

Оценка методов ренатурации для промышленного получения рекомбинантных белков из телец включения *Escherichia coli* в биологически активной форме

П. В. Гильчук

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

*Одной из широко применяемых стратегий для получения рекомбинантных белков в клетках *E. coli* является их накопление при экспрессии в виде нерастворимых цитоплазматических агрегатов — телец включения. Преимущество такого синтеза обусловлено высокими уровнями накопления и чистоты целевого белка, а также возможностью проведения успешной ренатурации и получения активного продукта из нерастворимых агрегатов в условиях *in vitro*. Основная проблема, препятствующая индустриализации этого процесса, обусловлена отсутствием универсальных схем ренатурации, так как рефолдинг рекомбинантных белков является эмпирическим процессом и требует разработки уникальных протоколов для индивидуальных белков. Изучение основных путей агрегации, а также процессов фолдинга *in vivo* позволило разработать эффективные подходы для рефолдинга многих рекомбинантных белков. В обзоре дана оценка некоторым современным методам ренатурации белков и описаны основные стратегии, которые могут быть использованы для промышленного получения белков из бактериальных телец включения. Кратко рассмотрены недавние достижения в области ренатурации рекомбинантных белков, содержащих дисульфидные связи (окислительный рефолдинг), а также причины, вызывающие агрегацию белков в процессе ренатурации *in vitro*, и подходы, применяемые для увеличения выхода правильно ренатурированного продукта.*

Введение. Экспрессия клонированных генов в клетках прокариотов широко используется в промышленности, фармацевтике, структурных и биохимических исследованиях. Бактериальный синтез относительно недорогой, технологичный и легко воспроизводимый, кроме того, бактерии способны синтезировать целевые белки в больших количествах. В настоящее время основной экспрессионной системой, представляющей практический интерес, по-прежнему остается *E. coli* [1].

При экспрессии гетерологических генов в клетках *E. coli* часто наблюдается агрегация синтезируемых белков, приводящая к образованию цитоплаз-

матических телец включения [1—3]. Использование подобных продуцентов создает определенные сложности, связанные с необходимостью выделения целевых белков в биологически активной форме (ренатурация) для их дальнейшего применения в биологии, медицине или промышленности. Несмотря на это, экспрессия рекомбинантных белков в тельцах включения *E. coli* широко применяется на практике, так как такой синтез обладает рядом преимуществ [4—6].

В случае многих эукариотических белков, которые не могут быть синтезированы *E. coli* в их нативном виде, или белков, токсичных для бактериальной клетки, стратегия накопления белков в тельцах включения является единственным путем их промышленного получения.

Особенности синтеза белков в тельцах включения приведены ниже:

Преимущества	Недостатки
1. Высокие уровни накопления целевого белка	1. Невозможность прямого функционального анализа активности целевого белка
2. Высокая степень чистоты целевого белка	2. Необходимость эмпирической разработки оптимальных протоколов для ренатурации белка
3. Защита белка от протеолитической деградации	3. Контаминирование минорными примесями (гидрофобные белки, компоненты клеточной стенки), которые могут влиять на ренатурацию
4. Простота выделения и отделения от бактериальных белков	4. Трудность отделения активного ренатурированного белка от его олигомерных форм, продуктов неправильного фолдинга и частичного протеолиза
5. Возможность ренатурации целевого белка	
6. Отсутствие или снижение эффекта токсичности клонированного гена для штамма-производителя	

Синтез в тельцах включения получил распространение более двух десятков лет назад. Параллельно с конструированием высокоэффективных бактериальных систем экспрессии были разработаны подходы по ренатурации небольших мономерных белков. Однако существующие на то время методы рефолдинга простых белков были мало пригодными для ренатурации из телец включения *E. coli* более сложных белков эукариотов. Это обусловлено в первую очередь тем, что для эффективной ренатурации многих эукариотических белков необходимы специфические условия, обеспечивающие возможность корректной сборки молекулы на уровне третичной/четвертичной структуры и образование функциональных дисульфидных связей [7, 8]. Достаточно долго эукариотические системы казались более перспективными промышленными производителями рекомбинантных белков, поскольку при экспрессии этих белков в *E. coli* возникали трудности, связанные с выделением функционально активного продукта в случае их накопления в нерастворимой форме. Изучение особенностей агрегации, а также основных путей фолдинга полипептидов *in vivo* позволило разработать эффективные методы рефолдинга нерастворимых белков, продуцируемых в *E. coli*. Многие из этих методов защищены патентами [3, 9].

В литературе приведено много примеров, показывающих возможность эффективной ренатурации конкретных белков из бактериальных телец включения. В некоторых работах представлены методики, позволяющие выделять небольшие количества белка для структурных и биохимических исследований [10—14], в других приведены протоколы, оптимизированные для препаративного получения определенных белков в коммерческих целях [5, 6, 15].

Наиболее общая стратегия, используемая для ренатурации нерастворимых белков, включает три этапа: 1) изоляцию и очистку телец включения; 2) солюбилизацию агрегированного белка; 3) рефолдинг солюбилизированного белка.

Несмотря на относительно высокую эффективность прохождения первых двух этапов ренатурации, конечный выход целевого белка лимитируется именно повторной укладкой белковой молекулы (рефолдинг), что связано с возможностью образования неактивных форм (продукты неправильного фолдинга), а также высокомолекулярных агрегатов при приобретении белком необходимой (нативной) конформации [8]. Основная проблема, препятствующая индустриализации процесса получения рекомбинантных белков из телец включения, обусловлена отсутствием универсальных схем их рефолдинга.

Подбор условий прохождения ренатурации агрегированных белков осуществляется эмпирическим путем, и индивидуальные нерастворимые белки, продуцируемые в *E. coli*, требуют разработки уникальных протоколов для получения их в функционально активной форме и с высоким выходом. Для масштабирования в условиях производства процесса ренатурации белков необходимыми условиями являются достижение высокой степени правильно ренатурированного продукта при высокой концентрации последнего, кроме того, процесс должен быть быстрым, недорогим и высокоэффективным [4, 5].

