

Disciplina de fiziopatologie (cond.: conf. dr. Magda Mózes, doctor în medicină)
a I.M.F. Tirgu-Mures

CROMATOGRAFIA PROTEINELOR.

III. Cromatografia proteinelor pe schimbători de ioni derivați ai celulozei

dr. A. Cojocaru

În ultimii ani au fost introduși în cromatografia proteinelor schimbătorii de ioni, derivați ai celulozei (29, 42). Datorită posibilităților largi de diferențiere și capacității mari de adsorbție ioniții celulozici au cunoscut o răspândire rapidă în toate laboratoarele specializate de fiziologie, biochimie, enzimologie și biofizică, care se ocupă cu studiul proteinelor din umori și țesuturi și al enzimelor.

Pentru obținerea schimbătorilor de ioni pe bază de celuloză se utilizează celuloza, vata de bumbac și celuloza din lemn.

Celuloza, macromoleculă cu grupe -OH reactive chimic, manifestă prin oxidare cu hipoclorit de sodiu sau cu tetraoxid de azot proprietăți de schimb cationic datorită grupeor carboxilice. Prin oxidare energetică celuloza se degradează devenind solubilă în soluție de NaOH 10%. *Oxicheluloza* nedegradată are capacitate de schimb selectiv pentru Fe^{3+} și dă rezultate bune la separarea albaștrilor. Prin introducerea de grupe polare în macromolecula celulozei s-au obținut schimbători de ioni cu largă răspândire în tehnica cromatografică. Reacția celulozei de bumbac cu acidul orto-fosforic permite obținerea unui schimbător de cationi puternic acid, *celuloza fosforilată*. La fel s-a preparat *celuloza sulfatată* prin reacția cu acidul clor-etil-sulfonic, *celuloza sulfatată* prin tratare cu acid clor-etil-sulfuric și *celuloza fosfatată* prin reacția cu acidul clor-etil-fosforic. Toți acești cationiți sînt puternici acizi, manifestînd o apreciabilă capacitate de schimb cationic, oricare ar fi pH-ul soluției de electroliți în care are loc procesul de schimb ionic.

Prezintă de asemenea o mare capacitate de schimb cationic *semlesterul succinic al celulozei* în soluțiile de electroliți cu pH alcalin. Reactivitatea ionitului celulozic poate fi mărită prin reticulare, utilizîndu-se în acest scop acidul diclor-acetic, formaldehidă, 1,3-diclor-2-propanolul și alți agenți de reticulare.

Prin *carboximetilarea celulozei* s-au obținut cationiți slab acizi cu capacități de schimb cuprinse între 0,4—0,6 mval/g, utilizați în cromatografia proteinelor serice, a hormonilor, a acizilor aminați bazici etc. Din lintersul de bumbac prin carboximetilare cu acid monocloracetic s-a preparat un ionit cu o capacitate de schimb de 1,90 mval/g.

O redusă capacitate de schimb cationic, datorită grupelor carboxilice puțin numeroase, prezintă hîrțile cromatografice Whatman, Schleicher-Schull și Munkcel. Mărirea capacității lor de schimb se realizează prin oxidarea cu oxizi de azot (hîrtia oxichelulozică utilizată la prepararea cromatografică a aminelor, a acizilor aminați și a ionilor anorganici), prin impregnarea hîrției celulozice cu rășini sintetice schimbătoare de ioni sau electroni sau prin introducerea de grupe acide (-COOH, -SO₃H, -PO₃H₂) sau bazice (-NH₂) în macromolecula polizaharidului. Dacă hîrtia acetilată, esterul butiric de celuloză și hidroceluloza sînt puțin utilizate (hîrțile cu grupe carboxilice obținute prin tratarea adecvată a hîrției de filtru nu prezintă interes, avînd o redusă capacitate de schimb ionic 0,22—0,26 mval/g), în schimb, dintre cationiți, *carboximetilceluloza* (CMC, CM-W) obținută sub formă

de pudră albă din celuloza Whatman și fosfatceluloza (P-W) au găsit o utilizare crescută în cromatografia proteinelor. La fel, sînt larg răspîndite hîrțiile anionice: DEAE-celuloza (DEAEC) cuprinzînd grupe cu un conținut de 1,4% azot (1 mval/g. preparată din pulberea de celuloză So-ka-Floc sau Whatman, cea preparată din celuloza de lemn, „Plycel” avînd o capacitate de schimb aproape dublă față de cea a hîrtiei obținute din pulberea Whatman), TEAE-celuloza, hîrtia anionică ECTEOLA-SF conținînd 0,25—0,30 mval/g azot.

