

4 Fermentation und Proteinisolierung

4.1 Fermentation

4.1.1 Zellanzucht in 2 X YT-Medium

Geringe Mengen einer Glycerinkultur wurden auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausgestrichen und Zellkolonien während 20 h bei 37°C angezogen. Eine Einzelkolonie wurde mittels Impföse in einen Schüttelkolben mit 200 ml LB-Medium plus 100 mg.l⁻¹ Ampicillin transferiert und bei 37°C bei 200 Upm im Schüttelinkubator über Nacht vermehrt. Die Anzucht der Zellen und Expression der Gene erfolgte im Fermenter bei 37°C unter ausreichender Luftzufuhr. Acht Liter 2 X YT-Medium mit 100 mg.l⁻¹ Ampicillin wurden im Verhältnis 1:100 mit der Übernachtskultur inoculiert und Zellen bis zu einer OD₆₀₀ von 0.7 angezogen. Die Expression der Gene wurde mit 1 mM Isopropyl-thio-β-D-galactosid eingeleitet. Nach 18 h wurden die Zellen bei 7 000 x g für 20 min abzentrifugiert, in Puffer HP_{LAUF} resuspendiert und in Aliquots von ca. 10 g Zellpaste pro 30 ml in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert. Pro Liter Anzuchtsmedium wurden durchschnittlich 18 g Pellet erhalten.

4.1.2 Zellanzucht in NMM-Medium

Zur Anzucht von Selenomethionin-derivatisiertem Protein wurde das Plasmid pBT288 in den auxotrophen *E. coli* AM943(met⁻) Stamm transformiert. Anfänglich wurden Einzelkolonien auf NMM/Met⁺-Agarplatten, anschließend auf NMM/Se-Met⁺-Agarplatten mittels Impföse mehrere Male nacheinander ausgestrichen und für 24 h bei 37°C inkubiert, um die Zellen an das NMM-Medium zu gewöhnen. Damit die Möglichkeit einer revertierten Kolonie ausgeschlossen werden konnte, wurde gleichzeitig auf NMM/Met⁻-Agarplatten ausplattiert und nach 24 h auf Wachstumshemmung kontrolliert. Nach dieser Eingewöhnungsphase dienten Einzelkolonien zum Animpfen einer Übernachtskultur bestehend aus 200 ml LB-Medium und 100 mg.l⁻¹ Ampicillin. Im Verhältnis 1:100 wurden drei 2 l Schüttelkolben à 1 l 2 X YT-Medium (inklusive 100 mg.ml⁻¹ Ampicillin) mit der Übernachtskultur inoculiert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.7 angezogen. Anschließend wurden die Zellen bei 7 000 x g für 5 min abzentrifugiert, in 0.2 M Lactose suspendiert und in 8 l NMM/Se-Met⁺-Medium (100 mg.ml⁻¹ Ampicillin) im Fermenter inoculiert. Um einen Einbau von Methionin, das aus der Wachstumsphase im 2 X YT-Medium im Zellcytosol vorhanden war, bei der Proteinsynthese der Gene ε und ζ zu vermeiden, wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0.9 angezogen und erst dann

mit 1 mM Isopropyl-thio- β -D-galactosid induziert. Nach 48 h Induktionszeit blieb die OD₆₀₀ bei 1.3 konstant und die Zellen wurden mit 7 000 x g für 10 min abzentrifugiert. 24 g Zellpaste suspendiert in 90 ml Puffer HEP_{LAUF} mit 5 mM 1,4-Dithiothreitol und in 30 ml Portionen aliquotiert, wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert. Die Zugabe von 1,4-Dithiothreitol erfolgte, um eine Oxidation des Selenomethionins zu verhindern.

