



Produkcja białek w systemach ekspresji pozakomórkowej

Witold Szaflarski, Patrycja Sujka, Michał Nowicki, Maciej Zabel
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Uniwersytet Medyczny
im. K. Marcinkowskiego, Poznań

Production of proteins in the cell-free expression systems

Summary

Efficient protein synthesis has become a critical issue in recent biotechnology and functional proteomic studies. Traditional expression of protein performed in host cells such as *Escherichia coli* or *Saccharomyces cerevisiae* is generally lengthy and costly. Cell-free protein synthesis is an attractive alternative offering simplicity and fast rate of the reaction as well as the generation of functional proteins that are difficult to obtain using *in vivo* systems. Furthermore, the open nature of these systems makes it amenable to manipulation allowing the investigations into the mechanism of protein synthesis itself and into the inhibition of that process by interfering molecules such as antibiotics.

Here we review all the main classes of cell-free protein expression system and we emphasize their potency and recent applications in biotechnology.

Key words:

cell-free protein expression system, *in vitro* protein expression, ribosome, protein biosynthesis, antibiotics.

Adres do korespondencji

Witold Szaflarski,
Katedra i Zakład Histologii
i Embriologii,
Uniwersytet Medyczny
im. K. Marcinkowskiego,
ul. H. Święcickiego 6,
60-781 Poznań;
e-mail:
witold@ump.edu.pl

1. Wprowadzenie

Białka uczestniczą praktycznie we wszystkich procesach biochemicznych zachodzących w żywej komórce. Intensywny w ostatnich latach rozwój proteomiki, będącej nauką o białkach i ich wzajemnych relacjach w komórce, łączy się nierozdzielnie z dążeniem do tworzenia coraz doskonalszych technik ułatwiających produkcję białek na skalę preparatywną. Stało się to możliwe dzięki adaptacji wielu metod z innych dziedzin biologii molekularnej, opartych na rekombinacji genetycznej i analizie genomów.

Obecnie stosowaną metodą wydajnej i szybkiej ekspresji białka, przy jednocześnie relatywnie niskich kosztach, jest pozakomórkowa ekspresja białka nazywana również w skrócie produkcją białka *in vitro* (ang. *cell-free expression systems* lub *in vitro protein expression systems*). Na świecie znanych jest wiele podobnych systemów *in vitro* dostępnych komercyjnie. Można je dzielić na wiele kategorii. Podstawą większości systemów jest ekstrakt komórkowy uzyskiwany przez rozbicie błon biologicznych i ścian komórkowych bakterii. Wyróżniamy systemy, które opierają się na ekstraktach z komórek prokariotycznych (m.in. *Escherichia coli*) lub eukariotycznych (m.in. kielki pszenicy oraz królicze retikulocyty). Ekstrakty mogą być wzbogacane dodatkowo czynnikami wzmacniającymi wydajność biosyntezy białka. Systemem o wyjątkowym charakterze jest tzw. system PURE (ang. *Protein Synthesis Using Recombinant Elements*), który opiera się na oddzielnie sklonowanych i niezależnie izolowanych wszystkich składnikach reakcji biosyntezy (1). Dzięki temu ta technika praktycznie eliminuje wpływ środowiska wewnętrznego komórek użytych do przygotowania ekstraktów w innych systemach *in vitro*.

Ważnym kryterium jest również prostota systemu oraz jego potencjalne zastosowanie: 1) systemy proste – takie jak synteza homopolimeru fenylalaninowego (ang. *poly(U)-dependent poly(Phe) expression*) jest powszechnie stosowana do badań nad samą biosyntezą białka i czynnikami blokującymi ten proces (np. antybiotyki); 2) systemy złożone – przeprowadzające obie reakcje: transkrypcji oraz translacji w jednym systemie.

2. Początki badań nad systemami pozakomórkowej biosyntezy białka

W latach pięćdziesiątych XX stulecia kilka grup badaczy wykazało niezależnie, że proces biosyntezy białka nie wymaga integralności komórki i może zachodzić nawet po zniszczeniu ciągłości błony komórkowej (2-5). Okazało się zatem, że izolowana cytoplazma zawiera niezbędny zestaw komponentów do przeprowadzenia biosyntezy białka.

W drugiej połowie lat pięćdziesiątych ubiegłego wieku w grupie kierowanej przez Zamecnika opracowano w pełni działający system pozakomórkowej syntezy białka oparty na rybosomach izolowanych z mitochondriów pochodzenia zwierzęcego (6,7). Badacze ci wykazali również zależność tego systemu od dostarczania związków wysokoenergetycznych, takich jak ATP i GTP.

Pierwszy system syntezy białka *in vitro* oparty na rybosomach bakteryjnych opracowano w grupie Zilliga (8). Niezależnie w grupie Zamecnika opracowano podobną technikę (9). W obu systemach można było czytać wyłącznie endogenny mRNA, co było ich dużym ograniczeniem, ponieważ pozwalało na translację tylko tych mRNA, które znajdowały się w komórce poddawanej lizie. Pomimo to, stanowiły one przełom otwierający drzwi do prac nad molekularnymi mechanizmami biosyntezy białka, funkcją rybosomów, czy wpływem czynników zawartych w cytoplazmie na działanie rybosomu.

