

## Corpi di Inclusione

I corpi di inclusione sono un fenomeno spesso riportato in biotecnologie, sin dall'inizio della produzione di proteine ricombinanti. Si osserva che la produzione di grandi quantità di proteine ricombinanti risulta nella formazione di aggregati che chiamiamo corpi di inclusione.

La formazione di corpi di inclusione è evidente anche microscopicamente.

In *E. coli* i corpi di inclusione hanno di solito una forma cilindrica, non sono contornati da membrana e se ne osservano uno o pochi per cellula. Si possono localizzare sia nel citoplasma che nel periplasma.

I corpi di inclusione possono essere isolati ed analizzati, e si vede che il contenuto preponderante è la proteina ricombinante (95%). Si trovano anche sHsp come IbpA ed IbpB e altre proteine che possono restare intrappolate nel corpo di inclusione.

La vecchia definizione di corpi di inclusione è quella di aggregati inerti, non attivi, disorganizzati che contengono proteine in stato non nativo che sono protette dall'attacco proteolitico.

Si è successivamente riportato che i corpi di inclusione non sono esattamente aggregati amorfi. Esperimenti in anni seguenti hanno riportato attività catalitica nei corpi di inclusione. Dallo studio delle proteine che formano i corpi di inclusione si sono ritrovate proteine con struttura native-like, si è quindi ipotizzato che alcune delle proteine nell'aggregato possano mantenere una struttura simile a quella nativa, con il mantenimento di una percentuale variabile di attività biologica.

### *Sistema modello*

Il gruppo di Villaverde ha lavorato con sistemi modello per lo studio sistematico dei corpi di inclusione.

Il gruppo lavora con proteine chimeriche. Una parte di queste proteine è un dominio che favorisce l'aggregazione. Questo dominio potrebbe essere anche una proteina virale di cui si conosce la tendenza ad aggregare.

La parte *aggregation prone* viene fusa ad un'altra proteina che ha una attività biologica rilevabile. Nel caso specifico il gruppo ha usato la *beta galattosidasi* (LAC), che è facilmente rilevabile perché l'enzima attivo è in grado di idrolizzare un substrato colorimetrico.

Il dominio di aggregazione può alternativamente essere fuso alla GFP (*green fluorescent protein*), che quindi può essere rilevata mediante la fluorescenza.

L'ipotesi iniziale è che la proteina aggregata non sia attiva, mentre la proteina solubile sì. Questo sistema sperimentale permette di avere una proteina chimerica che si può fare aggregare in base alle condizioni sperimentali.

Le proteine chimeriche vengono espresse in *E. coli* mediante un promotore inducibile.

Il primo punto studiato è se l'aggregazione sia un processo reversibile o meno.

Questo non è un problema facile da studiare, perché la cellula oltre alla proteina indotta produce anche tutto il resto delle proteine normalmente prodotte, e può mascherare l'aspetto dell'aggregazione.



Il gruppo decide di bloccare la sintesi proteica mediante cloramfenicolo.

Un altro sistema utilizzabile è abbassare la temperatura.

Le due strategie di stop hanno però un effetto diverso. Il cloramfenicolo blocca tutta la sintesi proteica. L'abbassamento della temperatura rallenta la sintesi proteica. Il rallentamento della sintesi può essere utile perché si evita la saturazione del sistema di controllo qualità della cellula.

Negli esperimenti in cui si formano gli aggregati, questi ultimi possono essere separati dalla frazione solubile della cellula, mediante passaggi di centrifugazione in cui il corpo di inclusione tende a sedimentare. Si riesce quindi a misurare sempre la quantità di proteina aggregata e di proteina solubile.

Nell'esperimento vediamo che i ricercatori usano una proteina chimerica che contiene in una porzione la proteina virale che facilita l'aggregazione e dall'altra la beta galattosidasi per la rilevazione dell'attività.

Il primo esperimento è fatto inducendo la produzione della proteina chimerica alla temperatura di 42°C.

