

## Affinity chromatography in brief

Affinity chromatography is unique in purification technology since it is the only technique that enables the purification of a biomolecule on the basis of its biological function or individual chemical structure. **Purification** that would otherwise be **time-consuming**, difficult or even impossible using other techniques can often be easily achieved with affinity chromatography.

Affinity chromatography separates proteins on the basis of a reversible interaction between a protein (or group of proteins) and a specific ligand coupled to a **chromatography matrix**. The technique offers high selectivity, **hence** high **resolution**, and usually high **capacity** for the protein(s) of interest. The **target protein(s)** is (are) collected in a purified, concentrated form. The concentrating effect **enables** large volumes to be processed. Target molecules can be purified from complex biological mixtures, native forms can be separated from **denatured** forms of the same substance and small **amounts** of biological material can be purified from high levels of contaminating substances.

Successful affinity purification therefore requires a biospecific ligand that can be covalently attached to a chromatography matrix.

Biological interactions between ligand and target molecule can be a result of electrostatic or hydrophobic interactions, van der Waals' forces and/or **hydrogen** bonding. The **coupled** ligand must **retain** its specific binding affinity for the target molecules and, after washing away unbound material, the binding between the ligand and target molecule must be reversible. To **elute** the target molecule from the affinity medium in an active form the interaction can be reversed, either specifically using a **competitive** ligand, or non-specifically, by changing the pH, **ionic strength** or polarity.

Any **component** can be used as a ligand to purify its **respective** binding partner. Some typical biological interactions, frequently used in affinity chromatography, are listed below:

- Enzyme and cofactor
- Antibody and antigen
- Nucleic acid and **complementary base sequence**
- Glutathione and glutathione-S-transferase or GST fusion proteins
- Metal ions and Poly (His) **fusion proteins**, native proteins with **histidine, cysteine** and/or **tryptophan residues** on their **surfaces**.

### **Dictionary:**

purification: Aufreinigung

competitive: wetteifernd

time-consuming: zeitraubend

denatured: denaturiert

ionic strength: Ionenkonzentration

chromatography matrix: Chromatographie Matrix

amounts: Mengen

component: Komponente / Teil

hence: daher / somit

hydrogen: Wasserstoff

respective: entsprechenden

resolution: Auflösung / Aufreinigung

coupled: gekoppelt

complementary base sequence:

komplementäre Basensequenz

capacity: Aufnahmefähigkeit

retain: festhalten

fusion: Zusammenschluss

target protein: Zielprotein

elute: auswaschen

histidine, cysteine, tryptophan: Histidin (AS);

Cystein (AS); Tryptophan (AS)

enables: erlaubt

surface: Oberfläche



Figure. 1: affinity chromatography; source: affinity chromatography - Principles and Methods“ - Amersham Biosciences Handbooks

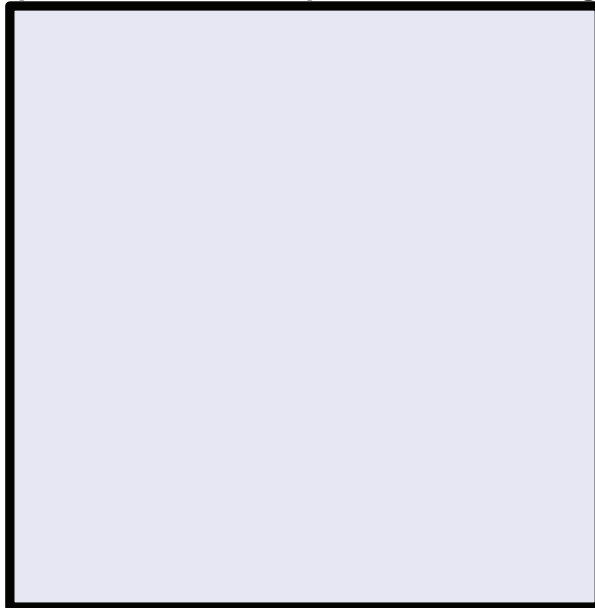
## Protein-Aufreinigung über Affinity-Tags

### Aufgabe:

Überlegen Sie sich mit den Informationen im Text die Anordnung des Modells an der Tafel in den jeweiligen Arbeitsschritten/Phase  
Fassen Sie den Ablauf der einzelnen Phase während einer Aufreinigung mittels Affinitäts-Chromatografie nochmals in eigenen Worten zusammen

