

## VIII. PURIFICAREA PROTEINELOR PRIN CROMATOGRAFIE DE AFINITATE FAȚĂ DE METALE

Încă de la începutul dezvoltării biochimiei ca știință, unul dintre domeniile fundamentale a fost izolarea și purificarea principiilor active. Dintre acestea, proteinele și în special enzimele s-au bucurat de un interes cu totul deosebit, purificarea lor fiind atractivă nu doar din punct de vedere teoretic, ci și din punct de vedere practic, enzimele fiind privite ca o alternativă simplă și extrem de eficientă a catalizei chimice.

Proteinele se caracterizează printr-o variabilitate mare atât a structurii, cât și a proprietăților specifice. Din acest motiv a fost imposibil până acum să se realizeze un protocol de purificare valabil fără echivoc pentru orice moleculă proteică. Cunoștințele acumulate în domeniul purificării proteinelor au permis cel mult conturarea unor reguli și principii generale de urmat în scopul adaptării unei metode de purificare la proprietățile fizico-chimice ale proteinei de interes.

Revoluția produsă de tehnicile ADN-recombinat în biologia moleculară s-a resimțit în domenii extrem de variate, printre care și cel al purificării proteinelor. Tehnicile de manipulare a ADN-ului permit acum cercetătorului să modifice secvența și implicit structura proteinei de purificat pentru a-i conferi proprietăți specifice care să faciliteze purificarea. În acest sens, una dintre cele mai utilizate tehnici este cea care se bazează pe atașarea la unul din capetele C sau N terminale ale proteinei de interes a unei „cozi” cu afinitate pentru suporturi imobilizate. Această „coadă” are dimensiuni variate, putând fi reprezentată fie de un întreg domeniu proteic, fie doar de un fragment de câțiva aminoacizi. Proteina recombinată obținută va prezenta aceeași afinitate ca și „coada” pe care o conține, putând fi astfel purificată prin tehnici specifice (Tabelul 11).

Foarte intens utilizată pentru purificarea proteinelor este așa numita „coadă” poli-His, reprezentată printr-o polipeptidă conținând 6-8 reziduuri de histidină cu afinitate foarte mare pentru  $\text{Ni}^{2+}$  sau  $\text{Co}^{2+}$ . Față de celelalte „cozi” proteice sau polipeptidice, polipeptida poli-His are marele avantaj al dimensiunilor deosebit de mici.

Aceasta face ca modificările aduse structurilor secundare și

terțiare ale proteinei de purificat să fie minime și, drept urmare, modificările activității enzimatică native a proteinei purificate să fie extrem de reduse. Au fost semnalate și cazuri foarte rare în care coada are un efect benefic, măbind activitatea proteinei (3). Deși nu foarte frecvent, au fost raportate și situații în care efectul este unul negativ, ducând la diminuarea activității biologice (4).

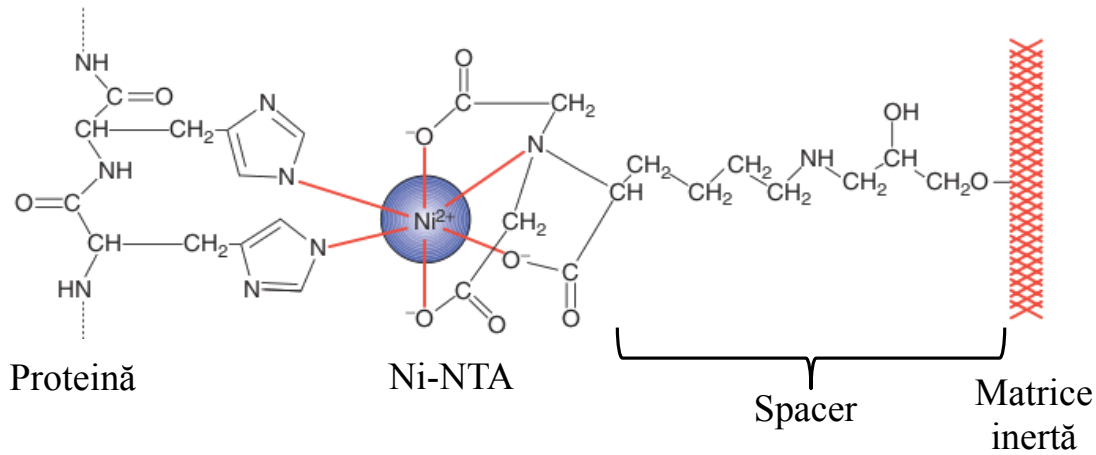
**TABEL 11.** Domenii proteice și cozi polipeptidice de fuziune utilizate frecvent în purificarea proteinelor recombinante (după Terpe, 2003 și LaVallie, 2001) (1) (2)

