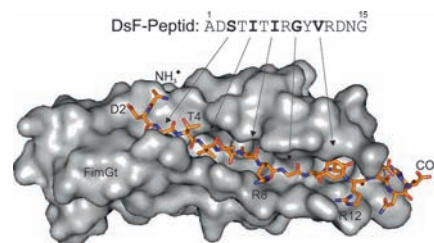


# Der stabilste Protein-Liganden-Komplex: Anwendung für die Einschritt-Affinitätsreinigung und Identifizierung von Protein- komplexen\*\*

Christoph Giese, Franziska Zosel, Chasper Puorger und Rudi Glockshuber\*

Die Reinigung von Proteinkomplexen und die Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungsnetzwerken im großen Maßstab sind durch die Entwicklung einer Reihe von Affinitätsmarkern, wie dem cmc-, FLAG- oder His<sub>6</sub>-Tag, maßgeblich vereinfacht worden.<sup>[2]</sup> Die derzeit verfügbaren Affinitätsreinigungssysteme weisen jedoch dynamische Bindungsgleichgewichte und messbare Dissoziationsgeschwindigkeiten auf, wodurch eine kompetitive Verdrängung gebundener Zielproteine durch einen geeigneten freien Liganden im Überschuss erfolgen kann.<sup>[3]</sup> Dieser Umstand erschwert die quantitative und kostengünstige Isolierung gering konzentrierter Proteinkomplexe. Im Folgenden wird ein neues, von Typ-1-Pili von *E. coli* abgeleitetes Affinitätsreinigungssystem vorgestellt. Typ-1-Pili sind starre, filamentöse, supramolekulare Proteinkomplexe, die in der äußeren Zellmembran verankert sind und in den Extrazellularraum ragen.<sup>[4]</sup> Sie bestehen aus den vier strukturellen Proteinuntereinheiten FimH, FimG, FimF und FimA.<sup>[4a]</sup> Diese Untereinheiten wechselwirken im Pilus nichtkovalent über einen als Donorstrangkplementation bezeichneten Mechanismus, wobei die unvollständige, Immunglobulin-ähnliche Faltung einer Untereinheit durch ein N-terminales, als „Donorstrang“ bezeichnetes Segment der folgenden Untereinheit vervollständigt wird.<sup>[5]</sup> Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem Komplex zwischen FimGt, einer N-terminal verkürzten Variante der Untereinheit FimG, der der eigene Donorstrang fehlt, und einem Peptid, das dem Donorstrang der benachbarten Untereinheit FimF entspricht (DsF), um den kinetisch stabilsten, bisher bekannten Protein-Liganden-Komplex handelt (Abbildung 1).<sup>[5d]</sup>

Hier stellen wir die Anwendung des FimGt/DsF-Systems für die Affinitätsreinigung heterooligomerer Proteinkom-



**Abbildung 1.** Kristallstruktur des FimGt/DsF-Komplexes (3BFQ.pdb).<sup>[5d]</sup> FimGt ist in grauer Oberflächendarstellung gezeigt, und das gebundene DsF-Peptid in Stabdarstellung. DsF-Reste, die in Richtung FimGt zeigen, sind fett gedruckt, und die Pfeile deuten auf ihre Position in der Struktur hin.

plexe aus Zellextrakten vor. Indem der Donorstrang von FimF als Affinitätsmarker (DsF-Tag) und FimGt als immobilisierter Bindungspartner genutzt werden, können wir die Einschrittreinigung DsF-markierter Tryptophansynthase aus *E. coli* demonstrieren, einem heterooligomeren  $\alpha\beta\alpha$ -Komplex, der in der Zelle nur in sehr geringen Konzentrationen vorkommt. Wir vergleichen die Leistungsfähigkeit des DsF-Tags mit derjenigen anderer, gebräuchlicher Affinitätsmarker und zeigen, dass in Übereinstimmung mit der hohen kinetischen Stabilität des FimGt/DsF-Komplexes die Anreicherung von Tryptophansynthase mit dem DsF-Tag am effizientesten erfolgt. Dieser Befund lässt darauf schließen, dass der DsF-Tag nicht nur zur Isolierung gering konzentrierter Proteinkomplexe, sondern vermutlich auch für viele andere technische Anwendungen bestens geeignet ist, z. B. zur funktionellen und dauerhaften Immobilisierung DsF-markierter Proteine auf Oberflächen oder deren Detektion in Zellen oder auf Western-Blot-Membranen.

