

Role of molecular chaperones in inclusion body formation

M. Mar Carrió, Antonio Villaverde

*Institut de Biotecnologia i de Biomedicina and Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 08193
Barcelona, Spain*

*Corresponding author: A. Villaverde. Institut de Biotecnologia i de Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 08193
Barcelona, Spain e-mail: avillaverde@servet.uab.es*

Phone: (34) 935812148

Fax: (34) 935812011

Key words: E. coli, protein aggregation; inclusion bodies; chaperones; GroEL; DnaK

Abstract

Protein misfolding and aggregation are linked to several degenerative diseases and are responsible for the formation of bacterial inclusion bodies. Roles of molecular chaperones in promoting protein deposition have been speculated but not proven *in vivo*. We have investigated the involvement of individual chaperones in inclusion body formation by producing the misfolding-prone but partially soluble VPILAC protein in chaperone null bacterial strains. Unexpectedly, the absence of a functional GroEL significantly reduced aggregation and favoured the incidence of the soluble protein form, from 4 to 35 % of the total VPILAC protein. On the other hand, no regular inclusion bodies were then formed but more abundant small aggregates up to $0.05 \mu\text{m}^3$. Contrarily, in a DnaK⁻ background, the amount of inclusion body protein was 2.5 fold higher than in the wild type strain and the average volume of the inclusion bodies increased from $0.25 \mu\text{m}^3$ to $0.38 \mu\text{m}^3$. Also in absence of DnaK, the minor fraction of soluble protein appears as highly proteolytically stable, suggesting an inverse connection between proteolysis and aggregation managed by this chaperone. In summary, GroEL and DnaK appear as major antagonist controllers of inclusion body formation by promoting and preventing, respectively, the aggregation of misfolded polypeptides. GroEL might have, in addition, a key role in driving the protein transit from the soluble to the insoluble cell fraction and also in the opposite direction. Although chaperones ClpB, ClpA, IbpA and IbpB also participate in these processes, the impact of the respective null mutations on bacterial inclusion body formation is much more moderate.

1. Introduction

The folding into a precise three-dimensional structure is a requisite for protein activity. However, under heat shock and other stresses protein folding can be impaired and folding intermediates tend then to associate through exposed hydrophobic patches. Individual polypeptide molecules are thus being trapped into growing oligomeric aggregates lacking the biological activity. These protein aggregates exhibit different molecular organization, such as a fibril structure in the amyloid plaques [1] and a particulate organization in bacterial inclusion bodies [2]. The precise mechanics of the intermolecular interactions driving the aggregation seeding process remain poorly understood.

Molecular chaperones are essential for the correct folding of a significant fraction of cellular proteins under both physiological but also stress conditions [3], acting in a complex network as a main defense against protein aggregation. In this cooperative context, some chaperones exhibit a holding activity preventing polypeptides from aggregation [4-6] while others show a complementary folding role to assist refolding and solubilisation from aggregates [7, 8]. Moreover, chaperones also minimize aggregation by mediating the degradation of proteins that cannot be properly folded [9].

The specific contribution of particular chaperones to this multifunctional folding network has been only partially identified. Aggregates formed upon thermal stress in bacteria have represented a useful model for such functional scrutiny. Upon heat-shock, DnaK has been observed as a major protector of aggregation but also as a key element for the solubilization of small aggregates, in close cooperation with ClpB [6, 10-12]. On the other hand, small heat shock proteins IbpA and IbpB protect heat-denatured proteins from irreversible aggregation [13, 14] while GroEL is a main folder element in the multichaperone network [15].

Interestingly, it has been observed that GroEL facilitates the recruitment of PrP^C into pre-existing PrP^{Sc} aggregates [16] and it also promotes PrP^C aggregation in absence of any template [17]. In the context of conformational

discases, this could be indicative of a role of molecular chaperones not only in the prevention and reversion of aggregation but also in the active formation of structured aggregates. In this regard, perinuclear elements called aggresomes, in which cell chaperones participate as well, have been proven to promote active protein deposition in eukaryotic cells [18, 19], these functional complexes being observed as a protective mechanism against the cellular toxicity of misfolded proteins [20]. No analogous mechanism for cell-driven protein deposition has been identified in thermally stressed prokaryotic cells. However, a specific type of aggregates, named inclusion bodies (IBs), are formed by an excluding seeding process in specific sites of the cell cytoplasm [21], and show an important extent of inner molecular organization [2]. The building of such organized structures could be compatible with the existence of bacterial mechanisms favouring protein deposition. To explore in more detail this possibility and the eventual participation of molecular chaperones we have here analysed the impact of null mutations in main chaperone-encoding genes on the formation of IBs. Interestingly, DnaK and GroEI. appear as antagonist elements in the IB-forming process. While the absence of DnaK results into bigger protein deposits, confirming the role of this chaperone in preventing aggregation, the deficiency in GroEI. reduces the extend of protein aggregation and prevents IBs to be assembled from numerous small protein aggregation cores that remain free and independent in the cell cytoplasm.

2. Materials and methods

2.1 Bacterial strains, plasmids, and culture conditions

Mutant *Escherichia coli* strains were derivative of MC4100 (*araD139* Δ (*argF-lac*)U169 *rpsL150 relA1 flbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR*). Inactivating mutations in chaperone genes were introduced by P1 transduction into MC4100 background to generate strains JGT3 (*ΔclpB::kan*), JGT4 (*ΔclpA::kan*), JGT6 (*zjd::Tn10 groES30*), JGT17 (*Δihp::kan*), JGT20 (*dnak756 thr::Tn10*), JGT32 (*dnak756 thr::Tn10 ΔclpB::kan*) [22], BB4564 (*groEL140 zjd::Tn10 zjc::ΩSp^c/Str^r*), BB4565 (*groEL44 zjd::Tn10 zje::Kan*) [6, 23]. All these strains were transformed with plasmid pJVP1LAC, encoding the misfolding-prone VP1LAC hybrid protein under the control of the lambda *p_R* and *p_T* lytic promoters and the temperature sensitive CI857 repressor [24]. Upon thermal induction of gene expression from 28°C to 42°C, VP1LAC is produced as inclusion bodies in the cytoplasm of *E. coli* [21]. For some experiments, the related plasmid pJVP1 encoding the non-fused VP1 protein was also used [24]. Luria Bertani (LB) medium [25] plus the required antibiotics were used for bacterial culture. Three hours after induction of *VP1LAC* gene expression, samples were taken to separate the soluble cell fraction and IBs for analysis. For the *in vivo* solubilisation experiments, protein synthesis was arrested at this time by both chloramphenicol addition (up to 200 μg/ml) and temperature downshift to 28°C. Then, IB protein evolution was analysed in Western blot by using an anti-β-galactosidase rabbit sera. β-Galactosidase activity was determined as described previously [26]. All the experiments were performed at least in triplicate, and a representative one is shown in the figures.

2.2 Separation of the soluble and insoluble protein fractions and IB purification

Cells concentrated up to a pre-defined OD₅₅₀ were ice-jacketed and disrupted by sonication in a Braun Labsonic U device for 10 minutes with a needle titanium probe. Sonication settings were 20 KHz and 50 W acoustic

power with 0.5 s-cycles of alternative sonication and resting. Samples were then centrifuged for 15 minutes at 12000 rpm, the soluble fraction was stored at -80 °C until used and the pellet was treated for IB purification by repeated detergent treatment as described [27]. Soluble cell fraction and IBs were analysed by PAGE and protein bands were detected in Western blot by using a polyclonal anti β -galactosidase sera.

2.3 Light scattering and IB image analysis

Light scattering measurements were made in an AMINCO SLM 8000 spectrofluorometer on purified IBs. Scattered light (320 nm) was collected at an angle of 90° of the incident light by integrating in the 315-325 nm window. For image analysis, samples of VP1LAC-producing cells 3h after the temperature up shift were fixed with 0.1% formaldehyde and stored at 4°C until use. Photographs were taken at $\times 1000$ magnification factor in a ZEISS (Axioplan D-7082) optical microscope and images processed as described in detail [21] for IB-volume determination. More than 100 individual cells were scanned from each strain for statistics.

3. Results

3.1 Protein aggregation as IBs is enhanced in absence of DnaK but largely reduced in a GroEL background

The mechanics of the *in vivo* IB construction and disintegration [28] are still unknown. However, since specific chaperones such as DnaK and ClpB have been proven to detach polypeptides *in vitro* and also *in vivo* from certain types of aggregates, these cell proteins (and eventually other chaperones) were presumed to also actively participate in IB solubilization [29]. Therefore, we investigated the construction and deconstruction of IBs in a relevant set of *E. coli* mutant strains (Table 1). Protein aggregation in absence of relevant chaperones was determined by light scattering of purified IBs upon recombinant expression of the model hybrid gene *VPILAC*. In addition, the amount of VPILAC protein in the isolated IBs was determined by Western blot (Figure 1). The coincidence between the profiles of total aggregated protein and VPILAC amounts (Figure 1C) indicates that the relative presence of the recombinant protein in the aggregates is not significantly different within the mutant strains and also compared to the wild type, and confirms that VPILAC is a reliable reporter protein for the analysis of IB formation in different genetic backgrounds. On the other hand, the amount of VPILAC IB protein was significantly higher in the *dnaK* mutant than in the rest of the strains, and in *groES*, *groEL140* and *clpB dnaK* mutant strains clearly lower than that found in the wild type. The amount of IB protein in the *dnaK* and *groEL140* mutants was also determined for a recombinant, non-fused VP1 protein of 23 kDa, rendering the same profile than that found for VPILAC (not shown).

Inversely, the soluble VPILAC protein in the *groEL* background was more than six fold higher than in the wild type cells, while in the *dnaK* mutant the soluble form of VPILAC was hardly detected (Figure 2A). Minor variations in the VPILAC fractioning were observed in the rest of the strains.

3.2 Inactivation of DnaK minimizes proteolysis of VP11AC

Interestingly, a VP11AC degradation fragment of 116 kDa commonly observed in recombinant cells (named “ β -gal-like”) was not detected in any of the *dnaK* mutants but in all the other strains (Figure 2B). This suggested that the absence of DnaK would render VP11AC more proteolytically stable. In GroEL⁻ cells, in which most of the recombinant protein is soluble, proteolytic stability might be impaired as observed by the ratio between the truncated and full-length forms of the protein. On the other hand, the divergent impact of *groEL* and *dnaK* mutations on VP11AC solubility is clearly observed in the protein fractioning as depicted in Figure 2C.

3.3 ClpB- and DnaK-null mutations have a moderate impact on the in vivo solubilization of IB protein

The formation of bacterial IBs is the result of an unbalanced equilibrium between protein aggregation and solubilization under overproduction conditions [27]. In addition, it has been suggested that chaperones DnaK and ClpB might participate in IB disintegration through the removal of IB proteins [29]. Therefore, the inverse influence of *dnaK* and *groEL* (and also *groES*) null mutations as deduced from the cellular amount of IB protein (Figure 1) could be due to either a deficient prevention of aggregation and/or a less efficient protein removal from IBs. In particular, the high IB protein amounts found in the *dnaK* mutant strain might be caused by either a favoured protein deposition or to a restricted rate of protein solubilization in absence of DnaK. To discriminate between these possibilities, we determined the loss of IB protein upon arresting protein synthesis in cells containing already formed IBs, and estimated the concomitant increase of soluble VP11AC protein and β -galactosidase activity in the soluble cell fraction (Table 2). In all the tested genetic backgrounds less protein is solubilized from IBs than in the wild type strain (63 %), ranging from intermediate (*clpA*, *groES*, *ibpAB*; 42-49 %) to high (*groEL*; 32 %) negative impact on the VP11AC release process. In *dnaK* mutants the amount of released protein within a given time period is comparable to that produced by the

groEL140 mutation. This indicates that the higher extent of VPILAC aggregation observed in *dnaK* compared to the wild type and also to the GroEL strains (Figure 1) is not merely due to a failure in protein solubilization but rather to altered aggregation pathways that favour protein precipitation in absence of DnaK. Interestingly, GroEL might have a major solubilizing activity on IB protein. This was confirmed by the analysis of IB disintegration also in the GroEL(44) background in which only around 15 % of VPILAC protein was lost from IBs (not shown), a value still lower than that found in the *groEL144* mutant.

On the other hand, while the protein release from IBs in the *dnaK* and *dnaK clpB* mutants is less efficient than that in the wild type strain, it results in a more important rise of VPILAC (and its enzymatic activity) in the soluble cell fraction (Table 2). Since proteolysis is the fate for most of the IB released polypeptides [27] it is again indicative of a higher proteolytic stability in absence of DnaK.

3.4 The absence of GroEL impairs protein deposition into IBs

Since DnaK and GroEL chaperones have been proven to be key elements of the cell protein quality control system [30], their inverse impact on IB formation was analysed in more detail. Protein fractioning was monitored in the *dnaK* and two *groEL* mutants plus in the GroES⁻ strain. Data at both 3 and 5 hours post-induction of VPILAC expression are depicted in Figure 3. Again, the soluble protein fraction was hardly detectable in the *dnaK* mutant but increasingly abundant in both GroEL⁻ strains. Interestingly, the absence of GroES does not result in a higher amount of soluble protein but in a lower productivity than in the wild type strain, indicating that the roles of GroEL and GroES in the management of VPILAC are not exclusively cooperative. In agreement with the abundance of soluble protein in GroEL⁻ cells, the β -galactosidase enzymatic activity in both *groEL* mutants was higher than in the rest of the tested strains (not shown). This fact proves that although the absence of GroEL favours the occurrence of soluble VPILAC, this chaperone is dispensable for its complete refolding to the native conformation.

3.5 The regular IB architecture is not reached in *GroEL* null mutants

The morphological features of IBs formed under the genetic backgrounds depicted in Figure 3, were determined three hours after induction of *VP1LAC* gene expression. In wild type cultures, cells bearing more than two IBs were rarely observed while those containing only one were abundant, representing over 80% of the IB-bearing cells (Figure 4). This is in agreement with previous observations on the Lon-deficient strain BL21 producing VP1LAC [21]. However, in the *groEL140* mutant, cells containing more than two particles represented more than 60% of the cell population in which aggregation was observed (Figure 5A), with an average of 5.1 particles per cell. A mere inhibition of cell division as occurring in this strain could not account for the higher number of aggregates since in *DnaK*⁻ cells, also showing filamentation, the statistics resemble those of the wild type strain. In addition, the average volume of IBs formed in *DnaK*⁻ is significantly higher than those produced in the wild type cells (0.38 versus 0.25 μm^3), while the aggregates observed in *GroEL*⁻ cells only measure 0.05 μm^3 (Figure 5B). We cannot exclude the existence of smaller aggregates in this last strain escaping from the microscopic observation. *GroES*⁻ IBs are in the range of 0.18 μm^3 , close to data obtained from the wild type cells.

4. Discussion

Inclusion bodies are a particular type of protein aggregates formed in bacterial cells upon expression of recombinant genes at high, non physiological rates [31]. Structurally, they are porous [32], composed by heterogeneously folded chains [2, 33] and organized into a particulate structure [2]. Protein deposition as IBs occurs simultaneously to cell-mediated solubilization of IB protein [34], being the volumetric IB growth the result of an unbalanced equilibrium of both events, that can be redirected towards disintegration upon the arrest of protein synthesis [27]. An important part of the solubilized IB protein undergoes proteolytic attack and it is degraded while a fraction reaches a fully functional form [27]. On the other hand, the formation of IBs and in general protein aggregates is largely enhanced in strains devoid of the protease Lon [24, 35]. Altogether, these observations prompt to observe IBs as an intermediate and transient status of misfolded protein deeply integrated in the cell quality control, in which proteases and chaperones play interconnected roles. Protein aggregation as IBs would be then the result from the inability of chaperones and proteases to process high amounts of misfolded protein, that are clustered until they can be released to re-enter the quality control. However, the specific components of the cell folding system involved in the specific processing of IB protein remained unidentified and the specific properties of the IB structure allowing the dynamic protein transfer from, and to IBs are still to be elucidated.

Recent research on protein aggregation has revealed that a bi-chaperone system consisting of DnaK and ClpB has the capacity to solubilize heat-aggregated proteins (reviewed in reference 29). The participation of these and other relevant chaperones and components of the heat-shock response in IB formation has been analysed in strains containing null mutations in the encoding genes (Table 1). Expectedly, the absence of a functional DnaK protein resulted in enhanced amounts of aggregated VPILAC protein (Figures 1, 2) and in large IBs (Figures 4, 5). However, this fact is not only depending on impaired solubilization activities, since the capacity of the DnaK⁻ strain to remove protein from IB is comparable to that observed in a GroEL⁻ background (Table 2), and in

which the deposition of insoluble protein is not particularly favoured (Figure 1). Interestingly, in absence of a functional DnaK, the amount of the remaining soluble VPILAC protein is hardly detectable (Figure 2). Moreover, a commonly observed degradation product of VPILAC, namely the β -galactosidase-like fragment, is absent in both DnaK⁻ and DnaK⁻ClpB⁻ cells (but not in ClpB⁻) (Figure 2), suggesting that DnaK could be involved in VPILAC degradation by delivering folding intermediates to proteases. In this context, the DnaK co-chaperone DnaJ has been proven to be involved in the selective breakdown of misfolded proteins by promoting the formation of protease-substrate complexes [9, 36]. Also, DnaK itself is necessary for the degradation of particular misfolded proteins and involved in the general proteolytic processing in *E. coli* [3, 37].

These results indicate that prevention of aggregation and the favouring of degradation (rather than the disaggregating properties), are the main activities of DnaK involved in IB formation. In this context, the absence of ClpB, participating in the bi-chaperone network for reversion of heat denaturation [6, 11] does not affect neither the total amount of IB protein (Figure 1) nor the efficiency of protein release from IBs (Table 2). It is not clear why IB formation is impaired in the double DnaK⁻ClpB⁻ mutant (Figure 1) and why DnaK and ClpB does not cooperate for the dissolution of IBs, while such coordinated activity has been proven on other types of aggregates different from IBs. The low disaggregating efficiency of DnaK-ClpB on big-sized aggregates [38] could account for IBs being recalcitrant to disintegration mediated by these chaperones. On the other hand, the molecular organization of polypeptide chains in heat- or chemically-denatured protein does not need to be necessarily comparable to that of polypeptides in IBs, where cell chaperones IbpA and IbpB and others are also present and associated to misfolded polypeptide regions. Therefore the refolding mechanics and requirements for solubilization of different aggregates could be not similar. In this context, several chaperone-inactivating mutations have observable impairing effects on the release of IB protein (Table 2), proving that this process is the result of cooperative or complementing activities of the multi-chaperone network.

Unexpectedly, in a GroEL-deficient background, IB formation is largely impaired (Figure 1), the VP11AC protein remaining soluble in the cell cytoplasm (Figures 2, 3) and retaining enzymatic activity. On the other hand, in absence of this chaperone, regular IBs are not formed (Figure 4) despite the total VP11AC amounts are comparable to those found in wild type cells (Figure 3). Contrarily, small and abundant protein aggregates are observed in the cell cytoplasm (Figures 4 and 5), indicative of a failure in the seeding process for IB construction. This role of GroEL in promoting protein aggregation and the organization of small protein aggregates in higher organized structures such as IBs would be irrespective of its well-described folding activities for which GroES is required [39]. The divergent impact of GroEL- and GroES-inactivating mutations (Figures 2, 3, 4, 5) indicates a lack of cooperation of these proteins in IB formation. In this context, GroEL without GroES can mediate PrP aggregation *in vitro* [17]. On the other hand, GroEL is also involved in protein removal from IBs, since the deficiency in this chaperone largely minimizes the release of IB protein (Table 2). These results support the idea that GroEL drives protein transfer not only from the soluble to the insoluble cell fraction but also inversely.

The folding activities of GroEL-GroEL are limited by the size of the protein substrate to be encapsulated up to 55 kDa [40], and VP11AC is an homotetrameric hybrid β -galactosidase enzyme of about 135 kDa per monomer [24]. However, binding of GroEL to proteins larger than 80 kDa for their folding has been reported [41]. In addition, GroEL co-purifies with VP11AC from crude cell extracts [42] and in absence of GroES, it forms *in vitro* complexes with denatured β -galactosidase [43]. These observations prove not only the dispensability of GroES for GroEL activities leading IB-formation but also the capacity of GroEL to interact with large-sized proteins for processes distinguishable from the encapsulated folding. Although the nature of these interactions remains still unsolved GroEL association with large-mass substrates would prevent GroES to seal the GroEL cavity [39]. Moreover, the fact that FMDV VP1 (23 kDa) IBs are also poorly formed in a GroEL context (not

shown), indicates that the involvement of GroEL in these IB managing activities might be independent of the molecular mass of the protein. On the other hand, the inefficient VPILAC solubilization from IBs in the GroEL⁻ background (Table 2) suggests that this protein might mediate the transit of misfolded protein in both directions, from the soluble to the insoluble but also from the insoluble to the soluble states. This would be in agreement with previous experiments performed *in vitro* and revealing an unusual behaviour of GroEL, in which this chaperone prevented the aggregation of denatured β -galactosidase but in presence of ATP, it instead stimulated its deposition into aggregates [43].

In summary, the construction of bacterial IBs is the result of a multi-chaperone network acting on both aggregation and disaggregation pathways, in which DnaK and GroEL play critical but antagonistic roles. While DnaK prevents IB formation by reducing aggregation and promoting proteolysis of misfolded proteins, GroEL operates its transit between soluble and insoluble cell fractions and positively participates in IB formation. The antagonism of DnaK and GroEL activities is amazingly exemplified by the volume reduction in IBs formed by the human growth hormone, the increase of the IB number per cell and also the higher amounts of soluble protein found upon over-expression of *dnaK* gene along with the recombinant gene [44], being this a phenotype similar to that reported here for GroEL-deficient mutants. A natural GroEL IB-seeding activity would be comparable to that driving the formation of PrP aggregates *in vitro* and as suggested to occur *in vivo* in eukaryotic cells by analogous chaperones during the course of conformational diseases [16, 17]. Therefore, GroEL (and eventually the generic Hsp60 chaperone family), in close combination with, or supervised by other cell elements, would act as a key instrument to minimize the toxicity associated to the exposition of hydrophobic domains on misfolded proteins. In bacteria, this protective task might be at least partially accomplished by IB formation.

Acknowledgements- We are grateful to Prof. F. Baneyx and Prof. B. Bukau for generously providing mutant *E. coli* strains and to Dr. U. Rinas for helpful

comments. This work has been supported by grant BIO2001-2443 (CICYT, Spain) and by Maria Francesca de Roviralta Foundation. Part of this paper was written at the GBI² (Germany) under a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 578 "Vom Gen zum Produkt") to AV. MMC has received a doctoral fellowship from MEC, Spain.