4.2 Proteinisolierung

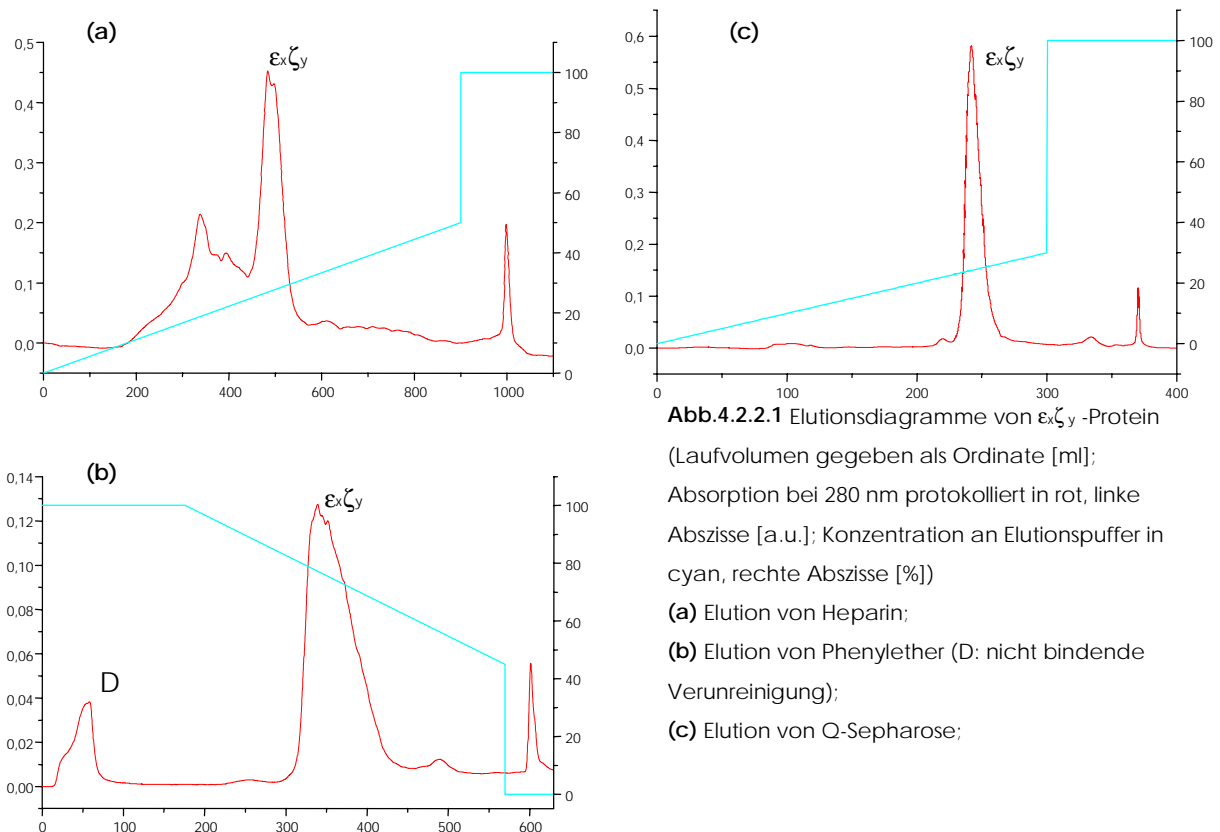
4.2.1 Zellaufschluß und Ultrazentrifugation

Zwei Aliquots mit jeweils 30 ml Zellsuspension wurden in Eiswasser aufgetaut und mit Puffer HEP_{LAUF} im Verhältnis 1:1 verdünnt. Mit Hilfe einer *FRENCH*[®] *Pressure Cell Press* (SLM Instruments, INC.) wurden die Membranen der Zellen bei ca. 900 PSI aufgebrochen und der Pressvorgang der Vollständigkeit halber drei Mal wiederholt. Um die dabei resultierende Erwärmung der Probe zu reduzieren, wurde diese zwischendurch auf Eis gekühlt. Mittels Ultrazentrifugation bei 63 000 x g für 1 h wurden Schwebbestandteile pelletiert und abschließend die dekantierte Lösung durch einen 0.22 μ m Spritzenfilter gefiltert. Dieses Verfahren blieb bei den verschiedenen Proteinreinigungen gleich. Lediglich bei der Aufreinigung des mit Selenomethionin derivatisierten Proteins wurde der Puffer HEP_{LAUF} auf 5 mM 1,4-Dithiothreitol eingestellt.

