

# Kolloidale Eigenschaften des humanen Transferrinrezeptors

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorgrades  
des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Jens Schüler

Berlin 1999

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und nur die in der Arbeit genannten Hilfsmittel verwendet habe.

1. Gutachten: Prof. Dr. W. Saenger
2. Gutachten: Prof. Dr. M. Schäfer-Korting

Datum der Disputation: 01. 03. 2000

# Inhalt

<b>Abstract</b>	<b>3</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1 Die zelluläre Eisenaufnahme bei Vertebraten	5
1.2 Struktur und Bindungsverhalten des hTfR	7
1.3 Zielsetzung der Studie	8
<b>2. Materialien und Methoden</b>	<b>11</b>
2.1 Lichtstreuung	11
2.1.1 Die statische Lichtstreuung	12
2.1.2 Die Photonenkorrelationspektroskopie	14
2.1.3 Experimentelle Durchführung	16
2.2 Fluoreszenz und Fluoreszenzkorrelationspektroskopie	19
2.2.1 Theorie der Fluoreszenzkorrelationspektroskopie	21
2.2.2 Experimentelle Durchführung	23
2.3 Kalorimetrie	26
2.3.1 Differenz Scanning Kalorimetrie	27
2.3.2 Differenz-Titrations-Kalorimetrie	29
2.4 Analytische Ultrazentrifugation	31
2.4.1 Experimentelle Durchführung	32
2.5 Circular dichroismus (CD)	34
2.5.1 Experimentelle Durchführung	36
2.6 Proteinreinigung und Probenvorbereitung	37
2.6.1 Reinigung des Transferrinrezeptors	37
2.6.2 Probenvorbereitung	40
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>43</b>
3.1 Kolloidale Eigenschaften	43
3.2 Aggregationsverhalten	46
3.3 Rezeptor-Ligand Wechselwirkungen	58

<b>4. Diskussion</b>	<b>67</b>
4.1 Kolloidale Eigenschaften	67
4.2 Aggregation	69
4.3 Rezeptor-Ligand Wechselwirkungen	78
4.4 Zusammenfassung und Ausblick	82
<b>5. Literaturverzeichnis</b>	<b>85</b>
<b>Abkürzungen</b>	<b>89</b>
<b>Danksagung</b>	<b>90</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>91</b>

# Abstract

The colloidal properties of human transferrin receptor in detergent free solution have been investigated by light scattering techniques and ultracentrifugation. At 293.2 K, hTfR forms stable and well defined aggregates with an apparent hydrodynamic radius of 17 nm. The molecular weight of these particles was determined by ultracentrifugation to be between  $(1722 \pm 87)$  kD (sedimentation equilibrium) and  $(1675 \pm 46)$  kD (sedimentation velocity). This implies that the particles are built up from nine hTfR dimers. Based on model calculations, which are in good agreement with the experimental data, a torus-like structure for the particles is proposed. Upon pH shift from pH 7.5 to 5.0 or removal of the N-linked carbohydrate chains, formation of larger aggregates is induced, which can be described in terms of porous fractal structures. A simple model is given on the foundation of basic DLVO theory, which accounts for this behavior assuming that the aggregation upon pH shift or deglycosylation is mainly due to the reduction of negative surface charge.

The thermal stability of transferrin receptor in detergent free solution has been investigated by static light scattering and photon correlation spectroscopy. When rising the temperature above 293.2 K, the 17 nm hTfR particles become more compact, and at 340.2 K a phase transition takes place and spontaneous aggregation of the receptor occurs. Under these conditions large clusters are formed which assemble to fractal aggregates and coexist with dendritic crystalline structures. The experimental findings are compatible with a model, which involves a reaction limited cluster-cluster aggregation mechanism in conjunction with a nucleation process. The molar enthalpy change associated with the phase transition was determined to be  $(1860 \pm 150)$  kJ mol<sup>-1</sup> at a transition temperature of  $(341.3 \pm 0.2)$  K.

The interaction dynamics of fluorescence labeled transferrin with the 17 nm hTfR particles were studied using fluorescence correlation spectroscopy. The dissociation constant for the equilibrium binding of Tetramethylrhodamine labeled ferri-transferrin to hTfR in detergent free solution was determined to be  $(7 \pm 3)$  nM. Binding curves were compatible with equal and independent binding sites present on the hTfR particles. Under pseudo first order conditions with respect to transferrin, complex formation is monophasic. From these curves, association and dissociation rate constants for a reversible bimolecular binding reaction were determined, with  $(1.1 \pm 0.1) 10^4$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> for the former and  $(6 \pm 4) 10^{-4}$  s<sup>-1</sup> for the latter. In dissociation exchange experiments, biphasic curves and concentration independent reciprocal relaxation times were found. From iso-thermal titration calorimetry experiments we obtained an enthalpy change of  $-44.4$  kJ mol<sup>-1</sup> for this reaction.