Als Voraussetzung für eine technische Anwendung des FimGt/DsF-Systems haben wir zunächst die Herstellung von FimGt durch Produktion im Zytoplasma von *E. coli*-BL21-(DE3)-Zellen, in Form unlöslicher Einschlusskörper, optimiert (Hintergrundinformationen, Abbildung S1). Nach Solubilisierung der Einschlusskörper, oxidativer Rückfaltung und Reinigung von FimGt mithilfe konventioneller chromatographischer Methoden war die Ausbeute an gereinigtem FimGt mit 35 mg pro Liter Bakterienkultur für technische Anwendungen genügend hoch. Die quantitative Bildung der einzigen, strukturellen Disulfidbrücke wurde mithilfe eines Ellman-Tests verifiziert.<sup>[6]</sup> Die Identität von FimGt wurde durch ESI-MS bestätigt (ber./gef. Masse: 13656.9/13657.0 Da).

Um Einblick in den Mechanismus der Bindungsreaktion von DsF und FimGt zu erhalten, wurden Assoziationskine-

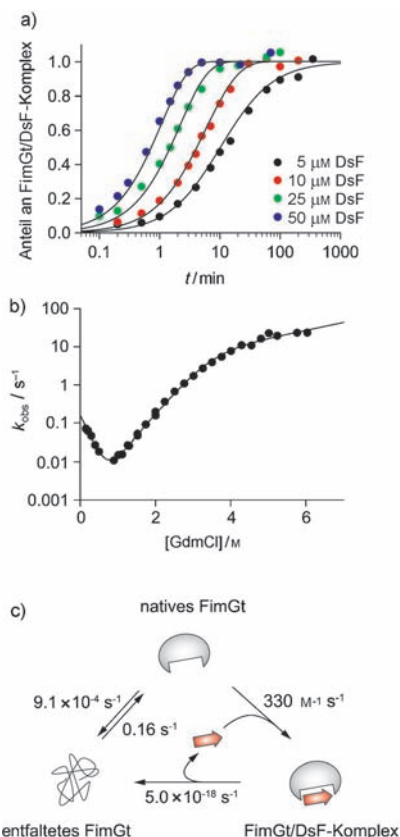
[\*] C. Giese, Dr. C. Puorger, Prof. R. Glockshuber  
Institut für Molekularbiologie und Biophysik, ETH Zürich  
Schafmattstrasse 20, 8093 Zürich (Schweiz)  
E-Mail: rudi@mol.biol.ethz.ch

F. Zosel  
Biochemisches Institut, Universität Zürich  
Winterthurerstrasse 190, 8057 Zürich (Schweiz)

[\*\*] Wir danken herzlichst B. Bukau (Universität Heidelberg) für den *E. coli*-Stamm MC4100  $\Delta rplW::kan$  [pL23], D. Waugh (National Institutes of Health) für das Plasmid pRK793-TEV<sup>[1]</sup> und D. Hilvert (ETH Zürich) für das Plasmid pAC-PTet7-HIV. Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds [Anträge 3100A0-100787 und 310030B-138657/1 (R.G.)] und der ETH Zürich im Rahmen des Nationalen Forschungsschwerpunktes Strukturbioologie unterstützt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201108747> zu finden.

tiken für DsF-Konzentrationen von 5, 10, 25 und 50  $\mu\text{M}$  bei konstanter FimGt-Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  gemessen (Abbildung 2a). Die Reaktionsgeschwindigkeiten waren von der DsF-Konzentration abhängig, was darauf schließen lässt, dass



**Abbildung 2.** Bindung des DsF-Peptids an FimGt. a) Bindungskinetiken von DsF an FimGt (5  $\mu\text{M}$ ) bei pH 8,0, 25 °C. Die durchgezogene Linie entspricht einer globalen Anpassung gemäß einer Reaktion zweiter Ordnung. b) Kinetische Stabilität von FimGt bei pH 8,0, 25 °C. Die durchgezogene Linie zeigt die Anpassung gemäß einem Dreizustandsmodell mit metastabilem, produktivem Intermediat. c) Minimaler Reaktionsmechanismus für die Bindung von DsF an FimGt. Das DsF-Peptid bindet ausschließlich an natives FimGt.

die Bindung von DsF der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Komplexbildung ist. Eine globale Anpassung gemäß einer irreversiblen Reaktion zweiter Ordnung ergab eine Geschwindigkeitskonstante für die Assoziation von  $(330 \pm 8,9) \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Obwohl vergleichsweise langsam, ist die Bindung von DsF an FimGt doch schnell genug, um technische Anwendungen innerhalb angemessener Zeitskalen zu ermöglichen. Wir bestimmten in einem nächsten Schritt die Geschwindigkeitskonstante der spontanen Dissoziation/Entfaltung des FimGt/DsF-Komplexes bei pH 8,0 und 25 °C zu  $(5,0 \pm 0,17) \times 10^{-18} \text{ s}^{-1}$  (extrapolierte Halbwertszeit der Entfaltung: ca. vier Milliarden Jahre; Hintergrundinformationen, Abbildung S2). Dieser Wert ist im Rahmen des experimentellen Fehlers mit dem zuvor bei pH 7,0 erhaltenen Wert identisch.<sup>[5d]</sup> Somit ergibt sich eine Dissoziationskonstante ( $K_{\text{D}}$ ) bei pH 8,0 von  $(1,5 \pm 0,066) \times 10^{-20} \text{ M}$  und entsprechend eine Bindungsenergie von  $(-113 \pm 0,11) \text{ kJ mol}^{-1}$ . Damit ist

der FimGt/DsF-Komplex nach bestem Wissen der nicht nur kinetisch, sondern auch thermodynamisch stabilste Protein-Liganden-Komplex, der bisher bekannt ist.