### Phase 1:

#### spezifische und unspezifische Bindung



---

---

---

---

---

---

---

---

### Phase 2:

#### Waschschritt



---

---

---

---

---

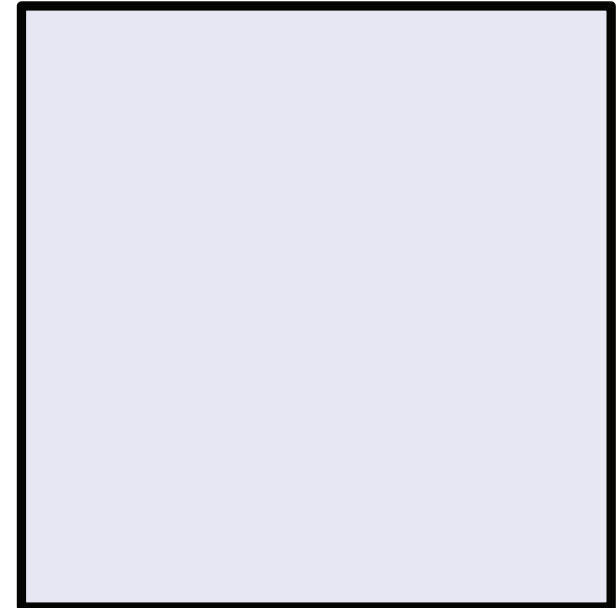
---

---

---

### Phase 3:

#### Elution



---

---

---

---

---

---

---

---

## Biologische Methoden

„Zellaufschluss, die Zerstörung der Zellhüllen von Mikroorganismen, wird normalerweise in der biochemischen Analytik angewandt oder um intrazelluläre Substanzen zu gewinnen.“

Biologische Aufschlussmethoden haben den Vorteil sehr spezifisch zu sein, wodurch milde Bedingungen gewählt werden können.

Im Allgemeinen unterscheidet man drei Methoden: den enzymatischen Zellaufschluss, die Autolyse und den Zellaufschluss durch Phagen.

Bei der Autolyse handelt es sich um die Auflösung der Mikroorganismen aus dem Inneren her. Dies beruht auf dem Effekt, dass Mikroorganismen nach einer bestimmten Wachstumszeit bzw. Phase ihres Wachstums aus einer stationären Phase in eine Absterbephase treten. Die Autolyse kann allerdings auch durch einen Hitzeschock schon zuvor induziert werden. Problematisch während der Autolyse ist die hohe Aktivität von Proteasen, welche u.a. auch die Zielproteine angreifen. Nur Hefeextrakt wird gezielt auf diese Weise hergestellt, meist tritt die Autolyse als unerwünschter Nebeneffekt auf.

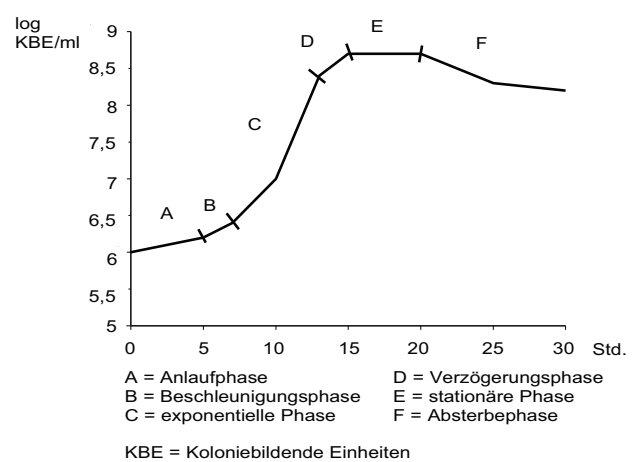


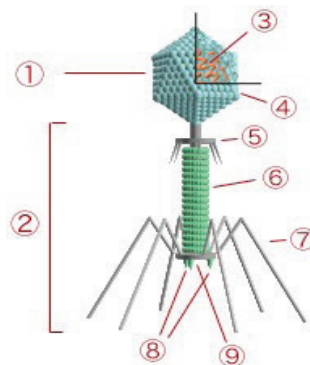
Abb. 1: Wachstum einer Bakterienkolonie

Beim enzymatischen Zellaufschluss verwendet man je nach Mikroorganismus unterschiedliche Enzyme wie z.B. Lysozym, Glucuronidase oder Zymolyase.

