



## Konstrukcja syntetycznego genu $K_2L$ -tPA – delecyjnej odmiany tkankowego aktywatora plazminogenu. Ekspresja genu w bakteriach *E. coli* i renaturacja rekombinowanego białka

Małgorzata Sierant, Andrzej Okruszek

Zakład Chemii Bioorganicznej, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych, Polska Akademia Nauk, Łódź

**Construction of synthetic gene coding for  $K_2L$ -tPA – deletion variant of tissue plasminogen activator. Expression in *E. coli* and renaturation of recombinant protein**

### Summary

The human fibrinolytic system comprises an inactive proenzyme – plasminogen which can be converted to the active form – plasmin which, in turn, degrades fibrin clots into soluble fibrin degradation products. Tissue plasminogen activator (t-PA) has been identified as a main physiological factor responsible for plasminogen – plasmin conversion. The high fibrin specificity of t-PA, which allows efficient activation on the surface of fibrin clots, has stimulated great interest in its preparation to be used for thrombolytic therapy. Several approaches have been followed to further improve the thrombolytic properties of recombinant t-PA by protein engineering to enhance its plasminogen – activating potency as well as fibrin specificity, and to reduce its plasma clearance. One of the approaches involves the conjugation of its deletion variant, so-called  $K_2L$ -tPA, to various biomolecules.  $K_2L$ -tPA is a 351-aminoacid C-terminal fragment of human t-PA. The protein is composed of two major domains: Kringle-2 ( $K_2$ ), responsible for fibrin binding, and so-called Light Chain domain (L), containing active centre of the enzyme. In this paper, we describe our efforts on expression of synthetic gene coding for  $K_2L$ -tPA, and on renaturation and purification of recombinant protein.

### Adres do korespondencji

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

**biotechnologia**

4 (63) 124–141 2003

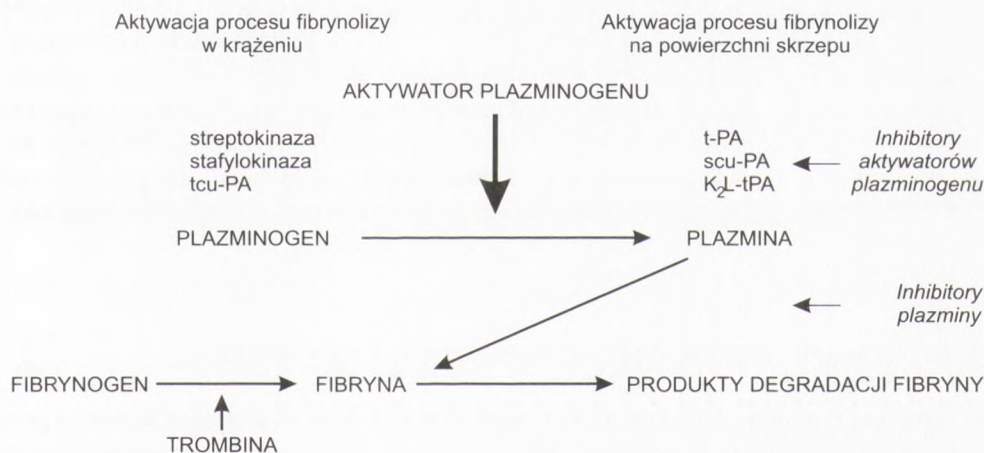
### Key words:

fibrinolytic system, tissue plasminogen activator (t-PA), deletion variant  $K_2L$ -tPA.

## 1. Wstęp

Zaburzenia w funkcjonowaniu układu krążenia krwi prowadzące do poważnych schorzeń, takich jak: choroba niedokrwienna serca, zawał mięśnia sercowego, zatory płucne, udary mózgu, są częstą przyczyną przedwczesnych zgonów. Wciąż istnieje duże zapotrzebowanie na nowe środki terapeutyczne, które mogłyby przywracać właściwy stan nieprawidłowo działających systemów krzepnięcia krwi i fibrynolizy. Fizjologiczna funkcja systemu fibrynolitycznego, polegająca na utrzymaniu płynności krwi poprzez rozpuszczanie powstałych złożeń, ulega czasami zaburzeniu. Nie wielkie zakrzepy lub agregaty płytkowe, oderwane od ściany naczynia krwionośnego mogą być przyczyną zatorów i uniemożliwić przepływ krwi przez to naczynie. Powstawaniu zakrzepów sprzyjają uszkodzenia naczyń krwionośnych, a w szczególności zmiany miażdżycowe. Uaktywnienie procesu fibrynolizy powoduje rozpuszczenie złożeń poprzez degradację włókniaka stanowiącego główny składnik zakrzepów, a tym samym częściowe lub całkowite udrożnienie naczynia krwionośnego. Ma to szczególne znaczenie w miejscach takich jak naczynia wieńcowe, gdzie wystąpienie zatoru grozi ostrym zawałem mięśnia sercowego.

Centralnym enzymem układu fibrynolitycznego jest plazmina. Powstaje ona z nieaktywnego białka prekursorowego, plazminogenu, w wyniku hydrolizy wiązania peptydowego Arg<sub>561</sub>-Val<sub>562</sub>. Reakcję tę katalizują substancje określane jako **aktywatory plazminogenu** (rys. 1). Stosowanie w praktyce klinicznej aktywatorów plazminogenu potwierdziło ich skuteczność jako leków trombolitycznych w terapii wielu chorób o podłożu zakrzepowym. Ujawniono jednak niekorzystne skutki uboczne to-



Rys. 1. Schemat działania aktywatorów plazminogenu w procesie fibrynolizy. Aktywatory plazminogenu wyższych generacji (t-PA, scu-PA, K<sub>2</sub>L-tPA) przekształcają selektywnie plazminogen do plazminy na powierzchni skrzepu. Aktywatory takie jak streptokinaza, stafylokinaza czy tcu-PA nie wykazują takiej specyficzności.

warzyszące takiej terapii, np. ryzyko wystąpienia krwotoków. Zróznicowana skuteczność poszczególnych czynników trombolitycznych oraz możliwość wywoływania przez nie niekorzystnych skutków ubocznych wynika głównie z ich różnych właściwości i odmiennych mechanizmów działania (1).

Tradycyjnie w literaturze wyróżnia się kilka generacji leków trombolitycznych. Pierwszą generację stanowią naturalne substancje: białko pochodzenia bakteryjnego – streptokinaza (Streptase®) (2), oraz białko izolowane z ludzkiego moczu – urokinaza (3-6). Działanie tych substancji jest jednak mało specyficzne. Aktywacja plazminogenu w krążącej krwi ma charakter systemiczny i wywołuje zaburzenia funkcjonowania systemu krzepnięcia poprzez m.in. degradację fibrynogenu oraz czynników V i VIII, co zwiększa ryzyko wystąpienia niepożądanych krwawień. Ponadto, w przypadku streptokinazy pojawia się problem immunogenności białka.

