

Proteinreinigung

2

Die Untersuchung von Struktur und Funktion von Proteinen beschäftigt die Wissenschaft schon seit über zweihundert Jahren. 1777 fasste der französische Chemiker Pierre J. Macquer unter dem Begriff *Albumine* alle Substanzen zusammen, die das eigenartige Phänomen zeigten, beim Erwärmen vom flüssigen in festen Zustand überzugehen. Zu diesen Substanzen gehörten das Hühnereiweiß, das Casein und der Blutbestandteil Globulin. Schon 1787, etwa zur Zeit der französischen Revolution, wurde über die Reinigung von gerinnbaren, eiweißartigen Substanzen aus Pflanzen berichtet. Im frühen neunzehnten Jahrhundert wurden viele Proteine wie Albumin, Fibrin oder Casein gereinigt und analysiert, und es zeigte sich bald, dass diese Verbindungen erheblich komplizierter aufgebaut waren als die damals bekannten anderen organischen Moleküle. Das Wort *Protein* wurde wahrscheinlich von dem schwedischen Chemiker Jöns J. von Berzelius um 1838 geprägt und dann von dem Holländer Gerardus J. Mulder zusammen mit einer chemischen Formel publiziert, die Mulder damals als allgemeingültig für eiweißartige Stoffe ansah. Homogenität und Reinheit dieser damals gereinigten Proteine entsprachen natürlich nicht den heutigen Ansprüchen, sie zeigten jedoch, dass sich einzelne Proteine durchaus voneinander unterscheiden lassen. Die Reinigung konnte damals nur gelingen, weil man einfache Schritte nutzen konnte: die Extraktion zur Anreicherung, die Ansäuerung zur Ausfällung und die Kristallisation beim einfachen Stehenlassen einer Lösung. Schon 1889 erhielt Hofmeister das Hühneralbumin in kristalliner Form. Obwohl Sumner 1926 enzymatisch aktive Urease kristallisieren konnte, blieben doch bis zur Mitte des zwanzigsten Jahrhunderts die Struktur und der Aufbau von Proteinen im Dunkel. Erst die Entwicklung von leistungsfähigen Reinigungsmethoden, mit denen sich einzelne Proteine aus komplexen Gemischen isolieren lassen, begleitet von einer Revolution der Techniken zur Analyse der aufgetrennten Proteine, ermöglichte unser heutiges Verständnis der Proteinstrukturen.

In diesem Kapitel werden diese Reinigungsmethoden beschrieben; dabei soll erkennbar sein, wie sie systematisch und strategisch eingesetzt werden. Es ist äußerst schwierig, das Thema unter generellen Aspekten zu betrachten, da sich die physikalischen und chemischen Eigenschaften verschiedener Proteine immens unterscheiden können. Diese Vielfalt ist aber biologisch notwendig, da Proteine – die eigentlichen Werkzeuge und Baustoffe einer Zelle – die unterschiedlichsten Funktionen ausüben müssen.

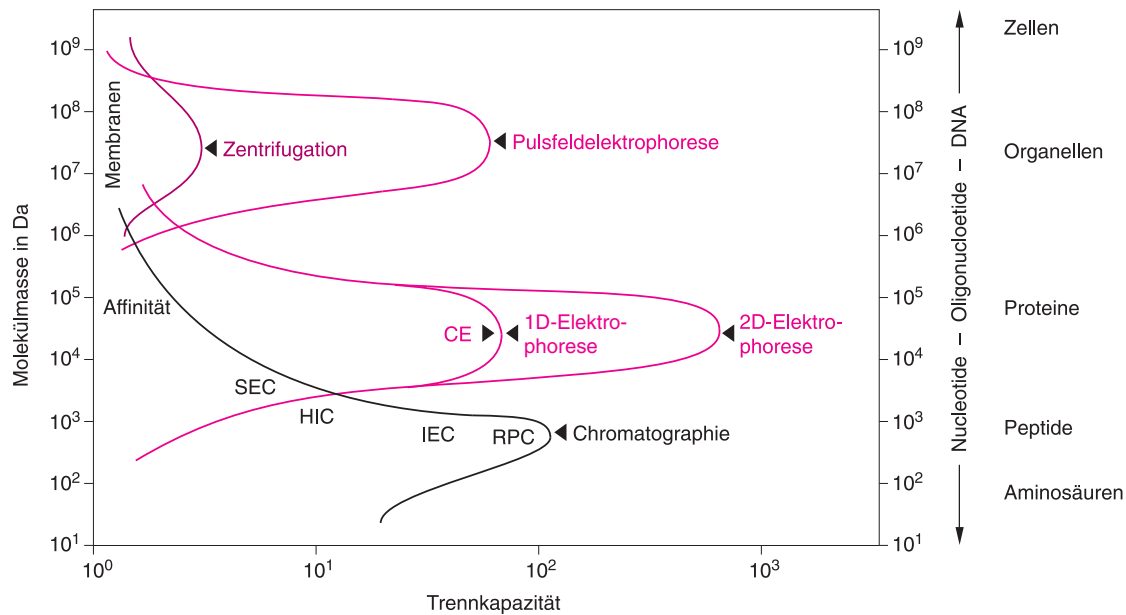
2.1 Eigenschaften von Proteinen

Größe von Proteinen Die Größe von Proteinen kann sehr unterschiedlich sein, von kleinen Polypeptiden, wie dem Insulin, das aus 51 Aminosäuren besteht, bis zu sehr großen multifunktionellen Proteinen, zum Beispiel dem Apolipoprotein B, einem cholesterintransportierenden Protein, das aus einer Kette von über 4 600 Aminosäuren besteht, mit einer molekularen Masse von mehr als 500 000 Dalton (500 kDa). Viele Proteine bestehen aus Oligomeren von gleichen oder verschiedenen Proteinketten und haben Molekülmassen bis zu einigen Millionen Dalton. Ganz allgemein ist zu erwarten, dass – je größer ein Protein ist – umso schwieriger seine Isolierung und Reinigung sein wird. Dies hat seinen Grund in den analytischen Verfahren, die bei großen Molekülen sehr geringe Effizienzen zeigen. In Abbildung 2.1 ist die **Trennkapazität** einzelner Trennverfahren (die maximale Anzahl von Analyten, die unter optimalen Bedingungen voneinander getrennt werden können) gegen die Molekülmasse aufgetragen. Man sieht, dass für kleine Moleküle wie Aminosäuren oder Peptide einige chro-

Molare Masse = Molmasse (M) Fälschlich oft als Molekulargewicht bezeichnet; ist keine Masse, sondern der Quotient aus Masse einer Substanz, dividiert durch die Stoffmenge der Substanz. Einheit: g/mol.