Als nächstes wurde die kinetische Stabilität von FimGt durch Messen von Rückfaltungs- und Entfaltungskinetiken bei verschiedenen Guanidiniumchlorid-Konzentrationen bestimmt. Da die über die intrinsische Tryptophanfluoreszenz gemessene Rückfaltung von FimGt einen spektroskopisch stillen Schritt enthält,<sup>[7]</sup> wurden die Rückfaltungskinetiken durch unterbrochene Rückfaltungsexperimente bestimmt, die den Anteil nativer Moleküle direkt wiedergeben (Hintergrundinformationen, Abbildung S3). Die halblogarithmische Auftragung der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten der Ent- und Rückfaltung weist bei hohen Denaturierungsmittel-Konzentrationen eine deutliche Abweichung von der Linearität auf (Abbildung 2b). Eine Anpassung an die Daten erfolgte daher gemäß einem Dreizustandsmodell mit metastabilem, produktivem Intermediat.<sup>[8]</sup> Dies ergab für die Geschwindigkeitskonstanten der Faltung und Entfaltung in Abwesenheit von Denaturierungsmittel Werte von  $k_{\text{f}}(\text{H}_2\text{O}) = (0,16 \pm 0,010) \text{ s}^{-1}$  bzw.  $k_{\text{u}}(\text{H}_2\text{O}) = (9,1 \pm 0,57) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  sowie die folgenden kinetischen  $m$ -Werte, die die lineare Abhängigkeit des Logarithmus der Geschwindigkeitskonstanten von der Denaturierungsmittelkonzentration angeben:  $m_{\text{UI}} = d\ln k_{\text{UI}}/d[\text{GdmCl}] = (-4,7 \pm 0,18) \text{ M}^{-1}$ ,  $m_{\text{IN}} = d\ln k_{\text{IN}}/d[\text{GdmCl}] = (-2,2 \pm 0,058) \text{ M}^{-1}$ ,  $m_{\text{NI}} = d\ln k_{\text{NI}}/d[\text{GdmCl}] = (0,47 \pm 0,016) \text{ M}^{-1}$ . Dabei steht U für entfaltetes Protein, N für natives Protein und I für Intermediat.

Mit diesen kinetischen Werten können die thermodynamische Stabilität von FimGt zu  $(-12,8 \pm 0,2) \text{ kJ mol}^{-1}$  und die Kooperativität des Gleichgewichtsübergangs ( $m_{\text{eq}}$ -Wert) zu  $(18 \pm 0,47) \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$  berechnet werden (eq steht für Gleichgewicht). Diese Werte stimmen sehr gut mit den zuvor aus Gleichgewichtsmessungen erhaltenen Daten überein.<sup>[7]</sup> Die lineare Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit der DsF-Bindung an FimGt von der DsF-Konzentration (Abbildung 2a), zusammen mit der niedrigen Geschwindigkeit der spontanen Entfaltung von FimGt (Halbwertszeit ca. 13 min,  $k_{\text{u}}(\text{H}_2\text{O}) = (9,1 \pm 0,57) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ), zeigen, dass das DsF-Peptid direkt an natives FimGt bindet. Dies schließt einen Mechanismus aus, der eine Entfaltung von FimGt vor der Bindung an DsF erfordern würde. Abbildung 2c fasst den resultierenden Bindungsmechanismus zusammen, bei dem nur die Dissoziation von DsF von der Entfaltung von FimGt abhängt. In diesem Zusammenhang weisen wir darauf hin, dass der oben berechnete  $K_{\text{D}}$ -Wert des FimGt/DsF-Komplexes nur für DsF-Konzentrationen unter 500  $\mu\text{M}$  gilt, da sonst die Faltung von FimGt geschwindigkeitsbestimmend würde. Schließlich zeigt der Vergleich von  $k_{\text{u}}(\text{H}_2\text{O})$  des freien FimGt mit der Geschwindigkeitskonstanten der spontanen Dissoziation/Entfaltung des FimGt/DsF-Komplexes, dass die Donorstrangkplementation die Halbwertszeit der spontanen Entfaltung von FimGt um 14 Größenordnungen erhöht.