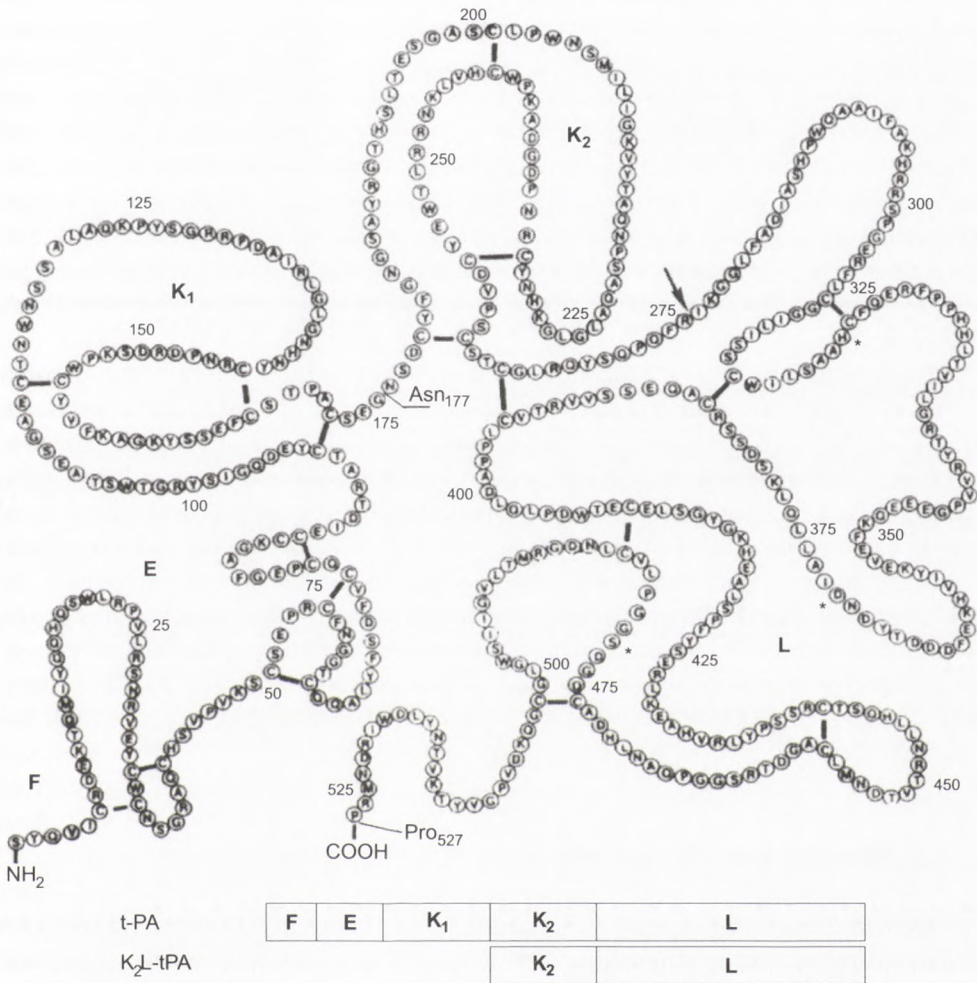
Do leków trombolitycznych drugiej generacji zaliczany jest rekombinowany tkankowy aktywator plazminogenu – rt-PA (Activase, Alteplase, Actilyse) (7), jednołańcuchowy aktywator typu urokinazowego – scu-PA (8) oraz acylowany kompleks plazminogen-streptokinaza – APSAC (*Anisoylated Plasminogen-Streptokinase Activator Complex*, Antistreptase, Eminase) (9). Posiadają one znacznie korzystniejsze właściwości trombolityczne. Nie powodują aktywacji systemowej, a ich działanie następuje na powierzchni zakrzepu.

Zastosowanie technik inżynierii genetycznej dało możliwość skonstruowania nowych cząsteczek białkowych o udoskonalonych właściwościach trombolitycznych, charakteryzujących się np. zwiększonym powinowactwem do włókniaka, wydłużonym czasem półtrwania w osoczu, czy zwiększonej specyficzności i selektywności działania. Poszukiwania nowych aktywatorów plazminogenu prowadzone są poprzez zastosowanie mutacji punktowych, mutacji delecyjnych, oraz konstrukcje hybryd białkowych (np. połączenie znanych aktywatorów plazminogenu z plazminogenem czy też z przeciwciałami monoklonalnymi) (10-12). Kilkanaście nowych preparatów uzyskanych metodami biotechnologicznymi, określanymi jako leki trombolityczne trzeciej generacji, znajduje się aktualnie w różnych fazach procesu rejestracyjnego (13,14). Oprócz substancji opartych na elementach struktury t-PA oraz u-PA są wśród nich preparaty wywodzące się z białka C (CTC-111), białek śliny nietoperza (ZK-152387), czy polipeptydu wytwarzanego przez szczepy *Staphylococcus* (stafylokinaza).

### 1.1. Tkankowy aktywator plazminogenu (t-PA) i jego odmiany

Ludzki tkankowy aktywator plazminogenu, t-PA (*tissue plasminogen activator*) jest najważniejszym obok aktywatora typu urokinazowego, naturalnie występującym białkiem o charakterze enzymu proteolitycznego, katalizującym przejście nieaktywnego plazminogenu do aktywnej proteazy serynowej – plazminy. Jest on jednołańcuchową glikoproteiną o masie cząsteczkowej około 70 kDa, składającą się

z 527 aminokwasów, wśród których znajduje się 35 reszt cysteinowych tworzących 17 wiązań disulfidowych; N-końcowym aminokwasem jest seryna (15). Gen kodujący t-PA jest zlokalizowany w chromosomie 8 (8p12) i jest podzielony na 14 eksonów (16). Część kodująca genu t-PA zawiera 2530 pz; kodon start (ATG) znajduje się w pozycji 85, natomiast sekwencja terminująca transkrypcję (TGA) znajduje się w pozycji 1771 (15). Łańcuch polipeptydowy t-PA tworzy pięć domen strukturalnych spełniających różne funkcje (rys. 2) (15,17,18). Są to: N-końcowa domena F – podobna do segmentów występujących w fibronektynie (aminokwasy 1-50), domena E – o budowie podobnej do epidermalnego czynnika wzrostu EGF (aminokwasy



Rys. 2. Schemat struktury tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA). Zaznaczono domeny strukturalne białka (F, E, K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, L), mostki dwusulfidowe (wężyki) miejsca glikozyłacji (gwiazdki), oraz miejsce proteolizy (strzałka). Odmiana delecyjna K<sub>2</sub>L-tPA rozpoczyna się od Asn<sub>177</sub>.

51-87), dwie domeny kringlowe  $K_1$  i  $K_2$  (aminokwasy 88-175 i 176-263), oraz C-końcowa domena L (aminokwasy 264-527). Miejsca wiązania włókniaka znajdują się w domenach F i  $K_2$ , domeny F i E odpowiadają za szybkie usuwanie aktywatora z krążenia, natomiast w domenie L jest zlokalizowana aktywność katalityczna enzymu. Tkankowy aktywator plazminogenu należy do rodziny proteaz serynowych, do której należą również m.in. trypsyna, chymotrypsyna i elastyna. W domenie L występuje typowa triada katalityczna Asp<sub>371</sub>, His<sub>322</sub>, Ser<sub>478</sub>, która jest charakterystyczna dla innych proteaz serynowych. Enzymy te są syntetyzowane jako jednołańcuchowe, nieaktywne zymogeny, wymagające aktywacji przez przecięcie łańcucha polipeptydowego i utworzenie cząsteczki dwułańcuchowej. W takiej postaci ich aktywność wzrasta  $10^7$ - $10^8$  razy (19). T-PA jest nietypową proteazą serynową, ponieważ jego forma jednołańcuchowa (sct-PA) jest również aktywna. Hydroliza wiązania peptydowego pomiędzy aminokwasami Arg<sub>275</sub>-Ile<sub>276</sub> przez plazminę powoduje przejście z formy jednołańcuchowej do dwułańcuchowej, co podwyższa tylko kilkakrotnie aktywność t-PA (19). Wewnątrz cząsteczki t-PA znajdują się trzy miejsca glikozylacji na resztach asparaginowych Asn<sub>117</sub>, Asn<sub>184</sub> i Asn<sub>448</sub>. Aktywacja plazminogenu do plazminy przez t-PA odbywa się na powierzchni zakrzepu, przy czym efektywność katalityczna aktywatora po związaniu z włókniakiem wzrasta od 200 do 400 razy (20,21). Ta selektywność działania w stosunku do plazminogenu zaadsorbowanego na powierzchni włókniaka wynika z obecności w cząsteczce t-PA miejsc wiążących włókniak.

