

2 Materialien und Methoden

2.1 Lichtstreuung

Wenn elektromagnetische Strahlung auf Materie trifft, wird diese durch das periodische elektrische Feld polarisiert. Die lokal beschleunigten Ladungen strahlen ein Streufeld mit Dipolstrahlungscharakteristik ab. Es lassen sich hierbei im Wesentlichen drei Arten von Streuprozessen unterscheiden.

Bei der elastischen bzw. statischen Lichtstreuung besitzt die Streustrahlung die gleiche Frequenz wie die Anregungsstrahlung. Wenn die Größe der Streuzentren klein gegenüber der Anregungswellenlänge ist, spricht man von Rayleigh- ansonsten von Mie - Streuung. Als Meßgröße in einem statischen Lichtstreuexperiment dient die zeitlich gemittelte Streuintensität in Abhängigkeit vom Streuwinkel. Hieraus lassen sich Informationen über die statischen Eigenschaften der Probe wie das Molekulargewicht, den Gyrationradius und die Partikelgeometrie gewinnen.

Der quasi-elastischen bzw. dynamischen Lichtstreuung liegt die Beobachtung zugrunde, daß das Spektrum des Streulichts leichte Änderungen gegenüber dem des Anregungslichts aufweist. Es handelt sich hierbei um eine Abweichung vom ideal elastischen Verhalten der Wechselwirkung zwischen Licht und Materie. Die beobachtbaren Abweichungen sind jedoch so gering, daß für die praktische Durchführung der Messungen das monochromatische Licht eines Lasers verwendet werden muß. Die Frequenzverschiebungen beruhen auf einer Doppler-Verschiebung der Frequenz des Streulichts, welche durch die thermische Bewegung der Teilchen in einer Suspension hervorgerufen wird. Hierbei leisten sowohl Translations - als auch Rotationsbewegungen einen Beitrag.

Kommt es durch die einfallende Strahlung zur Anregung von Molekülschwingungen, spricht man von inelastischer oder Raman - Streuung. Die Frequenz des Streulichts unterscheidet sich deutlich von der des Anregungslichts.

Im folgenden wird die Theorie der statischen und der dynamischen Lichtstreuung kurz umrissen. Detaillierte Darstellungen finden sich bei Berne und Pecora (1974), Schmitz (1990) und Brown (1993). Die technischen Aspekte sind bei Chu (1991) dargestellt.

2.1.1 Die statische Lichtstreuung

Eine zentrale Größe zur Beschreibung eines Streuexperimentes stellt der Streuvektor, \mathbf{q} , dar. Die grundsätzliche Geometrie ist in Abbildung 2-1 dargestellt. Der einfallende Lichtstrahl bewegt sich längs des Vektors \mathbf{k}_0 . Der Strahl wird im Winkel θ gestreut

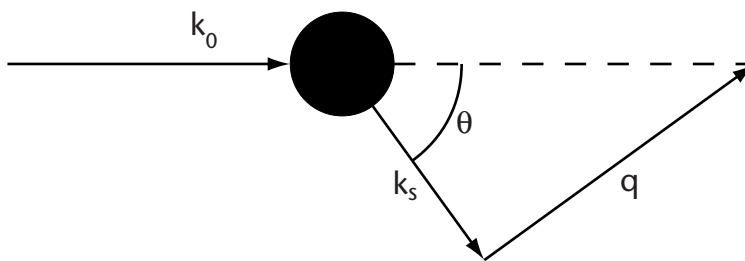


Abb. 2-1 Prinzipielle Geometrie eines Streuvorgangs. Der Streuvektor, \mathbf{q} , ergibt sich als Differenz aus den Vektoren \mathbf{k}_0 und \mathbf{k}_s .

und pflanzt sich entlang des Vektors \mathbf{k}_s fort. Der Differenzvektor aus beiden, \mathbf{q} , wird als Streuvektor bezeichnet und stellt ein Maß für die erreichbare strukturelle Auflösung dar. Durch den Wert des reziproken Streuvektors wird ein virtuelles Raumgitter definiert, wobei jedoch nur wenige Gitterpunkte mit Streuzentren besetzt sind. Darüberhinaus ändert sich, auf Grund der thermischen Bewegung der Streuzentren, der Besetzungszustand jedes Gitterpunktes mit der Zeit.

