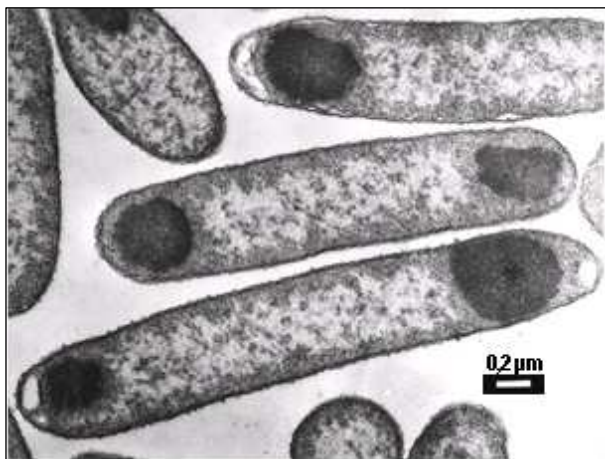


6. Zárványtestek feldolgozása.....	1
6.1. A zárványtestek .....	1
6.1.1. A zárványtestek kialakulása.....	2
6.1.2. A feldolgozási technológia .....	3
6.1.2.1. Sejtfeltárás .....	3
6.1.2.2. Centrifugálás, tisztítás.....	3
6.1.2.3. Oldás, szolubilizálás .....	3
6.1.2.4. Folding .....	4
6.1.2.5. Speciális folding technikák.....	7
6.1.2.6. A folding befolyásolása fehérjemérnökséggel.....	7

## 6. Zárványtestek feldolgozása

### 6.1. A zárványtestek

A zárványtest kifejezést az angol „inclusion body” szókapcsolat fordításaként használjuk. Jelentése a sejteken belül, zárványok formájában keletkező, szilárd halmazállapotú fehérjeszemcse. Kompakt, legömbölyített alakú testek. Fénytörésük eltér a citoplazmáétól, ezért fáziskontraszt mikroszkóppal észlelhetők. Sűrűségük viszonylag nagy, ezért sejtfeltárás után centrifugálással gyorsan ülepedhetnek.



6.1. 1. ábra Zárványtestek *E. coli*-ban

Anyagukban általában homogének, 90-95 százalékban egyféle fehérjéből állnak. Technológiai szempontból csak a prokariótákban előforduló zárványtestek érdekesek, emberi sejtekben csak nagyon ritka genetikai rendellenességek következtében fordulnak elő.

A genetikailag manipulált organizmusokkal előállított, röviden „rekombináns” fehérjék termelésének két alapvető lehetősége adódik. A manipulált prokarióta sejtekkel (pl. *E. coli*) kialakított technológiának számos előnye van:

- gyorsan szaporodnak a sejtek,
- nagy sejtkoncentráció érhető el
- egyszerű és olcsó táptalaj
- gyorsan és nagy koncentrációban keletkezik a fehérje.

Hátrányai ugyanakkor, hogy csak az aminosav sorrend kialakítása reprodukálható biztosan. A fehérjék „érése”, a poszttranszlációs modifikációk viszont nem, vagy nem megfelelően mennek végbe. Így hibás lehet:

- a diszulfid-hidak kialakulása
- a harmadlagos szerkezet, a „folding” kialakulása
- kémiai módosítások, glikozilálás, metilezés
- az „éretlen” fehérjék gyakran rosszul oldódnak, a citoplazmából kiválva oldhatatlan zárványtesteket alkotnak - ezekből a fehérjék kinyerése és aktiválása külön lépéseket igényel.

A másik technológiai út a bioszintézis végrehajtása manipulált állati sejtekkel. Ezek tenyésztésével érett szerkezetű, glikozilált, fiziológiailag aktív fehérjét állíthatunk elő, nem képződnek fehérjezárványok, ezek feldolgozásával sem kell foglalkozni. Viszont ennek az alternatívának is megvannak a maga hátrányai:

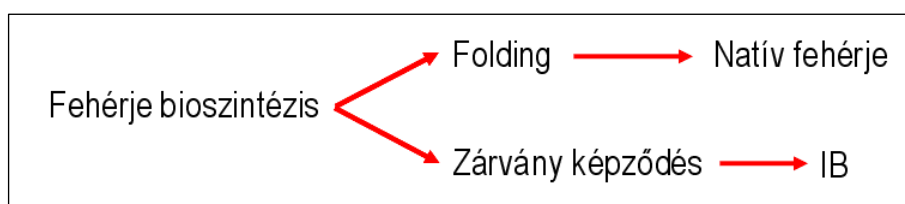
- a szöveti sejtek lassan szaporodnak,
- kisebb az elérhető sejtkoncentráció,
- a megtermelt fehérje mennyisége is viszonylag kevés
- drága, nehezen kezelhető tápoldatot igényelnek.