Znacznym rozszerzeniem zastosowania pozakomórkowych systemów biosyntezy białka było opracowanie ekspresji białka na matrycy egzogennych cząsteczek mRNA. Nastąpiło to w 1961 r. w laboratorium Nirenberga i Matthaei (10). Krótka inkubacja w temperaturze fizjologicznej (ok. 37°C) wystarczała do usunięcia z rybosomów endogennych cząsteczek mRNA. Uzyskane w ten sposób wolne rybosomy były wykorzystywane dalej do syntezy białka na matrycy egzogennych mRNA, a co ważniejsze rybosomy mogły zostać „zaprogramowane” przez syntetyczne mRNA. Technika Nirenberga stała się klasycznym systemem pozakomórkowej syntezy białka, a dzięki niej jej twórca rozszyfrował kod genetyczny, za co otrzymał Nagrodę Nobla w 1968 r. W kolejnych systemach zastosowano dodatkowe procedury oczyszczania rybosomów z endogennych cząsteczek mRNA przez zastosowanie m.in. DEAE celulozy, która pozwalała chromatograficznie rozdzielić rybosomy od wolnych kwasów nukleinowych.

Inkubację rybosomów, która poprzedzała właściwą biosyntezę białka, tak jak w technice Nirenberga, z powodzeniem zastosowano w eukariotycznych układach *in vitro*. Przygotowane ekstrakty z komórek zwierzęcych dodatkowo wzbogacone oczyszczonymi rybosomami prowadziły wydajną biosyntezę białek, również na matrycy egzogennych mRNA (11). Ponadto w tym samym czasie inni badacze wykazali zdolność biosyntezy białka w ekstraktach z kielków pszenicy, a co ciekawsze, odkryto, że w tym układzie ekspresyjnym występuje naturalnie niski poziom endogennych cząsteczek mRNA (12-14). Inne techniki eliminowania endogennych mRNA opierały się na zastosowaniu zależnej od jonów wapnia (Ca^{2+}) bakteryjnej RNazy, użytej do podniesienia wydajności systemu ekspresji białka w lizatach erytrocytów (15-17), jak również innych lizatach pochodzących z komórek zwierzęcych (18). Ominięcie ekspresji endogennych cząsteczek mRNA w latach osiemdziesiątych XX w. znacznie ulepszyło wydajność pozakomórkowych systemów ekspresji białek.

3. Proste systemy oparte na syntezie białkowych homopolimerów

Podstawowym systemem homopolimerycznym jest wspomniana synteza polifenyloalaniny na matrycy łańcucha poli(U). W środowisku zbuforowanym, zawierającym wolne rybosomy oraz pozostałe komponenty niezbędne dla reakcji translacji, dodaje się homopolimer poliurydynowy – poli(U) jako matrycę, która posiada zdolność łączenia się z rybosomem bez udziału sekwencji Shine-Dalgarno i jego „zaprogramowaniu” na syntezę polifenyloalaniny. Wydajność zoptymalizowanych systemów syntezy polifenyloalaniny sięga 300 inkorporacji aminokwasów przez jeden rybosom, co jest sporym osiągnięciem, bo pozwala na jednorazową i pełną analizę funkcjonalną wszystkich komponentów biosyntezy białka (19). Pierwsze próby wykonane w latach 50. i 60. ubiegłego stulecia pozwalały na wprowadzenie około 2-5 aminokwasów przez rybosom.

System homopolimeryczny przygotowuje się przez izolację dwóch frakcji komórkowych, które następnie są wzbogacane cząsteczkami wysokoenergetycznymi

oraz wolnymi aminokwasami i poli(U)-mRNA stanowiącym matrycę. Frakcje pozyskuje się z ekstraktów bakteryjnych, które frakcjonuje się przez wirowanie (szczegółowy opis izolacji rybosomów – (20)). Tzw. frakcja S30 (wirowanie ok. $30\ 000 \times g$ przez 18 godz.) jest bogata w rybosomy i służy bezpośrednio do oczyszczania wolnych podjednostek rybosomów w gradiencie 6-38% sacharozy (wirowanie ok. $15\ 000 \times g$ przez 24 godz.). Przygotowane w ten sposób rybosomy inkubuje się w temp. 37°C w buforze zawierającym m. in. jony Mg^{2+} o stężeniu 4,5 mM, w celu otrzymania pełnych rybosomów (70S) zdolnych do prowadzenia biosyntezy białka.

Frakcja S100 jest pozyskiwana z supernatantu frakcji S30 i stanowi źródło czynników białkowych niezbędnych do prowadzenia translacji (m.in. czynniki inicjujące – IF1, IF2, IF3, specyficzne syntetazy aminoacylo-tRNA, czynniki elongacyjne – EF-Tu, EF-G, EF-Ts).

Reakcja syntezy polifenylalaniny jest prostą i szeroko stosowaną techniką, która posiada też liczne odmiany. Zamiast matrycy poli(U) stosuje się poli(A), co pozwala na syntezę polilizyny. Niestety, polimer ten cechuje się słabą rozpuszczalnością w środowisku wodnym, co znacznie ogranicza możliwość jego stosowania na szeroką skalę. Użycie określonych detergentów pozwala jednak na jego stosowanie w badaniach takich jak analiza funkcjonalna dwóch antybiotyków paktamycyny i edeiny, będących inhibitorami biosyntezy białka (21).

