

Optimización de las condiciones de operación de Cromatografía de Interacción Hidrofóbica para purificación de proteínas

Lienqueo, M.E., Mahn, A.V., Asenjo, J.A. y Vásquez L.

Centro de Ingeniería Bioquímica y Biotecnología
Departamento de Ingeniería Química
Universidad de Chile
e-mail mlienque@cec.uchile.cl

RESUMEN

Se han desarrollado correlaciones que predicen de forma aceptable los tiempos de retención de una mezcla de proteínas en cromatografía de interacción hidrofóbica. Para ello se ha logrado determinar que las interacciones entre proteínas adsorbidas en matrices de HIC no son significativas, por lo cual el comportamiento de una mezcla de proteínas se puede predecir por medio de la estimación, en forma individual, de los tiempos de retención de cada una de las proteínas que forman la mezcla. Para dicho efecto se requiere conocer la estructura 3D de la proteína, específicamente el área de cada uno de los aminoácidos expuestos en la superficie. Posteriormente, se debe calcular la hidrofobicidad superficial de la proteína mediante la suma ponderada de la hidrofobicidad de cada uno de los aminoácidos superficiales mediante la escala de hidrofobicidad de Cowan-Whittaker o Miyazawa-Jernigan, normalizadas entre -1 y 1. Finalmente utilizando un modelo cuadrático, $DRT = A * \Phi_{\text{surface}}^2 + B * \Phi_{\text{surface}} + C$ (donde Φ_{surface} es hidrofobicidad superficial de la proteína, que ha sido calculada considerando la hidrofobicidad de los aminoácidos superficiales) es posible predecir el tiempo de retención de cada una de las proteínas que componen la mezcla.

INTRODUCCIÓN

La producción de proteínas comerciales, y en especial las terapéuticas, involucra etapas de fermentación, recuperación y purificación. Los costos de estas dos últimas etapas pueden llegar a alcanzar hasta un 80% del costo total del proceso (Sofer and Hagel 1998), por esta razón una adecuada selección de los procesos de purificación permitiría optimizar el proceso global de producción de proteínas.

Si se analiza la etapa de purificación, ésta normalmente involucra diferentes técnicas cromatográficas, tales como Cromatografías de Afinidad (AC), Cromatografía de Intercambio Iónico (IEC), Cromatografía de Interacción Hidrofóbica (HIC), Fase Reversa (RP) y Cromatografía de Filtración por Geles (GF) (Scopes, 1994). Al comparar estas alternativas la que presenta mayor selectividad, capacidad y resolución es la Cromatografía de Afinidad, pero también presenta un alto costo y no siempre se cuenta con un ligante adecuado. Por otro lado, Cromatografía de Fase Reversa produce denaturación de las proteínas, siendo utilizada principalmente para purificación y análisis de péptidos, y en el caso de Cromatografía de Filtración por Geles, ésta presenta baja capacidad, resolución y selectividad. Por último, las Cromatografías de Intercambio Iónico e Interacción Hidrofóbica presentan niveles altos de capacidad, resolución y velocidad. Adicionalmente, Cromatografía de Interacción Hidrofóbica presenta la ventaja de no requerir cambio de buffer y que la presencia de sal estabiliza a las proteínas en solución.

Considerando las ventajas que presenta HIC nos hemos centrado en implementar una metodología que permita seleccionar las mejores condiciones de operación de Cromatografía de **Interacción Hidrofóbica para la purificación de una mezcla de proteínas. Para dicha selección es necesario contar con correlaciones que predigan los tiempos de retención de las**

proteínas bajo diferentes condiciones experimentales y analizar las posibles interacciones que se produzcan cuando una mezcla de proteínas es purificada por HIC.

Teoría

Cromatografía de Interacción Hidrofóbica

La Cromatografía de Interacción Hidrofóbica es una cromatografía de adsorción, lo cual implica que se produce una interacción entre los grupos hidrofóbicos expuestos de las proteínas y los grupos hidrofóbicos de la matriz cromatográfica, proceso que resulta termodinámicamente favorable (Eriksson, 1998).

Para el proceso de HIC se ha propuesto un mecanismo de múltiples etapas por el cual las proteínas se adsorben a la matriz. La primera etapa estaría determinada por el tipo de sal utilizada (especialmente caotrópicas) y la segunda etapa resulta ser una etapa de cinética más lenta que dependerá de la hidrofobicidad de la proteína y de matriz (Sofer and Hagel, 1998, Tomaz et al, 2002).