4.2.2. Reinigung des Wild-Typ Proteins und der Punktmutanten

Als erstes Chromatographie-Material wurde Heparin quervernetzt mit 4%iger Agarose ("beaded agarose") (SIGMA, Steinheim) gewählt. Dieses wurde in einen FPLC-tauglichen Säulenkörper (\varnothing : 26mm; *l*: 150mm) gepackt und bei einer Flussrate von 1.5 ml.min⁻¹ betrieben. Die mit Puffer HEP_{LAUF} equilibrierte Säule wurde mit Rohextrakt beladen und anschließend mit sechs Säulenvolumen gewaschen, bis die Absorption bei OD₂₈₀ die ursprüngliche Basislinie wieder erreichte. Im Gradientenverfahren wurde im Verlauf von 900 ml die Konzentration an Puffer HEP_{ELUT} auf 50 % erhöht. Beide Proteine eluierten als Komplex bei einer Ionenstärke von 150 bis 250 mM NaCl. Das Elutionsverhalten wurde mittels Absorption bei OD₂₈₀ protokolliert (Abb. 4.2.2.1.a). Da dieser erste Reinigungsschritt selektiv für den Proteinkomplex war, eluierte dieser in Fraktionen mit höchster Absorption. Die Proteinreinheit wurde mit Hilfe von SDS-Gelelektrophorese beurteilt und die reinsten Fraktionen (ca. 90 ml) für weitere Aufreinigungsschritte verwendet.

Als zweiter Schritt wurde eine hydrophobe Interaktion benützt, mit Säulenmaterial bestehend aus Phenylether quervernetzt mit Polystyren-divinylbenzen (POROS®). Dieser Schritt wurde an einer BioCAD®-Workstation (PerSeptive Biosystems, INC.) mit einem präparativen Säulenkörper (\varnothing : 4.6 mm; l : 100 mm) bei einer Flussrate von $16.0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ durchgeführt. Mit feingepulvertem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ auf eine Konzentration von 1.3 M eingestellt, wurden je Lauf Proteine aus 15 ml sterilgefilterter Lösung an das mit Puffer PE_{LAUF} equilibrierte Säulenmaterial gebunden. In einer Gradientenmischung (25 Säulenvolumen) zu 45 % Puffer PE_{ELUT} ($560 \text{ mM } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) eluierte der Proteinkomplex als breites Absorptionsmaximum beginnend bei ca. $900 \text{ mM } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Abb.4.2.2.1.b). Abschließend wurden mit PE_{ELUT} die noch gebundenen Proteine von dem Säulenmaterial eluiert. Kontrolliert mittels SDS-Gelelektrophorese zeigten die gesammelten Fraktionen bereits einen hohen Reinheitsgrad.



Um eine anschließende Bindung an einen starken Ionenaustauscher zur Proteinkonzentrierung zu gewährleisten, musste die durch diesen Reinigungsschritt stark verdünnte Proteinlösung (ca. 250 ml) drei Mal gegen 5 l Puffer QS_{LAUF} dialysiert werden. Hierfür war eine Dialysemembran (Spectra/Por, Spectrum Laboratories, INC.) mit kleinem Ausschlussvolumen (3.5 kDa) zu verwenden, da ansonsten ϵ ($\sim 11.7 \text{ kDa}$) langsam durch

die Membran diffundieren konnte. Es zeigte sich im Verlauf der Arbeit, dass ε bei Konzentrationen höher als 1.3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ vom $\varepsilon_2\zeta_2$ Komplex dissoziieren konnte und damit die stöchiometrischen Verhältnisse der Lösung verändert wurden.