În general, hîrtia cationică CM-W cu grupe $-COOH$ e folosită pentru purificarea enzimelor și a hormonilor, hîrțiile anionice DEAE-SF cu grupe amino terțiare pentru purificarea enzime or și fracționarea proteinelor plasmatiche, hîrtă ECTEOLA slab bazică pentru cromatografierea acizilor nucleici și nucleotidelor, iar hîrtia DEAE-SF cu grupe cuaternare de amoniu e utilizată în cromatografia derivaților acidului folic.

Hîrțiile impregnate cu rășini ionice (SA-2, hîrtie impregnată cu 49% Amberlite IR-120, rășină cationică sulfonată; SB-2, hîrtie impregnată cu 45% Amberlite IRA-400, rășină anionică puternic bazică, WA-2 hîrtie impregnată cu 45% Amberlite IRC-50, rășină cationică carboxilică) se utilizează de asemenea pentru cromatografia pe hîrtie sau pe coloană, în acest caz folosindu-se pulberea de hîrtie.

Reproducem după Ionescu (23) principalele caracteristici ale ionizilor pe bază de celuloză (tabel nr. 1). Introducerea ionilor celulozici în studiul cromatografic al macromoleculor proteice se datorește lui Sober, Gutter, Wyckoff și Peterson (42), care au utilizat cei dintîi DEAE-celuloza la fracționarea proteinelor serice. Datorită numărului mare de constituenți care pot fi obținuți și a capacității înalte de adsorbție a ionitului, cromatografia proteinelor pe coloană cu schimbători de ioni derivați ai celulozei s-a generalizat rapid, fiind utilizată la fracționarea și purificarea enzimelor, a hormonilor, a constituenților proteici ai sîngelui, contribuind împreună cu tehnica modernă a filtrării prin gel la progresul cunoștințelor noastre asupra proprietăților fizico-chimice, funcționale și imunologice ale macromoleculor proteice.

Ionizii celulozici (DEAE-, CM-, TEAE-, AE-, P-, ECTEOLA-celuloza etc.) sînt utilizați cu succes la purificarea proteinelor serice, a hormonilor de natură proteică, a enzimelor, precum și a cromoproteidelor.

Hess (21) îndepărtează α -gobulinile serice prin tratarea serului dializat cu suspensia de DEAEC în tampon de fosfat 0,02 M, pH 6,0, într-o anumită proporție. Pro teinele mielomatoase, macrogobulinile, γ_2 -globulinile și produșii lor de digestie au fost cromatografați pe CMC de Deutsch și colaboratorii (17) în cercetările privind acțiunea papainei asupra globulinelor serice umane. Steelman, Segaloff și Anderson (44) purifică hormonul foliculo-stimulant și hormonul de luteinizare pe CMC și DEAEC.

Utilizînd DEAEC, Bouchilloux și colaboratorii (12) purifică tireoglobulina din extractele de glandă tiroidă, reușind să elimine endopeptidazele în mare măsură, activitatea exopeptidazică fiind prezentă în fracțiunile cromatografice obținute. Pe o coloană conținînd 80 g DEAEC (Schleicher-Schüll 0,9 mEq/g, prealabil tratată cu NaOH 1N, spălată cu apă deionizată și echilibrată cu tampon de fosfat de sodiu la pH 6,5, $\mu=0,15$) se încarcă 1,3 g proteine. Tamponul de echilibrare are $\mu=0,05$ în fosfat de sodiu și $\mu=0,10$ în NaCl. Prin creșterea concentrației de NaCl în tampon se obțin 6 fracțiuni cromatografice (a forța ionică a tamponului de 0,20, 0,22, 0,25, 0,30, 0,40 și respectiv de 2,0), aducîndu-se contribuții cu privire la eterogenitatea tireoglobulinei.