Predicción de los tiempos de retención en HIC

El principal problema existente para desarrollar una correlación que describa el comportamiento de las proteínas en HIC es la falta de una definición clara de hidrofobicidad de las proteínas. En la literatura se reportan numerosas escalas de hidrofobicidad de aminoácidos basadas en diferentes principios, tales como la energía libre de Gibbs necesaria para que un aminoácido pase desde una fase a otra, coeficientes de retención, en HPLC, de péptidos formados por un solo tipo de aminoácido, nivel de escondimiento de aminoácidos en proteínas modelo, presencia de aminoácidos en regiones antigénicas de proteínas modelo; energía de contacto entre aminoácidos adyacentes en proteínas, y otras, clasificadas como mixtas, basadas en escalas desarrolladas previamente (Lesser et al, 1987).

A pesar de la dificultad de encontrar una definición única de hidrofobicidad de aminoácidos, se ha propuesto una metodología para predecir los tiempos de retención en HIC considerando que la adsorción en HIC es un fenómeno superficial donde interactúan los grupos hidrofóbicos de la matriz y aquellos de la superficie de la proteína. Por ello se ha propuesto estimar la hidrofobicidad superficial de las proteínas a partir de las características de los aminoácidos expuestos (Lienqueo, 2002). Se utilizó la definición de hidrofobicidad superficial, $\Phi_{\text{superficial}}$, propuesta por Berggren y colaboradores (2000). Dicha propiedad se calcula como:

$$\Phi_{\text{superficial}} = \sum [\phi_{\text{aa}i} * r_{\text{aa}i}] \quad (1)$$

donde

$\phi_{\text{aa}i}$ es la hidrofobicidad de cada aminoácido “i” en base a una escala dada, con valores entre 0, para los aminoácidos hidrofílicos, y 1, para los aminoácidos hidrofóbicos.

$r_{\text{aa}i}$ es el área expuesta relativa de cada aminoácido “i” en la superficie de la proteína, definiéndose como:

$$r_{\text{aa}i} = \left[\frac{S_{\text{aa}i}}{S_{\text{proteína}}} \right] \quad (2)$$

donde

$S_{\text{aa}i}$ es el área total expuesta del aminoácido “i” en la proteína.

$S_{\text{proteína}}$ es el área superficial total de la proteína determinada.

Ambos valores son determinados computacionalmente a partir de los archivos PDB de las proteínas.

Por otro lado, se estudió el comportamiento cromatográfico de proteínas monoméricas globulares, determinándose su tiempo de retención adimensional, DRT, definido como:

$$DRT = \frac{RT - t_0}{t_f - t_0} \quad (3)$$

donde

RT es el tiempo de retención de un peak cromatográfico.

t_0 es el tiempo de inicio del gradiente de elución.

t_f es el tiempo de finalización del gradiente de elución.

Se correlacionaron los tiempos de retención adimensional con la hidrofobicidad superficial mediante un modelo cuadrático del tipo:

$$DRT = A\phi_{\text{superficial}}^2 + B\phi_{\text{superficial}} + C \quad (4)$$

Las escalas de hidrofobicidad más adecuadas, para determinar $\phi_{\text{superficial}}$, fueron las escalas de Miyazawa-Jernigan (1985), basada en la energía de contacto entre aminoácidos adyacentes en proteínas; y la escala de Cowan-Whittaker (1990), basadas en coeficientes de retención de péptidos en HPLC.

El presente trabajo describe cómo las correlaciones antes mencionadas han sido mejoradas considerando el efecto de las zonas hidrofílicas de las proteínas y las posibles interacciones entre las proteínas.

EQUIPO EXPERIMENTAL

Proteínas.

Se utilizaron 10 proteínas globulares cuya secuencia aminoacídica era conocida: citocromo C (1HRC), mioglobina (1YMB), ribonucleasa A (1AFU), conalbúmina (1OVT), lisozima de gallina (2LYM), ovalbúmina (1OVA), α -quimiotripsina (4CHA), quimiotripsinógeno A (2CHA) α -lactalbúmina (1A4V) y taumatina (1THV) obtenidas de Sigma. Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

Equipo.

Se utilizó un equipo FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography, Amersham Pharmacia). Las columnas y materiales de empaque fueron donadas por Amersham Pharmacia. Los buffers fueron filtrados a través de una membrana de 0,2 μm y desgasificados por 10 minutos con helio.