Durch Messung von NaCl-, Temperatur- und pH-Abhängigkeit wurde die Bindungsreaktion von DsF an FimGt weiter charakterisiert (Hintergrundinformationen, Abbildung S4). Die Erhöhung der NaCl-Konzentration auf 1,0 oder 3,0 M führte zu einer 2- bzw. 6-fach höheren Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und zeigt, dass die Kom-

plexbildung zwischen FimGt und DsF nicht wesentlich durch elektrostatische Wechselwirkungen getrieben wird. Bei 5 °C war die Bindung dreimal langsamer als bei 25 °C, die Messung der Temperaturabhängigkeit ergab eine Aktivierungsenergie von  $(34 \pm 1.6) \text{ kJ mol}^{-1}$ . Bei pH 4.5 war die Geschwindigkeitskonstante der Assoziation zehnmal höher als bei neutralen und basischen pH-Werten. Eine Anpassung an die Daten gemäß einem einfachen Ionisierungsgleichgewicht ergab einen effektiven  $pK_a$ -Wert von  $5.6 \pm 0.1$ , was darauf schließen lässt, dass die Protonierung eines sauren Aminosäure- oder eines Histidinrests für die schnellere Bindung bei niedrigem pH-Wert verantwortlich ist.

Um das FimGt/DsF-System für praktische Anwendungen wie die Affinitätschromatographie nutzbar zu machen, wurde FimGt über seine primären Aminogruppen kovalent an Succinimidylester-aktivierte Sepharose gekuppelt. Mit der gereinigten, DsF-markierten Dithioloxidase DsbA aus *E. coli* (22.9 kDa) wurde die dynamische Bindungskapazität der FimGt-Sepharose zu 220 nmol oder 5 mg DsbA pro Milliliter FimGt-Sepharose bestimmt. Um zu ermitteln, ob das FimGt/DsF-System zur Reinigung DsF-markierter Proteine und ihrer natürlichen Bindungspartner verwendet werden kann, wurde der Tryptophansynthasekomplex aus *E. coli* gewählt.

Dieser besteht aus zwei  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten (TrpA und TrpB;  $\alpha\beta\alpha$ -Tetramer) und katalysiert die letzten beiden Schritte der Tryptophanbiosynthese. Da der Komplex in *E. coli*-Zellen nur in sehr geringer Konzentration vorliegt,<sup>[9]</sup> erwarteten wir hohe Anreicherungsfaktoren für den Fall, dass das FimGt/DsF-System effizient funktionierte. Nach Fusion von DsF mit dem N-Terminus von TrpA wurde DsF-markiertes TrpA unter Verwendung des *tetA*-Promotors in Zellen des *E. coli*-Stammes BW25113  $\Delta trpA768::kan$  nahe am endogenen TrpA-Level produziert (Hintergrundinformationen, Abbildung S5 a). Um eine spezifische Freisetzung von DsF-markiertem TrpA von FimGt-Sepharose unter nativen Bedingungen zu ermöglichen, wurde eine TEV-Protease-Schnittstelle (TEV = tobacco etch virus) zwischen DsF und dem N-Terminus von TrpA eingefügt, die von flexiblen Hexapeptidlinkern flankiert war (Abbildung 3). Abbildung 3b zeigt ein allgemeines Schema zur Anwendung des FimGt/DsF-Systems in der Affinitätschromatographie. Nach Inkubation der FimGt-Sepharose mit löslichem Zellextrakt, der DsF-markiertes TrpA enthielt, wurden die Kügelchen zur Entfernung von Verunreinigungen gewaschen, und gebundenes TrpA wurde durch Inkubation des Säulenmaterials mit His<sub>6</sub>-markierter TEV-Protease freigesetzt. Die TEV-Protease

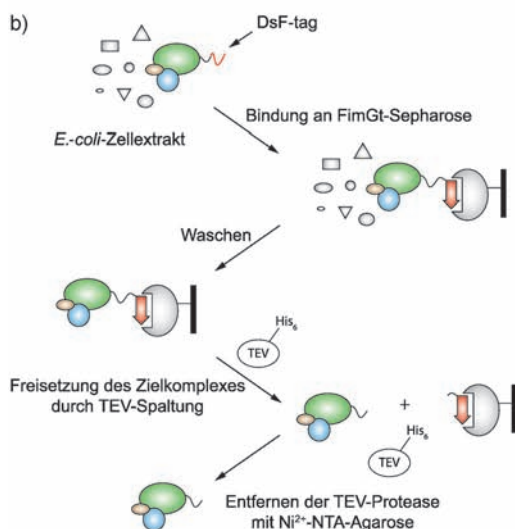
a) N-terminale Fusion:

GCAGACTCTACCATTACTATTTCGGCGCTATGTCAGGGATAACGGCAGCGGTGGAAGTGGTGGCGAGAACCTCTATTTCAGGGCAGCGGTGGAAGTGGAGGT  
A D S T I T I R G Y V R D N G S G G S G G E N L Y F Q G S G G S G G

