



## Ciałka inkluzyjne i ich wykorzystanie do otrzymywania rekombinowanych białek w systemie ekspresyjnym *Escherichia coli*

Małgorzata Sierant, Andrzej Okruszek

Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych,  
Polska Akademia Nauk, Łódź

### Inclusion bodies and their application for the production of recombinant proteins in *Escherichia coli* expression system

#### Summary

Over-expression of recombinant proteins in *Escherichia coli*, the most frequently used prokaryotic expression system, often results in the formation of intracellularly aggregated, insoluble folding intermediates. It is generally thought that protein aggregation is triggered by the failure of polypeptide intermediates to complete folding, leading to self-association. These aggregates are known as inclusion bodies or refractile bodies, since they appear upon microscopic observation as highly refractile areas. The formation of inclusion bodies often increases the yields of recombinant proteins and facilitates their isolation. The aggregated proteins are usually protected from proteases and do not harm host cells. Specific strategies are developed to produce bio-active proteins with the participation of inclusion bodies. These procedures include: 1) isolation and purification of inclusion bodies, 2) solubilization of the protein aggregates, and 3) renaturation of solubilized proteins involving formation of native disulphide bonds.

#### Key words:

over-expression of recombinant proteins, protein aggregation, inclusion bodies, refolding, renaturation.

#### Adres do korespondencji

Małgorzata Sierant,  
Centrum Badań  
Molekularnych  
i Makromolekularnych  
Polska Akademia Nauk,  
Zakład Chemii  
Bioorganicznej,  
ul. Sienkiewicza 112,  
90-363 Łódź;  
e-mail:  
msierant@bio.cbmm.lodz.pl

## 1. Wstęp

Zakłócenie warunków procesu fałdowania białka wywołane, np. jego nadprodukcją, brakiem lub niedostateczną ilością białek pomocniczych, czy działaniem innych czynników wywołujących stres komórkowy powoduje, że indywidualne cząsteczki polipeptydu zwijają się do pewnej stabilnej konformacji pośredniej i asocjują ze sobą tworząc oligomeryczne, nieaktywne biologicznie agregaty. Jako przykład mogą posłużyć agregaty o strukturze fibrylarnej, gromadzące się w komórkach neuronalnych w postaci amyloidów, będące przyczyną licznych chorób neurodegeneracyjnych (1). Ze zjawiskiem tym mamy również do czynienia w przypadku nadekspresji obcych genów w komórkach prokariotycznych, a szczególnie w przypadku biosyntezy białek z wieloma resztami cysteinowymi. Białka takie gromadzą się często w cytoplazmie w postaci nierozpuszczalnych agregatów, tzw. ciałek inkluzyjnych (ang. *inclusion bodies*) (2). Dokładny mechanizm oddziaływań międzycząsteczkowych prowadzących do agregacji jest słabo poznany. Ważną rolę w prawidłowym procesie fałdowania, zarówno w warunkach fizjologicznych jak i w warunkach stresu komórkowego, odgrywają tzw. białka opiekuńcze, określane inaczej jako molekularne chaperony (3). Niektóre chaperony zabezpieczają białka przed agregacją, natomiast inne biorą czynny udział w procesie fałdowania i rozpuszczania agregatów. Minimalizują one również agregację pośrednicząc w usuwaniu białek, które nie mogą być prawidłowo pofałdowane (4). W pewnych warunkach białka opiekuńcze aktywnie uczestniczą w tworzeniu agregatów. W niektórych komórkach eukariotycznych znajdują się elementy okołojądrowe zwane agresomami, w których chaperony promują powstawanie złogów białkowych (5,6). Tworzenie tych kompleksów stanowi mechanizm zabezpieczający komórki przed toksycznością źle pofałdowanych białek. W komórkach prokariotycznych powszechnym zjawiskiem jest tworzenie specyficznego typu złogów białkowych – ciałek inkluzyjnych (7).