В обзоре представлена общая стратегия ренатурации нерастворимых белков, синтезированных в *E. coli*, дана оценка методам, используемым для промышленного рефолдинга, описаны недавние достижения в области ренатурации белков, содержащих дисульфидные связи. Кратко рассмотрены причины, вызывающие агрегацию белков при ренатурации *in vitro*, и подходы, применяемые для увеличения выхода правильно ренатурированного продукта. Помимо этого приведены собственные данные по получению Fv-фрагмента из телец включения в биологически активной форме и оценке эффективности прохождения рефолдинга.

Баланс между фолдингом и агрегацией *in vitro*. Основными причинами низкого выхода целевого белка *in vitro* в растворимом виде являются процессы агрегации и образование продуктов неправильного фолдинга [8]. Агрегация — это межмолекулярный процесс, зависящий от концентрации белка в растворе. Так как агрегация приводит к снижению количества белка, изучение ее природы и путей *in vitro* может стать основой для разработки эффективных путей ренатурации и обеспечения поддержания высокой концентрации белка при прохождении рефолдинга.

В результате удаления денатурирующего реагента при прохождении рефолдинга формируются промежуточные белковые формы, содержащие экспонированные в раствор гидрофобные кластеры. Предполагают, что межмолекулярная ассоциация таких состояний молекул может служить стартовой точкой агрегационных процессов. [8, 16]. Формирующиеся переходные состояния молекул часто называют «расплавленными глобулами» и именно эти состояния молекулы определяют корректное завершение ее фолдинга, образование продуктов неправильного фолдинга или агрегацию полипептидных цепей. Такие интермедиаты обладают значительным количеством элементов вторичной структуры, в то время как элементы третичной структуры еще не сформировались. Как следствие этого, гидрофобные участки, находящиеся в норме в центре молекулы, экспонированы на поверхности. Когда такие гидрофобные кластеры отдельных полипептидных цепей реагируют между собой, происходит нарушение прохождения корректного фолдинга отдельных цепей, что приводит к их агрегации.

В результате исследований, целью которых являлось установление роли дисульфидных связей в агрегации, было показано, что некорректное спаривание цистеиновых остатков не является основной причиной образования агрегатов, поскольку агрегация — неспецифический феномен. Считают, что первопричиной формирования агрегатов являются гидрофобные взаимодействия, приводящие впоследствии к образованию межмолекулярных дисульфидных связей (ковалентная агрегация). В соответствии с этими представлениями предложена модель кластерно-кластерной мультимеризации переходных состояний белковых молекул, предполагающая мультимеризацию отдельных белковых молекул при взаимодействии их гидрофобных кластеров [17].

Исходя из вышесказанного полагают, что агрегация *in vitro* не является последовательным добавлением мономерных субъединиц к образова-

ным белковым агрегатам и не прекращается при истощении мономерных форм белка в растворе. Основываясь на гипотезе о том, что агрегация является следствием межмолекулярного взаимодействия между гидрофобными кластерами, были разработаны стратегии для снижения формирования агрегатов. На сегодня используют как минимум два подхода: теоретический компьютерный анализ гидрофобных кластеров белковой молекулы с последующей генно-инженерной заменой определенных аминокислотных остатков в полипептидной цепи [18, 19] и метод, основанный на экранировании ярко выраженных гидрофобных кластеров белковых молекул специфическими реагентами [6].

Особенности формирования цитоплазматических телец включения в бактериальной клетке. Хотя точная причина формирования бактериальных телец включения не известна, проведенные исследования допускают возможность их образования вследствие превышения предельной концентрации белка в клетке [1]. Так, разработанные высокоэффективные экспрессионные системы *E. coli* способны обеспечивать высокую скорость транскрипции и трансляции чужеродной генетической информации. В условиях индукции суперэкспрессии в бактериальной цитоплазме происходит накопление большого количества продуктов трансляции, которые могут ассоциировать быстрее, чем сформируются необходимые элементы третичной структуры белковых молекул [20]. Это приводит к преципитации синтезированного белка и образованию телец включения.

Известно, что для поддержания белков в растворимом состоянии в клетках эукариотов реализуются три основных механизма: компартиментализация продуктов трансляции, белково-белковые взаимодействия и посттрансляционные модификации [7]. Образующиеся в результате трансляции на эукариотических рибосомах полипептидные цепи не распределяются хаотически в цитоплазме, а последовательно проходят через ряд компартиментов, где происходит их фолдинг и ковалентные модификации. Отсутствие соответствующих систем распределения продуктов трансляции можно рассматривать как одну из возможных причин преципитации гетерологических белков при их экспрессии в клетках прокариотов.

Ключевым моментом образования и стабилизации третичной структуры S-S-содержащих белков является формирование дисульфидных связей [21—23]. Лактамаза и лактальбумин могут служить редкими примерами белков, сохраняющих функциональную активность как в присутствии, так и в отсутствие стабилизирующей S-S связи.

Тем не менее, даже в таких случаях дисульфидные связи определяют особенности структуры белка. Так, три тиольных остатка в молекуле лактальбумина не могут быть соединены произвольно, без потери белком функциональной активности.

Формирование и изомеризация дисульфидных связей в белках — процесс, нуждающийся в ферментативном катализе. Замыкание дисульфидной связи обычно происходит одновременно с фолдингом в эндоплазматическом ретикулуме эукариотов и периплазме грамотрицательных бактерий [22, 24]. Внутриклеточные белки *E. coli* редко содержат дисульфидные связи из-за восстанавливающего характера бактериальной цитоплазмы, обусловленного функционированием ферментативных систем, поддерживающих тиольные группы цистеиновых остатков цитоплазматических бактериальных белков в восстановленном состоянии. Окисление тиольных групп синтезируемых бактериальной клеткой белков катализируется периплазматическими белками, содержащими в активном центре SH-группы остатков цистеина. Соответственно все рекомбинантные белки, экспрессируемые в цитоплазму *E. coli*, содержат свободные SH-группы. В ряде случаев это может привести к накоплению таких белков в тельцах включения, особенно если дисульфидные связи являются элементом, стабилизирующим третичную структуру молекулы. Подобный эффект был показан при экспрессии в цитоплазме *E. coli* иммуноглобулиновых доменов (Fv), содержащих в своей структуре два цистеиновых остатка [25, 26]. Эти цистеины в норме образуют дисульфидный мостик между двумя антипараллельными β -слоями, стабилизируя характерный для данной молекулы тип пространственной укладки — «immunoglobulin fold». При экспрессии Fv клетками *E. coli* в большинстве случаев наблюдается образование цитоплазматических телец включения.

