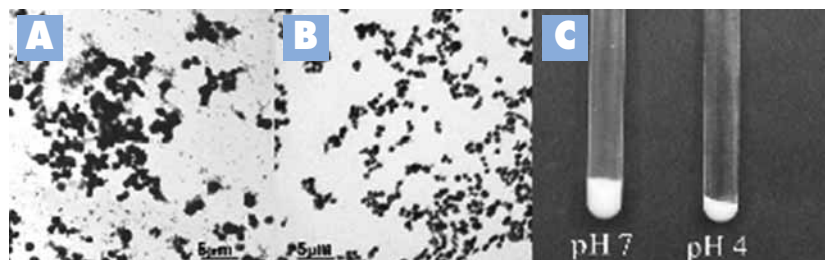
Nedavno smo v naši raziskovalni skupini pokazali, da temperatura gojenja močno vpliva na lastnosti beljakovin v inkluzijskih telesih. Pri nižji temperaturi gojenja zmanjšamo hitrost produkcije tarčne beljakovine, s tem pa ima beljakovina več časa, da se pravilno zvije. Tako pridobljena inkluzijska telesa vsebujejo pravilno zvite beljakovine, poleg tega pa se spremenijo tudi nekatere njihove lastnosti – zato smo jih poimenovali neklasična inkluzijska telesa (v nadaljevanju nkIT) (22, 30).

Neklasičnih inkluzijskih teles ne moremo spirati po klasičnih postopkih spiranja inkluzijskih teles (npr. 1% Na-deoksiholat, 2 M urea, 1% Triton X-100), saj jih zaradi njihove povečane topnosti, lahko s spiranjem izgubimo. Povečana topnost nkIT pa ni le slabost, pač pa hkrati tudi njihova največja prednost. Z ekstrakcijo s pomočjo nenedenaturirajočih raztopin (npr. 0,05 - 0,2 % sarkozil, 5 % dimetil sulfoksid (DMSO) in 0,2 % nemicelarni sulfobetain) lahko namreč iz njih izoliramo biološko aktivne beljakovine. Zaradi skrajšanega postopka izolacije se izgube tarčne beljakovine močno zmanjšajo. Izognemo pa se tudi uporabi močnih denaturantov in visokih koncentracij detergentov, kar omogoča uporabo okolju prijaznejše tehnologije.

Opazili pa smo še eno nenavadno lastnost nkIT. Ob prenosu nkIT iz nevtralnega v kisel pH se ireverzibilno skrčijo, tako na makro-, kot tudi mikroskopskem nivoju (Slika 2), zato je potrebno biti previden pri izbiri raztopin in pufrov za raztapljanje (30).

## 5 Perspektive inkluzijskih teles v biotehnologiji in medicini

Neklasična inkluzijska telesa so vse bolj uveljavljen pojem v svetovni znanstveni sferi. Tudi drugi znanstveniki ugotavljajo in poudarjajo možnost kopičenja netopnih, a biološko aktivnih beljakovinskih agregatov v *E. coli* (26). Tako inkluzijska telesa lahko predstavljajo celo prednost pri produkciji rekombinantnih beljakovin. Tarčna beljakovina lahko namreč predstavlja več kot 80 % vsebnosti IT, s centrifugiranjem pa jih ločimo od večine ostalih nečistot (ostanki celic, topna frakcija beljakovin). V primeru ekstrakcije pri nenedenaturirajočih pogojih pa že v drugem koraku dobimo iz nkIT relativno čisto, biološko aktivno beljakovino. Tako se postopek pridobivanja močno skrajša in poceni, hkrati pa je postopek tudi bolj prijazen okolju (22).



**Slika 2:** Skrčenje IT ob prenosu iz nevtralnega (A) v kisel pH (B) pod transmisijskim elektronskim mikroskopom in na makroskopskem nivoju (C).

**Figure 2:** Transfer of IBs from neutral (A) to acidic pH (B) observed under transmission electron microscope. IBs are larger at neutral pH. Contraction of IB at the macroscale (C).

Poleg izboljšane postopka izolacije beljakovin iz IT, pa se lahko biološko aktivne beljakovine v IT izkoriščajo tudi kot katalizatorji v bioprocseh (26).

Klasična in neklasična inkluzijska telesa nam lahko služijo tudi kot model nastajanja beljakovinskih vključkov v sesalskih celicah, ki so vzrok za mnoge t.i. konformacijske bolezni pri ljudeh in živalih (Alzheimerjeva bolezen, Parkinsonova bolezen, Huntingtonova bolezen...) (31). Nastajanje in razgradnja IT v bakterijski celici, kot tudi njihove lastnosti, so nam lahko v pomoč pri razvoju zdravil in novih idej za zdravljenje konformacijskih bolezni.

Zaključimo lahko, da so raziskave na področju neklasičnih inkluzijskih teles zelo pomembne, saj vodijo do novih aplikacij tako v biotehnologiji kot v medicini.