Hauptsächlich wird das aus Hühnereiweiß gewonnene Lysozym eingesetzt, welches besonders bei gram-positiven Bakterien verwendet werden kann. (Bei gram-negativen Bakterien wie E. coli ist eine Kombination aus Lysozymbehandlung und Einsatz von Chelatbildnern nötig.) Das Enzym greift spezifisch Bindungen, das Mureingerüst der Bakterienzellwände, an und löst diese auf. Der eigentliche Aufschluss der Zelle erfolgt z.B. durch Einfrieren und langsames Auftauen. Allerdings wird die Methode des enzymatischen Aufschlusses fast ausschließlich im Labormaßstab angewandt, da das eingesetzte Enzym relativ teuer ist.

Beim Zellaufschluss mit lytischen Phagen infizieren diese die Zellen. Es folgt eine starke Vermehrung der Phagen innerhalb der Wirtsbakterien, bis diese beim Austritt der Phagen lysiert und somit aufgeschlossen werden. Das Verfahren wird nur im Labormaßstab eingesetzt und ist

- 1 Kopf
- 2 Schwanz
- 3 Nukleinsäure
- 4 Capsid
- 5 Kragen
- 6 Schwanzstück
- 7 Schwanzfasern
- 8 Spikes
- 9 Grundplatte



relativ schwierig. Die Infektion der Bakterien mit den Phagen führt zu einer Belastung des Bakterienstoffwechsels, was sich wiederum auf die Produktion, vor allem die Menge des Zielproteins, auswirken oder auswirken kann.

Abb.2: Aufbau eines T4-Phagen (lytischer Phage)  
(Quelle: www.wikipedia.de)

## Chemische Methoden

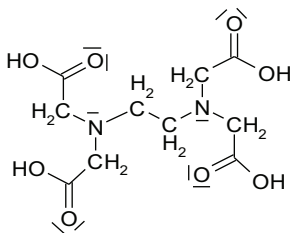
„Zellaufschluss, die Zerstörung der Zellhüllen von Mikroorganismen wird normalerweise in der biochemischen Analytik angewandt oder um intrazelluläre Substanzen zu gewinnen.“

Die chemischen Methoden des Zellaufschlusses werden hauptsächlich bei gram-negativen Bakterien angewandt. Die Chemikalien wirken spezifisch gegen Zellwandbestandteile der Bakterien. Durch das Einwirken der Stoffe wird der Wandverband gelockert, die Permeabilität für Zellinhalte erhöht. Dies führt zu einer Diffusion von Stoffen aus dem Zellinneren heraus. Oft wird die Zellwand jedoch bis auf wenige Bruchstücke komplett aufgelöst, so dass nur noch sogenannte Sphäroblasten übrig bleiben (Sphäroblasten = Zellen von Bakterien, Hefen oder Pilzen mit kugelförmiger Form, deren Zellwand zum großen Teil entfernt wurde).

Der eigentliche Zellaufschluss erfolgt bei allen Methoden effektiv erst durch einen osmotischen Schock, welcher die Sphäroblasten zum Platzen bringt, oder durch Einfrieren und Auftauen, was den Sphäroblasten ebenfalls zerstört und den Zellinhalt freisetzt.

Eingesetzte Chemikalien sind: Chelatbildner, Antibiotika, Chemikalien zur alkalischen Lyse und Detergenzien.

Die Methode ist je nach verwendeter Chemikalie mehr oder weniger schonend für die zu gewinnenden Zellinhalte. Detergenzien führen unter Umständen direkt zu einer Denaturierung des Zielproteins oder lösen Proteasen aus den Zellen heraus, welche ebenfalls zur Zerstörung des Zielproteins führen. Die Umgebungsbedingungen (z.B. pH-Wert) bei der alkalischen Lyse können vor allem bei empfindlichen Proteinen problematisch werden. Wie bei jeder Proteingewinnung ist darauf zu achten, dass die Temperatur niedrig gehalten wird und Proteasehemmer zugesetzt werden, um die Denaturierung der Proteine zu verhindern.