Der Streuvektor hängt von der Wellenlänge des verwendeten Lichts, λ , vom Streuwinkel, θ , sowie vom Brechungsindex der Lösung, n , ab. Für seinen Betrag gilt:

Der Streuvektor hängt von der Wellenlänge des verwendeten Lichts, λ , vom Streuwinkel, θ , sowie vom Brechungsindex der Lösung, n , ab. Für seinen Betrag gilt:

$$|\mathbf{q}| = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin(\theta/2) \quad (1)$$

Durch Änderung des Streuwinkels oder der Wellenlänge läßt sich also der Streuvektor beeinflussen und somit eine Längenskala für das Experiment festlegen.

Die Intensität der Streustrahlung hängt von der Wellenlänge der einfallenden Strahlung, der Polarisierbarkeit der suspendierten Partikel, dem Abstand, r , zwischen Streuzentrum und Detektor sowie dem Streuwinkel ab. Die Polarisierbarkeit ist experimentell nur schwer zugänglich, daher wird sie gemäß der Clausius–Mosotti Gleichung durch den Brechungsindex ersetzt. Damit ergibt sich für die Streuintensität pro Volumeneinheit, i_s , im Fall eines isolierten Streuzentrums folgender Ausdruck:

$$i_s = I_0 \frac{2\pi^2 n_0^2 M c (\cos^2 \theta + 1)}{r^2 \lambda^4 N_A} \left(\frac{\partial n}{\partial c} \right)^2 \quad (2)$$

n_0 bezeichnet hier den Brechungsindex des Lösungsmittels, c die Konzentration der suspendierten Substanz, M deren Molekulargewicht und N_A die Avogadrokonstante. I_0 ist die Intensität des eingestrahlt Lichts. Die partielle Ableitung des Brechungsindex der Lösung, n , nach der Konzentration des gelösten Stoffes, c , wird als Bre-

chungsindexinkrement bezeichnet, das in einem unabhängigen Versuch z.B. refraktometrisch bestimmt werden muß. In der Praxis ermittelt man häufig lediglich das Rayleigh – Verhältnis, R_θ , welches als das Verhältnis zwischen eingestrahelter und gestreuter Intensität definiert ist:

$$R_\theta = \frac{i_s r^2}{I_0(\cos^2\theta + 1)} = KcM \text{ mit } K = \frac{2\pi^2}{N_A \lambda^4} n_0^2 \left(\frac{\partial n}{\partial c}\right)^2 \quad (3)$$

In konzentrierten Lösungen müssen auch die Wechselwirkungen zwischen den Molekülen berücksichtigt werden. Dies kann durch Einführung des zweiten Virialkoeffizienten, welcher die scheinbare Konzentrationsabhängigkeit des Molekulargewichts beschreibt, in Gleichung 3 erfolgen.

Bei Makromolekülen, die mehrere Streuzentren beinhalten, kann es je nach Größe zu Interferenzen der an verschiedenen Streuzentren gestreuten Strahlung kommen, welche zu einer Abschwächung der Streuintensität in Abhängigkeit vom Streuvektor führen. Dieser Effekt kann durch Einführung des statischen Struktur factors, $S(q, R_G)$, berücksichtigt werden. Der statische Struktur faktor ist eine Funktion des Streuvektors sowie des Gyrationradius, R_G , der streuenden Teilchen. Er beschreibt also den Einfluß der Teilchenstruktur auf die Streuintensität. Der Einfluß des statischen Struktur factors auf die Streuintensität hängt sowohl von der Größe des Teilchens als auch vom Betrag des Streuvektors ab. Wenn q gegen 0 geht oder R_G sehr viel kleiner als die Lichtwellenlänge ist, nimmt der statische Struktur faktor einen Wert von 1 an und die Streuintensität ergibt sich aus Gleichung 2.