Таким образом, отсутствие компарментализации продуктов трансляции, невозможность формирования дисульфидных связей в цитоплазме, использование систем суперсинтеза при экспрессии эукариотических белков в клетках бактерий можно рассматривать как основные причины образования телец включения.

Методы солиubilизации и очистки телец включения. Клетки, содержащие тельца включения, разрушают, а растворимую белковую фракцию удаляют центрифугированием. В ряде случаев перед разрушением в клеточную суспензию вносят ферменты, например лизоцим, для повышения скорости и эффективности лизиса. Для предотвращения протеолитической дегградации используют ин-

гибиторы протеиназ, которые вносят прямо в лизирующий буфер [6].

Осажденные тельца включения промывают буфером, содержащим хаотропные реагенты в низких концентрациях (0,5—2 М гуанидин-хлорид) или детергенты (1 %-й тритон X-100, 0,1—0,5 %-й холат натрия). Этот этап необходим для удаления небелковых примесей, а также белков, которые, адсорбируясь на тельцах включения благодаря гидрофобным взаимодействиям, могут в дальнейшем влиять на прохождение рефолдинга и конечный выход целевого белка [3, 4].

Отмытые от гидрофобных примесей тельца включения солиubilизируют, используя сильные денатуранты (8 М мочевины, 6 М гуанидин-хлорид, тиоционатные соли) или детергенты (0,3—1 % SDS, 1 % бромид цетилтриметиламмония, 2 % N-лаурилсаркозин). При необходимости в солиubilизирующий буфер вносят восстанавливающие агенты (до 50 мМ 2-меркаптоэтанол, 1 мМ дитиотреитол (ДТТ), дитиоэритритол (ДЭТ) или цистеин). Для удаления ионов металлов, приводящих к нежелательному окислению тиольных групп белка, в солиubilизирующий буфер могут быть также включены хелатирующие реагенты (1—10 мМ ЭДТА, ЭГТА). Рабочую температуру во время солиubilизации белка подбирают в зависимости от состава буфера и солиubilизирующего агента. Чаще всего растворение проводят при температуре 30 °С [20].

Кроме солиubilизации в присутствии высоких концентраций денатурантов или детергентов, для растворения телец включения используют щелочные или кислые буферные растворы с крайними значениями pH в комбинации с вышеперечисленными условиями. Так, для многих белков эффективной солиubilизации можно достичь при использовании N-лаурилсаркозина и щелочных значений pH (50 мМ CAPS (3-(циклогексиламино)-1-пропансульфоновая кислота), pH 11,0) [26]. Данный принцип использовали для разработки коммерческого набора реагентов при ренатурации нерастворимых белков (Protein Refolding Kit, «Novagen», США). Показана возможность солиubilизации телец включения 70 %-й муравьиной кислотой [10].

При агрегации белка в периплазме продукт может быть получен методом солиubilизации *in situ*. При этом подходе денатурант и восстанавливающий реагент вносят в культуральную среду в конце ферментации и клеточный дебрис отделяют от растворимого материала методом двухфазной экстракции [4].

При подборе условий солиubilизации телец включения необходимо учитывать тот факт, что в процессе растворения белка может происходить его

необратимая денатурация. Это зависит от особенностей структуры индивидуальных белков. Например, солиобилизация не всех белков совместима с «экстремальными» значениями pH. При растворении в присутствии мочевины важно использовать свежеприготовленные растворы, так как при повышенной температуре и щелочных значениях pH образуются цианат-ионы, способные ковалентно модифицировать первичные аминокислоты белка. Применение SDS и других ионных детергентов для солиобилизации ограничено трудностью их удаления на последующих этапах рефолдинга [20, 28].

Предварительная промывка тельца включения растворами детергентов не позволяет полностью избавиться от сопутствующих примесей. Тельца включения могут быть в различной степени загрязнены бактериальными белками, нуклеиновыми кислотами и мембранными компонентами. В зависимости от условий экспрессии содержание целевого белка в тельцах включения составляет 60—95 %. Показано, что наличие примесей может вызывать агрегацию рекомбинантных белков при прохождении рефолдинга. Небелковые примеси оказывают незначительный эффект на процесс рефолдинга, в то время как белковые — могут существенно снижать выход целевого продукта вследствие межмолекулярных ковалентных взаимодействий и коагрегации.

Для очистки солиобилизованных рекомбинантных белков широко применяют хроматографические методы. В промышленных целях обычно используют металлхелатирующую, ионообменную, обратнофазную хроматографию, а также гель-фильтрацию [5, 6, 15, 29, 30, 31]. Преимущество данных методов состоит в возможности проведения очистки в условиях, при которых солиобилизованный белок находится в денатурированном состоянии и не образует агрегатов.

Одним из недавно предложенных оригинальных подходов, позволяющих параллельно проводить очистку от сопутствующих бактериальных белков, а также рефолдинг колоночным методом (on column refolding), является выборочная, нековалентная иммобилизация рекомбинантных белков, несущих добавленный генно-инженерным путем CBD фрагмент (cellulose binding domain) на целлюлозном сорбенте. При нанесении клеточного лизата *E. coli* в присутствии 6 М мочевины на колонку происходит выборочное связывание рекомбинантного белка, несущего CBD фрагмент, с целлюлозным матриксом, а сопутствующие белки и небелковые примеси удаляются промыванием. Иммобилизованный белок ренатурируют в линейном градиенте концентрации мочевины, а при опреде-

ленных значениях pH возможна элюция активного, высокоочищенного целевого белка с сорбента [29].

Подходы, применяемые для рефолдинга солиобилизованных белков. Рефолдинг растворенного белка инициируется удалением из солиобилизующего буфера денатуранта и (в случае необходимости) дальнейшего формирования дисульфидной связи восстанавливающего реагента. Для этих целей применяют несколько подходов, таких как разведение, диализ, диафильтрацию и колоночный метод [4, 5, 15].