Sokszor nehéz választani a két lehetőség közül. Előfordul, hogy ugyanazon termék piacán két versengő cég egyike prokariótával, a másik eukarióta sejtekkel termelt hatóanyaggal jelenik meg.

A zárványtestek kialakulása tehát a prokarióta sejtekben gyakran előfordul, a fehérjék izolálásánál komoly problémákat vet fel, ezért érdemes vele külön foglalkozni. Ez a fejezet némileg eltér a tárgy egyéb témaköreitől, mert nem egyetlen műveletet tárgyal, hanem egy sajátos célú műveletsort.

#### 6.1.1. A zárványtestek kialakulása

A kifejezett fehérjék között sem lehet bizonyossággal előre jelezni, hogy mely fehérjékből lesz zárványtest, és melyekből nem. A vizsgálatok szerint képződésük nem hozható összefüggésbe sem genetikai paraméterekkel (host, vektor, génkörnyezet), sem a fehérje tulajdonságaival (méret, oldhatóság, szerkezet). Annyit lehet csak megfogalmazni, hogy a sok diszulfid hidat tartalmazó fehérjék általában hajlamosabbak a zárványképzésre. A fehérjezárványok képződése kinetikai okokra vezethető vissza. A riboszómák felületén végbemenő fehérjeszintézis létrehozza a megfelelő aminosavsorrendű polipeptidláncot (elsődleges szerkezet), de az aktív (natív) állapot eléréséhez ennek fel kell vennie a megfelelő másodlagos és harmadlagos szerkezetet, beleértve az intramolekuláris diszulfid-hidak kialakulását is. Ezt a folyamatot nevezik "folding"-nak (legelfogadhatóbb fordítása talán a "hajtogatás"). A folyamat többé-kevésbé spontán módon is végbemegy, hiszen a rendezett, natív fehérje energiaállapota alacsonyabb, mint a frissen keletkezett, kigombolyított fehérjeláncé. Az átalakulást számos esetben katalizálják a chaperonok (dajkafehérjék). A fehérjeképződés és a folding normális körülmények között egyensúlyban van, a létrejött fehérjemennyiség túlnyomórészt átalakul natív formává. Ha viszont valamilyen oknál fogva több fehérje képződik, mint amennyit a folding folyamata át tud alakítani, akkor a felszaporodó "hajtogatatlan" (unfolded) fehérje zárványtestté alakul (2. ábra). Ezt a mechanizmust igazolja az a megfigyelés is, hogy ha a prokarióta organizmus saját fehérjéjének termelését fokozzuk (pl. géntöbbszörözéssel), akkor a mikroorganizmus saját fehérjéjéből is kialakulhat zárványtest.



6.1.1. 1. ábra A folding és a zárványképződés alternatív utak

A fehérjezárványok jellemzően a citoplazmában alakulnak ki. Az *E. coli* citoplazmájában ugyanis a közeg redukáló, ami nem kedvez a diszulfidhidak kialakulásának, azaz a foldingnak. A *coli* citoplazma-fehérjéinek jelentős részében nincs is diszulfid híd. A sejten belül oxidatív környezetet a periplazmikus térben találunk, itt megy végbe a keresztkötést tartalmazó fehérjék foldingja.

A fehérjezárványok kialakulása bonyolultabbá teszi az izolálási technológiát, de ugyanakkor vannak előnyei is. A szemcsék csaknem tiszta célfehérjéből állnak, homogenitásuk több mint 90 százalék, ezzel az előtisztítás feleslegessé válik. Ebben a tömör állapotban nem hatnak a proteázok, nem kell a termék elbontásától tartani. A zárványban lévő fehérjék inaktívak, így a sejten belül nem tudják kifejteni esetleges káros hatásukat.

### 6.1.2. A feldolgozási technológia

A zárványtestekbe tömörült fehérje kinyerése és aktiválása általában a következő sorrendi séma szerint folyik:

1. sejtfeltárás → sejtörmelék, benne a zárványtestek
2. centrifugálás, tisztítás → „IB paszta”
3. oldatba vitel → oldott, unfolded fehérje
4. folding → oldott, aktív fehérje

A következőkben eszerint tekintjük át a technológia lépéseit.