4. Biosynteza białka w sprzężonym systemie transkrypcji i translacji

Naukowcami, którzy po raz pierwszy opisali zależność bakteryjnego systemu pozakomórkowej syntezy białka od DNA byli ponownie M. Nirenberg i J. Matthaei (22). Ta zależność została potwierdzona przez syntezę białka na matrycy endogennych cząstek DNA. Inna grupa badaczy poszerzyła syntezę endogennego DNA o zastosowanie egzogenego DNA, który pochodził z bakteriofaga (23,24). Systemy te posiadały jednak słabą wydajność, kiedy stosowano endogenne lub wirusowe DNA. Ponadto zachodziła również niespecyficzna ekspresja białek komórkowych i bakteriofagowych. Jednak dalsze ulepszanie systemu sprzężonej transkrypcji i translacji doprowadziło do jego rozposzechnienia i ostatecznie stał się on istotnym narzędziem w laboratoriach (25,26).

W ulepszonym systemie zaproponowanym przez Zubaya wstępny ekstrakt bakteryjny poddawany był inkubacji w celu degradacji cząsteczek mRNA i DNA przez komórkowe nukleazy (27). Ten system stał się bardzo popularny z uwagi na łatwość przygotowania, stabilność komponentów oraz względnie wysoką wydajność. W systemie opracowanym przez Golda i Schweigera rybosomy były izolowane z ekstraktów komórkowych do postaci homogennych, a do tak przygotowanych rybosomów dodawano frakcję cytoplazmatyczną oczyszczaną z kwasów nukleinowych przez chromatografię jonowymienną (28-30). Takie przygotowanie komponentów do pozakomórkowej syntezy białka dawało jednak bardzo niską i niespecyficzną ekspresję białek. Wadą systemu była ponadto złożona procedura.

5. Współczesne systemy pozakomórkowej ekspresji białka

Lata 80. i 90. XX w. to rozwój systemów *in vitro* w aspekcie optymalizacji ekstraktów komórkowych, w których zastosowano szczepy bakteryjne pozbawione genów kodujących enzymy o charakterze endonukleaz (RNazy) (31). Pozwoliło to na utrzymywanie w mieszaninie reakcyjnej cząsteczek mRNA przez znacznie dłuższy czas. Współczesne systemy charakteryzują się wysokim poziomem mRNA utrzymanym nawet po 24 godzinach reakcji (32). Rozwijające się w latach 90. ubiegłego wieku metody inżynierii genetycznej oraz bioinformatyki miały również olbrzymi wpływ na rozwój systemów *in vitro*. Dzięki tym technikom można było poznać w szczególności samą reakcję biosyntezy, a przede wszystkim uzyskać informacje o budowie transkryptów mRNA oraz ich wpływu na wydajność biosyntezy. Okazało się, że bardzo ważna jest struktura przestrzenna mRNA, obejmująca przede wszystkim sekwencje przy końcu 5' (33).

Owoce wieloletniej pracy nad strukturą i funkcją poszczególnych elementów sekwencji mRNA jest opracowanie optymalnego wektora ekspresyjnego przeznaczonego do systemów ekspresji białka *in vitro*. Przykładem może być plazmid pIVEX (ang. *In Vitro EXpression*) (34). Cechuje go przede wszystkim niska zdolność do tworzenia struktur drugorzędowych na poziomie mRNA, zwłaszcza w obrębie sekwencji Shine-Dalgarno, tj. sekwencji mRNA oddziałującej z 16S rRNA rybosomu oraz w obrębie kodonu startowego AUG. Dzięki temu oba fragmenty sekwencji mRNA są eksponowane i łatwo wiążą się z rybosomem. Integralną częścią wektora jest również sekwencja bakteriofagowego promotora T7, dzięki której może zachodzić transkrypcja danego genu z użyciem polimerazy T7. Komercyjnie dostępne są dwa rodzaje wektorów zawierające sekwencje (1) His-tag lub (2) Strep-tag, które zlokalizowane są w końcu aminowym bądź karboksylowym białka, co pozwala na łatwe i szybkie oczyszczanie produktów biosyntezy.

5.1. Systemy *in vitro* oparte na zastosowaniu błony półprzepuszczalnej

Systemy ekspresji *in vitro* mają szerokie zastosowanie z uwagi na łatwość przeprowadzenia reakcji bez potrzeby używania zaawansowanej aparatury. W przeszłości charakteryzowały się jednak małą wydajnością, nie przekraczającą kilkudziesięciu nanogramów produktu w 50 μ l reakcji. Rozwiązaniem, które znacznie zwiększyło poziom ekspresji białka było zastosowanie półprzepuszczalnej membrany, po raz pierwszy użytej przez Aleksandra Spirina (35). Pozwoliło to na znaczne rozszerzenie rezerwuaru tzw. buforu zasilającego (ang. *feeding mix*) zawierającego wolne aminokwasy, rybonukleotydy oraz cząsteczki wysokoenergetyczne (głównie ATP i GTP), przy jednoczesnym utrzymaniu wysokiego stężenia rybosomów i powstającego produktu w obrębie przedziału reakcyjnego. Zastosowanie membrany półprzepuszczalnej pozwoliło ponadto na znaczne wydłużenie reakcji biosyntezy, po-

nieważ mogła być ona w sposób ciągły zasilana przez przyływ niezbędnych reagentów z buforu zasilającego. Maksymalny czas prowadzenia reakcji wynosi ok. 30-50 godz., przy czym *plateau* uzyskiwano po ok. 30 godz. (W. Szaflarski, dane nie publikowane). W tym systemie, po raz pierwszy uzyskano miligramowe ilości białka w 1 ml reakcji. Przykładem jest ekspresja białka GFP (ang. *Green Fluorescence Protein*) w systemie RTS (ang. *Rapid Translation System*), którego synteza osiągnęła poziom ok. 5 mg podczas jednej 24-godzinnej reakcji (32). RTS jest produkowany przez firmę Roche, a opracowany został na bazie patentu A. Spirina (*U.S. Pat. No. 5,478,730*).