Одностадийный диализ. Метод основан на относительно медленном удалении солиобилизующего реагента через мембрану с фиксированным размером пор. Рефолдинг при высоких концентрациях белка (0,1—10 мг/мл) осуществляют в присутствии реагентов, препятствующих агрегации. При низкой концентрации белка (1—100 мкг/мл) рефолдинг можно проводить и в отсутствие таких веществ.

Многостадийный (ступенчатый) диализ достигается постепенным понижением концентрации денатуранта в ренатурирующем буфере. Этот подход может быть полезен в том случае, когда промежуточные концентрации денатуранта предотвращают агрегацию и/или дестабилизируют продукты неправильного фолдинга, не влияя существенно на стабильность правильно ренатурированного белка.

Поскольку при диализе равновесие в системе устанавливается довольно долго, этот процесс редко применяют для получения препаративных количеств белка. Кроме того, при достижении промежуточных концентраций денатуранта возможна агрегация белка. Для промышленных целей более применим метод диафильтрации [5]. При данном подходе удаление денатуранта не лимитируется скоростью диффузионного процесса, однако значительные уровни накопления денатурированного белка на мембране ограничивают широкое использование этого метода.

Разведение. При рефолдинге путем разведения ренатурирующий буфер вносят прямо в раствор солиобилизованного белка [20]. Медленное внесение ренатурирующего буфера обеспечивает поддержание оптимальной для прохождения рефолдинга концентрации белка [32]. Разведение может осуществляться сразу (обратное разведение) или аликвотами (импульсное разведение). Существенным недостатком данного подхода является необходимость дальнейшего концентрирования белка из сильно разведенных растворов, а также высокое содержание продуктов неправильного фолдинга [29].

Гель-фильтрация. Быстрый и эффективный метод, с успехом использованный для ренатурации ряда белков [4, 5]. Обычно для ренатурации методом гель-фильтрации применяют буферы, содержащие денатуранты в низких концентрациях (до 1 М мочевины) и тиол/дисульфидные пары для формирования дисульфидных связей (см. ниже — *окислительный рефолдинг белков*). Однако данный подход применим только к белкам, не образующим нерастворимых промежуточных продуктов.

Колоночная ренатурация разработана как комплексный подход для оптимизации условий рефолдинга нерастворимых белков [5, 6, 15]. В этих работах показано, что агрегацию белка в растворе можно предотвратить, иммобилизуя индивидуальные полипептидные цепи на твердых носителях. Преимуществом этого метода является простота, быстрота и высокая эффективность, кроме того, при данном подходе отсутствуют ограничения, связанные с наносимыми на колонку объемами белка. Метод колоночной ренатурации высокотехнологичен, поскольку позволяет проводить эффективный рефолдинг и очистку целевого продукта в один этап.

Некоторые белки, несущие заряд при нейтральных значениях pH, могут быть иммобилизованы на ионообменных сорбентах. Связывание с ионообменником происходит в растворах денатурантов, содержащих соли в низких концентрациях. Рефолдинг достигается путем градиентного удаления денатуранта с последующей элюцией белков с сорбента при повышении концентрации солей или изменении pH. Метод ионообменной хроматографии используется только для рефолдинга небольших белков, несущих заряд в диапазоне оптимальных для ренатурации значений pH.

Для рефолдинга незаряженных белков описано использование методов обратнофазной хроматографии (RPH) и хроматографии гидрофобного взаимодействия (HIC) [5].

Наиболее универсальным подходом для оценки условий колоночной ренатурации рекомбинантных белков является иммобилизация полипептидных цепей за счет специфического связывания с сорбентом. Обычно синтезируемые бактериальной клеткой рекомбинантные белки несут добавленные генно-инженерным путем Tag-фрагменты — N-, C-концевые пептидные последовательности или белковые домены, способные к аффинному связыванию с определенными лигандами [31, 33]. Особенность некоторых Tag-фрагментов заключается в возможности связывания с лигандами в денатурирующих условиях [6, 29]. Аффинная иммобилизация на сорбенте белков, несущих фрагменты Tag,

предотвращает межмолекулярные взаимодействия белковых молекул при градиентном удалении солиоблизирующего реагента.

Наиболее перспективным с этой точки зрения является метод металлхелатирующей хроматографии, основанный на нековалентном взаимодействии 6-гистидинового фрагмента рекомбинантных белков (His-Tag) с ионами никеля (Ni^{2+}), образующими координационные связи с остатками нитрилотриуксусной кислоты. Ряд промышленных сорбентов, использующих данный принцип, выпускается фирмой «Quagen» (США). Этот подход был успешно применен для ренатурации многих нерастворимых белков [15]. Иммобилизация на сорбенте позволяет оптимизировать рефолдинг, оценивая влияние температуры, концентрации белка, pH ренатурирующего буфера, а также действие окислительно-восстановительных реагентов, двухвалентных катионов и других факторов на скорость и эффективность прохождения процесса.

Колоночный метод был успешно использован в нашей лаборатории для ренатурации ScFv (single chain antibody), синтезируемых в *E. coli* как тельца включения. В одном из случаев для получения функционально активного Fv-фрагмента к интерферону $\alpha 2b$ человека применяли комбинированный подход, основанный на последовательном использовании методов формирования дисульфидных мостиков *in vitro* и колоночной ренатурации. Мониторинг эффективности прохождения рефолдинга Fv-фрагмента проводили методом оценки способности связывать соответствующий лиганд (интерферон) при иммобилизации ренатурированного продукта на аффинной матрице, последующей элюции комплекса и определения молярного соотношения Fv/лиганд в комплексе. Эффективность прохождения рефолдинга Fv-фрагмента определяли также методом оценки связывающей способности белка в ELISA и гель-фильтрацией, корректность формирования дисульфидных мостиков проверяли методом электрофореза в неденатурирующих условиях (неопубликованные данные). Выходы целевого продукта составляли до 40 % от белка, накапливаемого в тельцах включения, что почти на порядок выше, чем при ренатурации Fv стандартными методами [28, 32]. Полученные нами оригинальные результаты по рефолдингу Fv-фрагмента являются одним из этапов цикла работ по клонированию и суперэкспрессии в *E. coli* рекомбинантных антител и представлены в заявке на патент.