Absolute Molekülmasse (m_M) ist die molare Masse (M) eines Moleküls dividiert durch die Anzahl der Teilchen in einem Mol (Avogadro-Konstante N_A): $m_M = M/N_A$. Einheit: g.

Relative Molekülmasse (M_r) ist die auf 1/12 der Masse des ^{12}C normierte Molekülmasse (dimensionslos).



2.1 Trennmethode für Biomoleküle. Die Trennkapazität einzelner Trennmethode (die maximale Anzahl der in einer Analyse voneinander getrennten Substanzen) ist für unterschiedliche Molekülmassen der Substanzen deutlich unterschiedlich. SEC Ausschlusschromatographie; HIC Hydrophobe Interaktionschromatographie; IEC Ionenaustauschchromatographie; RPC *reversed-phase*-Chromatographie; CE Kapillarelektrophorese.

Dalton (Da) ist eine nach dem englischen Naturforscher John Dalton (1766–1844) benannte, nicht SI-konforme Masseinheit. Ein Dalton ist gleich der atomaren Masseinheit ($u = 1/12$ der Masse von ^{12}C) und entspricht in etwa der Masse eines Wasserstoffatoms ($1,66 \cdot 10^{-24}$ g). Gebräuchlich in der Biochemie ist vor allem kDa (Kilodalton = 1000 Da).

Proteomanalyse
Kapitel 41

Affinitätschromatographie
Abschnitt 11.4.8

matographische Verfahren durchaus in der Lage sind, mehr als 50 Analyten in einer Probe zu trennen. Im Bereich der Proteine erkennt man, dass von den chromatographischen Techniken eigentlich nur die Ionenaustauschchromatographie komplexere Gemische halbwegs effizient aufzutrennen vermag und dass in diesem Molekülmassenbereich die elektrophoretischen Techniken weitaus leistungsfähiger sind. Aus diesem Grund wird auch in der Proteomanalyse (der Analyse aller Proteine einer Zelle), bei der mehrere Tausend Proteine aufgetrennt werden müssen, heute praktisch ausschließlich mit elektrophoretischen Verfahren (ein- und zweidimensionale Gelelektrophorese) gearbeitet. Aus der Abbildung ist auch ersichtlich, dass es keine effizienten Trennverfahren für große Moleküle, zum Beispiel für Proteinkomplexe mit Molekülmassen von mehr als 150 kDa, oder für Organellen gibt.

Die Trenneffizienz einer Methode ist jedoch nicht immer der relevante Parameter, der bei der Reinigung eine Rolle spielt. Stehen selektive Reinigungsschritte zur Verfügung, tritt die Bedeutung der Trennkapazität ganz in den Hintergrund und die **Selektivität** wird zur entscheidenden Größe. So hat eine Affinitätsreinigung, die auf der spezifischen Wechselwirkung einer bestimmten Substanz zu einer Affinitätsmatrix beruht, zum Beispiel eine Immunpräzipitation oder eine Antikörperaffinitätschromatographie, eine ganz schlechte Trennkapazität von „1“, aber eine extrem hohe Selektivität, mit der man aus einer sehr komplexen Mischung ein Protein in einem einzigen Schritt isolieren kann.

Da bei den wichtigsten Reinigungstechniken, der Elektrophorese und der Chromatographie, die Analyten in gelöster Form vorliegen müssen, ist die **Löslichkeit**, die das Protein in wässrigen Puffermedien besitzt, ein weiterer wichtiger Parameter bei der Planung einer Proteinreinigung. Viele intrazelluläre, im Cytosol lokalisierte Proteine (z. B. Enzyme) sind gut löslich, während Proteine, die strukturbildende Funktionen haben, wie zum Beispiel die Proteine des Cytoskeletts oder Membranproteine, meist deutlich schlechter löslich sind. Besonders schlecht in wässrigen Medien handhabbar sind die sehr hydrophoben, integralen Membranproteine, deren natürliche Umgebung Lipidmembranen sind und die ohne Lösungsvermittler wie Detergenzien aggregieren und ausgefällt werden.

Verfügbare Menge Die im Ausgangsmaterial verfügbare Menge spielt eine entscheidende Rolle für den Aufwand, der für eine Proteinreinigung betrieben werden muss. Ein zur Reinigung bestimmtes Protein ist vielleicht nur in wenigen Kopien pro Zelle vorhanden (z. B. Transkriptionsfaktoren) oder in wenigen Tausend Kopien (z. B. viele Rezeptoren). Häufige Prote-

ine (z. B. Enzyme) können Prozentanteile des Gesamtproteins einer Zelle ausmachen. Über-exprimierte Proteine liegen oft in deutlich höherer Menge vor (> 50 %), ebenso einige Proteine in Körperflüssigkeiten (z. B. Albumin in Plasma > 60 %). Da normalerweise die Reinigung mit steigender Menge eines Proteins um ein Vielfaches einfacher wird, sollten gerade bei der Isolierung von seltenen Proteinen verschiedene Quellen von Ausgangsmaterial auf den Gehalt des interessierenden Proteins untersucht werden.

Säure/Base-Eigenschaften Proteine haben aufgrund ihrer Aminosäurezusammensetzung bestimmte saure oder basische Eigenschaften, was bei der Trennung über Ionenaustausch-chromatographie und Elektrophoresen ausgenutzt wird. Die Nettoladung eines Proteins hängt vom pH-Wert der umgebenden Lösung ab und ist bei niedrigerem pH-Wert positiv, bei hohem pH-Wert negativ und null am isoelektrischen Punkt; bei diesem pH-Wert kompensieren sich die positiven und negativen Ladungen.

Biologische Aktivität Erschwert wird die Reinigung eines Proteins oft dadurch, dass ein bestimmtes Protein nur aufgrund seiner biologischen Aktivität in der Vielfalt der anderen Proteine zu erkennen und zu lokalisieren ist. Daher muss man in jeder Phase einer Proteinisolierung auf den Erhalt dieser biologischen Aktivität Rücksicht nehmen. Sie beruht normalerweise auf einer bestimmten molekularen und räumlichen Struktur. Wird sie zerstört, spricht man von **Denaturierung**, diese ist oft irreversibel. Um Denaturierung zu vermeiden, muss man in der Praxis den Einsatz einiger Reinigungsverfahren von vornherein ausschließen.