## 2. Przyczyny powstawania ciałek inkluzyjnych

Z badań nad wytwarzaniem rekombinowanych białek w bakteriach *Escherichia coli* wynika, że tworzenie się ciałek inkluzyjnych jest dla większości białek raczej regułą niż wyjątkiem (8). Po raz pierwszy obserwowano je podczas ekspresji genu ludzkiej insuliny (9). Później okazało się, że ciała inkluzyjne mogą powstawać także w innych gramujemnych i gramodatnich bakteriach (10). Co więcej, nierozpuszczalne formy białek mogą się tworzyć również w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae* i innych niższych organizmów eukariotycznych (11,12). Ciała inkluzyjne nie mają homogenego składu, a ich powstawanie nie jest związane wyłącznie z ekspresją genów białek heterologicznych. Agregacja *in vivo* jest obserwowana również w przypadku biosyntezy naturalnych białek komórkowych, np. niosących pewne uszkodzenia lub powstających w warunkach stresu komórkowego. Powstawanie



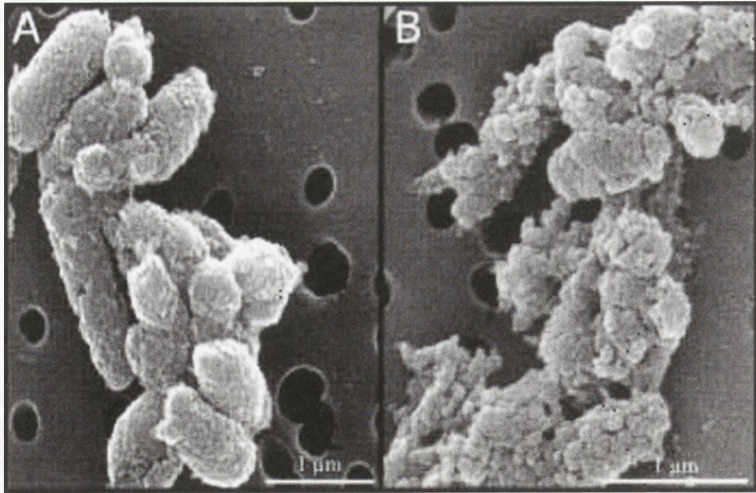
ciałek inkluzyjnych może być monitorowane mikroskopowo w trakcie hodowli, ponieważ dają silny efekt załamania światła (2). Początkowo sądzono, że w przypadku biosyntezy białek heterologicznych powodem agregacji są uszkodzenia wiązań kowalencyjnych w łańcuchu polipeptydowym. Odstąpiono jednak od tego poglądu gdy okazało się, że dla wielu białek po rozpuszczeniu ciałek inkluzyjnych w warunkach silnie denaturujących możliwy jest powrót do natywnej konformacji po usunięciu czynnika denaturującego. Przyczyny agregacji szukano również w nieprawidłowym tworzeniu się mostków disulfidowych. Dla wielu rekombinowanych białek posiadających w łańcuchu polipeptydowym reszty cysteinowe, wytworzenie prawidłowych wiązań disulfidowych w bakteryjnej cytoplazmie jest niemożliwe. Okazuje się jednak, że ciała inkluzyjne powstają także w przypadku ekspresji białek nie zawierających w łańcuchu polipeptydowym reszt cysteinowych, pomiędzy którymi mogłyby się tworzyć takie wiązania. Naturalne białka cytoplazmatyczne bakterii zazwyczaj nie zawierają strukturalnych mostków disulfidowych. Niektóre białka cytoplazmatyczne posiadające w strukturze pierwszorzędowej cysteiny, np. reduktaza rybonukleotydowa, czynniki transkrypcyjne OxyR i RsrA czy chaperon Hsp33 mogą przejściowo wytwarzać takie wiązania jako część swojego cyklu katalitycznego (13). Utlenianie grup tiolowych reszt cysteinowych w bakteryjnej cytoplazmie jest jednak utrudnione z powodu bardzo niskiego potencjału redukcyjno-oksydacyjnego wytwarzanego przez dwa zespoły komórkowe: system tioredoksynowy i system glutation/glutaredoxyna (14). Ponadto, w warunkach fizjologicznych cytoplazma nie zawiera enzymów katalizujących utlenianie grup tiolowych. Szczególnym przedziałem komórek bakteryjnych, w którym możliwe jest tworzenie strukturalnych mostków disulfidowych jest przestrzeń periplazmatyczna (14). Przykłady uzyskiwania aktywnych białek eukariotycznych w bakteriach *E. coli*, w warunkach umożliwiających ich sekrecję do periplazmy, sugerują istnienie w tym przedziale komórkowym aktywnego systemu utleniania i izomeryzacji wiązań disulfidowych (15,16). Reakcje te są katalizowane przez obecne w periplazmie białka Dsb należące do rodziny tioredoksyn: DsbA, DsbB, DsbC, DsbD, DsbG (17-19).