Roos și Gemzell (39) izolează din urină FSH pe coloană de DEAEC echilibrată cu fosfat de sodiu 0,02 M, pH 7,0, eluînd cu gradient de molaritate (0,06 M). Materialul activ a fost în continuare fracționat pe Sephadex G-100. Separarea incompletă a tireoglobulinei umane de proteinele serice, care o impurifică în cazul preparării extractelor, a fost realizată prin cromatografie pe DEAEC de Stanley (43). Pickering și colaboratorii (31) precum și Birk și Li (9), purifică parțial ACTH obținut din hipofiza de oaie pe CMC, materialul obținut conținînd 40% din întreaga activitate

Tabeau nr. 1
Ioniți pe bază de celuloză

Denumirea produsului	Tipul ionului	Simbolul distinctiv			Capacitatea de schimb mval/g
		Pudre	Fulgi	Hirtie	
Amino-etil-celuloză	Anionit slab bazic	AE-50	AE-50	AE-30	1,00 0,60 0,30
Carboximetil-celuloză	Cationit slab acid	CM-30 CM-70	CM-30 CM-70	CM-50	0,70 0,50 2,40
Citrat de celuloză	Cationit carboxilic de aciditate medie	CT-60	CT-60	CT-30	1,20 1,00 0,40 0,50
Dietil-aminoetil-celuloză	Anionit cu bazicitate medie	DE-50 ¹⁾	DE-50	DE-20	1,00 0,40 0,50
Celuloză Ecteoia	Anionit slab bazic	ET-30	ET-30	ET-20	0,30
Fosfat de celuloză	Cationit bifuncțional cu grupe puternic și mediu acide	P-10 P-40 P-70	P-10 P-40 P-70	P-20	a ²⁾ 1,0 4,2 7,4 2,1 0,6 ± 0,1
Celex CM (CM-W) Celex D (DEAE-SF) Celex E Celex P (P-W) P CAM (CM)	Cationit Anionit Anionit Cationit Cationit Cationit	Carboxi-metil-celuloză Dietil-amino-etil-celuloză Amină terțiară Fosfat de celuloză Fosfat de celuloză Carboxi-metil-celuloză			0,8 ± 0,1 0,3 ± 0,05 0,7 ± 0,1 — —

1) Celuloza DE este identică cu celuloza DEAE

2) a — valoarea teoretică a capacității maxime de schimb a ionului bifuncțional
b — valoarea minimă de schimb a grupărilor puternic acide.

a extractului acid acetonc; prin recromatografiere se obține un hormon de înaltă puritate în proporție de 100 mg/kg țesut hipofizar.

Cromatografiată pe CMC de *Smith* (41), insulina de șobolan pare a fi omogenă, eluindu-se cu un singur vîrf, dar se dovedește eterogenă la fracționarea pe DEAE. În aceste cercetări, CMC a fost echilibrată cu citrat monosodic 0,04 M, pH 3,3, eluindu-se cu gradient de NaCl 0,25 μ , iar DEAE cu 0,04 M TRIS, conținînd 0,001 M Versene (tampon TRIS-HCl-Versene) la pH 7,6, ajustat cu HCl, eluația făcîndu-se cu NaCl 0,3 M.

De utilizarea ionizilor celulozici beneficiază în măsură egală cercetările de enzimologie. *Kenney* (24) purifică transaminaza pe DEAE. *Merritt* și *Tomkins* (26) cromatografiază pe aceiași anionit dehidrogenaza. *Bloch* și colaboratorii (11), *Aqvist* și *Anfinsen* (4) cromatografiază pe CMC și DEAE ribonucleaza din extractele pancreatice, iar *Adachi* și colaboratorii (1) fracționează pe CMC aceeași enzimă, obținută din reticulocitele de iepure.

Studiind inactivarea ribonucleazei prin fosforilare, *Taborsky* (46, 47) cromatografiază ribonucleaza pancreatică pe CMC. Tirozinaza este cromatografiată de *Brown* și *Ward* (14) pe DEAE. Palmitiltransferaza a fost purificată de *Norum* (28) pe DEAE; la fel uridiltransferaza obținută din hematii de *Riabov* și colaboratorii (36). Combinînd procedeul de adsorbție pe gel de fosfat de calciu cu precipitarea salină, filtrarea pe Sephadex G-100, electroforeza pe coloană și cromatografia pe DEAE, *Björk* (10) purifică endonucleazele din cartofi. Materialul încărcat pe ionitul echilibrat cu TRIS-HCl 0,01 M, pH 8,5, este eluat cu tamponul de echilibrare, apoi cu 0,04 M și 0,40 M TRIS-HCl de aceeași pH.