Znajomość funkcji poszczególnych domen t-PA (16-18) skłoniła liczne ośrodki naukowe oraz firmy biotechnologiczne do podjęcia prac nad otrzymaniem odmian (mutein) tego białka o korzystniejszych właściwościach terapeutycznych. Stosując techniki inżynierii genetycznej i białkowej uzyskano setki nowych odmian t-PA, będących muteinami punktowymi, delecyjnymi, bądź hybrydami (koniugatami) z innymi cząsteczkami (22-24). Celem poszukiwań było znalezienie czynnika trombolitycznego o wyższej aktywności proteolitycznej, zwiększonym powinowactwie do włókniaka oraz przedłużonym okresie półtrwania w osoczu. Zwracano też uwagę na koszty wytwarzania leku, próbując uzyskać aktywne białko w systemach ekspresyjnych tańszych niż stosowane zazwyczaj hodowle komórek ssaczych (25). Do wytwarzania leków trombolitycznych zastosowano m.in. bakterie (26), drożdże (27), komórki owadzie (28), oraz zwierzęta transgeniczne (29).

## 1.2. Odmiana delecyjna $K_2$ L-tPA

Jednym z najbardziej owocnych kierunków poszukiwań aktywnych mutein t-PA była konstrukcja odmiany delecyjnej  $K_2$ L-tPA, w której z cząsteczki tkankowego aktywatora plazminogenu metodami inżynierii genetycznej usunięto trzy N-końcowe domeny: F, E i  $K_1$  (rys. 2). Na początku lat dziewięćdziesiątych XX w. w literaturze opisano trzy procedury otrzymywania białka  $K_2$ L-tPA w bakteriach *E. coli* poprzez ekspresję:

- syntetycznego genu zaopatrzonego w sekwencję liderową, z sekrecją białka do perioplazmy (30);
- genu fuzyjnego, z sekrecją białka do podłoża i chemicznym odcięciem K<sub>2</sub>L-tPA od białka nośnikowego (31);
- rekombinowanego cDNA, izolowanie ciałek inkluzyjnych i ich renaturację (32).

We wszystkich trzech przypadkach uzyskano aktywne fibrynolitycznie białka o masach cząsteczkowych zbliżonych do 38 kDa (ok. 350 aminokwasów), pozbawione łańcuchów cukrowych, jednak poziom ekspresji białka w systemach sekrecyjnych był niezadowalający (30,31). Preparat uzyskany przez zespół z firmy Boehringer Mannheim poprzez renaturację ciałek inkluzyjnych (32), znany jako Reteplase lub BM 06.022, przeszedł wyczerpujące badania biologiczne oraz kliniczne (33) i w 1996 r. został dopuszczony przez amerykańską agencję FDA do stosowania w USA jako lek trombolityczny trzeciej generacji (Retavase<sup>TM</sup>). Białko K<sub>2</sub>L-tPA (Reteplase) posiada wydłużony okres półtrwania w osoczu oraz preferencyjną aktywność w stosunku do plazminogenu związanego z włóknikiem, wykazując znaczną konkurencyjność w stosunku do macierzystego białka t-PA (Alteplase) (32). Sukces zespołu z firmy Boehringer Mannheim polegał na opanowaniu procesu renaturacji tworzonego z wysoką wydajnością nieaktywnego, zdenaturowanego białka. Renaturacja jest w tym przypadku zadaniem szczególnie trudnym, ponieważ wiąże się z prawidłowym odтворzeniem 9 mostków dwusulfidowych, obecnych w cząsteczce K<sub>2</sub>L-tPA. Złożoność technologii renaturacji białka znalazła zresztą odbicie w cenie leku Retavase<sup>TM</sup>, która jest porównywalna z ceną preparatu Alteplase wytwarzanego w komórkach ssących.

W pracy przedstawiono wyniki badań autorów nad konstrukcją syntetycznego genu K<sub>2</sub>L-tPA, jego ekspresją w bakteriach *E. coli* oraz izolowaniem i renaturacją rekombinowanego białka.

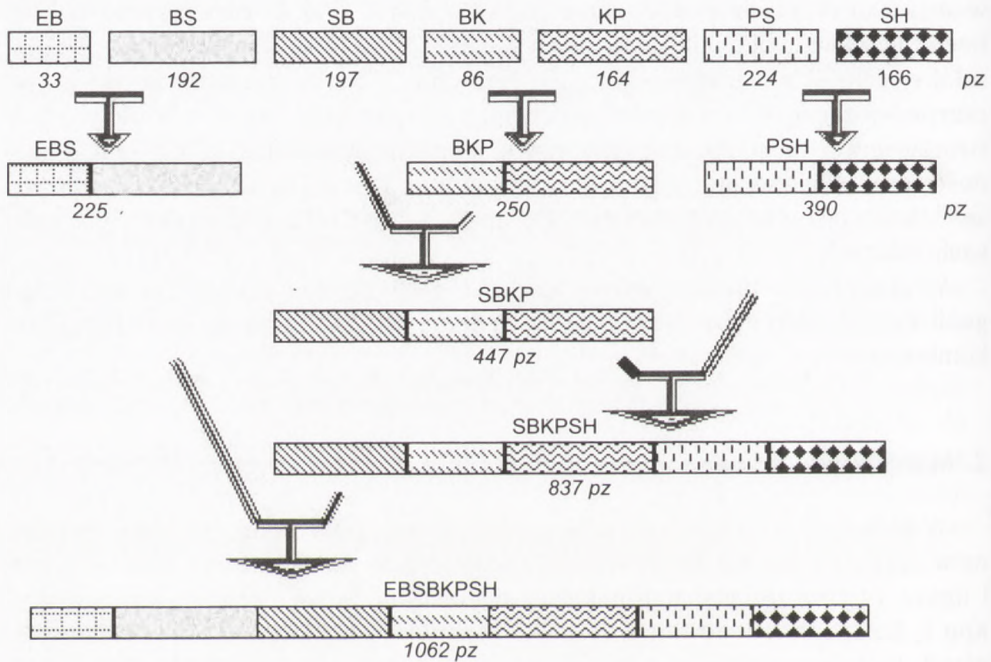
## 2. Materiały i metody

W badaniach wykorzystano: syntetyczne oligodeoksyrybonukleotydy, wytworzone w Zakładzie Chemii Bioorganicznej CBMM PAN w Łodzi; enzymy: kinaza T4 PNK i ligaza T4 DNA (Amersham); nukleazy restrykcyjne Eco RI, Nde I, Bam HI, Sal I, Kpn I, Pst I, Sph I, Hind III (Amersham); plazmid do klonowania pUC 19 (New England BioLabs); prokariotyczne wektory ekspresyjne: pKK 223-3 (Pharmacia), pDR540 (Pharmacia), pT7-7 (S. Tabor, Harvard Medical School), pTTQ19 (Amersham), pT7TioHis (konstrukcja A. Płucienniczak, IBA, Warszawa), pTrxFus (Invitrogen), pACMOD2-Arg (konstrukcja A. Płucienniczak IBA, Warszawa), pT7-7(ArgU); szczepy bakterii *Escherichia coli*: DH5 $\alpha$ , JM105, 5346, BL21(DE3), GI724, GI698; przeciwciała poliklonalne anty-t-PA (PolClone); IPTG (Serva); GSH, GSSG (Serva), chlorowodorek guanidyny (Serva); złoże do oczyszczania białka: kolumna AQUAPORE RP-300, 220x4,6 mm (Perkin-Elmer), ETI-Sepharose – białko ETI (*Erythrina trypsin in-*

hibitor, Boehringer Mannheim) immobilizowane na złożu CNBr-Sepharose (Pharmacia); test aktywności Spectrolyse/Fibrin Assay (Biopool); białkowe wzorce masy (Sigma). W pracy wykorzystano typowe procedury biologii molekularnej opisane w podręczniku *Molecular Cloning* (34).