REFERENCES

- [1] Fink, A.I. (1998) *Fold. Des.* 3, R9-23.
- [2] Carrió, M.M., Cubarsi, R., and Villaverde, A. (2000) *FEBS Lett.* 471, 7-11.
- [3] Tomoyasu, T., Mogk, A., Langen, H., Goloubinoff, P., and Bukau, B. (2001) *Mol. Microbiol.* 40, 397-413.
- [4] Ehmsperger, M., Graber, S., Gaestel, M., and Buchner, J. (1997) *EMBO J.* 16, 221-229.
- [5] Veinger, L., Diamant, S., Buchner, J., and Goloubinoff, P. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 11032-11037.
- [6] Mogk, A., Tomoyasu, T., Goloubinoff, P., Rudiger, S., Roder, D., Langen, H., and Bukau, B. (1999). *EMBO J.* 18, 6934-6949.
- [7] Parsell, D.A., Kowal, A.S., Singer, M.A., and Lindquist, S. (1994) *Nature* 372, 475-478.
- [8] Ben-Zvi, A.P., and Goloubinoff, P. (2001). *J. Struct. Biol.* 135, 84-93.
- [9] Huang, H.C., Sherman, M.Y., Kandror, O., and Goldberg, A.L. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 3920-3928.
- [10] Zolkiewski, M. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 28083-28086.
- [11] Goloubinoff, P., Mogk, A., Zvi, A.P., Tomoyasu, T., and Bukau, B. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 13732-13737.
- [12] Glover, J.R., and Tkach, J.M. (2001) *Biochem. Cell. Biol.* 79, 557-568.
- [13] Kitagawa, M., Miyakawa, M., Matsumura, Y., and Tsuchido, T. (2002) *Eur. J. Biochem.* 269, 2907-2917.
- [14] Kuczynska-Wisnik, D., Kedzierska, S., Matuszcwska, E., Lund, P., Taylor, A., Lipinska, B., and Laskowska, E. (2002) *Microbiology* 148, 1757-1765.
- [15] Grantcharova, V., Alm, E.J., Baker, D., and Horwich, A.L. (2001) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11, 70-82.

-
- [16] DebBurman, S.K., Raymond, G.J., Caughey, B., and Lindquist, S. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 13938-13943.
- [17] Stöckel, J., and Hartl, F.U. (2001) *J. Mol. Biol.* 313, 861-872.
- [18] Johnston, J.A., Ward, C.L., and Kopito, R.R. (1998) *J. Cell. Biol.* 143, 1883-1898.
- [19] Heath, C.M., Windsor, M., and Wileman, T. (2001) *J. Cell. Biol.* 153, 449-455.
- [20] Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J., Taddei, N., Ramponi, G., Dobson, C.M., and Stefani M. (2002) *Nature* 416, 507-511.
- [21] Carrió, M.M., Corchero, J.L., and Villaverde, A. (1998) *FEMS Microbiol. Lett.* 169, 9-15.
- [22] Thomas, J.G., and Bancy, F. (1998) *J. Bacteriol.* 180, 5165-5172.
- [23] Zeilstra-Ryalls, J., Fayet, O., Baird, L., and Georgopoulos, C. (1993) *J. Bacteriol.* 175, 1134-1143.
- [24] Corchero, J.L., Viaplana, E., Benito, A., and Villaverde A. (1996) *J. Biotechnol.* 48, 191-200.
- [25] Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. (1989) *In Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- [26] Ferrer-Miralles, N., Feliu J.X, Vandevuer, S, Müller, A., Cabrera-Crespo, J., Ortman, I., Hoffmann, F., Cazorla, D., Rinas, U., Prévost, M., and Villaverde, A. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 40087-40095.
- [27] Carrió, M.M., and Villaverde, A. (2001) *FEBS Lett.* 489, 29-33.
- [28] Carrió, M.M., and Villaverde, A. (2002) *J. Biotechnol.* 96, 3-12.
- [29] Schlicker, C, Bukau, B., and Mogk, A. (2002) *J. Biotechnol.* 96, 13-21.
- [30] Netzer, W.J., and Hartl, F.U. (1998) *Trends Biochem. Sci.* 23, 68-73.
- [31] Marston, F. A. (1986) *Biochem. J.* 240, 1-12.

- [32] Bowden, G. A., Parcdes, A. M., and Georgiou, G. (1991) *BioTechnology* 9, 725-730.
- [33] Oberg, K., Chrnyk, B. A., Wetzel, R., and Fink, A. L. (1994) *Biochemistry* 33, 2628-2634.
- [34] Carrió, M. M., Corchero, J. L., and Villaverde, A. (1999) *Biochim. Biophys. Acta.* 1434, 170-176.
- [35] Rosen, R., Biran, D., Gur, E., Becher, D., Hecker, M., and Ron, E.Z. (2002) *FEMS Microbiol. Lett.* 207, 9-12.
- [36] Jubete, Y., Maurizi, M.R., and Gottesman, S. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 30798-30803.
- [37] Sherman, M.Yu., and Goldberg, A.L. (1992) *EMBO J.* 11, 71-77.
- [38] Diamant, S., Ben-Zvi, A.P., Bukau, B., and Goloubinoff, P. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 21107-21113.
- [39] Bukau, B., Deuerling, E., Pfund, C., and Craig, E.A. (2000) *Cell* 101, 119-122.
- [40] Ewalt, K.I., Hendrick, J.P., Houry, W.A., and Hartl, F.U. (1997) *Cell* 90, 491-500.
- [41] Chaudhuri, T.K., Farr, G.W., Fenton, W.A., Rospert, S., and Horwich, A.I. (2001) *Cell* 107, 235-246.
- [42] Boels, K., Carrió, M.M., Arís, A., Corchero, J.L. and Villaverde, A. (1999) *Biotechnol. Lett.* 21, 531-536.
- [43] Ayling, A., and Baneyx, F. (1996) *Protein Sci.* 5: 478-487.
- [44] Blum, P., Velligan, M., Lin, N., and Matin, A. (1992) *BioTechnology* 10, 301-304.

Table 1. *E. coli* strains used in this work

Strain	Genotype	Phenotype	Reference
MC4100	<i>araD139 Δ(argF-lac)U169 rpsL150 relA1 flhB5301 deoC1 ptsI'25 rhsR</i>	wt	22
JGT3	MC4100 <i>ΔclpB::kan</i>	ClpB ⁻	22
JGT4	MC4100 <i>clpA::kan</i>	ClpA ⁻	22
JGT6	MC4100 <i>zjd::Tn10 groES30</i>	GroES ⁻	22
JGT17	MC4100 <i>Δibp1::kan</i>	IbpA ⁻ , IbpB ⁻	22
JGT20	MC4100 <i>dnaK756 thr::Tn10</i>	DnaK ⁻	22
JGT32	MC4100 <i>dnaK756 thr::Tn10 ΔclpB::kan</i>	ClpB ⁻ DnaK ⁻	22
BB4564	MC4100 <i>groEL44 zdj::Tn10 zje::ΩSpe^f</i>	GroEL ⁻	6
BB4565	MC4100 <i>groEL140 zdj::Tn10 zje::kan</i>	GroEL ⁻	6

Table 2. VP1LAC release from IBs in absence of protein synthesis

Phenotype	Loss of VP1LAC IB protein ^a (%)	Increase of VP1LAC in the soluble fraction ^b (%)	Increase of enzymatic activity ^b (%)
wt	63	240	253
ClpB ⁻	64	510	294
ClpA ⁻	42	172	211
GroES ⁻	49	461	272
IbpA IbpB ⁻	44	376	301
DnaK ⁻	34	918	409
ClpB DnaK	35	173	465
GroEL(140) ⁻	32	161	172

^a Maximal amount of VP1LAC protein lost from IB within a 3h-period after the arrest of protein synthesis. Note that a certain extent of protein re-aggregation can occur under these conditions (27).

^b Maximal increase in both the amount of VP1LAC found in the soluble cell fraction and the β-galactosidase activity within a 3h-period after the arrest of protein synthesis, referred to time 0. An important fraction of the solubilized protein is degraded upon release from IBs (27).

Figure 1. Amounts of VP1LAC protein in purified IBs 3 h after induction of *VP1LAC* gene expression, as measured by Western blot (A) and light scattering (B). The growth curves and final biomasses were similar in all the strains under the tested time period. The correlation between both parameters is also shown (C). Statistics are $r=0.94$; $p<0.01$.

Figure 2. Amount of soluble VP1LAC protein 3 h post-induction (A). The intact, full-length VP1LAC fusion of 135 kDa is shown as a black bar while a main degradation fragment of 116 kDa (β -galactosidase-like) is shown as a white bar. The quotient between the amount β -galactosidase-like and the intact VP1LAC protein is shown as an index of proteolytic susceptibility (B). The fraction of soluble (white bar) and IB (black bar) VP1LAC protein is also indicated (C).

Figure 3. Partitioning of VP1LAC protein at 3 h (panel A) and 5 h (panel B) after induction of gene expression. Protein was quantified by Western blot for the soluble (black bar) and IB (white bar) fractions.

Figure 4. Micrographs of mutant cells 3 h after the induction of *VP1LAC* gene expression .

Figure 5. Number of refractile IB particles per cell, namely one (black bar), two (light grey bar) and more than two (dark grey bar) (A). The average number of aggregates per cell has been calculated for GroES⁻ (3.0), for DnaK⁻ (3.6) and GroEL(140)⁻ (5.1). The average IB volume is represented in panel B.

Figure 1, Carrió and Villaverde

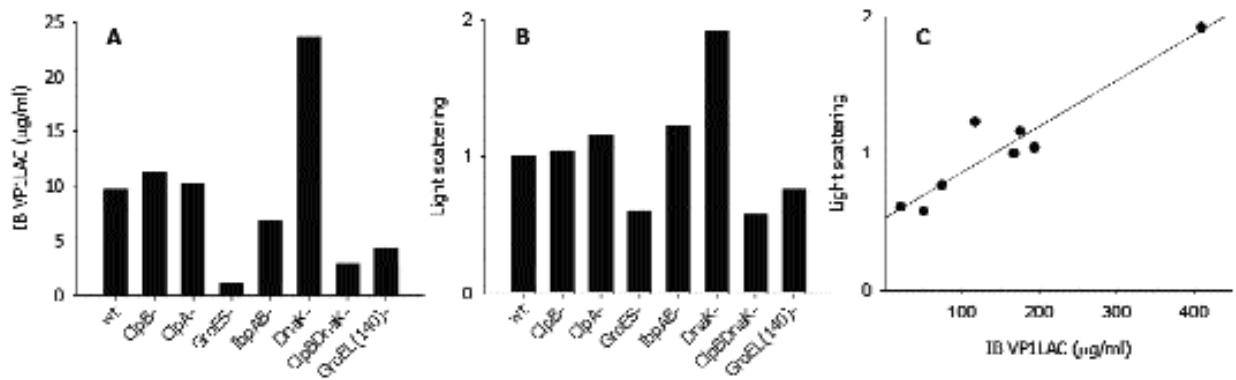


Figure 2, Carrió and Villaverde

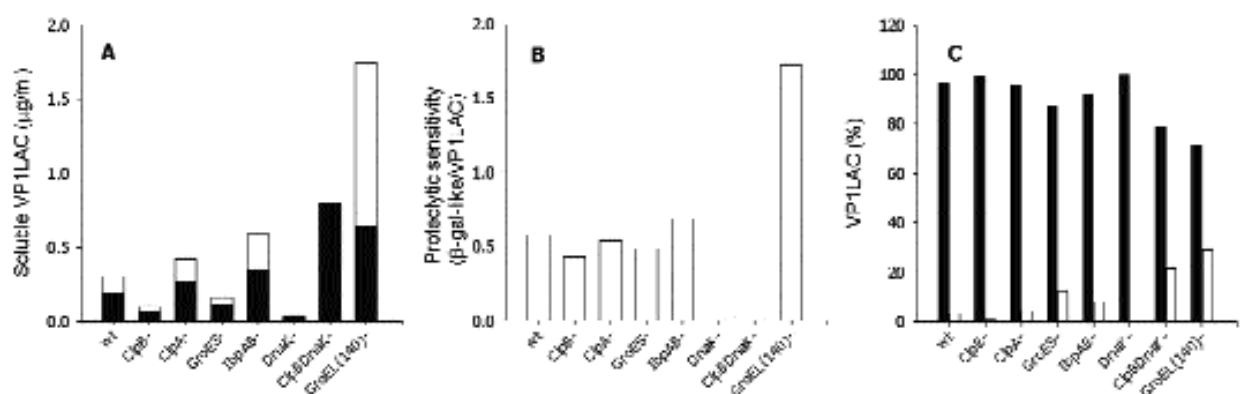


Figure 3, Carrió and Villaverde

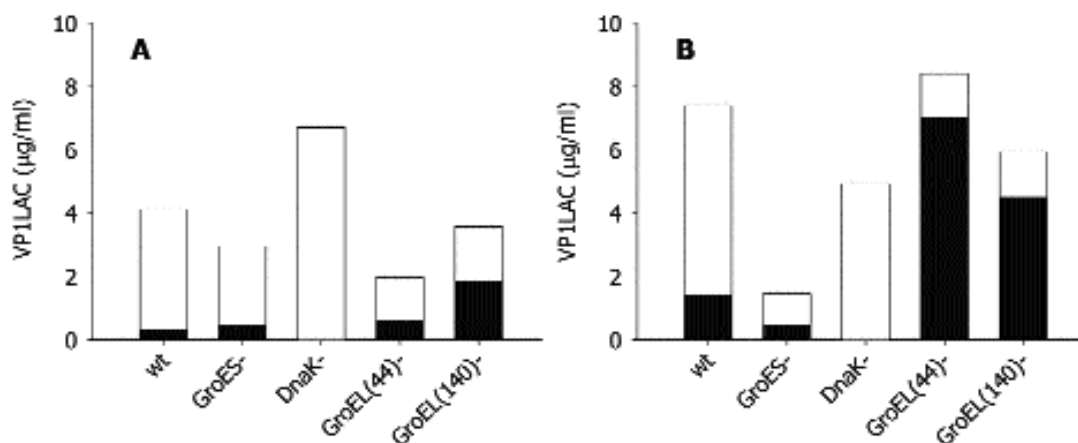


Figure 4, Carrió and Villaverde

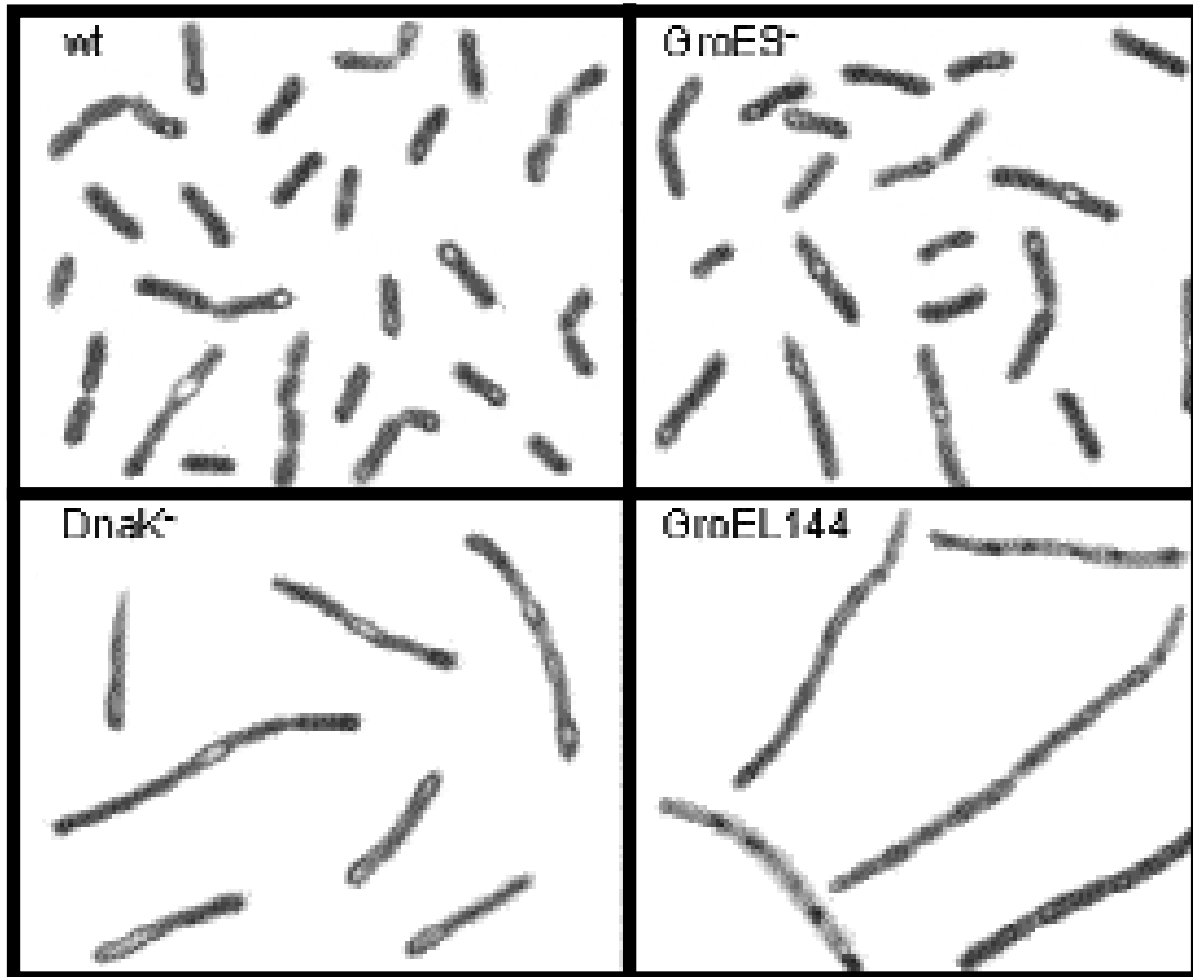
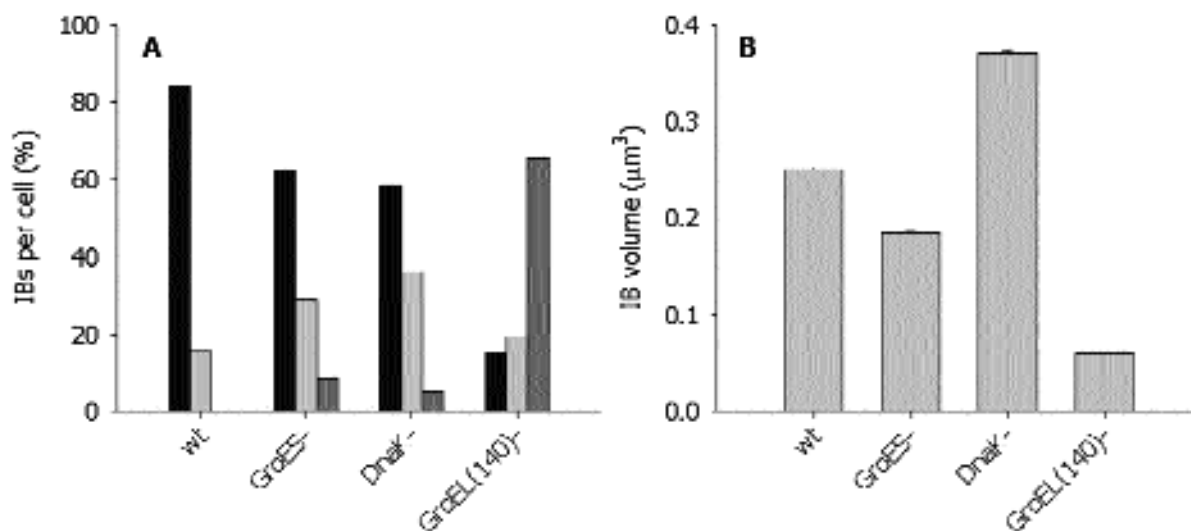


Figure 5, Carrió and Villaverde



4.6. NOVES ESTRATÈGIES PER A RECUPERAR PROTEÏNA NATIVA DELS COSSOS D'INCLUSIÓ

La formació de cossos d'inclusió representa un dels majors obstacles dels processos de producció de proteïnes recombinants. Per això, un dels principals objectius de conèixer el seu procés de formació és explotar el seu potencial biotecnològic, optimitzant la recuperació de proteïna nativa d'aquests. Es va analitzar la possibilitat de solubilitzar proteïna de cossos d'inclusió per dos mètodes nous que ofereixen algunes avantatges respecte els descrits fins ara, així com ésser genèrics per a tot tipus de proteïnes i reduir els agents caotròpics i desnaturalitzants usats. En primer lloc, es va proposar usar extractes cel·lulars concentrats per a mimetitzar el procés de renaturalització de la proteïna agregada, que s'havia observat *in vivo*. En segon lloc, es va estudiar l'ús de la pressió hidrostàtica per a desagregar els cossos d'inclusió i recuperar-ne la proteïna activa.

L'AGREGACIÓ DE PROTEÏNES EN FORMA DE COSSOS D'INCLUSIÓ ÉS REVERSIBLE: UTILITZACIÓ D'EXTRACTES CEL·LULARS PER A LA SOLUBILITACIÓ DE COSSOS D'INCLUSIÓ

La capacitat dels extractes cel·lulars de desagregar els cossos d'inclusió i recuperar una part de la proteïna en la seva forma activa (Fig.4, treball 3) ens ofereix la possibilitat d'estudiar si aquesta propietat es pot utilitzar per a desenvolupar un nou mètode de recuperació de proteïna activa dels cossos d'inclusió. El procediment es basa en incubar cossos d'inclusió purificats amb un extracte cel·lular concentrat (20X) que ha estat sotmès a un xoc tèrmic (Fig.1). Els resultats obtinguts mostren que els cossos d'inclusió de VP1LAC es desintegren un 60 %, però només una petita part de la proteïna desagregada es veu en la seva forma nativa (entre un 25 i un 30%). Com que la resta de proteïna desapareguda dels agregats no és detectada creiem que és proteolitzada. Per altra banda, part de la proteïna solubilitzada també és proteolitzada posteriorment (un 10% aproximadament)

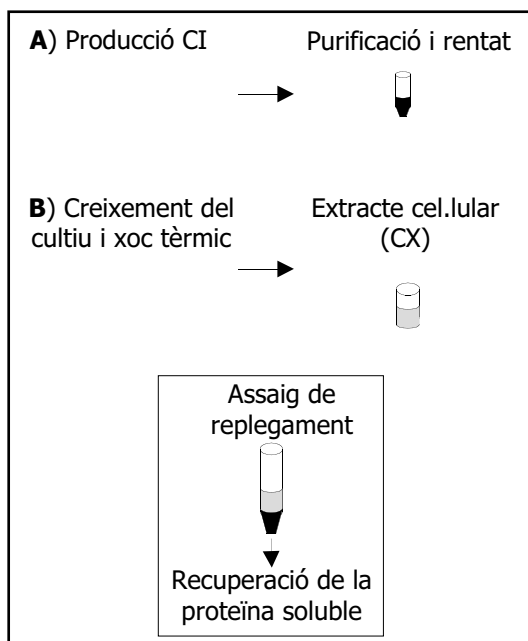


Figura 1. Protocol de solubilització de cossos d'inclusió, utilitzant extractes cel·lulars.