Bei der Untersuchung von Teilchen, deren Struktur mit Hilfe der fraktalen Geometrie beschrieben werden, können die fraktalen Dimensionen direkt mit Hilfe der statischen Lichtstreuung bestimmt werden. Voraussetzung ist hierfür, daß die Größe der Teilchen in einem bestimmten Verhältnis zum Streuvektor steht. Ein Aggregat mit dem Radius R besteht aus kugelförmigen Monomeren mit Radius r_0 . Wenn gilt:

$$\frac{1}{R} \ll |q| \ll \frac{1}{r_0} \quad (4)$$

kann die Abhängigkeit des zeitlichen Mittelwerts der Streuintensität vom Streuvektor, $\langle I(q) \rangle$, durch ein Potenzgesetz beschrieben werden. Es gilt dann:

$$\langle I(q) \rangle \propto S(q)P_0(q) \propto q^p \text{ mit } P_0 = \frac{9}{(qr_0)^6} (\sin qr_0 - qr_0 \cos qr_0)^2 \quad (5)$$

P_0 bezeichnet den Formfaktor der, bei kugelförmig angenommenen Monomeren, nach der Rayleigh–Gans–Debye Näherung berechnet wird (Kerker, 1969). Der charakteristische Exponent, p , ist mit der massen- bzw. oberflächenfraktalen Dimension, d_m bzw. d_s , über folgende Beziehung verknüpft (Martin, 1986; Schaefer et al., 1989):

$$p = -2d_m + d_s \quad (6)$$

Beide Größen beschreiben die Struktur eines Teilchens auf unterschiedlichen Skalenniveaus. Die massenfraktale Dimension erfaßt die Anordnung der Monomere in einem Aggregat, während die oberflächenfraktale Dimension die Rauigkeit der Aggregatoberfläche beschreibt. Ein Körper mit homogener Massenverteilung besitzt eine massenfraktale Dimension von 3, eine völlig glatte Oberfläche wird durch eine oberflächenfraktale Dimension von 2 beschrieben. Ein Teilchen, das beide Grenzbedingungen erfüllt, hätte also einen charakteristischen Exponenten von -4 . Es ist nicht möglich, beide Dimensionen gleichzeitig nebeneinander zu bestimmen. Welche von beiden betrachtet werden kann, hängt vom Verhältnis zwischen Partikelradius und Streuvektor ab.

2.1.2 Die Photonenkorrelations-spektroskopie

Der dynamischen Lichtstreuung oder Photonenkorrelationspektroskopie (PCS) liegt die Beobachtung zugrunde, daß das von einer Probe gestreute Licht eine Linienverbreiterung gegenüber dem eingestrahlt Licht aufweist. Der Grund hierfür liegt in der thermischen Eigenbewegung der Partikel in einer kolloidalen Lösung. Die Partikel bewegen sich relativ zum einfallenden Licht, was aufgrund des Doppler Effekts zu einer Frequenzverschiebung des Streulichts führt. Dieser Effekt ist sehr gering, so daß er mit herkömmlichen interferometrischen Methoden nur schwer meßbar ist. Diese Schwierigkeiten können umgangen werden, indem nicht die Linienverbreiterung, sondern die zeitlichen Fluktuationen der Streuintensität gemessen werden. Diese Fluktuationen lassen sich mit Hilfe einer Autokorrelationsfunktion (AKF) auswerten.

Autokorrelationsfunktionen können zur Charakterisierung von stochastischen Prozessen verwendet werden. Die AKF ist ein Maß dafür, wie die Werte einer Funktion zu einem gegebenen Zeitpunkt mit den Werten der gleichen Funktion zu einem späteren Zeitpunkt über den gesamten Funktionsverlauf korrelieren.

Die fluktuierende Größe in einem PCS Experiment ist die Feldstärke der Streustrahlung, die sich aus den Streuteilen der einzelnen Streuzentren zusammensetzt. Nach dem Wiener-Khintchine Theorem ist die Fouriertransformation der Feldautokorrelationsfunktion gleich dem Frequenzspektrum.