System RTS opiera się nie tylko na unikatowym zastosowaniu półprzepuszczalnej membrany, ale również na sprzężeniu reakcji transkrypcji i translacji, co znane było już we wcześniejszych systemach. Takie podejście znacznie skróciło cały proces w czasie i ograniczyło powstawanie produktów niespecyficycznych, gdyż tylko gen znajdujący się w wektorze ekspresyjnym ulegał transkrypcji, a następnie translacji.

5.1.1. Zalety i wady systemu RTS

System RTS posiada wiele zalet. Dzięki uwolnieniu rybosomów z komórki i zapewnieniu im odpowiednich warunków do przeprowadzania reakcji translacji można produkować białka toksyczne, które w warunkach *in vivo* zatrzymywały procesy życiowe komórki. Wzbogacenie wolnych aminokwasów ich wyznakowanymi radioaktywnie substytutami pozwoliło na efektywne znakowanie powstających polipeptydów. Nie bez znaczenia pozostaje również możliwość wprowadzania niekanonicznych aminokwasów, które wcześniej zostały sztucznie związane z określoną częścią tRNA.

Dzięki otwartej naturze systemów RTS oraz innych technik *in vitro* stanowią one dobre narzędzie do badań nad samą biosyntezą białka oraz antybiotykami blokującymi ten proces. Ciekawym podejściem jest przesiewowa analiza znanych lub potencjalnych antybiotyków. Dzięki temu można w bardzo szybki sposób oznaczyć poziom inhibicji danego antybiotyku (wyznaczać m.in. czynnik IC_{50} , ang. *Inhibitory Concentration*) lub analizować wstępnie mechanizm działania antybiotyku. Paktamycyna, edeina oraz antybiotyki aminoglikozydowe należą do cząstek intensywnie analizowanych w systemie RTS (21). Okazało się, że za pomocą systemu *in vitro* można odpowiedzieć na pytania, czy dana cząsteczka ma potencjalny wpływ na rybosom i biosyntezę białka, jak silny jest ten wpływ i jaki jest jego mechanizm.

Typowym białkiem markerowym wykorzystywanym w badaniach nad systemami *in vitro* jest białko GFP, z uwagi na łatwość oznaczenia całkowitej ilości produktu oraz procentowej zawartości cząsteczek aktywnych (zjawisko fluorescencji). Białko GFP jest niemal idealne do tego celu, gdyż posiada charakterystyczną strukturę beczułki tworzonej przez 11 łańcuchów β oraz centrum aktywne – chromofor umieszczony wewnątrz cząsteczki i ochroniany przez łańcuchy β przed dostępem

wody blokującej reakcję fluorescencji (36). Pojawienie się zatem błędnych aminokwasów w strukturze GFP zaburza jego strukturę i w konsekwencji pozwala na wejście cząsteczek wody do wnętrza białka. Przy użyciu takiej techniki potwierdzono charakter aminoglikozydów jako induktorów błędów translacyjnych (19). W obecności jednego z aminoglikozydów (paromomycyny lub streptomycyny) ekspresja GFP uległa obniżeniu, ale co ważniejsze, wszystkie cząsteczki GFP były całkowicie nieaktywne, tzn. nie wzbudzały fluorescencji. W świetle informacji zawartych w literaturze, dotyczącej charakteru aminoglikozydów, świadczy to o wprowadzaniu błędnych aminokwasów do cząsteczki GFP, co doprowadziło do zniekształcenia struktury tego białka.

Aminoglikozydy testowane były również w innym systemie biosyntezy *in vitro* – zależnej od poli(U) translacji polifenyloalaniny (19). Nie blokowały one jednak rybosomu, co było w sprzeczności z wynikami uzyskanymi w systemie RTS. Jednak po dodaniu dodatkowego aminokwasu leucyny okazało się, że jest ona wprowadzana do łańcucha polifenyloalaninowego już przy niewielkich stężeniach streptomycyny (ok. 1 μM). Wynika to z faktu, że leucyna posiada kodon zbliżony do kodonu fenyloalaniny (UUC vs. UUU), a zatem w przypadku indukcji sytuacji o podwyższonym prawdopodobieństwie błędu translacyjnego, leucyna będzie wprowadzana zamiast fenyloalaniny. Na podstawie dokonanej obserwacji nie można zatem w sposób bezpośredni dokonywać porównania obu systemów translacji *in vitro*. System RTS jest najbardziej zbliżony do warunków panujących w komórce, przez co jest bardziej wrażliwy na działanie antybiotyków, z uwagi na większą liczbę potencjalnych miejsc ich oddziaływania.