Die biologische Aktivität ist oft unter verschiedenen Umgebungsbedingungen unterschiedlich stabil. Zu hohe oder zu niedrige Pufferkonzentrationen, Temperaturextreme, Kontakte zu unphysiologischen Oberflächen wie Glas oder fehlende Cofaktoren können biologische Charakteristika von Proteinen verändern. Manche dieser Veränderungen sind reversibel: Vor allem kleine Proteine sind auch nach Denaturierung und Verlust der Aktivität häufig in der Lage, unter bestimmten Bedingungen zu **renaturieren**, das heißt ihre biologisch aktive Form wiederzugewinnen. Bei größeren Proteinen gelingt dies selten und oft nur mit schlechter Ausbeute.

Die Messung der biologischen, etwa der enzymatischen Aktivität gibt die Möglichkeit, die Reinigung eines Proteins zu verfolgen: Mit zunehmenden Reinigungsschritten wird eine höhere spezifische Aktivität gemessen. Daneben kann die biologische Aktivität selbst für die Reinigung des Proteins ausgenutzt werden. Oft geht sie einher mit Bindungseigenschaften zu anderen Molekülen, zum Beispiel Enzym-Substrat oder -Cofaktor, Rezeptor-Ligand, Antikörper-Antigen, etc. Diese sehr spezifischen Bindungen werden zum Design von Affinitätsreinigungen verwendet (Affinitätschromatographie) und zeichnen sich unter optimalen Bedingungen durch hohe Anreicherungsfaktoren und damit durch eine anders kaum erreichbar große Effizienz aus.

Enzymatische Aktivitätstests
Kapitel 4

Affinitätschromatographie
Abschnitt 11.4.8

Stabilität Extrahiert man Proteine aus ihrem biologischen Milieu, werden sie oft in ihrer Stabilität merklich beeinträchtigt, da sie von **Proteasen** (proteolytischen Enzymen) abgebaut werden oder zu unlöslichen Aggregaten assoziieren, was fast immer zu einem irreversiblen Verlust der biologischen Aktivität führt. Aus diesen Gründen werden in den ersten Schritten einer Proteinisolierung oft Protease-Inhibitoren zugesetzt und die Reinigung wird generell rasch und bei niedrigen Temperaturen durchgeführt.

Bedenkt man diese Vielfalt der Eigenschaften, wird schnell klar, dass eine Proteinreinigung nicht einer schematischen Vorschrift folgen kann. Für eine erfolgreiche Isolierungsstrategie ist – neben einem Verständnis des Verhaltens von Proteinen in den verschiedenen Trennverfahren und einem minimalen Wissen um die Löslichkeits- und Ladungseigenschaften des zu reinigenden Proteins – auch eine klare Vorstellung notwendig, zu welchem Zweck das Protein gereinigt werden soll.

Zielsetzung einer Aufreinigung Vor allem die ersten Schritte eines Reinigungsganges, die anzustrebende Reinheit und auch die einzusetzende Analytik sind in hohem Maße davon abhängig, mit welcher Intention ein bestimmtes Protein gereinigt werden soll. So müssen bei der Isolierung eines Proteins für therapeutische Zwecke (z. B. Insulin, Wachstumshormone oder Blutgerinnungshemmer) ungleich höhere Anforderungen an die Reinheit gestellt werden als für ein Protein, das im Labor für strukturelle Untersuchungen gebraucht wird. In vielen Fällen will man ein Protein nur für die eindeutige Identifizierung oder für die Aufklärung einiger

Proteomanalyse
Kapitel 41

weniger Aminosäuresequenzabschnitte isolieren. Dazu reicht eine sehr kleine Menge Protein (üblicherweise im Mikrogrammbereich). Mit der Sequenzinformation kann man das Protein in Proteindatenbanken identifizieren oder es lassen sich Oligonucleotidsonden herstellen und das Gen des Proteins isolieren. Das kann dann in einem Gastorganismus in viel größerer Menge (bis zu Grammengen) exprimiert werden, als es in der ursprünglichen Quelle vorhanden war (heterologe Expression). Viele der weiteren Untersuchungen werden dann nicht mit dem Material aus der natürlichen Quelle durchgeführt, sondern mit dem rekombinanten Protein.

Strategisch neue Ansätze zur Analyse biologischer Fragestellungen, wie die Proteomanalyse und subtraktive Ansätze, erfordern vollständig neue Arten der Probenvorbereitung und Proteinisolierung, da hier die quantitativen Verhältnisse der einzelnen Proteine nicht verändert werden dürfen. Ein großer Vorteil bei diesen neuen Strategien ist aber, dass auf den Erhalt der biologischen Aktivität nicht mehr geachtet werden muss.

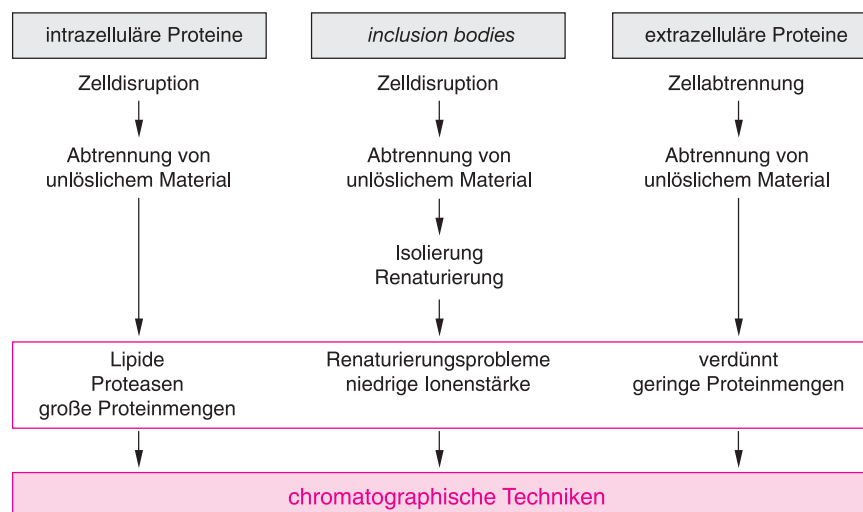
Auch wenn jede Proteinreinigung als ein Einzelfall zu betrachten ist, so kann man doch vor allem für die ersten Reinigungsschritte einige allgemeine Regeln und Verfahren finden, die bei erfolgreichen Isolierungen schon häufig angewendet worden sind und im Folgenden im Detail besprochen werden sollen.