In der Praxis wird jedoch nicht die zeitliche Fluktuation der Feldstärke, sondern die der Intensität gemessen. Somit ergeben sich zwei Autokorrelationsfunktionen, die Feldautokorrelationsfunktionen, $G^{(1)}(\tau)$ und die Intensitätsautokorrelationsfunktion, $G^{(2)}(\tau)$, welche für die PCS von besonderem Interesse sind:

$$G^{(1)}(\tau) = \langle E^*(0)E(\tau) \rangle \text{ und } G^{(2)}(\tau) = \langle I^*(0)I(\tau) \rangle \quad (7)$$

E bezeichnet hier die Feldstärke und I die Intensität. Da die absolute Intensität nicht von Interesse ist und nur ihre zeitlichen Schwankungen ausgewertet werden, kann man zum Zwecke der besseren Vergleichbarkeit beide Autokorrelationsfunktionen normieren:

$$g^{(1)}(\tau) = \frac{\langle E^*(0)E(\tau) \rangle}{\langle |E|^2 \rangle} \text{ und } g^{(2)}(\tau) = \frac{\langle I(0)I(\tau) \rangle}{\langle I^2 \rangle} \quad (8)$$

gemäß der Siegert – Relation sind beide Autokorrelationsfunktionen proportional:

$$g^{(2)}(\tau) = B[1 + f(A)|g^{(1)}(\tau)|^2] \quad (9)$$

B bezeichnet einen konstanten Hintergrund und $f(A)$ einen von den apparativen Bedingungen abhängigen Kohärenzfaktor. Im einfachsten Fall einer monomodalen und monodispersen Partikelverteilung fällt die Intensitätsautokorrelationsfunktion exponentiell mit der Zeit ab. Die Zeitkonstante dieser Exponentialfunktion ist umgekehrt proportional zum Diffusionskoeffizienten der streuenden Partikel. In polymodalen Systemen ergibt sich jedoch zumeist eine Überlagerung von Exponentialfunktionen, deren Zeitkonstanten und Wichtungsfaktoren proportional zu dem von jeder Partikelspezies gestreuten Licht sind. Wenn ein System polydispers ist ergeben sich ebenfalls komplizierte Gleichungen, in denen der relative Anteil jeder Spezies in einem bestimmten Radiusintervall zur Autokorrelationsfunktion beiträgt.

Die Feldautokorrelationsfunktion ist direkt mit dem Diffusionskoeffizienten der betreffenden Teilchen verknüpft. Hierbei gilt für kleine, isotrope Partikel:

$$g^{(1)}(\tau) = e^{-\Gamma_0\tau} \text{ mit } \Gamma_0 = D_T q^2 \quad (10)$$

D_T ist der Translationsdiffusionskoeffizient. Aus diesem kann der hydrodynamische Radius gemäß der Stokes – Einstein Gleichung berechnet werden:

$$D_T = \frac{k_B T}{6\pi\eta R} \quad (11)$$

T ist die absolute Temperatur, k_B die Boltzmannkonstante, η die dynamische Viskosität des Lösungsmittels und R der Partikelradius.

Diese einfache Berechnung ist streng genommen nur für Partikel gültig, deren Radius kleiner als der reziproke Streuvektor, d. h. in der vorliegenden Arbeit kleiner als 167 nm, ist. Wenn das Produkt aus reziprokem Streuvektor und Partikelradius im Bereich von eins liegt, tragen auch andere Prozesse, wie z. B. interne Bewegungen, zum Abfall der Feldautokorrelationsfunktion bei. Unter diesen Umständen kann

eventuell nur ein apparenter Diffusionskoeffizient bestimmt werden. Eine umfassende Beschreibung der Grenzen der PCS finden sich bei Martin und Leyvraz (1986).