### 2.1. Konstrukcja syntetycznego genu K<sub>2</sub>L-tPA

Jako podstawę konstrukcji wybrano C-końcowy fragment białka t-PA o długości 351 aminokwasów (od Asn<sub>177</sub> do Pro<sub>527</sub>) (15). Sekwencja ta została przepisana na sekwencję nukleotydową obu komplementarnych nici genu w oparciu na kodonach zastosowanych w podobnej konstrukcji przez Bella i wsp. (35). Gen został następnie podzielony na 7 subfragmentów, o długościach od 33 do 224 par zasad (pz), zawie-

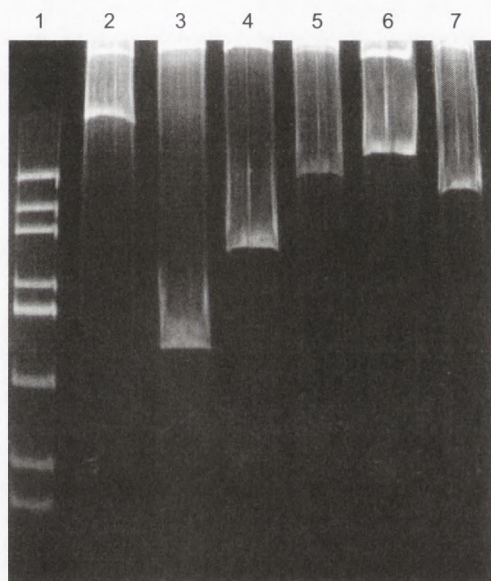


Sekwencje początku i końca genu K<sub>2</sub>L-tPA:

<b>Start Asn Ser</b>	<b>Arg Pro Stop Stop</b>
5' AATT C ATG AAT AGC.....	AGA CCA TAG TGA 3'
3' G TAC TTA TCG.....	TCT GGT ATC ACT TCGA 5
<b>Eco RI</b>	<b>Hind III</b>

Rys. 3. Strategia konstruowania syntetycznego genu K<sub>2</sub>L-tPA. Pokazano kolejne etapy klonowania subfragmentów genu w wektorze pUC 19 aż do otrzymania całkowitej sekwencji EBSBKPSH (Eco RI - Bam HI - Sal I - Bam HI - Kpn I - Pst I - Sph I - Hind III).

rających na swoich końcach sekwencje rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne (rys. 3). Skrócone symbole subfragmentów pochodzą od nazw enzymów: EB (Eco RI – Bam HI, 33 pz), BS (Bam HI – Sal I, 192 pz), SB (Sal I – Bam HI, 197 pz), BK (Bam HI – Kpn I, 86 pz), KP (Kpn I – Pst I, 164 pz), PS (Pst I – Sph I, 224 pz), SH (Sph I – Hind III, 166 pz). Obie komplementarne nici komponentów genu  $K_2L$ -tPA zostały następnie podzielone na krótkie jednoniciowe fragmenty (oligodeoksyrybonukleotydy), które zsyntetyzowano metodą amidofosforynową z wykorzystaniem zautomatyzowanego syntetyzera DNA ABI 380B. Łącznie zsyntetyzowano 60 fragmentów o długościach od 18 do 46 nukleotydów. Po fosforylacji końców 5' za pomocą kinazy polinukleotydowej z faga T4 i hybrydacji komplementarnych oligonukleotydów przeprowadzano ligację dwuniciowych odcinków DNA, składających się na pojedyncze subfragmenty genu. Dwuniciowe DNA posiadające właściwą długość oczyszczano na 10% żelu poliakrylamidowym i ligowano z przeciętym odpowiednimi enzymami restrykcyjnymi plazmidem pUC 19. Ostatecznie plazmid ze wstawką wprowadzano do bakterii *Escherichia coli* (szczep DH5 $\alpha$ ) i klonowano. Se-



Rys. 4. Mapowanie genu  $K_2L$ -tPA sklonowanego w wektorze pUC EH enzymami restrykcyjnymi:

- 1) wzorzec długości fragmentów DNA (pUC 19/Bsp RI): 587, 458, 434, 298, 267, 257, 174, 102, 80, 18, 11 pz,
- 2) pUC EH/Eco RI - Hind III, fragment EBSKPSH odpowiada genowi  $K_2L$ -tPA (1062 pz),
- 3) pUC EH/Eco RI - Sal I, fragment EBS (225 pz),
- 4) pUC EH/Bam HI, fragment BSB (389 pz),
- 5) pUC EH/Sal I - Sph I, fragment SBKPS (671 pz),
- 6) pUC EH/Sal I - Hind III, fragment SBKPSH (837 pz),
- 7) pUC EH/Kpn I - Hind III, fragment KPSH (554 pz).



kwencję nukleotydową każdego sklonowanego subfragmentu potwierdzono przez sekwencjonowanie metodą Sanger (36).

W kolejnych etapach subfragmenty genu  $K_2L$ -tPA: EB, BS, SB, BK, KP, PS, SH izolowano z zawierających je plazmidów pUC 19 i stopniowo łączono EB+BS (EBS, 225 pz), BK+KP (BKP, 250 pz), PS+SH (PSH, 390 pz), SB+BKP (SBKP, 447 pz), SBKP+PSH (SBKPSH, 837 pz), i ostatecznie ES+SBKPSH (ESBKPSH, 1062 pz) (rys. 3). Poprawność sekwencji sklonowanych w plazmidzie pUC 19 fragmentów EBS, BKP, SBKP, SBKPSH oraz ostatecznego konstrukt ESBKPSH potwierdzono poprzez mapowanie enzymami restrykcyjnymi i porównanie długości otrzymanych odcinków DNA z odpowiednimi wzorcami (np. pUC 19/Bsp RI, pUC 19/Hinf I) oraz przez sekwencjonowanie metodą Sanger (36). Przykład mapowania enzymami restrykcyjnymi genu  $K_2L$ -tPA sklonowanego w plazmidzie pUC 19 przedstawiono na rysunku 4.

## 2.2. Próby ekspresji genu kodującego białko $K_2L$ -tPA w bakterii *Escherichia coli*

Dwuniciowe DNA kodujące białko  $K_2L$ -tPA wprowadzono do plazmidów ekspresyjnych: **pKK 223-3** (promotor *lac* indukowany IPTG, ekspresja w bakterii *E. coli* szczep JM105), **pDR540** (promotor *tac* indukowany IPTG, ekspresja w bakterii *E. coli* szczep JM105), **pT7-7** (promotor polimerazy RNA T7 indukowany pośrednio IPTG, ekspresja w bakterii *E. coli* szczep BL21(DE3)), **pTTQ19** (promotor *tac* indukowany IPTG, ekspresja w bakterii *E. coli* szczep JM105 lub 5346), i podjęto wysiłki mające na celu uzyskanie rekombinowanego białka. Próby ekspresji genu  $K_2L$ -tPA w wymienionych prokariotycznych wektorach ekspresyjnych nie powiodły się. Wśród białek bakteryjnych, rozdzielonych podczas elektroforezy na żelu poliakrylamidowym z SDS, nie obserwowano pojawienia się dodatkowego białka o masie cząsteczkowej około 38 kDa, zarówno przy bezpośrednim wybarwianiu żeli SDS-owych barwnikiem Coomassie Brilliant Blue, czy też po zastosowaniu bardziej czulej reakcji z przeciwciałami poliklonalnymi anty-tPA. Przyłączenie do genu  $K_2L$ -tPA sekwencji liderowej *phoA* (30), w celu wywołania sekrecji białka do periplazmy bakteryjnej również zakończyło się niepowodzeniem. Podjęto także próbę ekspresji  $K_2L$ -tPA jako białka fuzyjnego z tioredoksyną w plazmidzie **pT7TioHis** (promotor polimerazy RNA z faga T7, gen tioredoksyny, 6xHis, ekspresja w bakterii *E. coli* szczep BL21(DE3)), oraz w plazmidzie **pTrxFus** (promotor  $P_L$ , gen tioredoksyny, ekspresja w bakterii *E. coli* szczep GI724 i GI698). W żadnym przypadku nie obserwowano tworzenia się białka fuzyjnego tioredoksyna- $K_2L$ -tPA o masie cząsteczkowej około 53 kDa.