Die Wirkung von Chelatbildner beruht auf der Komplexbildung von Ionen. So bindet EDTA (Ethylenediaminetetraacetat) sehr gut zweiwertige Kationen, z.B.  $Mg^{2+}$ . Die Zellwand gram-negativer Bakterien enthält zweiwertige Ionen wie  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$ . Durch Zusatz von EDTA erfolgt die Entfernung dieser Kationen, woraufhin die Zellwand destabilisiert wird. Die Folge ist eine erhöhte Permeabilität für Zellinhaltsstoffe.

Abb. 1: EDTA

Antibiotika wie Penicillin greifen in den Zellwandaufbau ein. Sie verhindern die Knüpfung von Peptidbindungen, so dass die Zellwand nach und nach instabiler und dadurch besser passierbar für Zellinhaltsstoffe wird. Die hohen Produktions- bzw. Bezugskosten für Antibiotika machen den Einsatz im industriellen Maßstab unrentabel.

Bei der alkalischen Lyse wirken Detergenz und NaOH in Kombination. Mittels eines Detergenz werden Lipidbausteine gelockert, anschließend erfolgt die Verseifung der Fette durch NaOH, womit die Integrität der Zellwand zerstört wird.

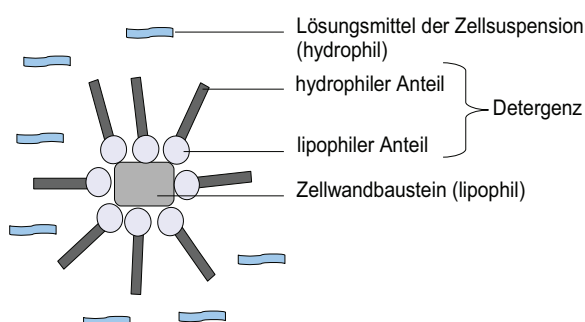


Abb. 2: In Micelle gelöster Zellwandbaustein

Detergenzien werden häufig in Verbindungen mit anderen Stoffen für den Zellaufschluss verwendet. Es sind Moleküle, die sowohl einen lipophilen als auch einen hydrophilen Bereich besitzen (amphiphil). Die Moleküle binden mit ihrem lipophilen Teil an lipophile Zellwandbestandteile und lösen diese unter Bildung einer Micelle aus der Zellwand heraus, wodurch auch hier die Instabilität der Zellwand zunimmt (siehe Abbildung 2)

## Rührwerkskugelmühle

„Zellaufschluss, die Zerstörung der Zellhüllen von Mikroorganismen wird normalerweise in der biochemischen Analytik angewandt oder um intrazelluläre Substanzen zu gewinnen.“

Der Zellaufschluss mittels Rührwerkskugelmühlen wird schon seit über 30 Jahren eingesetzt und eignet sich besonders gut für Hefezellen und Bakterien. Das Verfahren kann sowohl im Labormaßstab als auch im industriellen Maßstab angewandt werden.

Das Mahlgefäß ist ein kühlbarer Hohlzylinder in dessen Inneren das motorgetriebene Rührwerk aus Stiften oder Scheiben ragt. Gefüllt wird das Gefäß zu 80 – 90 % mit Mahlkugeln (Glas- oder Zirkonium-Mischoxidkugeln) und der aufzuschließenden Zellsuspension. Der Motor führt dazu, dass die Mahlkugeln in Bewegung gesetzt werden.

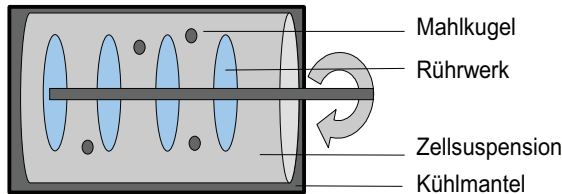
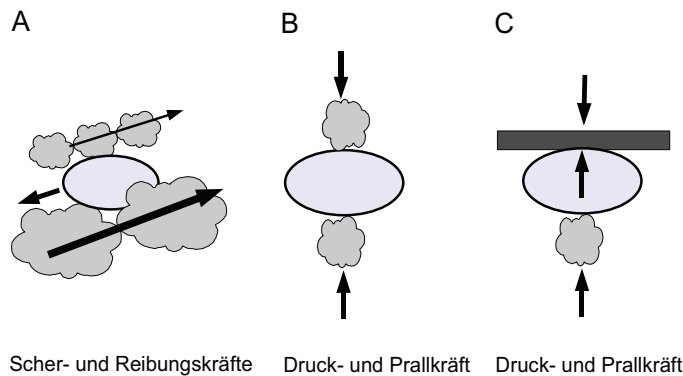