## 6 Literatura

- Walsh G. Biopharmaceuticals: recent approvals and likely directions. *Trends Biotechnol* 2005; 23: 553-558.
- Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2006. *Nat Biotechnol* 2006; 24: 769-776.
- Yin J, Li G, Ren X, Herrler G. Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *J Biotechnol* 2007; 127: 335-347.
- Joly JC, Leung WS, Swartz JR. Overexpression of *Escherichia coli* oxidoreductases increases recombinant insulin-like growth factor-I accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 2773-2777.
- Makrides SC. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 1996; 60:512-538.
- Stefani M, Dobson CM. Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J Mol Med* 2003; 81: 678-699.
- Kondo A, Kohda J, Endo Y, Shimomizu T, Kurokawa Y, Nishihara K, Yanagi H, Yura T, Fukuda H. Improvement of Productivity of Active Horseradish Peroxidase in *Escherichia coli* by coexpression of Dsb Proteins. *J Biosci Bioeng* 2000; 90: 600-606.
- Gonzales-Montalban N, Villaverde A, Aris A. Amyloid-linked cellular toxicity triggered by bacterial inclusion bodies. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 355(3): 637-642.
- Worrall DM, Goss NH The Formation of Biologically Active b-Galactosidase Inclusion Bodies in *Escherichia coli*. *Australian J Biotechnol* 1989; 3: 28-32.
- Bernardez Clark ED. Protein refolding for industrial processes. *Curr Opin Biotechnol* 2001; 12: 202-207.
- Lilje H, Schwarz E, Rudolph R. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr Opin Biotechnol* 1998; 9: 497-501.
- Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 1999; 10: 411-421.
- Valax P, Georgiou G. Molecular characterization of beta-lactamase inclusion bodies produced in *Escherichia coli*. 1. Composition. *Biotechnol Prog* 1993; 9: 539-547.
- Corchero JL, Cubarsi R, Enfors SO, Villaverde A. Limited in vivo proteolysis of aggregated proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 237: 325-330.
- Hoffmann F, Posten C, Rinas U. Kinetic model of in vivo folding and inclusion body formation in recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 2001; 72: 315-322.
- Schlieker C, Bukau B, Mogk A. Prevention and reversion of protein aggregation by molecular chaperones in the *E. coli* cytosol: implications for their applicability in biotechnology. *J Biotechnol* 2002; 96: 13-21.
- Clark ED. Protein refolding for industrial processes. *Curr Opin Biotechnol* 2001; 12: 202-207.
- Wong HH, O'Neill BK, Middelberg AP. Centrifugal processing of cell debris and inclusion bodies from recombinant *Escherichia coli*. *Bioseparation* 1997; 6: 361-372.
- Wong HH, O'Neill BK, Middelberg AP. Cumulative Sedimentation Analysis of *Escherichia coli* Debris size. *Biotechnol Bioeng* 1997; 55: 556-564.
- Villaverde A, Carrio MM. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnol Lett* 2003; 25: 1385-1395.
- Carrio MM, Villaverde A. Localization of chaperones DnaK and GroEL in bacterial inclusion bodies. *J Bacteriol* 2005; 187: 3599-3601.
- Jevsevar S, Gaberc-Porekar V, Fonda I, Podobnik B, Grdadolnik J, Menart V. Production of nonclassical inclusion bodies from which correctly folded protein can be extracted. *Biotechnol Prog* 2005; 21: 632-639.
- Tokatlidis K, Dhurjati P, Millet J, Beguin P, Aubert JP. High activity of inclusion bodies formed in *Escherichia coli* overproducing *Clostridium thermocellum* endoglucanase D. *FEBS Lett* 1991; 282: 205-208.
- Worrall DM, Goss NH. The formation of biologically active beta-galactosidase inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Aust J Biotechnol* 1989; 3: 28-32.
- Tsumoto K, Umetsu M, Kumagai I, Ejima D, Arakawa T. Solubilization of active green fluorescent protein from insoluble particles by guanidine and arginine. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 312: 1383-1386.
- Garcia-Fruitos E, Gonzalez-Montalban N, Morell M, Vera A, Ferraz RM, Aris A, Ventura S, Villaverde A. Aggregation as bacterial inclusion bodies does not imply inactivation of enzymes and fluorescent proteins. *Microb Cell Fact* 2005; 4: 27.
- Gonzalez-Montalban N, Garcia-Fruitos E, Ventura S, Aris A, Villaverde A. The chaperone DnaK controls the fractioning of functional protein between soluble and insoluble cell fractions in inclusion body-forming cells. *Microb Cell Fact* 2006; 5: 26.
- Ami D, Natalello A, Gatti-Lafranconi P, Lotti M, Doglia SM. Kinetics of inclusion body formation studied in intact cells by FT-IR spectroscopy. *FEBS Lett* 2005; 579: 3433-3436.
- Ami D, Natalello A, Taylor G, Tonon G, Maria DS. Structural analysis of protein inclusion bodies by Fourier transform infrared microspectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1764: 793-799.
- Peternel S, Jevsevar S, Bele M, Gaberc-Porekar V, Menart V. New properties of inclusion bodies with implications for biotechnology. *Biotechnol Appl Biochem* 2008; 49: 239-246.
- Stefani M, Dobson CM. Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J Mol Med* 2003; 81: 678-699.
- Graumann K, Premstaller A. Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. *Biotechnol J* 2006; 1: 164-186.