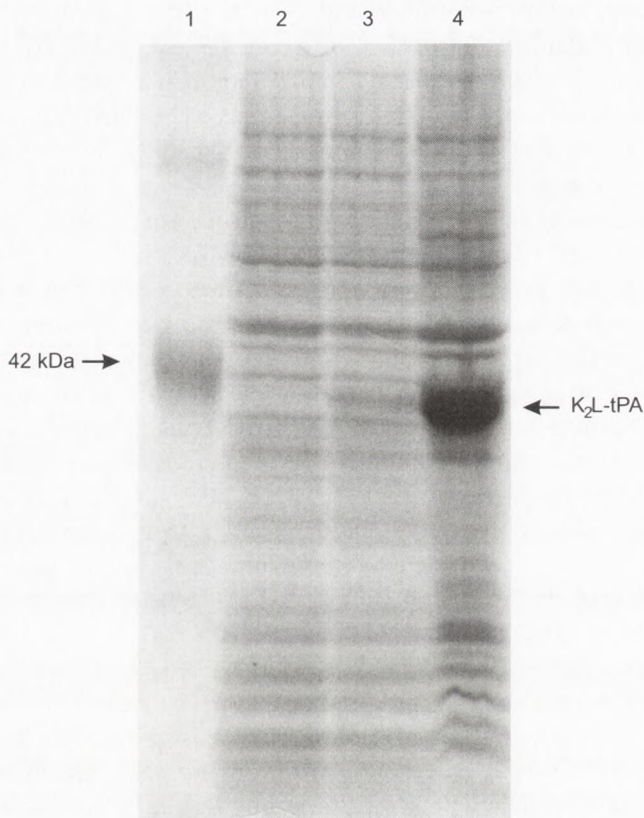
### 2.2.1. Otrzymywanie białka K<sub>2</sub>L-tPA w bakteriach *Escherichia coli* z koekspresją genu *argU*

Wobec niepowodzenia w uzyskaniu produktu ekspresji skonstruowanego przez nas syntetycznego genu kodującego białko K<sub>2</sub>L-tPA w najczęściej stosowanych systemach ekspresyjnych *E. coli*, zwróciliśmy uwagę na zastosowane przez nas kodony (35), a zwłaszcza na tryplety kodujące argininę. Trudności w ekspresji w systemach bakteryjnych genów, w których arginina kodowana jest przez tryplety AGA lub AGG zostały opisane przez Schenka i wsp. (37). Kodony AGA, popularne w genach białek eukariotycznych, są odczytywane w komórkach prokariotycznych przez występujący na bardzo niskim poziomie tRNA<sup>Arg4</sup>, produkt genu *argU* (38). Wykazano, że obecność większej liczby trypletów AGA lub AGG w sekwencji kodującej dane białko znacznie obniża wydajność ekspresji w bakteriach *E. coli*, a wystąpienie powtórzeń tandemowych takich kodonów praktycznie uniemożliwia ekspresję genu w systemach bakteryjnych. Niekorzystny efekt wymienionych kodonów „argininowych” można zniwelować stosując w systemie ekspresyjnym plazmidy, do których wprowadzono dodatkowo gen *argU*.

W przeprowadzonej analizie sekwencji skonstruowanego przez nas genu K<sub>2</sub>L-tPA wykazaliśmy obecność 17 pojedynczych kodonów AGA oraz jednej sekwencji tandemowej, co mogło być przyczyną opisanych niepowodzeń. W celu poprawy warunków ekspresji tego genu w bakteriach *E. coli* zastosowaliśmy pomocniczy plazmid pACMOD2-Arg zawierający m.in. gen *argU* oraz gen oporności na tetracyklinę. Do bakterii *E. coli* wprowadzano po dwa plazmidy: ekspresyjny, zawierający gen K<sub>2</sub>L-tPA (zastosowano opisane wcześniej pKK223-3, pT7-7, pT7TioHis) oraz pomocniczy pACMOD2-Arg i selekcjonowano kolonie bakteryjne posiadające oporność na ampicylinę i tetracyklinę. Po potwierdzeniu obecności obu plazmidów stymulowano ekspresję rekombinowanego genu przez podanie IPTG. W żadnym przypadku nie obserwowano pojawienia się w lizacie bakteryjnym oczekiwanego produktu ekspresji genu K<sub>2</sub>L-tPA lub białka fuzyjnego tioredoksyna – K<sub>2</sub>L-tPA (obserwacja żelu poliakrylamidowego z SDS).

Wobec niepowodzenia w ekspresji genu K<sub>2</sub>L-tPA w systemie z pomocniczym plazmidem kodującym gen *argU*, podjęta została próba zastosowania wektora ekspresyjnego pT7-7(ArgU), w którym umieszczony został zarówno gen K<sub>2</sub>L-tPA jak i *argU*. Wektor pT7-7(ArgU) został skonstruowany na bazie plazmidu pT7-7 przez wprowadzenie genu *argU* w miejsce restrykcyjne Bgl II. Po wcześniejszej korekcie sekwencji początku genu K<sub>2</sub>L-tPA, polegającej na wygenerowaniu sekwencji rozpoznawanej przez enzym restrykcyjny Nde I, wprowadzono go do plazmidu pT7-7(ArgU) wykorzystując miejsca restrykcyjne Nde I-Hind III. Tak przygotowanym plazmidem transformowano bakterie *E. coli* szczep BL21(DE3) i po indukcji promotora *lac* za pomocą IPTG uzyskano wydajną ekspresję genu K<sub>2</sub>L-tPA (rys. 5). Hodowlę prowadzono w podłożu wzbogaconym 2YT (1,6% Bacto-trypton, 0,5% ekstrakt drożdżowy, 1% NaCl pH 7,0), w obecności ampicyliny (20 µg/ml), w temperaturze 37°C

przez 4 godziny, z mieszaniem (150-200 rpm), aż do osiągnięcia gęstości komórek bakteryjnych ( $OD_{575}$ ) na poziomie 0,3-0,4. Po tym czasie następowała indukcja za pomocą IPTG (1 mM, 2-3 godz., temp. 37°C). Obecność białka  $K_2L$ -tPA w bakteriach po etapie indukcji wykazano techniką *western blotting*, z zastosowaniem przeciwciał poliklonalnych anty-t-PA. Porównanie migracji otrzymanego białka z białkami wzorcowymi w trakcie elektroforezy w żelu w obecności SDS wskazywało, że białko to, stanowiące około 10% wszystkich białek bakteryjnych, posiada oczekiwaną masę cząsteczkową około 38 kDa (rys. 5). Po dezintegracji ścian komórkowych bakterii i rozdzieleniu przez wirowanie frakcji białek rozpuszczalnych od frakcji nierozpusz-