C-terminale Fusion:

AGCGGTGGAAGTGGTGGCGAGAACCTCTATTTCAGGGCAGCGGTGGAAGTGGAGGTGCAGACTCTACCATTACTATTTCGGCGCTATGTCAGGGATAACGGCTAA  
S G G S G G E N L Y F Q G S G G S G G A D S T I T I R G Y V R D N G \*

b)



c)

Fusionskonstrukt

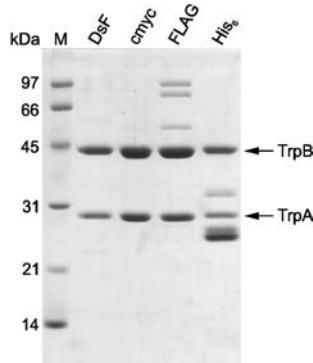
schematische Darstellung

DsF-TrpA	ADSTITIRGYVRDNG-SGGSGG-ENLYFQG-SGGSGG- <span style="border: 1px solid black;">TrpA</span>
cmv-TrpA	EQKLISEEDL-SGGSGG-ENLYFQG-SGGSGG- <span style="border: 1px solid black;">TrpA</span>
FLAG-TrpA	DYKDDDDK-SGGSGG-ENLYFQG-SGGSGG- <span style="border: 1px solid black;">TrpA</span>
His <sub>6</sub> -TrpA	HHHHHH-SGGSGG-ENLYFQG-SGGSGG- <span style="border: 1px solid black;">TrpA</span>
unmarkiertes TrpA	SGGSGG-ENLYFQG-SGGSGG- <span style="border: 1px solid black;">TrpA</span>
L23-DsF	<span style="border: 1px solid black;">L23</span> -SGGSGG-ENLYFQG-SGGSGG-ADSTITIRGYVRDNG

**Abbildung 3.** a) Nucleotid- und Aminosäuresequenzen des in dieser Arbeit genutzten DsF-Tags. Der DsF-Tag kann mit dem N- oder dem C-Terminus eines Zielproteins fusioniert werden. Die DsF-Sequenz ist fett gedruckt, die Erkennungssequenz der TEV-Protease ist fett und kursiv, und die spaltbare Peptidbindung ist durch eine Schere angedeutet. Um den Zugang der TEV-Protease zu ihrer Schnittstelle zu gewährleisten, wurden zwischen DsF-Tag und der TEV-Erkennungssequenz sowie zwischen TEV-Erkennungssequenz und dem N- oder C-Terminus des Zielproteins zwei SGGSGG-Linkersequenzen eingefügt. Das Zielprotein ist als grüne Ellipse angedeutet. b) Allgemeine Arbeitsschritte bei der Anwendung des FimGt/DsF-Systems in der Affinitätschromatographie. c) Schematische Darstellung der hier verwendeten Proteinkonstrukte zur Einschnitt-Affinitätsreinigung von Tryptophansynthase (TrpA-Fusionen) oder Ribosomen (L23-Fusion) aus *E. coli*-Zellextrakten.



wurde durch Zugabe von  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose (NTA = Nitrilotriacetat) entfernt, wonach der äquimolare Tryptophansynthasekomplex im Überstand gewonnen werden konnte. Die SDS-PAGE-Analyse (SDS = Natriumdodecylsulfat, PAGE = Polyacrylamid-Gelelektrophorese) zeigte zwei deutliche Banden für TrpA und TrpB bei ca. 28 bzw. 40 kDa (Abbildung 4). Als Negativkontrolle wurde das Experiment

