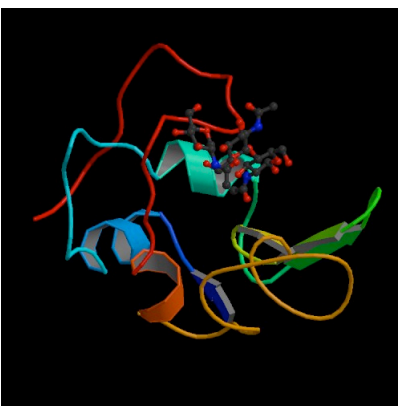
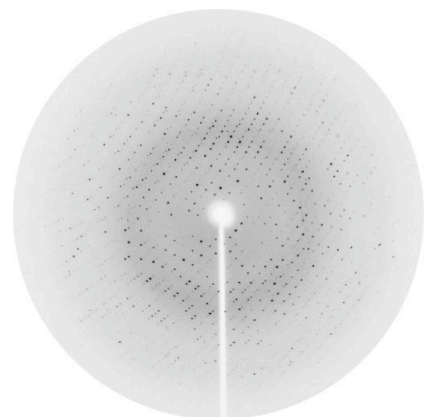
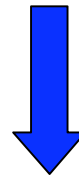
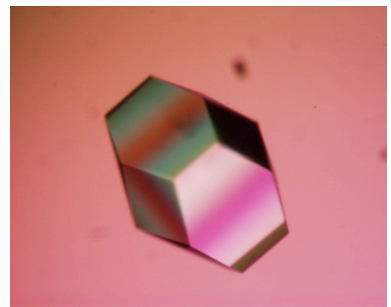


Vom Ei zum Proteinkristall

Reinigung und Kristallisation von Lysozym



Isolierung von Lysozym aus Hühnereiweiß

(Protokoll adaptiert von www.biochemie.uni-jena.de/files/Praktikum/lysozym.pdf)

Einführung in die Problemstellung

Lysozym wurde 1922 von Alexander Fleming entdeckt. Er machte die Beobachtung, daß Nasenschleim in der Lage ist, Bakterienkulturen aufzulösen. Lysozym ist ein Enzym, das bakterielle Zellwände durch Hydrolyse der glykosidischen β (1-4)-Bindungen zwischen N-Acetylmuraminsäure (NAM) und N-Acetylglucosamin (NAG) zerstört. Beide Verbindungen bilden den Polysaccharidbestandteil der Peptidoglycane der bakteriellen Zellwand. Lysozym ist in den Zellen und Sekreten von Vertebraten weit verbreitet.

Lysozym aus Hühnereiweiß ist das am gründlichsten untersuchte Lysozym und eines der mechanistisch am besten verstandenen Enzyme. Es ist ein relativ kleines Protein (14.6 kDa), dessen einzige Polypeptidkette aus 129 Aminosäuren besteht und intramolekular durch vier Disulfidbrücken quervernetzt ist. Von seinen 129 Aminosäuren sind 6 Lysine, 11 Arginine, 1 Histidine und 8 Cysteine. Das Hühnereiweiß-Lysozym hydrolysiert sein Substrat mit einer etwa 10^{10} -fach höheren Geschwindigkeit als die nichtkatalysierte Reaktion.

David Phillips konnte 1965 die Röntgenstruktur von Lysozym mit hoher Auflösung aufklären. Das Proteinmolekül hat eine annähernd ellipsoide Form mit den Abmessungen 3x3x4.5 nm. Sein charakteristisches Merkmal ist eine tiefe Spalte, die Substratbindungsstelle, die quer über die Fläche des Moleküls läuft. Die Polypeptidkette hat eine verhältnismäßig ungeordnete Sekundärstruktur:

Sie enthält mehrere helikale Segmente sowie ein dreisträngiges, antiparalleles β -Faltblatt, das einen wesentlichen Teil in der Wand der Bindungsspalte einnimmt. Die meisten der nicht polaren Seitenketten befinden sich im Inneren des Moleküls und sind so fern vom umgebenden wäßrigen Lösungsmittel.

Isolierung des Lysozyms

Die Isolierung des Lysozyms aus dem Hühnereiweiß erfolgt nach dem Prinzip der Ionenaustauschchromatographie.