Der letzte chromatographische Schritt diente der Konzentrierung des Proteinkomplexes. Als starker Anionentauscher erwies sich Q-Sepharose® (quaternäres Ammonium quervernetzt mit 6%iger Agarose) als geeignet. Hierfür wurde eine vorgepackte "HiLoad" Säule der Firma Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg benutzt (\varnothing : 16 mm; l : 110 mm; Flussrate: 2.0 ml.min⁻¹). Mit Puffer QS_{LAUF} equilibriert wurden die Proteine an das Säulenmaterial gebunden und mit einem Säulenvolumen gewaschen. Erhöhte man innerhalb 300 ml Pumpvolumen die Konzentration an Puffer QS_{ELUT} kontinuierlich bis 30 % QS_{ELUT}, so eluierte der Komplex als scharfer *Peak* bei 150 mM NaCl (Abb. 4.2.2.1.c). Die durch SDS-Gelelektrophorese analysierten Proteinlösungen zeigten, dass der Proteinkomplex ~99 % rein vorlag. Die gesammelten Fraktionen wurden erneut drei Mal gegen HP_{LAUF} dialysiert. Auch hier wurde ein sehr kleines Ausschlussvolumen der Dialysemembran gewählt.

4.2.3 Aufreinigung des mutierten ε, ζ (V234Stop) Proteinkomplexes.

Wie in Kapitel 3.2.3 erläutert, wurde bei dieser Mutation C-terminal 43 Aminosäuren entfernt. Wegen dieser Verkürzung war anzunehmen, dass das Protein im Vergleich zu Wild-Typ Protein eine unterschiedliche Affinität zu den in der Aufreinigung verwendeten Säulenmaterialien besitzt. Deshalb wurde von der üblichen Aufreinigung abgesehen. Die aufgetaute Zellsuspension wurde vor dem Aufschluss mit der *French Press* verdünnt und auf 100 mM NaCl eingestellt. Damit sollte die Löslichkeit der Proteine nach dem Öffnen der Zellen erhöht werden. Das Aufbrechen der Zellmembranen und die nachfolgende Ultrazentrifugation erfolgten in gleicher Weise wie bei der Aufreinigung der anderen Proteine. Der zentrifugierte Überstand wurde auf 0.25 % (v/v) Polyethylenimin eingestellt. Dabei wurde die im Rohextrakt enthaltene DNA und RNA unter ständigem Rühren präzipitiert. Nach einer Stunde war die Reaktion vollständig, und die Suspension wurde bei 64 000 x g für 30 min ultrazentrifugiert und damit die gefällten Produkte und andere Schwebbestandteile pelletiert. Mit flüssiger, bei Raumtemperatur 100%ig gesättigter Ammoniumsulfatlösung wurde der Überstand unter langsamem Eintropfen auf 40 % eingestellt. Um eine Änderung des pH-Wertes zu vermeiden, enthielt die gesättigte Ammoniumsulfatlösung 50 mM Tris und war mit HCl auf pH 7.5 titriert worden. Nach 30 min Rühren wurde die nun unlösliche Komponente bei 15 000 x g für 20 min abzentrifugiert. Dieser Schritt diente einer fraktionierten Fällung, bei der die Proteine ε und ζ (V234Stop) noch in Lösung blieben. Anschließend wurde die Konzentration langsam auf 65 % Ammoniumsulfat gebracht und für 30 min gerührt. Dabei