Fosfataza alcalină a fost purificată pe TEAE-celuloză și Sephadex G-200 (18). iar peptidaza A pe AE-celuloză (22) Δ -hemolizina stafilococică a fost purificată pe CM- și TEAE-celuloză și obținută în stare cristalină (49), la fel au fost purificate pe DEAE autoaglutininele la rece și hemolizinele de iepure obținute față de variații antigeni (3). *Phillips* și *West* (30) au descris o metodă pentru purificarea sulfatului de protamină pe DEAE, utilizat pentru precipitarea cantitativă a acizilor ribonucleici solubili și ribozomali.

Eterogenitatea ovomucoidului a fost demonstrată (7) prin cromatografie pe TEAE-celuloză, echilibrată cu fosfat de sodiu pH 6,8, 0,004 M, cu gradient de salinitate (0,02 M, 0,10 M și 0,20 M NaCl).

Numeroși constituenți protidici au fost studiați prin cromatografie pe DEAE. TEAE- sau CM-celuloză: eritropoietina (2, 5, 34), fagocitostimulinele (8), fitohemaglutinina (33), componenții complementului (35), hemoglobina (16), ceruloplasmina (13), haptoglobina (25), toxinele animale (37), proteinele vegetale (27, 45), fibrinogenul (19), protaminele (30), factorii coagulării (48). De asemenea au fost izolate cu aceeași tehnică, oligonucleotidele (1, 15) și acizii nucleici (6, 32). În ceea ce privește ECTEOLA-celuloza, ea a fost utilizată cu succes pentru cromatografierea dehidrogenazei (50, 51) precum și a acidului hialuronic, heparinei și acidului condroitin-sulfuric (38). În ultimii ani se extinde o variantă a acestor procedee de fracționare — tehnica de cromatografiere a proteinelor și nucleoproteinelor în strabuzțire pe ionii celulozici (20, 40).

Cromatografierea proteinelor pe coloană cu ionii celulozici conjugată cu alte tehnici de fracționare (precipitare salină, electroforeză, filtrare prin geluri etc.) permițînd izolarea proteinelor dintr-un amestec eterogen, oferă posibilități noi de purificare a acestora. Introducerea în tehnica modernă de laborator a cromatografierii proteinelor pe schimbători de ioni derivați ai celulozei contribuie la progresul cunoștințelor noastre privind relațiile dintre structura și funcția proteinelor plasmatică, activitatea enzimatică și hormonală precum și studiul mecanismelor fundamentale ale imunității.

Sosit la redacție: 1 iunie, 1970.