Im Ionenaustausch-Prozeß werden Ionen, die elektrostatisch an eine unlösliche und chemisch inerte Matrix gebunden sind, reversibel durch Ionen des Lösungsmittels verdrängt:



Dabei ist R^+ ein Anionenaustauscher, der A^- bindet; B^- sind die Anionen in der Lösung. Kationenaustauscher

tragen entsprechend negativ geladene Gruppen, die reversibel Kationen binden.

Proteine, die sowohl positive als auch negative Ladungen tragen, können in Abhängigkeit von ihrer Nettoladung sowohl an Kationen- als auch an Anionenaustauschern binden. Bei der Reinigung eines Proteins werden pH-Wert, Salzkonzentration und Ionenaustauscher im allgemeinen so gewählt, daß das zu isolierende Protein an den Ionenaustauscher bindet. Liegt ein Proteingemisch vor, so werden unter gegebenen Bedingungen wahrscheinlich eine Vielzahl

von Proteinen an den Ionenaustauscher binden. Proteine, die unter diesen Bedingungen nicht an den Ionenaustauscher binden, können durch Waschen mit dem Auftragspuffer entfernt werden. Das gesuchte Protein kann anschließend vom Ionenaustauscher mit einer Pufferlösung eluiert werden, deren pH-Wert und Salzkonzentration die Affinität des Proteins für den Ionenaustauscher herabsetzen.

Die am häufigsten verwendeten Ionenaustauscher bestehen aus Cellulose, wobei Diethylaminoethyl-(DEAE)-Cellulose der am häufigsten genutzte Anionenaustauscher und Carboxymethyl-(CM)-Cellulose der am häufigsten genutzte Kationenaustauscher ist. Der Vorteil von Cellulose gegenüber Harz als Matrix bei der Trennung biologischer Moleküle liegt in ihrer größeren Permeabilität für makromolekulare Elektrolyte. Dadurch wird den Makromolekülen der Zugang zu den geladenen Gruppen der Cellulose eröffnet, ohne daß extrem feine Partikel verwendet werden müssen, die ihrerseits den Durchfluß des Elutionsmittels behindern.

Praktische Vorgehensweise:

- Eiweiß eines Hühnereies sauber vom Eigelb trennen und durch Gaze filtrieren;
- ca. 5 ml des Eiweißes im Verhältnis 1:6 mit 0.1 M Glycin/NaOH-Puffer pH 10.0 verdünnen;
- **F₀-Fraktion** (Fraktion 0 zur Bestimmung des totalen Proteingehaltes, der Lysozymaktivität und zur elektrophoretischen Auftrennung) entnehmen (ca. 1 ml);
- zur Eiweißverdünnung 1 g trockene Carboxymethylcellulose (CM) pro 5 ml Eiweiß hinzufügen;
- 15 min unter Rühren stehen lassen (Adsorption des Lysozyms an die CM-Cellulose);
- Suspension bei ca. 5000-6000 U/min für 5 min zentrifugieren (Suspension auf 2 Zentrifugenröhrchen verteilen, austarieren!);
- **F₁-Fraktion** bereitstellen (vom Überstand ca. 1 ml für oben erwähnte Bestimmungen verwenden und Restüberstand verwerfen);
- Pellets mit je 25 ml Glycinpuffer waschen und wie oben zentrifugieren;
- **F₂-Fraktion** bereitstellen (wie oben 1 ml vom Überstand entnehmen);
- Pellets erneut mit je 25 ml Glycinpuffer waschen und wie oben zentrifugieren;
- **F₃-Fraktion** bereitstellen (vom Überstand 1 ml entnehmen); Carboxymethylcellulose mit ca. 10 ml Glycin/NaOH Puffer pH 10.0 unter Zusatz von 0.5 M NaCl spülen (das Lysozym wird freigesetzt); zentrifugieren
- **F₄-Fraktion** bereitstellen (1 ml vom Eluat abnehmen).

Gelelektrophorese

(Mengen müssen an das verwendete Gelsystem angepaßt werden)

Herstellung eines 15 %igen Polyacrylamidgels:

Zur Herstellung der Gele müssen Handschuhe getragen werden!