fielen die zu reinigenden Proteine aus und konnten bei 15 000 x g für 20 min pelletiert werden. Der Niederschlag wurde mit einer Lösung bestehend aus 50 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl und 70 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gewaschen und erneut abzentrifugiert. Wiederum wurde der Niederschlag in der gleichen Lösung suspendiert aber dann in einen Dialyseschlauch (Spectra/Por, Spectrum Laboratories, INC.; Aufschlussvolumen: 3.5 kDa) gefüllt. Anschließend erfolgte eine dreimalige Dialyse gegen 5 l Puffer QS_{LAUF} . Dabei lösten sich die gefällten Proteine vollständig reversibel und konnten nach einer Sterilfiltration ($0.22 \mu\text{m}$) an eine Q-Sepharose (Kapitel 4.2.2) gebunden werden. In einem Gradienten von 0% zu 50 % an Puffer QS_{ELUT} wurde das Proteingemisch getrennt. Nach einer SDS-Gelelektrophorese wurden Fraktionen mit einem Reinheitsgrad von mehr als 70 % ausgewählt, um weitergereinigt zu werden. 60 ml dieser Lösung wurden dann mit fein gepulvertem Ammoniumsulfat auf 1.4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eingestellt. Ab diesem Reinigungsschritt wurde die Aufreinigung mit Hilfe einer hydrophoben Interaktion, Dialyse und anschließender Konzentrierung mit Hilfe von Q-Sepharose[®] nach dem in Kapitel 4.2.2 beschriebenen Protokoll durchgeführt.

4.2.4 Konzentrierung der Proteinlösungen

Abschließend konnte die Proteinlösung mit Hilfe von ULTRAFREE - 15 CENTRIFUGAL FILTER DEVICE (Millipore Corporation, Bedford) mit einem Ausschlussvolumen von 10 kDa konzentriert werden. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford (1976). Als für die Kristallisation geeignete Proteinkonzentration erwiesen sich 16 mg.ml^{-1} . Pro Aufreinigung wurden durchschnittlich 25 mg Proteinkomplex erhalten.

4.1.5 Aufreinigung des Selenomethionin-derivatisierten Proteins

Die Reinigung des Selenomethionin-derivatisierten $\epsilon_x\zeta_y$ Proteinkomplexes erfolgte in gleicher Weise wie jene des Wild-Typ-Proteins, jedoch wurden alle 24 g Zellpaste einer Fermentation aufgeschlossen. Alle Pufferlösungen enthielten zusätzlich 5 mM 1,4-Dithiothreitol. Bedingt durch eine schwache Proteinproduktion der Zellen wurden Fraktionen verringerter Reinheit nach der Elution von Heparin erhalten. Diese konnten jedoch nach der Elution von Phenylether mit ähnlicher Reinheit wie der des Wild-Typ Proteins isoliert werden. Es gelang, 2 mg Protein zu reinigen. Diese wurden auf 8 mg.ml^{-1} Protein konzentriert. Da die Zellen vor Induktion in 2 X YT-Medium angezogen wurden, war der tatsächliche Einbau an Selenomethionin ungewiss. Für das angestrebte MAD-Experiment war eine Substitution von Schwefel durch Selen mit einer Positionsbesetzung von mehr als 90 % notwendig, deshalb

musste diese vorab geklärt werden. Dies erfolgte mit Hilfe von MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight spectroscopy*).

4.3 Materialcharakterisierung mittels MALDI-TOF

Bei dieser Ionisations-Massenspektrometrie wurde das Protein, das in einer kristallinen Matrix aus Sinapinsäure (3,5-Dimethoxy-4-hydroxymizsäure) eingebettet vorlag, gemeinsam mit dieser von einem Laserstrahl ionisiert und in einem Flugzeitanalysator charakterisiert. Zusätzlich gab diese Analyseverfahren eine generelle Information über die Reinheit des Proteins. Im MALDI-TOF Experiment flogen die Proteine ϵ und ζ getrennt. Wenngleich das einfach geladene ϵ ein gutes Signal bei 10 585 Da lieferte, erhob sich das detektierte Signal für einfach geladenes ζ mit 32 278 Da nur schwach vom Untergrund. Zusätzlich konnte zweifach geladenes ζ bei einem Masse/Ladungskoeffizienten von 16 148 beobachtet werden. Das Signal bei 21 193 konnte einem Zerfallsprodukt von ζ zugeordnet werden (Camacho, pers. Mitt.) Bei 10 792 wurde ein Adukt von ϵ und Sinapinsäure als *Artefact* der Messmethode beobachtet.