Имитация шапероновой активности. Этот подход был разработан при попытке имитации действия шапероновых белков, в частности GroEL-GroES, *in vitro* [34]. Стратегия рефолдинга основа-

на на том, что к белку, который изначально находится в растворе детергента, добавляют полисахарид циклодекстрин, способный медленно связывать детергент. Данный принцип успешно использован для рефолдинга ряда белков.

Преципитация. В некоторых случаях разведение солюбилизованных мочевиной белков растворами, способствующими преципитации, могут облегчить ренатурацию [20]. Описан метод ренатурации в суспензии, основанный на использовании реагентов, применяемых для преципитации белков.

Окислительный рефолдинг белков. В случае необходимости получения белков, содержащих дисульфидные связи, ренатурирующий буфер должен обеспечивать окисление тиольных групп определенных цистеиновых остатков [2, 3, 5, 8, 35]. Это достигается следующим образом: на этапе солюбилизации вносят восстанавливающие реагенты, такие как ДТТ, которые предотвращают спонтанное окисление тиольных групп, приводящее к образованию межмолекулярных ковалентных сшивок и некорректных дисульфидов в пределах полипептидной цепи. Восстанавливающие реагенты затем удаляют диализом и в ренатурирующий буфер при необходимости вносят тиол/дисульфидные пары для катализа корректного формирования дисульфидной связи и предотвращения получения неактивных продуктов. Такая реакция происходит в два этапа. На первом этапе сульфгидрильные группы цистеинов белка, реагируя с аналогичными группами тиольных реагентов, образуют смешанный дисульфид, обеспечивающий впоследствии формирование внутримолекулярной дисульфидной связи. На протяжении этой реакции влияют многие факторы, включая инкубационную температуру, pH среды (pH 8—9 способствует образованию тиолят-аниона S⁻), конформацию и близость расположения цистеиновых остатков, а также стерическую доступность и реакционную способность тиольных групп [20]. Белки, в которых отсутствуют дисульфидные связи, могут быть солюбилизованы и ренатурированы без добавления восстанавливающих реагентов.

Для формирования дисульфидных мостиков в белках во время рефолдинга используют следующие подходы: окисление сульфгидрильных групп кислородом воздуха [28], внесение в ренатурирующий буфер окислительно-восстановительных пар или сульфонатных реагентов [6, 21, 27], окисление при повышении pH [20, 29].

Во многих работах показано, что для белков, содержащих более одной дисульфидной связи, эффективность окисления кислородом воздуха довольно низкая, сопровождается произвольным спа-

риванием цистеиновых остатков в результате внутри- и межмолекулярных взаимодействий и, кроме того, требует наличия в растворе двухвалентных катионов (Cu^{2+} , Fe^{3+}), выступающих в роли соокислителей.

Высокой степени окисления цистеиновых остатков в белках можно достичь при использовании в определенных соотношениях окисленных и восстановленных форм тиолов. Присутствие в ренатурирующем буфере этих пар способствует формированию дисульфидных связей, а также их изомеризации при образовании некорректных дисульфидов. Для таких целей наиболее часто используют низкомолекулярные тиолы—восстановленный/окисленный глутатион, ДТТ/окисленный глутатион, ДТЭ/окисленный глутатион, цистеин/цистин. Рекомендуемые концентрации для формирования дисульфидной связи составляют 1—10 мМ восстановленного тиола и соотношение восстановленной и окисленной форм от 10:1 до 3:1. Выходы корректно ренатурированного белка зависят от особенностей белковой молекулы и количества цистеиновых остатков, но в среднем они составляют 1—30%. Недостатком таких систем является высокая стоимость некоторых реагентов, в частности, окисленного глутатиона, а также высокая вероятность образования продуктов неправильного фолдинга [22].

Одним из подходов для окисления белков во время рефолдинга является формирование в растворах 8 М мочевины смешанного дисульфида между окисленным глутатионом и восстановленным белком [20]. Образование смешанного дисульфида повышает растворимость денатурированного белка за счет усиления гидрофильности полипептидной цепи. Замыкание дисульфидной связи индуцируется разведением мочевины и добавлением каталитических количеств восстановленной формы тиола на последующих этапах ренатурации. Вместо мочевины для этих же целей может быть использован 6 М гуанидин-хлорид или 1% SDS, однако использование SDS ограничивается трудностью его дальнейшего удаления.

Одним из оригинальных подходов является обеспечение корректного формирования дисульфидных мостиков в присутствии высоких концентраций детергента и каталитических количеств некоторых ионов (Cu^{2+} , Fe^{3+}). Так, для Fv-фрагмента, синтезируемого в тельцах включения, была показана возможность получения больших количеств правильно ренатурированного продукта. Это достигалось путем окисления кислородом воздуха солюбилизованного в растворах N-лаурилсаркозила белка [28]. При окислении белка в присутствии

детергента не наблюдалось формирования межмолекулярных дисульфидов, а при дальнейшем рефолдинге методом диализа из растворов мочевины окисленного в таких условиях Fv-фрагмента эффективно предотвращалась агрегация. Этими же авторами было показано, что наличие в растворе детергента обеспечивает возможность взаимодействия тиольных групп четырех цистеиновых остатков Fv-фрагмента в комбинации S_1-S_2/S_3-S_4 . Использование для рефолдинга этого же белка системы окисленный/восстановленный глутатион с последующим диализом из растворов мочевины приводило к образованию всех трех белковых форм — продуктов неправильного фолдинга, которые являлись результатом случайного внутримолекулярного спаривания сульфгидрильных групп (S_1-S_2/S_3-S_4 , S_1-S_3/S_2-S_4 , S_1-S_4/S_2-S_3), а также сильной агрегации. Как полагают авторы, данный подход применим для получения из телец включения в биологически активной форме многих белков, содержащих функциональные дисульфидные связи.

Повышение выхода правильно ренатурированного продукта. При оптимизации условий ренатурации необходимо принимать во внимание три фактора, совокупность которых будет влиять на конечный выход правильно ренатурированного белка: 1) особенности структуры белковой молекулы; 2) выбор адекватного метода рефолдинга; 3) состав ренатурирующего буфера.

