

AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE PROTEINU NA VÁZANÝCH KOVOVÝCH IONTECH

JAN ZOUHAR^{a,b}

^aLaboratoř molekulární fyziologie rostlin, ^bKatedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská, 611 37 Brno, e-mail: zouhar@chemi.muni.cz

Došlo dne 23.X. 1998

Klíčová slova: afinitní chromatografie, rekombinantní proteiny, renaturace

Obsah

1. Úvod
2. Vývoj a charakteristika metody
3. Jednokroková purifikace za nativních a denaturačních podmínek
4. Perspektivy

1. Úvod

Nedostupnost dostatečných množství homogenních preparátů biologicky významných eukaryotních proteinů byla jednou ze základních překážek jejich studia. Rychlý pokrok ve studiu molekulárních a fyzikálně-chemických vlastností bílkovin, které se mohou vyskytovat v biologickém materiálu pouze ve stopovém množství, byl způsoben rozvojem molekulárně-biologických technik, umožňujících produkci studovaných eukaryotních proteinů v dostatečném množství. Prvním důležitým předpokladem bylo vypracování technik jejich nadprodukce v heterologních, převážně bakteriálních, expresních systémech. Protože prokaryotní transkripční aparát nedokáže odstranit nekódující oblasti eukaryotních genů, je nezbytné získat nejprve DNA komplementární k mRNA genu pro daný protein (cDNA), obvykle metodami založenými na reverzní transkripci mRNA. Pro účely nadprodukce rekombinantních proteinů je dostupná řada expresních vektorů se silnými promotory^{1,2} pro bakteriální kmeny *Escherichia coli*. Inzerce cDNA do vektoru je usnadněna přítomností mnohačetného klonovacího místa za promotorem, který má být použit k řízení exprese cDNA.

Druhou podmínkou pro získání rekombinantních proteinů v homogenní formě je jejich účinná purifikace z komplexních bakteriálních lyzátů. Purifikaci lze usnadnit řízeným směrováním syntetizovaného proteinu např. do periplazmatického³ nebo vnějšího⁴ prostoru *Escherichia coli* užitím specifických signálních sekvencí, ale tato technologie může být spojena s nižším výtěžkem. Proto byly vyvinuty metody purifikace, jež využívají fúze vysoce exprimovaného proteinu s doménami, které mají vysokou afinitu k ligandu, a umožňují tak snadnou afinitní chromatografii. Fúzované domény mohou mít podobu reálných polypeptidů nebo krátkých arteficiálních

oligopeptidů. Purifikační metody pak v první skupině zahrnují interakce protilátka - antigen⁵, enzym - substrát⁶ nebo protein - kovový ion⁷. Ve druhé skupině je nejužívanější interakcí koordináční vazba fúzovaného oligopeptidu a iontu přechodného kovu.

2. Vývoj a charakteristika metody

V roce 1975 uveřejnil Porath a kol. metodu frakcionace směsí sérových proteinů na agarosové matici s vázanou iminodiocetovou kyselinou (IDA), která tvoří cheláty s ionty přechodných kovů⁸. Iminodiocetová kyselina poskytuje do koordináční vazby s kovovým iontem tři elektronové páry a interakce proteinu s maticí zahrnuje zaplnění volných koordináčních orbitalů kovových iontů volnými elektronovými páry převážně z imidazolových skupin histidinových zbytků v bílkovině. V průběhu frakcionace byly proteiny eluovány změnou pH z alkalické do kyselé oblasti, kdy dochází k protonaci imidazolových skupin a tím k uvolnění ligandu z koordináční sloučeniny. V závěrečném izolačním kroku byly roztokem EDTA z matrice společně s kovovým iontem eluovány nejsilněji vázané sérové bílkoviny.