### 3. Charakterystyka ciałek inkluzyjnych

#### 3.1. Lokalizacja komórkowa, morfologia i wewnętrzna organizacja ciałek inkluzyjnych

Ciała inkluzyjne tworzą się głównie w bakteryjnej cytoplazmie, choć spotyka się również przykłady pojawiania się agregatów w przestrzeni periplazmatycznej (20,21). Cząstki ciałek inkluzyjnych nie są otoczone żadną błoną, charakteryzują się cylindrycznym lub owalnym kształtem, porowatością struktury, oraz szorstką lub gładką powierzchnią (22). Nie określono jednak związku pomiędzy kształtem czy





Rys. 1. Architektura ciałek inkluzyjnych. Obraz z mikroskopu elektronowego – ciała inkluzyjne przed (A) i po 5 min trawieniu trypsyną (B), wg (25).

charakterem powierzchni a właściwościami zagregowanego białka. Stosunkowo mała liczba tych cząstek w komórce może wskazywać na to, że mniejsze preagregaty mają tendencję do łączenia się w większe agregaty (23,24). Chociaż ciała inkluzyjne określane są często jako twory bezpostaciowe, to obserwacje mikroskopowe agregatów traktowanych trypsyną wykazały, że posiadają one określoną architekturę (25). Na rysunku 1 przedstawiono typowy obraz mikroskopowy ciałek inkluzyjnych przed- i po trawieniu enzymem proteolitycznym. Stwierdzono współistnienie w zagregowanych białkach szeregu populacji polipeptydów znajdujących się w odmiennych stanach konformacyjnych oraz w różnym stopniu wrażliwych na degradację proteolityczną. W przeprowadzonej analizie strukturalnej ciałek inkluzyjnych potwierdzono wysoką zawartość natywnej struktury drugorzędowej oraz obecność białek w różnych stopniach pofałdowania (22,25-27). W badaniach procesu fałdowania, prowadzonych zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo* wykazano, że agregaty nie powstają z białek natywnych na skutek zmian konformacyjnych, lub też z całkowicie rozwiniętych łańcuchów polipeptydowych, ale z częściowo pofałdowanych stanów pośrednich. Obserwacje procesu tworzenia się ciałek inkluzyjnych w bakteriach produkujących rekombinowane białka doprowadziły do wniosku, że w trakcie agregacji ciała inkluzyjne podlegają ciągłej rekonstrukcji (28,29). Istnieje kinetyczna równowaga pomiędzy procesem fałdowania łańcuchów polipeptydowych oraz ich agregacją. Wzrost ilości ciałek inkluzyjnych w komórce jest wynikiem przesunięcia równowagi pomiędzy procesami wytrącania się i rozpuszczania białka. Zatrzymanie biosyntezy białka w warunkach *in vivo* powoduje, że ciała inkluzyjne w ciągu kilku godzin ulegają całkowitemu rozpuszczeniu. Wiąże się to ze wzrostem stęże-



nia rozpuszczalnej formy białka w komórce oraz pojawieniem się związanej z nim aktywności (29). Agregaty typu ciałek inkluzyjnych są zatem rezerwuarem odpornych proteolitycznie białek, które akumulują się do chwili, aż chaperony lub proteazy komórkowe będą zdolne do przeprowadzenia ich właściwego fałdowania lub proteolizy.