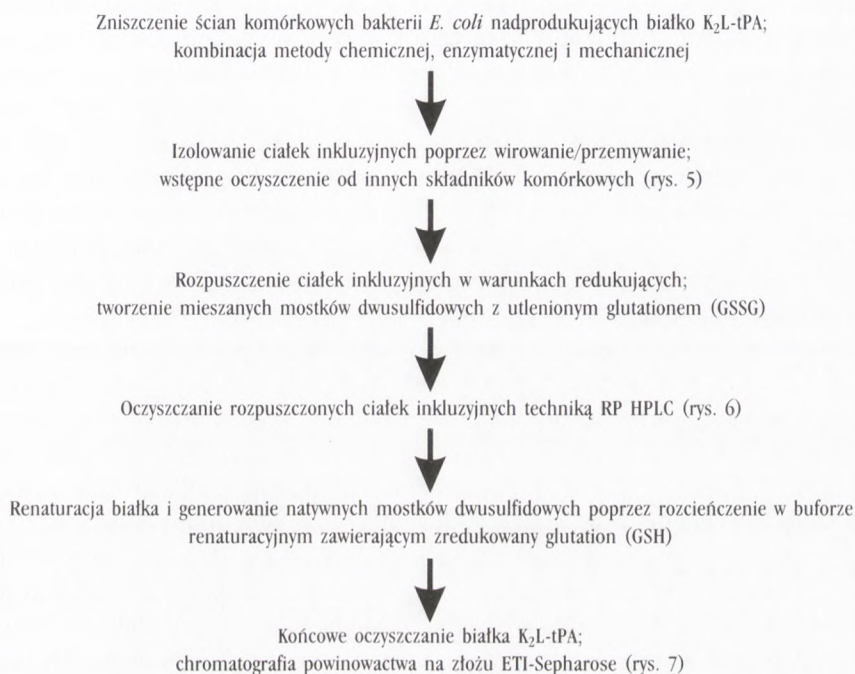
Rys. 5. Ekspresja genu białka  $K_2L$ -tPA w plazmidzie pT7-7(ArgU) w bakteriach *E. coli* BL21(DE3), elektroforeza w żelu poliakrylamidowym z SDS.

1. Wzorec masy cząsteczkowej białka (42 kDa).
2. Białka obecne w lizacie bakterii *E. coli* szczep BL21(DE3) hodowanych bez indukcji IPTG (brak ekspresji genu  $K_2L$ -tPA).
3. Białka obecne w lizacie bakterii *E. coli* szczep BL21(DE3) po 3-godzinnej indukcji 0,1 M IPTG, obecne dodatkowe białko o masie cząsteczkowej ok. 38 kDa.
4. Białka obecne w ciałkach inkluzyjnych izolowanych przez wirowanie/przemywanie.

czalnej okazało się, że rekombinowane białko K<sub>2</sub>L-tPA w całości lokalizuje się w cytoplazmie bakteryjnej w postaci nierozpuszczalnych złożeń, tzw. ciałek inkluzyjnych. W celu otrzymania aktywnego białka, ciała inkluzyjne zostały poddane procedurze renaturacji. Sposób postępowania od momentu zakończenia hodowli bakterii produkujących rekombinowane białko przedstawiono na schemacie.

## Schemat

### Strategia uzyskiwania aktywnego białka K<sub>2</sub>L-tPA z ciałek inkluzyjnych.



### 2.3. Izolowanie aktywnego białka K<sub>2</sub>L-tPA z ciałek inkluzyjnych

Białka eukariotyczne produkowane w komórkach bakteryjnych bardzo często nie uzyskują właściwej struktury trzeciorzędowej i odkładają się w cytolazmie (rzadziej w periplazmie) jako nieaktywne, bezpostaciowe, nie otoczone żadną błoną złoże określane jako ciała inkluzyjne (IB – *inclusion bodies*). Cząstki IB charakteryzują się cylindrycznym lub owalnym kształtem i porowatością struktury (39-41). Ciała inkluzyjne tworzą się szczególnie w przypadku białek złożonych, zawierających kilka mostków dwusulfidowych, choć niekiedy agregacji ulegają także małe białka. Początkowo sądzono, że przyczyną są uszkodzenia wiązań kowalencyjnych w łańcuchu polipeptydowym, ale odstąpiono 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 (41). Innej przyczyny akumulacji szukano w nieprawidłowym tworzeniu się mostków dwusulfidowych. Okazuje się jednak, że ciała inkluzyjne powstają również w przypadku ekspresji białek nie zawierających w łańcuchu polipeptydowym reszt cysteinowych, pomiędzy którymi mogłyby się tworzyć takie wiązania. Wystarczającym czynnikiem indukującym tworzenie ciałek inkluzyjnych jest zwykle nadprodukcja białka w komórce bakteryjnej, powodująca wzrost stężenia łańcucha polipeptydowego.

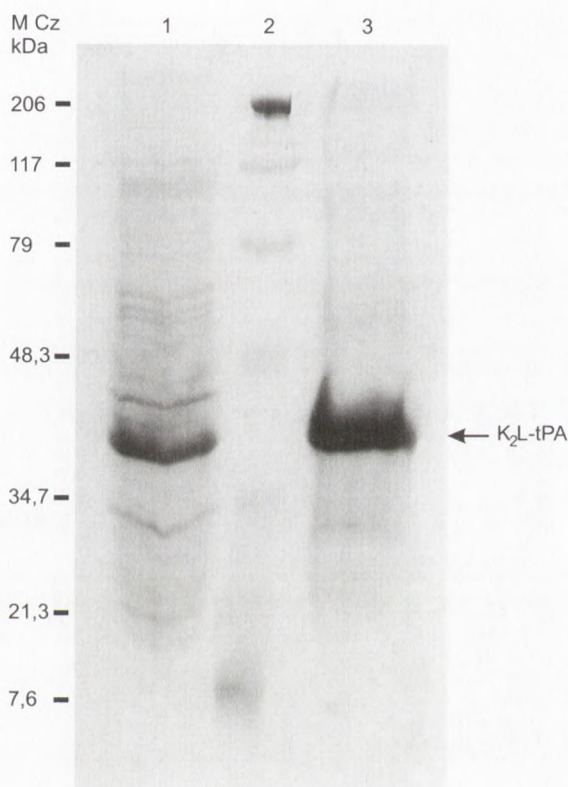
Wydajność procesu renaturacji, czyli uzyskania w pełni aktywnego białka ze stanu zdenaturowanego, w dużej mierze zależy od sekwencji aminokwasowej białka, warunków renaturacji i obecności zanieczyszczeń. Ciała inkluzyjne nie są homogenne. Obok rekombinowanego białka, które jest zazwyczaj ich głównym składnikiem, zawierają także białka bakteryjne, np. białka asystujące w procesie fałdowania łańcucha polipeptydowego, fragmenty błon komórkowych, czy też białka związane z błonami i kwasami nukleinowymi (41,42). Jedną z sugerowanych metod podwyższenia wydajności renaturacji rekombinowanego białka jest jego maksymalne oczyszczenie w stanie zdenaturowanym. Dopiero oczyszczone, nieaktywne białko poddaje się procesowi renaturacji.

Ponieważ ciała inkluzyjne charakteryzują się wyższą gęstością niż inne składniki komórki, mogą być w łatwy sposób izolowane poprzez wirowanie. Otrzymane bakterie ekspresujące białko K<sub>2</sub>L-tPA były poddane działaniu czynników chemicznych (detergenty), enzymatycznych (lizozym) i mechanicznych (ultradźwięki), w celu dezintegracji ścian komórkowych. Otrzymany homogenizat kilkakrotnie wirowano przemywając otrzymany osad ciałek inkluzyjnych odpowiednimi buforami. Uzyskano w ten sposób wstępne oddzielenie białka K<sub>2</sub>L-tPA od większości białek bakteryjnych. W typowym doświadczeniu, z 1 litra hodowli bakteryjnej uzyskiwano po indukcji od 0,8 do 1 g ciałek inkluzyjnych. Na podstawie analizy elektroforetycznej otrzymanych ciałek inkluzyjnych oszacowano, że K<sub>2</sub>L-tPA stanowiło około 40% wszystkich białek zawartych w preparacie.