Principu vazby imidazolové skupiny histidinu na přechodný kov bylo využito ke konstrukci umělých oligohistidinových domén fúzovaných technikami molekulární biologie k N- nebo C-konci purifikovaného proteinu. Domény vykazují ve srovnání s přirozenými izolovanými zbytky histidinu v polypeptidech vysokou afinitu k vázaným přechodným kovům⁹. Teprve proteinové inženýrství umožnilo, aby se metoda, označovaná jako afinitní chromatografie na vázaných kovových iontech (Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC), stala jedním ze základních purifikačních postupů pro rekombinantní proteiny. Dostupné expresní plazmidy již zpravidla obsahují sekvence kódující oligohistidinové domény orientované tak, aby ve směru transkripce následoval úsek kódující restrikční místo některé z proteas. Domény však ve většině aplikací není nutné odstranit, protože její vliv na biologickou aktivitu proteinu byl mnohdy shledán jako nevýznamný¹⁰.

Přestože iminodiocetová kyselina tvoří výhodné cheláty s nikelnatými, kobaltnatými, zinečnatými a měďnatými ionty a je stále užívána v řadě aplikací, stal se nejčastěji používaným systémem spojující výhodnou charakteristiku nitrilotriocetové kyseliny (NTA) a nikelnatého iontu¹¹. Nitrilotriocetová kyselina na rozdíl od IDA poskytuje do koordináční vazby 4 elektronové páry, vazba chelator - kov je silnější a v průběhu purifikace nedochází k nežádoucímu uvolňování nikelnatého iontu z chelatační matrice.

V některých aplikacích lze využít slabší vazbu oligohistidinové domény na komplex iminodiocetové kyseliny a některých kovových iontů. Za podmínek slabší interakce histidinového zbytku a kovového iontu totiž obvykle výrazně omezíme zastoupení kontaminujících proteinů vázaných na matici. Pro optimalizaci metody tedy platí, že je vhodné testovat nejprve komplex iontu a chelatoru se silnou vazbou k oligohistidinové

doméně, jako jsou kombinace NTA - Ni²⁺ nebo IDA - Cu²⁺, a v případě úspěchu otestovat některou z kombinací s vazbou slabší (IDA - Zn²⁺, IDA - Co²⁺).

3. Jednokroková purifikace za nativních a denaturačních podmínek

Protokol nativní IMAC konkrétního rekombinantního proteinu je zčásti nepřenosný na jiné proteiny z důvodů různé fyzikálně chemické charakteristiky proteinu a také vazebné dostupnosti oligohistidinové domény. Obecně lze navrhnout pro vazbu rekombinantního proteinu pufrů s pH = 7-8, zajišťující optimální interakci domény s kovovým iontem. V chromatografických pufrch je výhodné použít vysoké koncentrace solí (např. 0,5-1 mol / l NaCl) a tím snížit nežádoucí elektrostatické interakce mezi proteiny a maticí. Pro odstranění kontaminujících proteinů lze doporučit použití nižších koncentrací imidazolu jako kompetitivního činidla nebo snížení pH, doprovázené uvolněním kontaminantů z matrice. Eluce rekombinantního proteinu lze dosáhnout použitím gradientu 0-1 mol/l imidazolu, výrazným snížením hodnoty pH (hodnoty pH kolem 4) nebo využitím EDTA jako univerzálního elučního činidla, potom je však nutné matici znovu regenerovat kovovým iontem. Nedoporučované látky uvádí obvykle výrobce chromatografické matrice.

IMAC s vhodnou purifikační strategií a chelatační maticí umožňuje získat vysoce homogenní proteinový preparát v jednom chromatografickém kroku. Při izolaci některých labilních proteinů se tak vyvarujeme několikanásobných purifikací, doprovázených vždy určitým poklesem biologické aktivity.

Významnou aplikací IMAC je purifikace molekul interagujících s proteiny vázanými přes chelatační doménu na matici. Byly již popsány postupy purifikace protilátek¹² nebo specifických hydrolas¹³.