Abb. 1: Rührwerkskugelmühle

Beim Aufschluss wirken Druck-, Prall-, Scher- und Reibungskräfte auf die Zellen und lassen sie platzen. Grundprinzip des Aufschlusses ist die Übertragung der Bewegungsenergie durch den Rührer auf die Mahlkugeln. Dabei kann die Drehzahl zur Erhöhung der Zerkleinerungskräfte nicht beliebig erhöht werden, da mit steigender Drehzahl auch die Zentrifugalkräfte zunehmen. Dadurch wird die Mahlwirkung aufgehoben, die Kugeln sammeln sich immer mehr an der Wand des Gefäßes an.



Scher- und Reibungskräfte Druck- und Prallkraft Druck- und Prallkraft  
Abb. 2: Zellaufschluss durch unterschiedliche Kräftewirkung

Je nach Aufbau des Rührwerkzeuges und Größe der Mahlkugeln entstehen im Gefäß unterschiedliche Strömungen der Kugeln in bestimmte Richtungen (Schichtenströmung). Zwischen diesen Strömen herrschen bedingt durch unterschiedliche Geschwindigkeiten hohe Scherkräfte, welche die Zellen aufschließen [Abb. 2A]. Auch zum Zellaufschluss tragen Drücke bei, denen die Mikroorganismenzellen zwischen Zellwand und Mahlkugel [Abb. 2B] oder zwischen zwei Mahlkugeln ausgesetzt sind [Abb. 2C].

Um die Aufschlusswirkung zu optimieren müssen der Anteil an Mahlkugeln und die Drehzahl des Rührers, ebenso wie die Dauer der Prozedur und die Menge an Zellsuspension abgestimmt werden. Wird zu viele Zellsuspension eingesetzt, sinkt die Geschwindigkeit der Kugeln durch die höhere Viskosität der Lösung, die Wahrscheinlichkeit eines Zusammenstoßes steigt jedoch an.

Höhere Drehzahlen führen neben dem Anstieg der Zentrifugalkräfte auch zu einem Anstieg der Temperatur in der Apparatur, was gerade temperaturempfindliche Proteine schädigen kann. Deshalb muss die Apparatur ausreichend gekühlt werden.

Werden zu wenige Mahlkörper eingesetzt sammeln sich diese ungleichmäßig im Mahlgefäß an und verschlechtern das Ergebnis.

Auch muss die Dauer des Zellaufschlusses begrenzt werden, da nach zu langer Zeit die Bewegungsenergie fast gänzlich in Wärmeenergie umgewandelt wird, so dass die Suspension sich stark erwärmt, was die Proteine schädigen kann. Ebenso kann es mit steigender Dauer zu einer Beschädigung der Proteine durch mechanische Einwirkungen kommen.

## Methoden des Zellaufschlusses

Beim Zellaufschluss ist es wichtig, dass die Zielproteine geschont werden, um möglichst große Mengen intakten Proteins zu erhalten. Der Zellaufschluss erfolgt idealer Weise bei tiefen Temperaturen (Zellprozesse sind verlangsamt) und dem Zusatz von Proteasehemmern (verhindern denn Abbau von Proteinen durch Proteasen).

### Aufgabe:

- Achten Sie bei der Besprechung in den Expertengruppen auf die Punkte: Schonung der Proteine, Notwendige Zusätze, Vorteile, Nachteile, anwendbarer Maßstab der Methode.
- Tragen Sie in der folgenden Übersicht die Ergebnisse der Gruppenarbeit zusammen. Fehlen eindeutige Aussagen im Text, überlegen Sie gemeinsam.

Methoden:	Rührwerkskugelmühle	Ultraschallhomogenisator	Chemische Methoden	Biologische Methoden	Stickstoff-Dekompression
Schonung der Proteine					
Notwendige Zusätze					
Vorteile					
Nachteile					
Anwendbarer Maßstab: Labor/Industrie					





## Stickstoff-Dekompression

„Zellaufschluss, die Zerstörung der Zellhüllen von Mikroorganismen wird normalerweise in der biochemischen Analytik angewandt oder um intrazelluläre Substanzen zu gewinnen.“



Abb. 1: Parr Zellaufschlussbomben ([www.zellaufschluss.de](http://www.zellaufschluss.de))

Die Stickstoff-Dekompression ist eine schonende Methode um Zellsubstanzen und Gewebeprobe zu homogenisieren, den Zellinhalt freizusetzen. Durch die Regulation des Druckes gelingt es sogar, ganze Organellen intakt zu erhalten oder auch schwer aufschließbare Zellbestandteile wie den Zellkern zu homogenisieren.