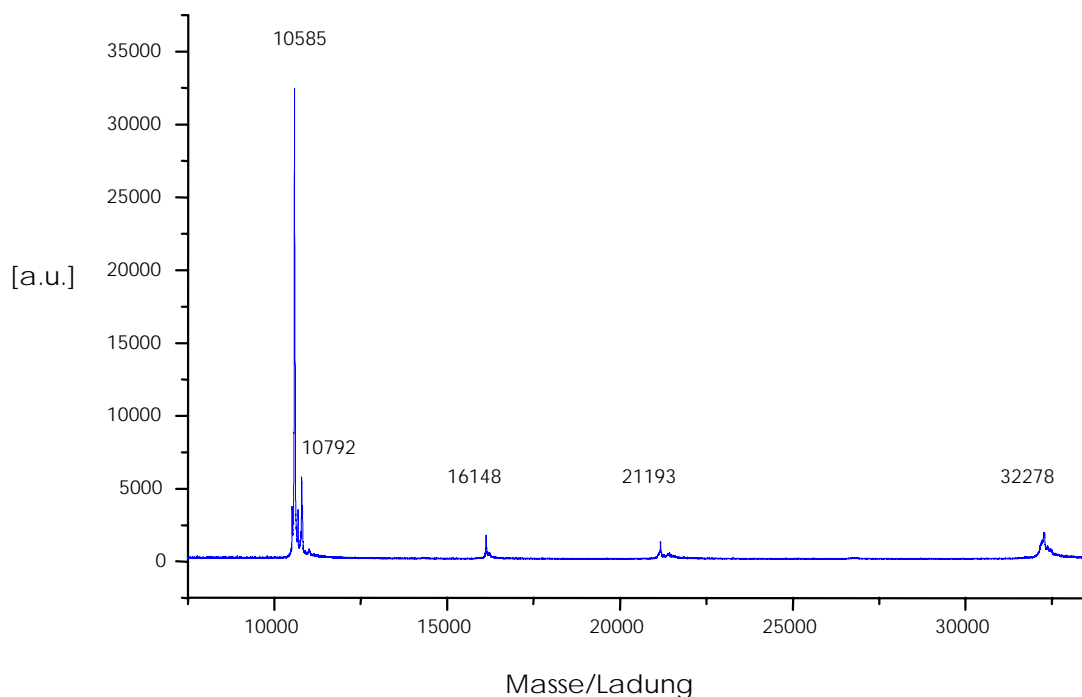


Abb.4.3.1 MALDI-TOF Diagramm des $\epsilon_x\zeta_y$ Wild-Typ-Proteins.

Um gerätebedingte detektierte Masseschwankungen zu vermeiden, wurden in einer Sitzung Wild-Typ und Selenomethionin-derivatisiertes Protein in nacheinander folgenden

Experimenten gemessen. Die unterschiedlichen Massenzahlen von Schwefelatomen (32.06) und Selenatomen (78.96) sollten dabei zu unterschiedlichen Massen der Proteine führen. Sieht man von einem N-terminalen Methionin der Polypeptidkette ϵ ab, das abgespalten wird (Camacho, pers. Mitt.), so enthält das Protein ϵ ein einziges Methionin. Deshalb sollte die Massendifferenz von einfach geladenem ϵ 49.6 Da betragen. Die Differenz von Wild-Typ Protein ϵ (10 585 Da) und dessen Selenomethionin-derivatisiertem Analogon (10 634 Da) beweist dies (Abb.4.3.2.a). Zusätzlich war nicht-derivatisiertes Protein in dieser Aufreinigung detektierbar. Generell ist bei MALDI-TOF Experimenten eine quantitative Aussage sehr schwer, da unterschiedliche Proteine unterschiedliches Flugverhalten zeigen. In diesem Fall war eine ungefähre Quantifizierung des Gehalts an derivatisiertem und underivatisiertem Protein möglich, da für beide Proteinarten gleiches Verhalten in MALDI-TOF Experimenten angenommen werden konnte. Ein grober Vergleich der beiden *peak*-Flächen, die nicht klar basisliniengetrennt werden konnten, zeigt eine Substitution von Schwefel durch Selen von mehr als 90 %. Zusätzlich wurde in beiden Experimenten ein Sinapinsäure-Adukt mit einer Massendifferenz von ca. 208 beobachtet.