2.2 Proteinlokalisierung und Reinigungsstrategie

Der erste Schritt jeder Proteinreinigung hat zum Ziel, das gewünschte Protein in Lösung zu bringen und alles partikuläre und unlösliche Material abzutrennen. Abbildung 2.2 zeigt ein Schema für verschiedene Proteine. Für die Reinigung eines löslichen **extrazellulären Proteins** müssen Zellen und andere unlösliche Bestandteile abgetrennt werden, um eine homogene Lösung zu erhalten, die dann den in den weiteren Abschnitten besprochenen Reinigungs- oder Analyseverfahren unterworfen werden kann (Fällung, Zentrifugation, Chromatographie, Elektrophorese, etc.). Quellen für extrazelluläre Proteine sind beispielsweise Kulturüberstände von Mikroorganismen, pflanzliche und tierische Zellkulturmedien oder auch Körperflüssigkeiten wie Milch, Blut, Harn oder Cerebrospinalflüssigkeit. Meist liegen extrazelluläre Proteine gelöst in relativ geringen Konzentrationen vor und fordern als nächsten Schritt eine effiziente Konzentrierung.

Um ein **intrazelluläres Protein** zu isolieren, müssen die Zellen in einer Weise zerstört werden, die den löslichen Inhalt der Zelle freigibt und die das interessierende Protein intakt lässt. Die Methoden des Zellaufschlusses (Zelldisruption) unterscheiden sich vor allem je nach Zellart und Menge der aufzuschließenden Zellen.

Membranproteine und andere unlösliche Proteine Membranassoziierte Proteine werden üblicherweise nach Isolierung der relevanten Membranfraktion aus dieser gereinigt. Dazu



2.2 Reinigungsschema für verschiedene Proteine. Je nach Lokalisation und Löslichkeit der zu reinigenden Proteine sind verschiedene Vorreinigungsschritte durchzuführen, bevor selektive und hoch effiziente Schritte folgen können.

werden periphere Membranproteine, die nur lose an Membranen gebunden sind, durch relativ milde Bedingungen, zum Beispiel hohen pH-Wert, EDTA-Zugabe oder niedere Konzentrationen eines nichtionischen Detergens, von der Membran abgetrennt und können dann oft weiter wie lösliche Proteine behandelt werden. Integrale Membranproteine, die außerhalb ihrer Membran über hydrophobe Aminosäuresequenzbereiche aggregieren und unlöslich werden, können nur mithilfe hoher Detergenkonzentrationen aus der Membran isoliert werden, sie stellen heute wohl die größte Herausforderung an die Isolierungs- und Reinigungstechniken dar.

In normalen wässrigen Puffern unlösliche Proteine sind im Allgemeinen Strukturproteine (z. B. Elastin), die manchmal auch noch über posttranslationale angefügte funktionelle Gruppen (posttranslationale Modifikationen) quervernetzt sind. Hier ist der erste und sehr effiziente Reinigungsschritt die Entfernung aller löslichen Proteine. Weitere Schritte sind meist nur mehr unter Bedingungen möglich, die die native Struktur des Proteins zerstören. Die weitere Bearbeitung erfolgt oft nach Auflösung der Quervernetzung an den denaturierten Proteinen und unter Verwendung von chaotropen Reagenzien (z. B. Harnstoff) oder Detergenzien.

Rekombinante Proteine Eine besondere Situation liegt bei der Herstellung von rekombinanten Proteinen vor. Eine sehr einfache Reinigung ergibt sich nach der Expression von rekombinanten Proteinen in *inclusion bodies*. Dies sind dichte Aggregate des rekombinanten Produktes, die in einem nicht nativen Zustand vorliegen und unlöslich sind, sei es, weil die Proteinkonzentration zu hoch ist, weil das exprimierte Protein in der bakteriellen Umgebung nicht korrekt gefaltet werden kann oder weil die Ausbildung der (richtigen) Disulfidbrücken in dem reduzierenden Milieu im Inneren des Bakteriums nicht möglich ist. Nach einer einfachen Reinigung durch differenzielle Zentrifugation (Abschnitt 2.5.1), bei der die anderen unlöslichen Zellbestandteile abgetrennt werden, erhält man das rekombinante Protein praktisch rein, muss es aber durch Renaturierung noch in den biologisch aktiven Zustand überführen.

Wenn die Expression von rekombinanten Proteinen nicht zu *inclusion bodies* führt, liegt das Protein je nach verwendetem Vektor in löslichem Zustand innerhalb oder außerhalb der Zelle vor. Hier lehnt sich die Reinigung sehr an die Reinigung von natürlichen Proteinen an, nur mit dem Vorteil, dass das zu isolierende Protein schon in relativ großer Menge vorliegt.

Rekombinante Proteine können durch Verwendung spezifischer Markerstrukturen (*tags*) sehr einfach gereinigt werden. Typische Beispiele sind die Fusionsproteine, bei denen auf DNA-Ebene die codierenden Bereiche für eine *tag*-Struktur und für das gewünschte Protein ligiert und als ein Protein exprimiert werden. Über spezifische Affinitätschromatographien mit Antikörpern gegen die *tag*-Struktur können solche Fusionsproteine mit einem einzigen Schritt gereinigt werden. Beispiele dafür sind GST-Fusionsproteine mit Antikörpern gegen GST oder biotinylierte Proteine über Avidinsäulen. Eine weitere häufig verwendete *tag*-Struktur sind Polyhistidinreste, die an das *N*- oder *C*-terminale Ende der Proteinkette geknüpft werden und die über immobilisierte Metallaffinitätschromatographie einfach zu isolieren sind.

Metallaffinitätschromatographie
Abschnitt 11.4.8

2.3 Homogenisierung und Zellaufschluss

Um biologische Bestandteile aus intakten Geweben reinigen zu können, müssen diese komplexen Zellverbände in einem ersten Schritt durch **Homogenisieren** zerstört werden. Dabei entsteht ein Gemisch aus intakten und aufgebrochenen Zellen, Zellorganellen, Membranfragmenten und auch kleinen chemischen Verbindungen, die aus dem Cytoplasma und aus beschädigten subzellulären Kompartimenten stammen. Da die zellulären Komponenten in eine unphysiologische Umgebung überführt werden, sollte das Homogenisierungsmedium verschiedene Grundvoraussetzungen erfüllen:

- Schutz der Zellen vor osmotischem Platzen,
- Schutz vor Proteasen,
- Schutz der biologischen Aktivität (Funktion),
- Verhinderung von Aggregation,
- möglichst wenig Zerstörung von Organellen,
- keine Interferenz mit biologischen Analysen und funktionellen Tests.

Tabelle 2.1 Protease-Inhibitoren

Substanz	Konzentration	Inhibitor von
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	0,1–1 mM	} Serinproteasen
Aprotinin	0,01–0,3 μ M	
ϵ -Amino- <i>n</i> -capronsäure	2–5 mM	
Antipain	70 μ M	} Cysteinproteasen
Leupeptin	1 μ M	
Pepstatin A	1 μ M	Aspartatproteasen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	0,5–1,5 mM	Metalloproteasen

Normalerweise geschieht dies durch isotonische Puffer bei neutralem pH-Wert, denen oft ein Cocktail von Protease-Inhibitoren zugesetzt wird (Tab. 2.1).