Cromatografía de Interacción Hidrofóbica.

Se empacaron columnas de 1 mL, con resina Butil sefarosa y Fenil sefarosa Fast Flow (Amersham Pharmacia). Se utilizó buffer Bis – Tris 20mM pH 7,0 como buffer A. Los buffer B se prepararon con buffer A más sulfato de amonio 1 ó 2 M o cloruro de sodio 2 ó 4 M. Cada proteína se disolvió en buffer B a una concentración de 0,5 mg/mL. Las condiciones de las corridas fueron: loop de 500 μL , velocidad de flujo igual a 0,75 mL/min, sensibilidad 0,2 AUFS. El paso del gradiente decreciente fue de 7.5 %B/min.

Estimación de la hidrofobicidad

La hidrofobicidad de las proteínas se estimó mediante la ecuación (1). El área superficial total y la ocupada por cada tipo de residuo aminoacídico se determinó mediante el software GRASP (Graphical Representation and Analysis of Surface Properties) (Nicholls et al., 1991) a partir de los archivos PDB (<http://www.rcsb.org/pdb>).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

1.- Escalas de hidrofobicidad

Considerando los resultados previos (Lienqueo et al., 2002), las escalas que mejor predicen los tiempos de retención en HIC son las escalas de Miyazawa-Jernigan y Cowan-Whittaker, mostradas en la Tabla 1. Con objeto de analizar el grado de similitud de ambas escalas, éstas fueron correlacionadas (Ver figura 1). Como era de esperar, y considerando los diferentes principios en los cuales se basan ambas escalas, los niveles de correlación entre las escalas fueron bajos, del orden 0.66 Existiendo algunas coincidencias entre aminoácidos hidrofóbicos como isoleucina y leucina, aminoácidos cargados como lisina y arginina y un aminoácido hidrofílico como cisteína, todos ellos con diferencia inferiores al 12%. En el otro extremo se encuentra el aminoácido prolina con una diferencia bastante significativa, superior al 100%.

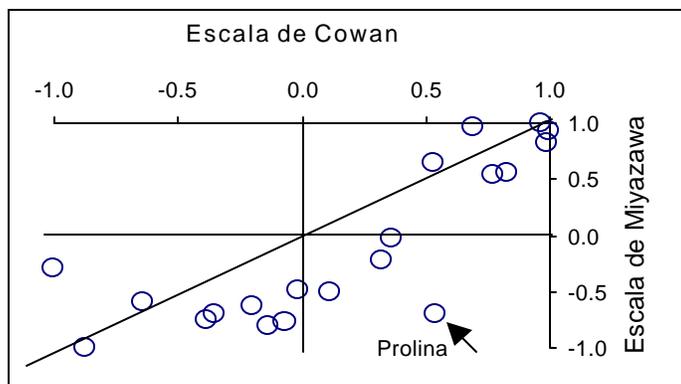


Figura 1 Comparación entre las escalas de hidrofobicidad utilizadas para predecir los tiempos de retención en HIC.

Tabla 1 Escalas de Hidrofobicidad

aa	Cowan-Whittaker			Miyazawa-Jernigan		
	original	Normalizadas		original	Normalizadas	
		0 a 1	-1 a 1		0 a 1	-1 a 1
Ala	0,42	0,66	0,32	5,33	0,39	-0,22
Arg	-1,56	0,18	-0,65	4,18	0,20	-0,60
Asn	-1,03	0,31	-0,39	3,71	0,13	-0,75
Asp	-0,51	0,43	-0,13	3,56	0,11	-0,80
Cys	0,84	0,76	0,53	7,93	0,82	0,64
Gln	-0,96	0,32	-0,36	3,87	0,15	-0,70
Glu	-0,37	0,47	-0,07	3,65	0,12	-0,77
Gly	0,00	0,56	0,12	4,48	0,25	-0,50
His	-2,28	0,00	-1,00	5,10	0,35	-0,29
ile	1,81	1,00	1,00	8,83	0,97	0,93
Leu	1,80	1,00	1,00	8,47	0,91	0,82
Lys	-2,03	0,06	-0,88	2,95	0,00	-1,00
Met	1,18	0,85	0,69	8,95	0,99	0,97
Phe	1,74	0,98	0,97	9,03	1,00	1,00
Pro	0,86	0,77	0,54	3,87	0,15	-0,70
Ser	-0,64	0,40	-0,20	4,09	0,19	-0,63
Thr	-0,26	0,49	-0,01	4,49	0,25	-0,49
Trp	1,46	0,91	0,83	7,66	0,78	0,55
Tyr	0,51	0,68	0,36	5,89	0,48	-0,03
Val	1,34	0,89	0,77	7,63	0,77	0,54

Normalización entre 0 y 1

Hidrofobicidad de un amino ácido con valor 0 significa un amino ácido hidrofílico.