Die chemischen und physikalischen Belastungen der Proben ist gering. Auch findet während des Aufschlusses kaum eine Temperaturerhöhungen statt, da zum Einen nur geringe Scherkräfte auftreten und zum Anderen die Ausdehnung des Gases beim Entweichen die Probe ebenfalls kühlt, was die empfindlichen Zellbestandteile ebenfalls schützt.

Die Methode ist besonders für den Aufschluss von Säugetierzellen geeignet. Auch Pflanzenzellen und Bakterien lassen sich aufschließen. Allerdings müssen bei manchen schwer aufschließbaren Zellen (z.B. E. coli, Hefen) die Zellwände mittels anderer Methoden vorbereitet werden.

Die Grundlage der Methode ist das Henry'sche Gesetz [Löslichkeitsverhalten von (flüchtigen) Substanzen in Flüssigkeit]: Die Konzentration einer flüchtigen Substanz in der flüssigen Phase ist direkt proportional zum Partialdruck über der Lösung.

Unter erhöhtem Gasdruck diffundieren viele Gasteilchen in die Zellen und reichern sich dort an.

Findet nun eine schlagartige Druckminderung statt, kann das innerhalb der Zellen gelöste Gas nicht schnell genug entweichen und bildet innerhalb der Zellen immer größer werdende Gasbläschen (es „perlt“). Die mechanische Belastung für die Zellmembran wächst und führt dazu, dass die Zellen platzen und somit den Zellinhalt freisetzen.

Der Grad des Zellaufschlusses hängt dabei ab von: der Art und Beschaffenheit der Zellen, der Art des Gases, dem Druck und der Temperatur.

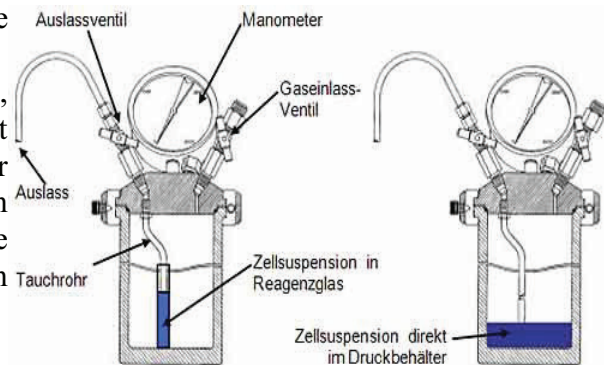


Abb. 2: Parr Zellaufschlussbomben (Querschnitt) ([www.zellaufschluss.de](http://www.zellaufschluss.de))

Die aufzuschließenden Zellen werden in Pufferlösungen suspendiert und anschließend in einem Druckbehälter aus Edelstahl platziert. Anschließend wird der Druck im Behälter erhöht. Oft wird hierzu Stickstoff-Gas verwendet. Stickstoff wird eingesetzt, weil es sich um ein Inert-Gas handelt, was zum Einen einen guten Schutz gegen Oxidationen von empfindlichen Organellen bietet, zum Anderen wird der pH-Wert der Zellsuspension durch den Stickstoff nicht verändert.

Der Druck wird je nach aufzuschließenden Zellen und dem erforderlichen Grad des Aufschlusses eingestellt.

Nach einer gewissen Zeit findet der eigentliche Zellaufschluss statt: Die Zellen gelangen aus dem Inneren des Druckbehälters in die Atmosphäre, wo das Gas unter Freisetzung starken mechanischen Druckes wieder entweicht und die Zellen aufschließt. Durch die benötigten hohen Drücke ist diese Methode nur für den Labormaßstab geeignet.