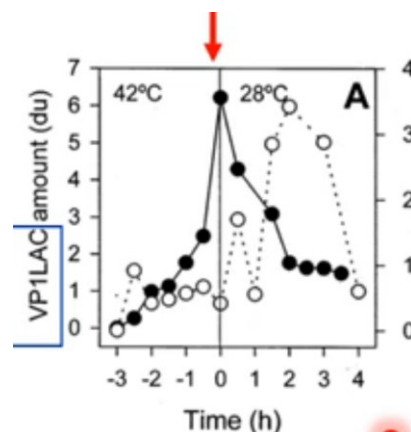
Pallini neri = Proteina in forma aggregata

Pallini bianchi = proteina in forma solubile

Si vede che la quantità della proteina chimerica nei corpi di inclusione (in nero) aumenta fino al momento in cui viene dato cloramfenicolo alle cellule.

Da quel momento si arresta la sintesi proteica della cellula e si porta la temperatura a 28°C. Si osserva una diminuzione della quota di proteina reporter aggregata, mentre aumenta la quota della stessa proteina in forma solubile (in bianco).

L'aumento della quota di proteina solubile a sintesi proteica bloccata indica che la proteina in forma solubile proviene dai corpi di inclusione.

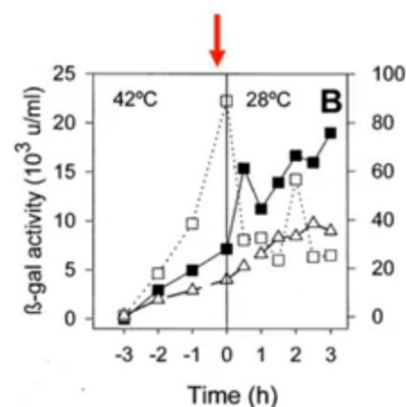


Quadrati bianchi =  $\beta$ -gal solubile

Quadrati neri =  $\beta$ -gal aggregato

Triangoli = IbpA-

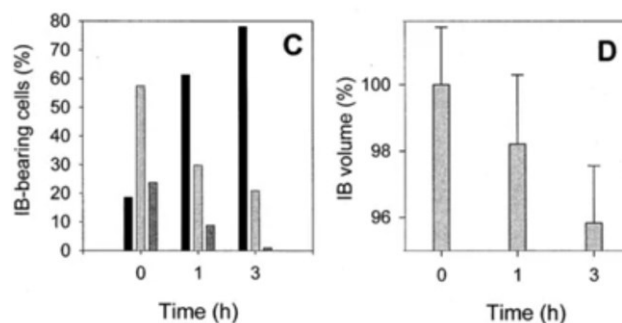
Quando si misura l'attività beta-galattosidasi nello stesso modo, vediamo l'attività catalitica rispetto alla proteina solubile è molto ridotta negli aggregati. Al blocco della sintesi con cloramfenicolo e con l'abbassamento della temperatura vediamo un aumento dell'attività, il che indica rilascio di proteina solubile dagli aggregati.



In seguito alla somministrazione di cloramfenicolo vediamo che i corpi di inclusione si riducono sia in numero che in volume.

Questi dati indicano che effettivamente il processo di aggregazione è reversibile.

In molte condizioni questo processo è mascherato dalla normale sintesi proteica delle cellule. In questo caso il blocco della sintesi ha permesso di osservare il fenomeno.



La formazione di corpi di inclusione non è quindi un punto cieco, ma una situazione transitoria. Il corpo di inclusione può essere considerata una riserva di proteine mal ripiegate che in condizioni ottimali possono essere recuperate e correttamente ripiegate.

### **Ruolo biologico dei corpi di inclusione**

L'ipotesi è che un corpo di inclusione sia un accumulo di proteine, protette dall'attacco delle proteasi, che possono essere mantenute in questo stato fino a quando gli chaperoni risultano nuovamente disponibili al loro recupero.

Non sempre il recupero delle proteine è comunque possibile dai corpi di inclusione.

Ci si è chiesti se i corpi di inclusione siano tossici, misurando la vitalità della cellula alla presenza di corpi di inclusione.