### 3.2. Skład ciałek inkluzyjnych

W typowych procesach biotechnologicznych otrzymywania białek heterologicznych poprzez nadekspresję kodujących je genów w bakteriach *E. coli*, głównym składnikiem ciałek inkluzyjnych jest rekombinowane białko (24,30). W skład agregatów wchodzi również białka komórkowe, np. białka asystujące w procesie fałdowania łańcucha polipeptydowego, takie jak małe białka szoku cieplnego IbpA i IbpB (31). Białka te wiążą się jako pierwsze z fałdującym się łańcuchem polipeptydowym, są zatem w pierwszej kolejności wyłapywane w procesie agregacji i zamykane w cząstkach tworzących ciała inkluzyjne. Pozostałe składniki agregatów to fragmenty błon komórkowych, białka związane z błonami i kwasy nukleinowe.

### 3.3. Wpływ agregacji na proces otrzymywania rekombinowanych białek

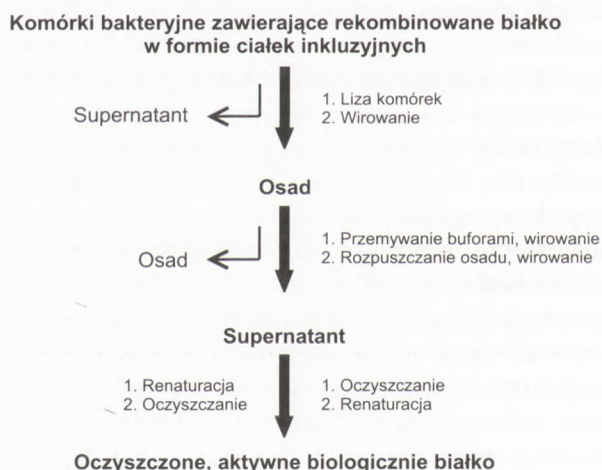
Akumulacja nowo syntetyzowanych łańcuchów polipeptydowych rekombinowanych białek w postaci ciałek inkluzyjnych jest poważnym problemem w biotechnologii (7). Wydajność procesu renaturacji, czyli uzyskania w pełni aktywnego białka ze stanu zdenaturowanego, w dużej mierze zależy od sekwencji aminokwasowej białka, warunków renaturacji i obecności zanieczyszczeń. W przypadku, kiedy białko może być w prosty sposób renaturowane, tworzenie ciałek inkluzyjnych jest zjawiskiem korzystnym. Agregacja zapobiega w pewnym stopniu enzymatycznej degradacji białek poprzez fakt, że miejsca wrażliwe na proteolizę stają się mniej dostępne. W niektórych przypadkach białka zawarte w ciałkach inkluzyjnych są jednak wrażliwe na degradację proteolityczną. Wykazano bowiem, że enzymy posiadające aktywność proteolityczną mogą koagregować z innymi białkami w ciałkach inkluzyjnych. Wówczas, w trakcie procesu renaturacji proteazy te są aktywowane i powodują degradację towarzyszących im białek. W sytuacji, gdy białka w postaci natywnej są toksyczne dla wytwarzających je komórek i nie mogą być syntetyzowane w formie aktywnej, produkcja w postaci ciałek inkluzyjnych jest praktycznie jedyną możliwością ich uzyskiwania. Inną pozytywną właściwością ciałek inkluzyjnych jest to, że zawierają one zazwyczaj duże ilości obcego dla bakterii rekombinowanego białka (zwykle na poziomie 40-50%), które może być łatwo oddzielone od większości zanieczyszczeń komórkowych. Nadprodukcja białka w komórce bakteryjnej, powodująca gwałtowny wzrost liczby tworzących się łańcuchów polipeptydowych, jest wystarczającym

czynnikiem indukującym powstawanie nieaktywnych ciałek inkluzyjnych. Potwierdzeniem tego faktu jest odkładanie się agregatów białkowych w cytoplazmie bakteryjnej w przypadku nadprodukcji homologicznych białek cytosolowych (32). Wykazano, że wydajność tworzenia się natywnej formy białka zależy od względnych relacji pomiędzy szybkościami jego biosyntezy, fałdowania oraz agregacji (33). Zgodnie z tym modelem, szybkość tworzenia się natywnego białka powinna rosnąć wraz z obniżeniem poziomu ekspresji białka, ponieważ w tych warunkach spada poziom agregacji tworzącego się białka. Wykazano na przykład, że zredukowanie szybkości wzrostu mikroorganizmów poprzez obniżenie temperatury hodowli, zmianę wartości pH, czy zastosowanie specyficznego podłoża hodowlanego, powoduje podwyższenie wydajności tworzenia się aktywnego białka (34). Powolny proces fałdowania, prowadzący do agregacji może być oczekiwany w przypadku biosyntezy rekombinowanych białek posiadających w natywnym stanie liczne mostki disulfidowe. Decyduje o tym etap wytwarzania mostków disulfidowych, który jest etapem powolnym, w większości przypadków limitującym szybkość procesu fałdowania.