Hidrofobicidad de un amino ácido con valor 1 significa un amino ácido hidrofóbico.

Normalización entre -1 y 1

Hidrofobicidad de un amino ácido con valor -1 significa un amino ácido hidrofílico.

Hidrofobicidad de un amino ácido con valor 1 significa un amino ácido hidrofóbico.

2.- Caracterización de los comportamientos cromatográficos de las proteínas.

Se determinó el tiempo de retención de 10 proteínas monoméricas estándar. Paralelamente, se calculó la hidrofobicidad superficial de dichas proteínas y se determinaron rangos desde los cuales las proteínas son retenidas en diferentes matrices. Se pudo observar que para las matrices Fenil y Butil en buffer sulfato de amonio 2M casi la totalidad de las proteínas fue retenida. Dichos resultados concuerdan con lo señalado en la literatura que recomienda esta condición de operación para iniciar una purificación de proteínas por HIC (Eriksson, 1998).

Adicionalmente, fue posible establecer los mínimos de hidrofobicidad, según las escalas de Miyazawa-Jernigan y Cowan-Whittaker, normalizadas entre -1 y 1, para que una proteína fuera adsorbida bajo diferentes condiciones de operación. Dichos valores se muestran en la tabla 2. Con estos resultados es posible realizar una primera selección de las condiciones de operación para que a lo menos la proteína de interés quede retenida en la columna de HIC.

Tabla N 2 Mínimos de hidrofobicidad, según las escalas de Miyazawa-Jernigan y Cowan-Whittaker, normalizadas entre -1 y 1, para que una proteína quede retenida

Sal	Miyazawa-Jernigan	Cowan-Whittaker
Fenil-Sepharosa		
1M Sulfato de Amonio	-0.54	-0.15
2M Sulfato de Amonio	-0.55	-0.21
2M Cloruro de Sodio	-0.43	-0.11
4M Cloruro de Sodio*	-0.55	-0.21
Butil-Sepharosa		
1M Sulfato de Amonio	-0.48	-0.11
2M Sulfato de Amonio	-0.55	-0.21
2M Cloruro de Sodio	-0.40	-0.06
4M Cloruro de Sodio*	-0.43	-0.11
A medida que una proteína presenta un valor más negativo es más hidrofílica y viceversa.		

Los resultados indican que a medida que la matriz posee ligantes más hidrofóbicos (Fenil > Butil) es capaz de adsorber proteínas con menor grado de hidrofobicidad. Así mismo, se muestra que a medida que se trabaje con una mayor concentración sal se adsorberán proteínas con menor hidrofobicidad, dado que las proteínas menos hidrofóbicas necesitan de más sal para ser adsorbidas en la matriz.

3.- Desarrollo de correlaciones para predecir el comportamiento cromatográfico de proteínas en HIC

Considerando que las zonas hidrofílicas de las proteínas podrían afectar las interacciones entre las zonas hidrofóbicas de la matriz de HIC y las proteínas, se consideró una nueva forma de normalizar las escalas de hidrofobicidad, para ello se utilizaron las escalas de Miyazawa-Jernigan y de Cowan-Whittaker, normalizadas a valores entre -1 y 1. Siendo el valor -1 asignado al aminoácido más hidrofílico y el valor 1 asignado al amino ácido más hidrofóbico. Luego a medida que las proteínas son más hidrofílicas, su valor de hidrofobicidad se vuelve más negativo y permite ir sustrayendo el efecto de los aminoácidos hidrofílicos, dado que estos son restados en la sumatoria de la ecuación 1. Así la ecuación 1 se modifica levemente:

$$\Phi^*_{\text{superficial}} = \sum [\phi^*_{\text{aai}} * r_{\text{aai}}] \quad (5)$$

ϕ^*_{aai} es la hidrofobicidad de cada aminoácido “i” en base a una escala dada, con valores entre -1, para los aminoácidos hidrofílicos, y 1, para los amino ácidos hidrofóbicos.