Der Diffusionskoeffizient von anisotropen Partikeln besitzt neben dem translatorischen Anteil auch noch eine rotatorische Komponente. Dieser findet sich auch in der Autokorrelationsfunktion und kann dadurch den ermittelten Radius verfälschen. Aus diesem Grund müssen Radiuschätzungen rechnerisch korrigiert werden. Die entsprechenden Verfahren finden sich bei Lindsay et al. (1988, 1989).

2.1.3 Experimentelle Durchführung

Alle PCS Experimente wurden mit einem ALV Spektrogoniometer (ALV, Langen) durchgeführt. Als Lichtquelle diente ein Spectraphysics Argon Ionen Laser mit einer maximalen Leistung von 1,5 W. Die komplette Apparatur ist fest auf einer Granitplatte montiert, welche auf einem Styroporblock liegt. Hierdurch wird sicherge-

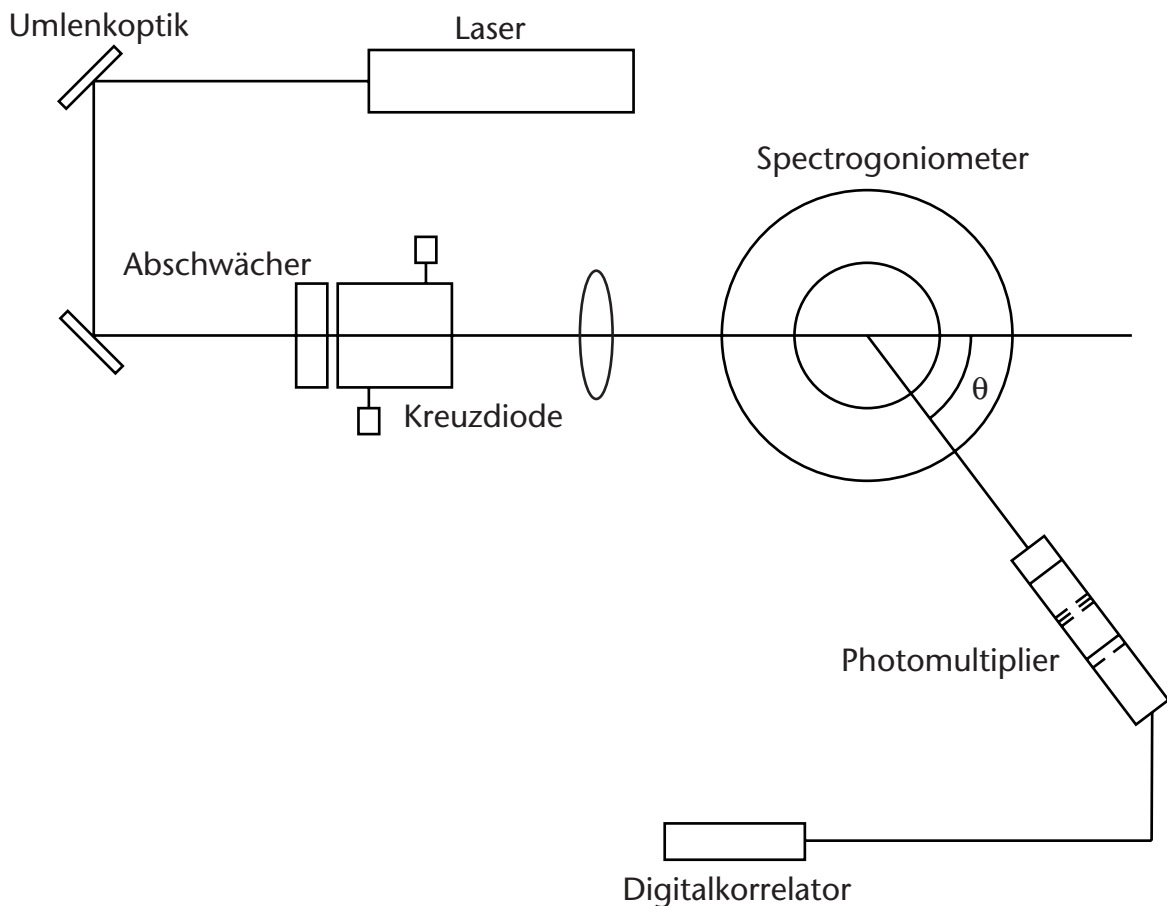


Abb. 2-2 Schematischer Aufbau der verwendeten Lichtstreuapparatur

stellt, daß die Messungen nicht durch Erschütterungen beeinträchtigt werden. Eine schematische Darstellung der Apparatur zeigt Abbildung 2-2.