#### 4. Uzyskiwanie aktywnych białek z ciałek inkluzyjnych

W celu otrzymania biologicznie czynnego produktu agregaty białkowe muszą być rozpuszczone i zrenaturowane. Procedura pozwalająca na uzyskiwanie aktywnych białek z ciałek inkluzyjnych obejmuje trzy etapy:

- 1) **izolowanie** ciałek inkluzyjnych z komórek bakteryjnych i ich oczyszczenie;
- 2) **rozpuszczanie** ciałek inkluzyjnych;
- 3) **renaturacja** białek wchodzących w skład ciałek inkluzyjnych.



Rys. 2. Schemat otrzymywania aktywnego biologicznie białka z ciałek inkluzyjnych, strzałka skierowana w bok oznacza frakcję odrzuconą, wg (2).



Dwa pierwsze etapy są zazwyczaj wysokowydajne i łatwe do przeprowadzenia, ponieważ w nieskomplikowany sposób można uzyskać oczyszczone ciała inkluzyjne, które następnie rozpuszcza się w odpowiednim buforze (szczegóły są przedstawione w tabeli). Etapem limitującym wydajność całego procesu jest renaturacja. Powodzenie tego etapu zależy głównie od właściwości białka podlegającego renaturacji. Ogólny schemat postępowania przedstawiono na rysunku 2.

#### 4.1. Izolowanie ciałek inkluzyjnych

Etap izolowania ciałek inkluzyjnych polega na ich wyodrębnieniu z komórek bakteryjnych. Ponieważ ciała inkluzyjne charakteryzują się wyższą gęstością niż pozostałe składniki komórki, mogą być od nich w łatwy sposób oddzielone poprzez wirowanie. Po zniszczeniu ściany komórkowej bakterii metodami chemicznymi (detergenty), enzymatycznymi (lizozym) lub/i mechanicznymi (działanie ultradźwiękami), mieszanina poddawana jest kilkakrotnemu wirowaniu. Otrzymany osad ciałek inkluzyjnych jest oddzielany od frakcji rozpuszczalnej i poddawany przemywaniu buforami zawierającymi niskie stężenie czynników chaotopowych (np. mocznik czy chlorowodorek guanidyny), lub detergentów (np. Triton X-100) (2,35-37). Etap przemywania ma na celu jak najdokładniejsze usunięcie wszelkich pozostałości komórkowych, w tym również białek bakteryjnych, które mogą ulec adsorbacji na powierzchni ciałek inkluzyjnych podczas procesu agregacji.

#### 4.2. Rozpuszczanie ciałek inkluzyjnych

Osad zawierający ciała inkluzyjne jest rozpuszczany w buforach o właściwościach silnie denaturujących (4-7 M roztwór chlorowodoru guanidyny, 5-10 M roztwór mocznika, 0,01-2% roztwory detergentów jonowych), a jeśli białko zawiera reszty cysteinowe, również w roztworach o właściwościach silnie redukujących (0,1-0,3 M roztwór  $\beta$ -merkaptoetanolu, 0,1 M roztwór ditiotretolu lub dithioerytrolu) (2,35-37). Zastosowanie tych odczynników ma na celu likwidację wszystkich niekwalencyjnych oddziaływań wewnątrz agregatów oraz redukcję wiązań disulfidowych, jeśli występują one w łańcuchu polipeptydowym. Ponieważ reakcje wymiany tiol/disulfid przebiegają z udziałem anionu merkaptidowego, rozpuszczanie ciałek inkluzyjnych przeprowadza się przy pH lekko alkalicznym (8,0-9,0). Proces prowadzi się w temperaturze pokojowej mieszając roztwór przez kilka godzin, po czym roztwór zawierający frakcję rozpuszczonych białek oddziela się przez wirowanie od nierozpuszczalnej pozostałości. Z czynników denaturujących częściej polecany jest chlorowodorek guanidyny, ponieważ mocznik w wysokim stężeniu ma tendencję do częściowego rozkładu. Powstające w wyniku tego rozkładu jony cyjanianowe mogą reagować z wolnymi grupami aminowymi łańcucha polipeptydowego powodując