W celu rozerwania wszystkich niekowalencyjnych wiązań oraz redukcji mostków dwusulfidowych, otrzymane ciała inkluzyjne poddano działaniu buforu o właściwościach silnie denaturujących i redukujących, o odczynie lekko alkalicznym (6 M chlorowodorek guanidyny/0,1 M Tris HCl, pH 8,5/5 mM EDTA /100 mM DTT). Mieszaninę inkubowano w czasie od 2 do 4 godzin w temperaturze pokojowej z silnym mieszaniem. Po upływie tego czasu nie rozpuszczony materiał oddzielono przez wirowanie. W kolejnym etapie z otrzymanego roztworu zawierającego zdenaturowane białka usunięto czynnik redukujący poprzez dializę do buforu zawierającego 6 M chlorowodorek guanidyny (pH 2,0) i przeprowadzono reakcję z utlenioną formą glutationu (GSSG). Procedura ta zabezpiecza zredukowane reszty cysteinowe przed przypadkowym utlenieniem przez utworzenie mieszanych mostków dwusulfidowych białko-Cys-S-SG.

Etap oczyszczania białka K<sub>2</sub>L-tPA od innych składników ciałek inkluzyjnych przeprowadzono wykorzystując technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), na kolumnie AQUAPORE RP-300, 220 x 4,6 mm, przepływ 1 ml/min, stosując jako eluent 0,1% wodny roztwór kwasu trójfluorooctowego (TFA) z rosnącym stężeniem acetonitrylu (liniowy gradient od 8 do 40% CH<sub>3</sub>CN w ciągu 30 min). W typowym doświadczeniu, w wyniku zastosowania opisanej procedury z preparatu 50 mg ciałek inkluzyjnych zawierających około 40% białka K<sub>2</sub>L-tPA uzyskano 4,7 mg preparatu zawierającego około 90% tego białka (rys. 6).

Etap renaturacji rozpoczęto od usunięcia czynnika denaturującego poprzez bezpośrednie rozcieńczenie, w stosunku 1:100, roztworu białka, otrzymanego po oczyszczeniu metodą RP HPLC, o wyjściowym stężeniu 1 mg/ml w buforze renaturacyjnym. Stosowane bufony renaturacyjne zawierały Tris HCl (pH 8,0, 0,1 M), EDTA



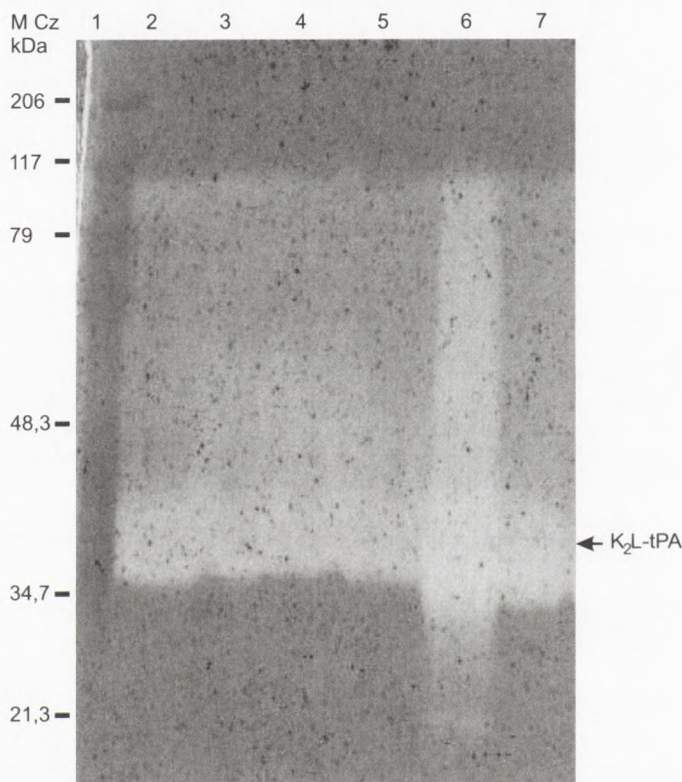
Rys. 6. Wynik oczyszczania białka K<sub>2</sub>L-tPA metodą RP HPLC na kolumnie AQUAPORE RP-300 (elektroforeza w żelu poliakrylamidowym z SDS).

1. Ciałka inkluzyjne wstępnie oczyszczone od większości białek bakteryjnych przez wirowanie/przemycanie.

2. Wzorzec masy cząsteczkowej białka (długości fragmentów zaznaczono na lewym marginesie).

3. Białko K<sub>2</sub>L-tPA oczyszczone metodą RP HPLC.

(2 mM), GSH/GSSG (3 mM/0,3 mM) oraz zmienne stężenia chlorowodoru guanidyny (0,5 lub 1 M) i L-argininy (0 lub 0,5 M). Zastosowano różne czasy (od 20 do 120 godz.) oraz temperatury prowadzenia procesu renaturacji (5, 16, 25 lub 30°C). Najlepsze wyniki uzyskano prowadząc renaturację w temperaturze 16°C, w czasie 20-48 godz. w buforze zawierającym, oprócz stałych składników, 0,5 M chlorowodoru guanidyny oraz 0,5 M L-argininy. Zrenaturowane białko poddawano dalszemu oczyszczeniu stosując chromatografię powinowactwa na złożu ETI-Sepharose. Białko K<sub>2</sub>L-tPA wmywano 2 M roztworem rodanku potasowego. W typowym cyklu doświadczeń, wychodząc z 3 mg ciałek inkluzyjnych wyizolowanych przez wirowanie, po procesie oczyszczania metodą RP HPLC, renaturacji, oraz końcowego oczyszczania drogą chromatografii powinowactwa uzyskiwano około 60 µg białka K<sub>2</sub>L-tPA



Rys. 7. Test zymograficzny aktywności białka K<sub>2</sub>L-tPA po renaturacji i oczyszczeniu na nośniku ETI-Sepharose. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym zawierającym plazminogen i kazeinę. Żel wybarwiony czernią amidową. Aktywator plazminogenu powoduje konwersję plazminogenu do plazminy, która z kolei hydrolizuje kazeinę. Miejsca, w których kazeina uległa hydrolizie są widoczne w postaci przejaśnień.

1. Wzorec masy cząsteczkowej białka (długości fragmentów zaznaczono na lewym marginesie).
- 2-7. Kolejne frakcje eluowane ze złoża ETI-Sepharose, zawierające aktywne białko K<sub>2</sub>L-tPA.

o czystości 95% (oznaczenie metodą elektroforetyczną). Identyczność otrzymanego białka K<sub>2</sub>L-tPA potwierdzono techniką *western blotting* z zastosowaniem przeciwciał poliklonalnych anty-t-PA. Próba określenia masy cząsteczkowej białka techniką spektrometrii masowej MALDI TOF nie powiodła się. Aktywność fibrynolityczną białka K<sub>2</sub>L-tPA po renaturacji i oczyszczeniu określano za pomocą testu zymograficznego (rys. 7), oraz testu aktywności Spectrolyse/Fibrin Assay (Biopool). Oczyszczony preparat zrenaturowanego białka wykazywał aktywność 0,4 U/μg. Pomimo względnie wysokiego poziomu ekspresji białka K<sub>2</sub>L-tPA w zastosowanym systemie ekspresyjnym *E. coli* w postaci ciałek inkluzyjnych, efektywność procesu oczyszczania i renaturacji białka nie była zadowalająca.

### 3. Podsumowanie wyników

Gen kodujący białko K<sub>2</sub>L-tPA skonstruowano na bazie 60 syntetycznych oligodeoksyrybonukleotydów, które były łączone enzymatycznie i klonowane w plazmidzie pUC 19. Ekspresję genu uzyskano w wektorze pT7-7(ArgU), zawierającym gen *argU*, kodujący rzadko występujący w bakteriach tRNA<sup>Arg</sup>. Zastosowanie innych prokariotycznych systemów ekspresyjnych nie dało pozytywnych wyników. Białko K<sub>2</sub>L-tPA gromadziło się w cytoplazmie bakterii w postaci nieaktywnych ciałek inkluzyjnych, stanowiąc około 40% zawartych w nich białek. Po wstępnym izolowaniu przez wirowanie, ciała inkluzyjne poddano oczyszczaniu metodą RP HPLC. Uzyskano białko oczyszczone do poziomu około 90%, stanowiące 10% wyjściowej masy ciałek inkluzyjnych. Białko poddano renaturacji poprzez 100-krotne rozcieńczenie w buforze renaturacyjnym, po czym oczyszczono metodą chromatografii powinowactwa na nośniku ETI-Sepharose. Zastosowanie takiej procedury doprowadziło do otrzymania kilkudziesięciu mikrogramów aktywnego białka, które posiadało oczekiwaną masę cząsteczkową około 38 kDa, dawało pozytywną reakcję z przeciwciałami poliklonalnymi anty-t-PA oraz wykazywało aktywność specyficzną dla tkankowego aktywatora plazminogenu.