Pozakomórkowa biosynteza białka posiada jednak wady, które od wielu lat są sukcesywnie eliminowane. W toku prowadzonych prac przez zespół K. Nierhausa okazało się, że taki system jak RTS pozwala na ekspresję stosunkowo dużych ilości białka, jednak około połowa z tych białek jest nieaktywna biologicznie (32).

Przyczyn obniżonej aktywności białek w systemach *in vitro* może być wiele, ale najprawdopodobniej wynika to ze sztucznego zastosowania polimerazy bakteriofaga T7, która jest zbyt wydajna. W warunkach *in vivo*, w komórce zachowana jest ścisła zależność pomiędzy transkrypcją a translacją przejawiająca się w eliminacji wolnej przestrzeni na mRNA pomiędzy polimerazą a rybosomem. Zapobiega to powstawaniu struktur przestrzennych w cząsteczce mRNA i nie pozwala na przedwczesną terminację translacji. Zastosowanie polimerazy T7 zaburza naturalny proces zależności pomiędzy polimerazą i rybosomem, co może prowadzić do powstawania błędów na poziomie translacji, czyli wprowadzaniem błędnych aminokwasów do rosnącego łańcucha polipeptydowego. Rozwiązaniem opracowanym przez zespół K. Nierhausa była rekombinacja genetyczna polimerazy T7, tak aby enzym ten posiadał dwie mutacje punktowe skutkujące obniżeniem jego szybkości działania (37). Na podstawie wyników pokazano, że pomimo obniżenia poziomu całkowitej biosyntezy, ilość białek aktywnych wzrosła niemal do 100%. Podobny efekt uzyskano obniżając temperaturę reakcji. Prawdopodobnie wynikało to z faktu, że polime-

raza jest znacznie bardziej wrażliwa na temperaturę niż rybosom, co spowodowało spowolnienie transkrypcji przy zachowaniu podobnego tempa translacji (38).

6. Problem konsumpcji energii i jej regeneracji w systemach *in vitro*

Biosynteza białka jest procesem szczególnie wymagającym energii, która w układach biologicznych jest pozyskiwana z hydrolizy wiązań wysokoenergetycznych. Na wprowadzenie jednego aminokwasu do rosnącego łańcucha polipeptowego komórka zużywa aż 10 wiązań wysokoenergetycznych. W tym kontekście 10 wiązań wysokoenergetycznych oznacza hydrolizę 10 cząstek ATP lub GTP, każde charakteryzujące się energią wiązania równą $\Delta G^0 = -6$ kcal/mol. Olbrzymie zapotrzebowanie energetyczne komórki w zakresie biosyntezy białka wyjaśnia rozwój skomplikowanych systemów kontrolujących utratę energii. Systemy te są jednak piętą Achilleusową współczesnych systemów biosyntezy białka *in vitro*, gdzie synteza jest poważnie ograniczona przez nadmierny niekontrolowany odpływ energii; zwykle nie więcej niż 5% energii jest zużywane do aktualnej syntezy białka, a pozostała część energii jest trwoniona na niekontrolowane reakcje biochemiczne. Należy w tym miejscu pamiętać, że uszkadzając komórkę doprowadzamy do skrajnego stresu metabolicznego. W przeciwieństwie do warunków *in vitro*, w warunkach *in vivo* w komórce bakteryjnej aż 70% energii może być ukierunkowane na biosyntezę białka (39).

Olbrzymim zatem wyzwaniem w technice ekspresji białek *in vitro* jest ciągła regeneracja cząsteczek wysokoenergetycznych (m.in. ATP i GTP) niezbędnych do wydajnego prowadzenia reakcji transkrypcji i translacji. Najwcześniej opracowanym systemem regeneracji cząstek wysokoenergetycznych jest wzbogacenie ekstraktu komórkowego w milimolarne stężenia fosfoenolpirogonianu (PEP, ang. *phosphoenolpyruvate*) – pochodną kwasu pirogrogonowego oraz dodanie kinazy pirogrogonianowej, która katalizuje przeniesienie grupy fosforanowej z fosfoenolpirogonianu na AMP i ADP (uzyskuje się odpowiednio ADP i ATP). Podobnie, GMP i GDP są również substratami dla tej kinazy. PEP charakteryzuje się najbardziej bogatym energetycznie wiązaniem ze wszystkich związków biologicznie czynnych – zawarte w tym związku wiązanie fosforoestrowe posiada energię równą $\Delta G^0 = -12$ kcal/mol. System oparty na PEP posiada jednak olbrzymią wadę ograniczającą wydajność biosyntezy białka, gdyż produktem ubocznym powstającym podczas regeneracji cząstek wysokoenergetycznych jest kwas ortofosforowy. Powoduje on obniżenie pH środowiska reakcji oraz – co ważniejsze – wiąże on jony magnezu (Mg^{2+}), znacznie obniżając ich stężenie w reakcji. Mg^{2+} stabilizuje strukturę rybosomu oddziałując z rRNA, zatem ograniczenie ich stężenia prowadzi do zaburzenia struktury rybosomu i obniżenia wydajności reakcji biosyntezy białka.