Průvodním jevem exprese eukaryotních proteinů je přítomnost nerozpustných útvarů v bakteriální cytoplazmě, složených obvykle z nekorektních konformerů rekombinantního proteinu a označovaných jako inkluzní tělíska. Důvodem jejich tvorby může být absence eukaryotních chaperonů nebo posttranslačně modifikačních systémů a někdy i toxicita rekombinantních eukaryotních proteinů pro bakteriální metabolismus. V mnoha případech je proto exprimovaný protein z větší části v nerozpustné formě, kterou není možné izolovat technikami nativní IMAC. Komplikace způsobují rovněž rozpustné konformery proteinu, které obsahují oligohistidinovou doménu za nativních podmínek nedostupnou pro chelatační interakci.

Jednou z největších předností techniky IMAC se tak stala možnost purifikace proteinů za podmínek vysokých koncentrací močoviny nebo guanidinium chloridu, kdy dochází k denaturaci a solubilizaci proteinu a k expozici vazebné domény. Tímto se fúzované proteiny s oligohistidinovými doménami nejvýrazněji liší od proteinů fúzovaných s reálným polypeptidem, kde je právě intaktní nativní struktura fúzované domény nejdůležitějším faktorem pro úspěšnou purifikaci. Za podmínek denaturační IMAC je interakce chelator - kovový ion - oligohistidinová doména zcela zachována⁹ (6-histidinová doména, 6 mol / l guanidinium chlorid, systém NTA - Ni²⁺, pH = 8; Kd = 10⁻¹³). Naopak ostatní proteiny, vázané na komplex

chelator- kovový ion za nativních podmínek, jsou tak zbaveny své přirozené terciární struktury a často s maticí výrazněji neinteragují. Purifikaci za denaturačních podmínek jsme tak schopni v některých případech izolovat čistý vzorek rekombinantního proteinu, který je v této formě vhodný např. pro imunizaci. Pro ostatní účely (enzymologie, studium vazebných rovnováh, rentgenostrukturní analýza) je však nezbytné získat nativní konformer proteinu. Metoda IMAC nabízí několik možných řešení. Jedním je eluce enzymu z matrice a renaturace dialýzou^{14,15} nebo výrazným zředěním v renaturačních pufrch¹⁶. I tak nemusí být renaturace pro silné interakce protein - protein vždy úspěšná. Elegantním řešením je renaturace enzymu vázaného na matici, kdy je možné nežádoucí interakce potlačit nebo výrazně omezit. Renaturaci vázaných proteinů můžeme realizovat jako jednoduchý gradient z denaturačních do renaturačních pufrů¹⁷ nebo využít metodu pulsní renaturace¹⁸. Metoda zahrnuje opakované pulsy denaturačního činidla, jehož koncentrace se s každým cyklem snižuje. Dosáhneme tak větší pravděpodobnosti, že protein zaujme ideální, termodynamicky výhodnou konformaci. Pulsní renaturace je v mnoha případech velmi účinná, klade však nároky na chromatograf, protože je nutné zachovávat přesnou charakteristiku pulsu denaturantu.

Je-li použitý renaturační protokol z hlediska výtěžkovatvinní formy bílkoviny dostatečně úspěšný, může být nerozpustnost rekombinantního proteinu výhodou. Inkluzní tělíska nejsou totiž, na rozdíl od solubilních rekombinantních eukaryotních proteinů, napadána bakteriálními proteasami. Navíc je obvykle poměrné zastoupení rekombinantního proteinu v inkluzních tělískách výrazně vyšší než v rozpustné frakci, kde je přítomna řada bakteriálních proteinů. Zastoupení inkluzních tělísk v bakteriální cytoplazmě můžeme ovlivnit např. podmínkami exprese.

4. Perspektivy

Problémem spojeným s použitím kmenů *E. coli* pro expresi rekombinantního proteinu s fúzovanou oligohistidinovou doménou je přítomnost přirozeného bakteriálního proteinu s vysokým zastoupením histidinových zbytků v molekule¹⁹. Tento protein s molekulovou hmotností 21 kDa je ve své monomerní a multimerní podobě častým kontaminantem u nativních technik, které jako kovový ion využívají zinečnaté nebo nikelnaté ionty. Multimerní podoba snad vzniká propojením monomerů přes ion přechodného kovu. Snaha o přípravu kmenů s chybějícím nebo modifikovaným genem pro tento protein je velkým příslibem do budoucnosti.