De esta forma se puede visualizar que la superficie de las proteínas son mayoritariamente hidrofílicas, dado que todos los valores de hidrofobicidad global de las proteínas son negativos, este efecto no se puede apreciar al utilizar una normalización entre 0 y 1.

Desarrollo de las correlaciones

Se utilizó el mismo modelo cuadrático anterior:

$$\text{DRT} = A\phi^2_{\text{superficial}} + B\phi_{\text{superficial}} + C \quad (3)$$

donde

A, B y C son constantes que dependen de las condiciones de operación y de la escala de hidrofobicidad que se esté utilizando.

En la tabla 3 se resumen los valores de dichas constante y los coeficientes de correlación (r^2) para las diferentes condiciones de operación y escalas aplicadas.

Tabla 3 Coeficientes de la ecuación cuadrática

Normalización	A	C	D	r^2
Escala de Cowan-Whittaker				
Fenil Sefarosa 2M Sulfato de Amonio				
0 y 1	-18.22	22.07	-5.56	0.96
-1 y 1	-5.18	1.91	0.93	0.97
Butil Sefarosa 2 M Sulfato de Amonio				
0 y 1	4.07	2.699	-1.49	0.96
-1 y 1	-4.29	-0.96	1.03	0.97

Escala de Miyazawa-Jernigan				
Fenil Sefarosa 2M Sulfato de Amonio				
0 y 1	-12.13	12.06	-1.74	0.94
-1 y 1	-3.9	-0.64	1.17	0.96
Butil Sefarosa				
0 y 1	9.96	0.57	0.39	0.95
-1 y 1	0.09	3.33	2.06	0.98

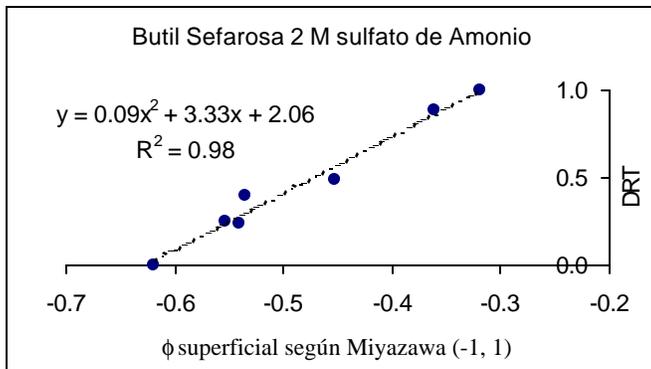


Figura 2 Correlación entre los tiempos de retención en Butil Sefarosa 2 M sulfato de amonio y la hidrofobicidad superficial de las proteínas calculada en base a las escalas de Miyazawa-Jernigan normalizadas entre -1 y 1

Los resultados que se muestran en la tabla 3 indican que las predicciones resultan ser bastante aceptables, resultando la normalización entre -1 y 1 mejor que la normalización entre 0 y 1. Esto avala el hecho que las zonas hidrofílicas interfieren entre las zonas hidrofóbicas de la matriz y la proteína, motivo por el cual su presencia debe ser restada de la hidrofobicidad total.

Por otra parte, al comparar los resultados de las dos escalas no es posible indicar que una sea más recomendable que la otra, recomendándose utilizarlas indistintamente.

En la figura 2 se muestra uno de los mejores ajustes para las condiciones evaluadas.

3.- Estudio de la interacción entre proteínas

Con el objetivo de evaluar posibles interacciones entre las proteínas una vez adsorbidas en la matriz, se inyectaron 14 mezclas de dos proteínas estándar, bajo diferentes condiciones de operación.

Los resultados obtenidos muestran que no se producen diferencias significativas entre los tiempos de retención de las proteínas que conforman una mezcla y los tiempos de retención de las proteínas inyectadas en forma individual, presentado una diferencia promedio menor a un 2%. La diferencia más significativa, presentada en la figura 3, alcanza un 7%.

En base a los resultados obtenidos es posible afirmar que se pueden predecir los tiempos de retención de las proteínas que conforman una mezcla si se conoce el tiempo de retención de cada una de las proteínas que la componen.