(Fig.4A, treball 3).

El primer pas per a l'optimització d'aquest procés seria minimitzar la proteòlisi, per la qual cosa es va afegir una mescla d'inhibidors de proteases (preparada comercialment per l'empresa Roche) a les mostres de solubilització de cossos d'inclusió amb extractes cel·lulars. Els resultats obtinguts no mostren una total inhibició de la proteòlisi (Fig. 2), la qual cosa suggereix que s'hauria d'utilitzar una concentració més elevada o provar-ne d'altres .

Els components dels extractes cel·lulars responsables de la solubilització dels cossos d'inclusió no han estat del tot identificats, però en altres treballs realitzats en aquesta tesi hem vist que algunes xaperones participen en aquest procés. Com que moltes xaperones que intervenen en el replegament de proteïnes, com la DnaK i la GroEL, són dependents d'ATP, vam afegir-ne per evitar que fos un factor limitant. Per a que no s'exhaurís ràpidament, també vam afegir un sistema de regeneració d'ATP, basat en el fosfoenolpiruvat i la piruvat quinasa (Dillon i Clark, 1990). Però el rendiment del procés tampoc va millorar significativament amb el suplement d'ATP, com es pot verure a la Fig.2..

Tot i que els primers intents d'optimitzar el procés de solubilització de cossos d'inclusió mitjançant extractes cel·lulars no hagin tingut bons resultats, val la pena continuar estudiant com inhibir eficientment la proteòlisi i afavorir el replegament de la proteïna desagregada.

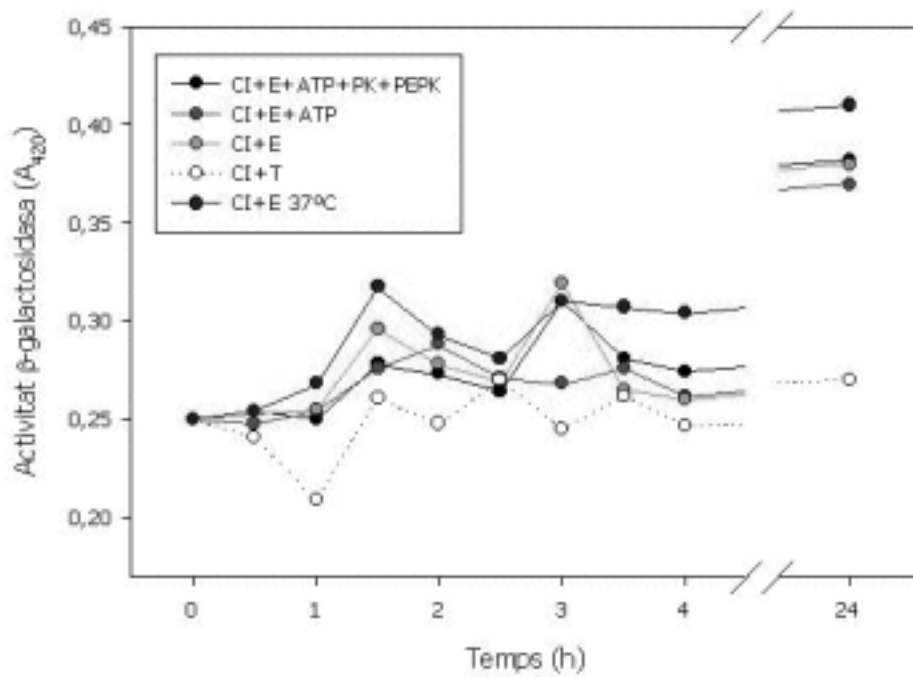


Figura 2. Optimització del protocol de solubilització de cossos d'inclusió descrit. Es van testar les diferents condicions descrites a la llegenda, essent E els extractes, PK piruvat quinasa i PEPK fosfoenolpiruvat quinasa i com a control es van incubar cossos d'inclusió amb tampó fosfat (CI+T)

UTILITZACIÓ DE LA PRESSIÓ HIDROSTÀTICA COM A EINA PER A RECUPERAR PROTEÏNA NATIVA DELS COSSOS

INTRODUCCIÓ

L'aplicació de pressió hidrostàtica és una eina molt útil per a estudiar propietats estructurals d'una proteïna, i sobretot, de proteïnes oligomèriques i d'estructures proteiques macromoleculares. El comportament de cada proteïna sota pressió hidrostàtica depèn de la seva estructura i del seu patró de plegament. La pressió hidrostàtica induïx la infiltració de molècules d'aigua en la matriu de la proteïna, que provoca una hidratació hidrofòbica, és a dir una solvatació, que depèn de la presència de volums de les cavitats existents en l'estructura de la proteïna nativa. Per tant el comportament que cada proteïna presenta sota pressió hidrostàtica, ens dóna una idea de la seva topologia.

La pressió hidrostàtica s'ha utilitzat per estudiar les vies de plegament i d'agregació. En alguns casos l'aplicació de la pressió hidrostàtica desestabilitza els intermediaris de plegament i porta a cinètiques de plegament més simples, en altres estabilitza els intermediaris de plegament i en permet el seu aïllament i la seva caracterització. Aquest últim comportament s'ha utilitzat per aïllar intermediaris que es poden utilitzar com a antagonistes per a bloquejar l'agregació (Foguel *i col.*, 1999; Ferrao-Gonzales *i col.*, 2000; St.John *i col.*, 1999).

D'altra banda, la pressió hidrostàtica també resulta molt útil per a estudiar agregats proteics, ja que les molècules

d'aigua tendeixen a col·locar-se entre les proteïnes agregades, desfent les interaccions que els formen i dissociant els agregats. Així doncs s'ha utilitzat per a analitzar agregats de rodhanasa (Gorovits i Horowitz, 1998), mioglobina (Smeller, 1999) i de la proteïna amiloidogènica transiretrina (Ferrao-Gonzales *i col.*, 2000) i per a dissociar proteïnes oligomèriques i complexes macromoleculares, sense afectar l'estructura secundària ni terciària de les subunitats proteiques (St.John *i col.*, 1999).

El grup de la Debora Foguel, va estudiar la utilització d'aquest mètode per a recuperar proteïna nativa d'agregats produïts *in vitro* (Foguel *i col.*, 1999). Per aquests estudis van usar la proteïna de la cua del bacteriòfag P22 (tailspike protein, TSP), de la qual es coneix molt bé el seu patró de plegament i estan ben caracteritzats els intermediaris de plegament que són conduïts cap a l'estructura nativa o cap a l'agregació. Aquest treball demostra que la pressió hidrostàtica pot dissociar els agregats de TSP produïts *in vitro* i recuperar més d'un 50% de la proteïna replegada en el seu estat natiu (Foguel *i col.*, 1999).

La solubilització de cossos d'inclusió per pressió hidrostàtica ha estat escassament estudiada, però els resultats obtinguts són esperançadors. S'ha estudiat la desagregació de cossos d'inclusió de β -lactamasa i s'observa que aplicant una pressió hidrostàtica de 2Kbar durant 48 hores, s'aconsegueix recuperar un 85% de

proteïna nativa, essent independent de la concentració de proteïna i de l'addició de GdmHCl (St.John *i col.*, 1999). Per això, és interessant avaluar amb més profunditat la possibilitat de solubilitzar cossos d'inclusió mitjançant pressió hidrostàtica, ja que representaria un mètode més fàcil i barat per a recuperar proteïna nativa.

Els cossos d'inclusió que vam utilitzar per aquests estudis van ser de les proteïnes ja esmentades, VP1LAC i TSP. Els agregats de VP1LAC es van testar perquè ja estaven ben caracteritzats (treball 1 i 2) i vam creure interessant provar de recuperar-ne proteïna nativa. Ens va semblar molt interessant estudiar els cossos d'inclusió de TSP per veure si es comportaven semblant als agregats de la mateixa proteïna produïts *in vitro*, dels quals se'n pot recuperar proteïna nativa. Aquest treball es va realitzar al laboratori de bioquímica de la Dra. Debora Foguel, en el que treballen des de fa anys amb pressió hirostàtica i agregació de proteïnes i on vaig fer-hi dues estades curtes, durant la tesis.

MATERIALS I MÈTODES

1. Producció, purificació dels cossos d'inclusió i preparació de les mostres per a ésser pressuritzades

Els cossos d'inclusió de VP1LAC es produeixen a la soca d'*Escherichia coli* Lon-BL21, transformades amb el plasmidi pJVP1LAC (Corchero *i col.* 1996). Els cultius de BL21/pJVP1LAC es creixen en medi ric (LB), a 28°C, i quan entren en fase exponencial s'indueix la producció de la proteïna recombinant, transferint-los a

42°C. Els cossos d'inclusió de TSP es produeixen a la soca d'*Escherichia coli* Lon-BL26, que porta el plàsmid pTTSP (Carbonell i Villaverde, 1998). Els cultius de BL26/pTTSP es creixen en medi ric a 37°C i la producció de TSP s'indueix mitjançant IPTG (1mM). Durant la producció de les proteïnes recombinants es recullen mostres de 100ml a les 3, 5 i 24 hores, per a la purificació dels cossos d'inclusió.

Els cossos d'inclusió es purifiquen a través de repetits tractaments amb detergents després de la lisi cel·lular, com s'ha descrit prèviament (treball 1).

Per a la posterior pressurització, els cossos d'inclusió purificats de TSP es resuspenen amb un tampó BisTris 50 mM, NaCl 100mM, i els de VP1LAC BisTrisPropà 50mM, 100mM NaCl i EDTA 1mM. Les mostres es preparen a un mateixa concentració de proteïna, mesurada a través de l'absorvència a 320nm, s'usa una DO de 0,6.

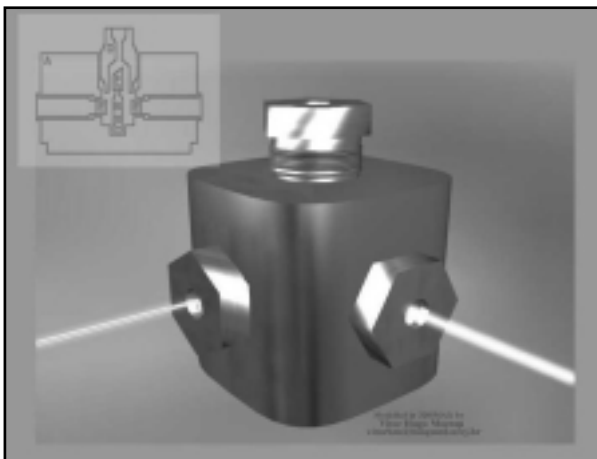
2. Detecció de l'activitat enzimàtica de la β -galactosidasa i de la presència de trimers de TSP

L'activitat enzimàtica de la β -galactosidasa es mesura a través de l'absorvència a una longitud d'ona de 420nm, que té la mostra de color groc, quan el lloc actiu de l'enzim reacciona amb el súbstrate ONPG. La presència de trimers nadius de TSP es pot detectar mitjançant la separació dels polipeptids pel tamany, amb una columna de cromatografia (HPLC del sistema Shimadzu, utilitzant una columna de TSK3000) i monitoritzant l'absorció a 280nm i l'emissió dels triptòfans a 340nm

(excitant a 280nm).

3. Aplicació de la pressió hidrostàtica

Les mostres dels cossos d'inclusió purificats amb tampó fosfat es sotmeten a una pressió hidrostàtica de 40Kpsi, que s'aplica de cop, mitjançant una bomba de pressió que va afegint etanol a la mostra que està tancada al buit dins d'una ampolleta de vidre amb un tap de plàstic moldejable. El seguiment de l'agregació i l'estat de la mostra es fa mitjançant el fluorímetre connectat a la bomba. Així es



Bomba utilitzada per l'aplicació de la pressió hidrostàtica. A l'esquema petit de la part superior esquerra es veu com queda col·locada la mostra dins la bomba i per on passa el feix de llum per a fer les mesures òptiques necessàries, amb el fluorímetre.

recullen espectres de triptòfan i d'espatllament de llum durant la pressurització.

4. Fluorimetria

Per a monitoritzar l'agregació de la mostra es segueixen els espectres de l'espatllament de llum cada 10 minuts durant el procés de pressurització, s'obtenen excitant les mostres a 320 i recullint l'espectre d'emissió de llum incident a 90°C, a través de la intensitat de llum integrada entre 315 i 325 nm. També s'analitzen els espectres del triptòfan per a conèixer l'estat de la proteïna, excitant la

mostra a 280nm i recullint l'espectre d'emissió de 300 a 400 nm.

RESULTATS

1. La pressió hidrostàtica dissocia parcialment cossos d'inclusió de VP1LAC

Cossos d'inclusió purificats en diferents temps de la producció de proteïna recombinant, a les 3h, i a les 24 hores, van ser pressuritzats, a 2,6 Kbar, sota diferents condicions, de temperatura, presència d'agents caotròpics i temps de pressurització. El combinar la pressió amb temperatura o urea provoca petites variacions, però en tots els casos els agregats pressuritzats disminueixen l'agregació entre un 35 i un 40%. De totes formes, no s'ha observat la forma activa de la proteïna desagregada. Això deu ésser degut a que l'efecte de la pressió hidrostàtica inactiva el tetràmer de β -galactosidasa, parcialment o completament, depenent de les condicions de pressurització (Degraeve *et al.*, 1996).

1.1. Efecte de l'urea

La presència d'urea perjudica una mica la dissociació dels cossos d'inclusió per pressió hidrostàtica (Fig.1). Això podria ser degut a que la urea afavoreix la hidratació dels agregats. Si els agregats estan més hidratats, l'impacte de la pressió hidrostàtica és més lleu, ja que aquesta promou la desagregació insertant molècules d'aigua entre els polipèptids associats, que fan trencar les interaccions intermoleculares que els uneixen.

1.2. Efecte de la temperatura

Elevades temperatures afavoreixen la

RESULTATS

TREBALL 11

desagregació (Fig.1A), però la proteïna desagregada s'inactiva completament (Fig.1B). Com que la incidència de la temperatura s'ha estudiat combinada amb la presència d'urea (1 i 2M), la inactivació de l'enzim podria ser deguda a la desnaturalització per temperatura o per l'urea. De totes formes, resultats anteriors (Degraeve *et al.*, 1996) mostren que l'estabilitat de la β -galactosidasa pressuritzada depèn del pH i la temperatura, l'enzim sota pressió es manté estable entre 4-35°C, fora d'aquest rang es desestabilitza el tetràmer (Degraeve *et al.*, 1996). La pressurització llarga a baixa temperatura, disminueix una mica la dissociació, però la proteïna alliberada manté un 15% d'activitat (Fig.1B).

1.3. Temps de pressurització

Les mostres s'han pressuritzat a varis intervals de temps, des de 3 hores, fins a 48 hores, però s'observa que la desagregació es dona durant els primers moments d'aplicar la pressió hidrostàtica.

1.4. Comparació entre cossos d'inclusió joves i vells

Els cossos d'inclusió de 24 hores són una mica més sensibles a la pressió que els de 3 hores. La fracció de proteïna desagregada que és replegada a la seva forma nativa, està en la mateixa proporció en els dos tipus de cossos d'inclusió, la qual cosa indica que deu haver-hi una fracció equivalent de proteïna potencialment replegable. En tots els casos, la fluorescència del triptòfan augmenta un nanòmetre, la qual cosa indica una major exposició del triptòfan, associada a la desagregació.

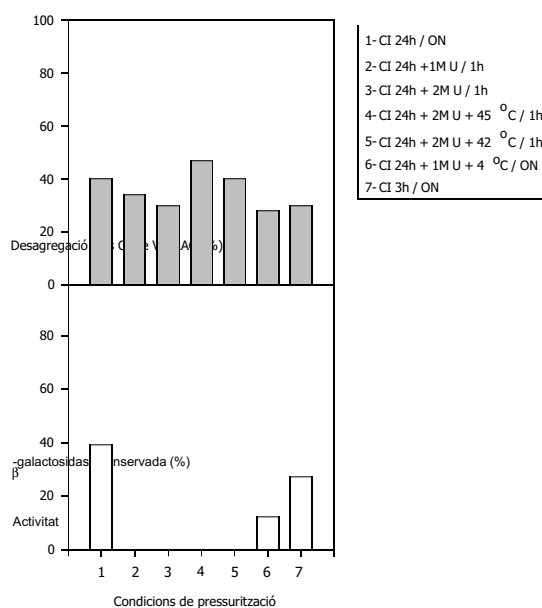


Figura 1. Desagregació dels cossos d'inclusió de VP1LAC de 3 o 24 hores al ser pressuritzats en diferents condicions de concentració d'urea, temperatura i temps de pressurització (descrites a la llegenda). A la gràfica inferior es mostra l'activitat enzimàtica de la proteïna dels cossos d'inclusió que es conserva després de ser pressuritzats.

2. Dissociació dels cossos d'inclusió de TSP

S'ha analitzat l'efecte d'una pressió hidrostàtica de 2,6 Kbar sobre cossos d'inclusió de TSP de 5 hores, a diferents temperatures i amb la presència de l'agent caotrópic clorur de guanidina (GnCl). Els resultats obtinguts, que es mostren a la Figura 2, són similars als obtinguts amb els cossos de VP1LAC. En els dos casos, el percentatge de desagregació està al voltant del 40%. Les diferències observades entre les temperatures de 3-36°C són insignificants. Curiosament, a temperatures elevades es comporten lleugerament diferent als agregats de VP1LAC, ja que en aquest cas s'observa una menor dissociació dels agregats.

El replegament de la proteïna alliberada es

va intentar estudiar per HPLC, però no vam aconseguir aïllar el pic dels trimers de TSP, degut a la presència de proteïna agregada. De la mateixa manera que en els cossos de VP1LAC, la fluorescència del triptòfan augmenta un nanòmetre en les mostres pressuritzades.

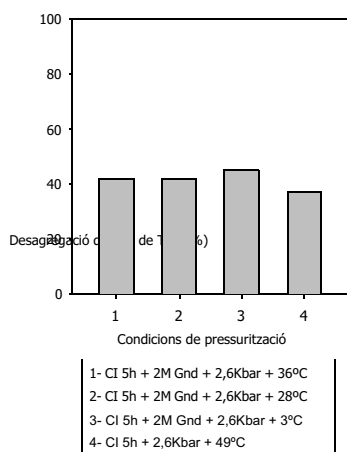


Figura 2. Desagregació dels cossos d'inclusió de TSP de 5 hores sotmesos a una pressió hidrostàtica de 2,6 Kbar a diferents temperatures i en presència o no de GnHCl (veure llegenda).

3. Dissociació dels cossos d'inclusió per SDS

Per a comparar la dissociació dels cossos d'inclusió per detergents i per pressió hidrostàtica, els agregats de VP1LAC i TSP es van incubar amb concentracions creixents de SDS i es va observar una dissociació ràpida i quasi total (del 85%) de les partícules. Això ens indica que aquests agregats estan formats per unions hidrofòbiques i de ponts hidrogen, que al ser atacades per el SDS es desintegren immediatament. De totes formes, queda una fracció de proteïna agregada incapaç d'ésser solubilitzada per SDS, que mostra la presència d'una espècie de polipèptids agregats molt més resistents, que

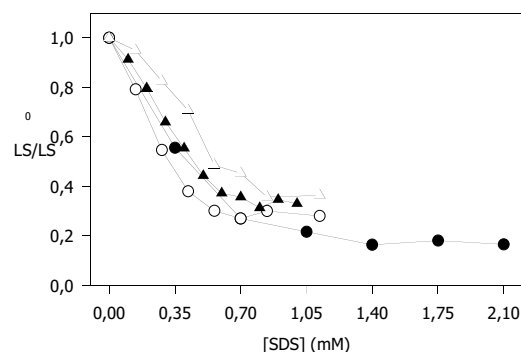


Figura 3. Dissociació dels cossos d'inclusió de VP1LAC (triangles) i TSP (cercles) de 1 hora (blancs) i 5 hores (negres) amb concentracions creixents de SDS. La desagregació dels cossos es mesura amb els valors de l'espallament de llum de les mostres, normalitzats amb el valor inicial, sense SDS.

probablement s'uneixin covalenment.

DISCUSSIÓ

L'ús de la pressió hidrostàtica per a diferents processos biotecnològics és força extens, en l'àmbit de la tecnologia alimentària, per a la pasteurització (Heremans, 1997), per a la inactivació de virus, i pel desenvolupament de vacunes (Jurkiewuckz *i col.*, 1995; Silva *i col.*, 1996). El coneixement de la desagregació de proteïnes a través de pressió hirostàtica pot obrir noves àrees de recerca i d'aplicació interessants utilitzant aquesta tècnica.

L'agregació de proteïnes pot esdevenir per diferents mecanismes. Un d'ells és a través de la formació de ponts disofre intermoleculares (Stoyan *i col.*, 1993), creant agregats que requereixen l'addició d'oxidants i tampons redox per ésser replegats (Builder *i col.*, 1997; De Bernandez-Clarck i Georgiou, 1991; Rudolph i Lilie, 1996). En molts casos predominen altres mecanismes en els que intervenen unions no

RESULTATS

TREBALL 11

covalents, com són els agregats responsables de les enfermetats priòniques, l'Alzheimer, o el Parkinson i per altra banda, la formació de cossos d'inclusió. Les interaccions no covalents són susceptibles a la pressió hidrostàtica i per això es pot usar aquesta eina per a desfer aquest tipus d'agregació proteica.

En aquest treball es mostra que els cossos d'inclusió de dues proteïnes diferents, VP1LAC i TSP poden ésser desagregats per pressió hidrostàtica, fins a un 40%. De totes maneres, encara s'ha d'optimitzar el procés per tal de conèixer les condicions idònies pel replegament i l'estabilitat de la proteïna desagregada.

El fet que els diferents cossos d'inclusió pressuritzats tinguin una mateixa fracció de proteïna susceptible a la pressió hidrostàtica, suggereix que tenen una organització molecular semblant. En estudis anteriors, ja havíem proposat que els cossos d'inclusió estan formats per espècies polipeptídiques diferents, que responen diferent a l'atac proteolític (treball 5) i també a la pressió hidrostàtica. El 60% de proteïna agregada que no és afectada per la pressió hidrostàtica, deu correspondre a una fracció més hidratada, que augmenta quan les partícules són incubades amb urea, que fa augmentar la hidratació.

La dràstica desintegració dels agregats amb SDS, demostra que la major part de les interaccions que uneixen els polipèptids agregats en els cossos d'inclusió són ponts d'hidrogen o interaccions hidrofòbiques. De totes formes, també s'observa una espècie polipeptídica menor (15%), que està agregada per unions més fortes, resistents al

SDS.