#### 6.1.2.1. Sejtfeltárás

A sejtfeltárás műveleteivel a 3. fejezetben már részletesen foglalkoztunk. A baktériumok sejtfa válogató erősségű, a Gram pozitív törzseké ellenállóbb, a Gram negatívaké valamivel gyengébb. Ipari méretekben lizozimos kezelést, és/vagy nagynyomású homogenizátort alkalmaznak. A feltárás a zárványtesteket nem károsítja, nem aprítja.

#### 6.1.2.2. Centrifugálás, tisztítás

A zárványtestek tömör, nagyobb sűrűségű részecskék, centrifugálásnál jól ülepednek. A sejtörmelékek és a fehérjeszemcsék kis mérettartományba esnek, ülepítésükhöz nagyobb g értékekre van szükség (~10.000 - 20.000 g). A zárványok anyaga eléggé tiszta, csak a felületükön hordoznak szennyezéseket. Ezeket a felülúszó elvétele után pufferrel célszerű lemosni, majd újra centrifugálni. Az alappuffer (pH ~ 8) sókat (pl. 0,2 M NaCl-ot), és felületaktív anyagot (p. Triton X100-at) is tartalmaz. A fémionok megkötésére EDTA-t, redukáló közeg fenntartására ditio-treitolt (DTT), a mikrobiális romlás kivédésére  $\text{NaN}_3$ -ot adagolnak.

#### 6.1.2.3. Oldás, szolubilizálás

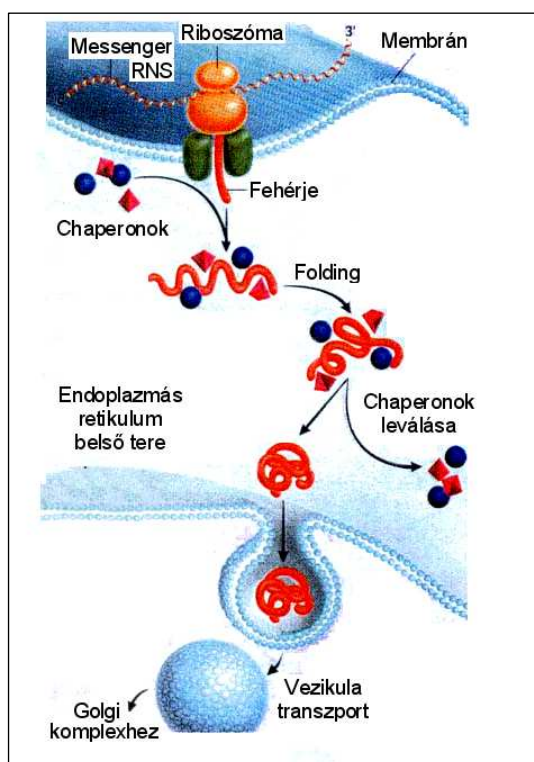
A zárványtestek kiválását éppen az okozza, hogy a nyers fehérjék a citoplazma sós vizes közegében rosszul oldódnak. Ha fel akarjuk ezeket oldani, ebben az esetben a közeg polaritásának változtatásával, csökkentésével (oldószer) vagy növelésével (sók) nem megyünk semmire. A fehérjék oldását ún. kaotróp oldószerekkel segíthetjük elő. A kaotróp anyagok (tipikusan a karbamid, illetve a guanidin), hidrogénkötések kiépítésére hajlamosak. A vízben szinte korlátlanul oldódnak, nagy koncentrációban (40-50 %) a szintén hidrogénhidak kialakítására képes vízmolekulákkal együtt sajátos tulajdonságú oldószert alkotnak. Ebben egyrészt a kaotróp molekulák közbeépülésével megszűnik a hidrogén kötésekkel összekapcsolódó vízmolekulák térhálós, végtelenített szövege (kaotróp = káoszt elősegítő). Másrészt a fehérjemolekuláknak lehetőségük van hidrátburkok helyett „kaotróp burkot” megkötni felületükön, és ezzel oldatba vihetők olyan anyagok is, amelyek vizes közegben oldhatatlanok.