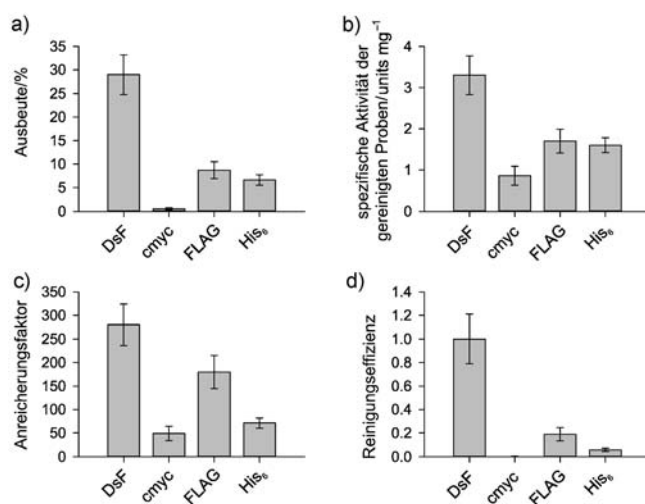


**Abbildung 4.** Mit Coomassie gefärbtes, 15-proz. Polyacrylamid-SDS-Gel, das die Koanreicherung der  $\beta$ -Untereinheit der Tryptophansynthase (TrpB) aus Zellextrakten zeigt. Zur Anreicherung wurden TrpA-Varianten mit verschiedenen Affinitätsmarkern und die zugehörigen Affinitäts-Säulenmaterialien verwendet, gefolgt von Spaltung durch  $\text{His}_6$ -markierte TEV-Protease und ihrer Entfernung mit  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose. Von jeder Probe wurden identische Mengen enzymatischer Aktivität (6 mU) geladen. Die höchste Reinheit wurde mit DsF- und cmc-markiertem TrpA erzielt. Spur M: Molekülmassenstandard.

mit unmarkiertem TrpA wiederholt, wobei keine Tryptophansynthase detektiert werden konnte (Hintergrundinformationen, Abbildung S6). Mit DsF-markiertem TrpA konnte also der aktive Tryptophansynthasekomplex in einem einzigen Schritt aus *E.-coli*-Lysat gereinigt werden.

Um das FimGt/DsF-System mit anderen gebräuchlichen Affinitätsreinigungssystemen bezüglich seiner Effizienz zu vergleichen, wurde die Reinigung der Tryptophansynthase ebenfalls mit cmc-, FLAG- und  $\text{His}_6$ -markiertem TrpA (Abbildung 3c) und den zugehörigen Affinitätssäulen durchgeführt. Für den DsF- und cmc-Tag wurden hochreine Enzympräparationen erhalten, wogegen die mit FLAG- und  $\text{His}_6$ -Tag erhaltenen Proben einen signifikanten Anteil an Verunreinigungen enthielten (Abbildung 4). Für einen quantitativen Vergleich der Leistungsfähigkeit der Affinitätsmarker berechneten wir für jedes der Affinitätsreinigungssysteme die Ausbeute und spezifische Aktivität der gereinigten Tryptophansynthase, den Anreicherungsfaktor und die Reinigungseffizienz (Abbildung 5 sowie Hintergrundinformationen, Tabelle S1). Es zeigt sich, dass der DsF-Tag 1) die höchste Ausbeute und höchste spezifische Aktivität gereinigter Tryptophansynthase erzielt und 2) eine 300-, 5- bzw. 15-fach höhere Reinigungseffizienz aufweist als der cmc-, FLAG- bzw.  $\text{His}_6$ -Tag. Somit ist der DsF-Tag etablierten Affinitätsreinigungssystemen bezüglich Reinheit und insbesondere Ausbeute überlegen.

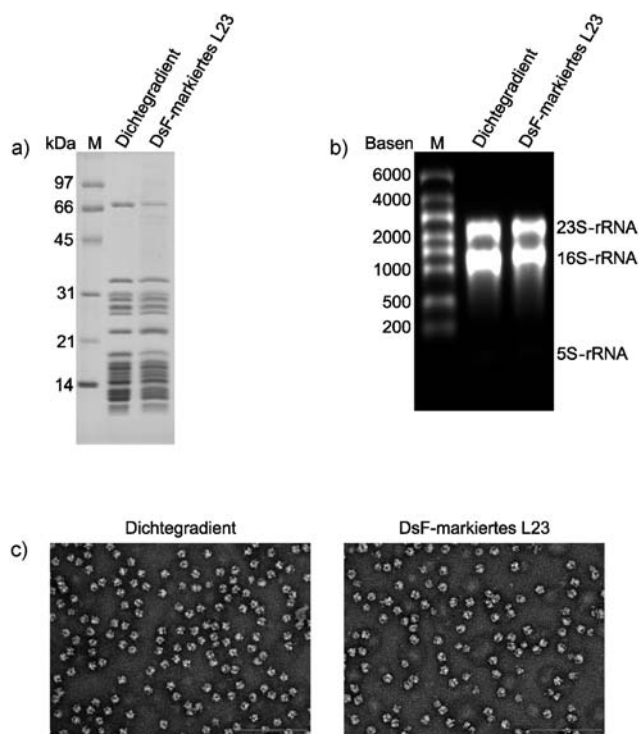
Um zu zeigen, dass das FimGt/DsF-System auch für eine Fusion des DsF-Tags an den C-Terminus eines Zielproteins



**Abbildung 5.** Vergleich verschiedener Affinitätsmarker bezüglich der Einschrittreinigung von *E.-coli*-Tryptophansynthase. a) Die Ausbeuten gereinigter Tryptophansynthase wurden durch Teilung der Gesamtkonzentration der gereinigten Probe durch diejenige im Zellextrakt berechnet. b) Die spezifischen Aktivitäten gereinigter Tryptophansynthase wurden über das Verhältnis zwischen der enzymatischen Aktivität und der Proteinkonzentration berechnet. c) Anreicherungsfaktoren wurden durch Teilung der spezifischen Aktivität gereinigter Tryptophansynthase durch die spezifische Aktivität im Zellextrakt berechnet. d) Die Reinigungseffizienzen wurden durch Multiplikation von Ausbeute und Anreicherungsfaktor erhalten und normiert. Alle Daten sind als Mittelwerte mit Standardfehlern gezeigt ( $n=3$ ).