La solubilització dels cossos d'inclusió mitjançant la pressió hidrostàtica evitaria els passos de desnaturalització i replegament, simplificant el procés de recuperació de proteïna nativa i eliminant l'ús d'agents desnaturalitzants i caotròpics, que a gran escala creen residus tòxics. Per això seria interessant conèixer millor les possibilitats de la pressió hidrostàtica per a la recuperació de proteïna replegada dels cossos d'inclusió. Els resultats obtinguts ens mostren que la pressió hidrostàtica provoca efectes específics sobre l'estructura i funcionalitat de diferents proteïnes i per tant, l'ús d'aquest mètode per a la solubilització dels agregats, requeriria estudiar la potencialitat de la proteïna agregada d'ésser replegada en la seva forma nativa, sota pressió hidrostàtica.

Els cossos d'inclusió es formen durant la sobreproducció d'algunes proteïnes recombinants, quan aquestes no aconsegueixen adquirir la seva estructura nativa i s'acumulen formant partícules intracel·lulars de proteïna agregada. Com que l'aparició de cossos d'inclusió durant els processos de producció de proteïnes recombinants sempre ha suposat un entrebanc, s'han buscat maneres d'evitar-ne la seva formació o de recuperar-ne proteïna replegada, però no s'havia estudiat a fons la seva biologia. Així doncs, es coneixia poc el procés de formació dels cossos d'inclusió, les formes polipeptídiques que agreguen i la manera en què s'associen i construeixen els agregats. Seria interessant esbrinar en quin estat conformacional es troba la proteïna agregada, si es tracta de material irrecuperable, com s'ha proposat en varis treballs (Marston, 1986) o si presenta una estructura quasi-nativa com s'ha observat en d'altres (Oberg *i col.*, 1994) i quines raons o explicacions fisiològiques porten a la seva formació. Per això hem de tenir en compte el medi on es produeixen els agregats, que és la cèl·lula hoste, i els factors que hi poden estar implicats, com els components del sistema de control de qualitat de plegament proteic i de resposta a l'estrès, les xaperones i les proteases.

En aquest treball hem examinat la formació dels cossos d'inclusió de les proteïnes VP1LAC, LACVP1 i TSPA, el seu creixement en el citoplasma d'*Escherichia coli*, la seva vinculació amb el sistema de control de qualitat cel·lular i l'estructura macromolecular dels agregats.

1. FORMACIÓ I CREIXEMENT DELS COSSOS D'INCLUSIÓ EN EL CITOPLASMA D'*Escherichia coli*

1.1. Morfologia, mida i distribució dels cossos d'inclusió

El creixement dels cossos d'inclusió de VP1LAC i LACVP1 es pot seguir mitjançant microscòpia òptica de contrast de fases, on s'observa l'augment de volum dels granuls citoplasmàtics, refringents durant la fase exponencial del cultiu en la que la cèl·lula està sintetitzant grans quantitats de proteïna recombinant (figura 1, treball 1). Els cossos d'inclusió de VP1LAC i LACVP1, comencen a ser visibles a partir de les 2 hores de producció de la proteïna recombinant i s'observa un augment de tamany fins que la cèl·lula entra en un estat biosintètic menys actiu, en el que s'atura el creixement dels agregats i en alguns casos inclús pateix petites davallades (taula 1, treball 2).

Els cossos d'inclusió de VP1LAC i LACVP1 presenten una morfologia ovoide (figura 5, treball 1 i taula 1, treball 2) i volums diferents, essent els cossos de VP1LAC més grans que els de LACVP1. A les 2 hores de producció de la proteïna recombinant, els cossos d'inclusió de VP1LAC tenen una grandària de $0,15 \mu\text{m}^3$ i creixen fins a $1,8 \mu\text{m}^3$, durant 24 hores (figura 6, treball 1), mentre que els cossos de LACVP1, creixen durant el mateix període de temps des d'un volum de $0,007 \mu\text{m}^3$ fins a $0,14 \mu\text{m}^3$ (taula 1, treball 2). L'anàlisi d'altres cossos d'inclusió, conjuntament amb aquestes dades, mostra que hi ha una variabilitat en la morfologia i mida dels

cossos d'inclusió, s'han observat cossos cilíndrics, ovoides, esfèrics i amorfes (Bowden *i col.*, 1991; Taylor *i col.* 1986) amb una ampla variabilitat de mides que van des de $0,007\mu\text{m}^3$ fins a presentar un volum equivalent al de la cèl·lula ($2\mu\text{m}^3$). Les diferències morfològiques dels diferents tipus de cossos d'inclusió citoplasmàtics depenen de la proteïna recombinant que els forma. La topologia superficial dels cossos d'inclusió també pot variar, pot ser rugosa o llisa (Bowden *i col.* 1991). Les imatges de microscòpia electrònica dels cossos d'inclusió de VP1LAC i LACVP1 (figura 4, article 4) i el seu comportament davant de pressió hidrostàtica (treball 11) semblen ésser compatibles amb una estructura porosa, com s'havia trobat amb els agregats de prochymiosin i γ -interferó (Taylor *i col.* 1986).

S'observa una bona correlació entre la quantitat de proteïna recombinant agregada i el volum dels cossos durant la fase d'acumulació (figura 5, treball 1), la qual cosa ens indica que els agregats no pateixen canvis de densitat importants en aquesta etapa. Durant la primera hora de producció de la proteïna VP1LAC s'observa, per microscòpia òptica, la presència de moltes cèl·lules amb 2 agregats petits, representant quasi un 70 % del total de les cèl·lules del cultiu. Aquests agregats no creixen independentment, ja que a partir de les 2 hores, quan els cossos d'inclusió ja comencen a ser partícules refringents ben definides, la proporció de cèl·lules que en tenen dos decau fins a un 20 %, i es manté permanent durant el seu creixement (figura 7, treball 1). Aquesta observació suggereix que

l'agregació proteica pot començar en varis punts del citoplasma cel·lular i que la unió d'aquests agregats petits per formar un o dos grans agregats exclou la formació d'un altre, dirigint els nous polipèptids agregats cap a aquests. Aquesta hipòtesi seria compatible amb la cinètica de primer ordre que s'ha descrit per l'agregació proteica en cossos d'inclusió (Hoffmann *i col.*, 2001) i indica que petits preagregats s'uneixen en una única partícula que representa un nucli d'agregació, a partir del qual creix el cos d'inclusió.

1.2. Anàlisi de la composició dels cossos d'inclusió durant el seu creixement

El component principal dels cossos d'inclusió és la proteïna recombinant (Rinas i Bailey, 1992; Rinas *i col.*, 1993; Valax i Georgiou, 1993), però hi ha altres proteïnes cel·lulars que també s'hi troben associades, en concentracions molt variables, en els diferents cossos d'inclusió. La quantitat de proteïnes coagregades, diferents de la recombinant, depèn de la proteïna produïda, però també de l'estratègia d'expressió dels gens recombinants i de les condicions de producció. S'han observat diferències significatives entre cossos d'inclusió de β -lactamasa, formats en el citoplasma o en el periplasma, essent els cossos citoplasmàtics molt més homogenis (95 % de proteïna recombinant) comparats amb els periplasmàtics (sols un 35 %) (Valax i Georgiou, 1993). Entre els components minoritaris dels cossos d'inclusió, s'inclouen les proteïnes contaminants procedents del procés de purificació (Georgiou i Valax, 1999), de la coagregació inespecífica d'altres polipèptids cel·lulars (Rinas *i col.*, 1993) i xaperones, que

probablement queden atrapades en el procés d'agregació. Entre aquestes destaquen les proteïnes IbpA i IbpB, que són abundants en els cossos (Allen *i col.*, 1992).

L'anàlisi cinètic de la composició proteica durant el procés de formació i creixement dels cossos d'inclusió de VP1LAC i LACVP1 mostra que en les primeres fases de la seva formació hi ha una gran heterogeneïtat proteica, indicant que els primers agregats que apareixen s'associen més fàcilment a altres proteïnes (figura 4, treball 1). A partir de les 2 hores d'edat, quan els cossos ja són ben identificats com a partícules refringents, s'observa que la proteïna recombinant és el principal component dels cossos d'inclusió. En els de VP1LAC, la proteïna recombinant intacta representa entre el 80 i el 100 % del seu contingut, i es manté estable durant l'acumulació de proteïna. En canvi, en els cossos de LACVP1 en representa menys del 30 %, augmentant fins a un 70-80 % considerant també el seu fragment de degradació estable "β-galactosidasa-like". Així doncs, presenten una composició molt més heterogènia, amb un 20-30 % de proteïnes coagregades diferents a la proteïna recombinant intacta (taula 1, treball 2). Això mostra que hi ha una gran variabilitat en la composició proteica de cossos d'inclusió de diferent naturalesa proteica, que depèn, en part, de l'estabilitat de la proteïna recombinant. Probablement, proteïnes més inestables proteolíticament arrossegueu més fàcilment polipèptids que coagreguen.

Les proteïnes que coagreguen en els primers estadis de formació dels cossos d'inclusió no han estat identificades. Tanmateix, les xaperones DnaK, GroEL i Ibps

s'han detectat formant part de les proteïnes minoritàries dels cossos d'inclusió més tardans, en els que la proteïna recombinant és el component principal de les partícules (Figures. 3 i 4, treball 8). El fet que es formin cossos d'inclusió de composició proteica tan heterogènia com els de LACVP1 implica que les interaccions intermoleculares que intervenen són, principalment, inespecífiques, i no específiques com s'havia proposat anteriorment (Speed *i col.*, 1996).

La proteïna recombinant s'incorpora en els cossos de VP1LAC i LACVP1 a taxes quasi constants durant la seva producció (figura 4, treball 1 i figura 2C, treball 2). Quan la taxa de síntesi de la proteïna recombinant disminueix, s'observen pèrdues de proteïna dels agregats. En els cossos de LACVP1 també s'observa que la proteïna recombinant agregada pateix un atac proteolític donant lloc als seus fragments de degradació VP1 i "β-galactosidasa like" (figura 2, treball 2), la qual cosa ens mostra que la proteïna dels agregats no és inerte, com s'havia proposat anteriorment (Marston, 1986, Hellebust *i col.*, 1989).

1.3. Els cossos d'inclusió són estructures dinàmiques

El fet de trobar que els cossos d'inclusió pateixen períodes de pèrdua de proteïna agregada, simultanis a petites reduccions del seu volum (taula 1, treball 2) ens suggereix que no són partícules inertes, sinó que es tracta d'estructures actives i flexibles. Les davallades de proteïna agregada s'observen quan els cultius entren en fase estacionària i per tant poden estar associades a l'aturada de la incorporació de polipèptids en els cossos d'inclusió. Això ens va portar a

investigar amb més profunditat l'evolució dels cossos d'inclusió en el citoplasma d'*E.coli* en absència de síntesi proteica.

Aquest estudi es va portar a terme amb cossos d'inclusió de diferents proteïnes, VP1LAC i de TSPA, produïdes per sistemes d'expressió diferents, descrits prèviament (veure antecedents del treball de recerca). Quan els cossos d'inclusió estan formats i s'atura la producció de proteïna recombinant, amb l'addició de cloramfenicol, s'observa una progressiva reducció en el seu nombre i volum (figures 1 i 3, treball 3). El contingut proteic dels cossos d'inclusió disminueix molt, i en concordança apareix proteïna soluble i amb activitat biològica. Aquest fet suggereix que la construcció dels cossos d'inclusió és un procés dinàmic, en el que hi intervenen simultàniament la incorporació i l'alliberació de proteïna. Per tant, la formació dels cossos d'inclusió és el resultat d'un equilibri dinàmic entre la precipitació i la solubilització, que està desplaçat cap a l'agregació quan les cèl·lules sobreproduïxen proteïna recombinant, però que es pot invertir quan s'atura la seva producció (figura 1). De totes formes, la proteïna soluble apareguda representa una petita fracció de la proteïna desapareguda dels cossos d'inclusió, la qual cosa suggereix que la porció més important de proteïna desagregada és degradada. Per tant, la proteòlisi també juga un paper primordial en el tractament de la proteïna agregada durant la desintegració dels cossos d'inclusió (figura 1). Aquests resultats ens porten a pensar que els cossos d'inclusió no són, únicament, el resultat de l'acumulació de proteïna que ha escapat del sistema de qualitat cel·lular, sinó que són reservoris de proteïna agregada amb

potencial per a ésser processada per la cèl·lula.

Les condicions d'estrès generades per la sobreproducció de proteïna recombinant indueixen l'expressió dels gens de xoc tèrmic (Goff i Goldberg, 1985). Tot i que s'han identificat moltes de les proteïnes que intervenen en la resposta al xoc tèrmic, encara es tenen escassos coneixements sobre els seus mecanismes d'acció. Fins ara, es creia que la resposta a l'estrès incloïa, principalment, sistemes per evitar el mal plegament i l'agregació proteica, ajudant els polipèptids recent sintetitzat a plegar-se correctament i induint la proteòlisi de les formes aberrants (Gross, 1996; Bukau i Horwich, 1998; Netzer i Hartl, 1998; Ellis i Hartl, 1999; Diamant *i col.*, 2000). Els resultats que hem obtingut sobre la biologia dels cossos d'inclusió ens suggereixen que l'agregació proteica podria representar un mecanisme integrat en la resposta cel·lular.

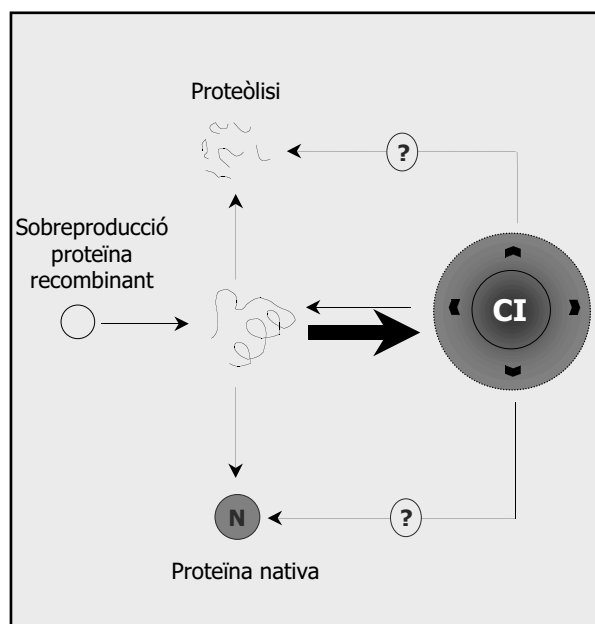


Fig. 1. Equilibri dinàmic entre l'agregació, la solubilització i la proteòlisi, desplaçat cap a l'agregació, durant la sobreproducció de proteïna recombinant. Els factors implicats en la solubilització i la proteòlisi dels agregats encara es desconeixen.

1.4. Desintegració dels cossos d'inclusió en el citoplasma cel·lular

Com s'ha esmentat prèviament, els cossos d'inclusió formats durant la sobreproducció de proteïna recombinant són desintegrats quan s'atura la producció proteica. Aquest fenomen s'ha observat en cossos d'inclusió produïts en diferents soques, BL21 i MC4100, i formats per diferents proteïnes, VP1LAC, LACVP1 TSPA. (figura 1, treball 4).

En la soca BL21, al cap de 4 hores de l'aturada de la síntesi proteica ja s'ha perdut un 76 % de la proteïna dels cossos de VP1LAC, un 79 % dels de LACVP1 i un 61 % dels de TSP (figura 1, treball 4). Al cap de 24 hores, els cossos de TSP semblen haver-se desintegrat totalment, però no els de VP1LAC i LACVP1, dels quals una fracció molt petita de proteïna roman agregada (un 1 % en els de VP1LAC i un 25 % en els de LACVP1) (figura 1, treball 4). Aquesta fracció recalcitrant, que també s'observa quan els cossos han estat produïts en la soca MC4100, deu estar composta pels polipèptids que han interaccionat més fortament i que els mecanismes cel·lulars han estat incapaços de disgregar. Per altra banda, els anàlisis de susceptibilitat proteolítica dels polipèptids dels cossos d'inclusió de VP1LAC i LACVP1 duts a terme *in vitro* mostren l'existència d'un tipus de proteïna més resistent a proteòlisi (taula 1, treball 5), que podria representar aquesta fracció de proteïna que la cèl·lula no pot processar. També s'observa que els agents caotròpics, com urea (figura 4, treball 7), o

detergents, com SDS (figura 3, treball 11), no aconsegueixen una desnaturalització total dels cossos d'inclusió de VP1LAC i LACVP1, la qual cosa demostra que hi ha una fracció agregada més resistent a la solubilització. Això podria ser degut a que s'han creat unions covalents entre alguns polipèptids agregats, com per exemple ponts disofre. La possibilitat de que es creïn o no aquestes interaccions més fortes deu dependre de la naturalesa de la proteïna agregada, probablement les proteïnes VP1LAC i LACVP1 tinguin més tendència a formar aquest tipus d'interaccions, que la TSP. De totes maneres, les interaccions que predominantment formen els cossos d'inclusió són hidrofòbiques i ponts d'hidrogen, que són fàcilment dissoltes.

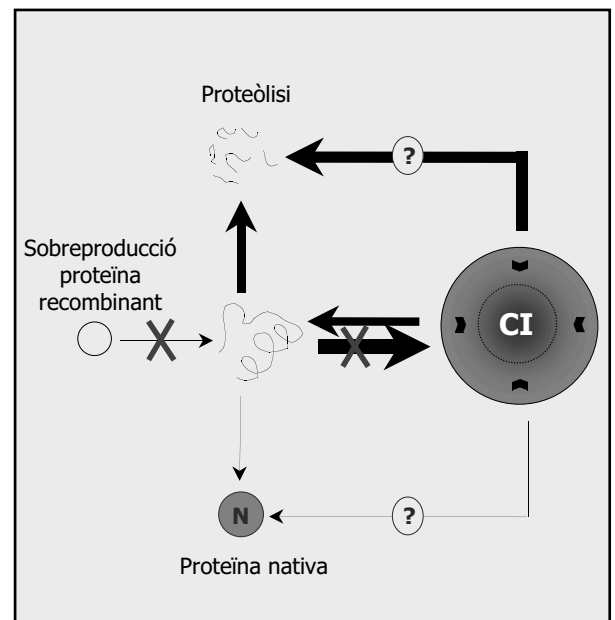


Figura 2. Desintegració dels cossos d'inclusió. Quan s'atura la incorporació de proteïna recombinant, la proteïna agregada desapareix, una fracció és proteòlitada i una altra replegada. Els factors implicats en la dissociació dels cossos d'inclusió i en la degradació i el replegament de la proteïna agregada es desconeixen.

1.5. La formació de cossos d'inclusió podria representar un mecanisme per a reduir la toxicitat provocada pels polipèptids mal plegats

La sobreproducció d'una proteïna recombinant suposa un gast energètic molt elevat per la cèl·lula i per això els sistemes de plegament i de proteòlisi no poden abordar tota la proteïna produïda i es saturen ràpidament (Rinas, 1996). En aquestes condicions, els polipèptids que no poden ser ni plegats ni proteolitzats, poden presentar toxicitat en el citoplasma cel·lular ja que presenten regions hidrofòbiques exposades que atrauen altres polipèptids cap a l'agregació. Així doncs podria ser millor acumular-los en un únic agregat de proteïna recombinant, perquè interferís el mínim en les altres funcions cel·lulars, com passa en alguns casos d'agregats eucariotes (Kopito, 2000; Muchowski *i col.*, 2002). Per tant, l'aglutinació de la proteïna agregada en un únic nucli d'acumulació podria reduir la toxicitat que ocasionen els polipèptids mal plegats i agregats, dispersos al citoplasma. Per altra banda, el fet que els cossos d'inclusió es desintegren tan eficientment un cop s'atura la incorporació de proteïna agregada, indica que hi ha un mecanisme cel·lular dirigit a eliminar els agregats citoplasmàtics. Aquestes observacions ens suggereixen que l'acumulació de la proteïna recombinant en els cossos d'inclusió podria representar un magatzem de proteïna possiblement tòxica per la cèl·lula, que agrega per ésser eliminada posteriorment pels mecanismes cel·lulars i, en

menor mesura, replegada.

2. ESTRUCTURA I ORGANITZACIÓ INTERNA DELS COSSOS D'INCLUSIÓ

L'organització interna dels cossos d'inclusió ha estat molt escassament estudiada. Els pocs treballs realitzats han determinat el tipus d'estructura secundària que presenten els polipèptids que formen els cossos d'inclusió, però no la naturalesa de les interaccions que els uneixen ni la seva ordenació dins els agregats. Entre aquests, s'han trobat cossos d'inclusió formats per proteïna amb una estructura secundària molt propera a la nativa, els de IL- β i cel·lulasa (Oberg *i col.*, 1994) i d'altres en els que augmenta considerablement el contingut en fulles beta, com els de β -lactamasa (Pryzbyecien *i col.*, 1994).

Analitzant la susceptibilitat de la proteïna recombinant agregada en els cossos d'inclusió de VP1LAC i LACVP1 a la proteòlisi *in vitro* per tripsina, i fent un modelatge de la seva digestió proteolítica, vam obtenir informació sobre l'organització interna d'aquestes partícules.

2.1. Els cossos d'inclusió de VP1LAC i LACVP1 són proteolitzats ràpidament amb tripsina

Malgrat que anys enrera es creia que els cossos d'inclusió eren resistents a proteases (Hellebust, 1989), hi havia dades que mostraven que agregats proteics laxos (Corchero *i col.*, 1997) i cossos d'inclusió (Weickert *i col.*, 1996) presentaven una vida

mitja més curta que la proteïna soluble. En aquest treball hem determinat que cossos d'inclusió de VP1LAC i LACVP1 es digereixen completament amb la tripsina en pocs minuts (figura 2, treball 5). Tant en els cossos de LACVP1 com en els de VP1LAC, la resistència a proteases augmenta durant el procés de creixement. En els cossos de VP1LAC la vida mitja augmenta de 1,35 a 14 minuts, des de la primera hora de la seva formació fins a les 24 hores i en els de LACVP1 passa de 0,35 a 21 minuts, en el mateix interval de temps. Aquests canvis indiquen que es produeixen transicions estructurals durant l'acumulació de proteïna que afecten a la susceptibilitat proteolítica global dels agregats.