Die Probenlösung befindet sich in einer Streuzelle aus Quarzglas mit einem Durchmesser von einem Zentimeter, die in ein Toluolbad eingetaucht ist. Hierdurch wird ein kontinuierlicher Übergang der Brechungsindizes von Luft über Toluol zu Glas garantiert. Desweiteren werden kleinere Kratzer in der Glasoberfläche durch das Toluol ausgeglichen.

Staubpartikel in der Probenlösungen verfälschen die gemessenen Autokorrelationsfunktionen bzw. machen diese komplett unbrauchbar. Daher wurden alle Streuzellen vor Beginn der Messungen mit Wasser (Bidest) und Aceton staubfrei gespült und die Probenlösungen durch Filter mit 200 nm bzw. 800 nm Porengröße steril filtriert.

Das Streulicht wurde mit Hilfe eines Thorn EMI D 191 A Photomultipliers aufgenommen, welcher sich auf einem beweglichen Arm befindet und computergesteuert auf jeden beliebigen Winkel zwischen 10° und 150° bewegt werden kann. Der Photomultiplier mißt nicht direkt die Streuintensität, sondern detektiert einzelne Photonen. Hierbei besteht das Problem, daß die Anzahl der detektierten Photonen, genau wie die Intensitätsschwankungen, einer Wahrscheinlichkeitsverteilung unterliegt. Es läßt sich jedoch mathematisch zeigen, daß dieses Vorgehen zulässig ist (Mandel Beziehung).

Die Signale des Photomultipliers werden von einem ALV-5000 Digital Korrelator ausgewertet, der in einem Mikrocomputer installiert ist. Die Autokorrelationsfunktionen werden automatisch mit Hilfe von 302 Kanälen aufgezeichnet, die den gesamten Zeitbereich quasi-logarithmisch abdecken. Dieser Zeitbereich liegt theoretisch zwischen 12,5 ns und 3200 s. In der Praxis liegt die untere Grenze der Korrelationszeiten jedoch bei ca. 100 ns, was durch die Totzeit des Photomultipliers bedingt ist. Die obere Grenze liegt aufgrund der relativ geringen Akkumulationszeiten von 30 s – 60 s bei ca. 0,5 s.

Alle PCS Experimente wurden bei einem Streuwinkel von 20° durchgeführt. Unter Berücksichtigung der Wellenlänge des Laserlichts (488 nm) ergibt sich hiermit ein Streuvektor von $5,96 \cdot 10^{-3} \text{ nm}^{-1}$. Die Akkumulationszeiten betragen entweder 30 s oder 60 s. Die Temperatur wurde mit Hilfe eines Lauda RC6 Thermostats auf $\pm 0,1 \text{ K}$ konstant gehalten. Für die Experimente zur temperaturinduzierten Aggregation wurde der Thermostat von einem programmierbaren Lauda P-351 Gradiententreiber gesteuert. Der Partikelradius wurde mit Hilfe der Stokes – Einstein Gleichung berechnet. Für die dynamische Viskosität wurde der für Wasser bei der jeweiligen Temperatur tabellierte Wert verwendet (CRC Handbook of Chemistry and Physics, 1984 / 1985). Die geringen Unterschiede zwischen Wasser und Puffer wurden vernachlässigt.

Für die Auswertung der Spektren wurde generell das Programm CONTIN benutzt, welches auf einer Silicon Graphics Workstation installiert ist. Die Funktionsweise von CONTIN wird ausführlich bei Provencher (1982a, 1982b) beschrieben. Ein Vergleich mit anderen Auswerteschemata findet sich bei Chu (1991).