Роль аминокислотного состава белка. Для подбора рН ренатурирующего буфера часто используют анализ суммарного заряда полипептидной цепи. Если заряд белковой молекулы близок к нулю, рефолдинг при нейтральных значениях рН может приводить к агрегации и низким выходам ренатурированного продукта.

Присутствие большого количества ароматических или алифатических аминокислотных остатков приводит к уменьшению растворимости белка при ренатурации вследствие агрегации промежуточных продуктов рефолдинга. Наиболее простой стратегией предотвращения образования агрегатов является использование различных низкомолекулярных реагентов. Такие молекулы, конкурируя в гидрофобных кластерах, препятствуют образованию агрегатов и могут быть легко удалены после завершения рефолдинга [3, 5, 6, 28].

Роль простетических групп. Знание необходимых кофакторов и простетических групп определенных белков может помочь в подборе состава буфера для ренатурации. Внесение в ренатурирующий буфер кофакторов, лигандов, субстратов или простетических групп в большинстве случаев способствует более эффективному прохождению ре-

фолдинга сложных белков. Например, бактериальная щелочная фосфатаза нуждается в присутствии катионов Zn^{2+} для правильного рефолдинга и катионов Mg^{2+} — для проявления полной энзиматической активности [27]. Если солюбилизированные тельца включения, в которые экспрессирована фосфатаза, диализировать против буфера, содержащего оба этих компонента, проходит эффективный рефолдинг с высоким выходом функционально активного белка. Однако использование двухвалентных катионов не рекомендуется в присутствии низкомолекулярных тиолов, так как это приводит к окислению восстанавливающего реагента.

Стабилизация продуктов рефолдинга и снижение агрегации. На способность предотвращать агрегационные процессы были тестированы разнообразные компоненты. Механизм их действия заключается в стабилизации нативного состояния конечных продуктов рефолдинга, дестабилизации продуктов неправильного фолдинга, повышении растворимости промежуточных продуктов, а также повышении растворимости солюбилизированного белка [8].

Наиболее прямой подход к минимизации агрегации состоит в понижении концентрации белка. Было показано, что оптимальная концентрация белка для обеспечения максимального эффекта рефолдинга находится в диапазоне 10—30 мкг/мл [2, 32]. Очевидно, что проведение рефолдинга белка при таких низких концентрациях нетехнологично.

Одним из подходов для снижения агрегации и проведения рефолдинга при относительно высокой концентрации белка (до 4 мг/мл) является метод «температурного скачка» [3]. Суть его состоит в том, что начальный этап рефолдинга проводят при низкой температуре, позволяющей минимизировать агрегацию, а затем быстро поднимают температуру, что обеспечивает завершение ренатурации, в то время как белковые интермедиаты, ответственные за агрегацию, выпадают в осадок.

Для некоторых белков показано, что рефолдинг может осуществляться при относительно высоких концентрациях денатуранта (до 2 М мочевины или гуанидин-хлорида), причем при данных условиях агрегаты остаются в растворенном состоянии [20, 36]. Разработаны подходы осуществления рефолдинга белка при умеренных концентрациях денатуранта [35]. В одном из них рефолдинг начинается с диализа против буфера, содержащего денатурант в высоких концентрациях (8 М мочевины) и тиол/дисульфидные реагенты. Затем проводят поэтапную замену диализного буфера на буфер, не содержащий денатуранта, но содержащий окислительно-восстановительную пару. Использование

данного подхода позволило ренатурировать с 70 %-м выходом иммуноглобулин G при конечной концентрации белка 1 мг/мл [3]. Показано, что для белков, не обладающих тенденцией агрегировать при умеренных концентрациях денатуранта, эффективным подходом для проведения рефолдинга является ступенчатый диализ. Для белков, агрегирующих при умеренных концентрациях денатуранта, более предпочтительно непосредственное разведение в ренатурирующем буфере после солюбилизации.

Некоторые аминокислоты (глицин, аргинин) проявляют хорошие солюбилизирующие способности при щелочных значениях pH. Для этих же целей применимы некоторые сахара и спирты, такие как глицерол (5–20 %), этиленгликоль, глюкоза, сахароза (10 %). Близкий эффект оказывают некоторые детергенты в очень низких концентрациях (0,1–0,5 % NP-40, 0,005 % твин-20), а также определенные анионы (фосфаты, сульфаты) и катионы (MES, HEPES). Фактически не влияя на скорость самого процесса рефолдинга, эти реагенты уменьшают вероятность образования агрегатов, участвуя в дестабилизации межмолекулярных гидрофобных взаимодействий [6]. Для облегчения рефолдинга некоторых белков рекомендуется включение солей.

Сурфактанты и детергенты могут способствовать более эффективному прохождению рефолдинга [11, 28]. Обратной стороной использования детергентов является трудность их удаления за счет формирования связанных с белковой молекулой мицелл, которые очень медленно удаляются в процессе диализа. Для их удаления используют экстракцию неорганическими растворителями или ионообменную хроматографию.

Использование шаперонов. Для разработки промышленных методов рефолдинга обсуждается возможность использования природной активности шаперонов и фолдаз *in vitro*. Показано, что некоторые шапероны, внесенные непосредственно в ренатурирующий буфер, способны обеспечивать корректный рефолдинг тех белков, которые являются для них субстратами. Однако широкое применение этого подхода ограничивается высокой стоимостью, так как отсутствуют схемы повторного использования шаперонов, а также возникает необходимость очистки рекомбинантного белка от шаперонов после проведения ренатурации [4]. Интенсивно разрабатываются подходы по использованию для ренатурации белков иммобилизованных шаперонов [37].

Индустриализация процесса рефолдинга. Многими биотехнологическими компаниями осу-

ществлена индустриализация процесса рефолдинга нерастворимых белков [4, 9]. Высокотехнологичным и наиболее перспективным направлением является использование для рефолдинга белков колоночных методов. Коммерческие хроматографические системы позволяют легко автоматизировать процесс рефолдинга белков, а также проводить автоматический скрининг оптимальных условий прохождения рефолдинга [5, 15]. Для мониторинга его успешного прохождения используют разные аналитические подходы, основанные на тестировании энзиматической активности ренатурированных белков, измерении собственной флуоресценции, определении степени агрегации [15, 38].