Jednym ze sposobów uniknięcia zaniżonego stężenia jonów Mg^{2+} jest przekształcenie kwasu ortofosforowego do acetylofosforanu za pomocą oksydazy pirogrogonianowej w obecności określonej grupy prostetycznej (TPP lub FAD). Do tej reak-

cji niezbędny jest tlen cząsteczkowy, którego dostępność w systemach *in vitro* jest ograniczona, zwłaszcza, gdy reakcja prowadzona jest w objętości kilku mililitrów. Jednak zastosowanie oksydazy pirogronianowej pozwoliło na znaczne wydłużenie czasu wydajnej reakcji biosyntezy białka, co w sposób znaczący podniosło jej wydajność (40).

System ten jest nadal daleki od idealnego. Przede wszystkim ograniczony dostęp tlenu cząsteczkowego bardzo ogranicza możliwość zastosowania tego systemu na szeroką skalę. Obecnie szeroko stosowanym rozwiązaniem jest użycie złożonego systemu opartego na tradycyjnym zastosowaniu układu PEP/kinaza pirogronianowa wraz z syntezą acetylofosforanu z acetylo-CoA, pozwalając na efektywną eliminację wolnego kwasu fosforowego (41). Zastosowanie tego systemu było przełomowe i pozwoliło na uzyskiwanie ilości miligramowych powstającego białka w objętości jednego mililitra (32).

7. Biotechnologiczne zastosowanie systemów pozakomórkowej syntezy białka

7.1. Jednoczesna wydajna ekspresja wielu białek i ich analiza przesiewowa

Pozakomórkowa ekspresja białka stała się podstawą wielu zautomatyzowanych technik wysoce wydajnej ekspresji i analizy wielu białek jednocześnie (ang. *high-throughput protein expression and screening*) (42,43). W takim systemie na pojedynczej płytce (96- lub 384-dołkowej) wiele genów może być jednocześnie powielanych, ulegać transkrypcji i translacji, dając wiele produktów stanowiących substraty do dalszej szybkiej analizy funkcji białek. Duża skala ekspresji i szybkość analizy stanowią obecnie obiecującą technikę w proteomice i inżynierii białek opartych na przesiewowej analizie bibliotek genowych i białkowych, jak również całych genomów i proteomów (44,45). Systemy *in vitro* ekspresji białek pozwalają na syntezę populacji białek w pojedynczej reakcji, co jest idealnym i jednocześnie ekonomicznym rozwiązaniem dla pełnej analizy przesiewowej białek z danej biblioteki genów. Ilustracją takich rozwiązań może być technologia znana jako „klonowanie ekspresyjne *in vitro*” (IVEC, ang. *in vitro expression cloning*) (46). W technice tej duża biblioteka genomowa jest wstępnie subklonowana do grup zawierających po 50-100 plazmidów umieszczanych na standardowej płytce 96-dołkowej. Stanowią one matryce do ekspresji w systemie *in vitro*. Geny w plazmidach dające produkt białkowy są następnie przenoszone metodą klonowania do wektorów ekspresyjnych, które pozwalają na syntezę miligramowych ilości białek w systemach *in vitro* typu RTS. Udoskonaleniem techniki IVEC jest jej połączenie z klonowaniem i amplifikacją genów za pomocą reakcji PCR, co wyeliminowało czasochłonne klonowanie genów do plazmidów. Przygotowanie odpowiednich starterów posiadających sekwencje promotorowe oraz sekwencje Shine-Dalgarno ułatwiło syntezę białka bezpośrednio z produktów reakcji

PCR (47). Przykładem jest wykorzystanie pozakomórkowego systemu ekspresji białka do przesiewowej analizy całego genomu *Arabidopsis thaliana* w celu znalezienia nowych genów i produktów ich ekspresji (48).

Systemy translacji *in vitro* znalazły zastosowanie również w badaniach medycznych. Test PTT (ang. *Protein Tuncated Test*) opracowano w celu identyfikacji otwartych ramek odczytu (ang. *Open Reading Frames*, ORF) (49). Znalezienie przedwczesnej terminacji translacji w obrębie ORF może być wynikiem mutacji na poziomie DNA, co jest podstawą do wyodrębnienia nowej choroby genetycznej. Inne zastosowanie wiąże się z produkcją i analizą w systemach *in vitro* potencjalnych szczepionek, które uzyskiwane na bakteryjnych bądź zwierzęcych rybosomach charakteryzowały się tymi samymi parametrami immunologicznymi jak te uzyskiwane w hodowlach ludzkich komórek (50). Obecnie, nowe białka będące potencjalnymi szczepionkami przeciwko malarii zostały całkowicie opracowane w systemach pozakomórkowej ekspresji białka (51). Scharakteryzowano również ekspresję białek VLP (ang. *virus-like particles*) w systemach *in vitro*. Przykładami są białko fagowe MS2 oraz C-końcowy fragment białka rdzenia wirusa WZW-B, których aktywność biologiczna nie różniła się od form uzyskanych *in vivo* (52).

7.2. Produkcja białek „opornych” na ekspresję

Mając na uwadze otwartość biologiczną systemów *in vitro* w aspekcie braku błon biologicznych systemy te można było zastosować ze znakomitym skutkiem do produkcji białek toksycznych lub błonowych, które ulegały słabej ekspresji w układach *in vivo* (53). Obecnie pozwalają one na ekspresję na dużą skalę białek błonowych w modyfikowanych ekstraktach z *E. coli* (54). Dzięki zastosowaniu w systemach *in vitro* technik pozwalających na tworzenie mostków siarczkowych możliwa stała się również produkcja przeciwciał. Przykładem jest immunoglobulina G (IgG), która uzyskana w tym systemie była w pełni aktywna biologicznie, charakteryzując się identycznym do naturalnego powinowactwem do antygeny oraz stabilnością (55).