Il risultato dell'esperimento è che i corpi di inclusione non sono tossici. Per le cellule sono più pericolose le forme intermedie di folding in soluzione. In condizioni fisiologiche di funzionalità del sistema degli chaperoni, i corpi di inclusione non sono tossici.

### **Attività biologica dei corpi di inclusione**

Gli esperimenti hanno dimostrato inoltre che i corpi di inclusione mostravano una attività catalitica residua variabile, che variava da ridotte percentuali a percentuali di attività maggiori rispetto alla proteina in soluzione.

Il fatto che alcune proteine mostrassero una maggiore attività catalitica rispetto alla proteina in soluzione ha fatto riflettere sulla possibilità di utilizzare gli aggregati come biocatalizzatori.

L'aggregazione può essere vista come un metodo alternativo di immobilizzazione.

Il gruppo della prof. Lotti ha provato ad usare gli aggregati come biocatalizzatori.

Il lavoro è stato fatto su una lipasi da un organismo psicrofilo, *Pseudomonas fragi*, molto sensibile alla temperatura.

In genere l'espressione della proteina in *E. coli* è fatta a 37°C. A 37°C la produzione delle proteine è veloce, ma le proteine aggregano in modo significativo.

Si è visto che abbassando la temperatura di coltura dell'organismo trasformato a 27°C si riusciva ad ottenere una frazione di proteina in forma solubile.

L'esperimento voleva comparare l'attività catalitica dell'aggregato formato a 37°C ed a 27°C per vedere se ci fossero differenze.

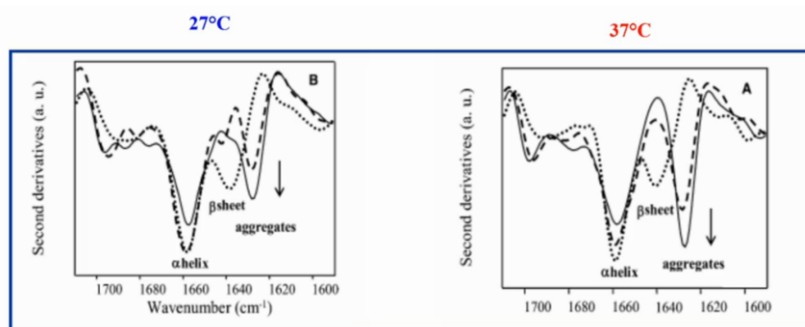
Lo spettro FTIR della stessa proteina ottenuto a diverse temperature è effettivamente diverso.

Vediamo che la struttura della stessa proteina a temperature diverse è diversa.

A 37°C vediamo che prevale il picco dell'aggregazione, mentre si smorzano i picchi correlati alla struttura nativa.

Il saggio colorimetrico dell'attività enzimatica mostra che effettivamente il corpo di inclusione ha attività catalitica.

Si è anche dimostrato che è possibile modulare la struttura della proteina ricombinante all'interno del corpo di inclusione usando strategie particolari durante la fase di produzione, come ad esempio la bassa temperatura.



### **Pull down domains**

Nel corso degli anni si è visto che i corpi di inclusione non sono abbastanza saldi nell'associazione proteina-proteina, e tendono quindi in corso di catalisi a rilasciare le proteine in essi contenute. Questo non è per forza uno svantaggio nel processo catalitico, ma può essere un problema quando si vuole recuperare l'enzima per un eventuale riutilizzo e per la purificazione del prodotto della catalisi.

Un approccio per evitare la dissociazione è quello di lasciare aggregare le proteine in soluzione e poi effettuare un cross-linking per stabilizzare l'aggregato.

Un altro approccio consistere nel fondere l'enzima di interesse ad un dominio peptidico che ha una forte tendenza all'aggregazione.

Ci sono domini che aggregano formando aggregati molto stabili, che possono risultare molto utili per questo tipo di utilizzo.

È importante che le parti enzimatiche che devono catalizzare la reazione si dispongano con un orientamento verso l'esterno dell'aggregato.

Questi aggregati così formati possono essere successivamente sottoposti ad altri processi, come l'incapsulamento, il cross-linking o l'immobilizzazione su un supporto.