nieodwracalną modyfikację białka (2). Jeśli akumulacja pożądanego białka w ciałkach inkluzyjnych jest wysoka, a produkt nadekspresji stanowi ponad 50% całkowitej puli białek, wówczas nie jest konieczne rozdzielanie nierozpuszczalnego i rozpuszczalnego materiału komórkowego. Ciałka inkluzyjne mogą być wówczas rozpuszczane bezpośrednio poprzez traktowanie komórek bakteryjnych czynnikami chaotropowymi (np. 4 M roztworem chlorowodoru guanidyny) (36). Wówczas gdy mamy do czynienia z ciałkami inkluzyjnymi gromadzącymi się w periplazmie, możliwe jest ich rozpuszczanie *in situ*, techniką w której denaturant i czynnik redukujący są dodawane bezpośrednio do hodowli w końcowym etapie fermentacji (36). Kolejnym etapem postępowania przed rozpoczęciem procesu renaturacji białka jest usunięcie czynnika redukującego poprzez dializę lub filtrację. Jeśli w łańcuchu polipeptydowym renaturowanych białek występują reszty cysteinowe, stosuje się często blokowanie grup tiolowych poprzez reakcję z utlenioną formą glutationu (G-S-S-G) prowadzące do wytworzenia mieszanych mostków disulfidowych typu białko-Cys-S-S-G (35). Procedura ta zabezpiecza zredukowane reszty cysteinowe przed przypadkowym utlenieniem. Pomimo opisanej procedury, rozpuszczone ciałka inkluzyjne mogą być wciąż zanieczyszczone pozostałościami białek komórkowych, kwasami nukleinowymi i składnikami błon komórkowych. Obecność tych zanieczyszczeń indukuje agregację podczas etapu renaturacji obniżając jej wydajność i dlatego korzystne jest dodatkowe oczyszczenie rozpuszczonej frakcji białkowej przed ostateczną renaturacją (38). Możliwe jest zastosowanie w tym celu chromatografii jonowymiennej, filtracji żelowej lub wysokosprawnej chromatografii cieczowej na odwróconej fazie (RP HPLC). Wspólną cechą wymienionych metod chromatograficznych jest możliwość użycia buforów utrzymujących białko w stanie zdenaturowanym i w pełni zredukowanym.

### 4.3. Renaturacja

Proces renaturacji rozpoczyna się od usunięcia czynnika denaturującego. Można to osiągnąć stosując następujące procedury:

a. **Rozcieńczenie w buforze renaturacyjnym.** Roztwór białka jest stopniowo rozcieńczany w buforze, którego główne składniki są podane w przedstawionej tabeli (35-37). Oprócz odpowiedniego składu buforu renaturacyjnego bardzo istotne są takie warunki procesu renaturacji jak temperatura, czas trwania czy stężenie białka.

b. **Dializa.** Stopniowe uwalnianie zdenaturowanego białka od czynnika denaturującego poprzez dializę do buforu renaturującego. Zbyt długi czas ekspozycji białka na pośrednie stężenia denaturanta może jednak powodować jego ponowną agregację.

c. **Diafiltracja.** Jest to metoda szybsza niż dializa, jednak niepożądana akumulacja zdenaturowanego białka na membranie może znacznie ograniczyć jej stosowalność.



d. **Filtracja żelowa.** Do oddzielenia niskocząsteczkowego czynnika denaturującego od białka wykorzystuje się znaczną różnicę mas cząsteczkowych. Wymywanie białka ze złoża prowadzi się za pomocą buforu o właściwościach renaturujących.