Trenngel: 15 ml 30 %ige Acrylamidfertiglösung

5.7 ml Trenngelpuffer (2 M Tris/HCl, pH 8.8)

150 µl 20 %iges SDS

9.3 ml H₂O

+ 80 µl Ammoniumpersulfat (frisch ansetzen 0.2 g/ml)

+ 8 µl TEMED

Die Auspolymerisierung des Trenngeles dauert etwa eine Stunde.

Sammelgel: 2 ml 30 %ige Acrylamidfertiglösung
3.75 ml Oberpuffer (0.5 M Tris/HCl, pH 6.8)
75 µl 20 %iges SDS
9.3 ml H₂O
+ 90 µl 20 %iges Ammoniumpersulfat
+ 6 µl TEMED

In dieses Gel wird vorsichtig der Kamm für die Bildung der Auftragslots hineingeschoben.

Elektrophoresepuffer: 50 ml 10facher Laufpuffer (30 g/l Tris (pH 8.3), 144 g/l Glycin)
+ 450 ml H₂O
+ 2.5 ml 20 %iges SDS

Probenpuffer: 0.3 ml 20 %iges SDS
0.3 ml Mercaptoethanol (**Arbeit unter dem Abzug mit Handschuhen!!**)
0.4 ml Glycerin (blaue Spitze abschneiden)
1 Spatelspitze Bromphenolblau

10 µl der Proteinlösung (Proben F₀-F₂ 1:10 verdünnt, Proben F₃ und F₄ unverdünnt) + 10 µl des SDS-haltigen Probenpuffers werden ca. 5 min gekocht und danach mit einer Mikroliterspritze auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich werden ein Lysozymstandard sowie ein Molekulargewichtsmarker auf das Gel aufgetragen.

Laufbedingungen:

Pro Gel werden ca. 20 mA angelegt. Die Anfangsspannung beträgt unter diesen Bedingungen etwa 80 V. Die Laufzeit liegt bei ca. 2-3 Stunden. Es wird eine Endspannung von 150-160 V erreicht.

Anfärben und Fixieren des Gels:

Das Gel wird für ca. 10 - 20 min in einer Coomassie-Blue-Lösung angefärbt und dann in eine Fixierlösung gelegt, bis die Banden gut erkennbar sind. Danach kann es unter Vakuum getrocknet werden.

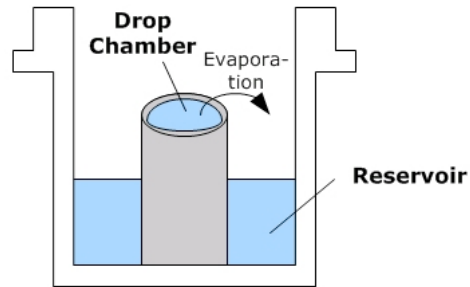
Färbelösung: 40 % Methanol, 10 % Eisessig, 0.1 % Coomassie Brilliant Blue

Fixierlösung: 40 % Methanol, 10 % Eisessig

Kristallisation

Die Kristallisation wird mit einer Lysozymlösung (Fluka #62971) der Konzentration 100 mg/ml durchgeführt. Die verwendete Methode ist die der Dampfdiffusion mit einem *sitting drop* Experiment. Die Proteinlösung wird der Mutterlauge gemischt und in einem abgeschlossenen Gasraum über einem Reservoir aus Mutterlauge inkubiert. Durch Evaporation wird die Proteinlösung langsam übersättigt und auf diese Weise die Voraussetzung für die Kristallisation geschaffen.

Schema:



Versuchsdurchführung:

Pro Kammer werden 300 μl Reservoirlösung pipettiert, dabei wird die Konzentration des Präzipitanten NaCl von 0.6 M bis 1.2 M variiert. Für den Proteintropfen wird 1 μl der Proteinlösung mit 1 μl der Reservoirlösung gemischt. Die Kammern werden mit Klebefolie luftdicht verschlossen. Der Erfolg des Versuchs wird am Mikroskop verfolgt.

Reservoirlösung: 0.1 M Natriumcitrat (pH 4.5), 0.6 – 1.2 M Natriumchlorid