### **Analisi degli aggregati**

La modulazione degli stati conformazionali delle proteine all'interno degli aggregati, e quindi la regolazione dell'attività biologica di queste proteine è stato studiato nel dettaglio.

Lo scopo era valutare il contenuto degli aggregati e come questo cambia nel corso degli esperimenti.

Si è usato come modello una proteina di fusione formata da GST (*Glutathione S-Trasferasi*, che ha una lieve tendenza ad aggregare) e GFP (fluorescente).

Questo sistema ha una attività catalitica facilmente rilevabile grazie alla fluorescenza della GFP, e se ne può regolare l'aggregazione con la variazione di temperatura.

La proteina di fusione aggrega a 30°C ed è parzialmente solubile a 20°C.

Si fa quindi produrre la proteina eterologa, si fa l'estratto cellulare e si separano le componenti su un gradiente di densità.

Questo è un modo molto utilizzato per separare componenti cellulari che hanno un diverso coefficiente di sedimentazione. È quindi una procedura di centrifugazione fatta in provette con un gradiente di densità che varia dal fondo alla cima della provetta. In seguito alla centrifugazione le particelle migreranno fino al punto della provetta in cui trovano la densità adatta a fermarle. Da lì si può recuperare.

Vediamo nell'immagine che in alto si dispongono le proteine solubili, mentre sul fondo si posizionano gli aggregati.

Non c'è una ripartizione netta tra aggregati e non aggregati, ma un continuum.

L'attività si vede dalla fluorescenza.

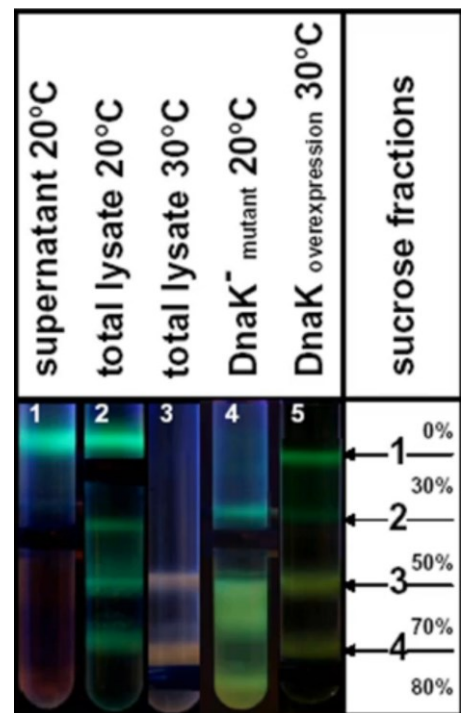
A 30°C vediamo che la proteina è tutta insolubile e tutta inattiva.

A 20°C nella provetta 1 abbiamo solo il surnatante.

Nella provetta 2 abbiamo il lisato totale, e vediamo che nelle bande sul fondo (aggregati) si osserva della fluorescenza.

Nella provetta 4 in cui si ha la distruzione del gene DnaK- vediamo che la proteina di fusione aggrega in forma non funzionale.

Nella provetta 5 dove DnaK è stata overespressa a 30°C la proteina tende di più alla conformazione nativa.



Le varie bande possono essere raccolte in modo separato per analizzarne il contenuto.

Se usiamo anticorpi contro specifiche proteine per rilevarne la presenza, troviamo chaperoni che cambiano a seconda che la proteina sia in una fase più o meno aggregata.

Questo dimostra che gli chaperoni possono rimanere intrappolati nei corpi di inclusione.

Questo esperimento ha messo in evidenza che chaperoni diversi possono avere effetti diversi sulla solubilità di proteine ricombinanti.

Sono quindi stati fatti esperimenti in cui si usavano vari chaperoni ai corpi di inclusione per recuperarne il contenuto.

|       | Fraction 1 | Fraction 2 | Fraction 3 | Fraction 4 |
|-------|------------|------------|------------|------------|
| DnaK  |            |            |            |            |
| ClpB  |            |            |            |            |
| IbpB  |            |            |            |            |
| GroEL |            |            |            |            |

### Solubilità ed attività non sempre coincidono

Un aspetto interessante è emerso da studi del gruppo di Villaverde. Il gruppo introduce il concetto di *protein quality*, per capire se la proteina era attiva o non attiva.