Tabela

Typowe warunki procesu izolowania i rozpuszczania ciałek inkluzyjnych oraz renaturacji rekombinowanego białka, wg (2,35-37)

Etap	Czynność	Typowy skład buforu	Stężenie białka (mg/ml)	Temperatura (°C)	Czas
I	izolowanie ciałek inkluzyjnych z komórek bakteryjnych	– Tris HCl/EDTA/100 mM NaCl/PMSF/lizozym (ultradźwięki, wirowanie)	–	25	10 min
		– Tris HCl/EDTA/100 mM NaCl/mocznik/PMSF (mieszanie, wirowanie)		4	1 godz.
		– Tris HCl/EDTA/1 M NaCl		25	10 min
		– H <sub>2</sub> O (mieszanie, wirowanie)		25	10 min
II	rozpuszczanie ciałek inkluzyjnych	6 M chlorowodorek guanidyny 0,1 M TrisHCl pH 8,0 1-5 mM EDTA pH 8,0 0,1 M DTT (lub DTE)*	5-10	25	2-4 godz.
	usuwanie czynnika redukującego	– obniżenie pH do wartości 2,0-4,5 – dializa do buforu zawierającego 6 M chlorowodorek guanidyny, pH 2,0-4,5	5-10	4	
III	renaturacja	rozcieńczenie 1:100 (1:200) w buforze zawierającym następujące składniki (wszystkie lub część): – TrisHCl pH 7,5-8,5 – EDTA – 0,5–0,7 M L-Arginina – 0,5-2,0 M chlorowodorek guanidyny – glicerol – Triton X-100 – fosfolipidy – GSH/GSSG***	< 1	4-30**	od kilku godz. do kilku dni**

\* Czynniki redukujące stosuje się, gdy białko zawiera reszty cysteinowe; \*\* warunki zależne od właściwości konkretnego białka; \*\*\* system GSH/GSSG (zazwyczaj 1:10) stosuje się w przypadku białek zawierających reszty cysteinowe tworzące mostki disulfidowe.

## 5. Podsumowanie

Białka eukariotyczne produkowane w komórkach bakteryjnych bardzo często nie uzyskują właściwej struktury trzeciorzędowej i odkładają się w cytoplazmie (rzadziej w perioplazmie) jako nieaktywne, bezpostaciowe, nie otoczone żadną błoną



złogi określane jako ciała inkluzyjne. Zjawisko to dotyczy najczęściej białek złożonych, posiadających w natywnej strukturze liczne wiązania disulfidowe. Nieprawidłowe zwijanie takich białek jest konsekwencją zbyt niskiego potencjału redukcyjno-oksydacyjnego bakteryjnej cytoplazmy oraz braku enzymów katalizujących reakcje utleniania grup tiolowych i izomeryzacji wiązań disulfidowych. Tworzenie ciałek inkluzyjnych jest obserwowane również podczas nadprodukcji małych białek, także tych, które nie zawierają wiązań disulfidowych. Fakt ten tłumaczy się niedostateczną ilością białek pomocniczych, aktywnie uczestniczących w procesie fałdowania nowo syntetyzowanych polipeptydów. Nadprodukcja białka jest w tym przypadku wystarczającym czynnikiem wywołującym tworzenie agregatów białkowych. W celu uzyskania biologicznie czynnego produktu ciała inkluzyjne muszą być oddzielone od zanieczyszczeń komórkowych, rozpuszczone i zrenaturowane. Efektywność tego procesu zależy głównie od właściwości konkretnego białka. O powodzeniu procesu decyduje zwłaszcza etap renaturacji, czyli wytworzenia warunków pozwalających rozwiniętemu łańcuchowi polipeptydowemu przyjąć natywną konformację, właściwą dla aktywnego białka.