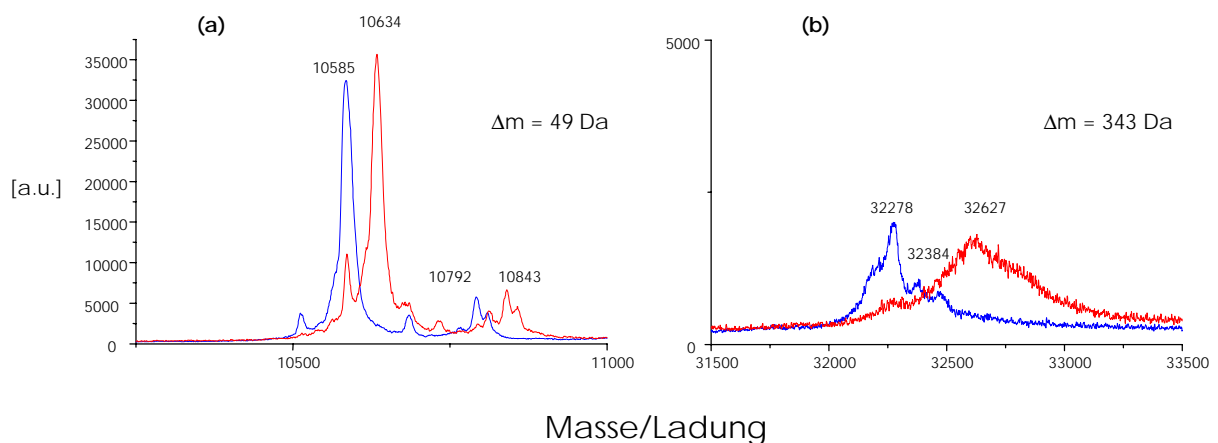


Abb.4.3.2 Überlagerte MALDI-TOF Diagramme des ϵ ζ _y Wild-Typ Proteins (blau) und des selenomethionin-derivatisierten Proteins (rot); (a) Überlagerung der beiden ϵ Massenpeaks (b) Überlagerung der beiden ζ Massenpeaks.

Das Signal des einfach geladenen Wild-Typ Proteins ζ zeigte einen Doppel-*Peak* bei 32 278 Da und 32 384 Da (Abb.4.3.2.b). Dies stimmt überein mit Beobachtungen von Camacho (pers. Mitt.), dass ~60 % der Moleküle kein N-terminales Methionin mehr besitzen und deshalb diese zwei unterschiedlichen Massenpopulationen entstehen. Im Vergleich dazu war der Massen-*Peak* des selenomethionin-derivatisierten Proteins zu 32 627 Da verschoben. Damit konnte eine erfolgreiche Derivatisierung gezeigt werden. Die Massendifferenz der Maxima beider Messungen korrespondiert mit der errechneten

Differenz von sieben Schwefel- und sieben Selenatomen (343 Da). Dies würde bedeuten, dass das N-terminale Methionin nicht mehr vorhanden ist. Da das Signal stark verrauscht war, konnte keine eindeutige Aussage über den Grad der Derivatisierung getroffen werden. Ebenso war eine Unterscheidung von Polypeptidketten mit und ohne N-terminalem Selenomethionin nicht möglich.