und auch für die Reinigung sehr komplizierter, makromolekularer Komplexe sowie für die Identifizierung ihrer molekularen Bestandteile geeignet ist, wurde der DsF-Tag mit dem C-Terminus des Proteins L23 der großen ribosomalen Untereinheit von *E. coli*, analog zum Vorgehen bei den TrpA-Fusionen, fusioniert (Abbildung 3c). DsF-markiertes L23 wurde nachfolgend wiederum mithilfe des *tetA*-Promotors in Zellen des *E.-coli*-Stammes MC4100 $\Delta$ rplW:kan [pL23]<sup>[10]</sup> und unter Bedingungen, bei denen die Produktion von Wildtyp-L23 (kodiert auf pL23) auf ein Minimum reduziert war, bei der endogen vorliegenden L23-Konzentration produziert (Hintergrundinformationen, Abbildung S5b). Ribosomen, die DsF-markiertes L23 enthielten, wurden gereinigt, wie oben für Tryptophansynthase beschrieben, d.h. über Immobilisierung an FimGt-Sepharose und Abspaltung durch TEV-Protease. Die Ribosomen waren gemäß SDS-PAGE, denaturierender Agarosegelelektrophorese und Elektronenmikroskopie von 70S-Ribosomen, die über Standard-Dichtegradientenzentrifugation erhalten wurden, bezüglich ihrer Protein- und rRNA-Zusammensetzung und ihrer Morphologie nicht zu unterscheiden (Abbildung 6a–c). Mit DsF-markiertem L23 der großen ribosomalen Untereinheit konnten somit in einem einzigen Schritt reine 70S-Ribosomen aus dem unbehandelten Zellextrakt isoliert werden.

Das hier beschriebene, neue System zur Einschritt-Affinitätsreinigung von Proteinkomplexen erwies sich anderen gebräuchlichen Systemen gegenüber als überlegen, vor allem im Hinblick auf die Isolierung von nur gering konzentriert vorliegenden Zielkomplexen wie der Tryptophansynthase. Zudem sollte das System über einen großen Bereich ver-



**Abbildung 6.** Reinigung von *E.-coli*-Ribosomen. a) Mit Coomassie gefärbtes, 15-proz. Polyacrylamid-SDS-Gel, das die Einschrittreinigung von *E.-coli*-Ribosomen aus dem Zellextrakt mit DsF-markiertem L23 zeigt. Ribosomen, die über Standard-Dichtegradientenzentrifugation oder über DsF-markiertes L23 gereinigt wurden, zeigen identische Bandenmuster. Spur M: Molekülmassenstandard. b) Denaturierendes 1%-Agarose/Formaldehyd-Gel, das rRNAs von Ribosomen zeigt, die per Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation oder mithilfe von L23-DsF gereinigt wurden. Beide Proben zeigen identische Bandenmuster mit 23S-, 16S- und 5S-rRNA (M: Einzelstrang-RNA-Massenstandard). c) Elektronenmikroskopiebilder negativ gefärbter, über Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation oder mithilfe von L23-DsF gereinigter Ribosomen.

schiedener pH-Werte, Temperaturen und NaCl-Konzentrationen einsetzbar sein und funktioniert auch für sehr komplizierte supramolekulare Komplexe wie Ribosomen. Auch kann reines FimGt einfach und in hoher Ausbeute rekombinant aus *E. coli* gewonnen werden, was eine effiziente und unkomplizierte Herstellung von FimGt-Sepharose ermöglicht. Damit ist das FimGt/DsF-System allgemein für die Isolierung von reinen, hoch aktiven Multiproteinkomplexen und deren Strukturbestimmung mithilfe von Kristallstrukturanalyse geeignet. Wegen der unter nativen Bedingungen praktisch unendlich hohen kinetischen Stabilität des FimGt/DsF-Komplexes gegen Dissoziation wird das DsF-markierte Zielmolekül nach seiner Immobilisierung an FimGt-Sepharose auch nahezu jeden Waschschrift überstehen. Dadurch wird das System für die permanente und funktionelle Immobilisierung von Zielproteinen unter Flussbedingungen, bei

denen andere Systeme wegen ihrer begrenzten kinetischen Stabilität gegen Dissoziation nicht bestehen, besonders interessant.