Will man intrazelluläre Organellen wie Mitochondrien, Kerne, Mikrosomen etc. oder intrazelluläre Proteine isolieren, müssen die (noch) intakten Zellen aufgebrochen werden. Dies wird durch eine mechanische Zerstörung der Zellwand erreicht, bei der Reibungswärme entstehen kann und die daher möglichst unter Kühlung durchgeführt werden soll. Die technische Realisierung des Aufschlusses variiert je nach Ausgangsmaterial und Lokalisation der gewünschten Zielstruktur (Tab. 2.2).

Bei sehr empfindlichen Zellen (z. B. Leukocyten, Ciliaten) genügt oft ein wiederholtes Pipettieren der Zellsuspension oder Pressen durch ein Sieb, um einen **Aufschluss durch schwa-**

Tabelle 2.2 Biologische Ausgangsmaterialien und Aufschlussmethoden

Material	Aufschlussmethode	Bemerkungen
Bakterien		
grampositiv	enzymatisch mit Lysozym EDTA/Tris French-Press	Peptidoglykanzellwand macht Zellwand permeabel
gramnegativ	Zellmühle mit Glaskugeln Einfrieren-Auftauen Ultraschall	mechanische Zerstörung der Zellwand für große Mengen wegen lokaler Überhitzung ungeeignet
Hefen	Autolyse French-Press mechanisch mit Glaskugeln enzymatisch mit Zymolase	24–28 h mit Toluol mehrfach, da ineffizient gute Effizienz Protease-Inhibitoren zufügen
Pflanzen		
	Messerhomogenisator + Dithiothreitol + Phenoloxidase-Inaktivatoren + Protease-Inhibitoren	hoher Proteasengehalt in Pflanzen Polyvinylpyrrolidon
faserige Gewebe	Zermahlen in flüssigem Stickstoff	kalter Homogenisierungspuffer
nicht faserige Gewebe	Zermahlen, eventuell nach Trocknen	
höhere Eukaryoten		
Zellen, die in Suspensionskultur wachsen	Osmolyse mit hypotonischem Puffer Pressen durch Sieb wiederholtes Pipettieren der Suspension	sehr empfindliche Zellen Protease-Inhibitoren zufügen
faserige Zellen	Zerkleinern Dounce-Homogenisator	
Muskelgewebe	Kleinschneiden, Fleischwolf	schwierig aufzuschließen

(Nach: Methods in Enzymology, Vol. 182 Guide to Protein Purification, Academic Press 1990.)

che Scherkräfte zu erreichen. Für die etwas stabileren tierischen Zellen werden die Scherkräfte mit einem Glaspistill in einem Glasröhrchen erzeugt (**Dounce-Homogenisator**). Für pflanzliche und Bakterienzellen sind diese Methoden nicht geeignet.

- Zellen, die keine Zellwand besitzen und die nicht in Zellverbänden assoziiert sind (z. B. isolierte Blutzellen), können **osmolytisch** aufgebrochen werden, indem sie in eine hypotonische Umgebung gebracht werden (z. B. in destilliertes Wasser). Das Wasser dringt in die Zellen ein und bringt sie zum Platzen. Bei Zellen mit Zellwänden (Bakterien, Hefen) müssen die Zellwände **enzymatisch** (z. B. mit Lysozym) abgedaut werden, bevor ein osmolytischer Aufschluss gelingt. Diese Aufschlussart ist sehr schonend und eignet sich daher besonders für die Isolierung von Zellkernen und anderen Organellen.
- Für Bakterien wird oft wiederholtes **Einfrieren und Auftauen** als Aufschlussmethode eingesetzt, wobei der Wechsel der Aggregatzustände die Zellmembranen so deformiert, dass sie aufbrechen und der intrazelluläre Inhalt frei wird.
- Mikroorganismen und Hefen können in dünner Schicht zwei bis drei Tage bei 20–30 °C **getrocknet** werden, wobei die Zellmembran zerstört wird. Die getrockneten Zellen werden in einem Mörser zerrieben und können bei 4 °C auch über längere Zeit gelagert werden. Lösliche Proteine lassen sich mit einem wässrigen Puffer aus dem trockenen Pulver in wenigen Stunden wieder in Lösung bringen.
- Mit kalten, wassermischbaren **organischen Lösungsmitteln** (Aceton, –15 °C, 10-faches Volumen) können Zellen schnell entwässert werden, wobei die Lipide in die organische Phase extrahiert und so die Zellwände zerstört werden. Nach Abzentrifugieren bleiben die Proteine im Niederschlag, aus dem man sie durch Extraktion mit wässrigen Lösungsmitteln wiedergewinnen kann.
- Bei stabilen Zellen wie Pflanzenzellen, Bakterien und auch Hefen kann das **Zerreiben** mit Mörser und Pistill zum Zellaufschluss angewendet werden, wobei allerdings auch größere Organellen (Chloroplasten) geschädigt werden können. Durch Zugabe eines Abrasionsmittels (Seesand, Glasperlen) wird der Aufschluss erleichtert.
- Für größere Mengen eignet sich ein **Messerhomogenisator**, bei dem das Zellgewebe durch ein schnell rotierendes Messer zerschnitten wird. Dabei entsteht erhebliche Wärme, sodass eine Möglichkeit zur Kühlung vorhanden sein sollte. Für kleine Objekte wie Bakterien und Hefen wird die Effizienz des Aufschlusses durch Zugabe von feinen Glasperlen deutlich verbessert.
- **Vibrationszelmühlen** werden für einen relativ rauen Aufschluss von Bakterien verwendet. Dies sind verschließbare Stahlgefäße, in denen die Zellen zusammen mit Glasperlen (Durchmesser 0,1–0,5 mm) heftig geschüttelt werden. Auch hier muss die entstehende Wärme abgeführt werden. Zellorganellen können bei dieser Aufschlussmethode geschädigt werden.
- Schnelle **Druckänderungen** brechen Zellen und Organellen sehr effizient auf. So werden mit **Ultraschallwellen** im Frequenzbereich von 10–40 kHz über einen Metallstab starke Druckänderungen in der Suspension eines Zellmaterials erzeugt. Da auch bei dieser Methode viel Wärme freigesetzt wird, sollte man nur relativ kleine Volumina und kurze – maximal zehn Sekunden lange – Beschallungspulse einsetzen. DNA wird unter diesen Bedingungen fragmentiert.
- Bei einer weiteren Aufschlussmethode, die sich vor allem für Mikroorganismen eignet, werden bis zu 50 ml einer Zellsuspension unter Druck durch eine enge Öffnung (< 1 mm) gepresst, wobei durch die auftretenden Scherkräfte die Zellen zerstört werden (**French-Press**).