Der zentrale Punkt in der Auswertung eines PCS Experiments besteht in der Ermittlung der charakteristischen Relaxationszeit, Γ , aus der Feldautokorrelationsfunktion. Dies erfordert, daß folgende Gleichung für eine experimentell ermittelte Autokorrelationsfunktion, die mit einem zeitabhängigen Rauschen $\varepsilon(\tau)$ behaftet ist, gelöst werden muß:

$$g^{(1)}(\tau) = \int_0^{\infty} \Gamma e^{-\Gamma\tau} d\Gamma + \varepsilon(\tau) + B \quad (12)$$

B stellt einen unbestimmten Summanden für den Hintergrund dar.

Diese Gleichung kann durch eine inverse Laplace Transformation gelöst werden. Hierbei tritt jedoch die Schwierigkeit auf, daß es unendlich viele Lösungen gibt, welche die Gleichung innerhalb des experimentellen Fehlers erfüllen. Daneben sind die Fehler ungebunden, d.h. jede Lösung kann eine willkürlich große Abweichung von der wahren Lösung aufweisen. Es existieren jedoch Methoden, die wahrscheinlichen Lösungen einzugrenzen. Die inverse Laplace Transformation erfolgt dann mit Hilfe zusätzlicher Informationen, die nicht im Experiment enthalten sind.

Entsprechend den experimentellen Bedingungen kann die Integration zunächst in einem begrenzten Frequenzbereich durchgeführt werden. Das Integral läßt sich numerisch lösen, wobei Gleichung 12 in ein lineares Gleichungssystem überführt wird. Das entstehende Gleichungssystem ist im allgemeinen nicht eindeutig lösbar. CONTIN benutzt nun eine Reihe von Strategien, um die beste und physikalisch sinnvollste Lösung zu finden. Hierzu gehört das *principle of parsimony*, welches besagt, daß von zwei gleich guten Lösungen diejenige mit der geringeren Anzahl von Parametern gewählt wird. Daneben werden Regularisierungsparameter eingeführt wie z. B. ein Ausschluß negativer Werte. In der Praxis kann man mit CONTIN normalerweise drei Komponenten in einer Probe auflösen, wobei die Qualität der Lösung erheblich von den Größenunterschieden zwischen den einzelnen Komponenten abhängt.

Bei fraktalen Aggregaten handelt es sich in der Regel um asymmetrische Strukturen, die relativ zur Lichtwellenlänge groß sind. Daher enthalten die Autokorrelationsfunktionen, wie oben bereits erwähnt, auch Anteile die auf Rotationsdiffusion zurückgeführt werden können. Der Rotationsanteil muß also vor einer Bestimmung des Partikelradius abgekoppelt werden. Für ein solches System lautet die normierte Feldautokorrelationsfunktion:

$$g^{(1)}(\tau) = \frac{\sum N(M)M^2 e^{-q^2 D_T(M)\tau} \sum S_l(qR_G) e^{-l(l+1)D_R(M)\tau}}{\sum N(M)M^2 (S_l(qR_G))} \quad \text{mit } D_R(M) = \frac{k_B T}{8\pi\eta R^3(M)} \quad (13)$$

Der translatorische und rotatorische Diffusionskoeffizient jeder Spezies M wird mit $D_T(M)$ bzw. $D_R(M)$ bezeichnet. N und R_G stehen für Anzahl und Gyrationradius jeder Spezies M . Den Gewichtungsfaktor $S_l(qR_G)$ erhält man durch eine Multipolentwicklung des statischen Strukturfaktors. Diese Reihe wurde bis zum siebten Term durch Computersimulationen bestimmt (Lindsay et al., 1988, 1989). Mit diesem Ergebnis kann Gleichung 13 umformuliert werden, wobei ein effektiver Diffusionskoeffizient, D_{eff} , eingeführt wird:

$$g^{(1)}(\tau) = \frac{\sum N(M)M^2 e^{-q^2 D_{eff}(M)\tau} S(qR_G)}{\sum N(M)M^2 S(qR_G)} \quad \text{mit } D_{eff} = D_T(M)f(qR_G) \quad (14)$$

Alle Rotationsanteile sind nun in einer berechenbaren Funktion enthalten, welche nur noch von q und R_G abhängt. Mit ihrer Hilfe läßt sich dann D_T berechnen (Georgalis et al., 1995).