# Abkürzungen

AKF	Autokorrelationsfunktion
β-DM	Decyl-β-D-Maltosid
BODIPY-FL	N-(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-propionyl)-N'-iodoacetylenylendiamin
C12E8	Octaethylenglycolmonododecylether
CD	Circulardichroismus
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
DLCA	Diffusions limitierte kolloidale Aggregation
DSC	Differential Scanning Kalorimetrie
DTC	Differential Titrations Kalorimetrie
FCS	Fluoreszenz Korrelations Spektroskopie
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethanesulfonsäure
(h)TfR	(Humaner) Transferrin Rezeptor
LDAO	Lauryldimethylamino-N-oxid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
PNGase F	Peptid-N <sup>4</sup> -(N-acetyl-β-glukosaminyl)asparagin-Amidase aus <i>Flavobacterium meningosepticum</i>
RLCA	Reaktions limitierte kolloidale Aggregation
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tf	Transferrin
TMR-Tf	TMR markiertes Transferrin
TMR	Tetramethylrhodamin

# Danksagung

Ohne die tatkräftige Mithilfe zahlreicher Personen, wäre die hier vorgelegte Arbeit nicht möglich gewesen. Insbesondere bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wolfram Saenger und Herrn Dr. Yannis Georgalis, Institut für Kristallographie, FU Berlin, sowie bei Herrn Dr. Joachim Frank, Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft, dafür, daß sie mich jederzeit mit Rat und Tat unterstützt haben, und für die gute Zusammenarbeit während der letzten Jahre.

Ebenso bedanke ich mich bei:

Herrn Prof. Dr. Joachim Behlke, Max-Delbrück-Zentrum, Berlin-Buch, für die Durchführung der Ultrazentrifugationsexperimente.

Frau Dr. Ulrike Trier und Frau Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting, Institut für Pharmazie II, FU Berlin, für ihre Unterstützung bezüglich der FCS Messungen.

Herrn Prof. Dr. Josef F. Holzwarth, Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft, für die Möglichkeit die kalorimetrischen Messungen durchführen zu können.

Herrn Dr. Ronald Clarke, Universität Sidney, für seine Hilfe bei der Aufstellung der Reaktionsmechanismen für die Tf-hTfR Komplexbildung.

Schließlich bedanke ich mich noch bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Kreißsaals, Frauen- und Polyklinik, Charité, Campus Virchow Klinikum für ihre Mithilfe bei der Bereitstellung der Plazenten und die freundliche Unterstützung während des Projekts.

# Lebenslauf

Name: Jens Schüler  
Wohnort: Elsterstr. 7, 12055 Berlin  
geboren: 03.02.1967 in Haiger, Lahn-Dill-Kreis, Hessen  
Eltern: Marianne und Walter Schüler

## Schulausbildung:

August 1973 - Juni 1977 Grundschole Rodenbach  
August 1977 - Juni 1986 Wilhelm-von-Oranien Schule in Dillenburg  
06.06.1986 Abitur an der Wilhelm-von-Oranien Schule

01.09.1986 - 01.05.1988 Zivildienst

## Studium:

April 1988 - Oktober 1990 Grundstudium im Fach Biochemie, FU Berlin  
11.10.1990 Vordiplom in Biochemie, FU Berlin  
Oktober 1990 - Juni 1992 Hauptstudium Biochemie, FU Berlin  
01.07.1992 - 23.12.1992 Diplomarbeit am Institut für Kristallographie der FU Berlin, AG Saenger  
23.12.1992 Diplom in Biochemie, FU Berlin  
Seit 1. 10. 1998 Aufbaustudium European Management (MBA), FHW Berlin und Southbank University, London

## Berufstätigkeit

01.04.1993 - 30.09.1994 Beschäftigung als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Kristallographie sowie als Assistent im Praktikum „Chemie für Mediziner“  
01.12.1994 - 31.03.1998 Beschäftigung am Virchow Klinikum der Charité, als wissenschaftlicher Mitarbeiter im SFB 273



## Veröffentlichungen

J. Schüler, J. Frank, U. Trier, M. Schäfer-Korting und W. Saenger: *Interaction kinetics of tetramethylrhodamine transferrin with human transferrinreceptor studied by fluorescence correlation spectrometry* (1999) *Biochemistry* **38** 8402–8408

J. Schüler, J. Frank, W. Saenger und Y. Georgalis: *Thermally induced aggregation of human transferrin receptor studied by light scattering techniques* (1999) *Biophys. J.* **77** 1117–1125

J. Schüler, J. Frank, J. Behlke, W. Saenger und Y. Georgalis: *Colloidal properties of human transferrin receptor in detergent free solution*, *Biochim. Biophys. Acta*, eingereicht

J. Schüler, A. Makki und A. Jordan: *Temperature dependence of cell adhesion*, in Vorbereitung

Y. Georgalis, J. Schüler, W. Eberstein und W. Saenger: *Time-resolved light scattering studies on protein precrystallization fractal clusters* (1994) in M. M. Novak (Hrsg.) *Fractals in the natural and applied sciences* 139–151 Elsevier, North Holland

Y. Georgalis, J. Schüler, J. Frank, M. D. Soumpasis und W. Saenger: *Protein crystallization screening through scattering techniques* (1995) *Adv. Coll. Interf. Sci.* **58** 57–86

Y. Georgalis, J. Schüler, P. Umbach und W. Saenger: *Light-Scattering Studies on the thermally induced crystallization transition of  $\beta$ -cyclodextrin* (1995) *J. Am. Chem. Soc.* **117** 9314–9322

A. Jordan, R. Scholz, J. Schüler, P. Wust und R. Felix: *Arrhenius analysis of the thermal response of human colonic adenocarcinoma cells in vitro using the multi-target, single-hit and the linear-quadratic model* (1997) *Int. J. Hyperthermia* **13** 83–88

P. Koch, J. Frank, J. Schüler, C. Kahle und H. Bradazcek: *Thermodynamics and structural studies of the interaction of polymyxin B with deep rough mutant lipopolysaccharides* (1999) *J. Coll. Interf. Sci.* **213** 557–564