2.2. La proteïna dels cossos d'inclusió presenta una gran heterogeneïtat conformacional

Els resultats obtinguts amb el modelatge del procés de digestió dels cossos d'inclusió de VP1LAC i LACVP1 mostren que aquests presenten una estructura heterogènia. Si els cossos d'inclusió fossin agregats compactes de difícil accessibilitat per les proteases, es degradarien per una erosió superficial degut a una menor accessibilitat interna, i augmentaria la taxa de degradació durant el procés de digestió degut al progressiu increment de la relació superfície/volum (figura 3B). Si els agregats fossin més laxos i tota la proteïna agregada fos igualment accessible a la tripsina, la taxa de degradació no variaria (figura 3A). Però s'observa una taxa de degradació decreixent, que en condicions no limitants de tripsina només es pot explicar considerant que els cossos d'inclusió estan

compostos per diferents espècies polipeptídiques coexistents, amb diferent susceptibilitat a la tripsina (figura 3C; figura 3,

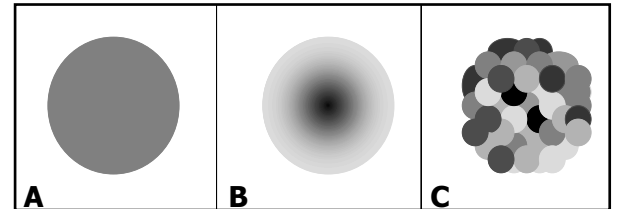


Figura 3. L'anàlisi cinètic de la digestió dels cossos d'inclusió *in vitro* indica que tenen una resistència proteolítica heterogènia (representada amb la intensitat de grisos). Es mostren altres possibilitats, com una sensibilitat homogènia (A) o una sensibilitat restringida a la superfície, com es podria esperar (B), que no són compatibles amb les dades experimentals. Per tant, els cossos d'inclusió deuen estar formats per varis nuclis de proteïna amb diferent sensibilitat a proteases (C).

treball 5). Com que la sensibilitat a proteases depèn de la conformació proteica, les diferents espècies proteiques deuen correspondre a diferents estats conformacionals de la proteïna recombinant.

El patró de digestió dels cossos d'inclusió estudiats, es pot explicar per un model d'agregat compost per 3 espècies polipeptídiques diferents; una molt sensible a la tripsina, que és degradada en qüestió de pocs minuts (entre 1 i 6,5), una altra una mica més resistent (entre 4 i 19 minuts) i una altra amb una vida mitja molt més llarga (entre 26 i 103 minuts). Al llarg del creixement no varien gaire les proporcions de les diferents espècies polipeptídiques, però la seva resistència a proteases augmenta en quasi tots els casos (taula 1, treball 5), i per això la vida mitja dels cossos d'inclusió augmenta.

El seguiment per microscòpia electrònica de la digestió per tripsina dels cossos d'inclusió de VP1LAC i LACVP1 mostra l'aparició de subpartícules amb una distribució aleatòria, que van desapareixent

progressivament després de períodes d'incubació més llargs (figura 4, treball 5). Aquestes observacions són coherents amb una composició proteica heterogènia, ja que revelen que una fracció de proteïna és ràpidament proteolitzada, deixant petits granuls proteics més resistents que tenen una vida mitja més llarga. Les subpartícules que

degradació seqüencial, en el que la proteïna passa per 3 (per LACVP1) o 4 (per VP1LAC) fragments de digestió estables, abans de la completa degradació (figura 3, treball 6). Els fragments de degradació que es generen durant aquest procés són més estables que els que apareixen durant la proteòlisi de la proteïna soluble, i es mantenen en la fracció agregada

(figura 1, treball 6), la qual cosa ens permet observar el seguiment del procés de tall seqüencial. El fet de no trobar proteïna soluble detectable (figura 2, treball 6) ens suggereix que la proteòlisi es dona sobre la proteïna agregada. La cascada proteolítica requereix una sèrie de

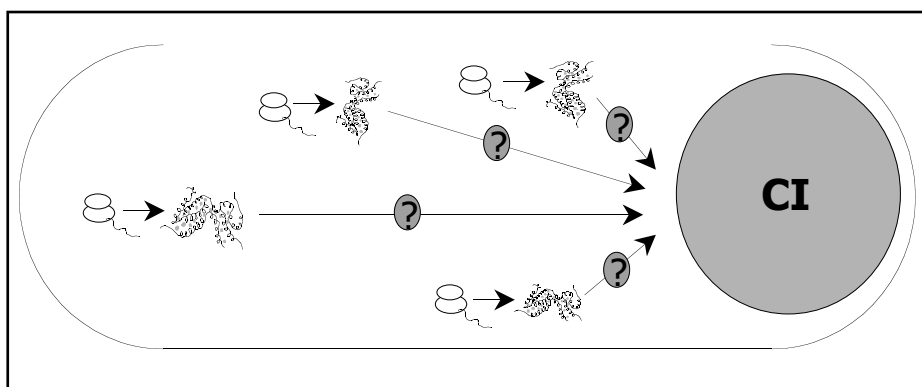


Figura 4. Model de la formació dels cossos d'inclusió per l'aglutinació de preagregats. Es desconeix si hi ha algun factor involucrat en la unió dels petits agregats.

apareixen semblen tenir una organització interna independent de les altres, que podrien correspondre amb els preagregats que interaccionen per a formar un gran cos d'inclusió.

2.3. La proteïna dels cossos d'inclusió és proteolitzada *in vitro* a través d'un procés en cascada

L'anàlisi detallat del procés de digestió *in vitro* de la proteïna inclosa en els agregats de VP1LAC i LACVP1 mostra una elevada sensibilitat a la tripsina i un procés de digestió similar al de la proteïna soluble, la qual cosa ens indica que les dianes de proteases dels polipèptids agregats estan exposades i conservades conformacionalment. La proteïna dels cossos d'inclusió segueix un procés de

modificacions conformacionals que es produeixen a través dels talls restringits de la proteïna i activen els llocs d'escissió de la proteasa, determinant la susceptibilitat dels nous fragments de degradació a ser proteolitzats. El fet que aquests episodis conformacionals es donin sobre la proteïna agregada en els cossos d'inclusió resulta interessant, ja que indiquen la presència de proteïna estructurada i susceptible a canvis conformacionals (en els seu patró de plegament) (Hubbard *i col.*, 1994; Tokatlidis *i col.*, 1991).

2.4. Dinamisme conformacional dels polipèptids que formen els cossos d'inclusió

L'anàlisi estructural dels polipèptids que formen els cossos d'inclusió mostren que es troben en estat de molten globule. L'estructura secundària detectada en els cossos d'inclusió, per dicroïsm circular, incrementa al llarg del seu creixement (figura 2, treball 7), aquesta podria correspondre a la proteïna que està en un estat transitori entre l'agregació i la solubilització. Aquests resultats semblen indicar que durant el creixement dels cossos, hi ha una tendència cap a incrementar o estabilitzar la forma plegada d'aquesta proteïna, això podria estar relacionat amb la solubilització dels agregats, que augmenta quan els cultius envelleixen i disminueix la incorporació de proteïna agregada als cossos d'inclusió (figures 2 i 3 i taula 1, treball 2). Tanmateix, els espectres de triptòfan, de DC i la unió a l'ANS (figures 2, 3 i 5, treball 7) dels cossos d'inclusió més vells, de 24 hores, indiquen que són agregats més compactes, probablement resultants d'un procés dinàmic d'agregació i solubilització, en el que resta la proteïna agregada que no ha pogut ésser solubilitzada.

3. BIOLOGIA DELS COSSOS D'INCLUSIÓ EN LA RESPOSTA D'ESTRÈS CEL·LULAR

La producció massiva d'una proteïna heteròloga en el citoplasma d'*Escherichia coli* causa una situació d'estrès cel·lular, que desencadena l'activació dels mecanismes de defensa cel·lulars (Rinas, 1996; Dong *i col.*, 1995; Kanemori *i col.*, 1994; Parsell i Sauer, 1989; Hoffman i Rinas, 2000). Els mecanismes de resposta a l'estrès conformacional els porten a terme una xarxa de proteïnes, xaperones i proteases, encarregades d'assistir el plegament proteic, evitar l'agregació i eliminar

les proteïnes mal plegades per proteòlisi (Ellis i Hartl, 1999; Hartl, 2002). Una de les conseqüències més problemàtiques dels processos de sobreproducció de proteïna és la formació dels cossos d'inclusió. Fins fa poc, els cossos eren considerats com agregats aberrants de polipèptids mal plegats, que havien escapat de la proteòlisi i el sistema de xaperones no havia pogut assistir degut a la seva saturació (Marston, 1986; Rudolph i Lillie, 1996; Thomas i Baneyx, 1996). De totes formes, l'estudi més detallat de la biologia dels cossos d'inclusió que hem portat a terme els últims anys, ens suggereix que la formació dels cossos d'inclusió és un procés inclòs dins dels mecanismes de resposta a l'estrès. Xaperones, foldases, proteases i diferents proteïnes de xoc tèrmic, es fan càrrec d'aquesta resposta cel·lular i juguen un paper important tant en la seva formació, com en el replegament de la proteïna dels cossos.

Per a estudiar la influència de diferents proteïnes de xoc tèrmic en la biologia dels cossos d'inclusió, s'han utilitzat soques deficientes en les xaperones DnaK, GroEL, GroES, Ibp, ClpA, ClpB, DnaKClpB (Thomas i Baneyx, 1998; Mogk, 1999) per a la producció de cossos d'inclusió i la seva solubilització. En totes les soques mutants estudiades s'observa la presència de cossos d'inclusió (figura 1, treball 9), la qual cosa indica que cap d'elles és imprescindible per a la seva formació. De totes formes, sembla que quasi totes intervenen en el procés, essent la DnaK i la GroEL les que tenen un paper més rellevant.

3.1. La DnaK és la xaperona més important en prevenir la formació de cossos d'inclusió

Els cossos d'inclusió són més grans en les soques deficientes en DnaK que en la soca salvatge (figures 4 i 5, treball 9), el que indica que aquesta xaperona té una funció important en la prevenció de l'agregació i formació dels cossos d'inclusió. La proteïna DnaK podria facilitar el plegament de les proteïnes novament sintetitzades (Hartl i Hayer-Hartl, 2002), intervenir en la desagregació o desintegració dels cossos d'inclusió formats (Goloubinoff *i col.*, 1999; Ben-Zvi i Goloubinoff, 2001; Zolkiewski, 1999), o en la proteòlisi dels polipèptids mal plegats.

Tot i que en aquest mutant la desintegració dels agregats en absència de síntesi proteica, disminueix un 30 % respecte la soca salvatge (taula 2, treball 9), el major volum dels cossos d'inclusió no depèn d'aquest procés, ja que s'observen valors comparables en la soca deficient en GroEL, mentre que en aquest cas, els cossos d'inclusió són significativament més petits (figura 4, treball 9).

Els nivells de DnaK regulen la producció d'algunes proteases a través del factor σ^{32} i està involucrada en el processament proteolític general d'*E. coli* (Yura, 1999; Bukau, 1993). En els resultats d'aquest treball, el fet de no detectar el fragment de degradació estable (β -galactosidasa like) de la proteïna recombinant VP1LAC en cap de les dues soques DnaK⁻ provades (DnaK⁻ i DnaK⁻ClpB⁻), suggereix que hi ha una menor activitat proteolítica (Figura 2, treball 9). Així doncs, si la seva absència provoca una menor proteòlisi, l'augment de l'agregació podria estar associada, en part, a la reducció de la proteòlisi dels polipèptids mal plegats, que conseqüentment són conduïts cap a l'agregació. Per altra banda, un menor

processat proteolític dels cossos d'inclusió podria contribuir també al major tamany dels cossos en aquesta soca. Així doncs, sembla que la prevenció de l'agregació per part de la xaperona DnaK es basa en assistir el plegament de les cadenes d'aminoàcids naixents i promoure la degradació dels polipèptids mal plegats.

3.2. El sistema DnaK/ClpB sembla que no exerceix la seva funció desagregadora amb els cossos d'inclusió

El complex DnaK/ClpB funciona cooperativament per a desfer agregats citoplasmàtics produïts per estrès tèrmic (Goloubinoff *i col.*, 1999; Ben-Zvi i Goloubinoff, 2001; Enfors, 1992; Zolkiewski, 1999). No obstant la desagregació dels cossos d'inclusió en el mutant deficient en ClpB/DnaK no varia significativament respecte els altres mutants (taula 2, treball 9). Així doncs, sembla que l'activitat desagregadora del complex bi-xaperona no és crítica pel processament dels cossos d'inclusió. Possiblement, els cossos d'inclusió són massa grans per a ser desagregats per aquest sistema, ja que la seva efectivitat és depenent de la mida dels agregats (Diamant *i col.*, 2000). Tanmateix, també seria raonable que els mecanismes encarregats de processar els cossos d'inclusió fossin diferents dels que actuen sobre els agregats de proteïnes citosòliques.

Sorprenentment, els cossos d'inclusió que es formen en la soca DnaK⁻ClpB⁻ són més petits que els que es formen en les soques salvatge, DnaK⁻ i ClpB⁻. Aquest resultat no s'esperaria si les dues xaperones exercissin la funció de desagregar proteïnes dels cossos d'inclusió i no és compatible amb el procés

cooperatiu i seqüencial descrit pel sistema ClpB/DnaK per altres tipus d'agregats (veure apartat 1.4.4. de la introducció) (Ben-Zvi i Goloubinoff, 2001), ja que si fos així l'absència de les dues xaperones individualment tindria un efecte similar. Així doncs, sembla que aquest sistema no està involucrat en el tractament dels cossos d'inclusió.

3.3. La xaperonina GroEL afavoreix la formació de cossos d'inclusió

Els agregats que es formen en les soques deficientes en GroEL presenten un aspecte diferencial de la resta, ja que són petits i n'hi ha varis per cèl·lula (5,1 de mitja)(figura 5, treball 9). Sorprenentment, hi ha més proteïna recombinant soluble, així que la manca de la xaperonina afavoreix la producció de proteïna nativa i redueix l'agregació (figura 3, treball 9). Per altra banda, la desagregació dels cossos d'inclusió disminueix un 30 % en absència de la xaperonina GroEL (taula 2, treball 9), la qual cosa suggereix que aquesta també està implicada en el processament dels agregats. La xaperonina podria actuar d'intermediària en els processos d'incorporació i d'alliberament de proteïna en els cossos d'inclusió.

L'aparició de cossos d'inclusió més petits en la soca GroEL- que en la salvatge s'ha observat en proteïnes de masses moleculars tan diferents com la β -galactosidasa d'*E.coli*, de 114 kDa per monòmer, i la proteïna VP1 de la càpside del virus de la febre aftosa, de 23 kDa. El fet que l'absència de GroEL limiti la formació de cossos d'inclusió de les dues proteïnes indica que la seva intervenció és independent del tamany de la proteïna, i per

tant de la internalització a la cavitat interna de GroEL.

Recentment, s'ha vist que la xaperonina GroEL pot actuar com a inductor de l'agregació de la proteïna priònica Prp^C *in vitro*, provocant la formació d'agregats d'estructura fulla beta, resistents a proteòlisi (Stöckel, 2001). Es creu que aquesta nova activitat "anti-xaperona" de la GroEL és específica de la Prp i s'associa a l'estructura anòmala de la proteïna Prp, que presenta una cua amino terminal desestructurada, que és reconeguda per la xaperonina amb elevada afinitat. El mecanisme descrit a través del qual la xaperonina GroEL induïx l'agregació de Prp, implica que la proteïna s'internalitzi dins la cavitat de la GroEL, on es produeix un canvi d'estructura cap a fulla beta, creant els precursors dels agregats (Stöckel, 2001). Aquesta troballa ens indica que la xaperonina pot actuar com a promotor de l'agregació, en determinades ocasions.

Tot i que els resultats que hem obtingut en *E.coli* suggereixen que la GroEL intervé positivament en la formació dels cossos d'inclusió, aquest ha de ser per un mecanisme diferent al descrit per la Prp, ja que la proteïna estudiada és massa gran per a ser internalitzada en la cavitat de GroEL i els cossos d'inclusió analitzats no estan únicament compostos per estructura en fulla beta. De totes maneres, es coneix que GroEL es copurifica amb VP1LAC (Boels *i col.*, 1999) i s'ha descrit que aquesta pot induir l'agregació de la β -galactosidasa *in vitro*, en presència d'ATP (Ayling i Baneyx 1996).

3.3.1 Possibles mecanismes del paper de GroEL en la

construcció dels cossos d'inclusió

Els resultats obtinguts ens mostren que la xaperonina GroEL intervé positivament en la formació dels cossos d'inclusió, però el seu mecanisme d'acció es desconeix. El fet de que la seva acció sigui independent de la massa de la proteïna, obre la possibilitat de que la influència de GroEL sobre la formació dels cossos d'inclusió sigui indirecte.

El fet que les cèl·lules GroEL⁻ filamentin (Figura 4, treball 9) indica que l'absència de GroEL repercuteix en algun aspecte de la divisió cel·lular, perjudicant el procés de septació. Aquesta peculiaritat és interessant ja que els processos de formació d'agregats descrits en cèl·lules eucariotes utilitzen els sistemes de microtúbuls (també responsables de la divisió cel·lular) per a conduir els petits agregats cap a l'agresoma o cos d'inclusió únic (Kopito, 2000; Muchowski *et al.*, 2002). Així doncs, la filamentació cel·lular de les soques GroEL⁻ podria insinuar una associació entre la deficiència en els sistemes de microtúbuls bacterians i la menor agregació. Els petits agregats que s'observen dispersos pel citoplasma de les cèl·lules GroEL⁻ podrien correspondre als preagregats a partir dels quals es formen els grans i refringents cossos d'inclusió. De la mateixa manera que succeeix en les cèl·lules eucariotes, el transport dels preagregats cap a un nucli únic d'agregació pot necessitar ésser motoritzat a través del sistema de microtúbuls bacterians.

Aquests resultats ens porten a especular que l'aglutinació dels preagregats per a formar un cos d'inclusió podria ser un procés en el que hi contribuís un factor cel·lular

associat a la xaperonina GroEL, que també intervingués en el mecanisme de divisió cel·lular. Un candidat podria ésser la proteïna FtsZ, ja que és el component del citoesquelet clau pel funcionament de la maquinària de divisió cel·lular bacteriana (Bramhill, 1997; Lutkenhaus i Addinall, 1997).

El sistema de microtúbuls bacterià, FtsZ i FtsA, és homòleg a l'actina i la tubulina d'eucariotes, totes aquestes proteïnes tenen un patró de plegament idèntic i es creu que tenen un origen evolutiu comú (Romberg *et al.*, 2001). Curiosament, la maduració i la polimerització de l'actina i la tubulina és dependent d'una xaperonina, anomenada CTT (Dobrzynsky *et al.*, 2000; Llorca *et al.*, 2001), que és molt similar a la GroEL tant en estructura com en el mecanisme funcional (Dobrzynsky *et al.*, 1996; Marco *et al.*, 1994; Melki *et al.*, 1997; Tian *et al.*, 1995; Yaffe *et al.*, 1992). Aquest fet podria suggerir que la GroEL fos necessària per a la polimerització de FtsZ, que podria intervenir en la formació dels cossos d'inclusió.

El fet que les soques DnaK⁻, en les que hi ha molta agregació, també filamentin, sembla contradictori amb aquesta hipòtesi. De totes maneres, es coneix que la DnaK intervé en el procés de septació ajudant la formació de l'anell Z (Uehara *et al.*, 2001). Aquest anell es forma a través de l'ensamblatge dels polímers de FtsZ, es localitza en el centre de la cèl·lula i forma el septe que dividirà la cèl·lula (Erickson, 1997). Així doncs, tot i que l'absència de DnaK provoqui filamentació, sembla que no influeix sobre el procés de polimerització de FtsZ, que es requeriria per a dirigir l'agregació. Per altra banda, s'ha observat que mutants DnaK⁻ produeixen més quantitat de

GroEL (McCarty i Walker, 1994), la qual cosa també pot influir en l'augment de l'agregació que s'observa en les soques DnaK⁻ (Figura 1, treball 9).

3.4. Les IbpAB coagreguen amb els cossos d'inclusió

Malgrat que s'ha trobat que les xaperones petites IbpA i IbpB formen part de diferents tipus de cossos d'inclusió (Allen *i col.*, 1992), es desconeix si aquestes sols hi queden atrapades o si també tenen una funció en l'agregació i la desagregació dels cossos d'inclusió. Es creu que aquestes proteïnes podrien representar els primers components cel·lulars que s'uneixen als polipèptids mal plegats, funcionant com a controladors de l'agregació (Veinger, 1998) i facilitant una agregació reversible (Laskowska *i col.*, 1996; Thomas i Baneyx, 1998).

S'ha detectat la presència de les IbpA i IbpB en els cossos d'inclusió de VP1LAC produïts en la soca MC4100 i els seus derivats deficients en les proteases de la família Clp (ClpA, ClpB i ClpP). La proporció de IbpAB respecte la proteïna recombinant VP1LAC en els cossos d'inclusió produïts en la soca salvatge i en els mutants es manté constant (0,4), excepte en la soca ClpA⁻ (0,7). En aquest mutant també augmenta la proporció de DnaK i GroEL (Figures 2, 3 i 4, treball 8).

La manca de les IbpAB no afecta en la formació dels cossos d'inclusió (Figura 1, treball 9) i presenta una influència comparable amb les altres soques en la desagregació dels cossos d'inclusió. La coagregació d'aquestes xaperones petites podria tenir algun paper en la biologia dels

cossos d'inclusió, que encara es desconeix. No obstant, la presència d'IbpAB en els cossos no és imprescindible ni per la seva formació, ni per la seva desagregació, com s'havia proposat (Shearston i Baneyx, 1999).

El fet que la manca de les diferents xaperones influeixi d'una manera quantitativament tan similar en el procés de desagregació i replegament dels cossos d'inclusió suggereix que aquest fenomen és el resultat d'un procés en el que cooperen les diferents xaperones i en el que exerceixen activitats complementàries.

3.5. ClpA i ClpB no intervien individualment en el procés de formació dels cossos d'inclusió

Tot i que la formació dels cossos d'inclusió està molt lligada a la proteòlisi, sembla que les dues proteases estudiades, ClpA i ClpB no intervien de forma destacada en aquest procés, ja que els cossos d'inclusió que es formen en els respectius mutants deficients no presenten masses diferències respecte els que es formen a la salvatge (figura 1 taula 2, treball 9). Una particularitat detectada en els cossos d'inclusió produïts en la soca ClpA⁻ és que presenten una quantitat més elevada de les xaperones IbpAB, DnaK i GroEL coagregades, respecte els altres cossos (figura 3 i 4, treball 8). Això ens suggereix que la seva absència provoca una major interacció de la proteïna recombinant, VP1LAC, amb les xaperones IbpAB, DnaK, GroEL, que queden atrapades en els agregats. Es desconeix de quina forma pot influir l'absència de ClpA en aquest fenomen, però ens indica que l'absència d'aquesta xaperona

provoca una major demanda de les altres, el que vol dir que com a mínim, algun dels components del sistema actua de forma coordinada. El fet que els cossos d'inclusió produïts en la soca ClpA⁻ es dissociïn un 20 % menys que els de la soca salvatge (Taula 2, treball 9), indica que la ClpA⁻ participa en aquest procés i que aquests agregats presenten més dificultat per a ésser desagregats.