A szolubilizáló elegy fő komponense 8 M karbamid, vagy 6 M guanidin-hidroklorid. A közeget pH~8 körül pufferolják. Ez az oldat is tartalmaz EDTA-t, és itt is erősen redukáló potenciált alakítanak ki SH vegyületekkel (ditiotreitrol, ditioneitol, redukált glutation, merkaptó-etanol, cisztein, cisztamin), amely megakadályozza a diszulfid hidak idő előtti kialakulását. A fehérje szuszpenzió koncentrációját ~5 g/l-re állítják be. Az oldási folyamat szobahőmérsékleten néhány óra (1 – 4 óra) alatt végbemegy. Felmerülhet a kérdés, hogy miképpen lehetne elválasztani az oldódás során kiszabaduló szennyező fehérjéket. Ez a lépés azonban nem szükséges, mert a következő lépésben többszázszorosan meghígítják az oldatot, aminek következtében a szennyezők koncentrációja elhanyagolható szintre csökken.

#### 6.1.2.4. Folding

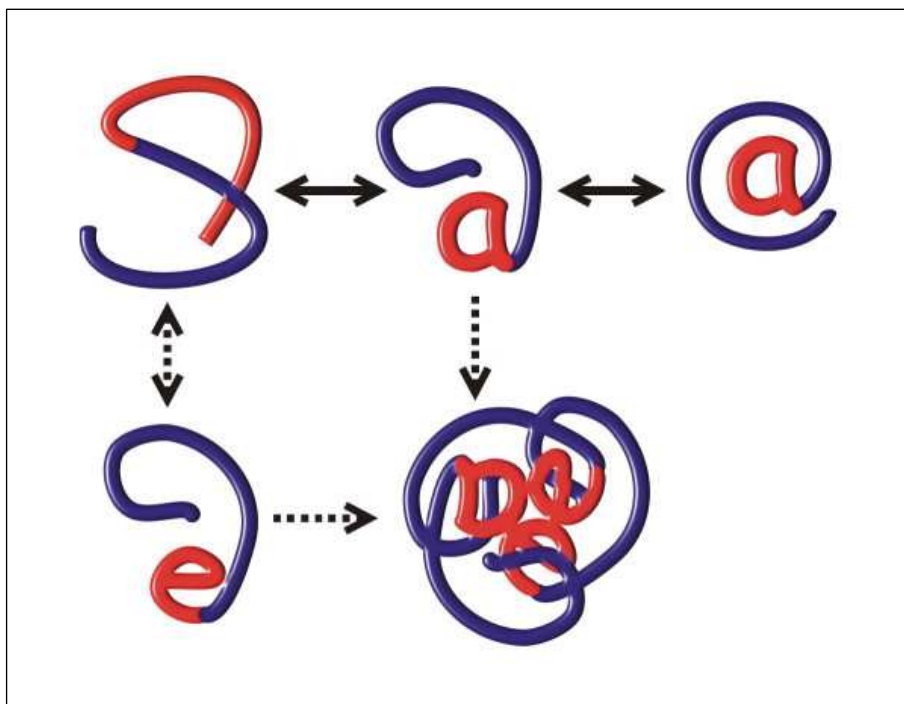
Ebben a témakörben folding („hajtogatás”) alatt a fehérje másodlagos és harmadlagos szerkezetének megfelelő kialakulását értjük. A térbeli szerkezetet az intramolekuláris elsődleges és másodlagos kémiai kötések rögzítik. Az intermolekuláris (két, vagy több fehérje molekulát összekötő) kapcsolatok hibás szerkezetet, inaktív fehérjéket eredményeznek. A háromdimenziós szerkezetet kovalens kötések (diszulfid hidak), és gyengébb kölcsönhatások (hidrogén hidak, ionpár kölcsönhatások és van der Waals erők) stabilizálják.

A sejtekben a folding természetes folyamata az endoplazmás retikulumban megy végbe. A belső kötések kialakulását dajkafehérjék (chaperonok) katalizálják, amelyek átmenetileg összekapcsolódnak a formálódó fehérjével, majd a megfelelő alak kialakulása után leválnak róla (3. ábra). Ezzel párhuzamosan a fehérje N-glikozilálásának első lépései is lejátsszódhatnak. A fehérje molekulák ezek után szállító (transzport) vezikulákban lépnek ki a lumenből, és továbbítódnak a Golgi-komplexbe, ahol glikozilálásuk folytatódik, érésük befejeződik.