Je nach Zielsetzung werden die gewünschten Proteine in löslicher Form weiteren Reinigungsschritten unterworfen. Dazu wird das Homogenisat normalerweise durch differenzielle Zentrifugationsverfahren (Abschnitt 2.5.1) grob in verschiedene Fraktionen aufgetrennt.

2.4 Die Fällung

Die Fällung (Präzipitation) von Proteinen ist eine der ersten Techniken, die zur Reinigung von Proteinen eingesetzt wurde (das Aussalzen von Proteinen geschah erstmals vor über 130 Jahren!). Die Methode beruht auf der Interaktion von präzipitierenden Agenzien mit den in Lösung befindlichen Proteinen. Diese Agenzien können relativ unspezifisch sein und praktisch alle Proteine aus einer Lösung ausfällen, was in den ersten Schritten eines Reinigungsgangs zur Gewinnung der Gesamtproteine aus einem Zelllysate eingesetzt wird. Die Fällung kann aber auch so geführt werden, dass eine Fraktionierung der Bestandteile einer Lösung möglich wird. Ein Beispiel dafür ist die **Kohn-Fraktionierung** von Plasma, die schon 1946 ausgearbeitet wurde und heute noch zur Plasmaproteingewinnung in großem Maßstab eingesetzt wird. Dabei wird Blutplasma mit steigenden Mengen von kaltem Ethanol versetzt und das jeweils ausgefallte Protein in Fraktionen abzentrifugiert. Mit Ausnahme der Präzipitation von Antigenen mit Antikörpern ist die Fällung nicht proteinspezifisch und wird daher nur für eine grobe Vorreinigung von Proteingemischen eingesetzt.

Je nach Fragestellung und Ausgangsmaterial kann die Fällung unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt werden. Dabei sollte nicht nur die Effizienz der Fällung an sich, sondern auch immer weitere Aspekte beachtet werden:

- Wird die biologische Aktivität durch das Fällungsmittel und die Fällungsbedingungen beeinträchtigt?
- Unter welchen Bedingungen kann das Fällungsmittel wieder entfernt werden?

Aussalzung Die Eigenschaft eines Salzes, Proteine zu fällen, ist in der so genannten **Hofmeister-Serie** beschrieben (Abb. 2.3). Dabei sind die weiter links stehenden (so genannten antichaotropen oder kosmotropen) Salze besonders gute und schonende Fällungsmittel. Sie vergrößern hydrophobe Effekte in der Lösung und fördern Proteinaggregationen über hydrophobe Wechselwirkungen. Die weiter rechts stehenden (chaotropen) Salze vermindern hydrophobe Effekte und halten Proteine in Lösung.

Konzentrationsbestimmung von
Proteinen
Kapitel 3

Die älteste Methode Proteine zu fällen ist, sie durch Zugabe von **Ammoniumsulfat** auszusalzen. Die Proteine sollen vor der Fällung in einer Konzentration von etwa 0,01–2 % vorliegen. Ammoniumsulfat ist besonders gut geeignet, da es in Konzentrationen oberhalb von 0,5 M die biologische Aktivität auch empfindlicher Proteine schützt. Es ist leicht wieder von den Proteinen zu entfernen (Dialyse, Ionenaustausch) und überdies preiswert, deshalb kann es auch für Fällungen aus größeren Volumina und somit schon in den ersten Reinigungsschritten eingesetzt werden. Ammoniumsulfat wird üblicherweise unter kontrollierten Bedingungen (Temperatur, pH-Wert) portionsweise zu der Proteinlösung zugegeben, wodurch eine fraktionierte Fällung und damit eine Anreicherung des interessierenden Proteins möglich werden. Man sollte beachten, dass eine vollständige Fällung einige Stunden dauern kann! Ammoniumsulfatpräzipitate sind normalerweise dicht und gut abzentrifugieren (100 g, s. Abschnitt 2.5). Der einzige größere Nachteil von Ammoniumsulfat betrifft die Fällung von Proteinen, die für ihre Aktivität/Struktur Calcium benötigen, da Calciumsulfat praktisch unlöslich ist und so von den Proteinen entfernt wird. Diese Proteine müssen daher mit anderen Salzen (z. B. Acetaten) gefällt werden.

Fällung mit organischen Lösungsmitteln Schon seit über hundert Jahren ist bekannt, dass Proteine mit kaltem Aceton oder kurzkettigen Alkoholen (hauptsächlich Ethanol) gefällt werden können. Längerkettige Alkohole (größer als C_3) sind in Wasser zu wenig löslich und für eine Fällung nicht brauchbar. Für die Wahl des organischen Fällungsmittels oder der optimalen Temperatur können keine allgemeingültigen Regeln angegeben werden. Ethanol hat sich

Kationen:	NH_4^+	K^+	Na^+	$C(NH_2)_3^+$	(Guanidin)						
Anionen:	PO_4^{3-}	SO_4^{2-}	CH_3COO^-	Cl^-	Br^-	NO_2^-	ClO_3^-	I^-	SCN^-		

besonders bei der Fällung von Plasmaproteinen bewährt. Für Proteinlösungen, die noch Lipide enthalten, wird oft Aceton eingesetzt, da neben der Präzipitation der Proteine gleichzeitig die Lipide extrahiert werden. Um zu hohe lokale Konzentrationen des organischen Lösungsmittels zu vermeiden, was die Denaturierung der Proteine zur Folge haben kann, sollte das Lösungsmittel langsam zugegeben werden. Gute Kühlung und langsame Zugabe sind auch sinnvoll, da sich durch die Zumischung des organischen Lösungsmittels (z. B. Ethanol zu Wasser) Wärme entwickeln kann, die zu unerwünschter Denaturierung führt. Das Präzipitat wird durch Zentrifugation pelletiert (s. unten) und wieder in wässrigen Puffern aufgenommen. Ein häufig angewendetes Protokoll für eine Acetonfällung setzt einen 5-fachen Volumenüberschuss von $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kaltem Aceton zu der Proteinlösung zu und inkubiert über Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dann wird für 30 min bei 20 000 g abzentrifugiert. Diese Fällung liefert auch für sehr kleine Proteinmengen normalerweise ausgezeichnete Resultate. Die Ausbeute der Fällung muss mit analytischen Methoden überprüft werden (SDS-Gelelektrophorese, Aktivitätstests, etc.).