1. ADACHI K., NOGANO K., NAKAO M.: *Biochim. Biophys. Acta* (1964), 92 59; 2. ALT H. L., RAMBACH W. A., COOPER J. A. D.: Proceedings of the seventh International Congress of the International Society of Haematology, Rome, sept. 1958; 3. AMIRAIAN K., LEIKHIM E. J.: *J. Immunol.* (1961), 87, 301; 4. AQVIST S. E. G., ANFINSEN C. B.: *J. Biol. Chem.* (1958), 234, 1112; 5. BACIU I., SECAREANU ȘT., VASILE V., POPA L.: *Clujul Medical* (1964), 2, 118; 6. BAUGLEY B. C., BERGQUIST P. L., RALPH R. K.: *Biochim. Biophys. Acta* (1965), 95, 510; 7. BEELEY J. G., JEVONS P. R.: *Biochim. Biophys. Acta* (1965), 101, 133; 8. BENETATO GR., BACIU I., SECAREANU ȘT., COJOCARU A., MOCODEANU J., VITEBSKI V., SOLTUZ V.: *Revue des Sciences Médicales* (1962) 7, 7; 9. BIRK I., LI C. H.: *Biochim. Biophys. Acta* (1964), 82, 430; 10. BJÖRK W.: *Biochim. Biophys. Acta* (1965), 95, 652; 11. BLOCH K., CHAYKIN S., PHILLIPS A. H., DE WAARD A.: *J. Biol. Chem.* (1959), 234, 2592; 12. BOUCHILLOUX S., ROLLAND M., TORRESANI J., ROQUES M., LISSITZKY S.: *Biochim. Biophys. Acta* (1964), 93, 15; 13. BROMAN I., KJELIN K.: *Biochim. Biophys. Acta* (1964), 82, 101; 14. BROWN F. C., WARD D. N.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1959), 100, 701; 15. BRUDON M. G., SMELLIE R. M. S., DAVIDSON J. N.: *Biochim. Biophys. Acta* (1964), 91, 46; 16. CHERNOFF A. I., PETTIT N. JR.: *Biochim. Biophys. Acta* (1965), 57, 47; 17. DEUTSCH H. F., STIEHM E. R., MORTON J. I.: *J. Biol. Chem.* (1961), 236, 2216; 18. ENGSTRÖM L.: *Biochim. Biophys. Acta* (1964), 92, 71; 19. FINLAYSON J. S., MOSESSON M. W.: *Biochim. Biophys. Acta* (1964), 82, 415; 20. GRIPPO M., JACCARINO M., ROSSI M., SCARANO E.: *Biochim. Biophys. Acta* (1965), 95, 1; 21. HESS B., WALTER S. J.: *Klin. Wschr.* (1961), 39, 213; 22. HOFMANN T., SHAW R.: *Biochim. Biophys. Acta* (1964), 92, 543; 23. IONESCU T. D.: *Schimbători de ioni*, Ed II., Ed. Tehnică, București, 1964; 24. KENNEY F. T.: *J. Biol. Chem.* (1959), 234, 2707; 25. KRAUSS S., SARCONE E. J.: *Biochim. Biophys. Acta* (1964), 90, 301; 26. MERRITT A. D., TOMKINS G. M.: *J. Biol. Chem.* (1959), 234, 2778; 27. NOORT G. VAN, WILDMAN S. G.: *Biochim. Biophys. Acta* (1964), 90, 309; 28. NORUM K. R.: *Biochim. Biophys. Acta* (1964), 89, 95; 29. PETERSON E. A., SOBER H. A.: *J. Am. Chem. Soc.* (1956), 78, 751; 30. PHILLIPS G. R., WEST J.: *Biochim. Biophys. Acta* (1964), 91, 416; 31. PICKERING B. T., ANDERSEN R. N., LOHMAR P., BIRK Y., LI C. H.: *Biochim. Biophys. Acta* (1963), 74, 763; 32. PORTOCALA R., POPA L., SAMUEL I.: *Biochim. Biophys. Acta* (1965), 95, 185; 33. PRAGER M. D., SPEER R. J.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1959), 100, 68; 34. RAMBACH W. A., COOPER J. A. D., ALT H. L.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1958), 98, 602; 35. RAPP H. I.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1959), 100, 730; 36. RIABOV S., INOUE T., PARKER D., HSIA D., YI-YUNG: *Biochim. Biophys. Acta* (1965), 99, 173; 37. RIESEN W. H., GROSS A. M., HAWRYLEWICZ E. J.: *Biochim. Biophys. Acta* (1964), 90, 383; 38. RINGERTZ N. R., REICHARD P.: *Acta Chem. Scand* (1960), 14, 303; 39. ROOS P., GEMZELL C. A.: *Biochim. Biophys. Acta* (1964), 93, 217; 40. SIMONIANOVÁ E., RYBAK M.: *Biochim. Biophys. Acta* (1964), 93, 194; 41. SMITH L. F.: *Biochim. Biophys. Acta* (1964), 82, 231; 42. SOBER H. A., GUTER F. J., WYCKOFF M. M., PETERSON E. A.: *J. Am. Chem. Soc.* (1956), 78, 756; 43. STANLEY P. G.: *Biochim. Biophys. Acta* (1963), 78, 756; 44. STEELMAN S. L., SEGALOFF A., ANDERSEN R. N.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1959), 101, 452; 45. STOCKWELL D. M., DECHARY J. M., ALTSCHUL A. M.: *Biochim. Biophys. Acta* (1964), 82, 221; 46. TABORSKY G.: *J. Biol. Chem.* (1959), 234, 2652; 47. TABORSKY G.: *J. Biol. Chem.* (1959), 234, 2915; 48. URAYAMA T.: *Biochim. Biophys. Acta* (1964), 93, 683; YOSHIDA A.: *Biochim. Biophys. Acta* (1963), 71, 544; 50. YOSHIDA A., FREESE E.: *Biochim. Biophys. Acta* (1964), 92, 33; 51. YOSHIDA A., FREFSE E.: *Biochim. Biophys. Acta* (1965), 99, 56.