4. GENERALITATS DELS COSSOS D'INCLUSIÓ BACTERIANS I EUCARIOTES — FORMACIÓ BIOLÒGICA D'AGREGATS PROTEICS

L'agregació proteica és una àrea d'estudi que està en intensa exploració i darrerament s'està començant a entendre amb més profunditat la seva biologia i el seu paper en el context cel·lular. Estudis recents d'agregats proteics que es formen en cèl·lules eucariotes, suggereixen que aquests representen un mecanisme de defensa cel·lular. El grup de Kopito i col. descriuen que els agrosomes es produeixen per evitar que els agregats proteics dispersos pel citoplasma, provoquin toxicitat al presentar regions hidrofòbiques exposades, que poden atraure altres proteïnes citosòliques cap a l'agregació (Kopito, 2000). Per altra banda, la formació dels cossos d'inclusió de la proteïna de huntingtin Exó 1 (HtEx1) que es produeixen en cèl·lules de mamífer, sembla que és un mecanisme per segrestar les espècies de proteïna soluble HtEx1 que són tòxiques per la cèl·lula (Muchowski *i col.*, 2002). Els dos mecanismes estan associats al transport actiu dels polipèptids a través dels microtúbuls (Kopito, 2000; Muchowski *i col.*, 2002). Un altre exemple, és el cas dels agregats que apareixen

en algunes enfermetats, com les ataxies, que s'ha vist que no són la causa de la patogènesi, com s'havia cregut, sinó una conseqüència de la progressió de l'enfermetat (veure introducció, apartat 1.3.1.) (Klement, 1998) (Sisodia, 1998).

Actualment, l'agregació proteica en bacteris en forma de cossos d'inclusió s'entén d'una manera molt diferent de com s'havia descrit originalment. Anys enrera es creia que els cossos d'inclusió eren agregats inertes i irreversibles, de proteïna mal plegada, inactiva, i resistent a la proteòlisi (Marston, 1986). Com prèviament s'ha esmentat, estudis més recents ja havien trobat varies evidències que no encaixaven amb aquesta idea original, com la presència d'activitat enzimàtica en els cossos d'inclusió (Tokatlidis *i col.*, 1991; Worrall i Goss, 1989), l'alt voidatge accessible al solvent, que suggereix la capacitat dels agregats d'interaccionar amb molècules del solvent (Taylor *i col.*, 1986) i l'elevat contingut d'estructura secundària de la proteïna dels cossos (Oberg *i col.*, 1994). Les troballes presentades en aquest treball han contribuït en tenir un millor coneixement de la biologia dels cossos d'inclusió, que ens porten a qüestionar-nos si representen mecanismes equivalents als agregats que es formen en cèl·lules eucariotes.

Els indicis que tenim de que els cossos d'inclusió bacterians es construeixen per la unió de petits preagregats, ens fan sospitar que el seu mecanisme de formació podria presentar semblances amb el d'eucariotes. Kopito i col. van observar, l'any 2000, que els agrosomes es formen a través de l'aglutinació de petits preagregats que són transportats de forma activa, a través de microtúbuls, cap a un



Figura 4. Resum esquemàtic de les vies que poden seguir els polipèptids que formen els cossos d'inclusió en el citoplasma d'*Escherichia coli*. Les fletxes puntejades indiquen les vies que no han estat estudiades.

mateix indret cel·lular per interaccionar amb els altres i formar un únic reservori de proteïna agregada (Kopito, 2000). Tanmateix, fins ara no s'ha identificat cap factor bacterià que dirigeixi els preagregats cap a la formació d'un cos d'inclusió, però els resultats obtinguts no descarten aquesta possibilitat.

Per altra banda, els diferents resultats d'aquest treball indiquen que la formació dels cossos d'inclusió és un fenomen integrat dins dels mecanismes de resposta a l'estrès, que podria estar involucrat en la reducció dels efectes tòxics de la proteïna heteròloga, com també s'ha proposat per alguns agregats que es formen en eucariotes (Muchowski *i col.*, 2002). Si consideréssim que els cossos d'inclusió es formen per eliminar la toxicitat de proteïnes aberrants, podria ser que proteïnes recombinants plegades que són tòxiques per la cèl·lula, també fossin acumulades en els cossos d'inclusió. Això explicaria la presència d'estructura secundària quasi-nativa (Oberg *i col.*, 1994) i l'activitat de la proteïna associada als cossos (Worrall i Goss, 1989). La producció d'una proteïna heteròloga pot provocar toxicitat a la cèl·lula per diverses raons: la càrrega

metabòlica que suposa (Glick, 1995), l'activitat enzimàtica i/o les propietats físiques de la proteïna poden interferir en el funcionament de la cèl·lula hoste (Sano i Cantor, 1990), l'activació dels sistema SOS (Aris *i col.*, 1998 ; Lukacsovich i Ventianer, 1991), en el cas de proteïnes secretores pel colapse dels llocs de translocació i transport que perjudica la correcta localització de proteïnes cel·lulars essencials (Skare *i col.*, 1989) i com ja hem esmentat, el plegament incorrecte de la proteïna heteròloga també ocasiona efectes tòxics.

5. NOVES ESTRATÈGIES PER MILLORAR EL RENDIMENT DELS PROCESSOS DE PRODUCCIÓ DE PROTEÏNES RECOMBINANTS QUE FORMEN COSSOS D'INCLUSIÓ

Un dels objectius principals d'aquest treball era tenir un millor coneixement del procés de formació dels cossos d'inclusió per minimitzar la seva formació i així millorar el rendiment del procés de producció, o bé desenvolupar un mètode per a recuperar proteïna activa dels cossos d'inclusió.

Malgrat que els coneixements adquirits durant aquest treball no ens han ofert la solució definitiva a la problemàtica que suposa la formació dels cossos d'inclusió en molts dels processos biotecnològics, ens poden ajudar a dissenyar noves estratègies per a millorar-ne el rendiment. Quan la proteïna recombinant d'interès forma cossos d'inclusió es poden seguir dues estratègies; optimitzar el procés de producció per a evitar que es formin o bé purificar-los i intentar recuperar la proteïna en la seva forma soluble mitjançant processos de replegament.

5.1. Com es pot minimitzar la formació dels cossos d'inclusió?

Fins ara, s'ha vist que quan una proteïna forma cossos d'inclusió, és molt difícil evitar-ho optimitzant el sistema de producció o les condicions de cultiu. Hi ha maneres de minimitzar la seva formació, modificant les condicions d'expressió gènica (Schein, 1991; Weicker, 1996), evitant l'ús d'elevades temperatures i l'acidificació del medi (Chalmers, 1990; Strandberg i Enfors, 1991) i manipulant els components del medi (Bowden i Georgiou, 1990; Moore *i col.*, 1993). Una altra estratègia que ha aconseguit millorar la solubilitat de la proteïna recombinant ha estat co-produir-la simultàniament amb diferents xaperones (Caspers *i col.*, 1994; Nishihara *i col.* 1998, 2000; Thomas i Baneyx, 1996), però els resultats són molt variables en funció de la proteïna recombinant (Nishihara *i col.*, 2000). També es pot modificar la proteïna recombinant, mitjançant mutacions o fusionant-li algun pèptid, per augmentar la solubilitat (Rinas,

1992; Mitraki i King, 1992; Chrnyk, 1993; LaVallie, 1992; Wetzel, 1994; Forrer i Jaussi, 1998). Tanmateix, cap d'aquests mètodes ofereix una estratègia universal per la prevenció dels cossos d'inclusió, ja que depèn de cada proteïna particular. Gràcies als nous coneixements sobre la formació dels cossos d'inclusió, es pot dissenyar un nou organisme productor, deficient en els factors que afavoreixen la formació dels cossos d'inclusió, i així evitar-ne la seva producció. D'altra banda, també es podria millorar el sistema de plegament, per tal de que la proteïna que no pugui ésser agregada, aconsegueixi adquirir la seva estructura nativa. D'aquesta manera es podria millorar bastant el rendiment del procés.

Una de les troballes més interessants des del punt de vista aplicat, ha estat veure que l'absència de la xaperona GroEL afavoreix la solubilitat de la proteïna recombinant i redueix la formació dels cossos d'inclusió. Per altra banda, s'ha vist que la xaperona DnaK participa en el plegament proteic i evita l'agregació. Estudis anteriors mostren que la sobreproducció del sistema de xaperones DnaK/DnaKJ/GrpE millora la producció de la proteïna recombinant en la seva forma soluble a totes les temperatures (Thomas i Baneyx, 1996). Així doncs, creiem que combinar el genotip GroEL⁻ amb la sobreproducció del sistema DnaK/DnaJ/GrpE, seria una bona estratègia per a millorar la producció de proteïna recombinant.

5.2. Nous mètodes per a recuperar proteïna dels cossos d'inclusió

Com que moltes de les proteïnes que es

volen produir formen cossos d'inclusió, i aquests representen una font rica de proteïna recombinant, pràcticament pura, hi ha un gran interès en poder recuperar-ne la seva forma activa mitjançant processos de replegament *in vitro*. La recuperació de proteïnes bioactives dels cossos d'inclusió és un procés complex, pel qual es poden usar diversos procediments descrits (veure introducció, apartat 3.3.1). Normalment el rendiment varia entre un 10 i un 50 % (Arora i Khanna, 1996; Jin *i col.*, 1994; Batas *i col.*, 1999; Ejima *i col.*, 1999; Babu *i col.*, 2000; Patra *i col.*, 2000) de la proteïna inicial dels cossos d'inclusió, però en alguns casos s'han aconseguit rendiments més alts, arribant fins a un 85 % (Vandebroeck *i col.*, 1993; Hellman *i col.*, 1995; Cardamone *i col.*, 1995; Khan *i col.*, 1998; Sunitha *i col.*, 2000; Rehm *i col.*, 2001). De totes maneres, l'èxit del procediment escollit varia molt depenent de la proteïna i per això el procés d'optimització resulta lent i costós. La clau per a dissenyar un procés de renaturalització comercialment viable es basa en minimitzar el nombre de passos del procés, les quantitats i els costos dels agents químics que es necessitin, i aconseguir un bon rendiment de proteïna funcional.

5.3. Procés de recuperació de proteïna activa dels cossos d'inclusió utilitzant extractes cel·lulars

El descobriment de la reversibilitat de l'agregació i l'observació que una part de la proteïna dels cossos d'inclusió és replegada *in vivo* ens va obrir noves portes pel desenvolupament d'un nou procediment, que mimetitzés *in vitro* el procés natural que es dona a la cèl·lula. Tot i que la quantitat de

proteïna replegada *in vivo* no és molt elevada, aquest fenomen es pot explotar i mirar d'accentuar-lo, manipulant les condicions *in vitro*.

Com que els components específics que s'encarreguen d'assistir el replegament de la proteïna agregada en cossos d'inclusió encara no han estat identificats, es va provar d'utilitzar extractes cel·lulars, sotmesos a un xoc tèrmic, sonicats i concentrats, per la solubilització dels cossos d'inclusió. Quan es mesclen aquests extractes cel·lulars amb cossos d'inclusió purificats, una part de la proteïna agregada es renaturalitza. Aquests resultats ens van portar a desenvolupar un nou protocol per a la renaturalització dels cossos d'inclusió *in vitro*, que es descriu en l'esquema 1 del treball 10. L'eficiència del procés descrit es va demostrar amb dos tipus de cossos d'inclusió diferents de les proteïnes VP1LAC i TSP. En els dos casos, s'observa que després de dues hores d'incubació amb extractes cel·lulars concentrats, es desagrega un 60 % i un 40 % de la proteïna de les partícules, respectivament. Una fracció de la proteïna desagregada és replegada en la seva forma nativa, com reflecteix l'augment d'activitat enzimàtica i la seva identificació a la fracció soluble per Western-blot (figura 4, treball 3), però una fracció important és proteolitzada.

El procés de solubilització dels cossos d'inclusió *in vitro* utilitzant extractes cel·lulars ofereix varies avantatges respecte els descrits fins ara. En primer lloc, és un procés genèric per a totes les proteïnes, i això facilita el procés d'optimització; per altra banda s'evita l'ús d'agents químics amb la qual cosa es redueixen els costos i els residus i també és un procés més ràpid. De totes maneres, el procés

descriu requereix ésser optimitzat per a obtenir un millor rendiment. Fins ara, s'ha provat de controlar la proteòlisi mitjançant inhibidors de proteases, però no s'ha aconseguit eliminar. Per altra banda, també s'ha provat d'addicionar ATP, juntament amb un sistema de recircularització d'ATP, basat en fosfoenolpiruvat i piruvat quinasa (Dillon i Clark, 1990), sense millores significatives (figura 2, treball 10). El procés d'optimització hauria d'anar dirigit a optimitzar les condicions de temperatura i temps d'incubació idònies i evitar la proteòlisi, i un cop s'hagin identificat les xaperones que faciliten el replegament, addicionar-les o utilitzar extractes que les sobreexpressin.

5.4. Utilització de la pressió hidrostàtica com a mètode per a recuperar proteïna activa dels cossos d'inclusió

L'aplicació d'una elevada pressió hidrostàtica ha estat una eina eficaç per a desfer agregats proteïcs. Alguns exemples són els agregats de rodanasa formats *in vitro*, que es disgreguen completament, però la proteïna sols es manté soluble sota pressió (Gorovits i Horowitz, 1998). Per altra banda, els agregats de la proteïna TSP produïts *in vitro* es dissocien i s'arriba a recuperar més del 50% de la proteïna en el seu estat natiu (Foguel, 1999).

Poder usar la pressió hidrostàtica pel replegament de la proteïna dels cossos d'inclusió seria una valuosa eina en la biotecnologia, ja es podria escalar a nivell industrial. La pressió hidrostàtica ja ha estat adaptada per la indústria alimentària és un mètode més simple i econòmicament més rentable que els descrits fins ara. Aquesta possibilitat s'ha explorat poc, però estudis amb

cossos d'inclusió citoplasmàtics de β -lactamasa mostraven la capacitat de solubilitzar un 85% de la proteïna dels cossos d'inclusió, sotmetent-los durant 48h, a 37°C, a una pressió de 2 Kbar (St. John *i col.*, 1999).

Tanmateix, els estudis que hem realitzat nosaltres amb cossos d'inclusió de VP1LAC, LACVP1 i TSP mostren que la pressió hidrostàtica és una bona eina per a desagregar parcialment els cossos d'inclusió, però que presenta dificultats per a la recuperació de la seva forma nativa. Aquests cossos presenten un 40% de proteïna sensible a ésser dissociada per pressió hidrostàtica. Si aquest percentatge de proteïna desagregada fos capaç d'ésser replegada, el procediment tindria un rendiment força bo. Però la pressió hidrostàtica exerceix un efecte variable sobre les diferents proteïnes, i en alguns casos indueix la desnaturalització total de la proteïna (Li *i col.*, 1976; Wong *i col.*, 1988; Takeda, 1995), en altres les deixa en estat de "molten globule" (Mantulin, 1985; Peng, 1993; Zhou, 2000) o en formes intermediàries del plegament estables (Vidugiris, 1998; Kobashigawa, 1999; Zhou, 2000; Sashara, 1999). Les proteïnes oligomèriques sovint són dissociades (Silva, 1993) i hi ha molts enzims que perden l'activitat (Morild, 1981; Northrop, 2002). Per això, tot i que la pressió hidrostàtica representa una bona eina per a desfer agregats, és difícil el seu ús com a un mètode genèric per a solubilitzar una diversitat de proteïnes. Per altra banda, cada cop hi ha més coneixements sobre les conseqüències que la pressió hidrostàtica té sobre diferents estructures proteïques (Perret, 2002; Northrop, 2002; Kornblatt, 2002) i així doncs, pot representar un bon mètode per proteïnes que no en resultin perjudicades.

1. Quan es produeixen les proteïnes recombinants VP1LAC i LACVP1 en la soca BL21, es formen cossos d'inclusió citoplasmàtics polars, de morfologia ovoide i caràcter refringent. En la majoria de les cèl·lules del cultiu es forma un cos d'inclusió, però hi ha una proporció de cèl·lules, variable durant la primera hora de la inducció, on se'n formen dos. Al cap d'una hora de producció de la proteïna recombinant, el percentatge de cèl·lules que presenta dos cossos d'inclusió es manté constant, essent un 20% per les cèl·lules que produeixen VP1LAC i un 4% per les que produeixen LACVP1. A partir d'aquest moment, sembla que la presència d'un cos d'inclusió exclouï la formació d'un altre.
2. La caracterització dels cossos d'inclusió de VP1LAC i LACVP1 mostra que presenten propietats diferents. Els cossos de VP1LAC són grans (el volum mig a les 5 hores és de $0,6 \mu\text{m}^3$) i estan compostos majoritàriament per la proteïna recombinant intacta, representant un 80-90% del contingut proteic dels agregats. Encanvi, els cossos de LACVP1 són més petits (el volum mig a les 5 hores és de $0,04 \mu\text{m}^3$) i de composició més heterogènia, ja que la proteïna LACVP1 representa un 30% del contingut dels cossos d'inclusió i sumant-hi els seus fragments de degradació, un 65%. Aquestes diferències s'associen a la major sensibilitat proteolítica de la proteïna LACVP1.
3. Els cossos d'inclusió de VP1LAC i LACVP1 tenen un creixement volumètric continu durant la fase exponencial del cultiu. Els cossos d'inclusió de VP1LAC incrementen de volum a una taxa de $0,4 \mu\text{m}^3\text{h}^{-1}$ fins arribar a un volum de $1,8 \mu\text{m}^3$, equivalent al volum de les cèl·lules no recombinants.
4. Durant les primeres 2 hores de formació dels cossos d'inclusió, hi ha un percentatge creixent de proteïna recombinant en els cossos de VP1LAC i en els de LACVP1, a partir del qual es manté constant durant el seu creixement. El menor percentatge de proteïna recombinant que presenten els agregats durant aquest primer període de temps implica una major heterogeneïtat proteica, indicant que els intermediaris de plegament que formen els primers nuclis d'agregació interaccionen amb altres proteïnes.
5. Durant la síntesi de les proteïnes recombinants VP1LAC i LACVP1, aquestes s'incorporen en els cossos d'inclusió a una taxa constant, que varia entre 2 i $25 \text{ngml}^{-1}\text{h}^{-1}$.
6. Quan els cultius envelleixen i l'activitat biosintètica disminueix, s'observa una pèrdua de proteïna dels cossos d'inclusió, que es correspon a les reduccions de volum. Els cossos d'inclusió de VP1LAC i LACVP1 perden un 20% de proteïna agregada entre les 5 i les 24 hores de la inducció.
7. La proteïna LACVP1 que forma els cossos d'inclusió és proteolitzada. La proteòlisi es podria donar en una fracció prèviament solubilitzada, però també podria ocórrer *in situ*, ja que els fragments de degradació

CONCLUSIONS

- corresponents, β -galactosidasa i VP1, es troben associats als cossos d'inclusió.
8. L'agregació proteica en forma de cossos d'inclusió és reversible. Quan s'atura la síntesi proteica, s'observa com els cossos d'inclusió de diferents proteïnes, VP1LAC, LACVP1 i TSP es desintegren en el citoplasma cel·lular. Una part de la proteïna desagregada apareix a la fracció soluble, en forma activa, i l'altra és proteolitzada. Els cossos d'inclusió de TSP es dissocien completament al cap de 24 hores d'haver aturat la síntesi proteica, mentre que els cossos de VP1LAC i LACVP1 conserven una fracció de proteïna, entre un 15 i 20%, que no és dissociada durant aquestes 24 hores.
9. Els cossos d'inclusió de VP1LAC i LACVP1 purificats es digereixen completament *in vitro* quan són incubats amb tripsina. Per tant, aquests agregats són sensibles a la proteòlisi i presenten una vida mitja de pocs minuts. Tant en els cossos de LACVP1 com en els de VP1LAC, la resistència a tripsina augmenta al llarg del seu creixement. En els cossos de VP1LAC la vida mitja és de 1,34 minuts a la primera hora de formació i augmenta fins a 14 minuts en els cossos de 24 hores. En els de LACVP1 augmenta de 0,35 a 21 minuts, en el mateix interval de temps. Aquests canvis indiquen que els agregats pateixen transicions estructurals durant el seu creixement.
10. La proteòlisi *in vitro* dels cossos d'inclusió de VP1LAC i LACVP1 té lloc a través d'un procés en cascada, en el que es produeix una degradació seqüencial de proteïna agregada per talls específics que generen fragments de degradació estables. La cascada proteolítica dels cossos d'inclusió sembla que es dona *in situ* i implica la presència de 3 (per LACVP1) o 4 (per VP1LAC) estadis previs a la completa degradació.
11. El procés de digestió dels cossos d'inclusió indica que estan compostos per proteïna recombinant que presenta una heterogeneïtat conformacional, ja que coexisteixen diferents espècies polipeptídiques amb diferent sensibilitat a tripsina. En els cossos d'inclusió de VP1LAC i LACVP1 coexisteixen tres espècies de proteïna, que es diferencien en la seva vida mitja; una molt sensible a la tripsina (entre 1 i 6,5 minuts), una altra intermitja i més abundant (entre 4 i 19 minuts) i una tercera molt resistent (entre 26 i 103 minuts). Les proporcions de les diferents espècies polipeptídiques es mantenen al llarg del creixement dels cossos d'inclusió, però la seva resistència a proteòlisi augmenta. Per això els cossos d'inclusió més vells tenen una vida mitja més llarga.
12. L'anàlisi dels cossos d'inclusió mitjançant tècniques d'espectroscopia mostra que els de 24 hores presenten propietats estructurals diferents. La menor senyal en els espectres de dicromisme circular i la menor unió a l'ANS, indiquen que són agregats més compactes. Aquestes diferències suggereixen que la fracció de proteïna més agregada que forma els

- cossos d'inclusió s'estabilitza quan aquests s'envelleixen.
13. Els cossos d'inclusió presenten una organització interna subparticulada, és a dir, estan formats per la unió d'altres granuls o subagregats, que s'observen per microscòpia electrònica durant el procés de digestió per tripsina.
 14. El fet que la presència d'un cos d'inclusió exclouï la formació d'un altre i que els agregats presentin una arquitectura interna subparticulada, suggereix que la construcció dels cossos d'inclusió es podria iniciar per la formació de petits agregats, que s'aglutinen per formar un gran nucli d'agregació.
 15. S'ha identificat la presència de les proteïnes IbpAB en cossos d'inclusió de VP1LAC produïts a la soca MC4100, i en els seus derivats deficients en ClpA, ClpB i ClpP. La proporció de proteïnes IbpAB respecte la proteïna recombinant és igual en les diferents soques, excepte en la ClpA⁻.
 16. Els cossos d'inclusió que es produeixen en la soca ClpA⁻ tenen un contingut més elevat de les xaperones IbpAB, DnaK i GroEL respecte als que es produeixen en la soca salvatge i els mutants ClpB i ClpP.
 17. En la formació de cossos d'inclusió hi intervenen varies proteïnes de xoc tèrmic. Les xaperones IbpAB, ClpA, ClpB i GroES participen en aquest procés d'una forma moderada, sense ser-ne imprescindibles.
 18. L'absència de la DnaK provoca la formació de cossos d'inclusió de VP1LAC majors (amb un volum mig de $0,38\mu\text{m}^3$, versus els produïts en la soca salvatge de $0,25\mu\text{m}^3$), una menor presència de proteïna nativa i la reducció de la proteòlisi de la proteïna recombinant. Això suggereix que la xaperona DnaK exerceix una funció clau en la formació dels cossos d'inclusió.
 19. L'absència de la GroEL resulta en una major presència de proteïna nativa (més de sis ordres de magnitud respecte la salvatge) i una menor agregació. Es produeixen cossos d'inclusió més petits (representant una cinquena part del volum dels produïts en la soca salvatge), més abundants (un 60% de les cèl·lules tenen una mitja de 5,1 partícules per cèl·lula) i dispersos pel citoplasma bacterià. Així doncs, sembla indicar que la xaperonina GroEL afavoreix la formació dels cossos d'inclusió, potser actuant com a transportador de la proteïna agregada cap al cos d'inclusió.
 20. L'absència de cadascuna de les xaperones estudiades (DnaK, GroEL, GroES, IbpAB, ClpB, ClpA) i de les dues xaperones ClpB i DnaK conjuntes té una influència negativa en la desintegració dels cossos d'inclusió, que en tots els casos disminueix entre un 20 i un 30%. Això indica que la desintegració *in vivo* és un procés multifactorial, en el que hi deuen participar gran part de la xarxa de proteïnes de xoc tèrmic de manera cooperativa i complementaria.