SDS-Gelelektrophorese
Abschnitt 12.3.9

Enzymatische Aktivitätstests
Kapitel 4

Fällung mit Trichloressigsäure Eine häufig eingesetzte Methode, um Proteine aus Lösungen auszufällen, ist die Fällung mit zehnpromzentiger Trichloressigsäure, wobei eine Endkonzentration von 3–4 % erreicht werden sollte. Nach Abzentrifugieren wird das Präzipitat im gewünschten Puffer resuspendiert und weiterverwendet, wobei der pH-Wert der Lösung geprüft werden sollte. Diese Methode denaturiert die Proteine und wird daher vor allem zur Konzentrierung für eine Gelelektrophorese oder vor enzymatischen Spaltungen eingesetzt. Die minimale Probenkonzentration sollte $5\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ betragen.

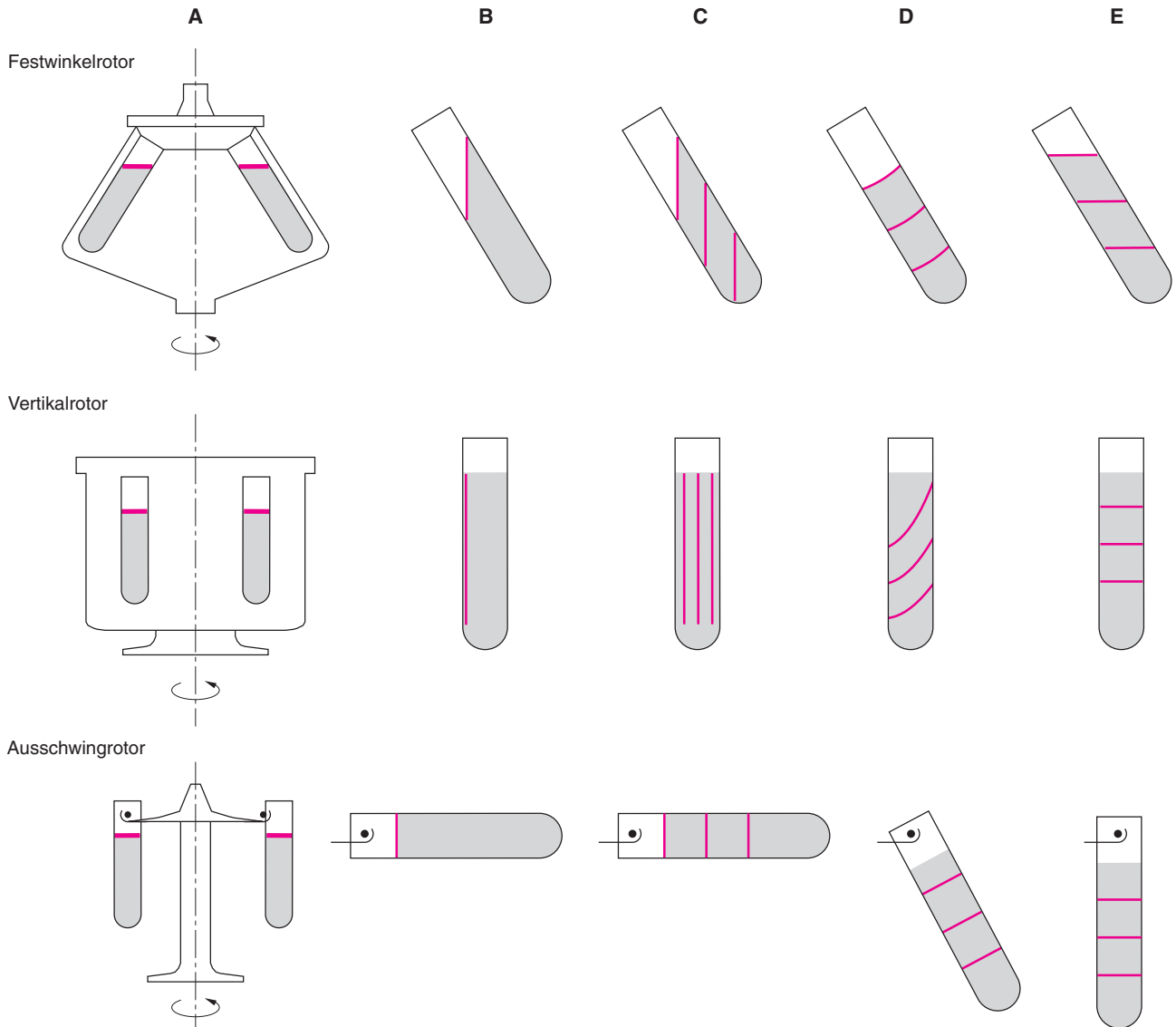
Fällung von Nucleinsäuren Proteinlösungen von Zellaufschlüssen, speziell von Bakterien und Hefen, enthalten einen großen Anteil an Nucleinsäuren (DNA und RNA), die mit einer Proteinreinigung interferieren können und daher gewöhnlich abgetrennt werden müssen. Da Nucleinsäuren hoch negativ geladene Polyanionen sind, können sie mit stark basischen Substanzen (z. B. Polyaminen, Polyethylenimin oder Anionenaustauscherharzen) oder auch sehr basischen Proteinen (Protaminen) gefällt werden. Durch Optimierung der Präzipitations- und Waschbedingungen muss vermieden werden, dass auch interessierende Proteine vom Fällungsreagens oder im Komplex mit den Nucleinsäuren (z. B. Histone, Ribosomen) gefällt werden.

2.5 Zentrifugation

Die Zentrifugation ist nicht nur eine der ältesten Techniken zur Abtrennung von unlöslichen Bestandteilen, sondern auch zur Zellfraktionierung und Isolierung von Zellorganellen. Sie basiert auf der Bewegung von Teilchen in einem flüssigen Medium durch Zentrifugalkräfte. Der zentrale Bestandteil einer Zentrifuge ist der Rotor, der zur Aufnahme der Probenbecher dient und durch einen Motor zu hoher Umdrehungsgeschwindigkeit angetrieben wird. Es gibt verschiedene Bauausführungen der Rotoren, wie zum Beispiel Festwinkelrotoren, Vertikal- oder Schwingbecherrotoren (Abb. 2.4), die in verschiedenen Größen und Materialien erhältlich sind. Sie erlauben Trennungen von wenigen Mikrolitern bis zu einigen Litern und können je nach Aufgabenstellung mit verschiedenen, einstellbaren Umdrehungsgeschwindigkeiten betrieben werden. Für Arbeiten mit biologischen Materialien werden meist kühlbare Zentrifugen verwendet. Hochgeschwindigkeitszentrifugen, die **Ultrazentrifugen**, werden durchwegs an ein Vakuumsystem angeschlossen betrieben, um die bei hohen Geschwindigkeiten infolge des Luftwiderstandes auftretende Reibungswärme zu vermeiden. Beim Betrieb von Zentrifugen sind bestimmte Sicherheitsmaßnahmen zu beachten, vor allem müssen die einander gegenüberliegenden Probengefäße gut austariert sein, um jegliche Unwucht zu vermeiden, die die Zentrifuge zerstören könnte.