Одним из примеров индустриализации процесса рефолдинга является уникальная технология, разработанная фирмой «Proteom Tech. Inc.» (США). Этой фирмой создана автоматизированная система скрининга условий рефолдинга белка (the Pt-Fold Technology). С помощью этой системы фирма провела эффективный рефолдинг более 250 белков. Фирма сейчас предлагает Pt-Fold-технологию как сервис для биологических лабораторий во всем мире.

Выводы. Многие рекомбинантные белки, представляющие коммерческую ценность, при экспрессии в клетках *E. coli* образуют нерастворимые агрегаты — тельца включения. В большинстве случаев агрегированные белки могут быть солюбилизованы и ренатурированы с полным возвратом их биологической активности.

Основные проблемы, препятствующие индустриализации этого процесса, обусловлены отсутствием универсальных схем ренатурации. Подбор условий прохождения ренатурации осуществляется эмпирическим путем, и индивидуальные белки требуют разработки уникальных протоколов для получения их в функционально активной форме и с высоким выходом.

Для масштабирования в условиях производства процесса ренатурации белков необходимым условием является достижение высокой степени правильно ренатурированного продукта при высокой концентрации последнего, кроме того, процесс должен быть быстрым, недорогим и высокоэффективным.

Индустриализация процесса ренатурации возможна после оптимизации условий солюбилизации и рефолдинга целевого белка. Этого можно достичь при использовании различных стратегий, таких как оценка влияния температуры, концентрации белка, состава солюбилизирующего и ренатурирующего буферов, действия окислительно-восстановительных реагентов, двухвалентных катионов и других факторов на скорость и эффективность

проходження рефолдинга, предотвращения агрегации и образования продуктов неправильного фолдинга. Высокотехнологичным и наиболее перспективным для промышленного получения функционально активного продукта из телец включения *E. coli* является использование методов колоночной ренатурации.

Автор выражает искреннюю благодарность профессору А. И. Корнелюку за высказанные критические замечания.

P. V. Gilchuk

Evaluation of renaturation methods for industrial obtaining of recombinant proteins from *Escherichia coli* inclusion bodies in biologically active form

Summary

One of the widely used strategies for the production of recombinant proteins in *Escherichia coli* cells is their accumulation as insoluble cytoplasmic aggregates — inclusion bodies — during the expression. The advantage of such synthesis is determined by the high levels of accumulation and purity of the target protein as well as by the possibility to carry out successful renaturation and to obtain active product from insoluble aggregates under conditions in vitro. The main problem hindering industrialization of this process is caused by the absence of universal renaturation schemes, as refolding of the recombinant proteins is an empiric process and needs the development of unique protocols for individual proteins. Study on main aggregation modes and folding processes in vivo allowed developing effective approaches for the refolding of many recombinant proteins. The evaluation of some contemporary methods of protein refolding is given in the review. The main strategies, that can be used for the industrial obtaining of proteins from bacterial inclusion bodies, are discussed. Recent achievements in the area of refolding recombinant proteins that contain disulfide bonds (oxidative refolding) are briefly described. The reasons of protein aggregation in the process of in vitro renaturation as well as the approaches used for increasing yield of correctly refolded protein are analyzed.

П. В. Гільчук

Оцінка методів ренатурації для промислового отримання рекомбінантних білків із телець включення *Escherichia coli* в біологічно активній формі

Резюме

Однією із стратегій, широко використовуваних для отримання рекомбінантних білків у клітинах *E. coli*, є їхнє накопичення при експресії у вигляді нерозчинних цитоплазматичних агрегатів — телець включення. Переваги такого синтезу обумовлені високими рівнями накопичення і чистоти цільового білка в тільцях включення, а також можливістю проведення успішної ренатурації білка in vitro. Основна проблема, яка перешкоджає індустріалізації цього процесу, обумовлена відсутністю універсальних схем ренатурації, оскільки рефолдинг рекомбінантних білків залишається емпіричним процесом і потребує розробки унікальних протоколів для індивідуальних білків. Вивчення основних шляхів агрегації, а також особливостей фолдингу in vivo дозволило розробити ефективні підходи для проведення рефолдингу багатьох рекомбінантних білків. В огляді оцінено деякі сучасні методи ренатурації та описано