CONCLUSIONS

21. Extractes cel·lulars d'*Escherichia coli* sotmesos a un xoc tèrmic i concentrats (20X) tenen la capacitat de renaturalitzar *in vitro* proteïna dels cossos d'inclusió purificats de VP1LAC i TSP. S'ha aconseguit dissociar un 60% i un 40% els cossos d'inclusió de VP1LAC i TSP, respectivament, però no tota la proteïna recuperada dels agregats és renaturalitzada i part d'aquesta es proteolitzada. Tanmateix, el nou protocol descrit per a la recuperació de proteïna nativa dels agregats, utilitzant extractes cel·lulars, presenta bones expectatives pel disseny d'un mètode genèric, econòmic i que eviti els residus químics.

22. La pressió hidrostàtica representa una bona eina per a desagregar fins a un 40% de la proteïna que compon els cossos d'inclusió de VP1LAC, LACVP1 i TSP. Aquesta tecnologia pot utilitzar-se per a la solubilització de proteïnes, en les que la seva estructura nativa no es vegi perjudicada per l'efecte de la pressió hidrostàtica.

23. La formació dels cossos d'inclusió és el resultat d'un equilibri dinàmic entre l'agregació, la solubilització i la proteòlisi, que està desplaçat cap a l'agregació en condicions de sobreproducció d'una proteïna recombinant, però que pot ser invertit quan s'atura la producció de proteïna agregada. En aquesta situació, els cossos d'inclusió es desintegren i una major part de la proteïna és degradada i una altra és replegada. Aquesta troballa ens indica que la formació dels cossos

d'inclusió és un mecanisme integrat dins del sistema de control de qualitat cel·lular, que podria estar destinat a acumular la proteïna insoluble (que pot provocar toxicitat a l'exposar dominis hidrofòbics), que apareix en el citoplasma durant la sobreproducció d'una proteïna recombinant. Probablement, la formació dels cossos d'inclusió serveix per arraconar proteïna insoluble per a ser processada quan les condicions ho permeten.

- Ahn, J. H., Lee, Y. P. i Rhee, J. S. Investigation of refolding condition for *Pseudomonas fluorescens* lipase by response surface methodology. 1997. *J.Biotechnol.* **54**: 151-160.
- Allen, S.P., Polazzi, J.O., Gierse, J.K. i Easton, A.M. Two novel heat shock genes encoding proteins produced in response to heterologous protein expression in *Escherichia coli*. 1992. *J. Bacteriol.* **174**: 6938-6947.
- Arakawa, T. i Timasheff, S. N. Theory of protein solubility. 1985. *Methods in Enzymology* **114**: 49-77.
- Aris, A., Corchero, J.L., Benito, A., Carbonell, X., Vilaplana, E. i Villaverde, A. The expression of recombinant genes from bacteriophage lambda strong promoters triggers the SOS response in *Escherichia coli*. 1998. *Biotechnology and Bioengineering* **60**: 551-559.
- Ayling, A. i Baneyx, F. Influence of the GroEL molecular chaperone machine on the *in vitro* refolding of *Escherichia coli* β -galactosida. 1996. *Protein Science* **5**: 478-487.
- Babbit, B. L., West, D. D., Burchter, I. D., Kuntz, I. D. i Kenyon, G. L. 1990. *Bio/Technology* **8**: 945.
- Baneyx, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. 1999. *Current Opinion on Biotechnology* **10**: 411-421.
- Ben-Zvi, A. P. i Goloubinoff, P. Review: mechanisms of disaggregation and refolding of stable protein aggregates by molecular chaperones. 2001. *J.Structural Biology* **135(2)**: 84-93.
- Bessette, P. H., Aslund, F., Beckwith, J. i Georgiou, G. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. 1999. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96 (24)**: 13703-13708.
- Boels, K., Carrio, M. M., Aris, A., Corchero, J. L. i Villaverde, A. Distinct chaperone affinity to folding variants of homologous recombinant proteins. 1999. *Biotechnology Letters* **21**: 531-536.
- Bowden, G.A. i Georgiou, G. Folding and aggregation of beta-lactamase in the periplasmic space of *Escherichia coli*. 1990. *J. Biol. Chem.* **265**: 16760-16766.
- Bowden, G.A., Paredes, A.M. i Georgiou, G. Structure and morphology of protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. 1991. *Biotechnology (N. Y.)* **9**: 725-730.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. 1976. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Bramhill, D. Bacterial cell division. 1997. *Annu.Rev.Cell.Dev.Biol.* **13**: 395-424.
- Buchner, J. i Rudolph, R. Renaturation, purification and characterization of recombinant Fab fragments produced in *Escherichia coli*. 1991. *Biotechnology* **9**: 157-162.
- Builder, S., Hart, R., Lester, P. i Reifsnnyder, D. Refolding of midfolded insulin-like growth factor-1. 1997. US.Patent 5663304 .
- Bukau, B. Regulation of the *Escherichia coli* heat-shock response. 1993. *Mol.Microbiol.* **9(4)**: 671-680.
- Bukau, B., Deuerling, E., Pfund, C. i Craig, E.A. Getting newly synthesized proteins into shape. 2000. *Cell* **101**: 119-122.
- Bukau, B. i Horwich, A. L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. 1998. *Cell* **92(3)**: 351-366.
- Burgess, R. R. Purification of overproduced *Escherichia coli* RNA polymerase σ factors by solubilizing inclusion bodies and refolding from sarkosyl. 1996. *Methods in Enzymology* **273**: 145-149.
- Carbonell, X. i Villaverde, A. Insertional mutagenesis in tailspike protein of bacteriophage P22. 1998. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **244**: 428-433.
- Cardamone, M., Puri, N. K. i Brion, M. Comparing the refolding and reoxidation of recombinant porcine growth hormone from a urea denatured state and from *Escherichia coli* inclusion bodies. 1995. *Biochemistry* **34**: 5773-5794.
- Carugo, O. Predicting residue solvent accessibility from protein sequence by considering the sequence environment. 2000. *Protein engineering* **13(9)**: 607-609.
- Caspers, P., Stieger, M. i Burn, P. Overproduction of bacterial chaperones improves the solubility of recombinant protein tyrosine kinases in *Escherichia coli*. 1994. *Cell Mol Biol* **40(5)**: 635-644.
- Cerletti, N., McMaster, G. K., Cox, D., Schmitz, A. i Meyback, B. Process for refolding recombinantly produced TGF-b-like proteins. 1997. US.Patent 5 650 494 .
- Chalmers, J.J., Kim, E., Telford, J.N., Wong, E.Y., Tacon, W.C., Shuler, M.L. i Wilson, D.B. Effects of temperature on *Escherichia coli* overproducing beta-lactamase or human epidermal growth facto. 1990. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 104-111.

BIBLIOGRAFIA

- Chaudhuri, T. K., Farr, G. W., Fenton, W. A., Rospert, S. i Horwich, A. L. GroEL/GroES-Mediated folding of a protein too large to be encapsulated. 2001. *Cell* **107**: 235-246.
- Chernoff, Y. O., Lindquist, S. L., Ono, B., Inge-Vechtomov, S. G. i Liebman, S. W. Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [psi+]. 1995. *Science* **268**: 880-884.
- Chrnyk, B. A., Evans, J., Lillquist, J., Young, P. i Wetzler, R. Inclusion body formation and protein stability in sequence variants of interleukin-1 beta. 1993. *J. Biol. Chem.* **268**: 18053-18061.
- Corchero, J. L., Cubarsi, R., Enfors, S. O. i Villaverde, A. Limited *in vivo* proteolysis of aggregated protein. 1997. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **237**: 325-330.
- Corchero, J.L., Viaplana, E., Benito, A. i Villaverde, A. The position of the heterologous domain can influence the solubility and proteolysis of beta-galactosidase fusion proteins in *E. coli*. 1996. *J. Biotechnol.* **48**: 191-200.
- Cowley, DJ. i Mackin, RB. Expression, purification and characterization of recombinant human proinsulin. 1997. *FEBS Lett.* **402**: 124-130.
- Creighton, T. E. How important is the molten globule for correct protein folding? 1997. *Trends Biochem.Sci.* **22** : 6-10.
- Creuger, A. i Creuger, W. 1984. *Biotechnology.De: Kiesslich, K., Verlag Chemie, Weinheim.* 421-457.
- Danner, M., Fuchs, A., Miller, S. i Seckler, R. Folding and assembly of phage P22 tailspike endorhamnosidase lacking the N-terminal, head-binding domain. 1993. *Eur.J.Biochem.* **215**: 653-661.
- Danner, M. i Seckler, R. Mechanism of phage P22 tailspike protein folding mutations. 1993. *Protein Science* **2** : 1869-1881.
- Darby, N. J. i Creighton, T. E. Folding proteins. 1990. *Nature* **344**: 715.
- De Berniez-Clarck i Georgiou, G. Insulin inclusion bodies and recovery of proteins from the aggregated state. 1991. In: *Protein Refolding*. Georgiou, G., De Berniez-Clarck, E., editors. ACS Symposium Series, Washington, DC: American Chemical Society. **470**: 1-2.
- De Berniez Clark, E., Hevehan, D., Szela, S. i Maachupali-Reddy, J. Oxidative renaturation of hen egg-white lysozyme. Folding vs. aggregation. 1998. *Biotechnol Prog* **14**: 47-54.
- Degraeve, P., Delorme, P. i Lemay, P. Pressure-induced inactivation of *E. coli* b-galactosidase: influence of pH and temperature. 1996. *Biochim.Biophys.Acta* **1292**: 61-68.
- Deuerling, E., Schulze-Specking, A., Tomoyasu, T., Mogk, A. i Bukau, B. Trigger factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins. 1999. *Nature* **400**: 693-696.
- Diamant, S., Ben Zvi, A.P., Bukau, B. i Goloubinoff, P. Size-dependent disaggregation of stable protein aggregates by the DnaK chaperone machinery. 2000. *J. Biol. Chem.* **275**: 21107-21113.
- Dillon, P., i Clark, J. The theory of diazymes and functional coupling of pyruvate kinase and creatine kinase. 1990. *J. Theoretical Biol.* **143**: 275.
- Dobrzynsky, J. K., Sternlicht, M. L., Farr, G. i Sternlicht, H. Newly-synthesized beta-tubulin demonstrates domain-specific interactions with the cytosolic chaperonin. 1996. *Biochemistry* **35**: 15870-15882.
- Dobrzynsky, J. K., Sternlicht, M. L., Peng, I., Farr, G. W. i Sternlicht, H. Evidence that β -tubulin induces a conformation change in the cytosolic chaperonin which stabilizes binding: implications for the mechanism of action. 2000. *Biochemistry* **39**: 3988-4003.
- Dobson, C. i Karplus, M. Protein misfolding, evolution i disease. 1999. *Curr.Opin.Struct.Biol.* **9**: 92.
- Dong, H., Nilsson, L. i Kurli, C. G. Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction. 1995. *J.Bacteriol.* **177(6)**: 1497-1504.
- Dorin, G., McAlary, P. i Wong, K. Bacterial production of hydrophobic polypeptides. 1996. WO Patent 96/39523.
- Ellis, R. J. i Hartl, F. U. Principles of protein folding in cellular environment. 1999. *Curr.Opin.Struct.Biol.* **9(1)**: 102-110.
- Ellis, R. J. i Hemmingsen, S. M. Molecular chaperones: proteins essential for the biogenesis of some macromolecular structures. 1989. *Trends Biochem.Sci.* **14**: 339.
- Ellis, R. J. i Pinheiro, T.J. Medicine: danger - misfolding proteins. 2002. *Nature* **416(6880)**: 483-484.
- Enfors, S. O. Control of *in vivo* proteolysis in the production of recombinant proteins. 1992. *Trends Biotechnol* **10(9)**: 310-315.

- Erickson, H. P. FtsZ, a tubulin homologue in prokaryote cell division. 1997. *Trends Cell Biol* **7**: 362-367.
- Farrer, M., Chan, P., Chen, R., Tan, L., Lincoln, S., Herniez, D., Forno, L., Gwinn-Hardy, K., Petrucelli, L., Hussey, J., Singleton, A., Tanner, C., Hardy, J. i Langston, J. W. Lewy bodies and parkinsonism in families with parkin mutations. 2001. *Ann.Neurol.* **50(3)**: 283-285.
- Fayet, O., Ziegelhoffer T. i Georgopoulos, C. The GroES and GroEL heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. 1989. *J.Bacteriol.* **171(3)**: 1379-1385.
- Feliu, J. X., Ramírez, E. i Villaverde, A. Distinct mechanisms of antibody-mediated enzymatic reactivation in b-galactosidase molecular sensors. 1998. *FEBS Lett.* **438**: 267-271.
- Ferrao-Gonzales, A. D. The preaggregated state of an amyloidogenic protein: hydrostatic pressure converts native transthyretin into the amyloidogenic state. 2000. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97** : 6445-6450.
- Fink, AL. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. 1998. *Fold Des* **3**: R9-23.
- Foguel, D., Robinson, C. R., Caetano de Sousa, P., Silva, J. L. i Robinson, A. S. Hydrostatic pressure rescues native protein from aggregates. 1999. *Biotechnol.Bioeng.* **63**: 552-558.
- Foguel, D. i Weber, G. Pressure-induced dissociation and denaturation of allophycocyanin at subzero temperatures. 1995. *J.Biol.Chem.* **270(48)**: 28759-28766.
- Fowler, A. i Zabin, Y. Amino acid sequence of β -galactosidase XI Peptide ordering procedures and the complete sequence. 1978. *J.Biol.Chem.* **253**: 5521-5525.
- Fox, G., Parry, NR., Barnett, PV., McGinn, B., Rowlis, D. i Brown, F. Cell attachment site on foot-and-mouth-disease virus includes the amino acid sequence RGD. 1989. *J.Gen.Virol.* **70**: 625-637.
- Frydman, J. Folding of newly translated proteins *in vivo*: the role of molecular chaperones. 2001. *Annu.Rev.Biochem.* **70**: 603.
- Fuchs, A., Seiderer, C. i Seckler, R. *In vitro* folding pathway of phage P22 tailspike protein. 1991. *Biochemistry* **30**: 6598-6604.
- Georgiou, G. Expression of proteins in bacteria. 1995. Principles and practice of protein engineering. Edited by Cleli JL. Craik CS. New York: Butterworths : 101-127.
- Georgiou, G. i Valax, P. Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. 1996. *Current Opinion in Biotechnology* **7**: 190-197.
- Georgiou, G. i Valax, P. Isolating inclusion bodies. 1999. *Methods in Enzymology* **309**: 48-58.
- Gething, M. J. i Sambrook, J. Protein folding in the cell. 1992. *Nature* **355(6355)**: 33-45.
- Glick, B. R. Metabolic load and heterologous gene expression. 1995. *Biotechnol.Adv.* **13**: 247-261.
- Glover, J. R., Kowal, A. S., Schirmer, E. C., Patino, M. M. i Lindquist, S. Self-seeded fibers formed by Sup35, the protein determinant of [PSI⁺], a heritable prion-like factor of *S.cerevisiae*. 1997. *Cell* **89(5)** : 811-819.
- Goff, S.A. i Goldberg, A.L. Production of abnormal proteins in *E. coli* stimulates transcription of lon and other heat shock genes. 1985. *Cell* **41**: 587-595.
- Goldberg, M.E., Rudolph, R. i Jaenicke, R. A kinetic study of the competition between renaturation and aggregation during the refolding of denatured-reduced egg lysozyme. 1991. *Biochemistry* **30**: 2790-2797.
- Goldenberg, D., Berget, P. B. i King, J. Maturation of the tail spike endorhamnosidase of *Salmonella* phage P22. 1982. *J.Biol.Chem.* **257**: 7864-7871.
- Goldenberg, D. i King, J. Trimeric intermediate in the *in vivo* folding and subunit assembly of the tailspike endorhamnosidase of bacteriophage P22. 1982. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **79**: 3403-3407.
- Goloubinoff, P., Mogk, A., Zvi, A.P., Tomoyasu, T. i Bukau, B. Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. 1999. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**: 13732-13737.
- Gorovits, B. M. i Horowitz, P. M. High hydrostatic pressure can reverse aggregation of protein folding intermediates and facilitate acquisition of native structure. 1998. *Biochemistry* **37**: 6132-6135.
- Gottesman, S. Proteases and their targets in *Escherichia coli*. 1996. *Annu.Rev.Genet.* **30**: 465-506.
- Hardy, J. A. i Higgins, G. A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. 1992. *Science* **256(5054)**: 184-185.
- Harrison, C. J., Hayer-Hartl, M., Liberto, M. D., Hartl, F. i Kuriyan, J. crystal structure of the nucleotide exchange factor GrpE bound to the ATPase domain of the

BIBLIOGRAFIA

- molecular chaperone DnaK. 1997. *Science* **276(5311)**: 431-435.
- Hartl, F. U. Molecular chaperones in cellular protein folding. 1996. *Nature* **381**: 571.
- Hartl, F. U. i Hayer-Hartl, M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. 2002. *Science* **295**: 1852-1858.
- Hellebust, H., Murby, M., Abrahmsen, L., Uihén, M. i Enfors, S. O. 1989. *Biotechnology* **7**: 165-168.
- Heremans, K. High pressure research in the biosciences and biotechnology. 1997. Leuven: Leuven University Press.
- Herman, R. Protein folding. 1993. European patent Office EPO Applied Technology Series vol.12 .
- Hestekamp, T., Hauser, S., Lutcke, H. i Bukau, B. Escherichia coli trigger factor is a prolyl isomerase that associates with nascent polypeptide chains. 1996. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93(9)**: 4437-4441.
- Hockney, R.C. Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*. 1994. *Trends Biotechnol* **12**: 456-463.
- Hoffmann, F., Posten, C. i Rinas, U. Kinetic model of *in vivo* folding and inclusion body formation in recombinant *Escherichia coli*. 2001. *Biotechnology i Bioengineering* **72 (3)**: 315-322.
- Hoffmann, F. i Rinas, U. Kinetics of heat-shock response and inclusion body formation during temperature-induced production of basic fibroblast growth factor in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. 2000. *Biotechnol. Prog.* **16**: 1000-1007.
- Hoop, T. P. i Woods, K. R. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. 1981. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **78**: 3824-3828.
- Horowitz, P. M. i Butler, M. Interactive intermediates are formed during the urea unfolding of rhodanese. 1993. *J.Biol.Chem.* **268(4)**: 2500-2504.
- Horwich, A. L., Low, K. B., Fenton, W. A., Hirshfield, I. N. i Furtak, K. Folding *in vivo* of bacterial cytoplasmic proteins: role of GroEL. 1993. *Cell* **74(5)**: 909-917.
- Hubbard, S. J., Eisenmenger, F. i Thornton, J. M. Modeling studies of the change in conformation required for cleavage of limited proteolytic sites. 1994. *Protein Science* **3**: 757-768.
- Iwashita, S. i Kanegasaki, S. Enzymic and molecular properties of base-plate parts of bacteriophage P22. 1976. *Eur.J.Biochem.* **65**: 87-94.
- Jacobson, R.H., Zhang, X.-J., DuBose, R. i Matthews, B. Three-dimensional structure of b-galactosidase from *E. coli*. 1994. *Nature* **369**: 761-766.
- Jarret, J. T., Berger, E. P. i Lansbury, P. T. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. 1993. *Biochemistry* **32(18)**: 4693-4697.
- Jarrett, J. T. i Lansbury, P. T. Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie. 1993. *Cell* **73**: 1055-1058.
- Jurkiewuckz, E., Villas-Boas, M., Silva, J. L., Weber, G., Hunsmann, G. i Clegg, R. M. Inactivation of simian immunodeficiency virus by hydrostatic pressure. 1995. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**: 6935-6937.
- Kalnins, A., Otto, K., Ruther, U. i Müller-Hill, B. Sequence of *lacZ* gene of *Escherichia coli* . 1983. *EMBO J.* **2**: 593-597.
- Kanemori, M., Mori, H. i Yura, T. Induction of heat shock proteins by abnormal proteins results from stabilization and not increased synthesis of sigma 32 in *Escherichia coli*. 1994. *J.Bacteriol.* **176(18)**: 5648-5653.
- Katzav-Gozansky, T., Hanan, E. i Solomon, B. Effect of monoclonal antibodies in preventing carboxypeptidase A aggregation. 1996. *Biotechnol.Appl.Biochem.* **23**: 227-230.
- Khurana, R., Gillespie, J. R., Talapatra, A., Minert, L. J., Ionescu-Zanetti, C., Millett, I. i Fink, A.L. Partially folded intermediates as critical precursors of light chain amyloid fibrils and amorphous aggregates. 2001. *Biochemistry* **40(12)**: 3525-3535.
- Kim, S., Baum, J. i Ierson, S. Production of correctly folded recombinant (¹³C¹⁵N) enriched guinea pig (Val90)-a-lactalbumin. 1997. *Protein engineering* **9**: 455-462.
- Klement, I. A., Skinner, P. J., Kaytor, M. D., Hersch, S. M., Clark, H. B., Zoghbi, H. Y. i Orr, H. T. Ataxin-1 nuclear localization and aggregation: role in polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice. 1998. *Cell* **95 (1)**: 1-4.
- Kobashigawa, Y., Sakurai, M. i Nitta, K. Effect of hydrostatic pressure on unfolding of a-lactalbumin: volumetric equivalence of the molten globule and