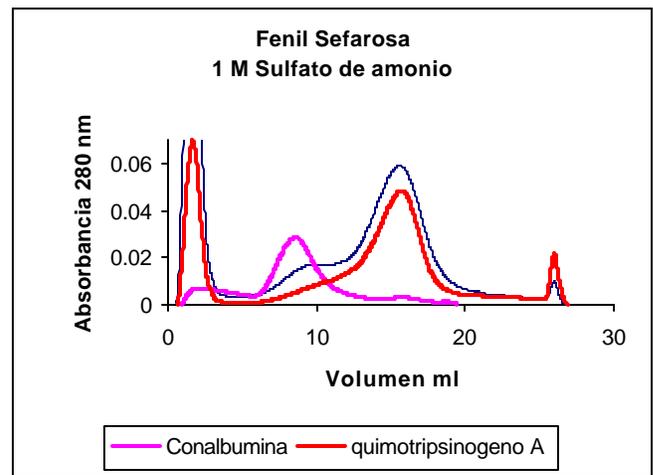


Figura 3. Cromatograma con mayor diferencia entre los tiempos de retención de las proteínas inyectadas en una mezcla y en forma individual.

CONCLUSIONES

Se han desarrollado correlaciones que predicen de manera aceptable los tiempos de retención de una mezcla de proteínas en cromatografía de interacción hidrofóbica.

Se ha logrado determinar que las interacciones entre proteínas adsorbidas en matrices de HIC no son significativas, por lo cual el comportamiento de una mezcla de proteínas se puede predecir por medio de la estimación, en forma individual, de los tiempos de retención de cada una de las proteínas que forman la mezcla en forma separada.

Para predecir el tiempo de retención de proteínas, ya sea individualmente o formando parte de una mezcla de proteínas, se requiere llevar a cabo tres pasos:

- 1.- Conocer la estructura 3D de la proteína, específicamente el área de cada uno de los aminoácidos de superficie.
- 2.- Determinar la hidrofobicidad superficial de la proteína mediante la suma ponderada de la hidrofobicidad de cada uno de los aminoácidos superficiales, utilizando la escala de hidrofobicidad de Cowan-Whittaker o la de Miyazawa-Jernigan, normalizadas entre -1 y 1.
- 3.- Finalmente, utilizando un modelo cuadrático, $DRT = A * \Phi_{\text{surface}}^2 + B * \Phi_{\text{surface}} + C$ (donde Φ_{surface} es hidrofobicidad superficial de la proteína que ha sido calculada considerando la hidrofobicidad de los aminoácidos superficiales) es posible predecir el tiempo de retención adimensional de cada proteína.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido financiado por el Proyecto Fondecyt 1010702.

REFERENCIAS

1. Berggren K., Egmond M., Tjerneld F: (2000) "Substitutions of surface amino acid residues of cutinase probed by aqueous two-phase partitioning" *Biochim. Biophys. Acta* 1481, 317-327
2. Cowan R., Whittaker R.G. (1990) "Hydrophobicity indices for amino acid residues as determined by HPLC", *Peptide Research* 3:75-80
3. Eriksson K. (1998) "Hydrophobic Interaction Chromatography" en "Protein Purification: Principles, High-Resolution Methods, and Applications", Editado por J-C Janson and L. Ryden, 2 Edition, Wiley-Liss, New York, 283-309
4. Lesser G., Lee R., Zehfus M., Rose G. (1987) "Hydrophobic interactions in proteins" *Protein Engineering* pages 175-179
5. Lienqueo, M.E., Mahn, A.V., Asenjo, J.A. (2002) "Mathematical correlations for predicting protein retention time in Hydrophobic Interaction Chromatography", *Journal Chromatography A* (en prensa)
6. Miyazawa S., Jernigan R., (1985) "Estimation of effective interresidue contact energies from protein crystal structures. Quasi-chemical approximation", *Macromolecules* 18: 534-552.
7. Nicholls A., Sharp K., Honing B. (1991) *Proteins, structure, function and genetics*, 11(4):281
8. Scopes R.K. (1994). "Protein purification: principles and practice", 3era Edición, Springer, 379pp.
9. Sofer G. , Hagel L.(1998) "Handbook of process Chromatography : A guide to Optimization, Scale-Up, and Validation" Academic Press, San Diego, 387pp.
10. Tomaz C.T., Duarte D., Queiroz J.A. (2002) "Comparative study on the fractionation of cellulases on some HIC adsorbents" *J. Chrom A* 944, 211-216