



Doctoral Thesis

## **A new single-step affinity purification system derived from type 1 pili of *Escherichia coli***

**Author(s):**

Giese, Christoph

**Publication Date:**

2011

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006715823> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 19806

**A new single-step affinity purification system derived from  
type 1 pili of *Escherichia coli***

A dissertation submitted to

**ETH ZURICH**

for the degree of

**Doctor of Sciences**

presented by

**Christoph Giese**

Dipl. Biochem., Martin-Luther-University Halle-Wittenberg

born May 2, 1979

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Rudi Glockshuber, examiner

Prof. Eilika Weber-Ban, co-examiner

Prof. Ben Schuler, co-examiner

2011

# 1 SUMMARY

Type 1 pili of *E. coli* are heterooligomeric protein complexes that are anchored within the outer membrane of the cell and extend into the extracellular space. Uropathogenic *E. coli* strains use type 1 pili to bind to mannosylated target receptors of their host and in this way initiate infections of the urinary tract. The pilus consists of five structural protein subunits termed FimA, FimG, FimF, FimH and FimI.

In the assembled pilus, these subunits interact non-covalently by a mechanism called donor strand complementation where the incomplete fold of one subunit is completed by an N-terminal peptide extension, termed donor strand, of the successive subunit. The complex between FimGt, a truncated variant of FimG which lacks its own donor strand, and a 15-amino-acid-residue peptide corresponding to the donor strand of the neighboring subunit FimF (DsF) has been shown to be the kinetically most stable non-covalent protein ligand complex known to date: under physiological conditions, the extrapolated unfolding/dissociation rate constant of this complex is  $6.5 \cdot 10^{-18} \text{ s}^{-1}$  (Puorger et al. 2008). Based on this extraordinary kinetic stability, the goal of this thesis was to establish the FimGt/DsF system for use in technical applications such as affinity purification of heterooligomeric protein complexes.

For this, the large-scale production of FimGt needed to be established first. This was accomplished by expressing the protein in form of inclusion bodies in *E. coli*. After refolding and purification, native FimGt was obtained with a yield of 35 mg per liter of bacterial culture. Binding kinetics of the free DsF peptide to FimGt were measured and yielded a second-order association rate constant of  $330 \pm 8.9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  at pH 8.0 and 25 °C. This allowed to calculate the dissociation constant  $K_D$  of the FimGt/DsF complex to  $(2.0 \pm 1.8) \cdot 10^{-20} \text{ M}$  and the binding energy to  $-112 \pm 2 \text{ kJ/mol}$ .

The kinetic stability of FimGt was determined by measuring the rate constants for spontaneous refolding and unfolding  $k_f = 0.16 \pm 0.010 \text{ s}^{-1}$  and  $k_u = (9.1 \pm 0.57) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ , respectively. A comparison of the rate constant for unfolding of FimGt to that of the FimGt/DsF complex revealed that binding of the DsF peptide to FimGt increases the half-life of spontaneous unfolding of the protein by 14 orders of magnitudes.

To be able to use the FimGt/DsF system in affinity chromatography, FimGt-sepharose was produced by coupling FimGt to pre-activated sepharose beads. Using purified

DsF-tagged DsbA from *E. coli* (22.9 kDa) the dynamic binding capacity was determined to 220 nmol or 5 mg of DsbA per milliliter of FimGt-sepharose. Successful application of the FimGt/DsF system in affinity chromatography was demonstrated by single-step purification of holo-tryptophan synthase from *E. coli*, a heterotetrameric  $\alpha\beta\beta\alpha$ -complex, using a DsF-tagged  $\alpha$ -subunit. The performance of the DsF-tag was compared to that of the His<sub>6</sub>-, FLAG-, StrepII- and cmc-tag. Only the DsF- and cmc-tag led to a final purity of the tryptophan synthase complex of more than 90 %. As the yield using the DsF-tag was 100fold higher than that of the cmc-tag, the DsF-tag was found to be superior compared to commonly used affinity tags. The FimGt/DsF system was used similarly to purify entire 70 S ribosomes from *E. coli* using the DsF-tagged ribosomal protein subunit L23. The ribosomes obtained were indistinguishable from ribosomes prepared using standard density gradient centrifugation in terms of overall morphology and protein and rRNA composition. Free FimGt was found to spontaneously form short, flexible, amyloid-like fibrils with a diameter of approximately 7 nm and lengths between 30 and 100 nm. Fibrillation was accompanied by a major conformational change as was evident from significantly different fluorescence emission and far-UV CD spectra of FimGt fibrils compared to monomeric FimGt.

In a second part of the thesis, purified type 1 pili were found to form a liquid crystal when incubated in a magnetic field of 9.4 T at concentrations higher than 120 mg/ml. The liquid crystal was used to record an X-ray fiber diffraction pattern of type pili which had a resolution of approximately 3 Å and 4 Å in the meridional and equatorial direction, respectively. Formation of liquid crystals by type 1 pili also suggested their use as an alignment medium for measuring residual dipolar couplings in NMR spectroscopy.

## 2 ZUSAMMENFASSUNG

Typ 1 pili von *E. coli* sind heterooligomere Proteinkomplexe, die in der äußeren Membran der Zelle verankert sind und in den extrazellulären Raum reichen. Uropathogene *E. coli* Stämme nutzen Typ 1 pili zur Bindung an mannosehaltige Zielrezeptoren ihres Wirtes. Auf diese Weise wird eine Infektion des Harntraktes initiiert. Typ 1 pili bestehen aus fünf strukturellen Proteinuntereinheiten die als FimA, FimG, FimF, FimH und FimI bezeichnet werden.