- unfolded state. 1999. *Protein Sci.* **8** : 2765-2772.
- Kopito, R.R. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. 2000. *Trends Cell Biol.* **10**: 524-530.
- Kornblatt, J. A. i Kornblatt, M. J. The effects of osmotic and hydrostatic pressures on macromolecular systems. 2002. *Biochim Biophys Acta* **1595**: 30-47.
- Kurucz, I., Titus, J. A., Jost, C. A. i Segal, D. M. Correct disulphide pairing and efficient refolding of detergent-solubilized single-chain Fv proteins from bacterial inclusion bodies. 1995. *Mol. Immunology* **12**: 1443-1452.
- Kushinrov, V. V. i Ter-Avanesyan, M. D. Structure and replication of yeast prions. 1998. *Cell* **94**: 13-16.
- Lakowicz, J. R. Principles of fluorescence spectroscopy. 1986. Cap. 11, Plenum Press, NY: 341-379.
- Langer, T., Lu, C., Echols, H., Flanagan, J., Hayer, M. K. i Hartl, F. U. Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. 1992. *Nature* **356(6371)**: 683-689.
- Laskowska, E., Kuczynska-Wisnik, D., Skorko-Glonek, J. i Taylor, A. Degradation by proteases Lon, Clp and HtrA, of *Escherichia coli* proteins aggregated *in vivo* by heat shock; HtrA protease action *in vivo* and *in vitro*. 1996. *Mol. Microbiol.* **22**: 555-571.
- Li, T. M., Hook, H. G. i Drickamer, H. G. Plurality of pressure-denatured forms in chymotrypsinogen and lysozyme. 1976. *Biochemistry* **15**: 5571-5580.
- Lilie, H., Schwarz, E. i Rudolph, R. Advances in refolding of proteins produced in *E.coli*. 1998. *Current Opinion on Biotechnology* **9**: 497-501.
- Llorca, O., Martin-Benito, J., Gomez-Puertas, P., Ritco-Vonsvovici, M., Willison, K. R., Carrascosa, J. L. i Valpuesta, J. M. Analysis of the interaction between the eukaryotic chaperonin CCT and its substrates actin and tubulin. 2001. *J. Structural Biology* **135 (2)**: 205-218.
- Luckacovic, T. i Venetanier, P. Increased mutation in bacteria overexpressing a cloned foreign gene. 1991. *Mutation Res.* **264**: 25-28.
- Lutkenhaus, J. i Addinall, S. G. Bacterial cell division and the Z ring. 1997. *Annu. Rev. Biochem.* **66**: 93-116.
- Maachupali-Reddy, J., Kelly, B. D. i De Berniez Clark, E. Effect of inclusion body contaminants on the oxidative renaturation of hen egg whit lysozyme. 1997. *Biotechnol Prog* **13**: 144-150.
- Mantulin, W. W. i Pownall, H. J. Reversible folding reactions of human apolipoprotein A-I: pressure and guanidinium chloride effects. 1985. *Biochim Biophys Acta* **836**: 215-221.
- Marco, S., Carrascosa, J. i Valpuesta, J. M. Reversible interaction of beta-actin along the channel of the TCP-1 cytoplasmic chaperonin. 1994. *Biophysical J.* **67**: 364-368.
- Marston, F.A. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. 1986. *Biochem. J.* **240**: 1-12.
- Mateu, MG., Martinez, MA., Capucci, L., Ireu, D., Giralt, E., Sobrino, F., Brocchi, E. i Domingo, E. A single amino acid substitution affects multiple overlapping epitopes in the major antigenic site of foot-and-mouth-disease virus of serptype. 1990. *J. Gen. Virol.* **71** : 629-637.
- Mateu, MG., Martinez, MA., Rocha, E., Ireu, D., Parejo, J., Giralt, E., Sobrino, F. i Domingo, E. Implication of a quasispecies genome structure: effect of frequent, naturally occurring amino acid substitutions on the antigenicity of foot-and-mouth disease virus. 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **86**: 5883-5887.
- Mateu, MG., Rocha, E., Vicente, O., Vayareda, F., Navaltropo, C., Ireu, D., Pedroso, E., Giralt, E., Enjuanes, L. i Domingo, E. Reactivity with monoclonal antibodies of viruses from episode of foot-and-mouth disease. 1987. *Virus Res.* **8**: 261-274.
- Matthews, B.W. Solvent content of protein crystals. 1974. *Journal of Molecular Biology* **33**: 491-497.
- McCarty, J. S. i Walker, G. C. DnaK mutants defective in ATPase activity are defective in negative regulation of the heat shock response: expression of mutant DnaK proteins results in filamentation. 1994. *J. Bacteriol.* **176 (3)**: 764-80.
- Melki, R., Batelier, G., Soulie, S. i Williams, R. C. Cytoplasmic chaperonin containing TCP-1: structural and functional characterization. 1997. *Biochemistry* **36**: 5817-5826.
- Mhammedi-Alaoui, A., Pato, M., Gama, M. J. i Toussaint, A. A new component of bacteriophage Mu replicative transposition machinery: the *E.coli* ClpX protein. 1994. *Mol. Microbiol.* **11**: 1109-1116.
- Miller, C. G. Protein degradation and proteolytic modification. 1996. *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. Washington DC: ASM. 2nd. ed. 938-954.
- Mitraki, A., Fane, B., Haase-Pettingell, C., Sturtevant, J. i

BIBLIOGRAFIA

- King, J. Global suppression of protein folding defects and inclusion body formation. 1991. *Science* **253**: 54-58.
- Mogk, A., Tomoyasu, T., Goloubinoff, P., Rudiger, S., Roder, D., Langen, H., i Bukau, B. Identificatiob og thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion od aggregation by DnaK and ClpB. 1999. *EMBO J.* **18**: 6934-6949
- Moore, J.T., Uppal, A., Maley, F. i Maley, G. F. Overcoming inclusion body formation in a high-level expression system. 1993. *Protein Expr.Purif.* **4(2)**: 160-163.
- Morild, E. Pressure variation of enzymatic reaction rates: yeast and liver alcohol dehydrogenase. 1977. *Biophys.Chem.* **6**: 351-362.
- Muchowski, P.J., Ning, K., D'Souza-Schorey, C. i Fields, S. Requirement of an intact microtubule cytoskeleton for aggregation and inclusion body formation by a mutant huntingtin fragment. 2002. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99 (2)**: 727-732.
- Negro, A., Onisto, M., Grassato, L., Caenazzo, C. i Garbisa, S. Recombinant human TIMP-3 from *Escherichia coli*: synthesis, refolding, physico-chemical and functional insights. 1997. *Protein engineering* **10**: 593-599.
- Netzer, W. J. i Hartl, F. U. Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and independent mechanisms. 1998. *Trends Biochem.Sci.* **23(2)**: 68-73.
- Nishihara, K., Kanemori, M., Kitagawa, M., Yanagi, H. i Yura, T. Chaperone coexpression plasmids: differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*. 1998. *Appl.Environ.Microbiol.* **64(5)**: 1694-1699.
- Nishihara, K., Kanemori, M., Y i Yura, T. Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli*. 2000. *Appl.Environ.Microbiol.* **66(3)**: 884-889.
- Oberg, K., Chrnyk, B.A., Wetzel, R. i Fink, A.L. Nativelike secondary structure in interleukin-1 beta inclusion bodies by attenuated total reflectance FTIR. 1994. *Biochemistry* **33**: 2628-2634.
- Parsell, D. A., Kowal, A. S., Singer, M. A. i i Lindquist, S. Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. 1994. *Nature* **372**: 475-478.
- Parsell, D.A. i Sauer, R.T. The structural stability of a protein is an important determinant of its proteolytic susceptibility in *Escherichia coli*. 1989. *J. Biol. Chem.* **264**: 7590-7595.
- Peng, X., Jonas, J. i Silva, J. L. Molten-globule conformation of Arc repressor monomers determined by high-pressure ¹H NMR spectroscopy. 1993. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**: 1776-1780.
- Perrett, S. i Zhou, J. M. Exping the pressure technique: insights into protein folding from combined use of pressure and chemical denaturants. 2002. *Biochim Biophys Acta* **1595**: 210-223.
- Prouty, W.F., Karnovsky, M.J. i Goldberg, A.L. Degradation of abnormal proteins in *Escherichia coli*. Formation of protein inclusions in cells exposed to amino acid analogs. 1975. *J. Biol. Chem.* **250**: 1112-1122.
- Prybycien, T., Dunn, JP., Valax, P. i Georgiou, G. Secondary structure characterization of b-lactamase inclusion bodies. 1994. *Protein engineering* **7**: 131-136.
- Puri, N. K., Cardamone, M., Crivelli, E. i Traeger, J. C. Characterization of a truncated form of recombinant porcine growth hormone generated *in vitro* during solubilization of inclusion bodies. 1993. *Protein Expr.Purif.* **4**: 164.
- Qiu, H., Wen, D., Belanger, A. i Bunn, HF. Over-expression i refolding of biologically active human erythropoietin from *E.coli*. 1997. *Protein engineering* **10 (suppl)**: 33.
- Radford, S. E. Protein folding: progress made and promises ahead. 2000. *Trends Biochem.Sci.* **25**: 611.
- Rinas, U. Synthesis rates of cellular proteins involved in translational and protein folding are strongly altered in response to overproduction of basic fibroblast growth factor by recombinant *Escherichia coli*. 1996. *Biotechnol Prog* **12**: 196-200.
- Rinas, U. i Bailey, J.E. Protein compositional analysis of inclusion bodies produced in recombinant *Escherichia coli*. 1992. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 609-614.
- Rinas, U., Boone, T.C. i Bailey, J.E. Characterization of inclusion bodies in recombinant *Escherichia coli* producing high levels of porcine somatotropin. 1993. *J. Biotechnol.* **28**: 313-320.
- Romberg, L., Simon, M. i Erickson, H.P. Polymerization of FtsZ, a bacterial homolog of tubulin. 2001. *J.Biol.Chem.* **276**: 11743-11753.
- Rosen, R., Biran, D., Gur, E., Becher, D., Hecker, M. i Ron, E. Z. Protein aggregation in *Escherichia coli*: role of proteases. 2002. *FEMS Microbiol.Lett.* **207**: 9-12.
- Rudiger, S., Schneider-Mergener, J. i Bukau, B. Its substrate specificity characterizes the DnaJ co-

- chaperone as a scanning factor for the DnaK chaperone. 2001. *EMBO J.* **20**: 1042-1050.
- Rudolph, R. i Lillie, H. *In vitro* folding of inclusion body proteins. 1996. *FASEB J.* **10**: 49-56.
- Rudolph, R., Lillie, H. i Jaenicke, R. Folding proteins. 1997. In Protein Function. A practical approach, edn 2. Edited by Creighton TE. New York: IRL Press : 57-99.
- Sachdev, D. i Chirgwin, J. M. Order of fusions between bacterial and mammalian proteins can determine solubility in *Escherichia coli*. 1998. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **244**: 933-937.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. i Maniatis, T. Molecular cloning. A Laboratory manual. 1989. *Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.*
- Sano, T. i Cantor, C. R. Expression of a cloned streptavidin gene in *Escherichia coli*. 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **87**: 142-146.
- Sasahara, K. i Nitta, K. Pressure-induced unfolding of lysozyme in aqueous guanidinium chloride solution. 1999. *Protein Science* **8**: 1469-1474.
- Schein, C. H. Optimizing protein folding to the native state in bacteria. 1991. *Current Opinion in Biotechnology* **2(5)**: 746-750.
- Schewder, T., Lee, K. H., Lomovskaya, O. i Matin, A. Regulation of *Escherichia coli* starvation sigma factor (σ^s) by ClpXP protease. 1996. *J. Bacteriol.* **178**: 470-476.
- Serio, T. R., Cashikar, A. G., Kowal, A. S., Sawicki, G. J. i Lindquist, S. L. Self-perpetuating changes in Sup35 protein conformation as a mechanism of heredity in yeast. 2001. *Biochem Soc Symp* **68**: 35-43.
- Serio, T. R. i Lindquist, S. L. Protein-only inheritance in yeast: something to get [PSI⁺] -ched about. 2000. *Trends Cell Biol* **10(3)**: 98-105.
- Sha, B., Lee, S. i Cyr, D. M. The crystal structure of the peptide-binding fragment from the yeast Hsp40 protein Sis1. 2000. *Structure Fold. Des.* **8(8)**: 799-807.
- Shauder, B., Blöcker, R., Frank, R. i MacCarthy, J. E. G. Inducible expression vectors incorporating the *Escherichia coli atpE* translational initiation region. 1987. *Gene* **72**: 279-283.
- Shearston, J. R. i Baneyx, F. Biochemical characterization of the small heat shock protein IbpB from *Escherichia coli*. 1999. *J. Biol. Chem.* **274 (15)**: 9937-9945.
- Shimura, H., Schlossmacher, M. G., Hattori, N., Frosch, M. P., Trockenbacher, A., Schneider, R., Mizuno, Y., Kosik, K. S. i Selkoe, D. J. Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. 2001. *Science* **293(5528)**: 263-269.
- Sigler, P. B. Structure and function in GroEL-mediated protein folding. 1998. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 581.
- Silva, J. L., Fogue, D., Da Poian, A. i Prevelige, P. E. The use of hydrostatic pressure as a tool to study viruses and other macromolecular ensembles. 1996b. *Current Opinion in Structural Biology* **6**: 166-175.
- Silva, J. L. i Weber, G. Pressure stability of proteins. 1993. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **44**: 89-113.
- Simmons, T., Newhouse, Y. M., Arnold, K. S. i Innerarity, T. L. Human low density lipoprotein receptor fragment. Successful refolding of a functionally active ligand-binding domain produced in *Escherichia coli*. 1997. *J. Biol. Chem.* **272**: 25531-25536.
- Sisodia, S. S. Nuclear inclusions in glutamine repeat disorders: are they pernicious, coincidental, or beneficial? 1998. *Cell*, **95** : 41-53.
- Skare, J. T., Roof, S. K. i Postle, K. A. A mutation in the amino terminus of a hybrid TrpC-TonB protein relieves overproduction lethality i results in cytoplasmic accumulation. 1989. *J. Bacteriol.* **171**: 4442-4447.
- Smeller, L. Pressure effect on the temperature-induced unfolding i tendency to aggregate o myoglobin. 1999. *Biochemistry*, **38** : 3816-3820.
- Speed, M. A., King, J. i Wang, D. I. C. Polymerization mechanism of polypeptide chain aggregation. 1997. *Biotechnol. Bioeng.* **54**: 333-343.
- Speed, M. A., Wang, D. I. i King, J. Specific aggregation of partially folded polypeptide chains: the molecular basis of inclusion body composition. 1996. *Nature Biotechnology* **14**: 1283-1287.
- St. John, R. J., Carpenter, J. F. i Riolph, T. W. R. High pressure fosters protein refolding from aggregates at high concentrations. 1999. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **96**: 13029-13033.
- Stempfer, G. i Rudolph, R. Improved refolding of a matrix-bound fusion protein. 1996. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **782**: 506-512.
- Stoyan, T., Michaelis, U., Schooltink, H., Van Dam, M., Rudolph, R., Heinrich, P. C. i Rose-John, S. Recombinant soluble human interleukin-6 receptor. Expression in *Escherichia coli*, renaturation and purification. 1993.

BIBLIOGRAFIA

- Eur.J.Biochem.* **216**: 239-245.
- Stöckel, J. i Hartl, F. U. Chaperonin-mediated de novo generation of prion protein aggregates. 2001. *J.Mol.Biol.* **2**: 861-872.
- Striberg, L. i Enfors, S.O. Factors influencing inclusion body formation in the production of a fused protein in *Escherichia coli*. 1991. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1669-1674.
- Strohmaier, R., Franze, R. i Adam, K. H. Localisation and characterization of the antigenic position of the FMDV immunizing protein. 1982. *J.Gen.Virol.* **59**: 295-306.
- Studier, F. W. i Moffatt, B. A. Use of bacteriophage T7 RN polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. 1986. *J.Mol.Biol.* **189(1)**: 113-130.
- Suzuki, C. K., Rep, M., Maarten, J., Suda, K., Grivell, L. A. i Schatz, G. ATP-dependent proteases that also chaperone protein biogenesis. 1997. *Trends Biochem.Sci.* **22**: 118-123.
- Takano, K. i Yutani, K. A new scale for side-chain contribution to protein stability based on the empirical stability analysis of mutant proteins. 2001. *Protein engineering* **14(8)**: 525-528.
- Takeda, N., Kato, M. i Taniguchi, Y. Pressure- and thermally- induced reversible changes in the secondary structure of ribonuclease A studied by FTIR spectroscopy. 1995. *Biochemistry* **34**: 5980-5987.
- Taylor, G., Hoare, M., Gray, D.R. i Marston, F.A.O. Size and density of protein inclusion bodies. 1986. *Biotechnology* **4**: 553-557.
- Taylor, J. P., Hardy, J. i Fischbeck, K. H. Toxic proteins in neurodegenerative disease. 2002. *Science* **296(5575)**: 1991-1995.
- Teter, S. A., Houry, W. A., Ang, D., Tradler, T., Rockabri, D., Fischer, G., Blum, P., Georgopoulos, C. i Hartl, F. U. PLYpeptide flux through bacterial Hsp70: DnaK cooperates with trigger factor in chaperoning nascent chains. 1999. *Cell* **97(6)**: 755-765.
- Thomas, J.G., Ayling, A. i Baneyx, F. Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*. To fold or to refold. 1997. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **66**: 197-238.
- Thomas, J.G. i Baneyx, F. Protein folding in the cytoplasm of *Escherichia coli*: requirements for the DnaK-DnaJ-GrpE i GroEL-GroES molecular chaperone machines. 1996. *Mol. Microbiol.* **21**: 1185-1196.
- Thomas, J.G. i Baneyx, F. Roles of the *Escherichia coli* small heat shock proteins IbpA and IbpB in thermal stress management: comparison with ClpA, ClpB, and HtpG *in vivo*. 1998. *J. Bacteriol.* **180**: 5165-5172.
- Tian, G., Vainberg, I. E., Tap, W. D., Lewis, S. A. i Cowan, N. J. Quasi-native chaperonin-bound intermediates in facilitated protein folding. 1995. *J.Biol.Chem.* **270**: 23910-23913.
- Tobias, J. W., Shrader, T. E., Rocap, G. i Varshavsky, A. The N-end rule in bacteria. 1991. *Science* **254**: 1374-1376.
- Tokatlidis, K., Dhurjati, P., Millet, J., Beguin, P. i Aubert, J.P. High activity of inclusion bodies formed in *Escherichia coli* overproducing *Clostridium thermocellum* endoglucanase D. 1991. *FEBS Lett.* **282**: 205-208.
- Tomoyasu, T., Mogk, A., Langen, H., Goloubinoff, P. i Bukau, B. Genetic dissection of the roles of chaperones and proteases in protein folding and degradation in the *Escherichia coli* cytosol. 2001. *Mol. Microbiol.* **40**: 397-413.
- Uehara, T., Matsuzawa, H. i Nishimura, A. HscA is involved in the dynamics of FtsZ-ring in *Escherichia coli* K12. 2001. *Genes Cells* **6 (11)**: 1017-1018.
- Uptain, S. M., Sawicki, J., Caughey, B. i Lindquist, S. Strains [PSI⁺] are distinguished by their efficiencies of prion-mediated conformational conversion. 2001. *EMBO Journal* **20 (22)**: 6236-6245.
- Valax, P. i Georgiou, G. Molecular characterization of beta-lactamase inclusion bodies produced in *Escherichia coli*. 1993. *Biotechnol. Prog.* **9**: 539-547.
- Veinger, L., Diamant, S., Buchner, J. i Goloubinoff, P. The small heat-shock protein IbpB from *Escherichia coli* stabilizes stress-denatured proteins for subsequent refolding by a multichaperone network. 1998. *J. Biol. Chem.* **273**: 11032-11037.
- Vidugiris, G. J. A. i Royer, C. A. Determination of the volume changes for pressure-induced transitions of apomyoglobin between the native, molten globule and unfolded state. 1998. *Biophysical J.* **75**: 463-470.
- Vila, P., Corchero, J. L., Cubarsi, R. i Villaverde, A. Enhanced fitness of recombinant protein synthesis in the stationary phase of *Escherichia coli* batch cultures. 1997. *Biotechnology Letters* **19(3)**: 225-228.
- Villaverde, A., Benito, A., Viaplana, E. i Cubarsi, R. Fine regulation of Cl857-controlled gene expression in continuous culture recombinant *Escherichia coli* by temperature. 1993. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3485-3487.

- Vogel, J. L., Parsell, D. A. i Lindquist, S. L. Heat-shock proteins Hsp104 and Hsp70 reactivate mRNA splicing after heat inactivation. 1995. *Curr.Biol.* **5**: 306-317.
- Wall, J.G. i Pluckthun, A. Effects of overexpressing folding modulators on the *in vivo* folding of heterologous proteins in *Escherichia coli*. 1995. *Current Opinion in Biotechnology* **6**: 507-516.
- Weickert, M. J., Doherty, D. H., Best, E. A. i Olins, P. O. Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*. 1996. *Current Opinion in Biotechnology* **7(5)**: 494-499.
- Wetzel, R. i Chrnyk, B.A. Inclusion body formation by interleukin-1 beta depends on the thermal sensitivity of a folding intermediate. 1994.. *FEBS Lett.* **350**: 245-248.
- Wickner ,S., Maurizi, M.R. i Gottesman, S. Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. 1999. *Science* **286**: 1888-1893.
- Wilkinson, D. L. i Harrison, R. G. Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. 1991. *Bio/Technology* **9**: 443-448.
- Winther, M., Bomford, R., Allen, G. i Brown, F. Bacterial fusions as immunogens. 1986. *Vaccines* **86**: 79-84.
- Wollin, R., Eriksson, U. i Lindberg, A. A. *Salmonella* bacteriophage glycanases: endorhamnosidase activity of bacteriophages P27, 9NA, and KB1. 1981. *J.Virol.* **38**: 1025-1033.
- Wong, P. T. i Heremans, K. Pressure effects on protein secondary structure and hydrogen deuterium exchange in chymotrypsinogen: a Fourier transform infrared spectroscopic study. 1988. *Biochim Biophys Acta* **956**: 1-9.
- Worrall, D.M. i Goss, N.H. The formation of biologically active beta-galactosidase inclusion bodies in *Escherichia coli*. 1989. *Aust. J. Biotechnol.* **3**: 28-32.
- Yaffe, M., Farr, G., Miklos, D., Horwick i Sternlicht, M. L. TCP-1 complex is a molecular chaperone in tubulin biogenesis. 1992. *Nature* **358**: 245-248.
- Yon, J. M. The specificity of protein aggregation. 1996. *Nature Biotechnology* **14**: 1231.
- Yura. Regulation of heat-shock response. 1999. *Curr.Opin.Microb.* **2**: 153-158.
- Zhou, J. M., Zhu, L. i Balny, C. Inactivation of creatin kinase by high pressure may precede dimer dissociation. 2000. *Eur.J.Biochem.* **267**: 1247-1253.
- Zolkiewski, M. ClpB cooperates with DnaK, DnaJ, and GrpE in suppressing protein aggregation. A novel multi-chaperone system from *Escherichia coli*. 1999. *J.Biol.Chem.* **274(40)**: 28083-28086.