Badania przedstawione w pracy były częściowo finansowane z funduszy programu JPBR 3.3 oraz grantu KBN nr 6 6289 92 03. Autorzy dziękują prof. Andrzejowi Płucienniczakowi z Instytutu Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie, za udostępnienie skonstruowanych przez siebie plazmidów zawierających gen *argU*.

### Literatura

1. Weitz J. I., Stewart R. J., Fredenburgh J. C., (1999), *Thrombosis and Haemostasis*, 82, 974-982.
2. Rao A. K., Pratt C., Berke A., Jaffe A., Ockene I., Schreiber T. L., Bell W. R., Knatterud G., Robertson T. L., Terrin M. L., (1988), *J. Am. Coll. Cardiol.*, 11, 1-11.
3. Williams J. R. B., (1951), *Br. J. Exp. Pathol.*, 32, 530-537.
4. Sobel G. W., Mohler S. R., Jones N. W., Dowdy A. B. C., Guest M. M., (1952), *Am. J. Physiol.*, 171, 768-769.



5. Günzler W. A., Steffens G. J., Ötting F., Buse G., Flohé L., (1982), *Z. Physiol. Chem.*, 363, 133-141.
6. Wun T. C., Schleuning W. D., Reich E., (1982), *J. Biol. Chem.*, 257, 3276-3283.
7. Crespi R. S., (1989), *Nature*, 337, 317-318.
8. Winkler M. E., Blaber M., (1986), *Biochemistry*, 25, 4041-4045.
9. Smith R. A., Dupe R. J., English P. D., Green J., (1981), *Nature*, 290, 505-508.
10. Lijnen H. R., Collen D., (1991), *Thrombosis and Haemostasis*, 66(1), 88-110.
11. Keyt B. A., Paoni N. F., Bennett W. F., (1996), *Protein Engineering: Principles and Practice*, Eds. J. L. Cleland, Ch. S. Craik, Wiley-Liss Inc., New York.
12. Smalling R. W., (1997), *Eur. Heart J.*, 18 (Suppl. F), F11-F16.
13. Pharmaprojects Plus CD-ROM (January 1996), za: Vessels, (1996), 2(1), 15.
14. Bode C., Peter K., Moser M., Smalling R. W., Weaver W. D., (1997), *Eur. Heart J.*, 18(Suppl. F), F17-F21.
15. Pennica D., Holmes W. E., Kohr W. J., Harkins R. N., Vehar G. A., Ward C. A., Bennett W. F., Yelverton E., Seeburg P. H., Heyneker H. L., Goeddel D. V., Collen D., (1983), *Nature*, 301, 214-221.
16. Ny T., Elgh F., Lund B., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 5335-5359.
17. van Zonneveld A. J., Veerman H., Pannekoek H., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 4670-4674.
18. van Zonneveld A. J., Veerman H., Pannekoek H., (1986), *J. Biol. Chem.*, 261, 14214-14218.
19. Nienaber V. L., Young S. L., Birktoft J. J., Higgins D. L., Berliner L., (1992), *Biochemistry*, 31, 3852-3861.
20. Lijnen H. R., Bachmann F., Collen D., Ellis V., Pannekoek H., Rijken D. C. Thorsen S., (1994), *J. Intern. Med.*, 236, 415-424.
21. Cierniewski C. S., Stasiak M., (1996), *Biotechnologia*, 3(34), 11-22.
22. Harris T. J. R., (1987), *Protein Engineering*, 1(6), 449-458.
23. Lijnen H. R., Collen D., (1988), *Blut*, 57, 147-162.
24. Higgins D. L., Bennett W. F., (1990), *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 30, 91-121.
25. Collen D., Stassen J. M., Marafino B. J. Jr., Builder S., de Cock F., Ogez J., Tajiri D., Pennica D., Bennett W. F., Salwa J., Hoyng C. F., (1984), *Pharmacol. Exp. Ther.*, 231, 146-152.
26. Sarmientos P., Duchesne M., Deneffe P., Boiziau J., Fromage N., Deiporte N., Parder F., Lelievre Y., Mayaux J-F., Cartwright T., (1989), *Biotechnology*, 7, 495-501.
27. Lemontt J. F., Wei C. M., Dackowski W. R., (1985), *DNA*, 4, 419-428.
28. Steiner H., Pohl G., Gunne H., Hellers M., Elhammer A., Hansson L., (1988), *Gene*, 73, 449-457.
29. Ebert K. M., DiTullio P., Barry C. A., Schindler J. E., Ayres S. L., Smith T. E., Pellerin L. J., Meade H. M., Denman J., Roberts B., (1994), *Biotechnology*, 12, 699-702.
30. Obukowicz M. G., Gustafson M. E., Junger K. D., Leimgruber R. M., Wittwer A. J., Wun T. C., Warren T. G., Bishop B. F., Mathis K. J., McPherson D. T., Siegel N. R., Jennings M. G., Brigtwell B. B., Diaz-Collier J. A., Bell L. D., Craik C. S., Tacon W. C., (1990), *Biochemistry*, 29, 9737-9745.
31. Waldenstrom M., Holmgren E., Attersand A., Kalderen C., Lowenadler B., Raden B., Hansson L., Pohl G., (1991), *Gene*, 99, 243-248.
32. Kohnert U., Rudolph R., Verheijen J. H., Jacqueline E., Weening-Verhoeff J. D., Stern A., Opitz U., Martin U., Lill H., Prinz H., Lechner M., Kresse G-B., Buckel P., Fischer S., (1992), *Protein Engineering*, 5, 93-100.
33. Smalling R. W., Bode Ch., Kalbfleisch J., Sen S., Limbourg P., Forycky F., Habib G., Feldman R., Hohnloser S., Seals A., (1995), *Circulation*, 91, 2725-2732.
34. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J., (1982), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
35. Bell L. D., Smith J. C., Derbyshire R., Finlay M., Johnson I., Gilbert R., Slocombe P., Cook E., Richards H., Clissold P., Meredith D., Powell-Jones C. H., Dawson K. M., Carter B. L., McCullagh K. G., (1988), *Gene*, 63, 155-163.
36. Sekwencjonowanie sklonowanych subfragmentów syntetycznego genu K<sub>2</sub>L-tPA było przeprowadzone w zespole prof. A. Plucienniczaka w ramach programu JPBR 3.3.
37. Schenk P. M., Baumann S., Matters R., Steinbib H. H., (1995), *BioTechniques*, 19, 196-200.
38. Matters A. C., (1993), *Principles of gene expression, Biotechnology*, vol. II, 233-256, Eds. H. J. Rehm, G. Reed, VCH, Weinheim.

39. Georgiou G., Telford J. N., Shuler M. I., Wilson D. B., (1986), *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 1157-1161.
40. Bowden G. A., Paredes A. M., Georgiou G., (1991), *Biotechnology*, 9, 725-730.
41. Georgiou G., de Bernardez-Clark E., (1991), *Protein refolding*, ASC Symposium Series, Washington, DC.
42. Laskowska E., Kuczyńska-Wisnik D., Skorko-Glonek J., Taylor A., (1996), *Mol. Microbiol.*, 22, 555-571.