Im assemblierten Pilus interagieren diese Untereinheiten über einen als Donorstrangkompensation bezeichneten Mechanismus. Dabei wird die zunächst unvollständige Faltungsstruktur einer Untereinheit durch einen kurzen N-terminalen Abschnitt einer folgenden Untereinheit, Donorstrang genannt, vervollständigt. Der Komplex zwischen FimGt, einer verkürzten Variante von FimG die keinen eigenen Donorstrang besitzt, und einem 15 Aminosäuren langen Peptid das dem N-terminalen Donorstrang der benachbarten Untereinheit FimF entspricht (DsF) wurde als kinetisch bislang stabilster Protein-Ligand-Komplex identifiziert. Die extrapolierte Geschwindigkeitskonstante der spontanen Entfaltung/Dissoziation dieses Komplexes beträgt unter physiologischen Bedingungen  $6.5 \cdot 10^{-18} \text{ s}^{-1}$  (Puorger et al. 2008). Ausgehend von dieser außergewöhnlichen kinetischen Stabilität war es das Ziel der vorliegenden Arbeit das FimGt/DsF System für technische Anwendungen, insbesondere zur Aufreinigung heterooligomerer Proteinkomplexe mittels Affinitätschromatographie, nutzbar zu machen.

Dazu musste zunächst die Herstellung von großen Mengen FimGt etabliert werden was durch Expression des Proteins in Form sogenannter Einschlusskörper im Zytoplasma von *E. coli* gelang. Nach Rückfaltung und Reinigung konnte natives FimGt mit einer Ausbeute von 35 mg pro Liter Bakterienkultur gewonnen werden. Die Messung von Bindungskinetiken zwischen FimGt und dem freien DsF Peptid ergab eine Geschwindigkeitskonstante der Assoziation von  $330 \pm 8.9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bei pH 8.0 und 25 °C. Dies ermöglichte die Berechnung der Dissoziationskonstante  $K_D$  des FimGt/DsF-Komplexes zu  $(2.0 \pm 1.8) \cdot 10^{-20} \text{ M}$  und die der Bindungsenergie zu  $-112 \pm 2 \text{ kJ/mol}$ .

Die kinetische Stabilität von FimGt wurde bestimmt durch Messung der Geschwindigkeitskonstanten der spontanen Rückfaltung,  $k_f = 0.16 \pm 0.010 \text{ s}^{-1}$ , beziehungsweise der spontanen Entfaltung  $k_u = (9.1 \pm 0.57) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ . Ein Vergleich der Geschwindigkeitskonstante der Entfaltung von freiem FimGt zu der des FimGt/DsF-Komplexes ergab, dass die Bindung des DsF Peptids an FimGt die Halbwertszeit der spontanen Entfaltung des Proteins um 14 Größenordnungen erhöht. Um das FimGt/DsF System für Affinitätschromatographie nutzen zu können, wurde FimGt kovalent an voraktivierte Sepharose gekoppelt und auf diese Weise FimGt-Sepharose hergestellt. Die dynamische Bindungskapazität wurde mittels gereinigtem, DsF-getaggen DsbA von *E. coli* (22.9 kDa) zu 220 nmol oder 5 mg DsbA pro Milliliter FimGt-Sepharose bestimmt. Die erfolgreiche Anwendung des Systems in der Affinitätschromatographie konnte durch Reinigung von holo-Tryptophan Synthase aus *E. coli*, einem heterotetrameren  $\alpha\beta\alpha$ -Komplex, unter Verwendung einer DsF-getaggen  $\alpha$ -Untereinheit gezeigt werden. Das Experiment wurde mit His<sub>6</sub>-, FLAG-, StrepII- und myc-getaggtter  $\alpha$ -Untereinheit wiederholt und die Ergebnisse aller Affinitätstags verglichen. Nur der DsF- und myc-tag lieferten Tryptophan Synthase mit einer Reinheit von mehr als 90 %. Da die mit dem DsF-tag erzielte Ausbeute 100fach höher war als die des myc-tags war der DsF-tag den anderen Affinitätstags überlegen. Auf analoge Art und Weise wurde das FimGt/DsF System zur Reinigung intakter 70 S Ribosomen aus *E. coli* verwendet. Dazu wurde die DsF-getaggte ribosomale Proteinuntereinheit L23 genutzt. Die so erhaltenen Ribosomen waren bezüglich ihrer Protein- und rRNA-Zusammensetzung sowie ihrer Morphologie von Ribosomen, die mit Standard-Dichtegradientenzentrifugation gereinigt worden waren, nicht zu unterscheiden.

Freies FimGt bildete spontan kurze, flexible, amyloid-ähnliche Fibrillen mit einem ungefähren Durchmesser von 7 nm und einer Länge von 30 bis 100 nm aus. Unterschiede in den Fluoreszenz- und fern-UV CD-Spektren von freiem beziehungsweise fibrillären FimGt zeigten, dass die Fibrillierung von einer markanten Konformationsänderung des Proteins begleitet wurde.

In einem zweiten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass Typ 1 pili, nach Inkubation in einem Magnetfeld von 9.4 T und bei Konzentrationen von mehr als 120 mg/ml, einen Flüssigkristall bilden. Dies ermöglichte die Aufnahme eines Röntgenbeugungsmusters von Typ 1 pili mit einer ungefähren Auflösung von 3 Å in

Richtung des Meridians und  $4 \text{ \AA}$  in Richtung des Äquators. Die Ausbildung eines Flüssigkristalls durch Typ 1 pili legte ihre prinzipielle Anwendung zur Messung von sogenannten residual dipolar couplings in der NMR Spektroskopie nahe.