C'era la tendenza da parte di diversi gruppi a cercare di avere produzioni di proteine eterologhe in forma solubile, ma ci si è accorti che a volte i catalizzatori in forma solubile non sono necessariamente più attivi.

Si è dimostrato che ci sono modi per direzionare la produzione verso proteine solubili e proteine insolubili. Si è visto che la rimozione di alcuni chaperoni causa una maggiore percentuale di aggregazione, ma allo stesso tempo si è osservato che la proteina prodotta (proteina di fusione con GFP) era più attiva nella forma aggregata rispetto a quella solubile.

La proteina eterologa può essere in forma attiva o in forma inattiva. La concezione comune è che se la proteina è aggregata non è funzionale, mentre la forma solubile è funzionale.

Gli esperimenti hanno dimostrato che non sempre è così.

La stessa proteina può essere prodotta in condizioni diverse. Quando le condizioni favoriscono un folding corretto la proteina può aggregare mantenendo una forma native-like, e quindi almeno parzialmente attiva.

Quando le condizioni sono sfavorevoli per il folding, la proteina avrà difficoltà a ripiegarsi in conformazione nativa, per cui quando la proteina aggrega si avranno corpi di inclusione contenenti la proteina in forma non nativa, e quindi poco o nulla funzionale.

### **Propensione all'aggregazione**

Si osserva a volte una tendenza all'aggregazione nella produzione di proteine eterologhe. Non sempre se ne riesce a comprendere il motivo.

In aiuto ci sono dei web server che permettono, attraverso analisi bioinformatica, di predire la tendenza della proteina ad aggregare, sulla base della sequenza.

Da questa analisi si potrebbe trovare che ci sono regioni della proteina che favoriscono l'aggregazione. Si potrebbe provare ad agire su queste con tecniche di mutagenesi sito diretta, ma difficilmente questi metodi funzionano, per cui più frequentemente si applica la mutagenesi random.

Sappiamo anche le proteine intrinsecamente disordinate sono generalmente solubili, nonostante si trovino in forma distesa. Queste proteine sono caratterizzate dall'esposizione di aminoacidi polari.

In tutte le proteine ci sono zone particolarmente aggregogeniche, che sono quelle più ricche di aminoacidi idrofobici. Le nostre proteine non aggregano in massa perché intorno a queste zone aggregogeniche l'evoluzione ha posizionato aminoacidi molto polari, idrofilici e spesso carichi, che impediscono l'aggregazione.

Di questo si può tener conto nell'esecuzione di ingegneria proteica.

La modifica di una proteina con l'ingegneria proteica per renderla più solubile è una strategia ancora poco usata, per l'incertezza nei risultati. Si cerca quindi spesso di controllare la situazione (come?).

Al di là della comodità di avere la proteina solubile, la formazione di corpi di inclusione non è vista male dal ricercatore, perché in fondo questi sono una riserva di proteina relativamente pura che si può isolare con opportune tecniche.

Dato che per recuperare le proteine dai corpi di inclusione queste vanno prima denaturate, è importante avere un buon protocollo di refolding per riformare la struttura nativa. La strategia da utilizzare dipende dalla proteina di interesse e va quindi provata caso per caso.

Ipotizzando di volere proteine solubili, ma la nostra proteina tende ad aggregare.

Un metodo immediato è cambiare le condizioni nelle quali vengono prodotte le proteine.

Si può agire su:

- temperatura
- cambiare i ceppi di espressione
- cambiare il medium di coltura
- rallentare la velocità della sintesi
- includere degli chaperoni o altre molecole che aiutano il folding

Si può anche decidere di modificare la proteina di interesse.

Per ridurre l'aggregazione possiamo far produrre meno proteina.

Ci sono terreni di coltura che supportano una bassa crescita ed un metabolismo cellulare ridotto.  
Si può mettere meno induttore.  
Si può abbassare la temperatura.