6.1.2.4. 1. ábra A folding az endoplazmás retikulumban megy végbe

Ugyanezt a folding reakciósort a technológia során *in vitro*, azaz készülékben, endoplazmás retikulum és dajkafehérjék nélkül kell megvalósítani. Ez sokkal nehezebb feladat. A natív szerkezet kialakulása soklépéses folyamat, amely többféle mellékreakcióban is „félrecsúszhat”, inaktív termékeket eredményezve. A „téves” reakciók lehetnek intra- és intermolekulárisak (4. ábra).



6.1.2.4. 2. ábra A folding folyamata és mellékreakciói

A monomolekuláris reakciók többé-kevésbé reverzibilisek, az aggregátum képzés viszont nem. Emiatt elsődleges cél a molekulák távoltartása, találkozásuk megakadályozása. A legegyszerűbb megoldás az erős hígítás, a híg oldatokban a fehérjék találkozási valószínűsége kicsi. A szolubilizálásnál beállított ~5 g/l koncentrációjú oldatot 500-1000-szeresen felhígítják. A kisebb koncentráció hatása a reakciósebességre kvantitatívan is kifejezhető. A sebességeket felírva a foldingra (F), és az aggregációra (A) a következő összefüggéseket kapjuk:

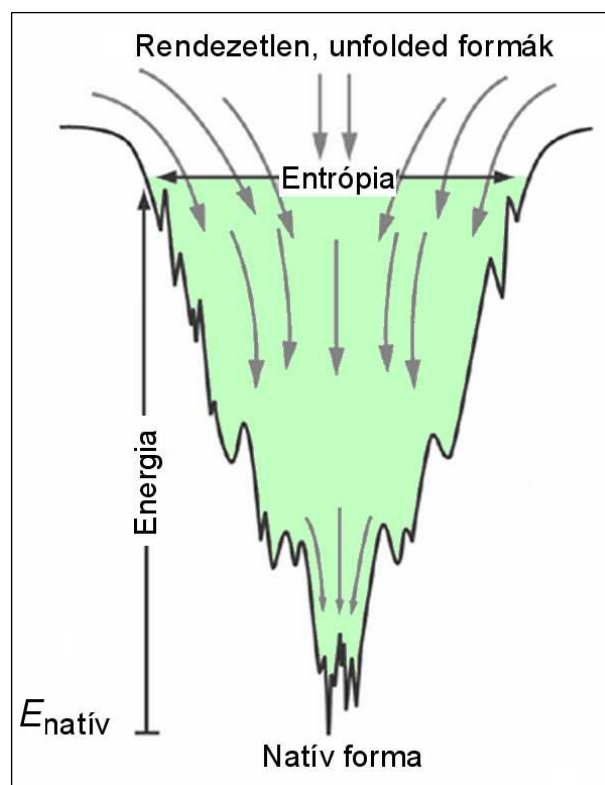
$$v_F = \frac{dc}{dt} = -k_F c \qquad v_A = \frac{dc}{dt} = -k_A c^2$$

A negatív előjel arra utal, hogy a kiindulási fehérje koncentráció a reakció során csökken. Az aggregáció (minimum) bimolekuláris (másodrendű) folyamat, emiatt szerepel a koncentráció a második hatványon. Ha tehát a hígítással a koncentrációt ezerszeresen csökkentjük, a folding sebessége ezredrésze csökken, az aggregációé viszont egy milliomod részére. A folding lelassul ugyan, de a bimolekuláris reakciók gyakorlatilag megszűnnek. A folding kialakulására emiatt hosszabb, 24-48 órás reakcióidőt adnak. A fehérje oldatot lassan, keverés közben nagy mennyiségű folding pufferbe engedik. A beadagolást sokszor több ponton, illetve több részletben hajtják végre. A bevétel késleltetése nem csak a tökéletes elkeveredést szolgálja, hiszen az néhány másodperc alatt bekövetkezik. Ha a betáplálás során több időt hagyunk, akkor a már bevitt fehérje egy része felveszi a natív formát, ezzel csökkenti az intermolekuláris reakcióra képes molekulák koncentrációját.