загальні стратегії, які можна застосовувати для промислового отримання білків із бактеріальних телець включення. Стилю проаналізовано новітні досягнення, що стосуються ренатурації рекомбінантних білків, які містять дисульфідні зв'язки (окислювальний рефолдинг), розглянуто причини, що викликають агрегацію білків під час ренатурації in vitro, а також підходи, які застосовують для підвищення виходу правильно ренатурованого продукту.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Maishko S. V. Оптимизация экспрессии чужеродных генов в клетках *E. coli* // Биотехнология.—1998.—№ 6.—С. 3—23.
2. Rudolph R., Lilie H. In vitro folding of inclusion body proteins // FASEB J.—1996.—N 10.—P. 49—56.
3. Clark E. Refolding of recombinant proteins // Curr. Opin. Biotechnol.—1998.—N 9.—P. 157—163.
4. Clark E. Protein refolding for industrial processes // Curr. Opin. Biotechnol.—2001.—N 12.—P. 202—207.
5. Li M., Su Z.-G., Janson J.-C. In vitro protein refolding by chromatographic procedures // Protein Exp. and Purif.—2003.—33.—P. 1—10.
6. The QIAexpressionist. A handbook for high-level expression and purification of His-tagged proteins.—New York: Qiagen, 2000.—14 p.
7. Demchenko A. Recognition between flexible protein molecules: Induced and assisted folding // J. Mol. Recogn.—2001.—N 14.—P. 1—20.
8. Horowitz M. Ironing out the protein folding problem // Nat. Biotechnol.—1999.—N 17.—P. 136.
9. Tsumoto K. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies // Protein Exp. and Purif.—2003.—28.—P. 1—8.
10. Cowley D. J., Mackin R. B. Expression, purification and characterization of recombinant human proinsulin // FEBS Lett.—1997.—402.—P. 124—130.
11. Burgess R. R. Purification of overproduced *Escherichia coli* RNA polymerase σ -factors by solubilizing inclusion bodies and refolding from sarkosyl // Meth. Enzymol.—1996.—273.—P. 145—149.
12. Rozema D., Gellman S. H. Artificial chaperone-assisted refolding of denatured reduced lysozyme: modulation of competition between renaturation and aggregation // Biochemistry.—1996.—35.—P. 15760—15771.
13. Choi S.-H., Kim J.-E., Lee Y.-C., Jang Y.-J., Pastan I., Choe M.-H. A divalent immunotoxin formed by the disulfide bonds between hinge regions of Fab domain // Bull. Korean Chem. Soc.—2001.—22, N 12.—P. 1361—1365.
14. Simmons T., Newhouse Y. M., Arnold K. S., Innerarity T. L., Weisgraber K. H. Human low density lipoprotein receptor fragment. Successful refolding of a functionally active ligand-binding domain produced in *Escherichia coli* // J. Biol. Chem.—1997.—272.—P. 25531—25536.
15. Middelberg A. Preparative protein folding // TRENDS Biotechnol.—2002.—20, N 10.—P. 437—443.
16. Ptitsyn O. B., Bychkova V. E., Uversky V. N. Kinetic and equilibrium folding intermediates // Phil. Trans. Roy. Soc. London B.—1995.—348.—P. 35—41.
17. Clark E., Hevehan D., Szela S., Maachupalli-Reddy J. Oxidative renaturation of hen egg-white lysozyme. Folding vs aggregation // Biotechnol. Progr.—1998.—14.—P. 47—54.
18. Gerar W. J., Pluckthun A. The hierarchy of mutations influencing the folding of antibody domains in *Escherichia coli* // Protein Eng.—1999.—12, N 7.—P. 605—611.
19. Knappik A., Pluckthun A. Engineering turns of a recombinant

- antibody improve its *in vitro* folding // *Protein Eng.*—1995.—8.—P. 81—89.
20. *Bollag D. M., Daniel M.* *Protein Methods.*—New York, 1996.—415 p.
 21. *Glockshuber R., Schidt T., Pluckhun A.* The disulfide bonds in antibody variable domains: Effects of stability, folding *in vitro*, and functional expression in *Escherichia coli* // *Biochemistry.*—1992.—31, N 5.—P. 1270—1279.
 22. *Raina S., Missiakas D.* Making and breaking disulphide bonds // *Annu. Rev. Microbiol.*—1997.—51.—P. 179—202.
 23. *Ohage E., Steipe B.* Intrabody construction and expression. The critical role of VH domain stability // *J. Mol. Biol.*—1999.—291.—P. 1119—1128
 24. *Wulfig C., Pluckthun A.* Protein folding in the periplasm of *Escherichia coli* // *Mol. Microbiol.*—1994.—12.—P. 685—692.
 25. *Pluckthun A.* Antibodies from *Escherichia coli* // *The pharmacology of monoclonal antibodies / Eds M. Rosenberg, G. P. Moore.*—Berlin: Springer, 1995.—P. 269—315.
 26. *Martineau P., Jones P., Winter G.* Expression of an antibody fragment at high-levels in bacterial cytoplasm // *J. Mol. Biol.*—1998.—280.—P. 117—127.
 27. *pET System Manual.*—New York: Novagen, 1999.—15 p.
 28. *Kurucz J., Titus J. A., Jost C. A., Segal D. M.* Correct disulphide efficient refolding of detergent-solubilized single chain Fv proteins from bacterial inclusion bodies // *Mol. Immunol.*—1995.—12.—P. 1443—1452.
 29. *Berdichevsky Y., Lamed R., Frenkel D., Gophna U., Bayer E. A., Yaron S., Shoham Y., Benhar I.* Matrix-assisted refolding of single chain Fv cellulose binding domain fusion proteins // *Protein Exp. and Purif.*—1999.—17.—P. 249—259.
 30. *Blank K., Lidner P., Diefenbach B., Pluckthun A.* Self-immobilized recombinant antibody fragment for immunoaffinity chromatography: Generic, parallel, and scalable protein purification // *Protein Exp. and Purif.*—2002.—24.—P. 313—322.
 31. *Stevens R.* Design of high-throughput methods of protein production for structural biology // *Structure.*—2000.—8.—P. R177—R185.
 32. *Buchner J., Pastan I., Brinkman U.* A method for increasing the yield of properly folded recombinant fusion proteins: Single-chain immunotoxins from renaturation of bacterial inclusion bodies // *Anal. Biochem.*—19—205.—P. 263—270.
 33. *Lidner P., Guth B., Wulfig C.* Purification of native proteins from the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli* using IMAC and histidine tails: A comparison of proteins and protocols // *Meth. Enzimol.*—1992.—4.—P. 41—56.
 34. *Schmid G.* Cyclodextrin glycosyltransferase production: yield enhancement by overexpression of cloned genes // *Trends Biotechnol.*—1989.—7.—P. 244—248.
 35. *Cardamone M., Puri N. K., Brandon M. R.* Comparing the refolding and reoxidation of recombinant porcine growth hormone from a urea denatured state and from *Escherichia coli* inclusion bodies // *Biochemistry.*—1995.—34.—P. 5773—5794.
 36. *Dubnovitsky A., Kravchuk Z., Chumanevich A., Cozzi A., Arosio P., Martsev S. P.* Expression, refolding and ferritin-binding activity of the isolated VL domain of monoclonal antibody F11 // *Biochemistry.*—2000.—65, N 9.—P. 1011—1018.
 37. *Altamirano M., Golbik R., Zahn R., Buckle A. M., Fersht A. R.* Refolding chromatography with immobilized mini-chaperones // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1997.—94.—P. 3576—3578.
 38. *Дубровский А. Л., Савинская Л. А., Корнелюк А. И.* Клонирование и бактериальная экспрессия некаталитического домена бычьей тирозил-тРНК синтетазы // *Биополимеры и клетка.*—1998.—14, № 5.—С. 449—452.

УДК 579.69 + 576.311.31
Надійшла до редакції 16.01.03