7.3. Analiza oddziaływań molekularnych

Pozakomórkowe systemy ekspresji białka znacznie ułatwiają analizę molekularną oddziaływań w aspekcie białko-X, gdzie X może być innym białkiem, DNA, RNA, lub ligandem (53). W celu identyfikacji oddziaływań jeden z partnerów musi zostać wyznakowany (białko, nukleotyd bądź ligand) i umieszczony w systemie, w którym syntetyzowane jest dane białko-partner. Następnie powstały kompleks jest izolowany z reakcji za pomocą technik immunoprecypitacji (56) lub może być bezpośrednio analizowany w żelach agarozowych bądź akrylamidowych (57).

7.4. Genetyczna ekspozycja białka

Istotą genetycznej ekspozycji białka (ang. *protein display technologies*) jest powiązanie informacji genetycznej (genotypu) z funkcją nieznanego białka (fenotypu), znajdującego w bibliotece białkowej. Podstawową techniką jest ekspozycja rybosomu (ang. *ribosome display*) (58,59). Wyeliminowanie kodonu STOP z mRNA pozwoliło na uzyskanie stabilnych kompleksów mRNA-rybosom-białko. Stanowi to zatem stan zamrożenia pomiędzy światem genetyki a proteomiki. Związanie dalej powstałego na rybosomie białka do określonego ligandu (może nim też być DNA lub RNA) powoduje powiązanie informacyjne pomiędzy danym ligandem a sekwencją mRNA. Dany kompleks mRNA-rybosom-białko-ligand izoluje się następnie ze środowiska zawierającego inne ligandy na zasadzie chromatografii powinowactwa, a sekwencje mRNA odczytuje się za pomocą odwrotnej transkrypcji i sekwencjonowaniu DNA. W celu zwiększenia wydajności tego systemu proces ten przeprowadza się cyklicznie, to znaczy wyizolowane mRNA powiela się niezależnie i podaje ponownie do mieszaniny rybosomów i ligandów, co pozwala na efektywniejszą selekcję pojedynczego specyficznego ligandu. W powiązaniu z metodami inżynierii genetycznej w tym z mutagenезą, technika genetycznej ekspozycji białka pozwala na zastosowanie jej nie tylko do proteomiki, ale również do badania ewolucji molekularnej. Procesy oddziaływań pomiędzy DNA, RNA i białkiem zachodzące w ciągu milionów lat ewolucji mogą być teraz analizowane w laboratorium, a tempo ich przemian można z wielokrotnie przez zastosowanie selektywnej amplifikacji DNA.

Podziękowania

Witold Szaflarski dziękuje prof. Knudowi Nierhausowi za wieloletnią opiekę naukową oraz Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej za wsparcie finansowe w ramach programu START.

Literatura

1. Shimizu Y., Inone A., Tomari Y., Suzuki T., Yokogawa T., Nishikawa K., Ueda T., (2001), *Nat. Biotechnol.*, 19, 751-755.
2. Siekiewitz P., Zamecnik P. C., (1951), *Fed. Proc.*, 10, 246-247.
3. Borsook H., Deasy C. L., Haagensmit A. J., Keighley G., Lowy P. H., (1950), *J. Biol. Chem.*, 186, 309-315.
4. Winnick T., (1950), *Arch. Biochem.*, 28, 338-447.
5. Gale E. F., Folkes J. P., (1954), *Nature*, 173, 1223-1227.
6. Littlefield J. W., Keller E. B., Gross J., Zamecnik P. C., (1955), *J. Biol. Chem.*, 217, 111-123.
7. Keller E. B., Littlefield J. W., (1957), *J. Biol. Chem.*, 224, 13-30.
8. Schachtschabel D., Zillig W., (1959), *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*, 314, 262-275.
9. Lamborg M.R., Zamecnik P.C. (1960), *Biochim Biophys Acta*, 42, 206-211.
10. Nirenberg M. W. Matthaei J. M., (1961), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 47, 1588-1602.
11. Schreier M. H., Staehelin T., (1973), *J. Mol. Biol.*, 73, 329-349.