Eingegangen am 12. Dezember 2011

Online veröffentlicht am 21. März 2012

**Stichwörter:** Affinitätschromatographie · Enzyme · Kinetik · Protein-Protein-Wechselwirkungen · Ribosomen

- [1] R. B. Kapust, J. Tozser, J. D. Fox, D. E. Anderson, S. Cherry, T. D. Copeland, D. S. Waugh, *Protein Eng.* **2001**, *14*, 993–1000.
- [2] a) M. Arifuzzaman, M. Maeda, A. Itoh, K. Nishikata, C. Takita, R. Saito, T. Ara, K. Nakahigashi, H. C. Huang, A. Hirai, K. Tsuzuki, S. Nakamura, M. Altaf-Ul-Amin, T. Oshima, T. Baba, N. Yamamoto, T. Kawamura, T. Ioka-Nakamichi, M. Kitagawa, M. Tomita, S. Kanaya, C. Wada, H. Mori, *Genome Res.* **2006**, *16*, 686–691; b) G. I. Evan, G. K. Lewis, G. Ramsay, J. M. Bishop, *Mol. Cell. Biol.* **1985**, *5*, 3610–3616; c) C. J. Gloeckner, K. Boldt, A. Schumacher, R. Roepman, M. Ueffing, *Proteomics* **2007**, *7*, 4228–4234; d) J. Graumann, L. A. Dunipace, J. H. Seol, W. H. McDonald, J. R. Yates III, B. J. Wold, R. J. Deshaies, *Mol. Cell. Proteomics* **2004**, *3*, 226–237; e) E. Hochuli, W. Bannwarth, H. Döbeli, R. Gentz, D. Stüber, *Biotechnology* **1988**, *6*, 1321–1325; f) T. P. Hopp, K. S. Prickett, V. L. Price, R. T. Libby, C. J. March, D. P. Cerretti, D. L. Urdal, P. L. Conlon, *Biotechnology* **1988**, *6*, 1204–1210.
- [3] a) A. G. Atanasov, L. G. Nashev, L. Gelman, B. Legeza, R. Sack, R. Portmann, A. Odermatt, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2008**, *1783*, 1536–1543; b) I. T. Dorn, K. Pawlitschko, S. C. Pettinger, R. Tampe, *Biol. Chem.* **1998**, *379*, 1151–1159; c) A. Einhauser, A. Jungbauer, *J. Chromatogr. A* **2001**, *921*, 25–30; d) L. Nieba, S. E. Nieba-Axmann, A. Persson, M. Hamalainen, F. Edebratt, A. Hansson, J. Lidholm, K. Magnusson, A. F. Karlsson, A. Pluckthun, *Anal. Biochem.* **1997**, *252*, 217–228.
- [4] a) E. Hahn, P. Wild, U. Hermanns, P. Sebbel, R. Glockshuber, M. Haner, N. Taschner, P. Burkhard, U. Aebi, S. A. Muller, *J. Mol. Biol.* **2002**, *323*, 845–857; b) P. Klemm, G. Christiansen, *Mol. Gen. Genet.* **1990**, *220*, 334–338.
- [5] a) D. Choudhury, A. Thompson, V. Stojanoff, S. Langermann, J. Pinkner, S. J. Hultgren, S. D. Knight, *Science* **1999**, *285*, 1061–1066; b) A. D. Gossert, P. Bettendorff, C. Puorger, M. Vetsch, T. Herrmann, R. Glockshuber, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **2008**, *375*, 752–763; c) I. Le Trong, P. Aprikian, B. A. Kidd, M. Forero-Shelton, V. Tchesnokova, P. Rajagopal, V. Rodriguez, G. Interlandi, R. Klevit, V. Vogel, R. E. Stenkamp, E. V. Sokurenko, W. E. Thomas, *Cell* **2010**, *141*, 645–655; d) C. Puorger, O. Eidam, G. Capitani, D. Erilov, M. G. Grutter, R. Glockshuber, *Structure* **2008**, *16*, 631–642; e) C. Puorger, M. Vetsch, G. Wider, R. Glockshuber, *J. Mol. Biol.* **2011**, *412*, 520–535.
- [6] G. L. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, *82*, 70–77.
- [7] M. Vetsch, C. Puorger, T. Spirig, U. Grauschopf, E. U. Weber-Ban, R. Glockshuber, *Nature* **2004**, *431*, 329–333.
- [8] A. Bachmann, T. Kiefhaber, *J. Mol. Biol.* **2001**, *306*, 375–386.
- [9] Y. Ishihama, T. Schmidt, J. Rappsilber, M. Mann, F. U. Hartl, M. J. Kerner, D. Frishman, *BMC Genomics* **2008**, *9*, 102.
- [10] G. Kramer, T. Rauch, W. Rist, S. Vorderwulbecke, H. Patzelt, A. Schulze-Specking, N. Ban, E. Deuerling, B. Bukau, *Nature* **2002**, *419*, 171–174.