## Ultraschall

„Zellaufschluss, die Zerstörung der Zellhüllen von Mikroorganismen wird normalerweise in der biochemischen Analytik angewandt oder um intrazelluläre Substanzen zu gewinnen.“

Der Zellaufschluss im Ultraschallhomogenisator erfolgt mittels Ultraschallwellen (US-Wellen). Diese besitzen Frequenzen im Bereich von 20 kHz bis zu 1 – 10 GHz. In Flüssigkeiten, z.B. Zellsuspensionen, bilden sich bei Ultraschallsignalen in bestimmten Frequenzbereichen Dampfblasen. Diese akustische Kavitation (= Bildung von Hohlräumen in Flüssigkeiten) findet auf Grund der durch die US-Wellen ausgelösten Druckschwankungen statt. Besonders Zellen können als Kavitationskeime dienen, da hier der Flüssigkeitsnachfluss gestört wird. Durch Druckverminderung entstehen Blasen, welche sich auf Grund des Dampfdruckes der umgebenden Flüssigkeit mit Dampf füllen. Sie wachsen bis zu einer kritischen Größe an und implodieren bei Druckerhöhung. Dabei entstehen sehr hohe Temperaturen (bis zu 5000 K ~ 4727 °C) und hohe Drücke (bis 500 bar).



Abb. 1: Ultraschallhomogenisator  
Sonifier W-150  
(<http://www.gheinemann.de>)

Je nach Frequenzbereich ändert sich die eingebrachte Energie. Dabei ist zu beachten, dass höhere Energien zur Entstehung höherer Temperaturen und Drücke führen, was für Proteine schädlich sein kann.

Ebenfalls entstehen mehr freie Radikale. Diese müssen mit Radikalfängern abgefangen werden, da auch sie ansonsten zur Schädigung der Zielproteine führen.

Der Ultraschallhomogenisator ist aus einem Generator, einem Keramikkrystall (piezoelektrisches Material) und einer Sonotrode aufgebaut.

Der Generator erzeugt Spannungen im hochfrequenten Bereich. Das piezoelektrische Material wandelt die elektrischen Impulse des Generators in mechanische Schwingungen um, welche durch die Sonotrode auf das Medium übertragen werden.

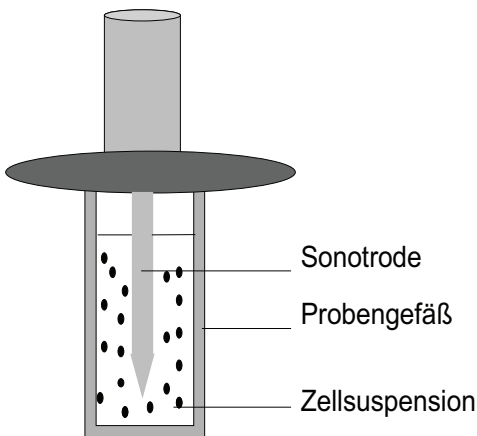


Abb. 2: Sonotrode und Probengefäß

Die Proben werden gekühlt in die Geräte gebracht oder sogar während der Prozedur über gekühlt, um die Zielproteine zu schonen. Ebenfalls ist die Zugabe von Proteaseinhibitoren nach dem Aufschluss sinnvoll, da diese sonst zur Denaturierung der freigesetzten Zellinhalte führen. Im Labor werden Ultraschallhomogenisatoren zum Aufschluss von Probenmengen bis in den Milliliterbereich benutzt, es gibt aber auch Hochdurchsatzgeräte, die mehrere hundert Liter pro Stunde an Durchfluss bewältigen (hauptsächlich eingesetzt bei der Abwasserreinigung).

Der eigentliche Aufschluss der Zellen erfolgt über verschiedene Folgeprozesse der Ultraschalleinwirkung:

Während der Blasenbildung strömt aus der direkten Umgebung Flüssigkeitsdampf in die Blase ein. Bilden sich Blasen in der Nähe von Zellen kann der Nachstrom so stark werden, dass ein Loch in die Zellwand gerissen wird, wodurch der Zellinhalt austreten kann. Beim Kollabieren der Blasen entstehen Druckunterschiede, welche zur Bildung von Wirbeln führen; die entstehenden Scherkräfte brechen die Zellen auf. Ebenfalls durch das Kollabieren können Flüssigkeitsstrahlen entstehen, welche bis zu 100m/s schnell sind und Löcher in die Zellwände schlagen können.

Durch Zusatz von Proteasehemmern und dem Arbeiten bei tiefen Temperaturen lassen sich die Protein schonend extrahieren.