Egy adott fehérjelánc a hajtogatás során nagyon sokféle konformációt fölvehet, ezek közül csak egy „az igazi”, a natív, aktív fehérje. A sokféle szerkezet energiaszintje is különböző. Sok vizsgálattal alátámasztott feltételezés, hogy a natív állapot az energiaminimumnak megfelelő szerkezet. A feltételezés azon alapul, hogy ha a természetben, a sejtekben működő aktív, natív fehérjéknek lenne egy még alacsonyabb energianívójú alakja, akkor a fehérjék spontán módon „átcsúsznának” ebbe a másik - kevésbé aktív - formába, amelyben kevésbé hatékonyan működnének. A rosszabb hatékonyságú működést viszont a természetes szelekció, az evolúciós verseny kiszelektálja, kihalásra ítéli. Az *in vitro* folding során tehát fehérjéket az energiaminimum felé kell mozgatni, ami látszólag könnyű, önként végbemenő folyamat. A nehézséget az jelenti, hogy a nagyon sok hajtogatási forma

energiaszintjei bonyolult energiafelületeket alkotnak (5. ábra), aminek számos lokális minimuma lehet, ahol a molekula „megrekedhet”. Ennek kivédésére a tudomány által sok helyen alkalmazott módszert alkalmazzuk: ismételt kis energia „lökésekkel” perturbáljuk a rendszert, átsegítjük a lokális energia gátakon. Ezzel elérjük, hogy a molekulák túlnyomó többsége az energiaminimumra, vagy legalább annak közvetlen közelébe kerüljön. Ilyen perturbációs energiaközlés történhet a hőmozgással, illetve dinamikus kémiai rendszerekkel. A folding reakciót nem szokták melegíteni, általában 4-20 °C között végzik.

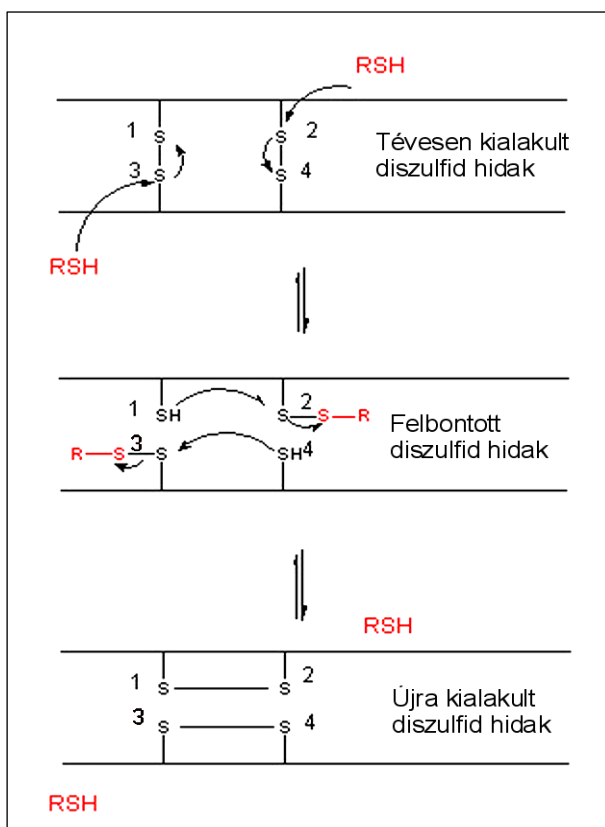
6.1.2.4. 3. ábra A fehérje hajtogatósi formák energia és entrópia viszonyai



A folding kialakításánál kritikus folyamat a

diszulfid hidak (kovalens kötések, nagyobb energiát képviselnek) megfelelő kialakítása. Ha egy fehérje molekulában csak két hozzáférhető cisztein van, akkor nincs esély hibás kénhíd létrejöttére. Ha viszont több is van ( $n$ ) akkor a lehetséges hidak száma  $n \cdot (n-1) / 2$  - ekkor már nagy az esély a „téves” kapcsolódásra. Extrém példa a rekombináns fehérjeként gyártott szöveti plazminogén aktivátor (tPA), amelyben 16 diszulfid híd fordul elő. A kénhidak létrehozásához az eddigiektől eltérően oxidáló közegre van szükség, ezt ditio-vegyületekkel érjük el. De mivel gyakran előfordul, hogy az adott SH-csoport elsőre nem a megfelelő partnerrel alkot kötést, biztosítani kell a felbontás és újrakötés lehetőségét is. Ehhez redukáló, SH-vegyületek jelenlétére is szükség van. Erre a célra „redox-puffert” alkalmaznak, amiben az adott kénvegyület oxidált és redukált alakja egymás mellett jelen - a fő reakció irányának megfelelően oxidáló túlsúllyal. Ilyen vegyületpárok például a glutation (oxidált > redukált forma), a cisztein < cisztin és a  $\beta$ -merkaptó-etanol < diszulfidja. A dinamikus kötés-felbomlás-újrakötés folyamat végeredményeképpen a kialakul az energiaminimum, vagy ahhoz közeli állapot (6. ábra).