2.5.1 Grundlagen

Das physikalische Prinzip der Zentrifugation ist eine Trennung nach Größe und Dichte. Auf ein Teilchen, das mit konstanter Winkelgeschwindigkeit ω um eine Drehachse bewegt wird,



2.4 Rotoren für die Zentrifugation. Festwinkelrotor, Vertikalrotor und Ausschwingrotor bei Beladung (A); unter Zentrifugationsbedingungen zu Beginn der Trennung (B); während der Trennung (C); beim Abbremsen (D) und nach Beendigung der Zentrifugation (E). Protein enthaltene Fraktionen sind rot eingezeichnet.

wirkt eine Zentrifugalkraft, die das Teilchen nach außen beschleunigt. Die Beschleunigung B ist von der Winkelgeschwindigkeit ω und dem Abstand r von der Rotationsachse abhängig:

$$B = \omega^2 r \quad (2.1)$$

Die Beschleunigung wird auf die Erdbeschleunigung g (981 cm s^{-2}) bezogen und als **relative Zentrifugalbeschleunigung RZB** in Vielfachen der Erdbeschleunigung (g) angegeben:

$$\text{RZB} = \frac{\omega^2 r}{981} \quad (2.2)$$

Die Beziehung zwischen der Winkelgeschwindigkeit und der Rotationsgeschwindigkeit in Rotationen pro min (rpm) ist gegeben durch:

$$\omega = \frac{\pi \cdot \text{rpm}}{30} \quad (2.3)$$

woraus sich durch Substitution ergibt:

$$\text{RZB} = 1,118 \cdot 10^{-5} \cdot r \cdot (\text{rpm})^2 \quad (2.4)$$

Zu berücksichtigen ist, dass sich normalerweise während einer Zentrifugation die Entfernung der Teilchen von der Rotationsachse und damit auch die RZB ändern. Für Umrechnungen nimmt man daher oft den Mittelwert.

Die Sedimentationsgeschwindigkeit von sphärischen Partikeln in einer viskosen Flüssigkeit wird durch die nebenstehende **Stokessche Gleichung** beschrieben.

Dabei sind v die Sedimentationsgeschwindigkeit, g die relative Zentrifugalbeschleunigung, d der Durchmesser des Teilchens, ρ_p und ρ_m die Dichte des Teilchens bzw. der Flüssigkeit und η die Viskosität des Mediums.

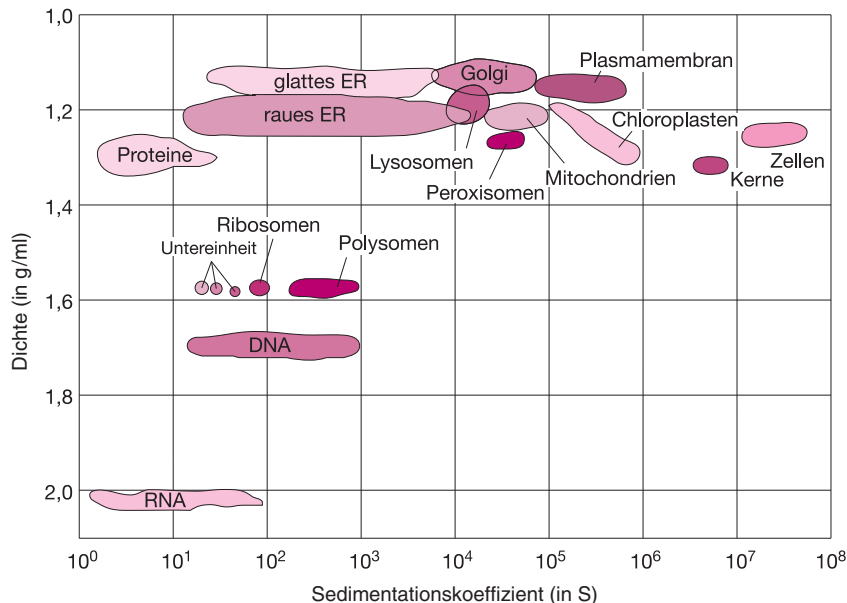
Die Sedimentationsgeschwindigkeit wächst mit dem Quadrat des Teilchendurchmessers und der Differenz der Dichten zwischen Teilchen und Medium und nimmt mit der Viskosität der Flüssigkeit ab. Wenn nun die Sedimentation in einem Medium wie zum Beispiel 0,25 M Sucrose stattfindet, das weniger dicht als alle Teilchen ist und außerdem eine niedrige Viskosität hat, so ist der Durchmesser der Teilchen der für die Sedimentationsgeschwindigkeit dominierende Faktor.

Der **Sedimentationskoeffizient s** ist die Sedimentationsgeschwindigkeit unter geometrisch vorgegebenen Bedingungen des Zentrifugalfeldes. Er wird in **Svedberg-Einheiten (S)** angegeben.

$$s = \frac{v}{r\omega^2} \quad (2.6)$$

1 S entspricht 10^{-13} Sekunden. In dieser Größenordnung liegen verschiedene biologische Moleküle. Die Svedberg-Einheit eines Biomoleküls fließt zuweilen in seine Benennung ein (z. B. 18S-rRNA), was dann einen Schluss auf die Größe des Teilchens zulässt. In Tabelle 2.3 sind die Größe und die Zentrifugationsbedingungen für die Reinigung von Zellen und einiger zellulärer Kompartimente angegeben. Eine gute Übersicht gibt auch die Darstellung der Teilchen in einem Dichte/Sedimentationskoeffizient-Diagramm (Abb. 2.5) oder in einem Dichte/g-Werte-Diagramm.

Aus der Stokesschen Gleichung können die verschiedenen Techniken der Zentrifugation leicht verstanden werden.



2.5 Dichte und Sedimentationskoeffizienten einiger Zellkompartimente. Die Abbildung zeigt die Verteilung verschiedener Zellbestandteile bezüglich ihrer Dichte und ihres Sedimentationskoeffizienten.



<http://www.springer.com/978-3-8274-2942-1>

Bioanalytik

Lottspeich, F.; Engels, J.W. (Hrsg.)

2012, XL, 1208 S. 812 Abb., 618 Abb. in Farbe.,

Hardcover

ISBN: 978-3-8274-2942-1