Si può anche fare una proteina di fusione.

Possiamo legare la proteina di interesse ad un tag di solubilità, che la aiuti ad andare nella sua conformazione funzionale.

Ci sono in commercio vettori di espressione che contengono molte di queste sequenze tag, tra cui la *maltose binding protein* e la *glutathione s-trasferasi*. Alcuni usano la fusione con sequenze sintetiche molto idrofiliche.

Si può fare l'ingegneria proteica

Si possono far coesprimere vari chaperoni.

Questa tecnica è stata utilizzata dal gruppo di De Marco, e ci si è accorti che la strategia non è semplice da attuare. Ogni proteina ha delle esigenze particolari, spesso non conosciute a priori, per cui la scelta degli chaperoni va ottimizzata caso per caso. Inoltre la produzione di chaperoni si aggiunge alla produzione di proteina ricombinante e a tutta la sintesi cellulare, la situazione può quindi precipitare (in tutti i sensi).

Si possono utilizzare strategie più raffinate, utilizzate da De Marco, come far produrre per prima gli chaperoni e solo successivamente la proteina di interesse, usando promotori diversi.

Da questi dati si può comprendere che è in effetti possibile cercare di spostare l'equilibrio da proteina insolubile a solubile. Non è comunque detto che la proteina solubile sia l'ideale, perché bisogna considerare la qualità conformazionale.

Interessante è notare che il corpo di inclusione può essere un oggetto interessante in biocatalisi, e con tutte le limitazioni del caso può mantenere una certa attività. Inoltre i corpi di inclusione che contengono proteine in forma native-like sono più facili da solubilizzare.

Per recuperare le proteine dai corpi di inclusione in genere questi vanno denaturati con denaturanti forti, per cui possono poi tendere a riaggregare nel processo di folding.

I corpi di inclusione con una alta percentuale di proteine native-like non richiedono condizioni drastiche di denaturazione, per cui saranno più facili da rinaturare.

### **Lavorare con i corpi di inclusione**

Lavorare coi corpi di inclusione può essere una scelta oppure una necessità.

Il processo cambia da proteina a proteina. Immaginiamo comunque di lavorare con una proteina aggregata.

Dobbiamo recuperare la proteina di nostro interesse dall'aggregato.

I passaggi consistono in:

- effettuare una lisi della cellula
- separare le proteine solubili dalle insolubili per centrifugazione, e corpi di inclusione da altre componenti cellulari sempre per centrifugazione.
- bisogna lavare bene i corpi di inclusione per rimuoverne i contaminanti

Avremo così il corpo di inclusione da cui cercare di recuperare la proteina nativa.

Se l'aggregato è formato da proteine molto denaturate e molto adese tra loro, va denaturato in un denaturante forte, come urea o guanidinio.

Dopo la denaturazione avremo una soluzione di denaturante e proteine libere ma denaturate.

Dobbiamo pensare a come far rinaturare le proteine nella maniera corretta.

Va rimosso il denaturante. Si può rimuovere tutto assieme o gradualmente. Anche qui bisogna fare esperimenti per creare il protocollo adatto, tenendo in considerazione la formazione di intermedi del folding che tendono ad aggregare.

Se il processo di rinaturazione va a buon fine si ottiene la proteina in stato nativo.

Se il corpo di inclusione contiene molte proteine in stato nativo l'intero processo è più semplice.

Quando si produce una proteina eterologa, il rischio di aggregazione è molto aumentato dell'uso di promotori forti. Va tenuto conto che durante la sintesi di proteine ricombinanti la sintesi è molto intensiva, per cui le concentrazioni di proteina intracellulare crescono e questo può saturare il sistema di proteostasi della cellula.

Una strategia utile per la produzione di proteine eterologhe e per il refolding da corpi di inclusione è l'uso degli osmoliti.

Queste molecole possono essere utili perché riproducono in vitro le condizioni di crowding che si osservano nella cellula.

Gli osmoliti si usano anche per mantenere la conformazione nativa di proteine che vanno conservate a lungo.