6.1.2.4. 4. ábra A diszulfid hidak újrapcsolódása



A folding puffer alapja általában 0,1- 0,2 M Tris, a pH változatlanul 7,5-8,5 közötti érték. A kénvegyületek koncentrációja 1 -10 mM. Az oldat az eddigiekhez hasonlóan tartalmaz detergenset,

pl. Triton-X-et, és 2 – 10 mM EDTA-t. Konzerválószerként a sejteket elpusztító azid helyett ~0,1 mM PMSF-ot (fenil-metil-szulfonil-fluorid, proteáz inhibitor) használnak. Emellett chaperon-hatású anyagokkal is kiegészítik az összetételt, így arginint adnak 0,4 – 1 M koncentrációban. Kisebb koncentrációban kaotróp anyagokat is alkalmaznak. Egyes speciális esetekben olyan amfifil molekulák pozitív chaperon hatását mutatták ki, mint az alkil-karbamid, PEG, lauril-maltozid, CHAPS, ciklodextrinek.

#### 6.1.2.5. Speciális folding technikák

A leírt általánosan használt hígítási módszer mellett számos, eltérő elven működő technikát is leírtak.

Kialakítható a folding gélkromatográfia közben is. A folding pufferrel eluálva a kaotróp anyagok kihígulnak és lemaradnak az oszlopban. A legelső frakcióban a nagy méretű aggregátumok jelennek meg, azután a monomer fehérjék, végül a kaotrópok. Ideális esetben a nyers, a natív és a misfolded (rosszul hajtogatott) formákat is el lehet választani, bár ezek molekulatömege egyforma.

A fehérjék találkozásait hígítás helyett meg lehet akadályozni úgy is, hogy a lánc egyik végét szilárd felülethez kötik (matrix assisted folding). Ha a kötés csak egy rövid szakaszt érint (poli-His vég, poli-Arg vég), akkor a molekulalánc többi része a pufferben felveszi a natív alakot. Külön lépés a kész fehérje leválasztása a töltet felületéről.

Más kromatográfiai tölteten is végbemehet a folding. Adszorpciós kromatográfia során (pl. HIC) a fehérjemolekula a sokszor ismétlődő szopció-deszorpció során „átgyűrődik”, felveszi a minimális energiájú formáját.

A hígítási puffercsere helyett az oldószerváltás megoldható dialízissel is. A kaotróp anyagok fokozatosan eltávoznak, a kénvegyületek belépnek a folyadékba. A dialízis és a folding egyaránt lassú folyamatok, párhuzamosan megvalósíthatók.

#### 6.1.2.6. A folding befolyásolása fehérjemérnökséggel

A foldingot, különösen a diszulfid hidak kialakulását egy vagy néhány kritikus aminosav kicserélésével meg lehet változtatni. A ciszteinek beépítésével, vagy cseréjével a kötési lehetőségek megváltoznak. Jó példa erre a BETASERON™ kialakítása. A béta-interferon (immunfehérje) eredetileg három ciszteint tartalmaz (17, 31 és 141 aminosav), ezek közül kettő (31 és 141) diszulfid hidat képez. Amikor rekombináns fehérjeként állították elő, problémát okozott, hogy az SH-csoportok statisztikusan kapcsolódtak össze, és a három lehetséges szerkezetből csak egy volt aktív. A hibás szerkezetű termékek kialakulásának megakadályozására a gén módosításával a 17 pozícióban álló ciszteint kicserélték szerinre. A szerin kémiaiilag hasonló tulajdonságú aminosav, oldalláncán SH-csoport helyett hasonló polaritású OH-csoportot tartalmaz, így a fehérje tulajdonságait legfeljebb minimális mértékben változtatja meg. Keresztkötések létesítésére a szerin viszont alkalmatlan, így csakis a megmaradt két cisztein között jöhet létre a kötés, így nem keletkeznek melléktermékek (7. ábra).

6.1.2.6. 1. ábra A béta interferon lehetséges diszulfid hídjai