Další snahy o zdokonalení metody zahrnují konstrukce domén složených z histidinů a jiných aminokyselin¹². Purifikačními podmínkami nebo počtem kopií sekvence domény na plazmidu je možné ovlivňovat sílu interakce s kovovým iontem a obdržet velmi čisté proteinové preparáty.

Práce vznikla při řešení úkolu podporovaného grantem MŠMT č. VS96096 a grantem GA AV ČR č. A5004603.

LITERATURA

1. Studier F. W., Rosenberg A. H., Dunn J. J., Dubendorff J. W.: *Methods Enzymol.* 185, 60 (1990).

2. Kroll D. J., Abdel-Hafiz Abdel-Malek H., Marcelli T., Simpson S., Chen C. Y., Gutierrez-Hartmann A., Lustbader J. W., Hoeffler J. P.: *DNA Cell Biol.* 12, 441 (1993).
3. Takahara M., Hibler D. W., Barr P. J., Gerlt J. A., Inouye M.: *J. Biol. Chem.* 260, 2670 (1985).
4. Oka T., Sakamoto S., Miyoshi K., Fuwa T., Yoda K., Yamasaki M., Tamura G., Miyake T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 7212 (1985).
5. Nilsson B., Abrahmsen L., Uhlen M.: *EMBO J. A*, 1075 (1985).
6. Smith D. B., Johnson K. S.: *Gene* 67, 31 (1988).
7. LaVallie E. R., DiBlasio E. A., Kovacic S., Grant K. L., Schendel P. F., McCoy J. M.: *Bio/Technology* 11, 187 (1993).
8. Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage G.: *Nature* 258, 598 (1975).
9. Hochuli E., Bannwarth W., Dobeli H., Gentz R., Stueber D.: *Bio/Technology* 6, 1321 (1988).
10. Witner M. R., Micanovic R., Tredup J., Lin W., Hail M., Villafranca J. J.: *Arch. Biochem. Biophys.* 318, 430 (1995).
11. Hochuli E., Dobeli H., Schacher A.: *J. Chromatogr.* 411, 177 (1987).
12. Ljungquist C., Breitholtz A., Brink-Nilsson H., Moks T., Uhlen M., Nilsson B.: *Eur. J. Biochem.* 186, 563 (1989).
13. Beers E. P., Callis J.: *J. Biol. Chem.* 268, 21645 (1993).
14. Aniskovitch L. P., Winkler H. H.: *Microbiology* 142, 901 (1996).
15. Stoeckel J., Meinel E., Hahnel C., Malotka J., Seitz R., Drexler K., Wekerle H., Dornmair K.: *J. Biol. Chem.* 269, 29571 (1994).
16. Newton D. L., Nichollas P. J., Rybak S. M., Youle R. J.: *J. Biol. Chem.* 269, 26739 (1994).
17. Shi P. Y., Maizels N., Weiner A. M.: *Bio/Techniques* 23, 1036 (1997).
18. Etzerodt M., Hotet T. L., Thogersen H. C.: *WO 94/18227* (1994).
19. Wulfing C., Lombardero J., Pluckthun A.: *J. Biol. Chem.* 269, 2895 (1994).

J. Zouhar (*Laboratory of Plant Molecular Physiology, Faculty of Science, Masaryk University, Brno*): **Affinity Chromatography of Proteins on Immobilized Metal Ions**

Immobilized-metal affinity chromatography is presented in this paper as a powerful technique for recombinant protein purification. The development of this method and some recommendations for potential users are also described. Recombinant proteins with fused oligohistidine tags can be purified to homogeneity under native or denaturing conditions. In some cases, denatured immobilized proteins can be directly refolded in a matrix-assisted procedure. It is also possible to use immobilized recombinant proteins for the isolation of specific antibodies or other molecules. In future, we can expect special bacterial strains to be developed for oligohistidine-tagged protein expression and improved design of affinity tags.