12. Marcus A., Efron D., Weeks D. P., (1974), *Methods Enzymol.*, 30, 749-754.
13. Roberts B. E., Paterson B. M., (1973), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70, 2330-2334.
14. Anderson C. W., Straus J. W., Dudock B. S., (1983), *Methods Enzymol.*, 101, 635-644.
15. Jackson R. J., Hunt T., (1983), *Methods Enzymol.*, 96, 50-74.
16. Merrick W. C., (1983), *Methods Enzymol.*, 101, 606-615.
17. Pelham H. R. B., Jackson R. J., (1976), *Eur. J. Biochem.*, 67, 247-256.
18. Henshaw E. C., Panniers R., (1983), *Methods Enzymol.*, 101, 616-629.
19. Szaflarski W., Vesper O., Teraoka Y., Plitta B., Wilson D. N., Nierhaus K. H., (2008), *J. Mol. Biol.*, 380, 193-205.
20. Blaha G., Stelzl U., Spahn C. M. T., Agrawal R. K., Frank J., Nierhaus K. H., (2000), *Methods Enzymol.*, 317, 292-309.
21. Dinos G., Wilson D. N., Teraoka Y., Szaflarski W., Fucini P., Kalpaxis D., Nierhaus K. H., (2004), *Mol. Cell*, 13, 113-124.
22. Matthaei J. H., Nirenberg M. W., (1961), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 47, 1580-1588.
23. Byrne R., Levin J. G., Bladen H. A., Nirenberg M. W., (1964), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 52, 140-148.
24. Wood W. B., Berg P., (1962), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 48, 94-104.
25. Lederman M., Zubay G., (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, 149, 253-258.
26. DeVries J. K., Zubay G., (1967), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 57, 1010-1012.
27. Zubay G., (1973), *Annu. Rev. Genet.*, 7, 267-287.
28. Schweiger M., Gold L. M., (1969), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 63, 1351-1358.
29. Schweiger M., Gold L. M., (1969), *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 34, 763-766.
30. Schweiger M., Gold L. M., (1970), *J. Biol. Chem.*, 245, 5022-5025.
31. Zaniewski R., Petkaites E., Deutscher M. P., (1984), *J. Biol. Chem.*, 259, 11651-11653.
32. Iskakova M. B., Szaflarski W., Dreyfus M., Remme J., Nierhaus K. H., (2006), *Nucleic Acids Res.*, e135.
33. Graentzdoerfer A., Watzele M., Buchberger B., Wizemann S., Metzler T., Mutter W., Nemetz C., (2002), *Cell-Free Translation Systems*, Ed. Spirin A. S., 211-217, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
34. Betton J. M., (2003), *Curr. Protein Pept. Sci.*, 4, 73-80.
35. Baranov V. I., Spirin A. S., (1993), *Methods Enzymol.*, 217, 123-142.
36. Yang F., Moss L. G., Phillips G. N., (1996), *Nat. Biotechnol.*, 14, 1246-1251.
37. He B., Rong M., Lyakhov D., Gartenstein H., Diaz G., Castagna R., McAllister W. T., Durbin R. K., (1997), *Protein Expr. Purif.*, 9, 142-151.
38. Lewicki B. T. U., Margus T., Remme J., Nierhaus K. H., (1993), *J. Mol. Biol.*, 231, 581-593.
39. Szaflarski W., Nierhaus K. H., (2007), *Orig. Life Evol. Biosph.*, 37, 423-428.
40. Kim D. M., Swartz J. R., (2000), *Biotechnol. Prog.*, 16, 385-390.
41. Jewett M. C., Swartz J. R., (2004), *Biotechnol. Bioeng.*, 86, 19-26.
42. Angenendt P., Nyarsik L., Szaflarski W., Glöckler J., Nierhaus K. H., Lehrach H., Cahill D. J., Lueking A., (2004), *Anal. Chem.*, 76, 1844-1849.
43. Spirin A. S., (2004), *Trends Biotechnol.*, 22, 538-545.
44. He M., Taussig M. J., (2007), *Biochem. Soc. Trans.*, 35, 962-965.
45. He M., Taussig M. J., (2008), *Methods Mol. Biol.*, 484, 207-215.
46. King R. W., Lustig K. D., Stukenberg P. T., McGarry T. J., Kirschner M. W., (1997), *Science*, 277, 973-974.
47. Rungpragayphan S., Nakano H., Yamane T., (2003), *FEBS Lett.*, 540, 147-150.
48. Sawasaki T., Ogasawara T., Morishita R., Endo Y., (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 14652-14657.
49. Roest P. A., Roberts R. G., Sugino S., van Ommen G. J., den Dunnen J. T., (1993), *Hum. Mol. Genet.*, 2, 1719-1721.
50. Kanter G., Yang J., Voloshin A., Levy S., Swartz J. R., Levy R., (2007), *Blood*, 109, 3393-3399.
51. Tsuboi T., Takeo S., Iriko H., Jin L., Tsuchimochi M., Matsuda S., Han E. T., Otsuki H., Kaneko O., Sattabongkot J., Udomsangpetch R., Sawasaki T., Torii M., Endo Y., (2008), *Infect. Immun.*, 76, 1702-1708.

52. Bundy B. C., Franciszkowicz M. J., Swartz J. R., (2008), *Biotechnol. Bioeng.*, 100, 28-37.
53. Jackson A. M., Boutell J., Cooley N., He M., (2004), *Brief. Func. Genomic Proteomic*, 2, 308-319.
54. Klammt C., Schwarz D., Lohr F., Schneider B., Dotsch V., Bernhard F., (2006), *FEBS J.*, 273, 4141-4153.
55. Frey S., Haslbeck M., Hainzl O., Buchner J., (2008), *Biol. Chem.*, 389, 37-45.
56. Derbigny W. A., Kim S. K., Caughman G. B., O'Callaghan D. J., (2000), *J. Virol.*, 74, 1425-1435.
57. Lee H. J., Chang C., (1995), *J. Biol. Chem.*, 270, 5434-5440.
58. He M., Taussig M. J., (1997), *Nucleic Acids Res.*, 25, 5132-5134.
59. Hanes J., Pluckthun A., (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 4937-4942.