## Literatura

1. Soto C., (2003), *Nature Rev./Neuroscience*, 4, 49-60.
2. Georgiou G., de Bernardez Clark E., (1991), *Protein refolding*, ASC Symposium Series, Washington, DC.
3. Mogk A., Mayer M. P., Deuerling E., (2002), *ChemBioChem.*, 3, 807-814.
4. Huang H. C., Sherman M. Y., Kandró O., Goldberg A. L., (2001), *J. Biol. Chem.*, 276, 3920-3928.
5. Johnston J. A., Ward C. L., Kopito R. R., (1998), *J. Cell Biol.*, 143, 1883-1898.
6. Heath C. M., Windson M., Wileman T., (2001), *J. Cell Biol.*, 153, 449-455.
7. Buchner J., Rudolph R., (1991), *Curr. Opin., Biotechnol.*, 2, 532-538.
8. Marston F. A., (1986), *Biochem. J.*, 240, 1-12.
9. Goeddel D. V., Kleid D. G., Bolivar F., Heyneker H. L., Yansura D. G., Crea R., Hirose T., Kraszewski A., Itakura K., Riggs A. D., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 106-109.
10. Leemans R., Remaut E., Fiers W., (1987), *J. Bacteriol.*, 169, 1899-1904.
11. Berndt N., Cohen P. T. W., (1990), *Eur. J. Biochem.*, 190, 291-297.
12. Bowden G., Georgiou G., (1990), *Recombinant DNA Technology and Applications*, Eds. Prokop A., Bajpai K. R., Ho C., McGraw-Hill, 333-356.
13. Zheng M., Asland F., Storz G., (1998), *Science*, 279, 1718-1721.
14. Ritz D., Beckwith J., (2001), *Annu. Rev. Microbiol.*, 55, 21-48.
15. Belin D., Vassalli J. D., Combepine C., Godeau F., Nagamine Y., (1985), *Eur. J. Biochem.*, 148, 225-232.
16. Vlahos C. J., Wilhelm O. G., Hassell T., Jaskunas S. R., Bang N. U., (1991), *J. Biol. Chem.*, 266, 10070-10072.
17. Bardwell J. C., McGovern K., Beckwith J., (1991), *Cell*, 67, 581-589.
18. Sone M., Akiyama Y., Ito K., (1997), *J. Biol. Chem.*, 272, 10349-10352.
19. Bader M. W., (2000), *J. Biol. Chem.*, 275, 26082-26088.
20. Georgiou G., Telford J. N., Shuler M. L., Wilson D. B., (1986), *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 1157-1161.
21. Bowden G. A., Georgiou G., (1990), *J. Biol. Chem.*, 265, 16760-16766.
22. Bowden G. A., Paredes A. M., Georgiou G., (1991), *Bio/Technology*, 9, 725-730.
23. Carrio M. M., Villaverde A., (2002), *J. Biotechnol.*, 96, 3-12.



24. Carri M. M., Corchero J. L., Villaverde A., (1998), *FEMS Microbiol. Lett.*, 169, 9-15.
25. Carri M. M., Villaverde A., (2000), *FEBS Lett.*, 471, 7-11.
26. Olberg K., Chrnyk B. A., Wetzel R., Fink A. L., (1994), *Biochemistry*, 33, 2628-2634.
27. Cubarsi R., Carri M. M., Villaverde A., (2001), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 282, 436-441.
28. Carri M. M., Corchero J. L., Villaverde A., (1999), *Biochim. Biophys. Acta*, 1434, 170-176.
29. Carri M. M., Villaverde A., (2001), *FEBS Lett.*, 489, 29-33.
30. Valax P., Georgiou G., (1993), *Comp. Biotechnol. Prog.*, 9, 539-547.
31. Laskowska E., Kuczyńska-Wiśnik D., Skorko-Glonek J., Taylor A., (1996), *Mol. Microbiol.*, 22, 555-571.
32. Gribskov M., Burgess R. R., (1983), *Gene*, 26, 109-118.
33. Kiefhaber T., Rudolph R., Kohler H. H., Buchner J., (1991), *Bio/Technology*, 9, 825-829.
34. Schein C. H., Noteborn M. H. M., (1988), *Bio/Technology*, 6, 291-294.
35. de Bernardez Clark E., Schwarz E., Rudolph R., (1999), *Methods Enzymol.*, 309, 217-236.
36. de Bernardez Clark E., (1998), *Curr. Opin. Biotech.*, 9, 157-163.
37. Rudolph R., Lilie H., (1996), *FASEB J.*, 10, 49-56.
38. Maachupalli-Reddy J., Kelley B. D., de Bernardez Clark E., (1997), *Biotechnol. Prog.*, 13, 144-150.