“Cozi” de fuziune	Metodă de purificare
<b>Domenii proteice de fuziune</b>	
MPB <sup>1</sup>	Afinitate față de amiloză
Glutation S-transferaza	Afinitate față de glutatation
Proteina A	Afinitate față de IgG
Represorul <i>lac</i>	Afinitate față de operatorul <i>lac</i>
GBP <sup>2</sup>	Afinitate față de galactoză
<b>Cozi polipeptidice de fuziune</b>	
Poli-His	IMAC <sup>3</sup>
Poli-Asp	Cromatografie pe rășini anionice
Poli-Arg	Cromatografie pe rășini cationice
Poli-Cys	Afinitate pentru grupări tiolice
Strep-tag II	Afinitate pentru avidină sau streptavidină
<sup>1</sup> MBP – <i>engl.</i> <b>M</b> altose- <b>B</b> inding <b>P</b> roteine <sup>2</sup> GBP – <i>engl.</i> <b>G</b> alactose- <b>B</b> inding <b>P</b> rotein <sup>3</sup> IMAC – cromatografie de afinitate pentru metale immobilizate ( <i>engl.</i> <b>I</b> mmobilized <b>M</b> etal <b>A</b> ffinity <b>C</b> hromatography)	

Tehnica de purificare care se bazează pe „coada” polipeptidică poli-His a fost descrisă pentru prima dată în anul 1975 de Porath *et al.*(5) și se bazează pe afinitatea pentru metalele tranziționale pe care această coadă o conferă proteinelor recombinante. Denumirea metodei este este

cromatografie de afinitate pentru metale imobilizate (*engl.* Immobilized Metal Affinity Chromatography –IMAC). Întreaga separare cromatografică are la bază o matrice inertă pe care sunt imobilizați ionii unor metale tranziționale ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  sau cel mai frecvent  $\text{Ni}^{2+}$ ). Matricea suport este confecționată dintr-un material puternic hidrofil, inert din punct de vedere chimic și rezistent la atacul microorganismelor. Materialele cel mai frecvent utilizate pentru suportul cromatografic sunt agaroză și Sephadex-ul sub forma unor fragmente sferice, rigide și uniforme cu diametrul de 5-50  $\mu\text{m}$ . Pe acest suport se fixează covalent o grupare ce are proprietatea de a chelata ionul metalic. Prima grupare chelatantă descrisă a fost acidul nitrilotriacetic (NTA), grupare ce este utilizată foarte frecvent și astăzi. NTA are 4 situsuri de coordinare și poate astfel lega foarte puternic ionii metalelor tranziționale. Suportul cromatografic cunoscut comercial sub denumirea de Ni-NTA se obține prin imobilizarea ionilor  $\text{Ni}^{2+}$  pe NTA. Prin legarea sa de matricea inertă, ionul  $\text{Ni}^{2+}$  își ocupă patru din cele șase valențe, celelalte două valențele rămase libere putând interacționa cu inelul imidazolic al resturilor de histidină de pe catena polipeptidică sau de pe coada poli-His. Modul în care au loc interacțiunile specifice prin care polipeptida se fixează de ionul metalic, iar acesta de matrix, este prezentat în Figura 23. De notat este faptul că aceste interacțiuni sunt independente de structura tridimensională a proteinei recombinante, astfel încât tehnica permite purificarea proteinelor atât în formă nativă cât și a în formă denaturată.

Mecanismul prin care are loc purificarea propriu-zisă a proteinelor de fuziune cu His-tag presupune contactul extractului acelușar ce conține proteina recombinată cu Ni-NTA. În mod natural, proteinele native au afinitate relativ redusă pentru nichel și nu se vor lega de Ni-NTA, pe când proteina cu His-tag care are afinitate puternică pentru ionii acestui metal se va lega foarte puternic. Complexul matrice-Ni-NTA-proteină recombinată este unul destul de stabil, ceea ce permite spălarea succesivă cu soluții tampon pentru eliminarea tuturor impurităților de pe coloană. Prin aplicarea unei soluții conținând chelatanți puternici ai  $\text{Ni}^{2+}$  (precum imidazolul), complexul matrice-Ni-NTA-proteină recombinată este destabilizat prin ruperea legăturilor metal-proteină recombinată, astfel încât aceasta din urmă este eluată de pe coloana cromatografică în stare pură.



**FIGURA 23.** Interacțiunile dintre partenerii complexului matrice-Ni-NTA-proteină ce stau la baza cromatografiei de afinitate pentru metale imobilizate (IMAC)

Purificarea unei proteine recombinante prin IMAC presupune parcurgerea a trei etape distincte:

1. *clonarea genei care codifică proteina de interes în vectori de expresie specifici*— permite nu doar modificarea secvenței de aminoacizi a proteinei de interes în scopul introducerii cozii poli-His, ci și expresia ei controlată în organisme gazdă specifice (cel mai frecvent *E. coli*);
2. *identificarea condițiilor optime de supraexpresie a proteinei recombinante în organismul gazdă și testarea solubilității acesteia*— supraexpresia în organisme gazdă, altele decât cel din care provine proteina de interes, permite acumularea acesteia și obținerea unui randament de purificare bun; dezavantajul este că, uneori, pot apărea probleme privind stabilitatea și mai ales solubilitatea proteinei de interes; din acest motiv este esențială o etapă de selecție a condițiilor optime de expresie;
3. *expresia și purificarea propriu-zisă* — în funcție de solubilitatea proteinei țintă, purificarea prin IMAC se poate realiza în condiții native sau în condiții denaturante; în acest ultim caz, după purificare, este necesară introducerea unei etape suplimentare de repliere a proteinei în forma sa nativă.

În cele ce urmează sunt prezentate fiecare dintre aceste trei etape, fiind detaliată însă doar metoda de purificare propriu-zisă.