Die statischen Lichtstreuexperimente und die PCS Messungen wurden mit Hilfe desselben Spektrogoniometers durchgeführt. Die Streulichtintensitäten wurden zwischen 20° und 150° , jeweils in $2,5^\circ$ Schritten, aufgenommen. Dies entspricht einem Streuvektorbereich von $5,96 \times 10^{-3} \text{ nm}^{-1}$ bis $3,32 \times 10^{-3} \text{ nm}^{-1}$.

Die Streuintensitäten wurden jeweils zu Beginn für 15 s akkumuliert. Die Akkumulationszeit wurde jeweils mit einem Faktor $\sin(\theta)$ multipliziert, um die Änderung des Streuvolumens mit dem Streuwinkel zu kompensieren. Jede Messung wurde insgesamt fünfmal wiederholt und die jeweiligen Streuintensitäten gemittelt. Zur Auswertung wurde die Streuintensität in Abhängigkeit vom Streuvektor doppelt-logarithmisch aufgetragen und der charakteristische Exponent, p , aus der Steigung der Ausgleichsgeraden bestimmt.

2.2 Fluoreszenz und Fluoreszenzkorrelationspektroskopie

Die Verwendung von Fluoreszenz stellt eine empfindliche und hochspezifische Möglichkeit dar, bestimmte Moleküle in einer Lösung zu identifizieren und quantitativ zu bestimmen. Bei dieser Methode absorbiert ein Fluorophor ein Lichtquant einer bestimmten Wellenlänge und wird in einen angeregten, d.h. energiereicheren Zustand überführt. Dieser angeregte Zustand besitzt nur eine begrenzte Lebensdauer

er. Die Rückkehr in den elektronischen Grundzustand unter Aussendung von Licht wird als Lumineszenz bezeichnet, welche wiederum in Fluoreszenz und Phosphoreszenz unterteilt wird. Die Fluoreszenz zeigt gegenüber der Phosphoreszenz eine wesentlich kürzere Lebensdauer des angeregten Zustandes. Neben der Lichtemission kommt es auch zu strahlungslosen Deaktivierungsprozessen, die mit dieser konkurrieren. Die strahlungslose Deaktivierung wird auch als innere Umwandlung oder internal conversion bezeichnet. Hierzu kommt es beispielsweise, wenn sich die Energie des angeregten Zustandes durch thermische Stöße auf andere Moleküle verteilt.

Die meisten Fluorophore sind aromatische Moleküle mit zwei oder mehreren kondensierten Ringen. Im Grundzustand eines solchen Moleküls mit gerader Elektronenzahl sind die π -Orbitale in der Regel paarweise mit Elektronen besetzt, deren Spins nach dem Pauli-Prinzip antiparallel ausgerichtet sind. Der Gesamtspin, S , ist dann gleich null. Der entsprechende Energiezustand wird entsprechend seiner Multiplizität, $M = 2S + 1$, als Singulettzustand bezeichnet. Nach dem Übergang eines Elektrons in ein angeregtes π^* -Orbital können die Elektronenspins parallel oder antiparallel orientiert sein. Hierdurch entstehen Singulett- ($S = 0$) und Triplettzustände ($S = 1$), welche unterschiedliche Energie aufweisen. Hierbei liegt die Energie des niedrigsten Triplettzustands unter der des angeregten Singulettzustands. Der Übergang zwischen Singulett- und Triplettzustand, das sogenannte intersystem crossing, ist quantenmechanisch verboten, d.h. relativ unwahrscheinlich. Falls er doch stattfindet besitzt der Triplettzustand eine relativ lange Lebensdauer (10^{-4} s – 1 s), da der Übergang in den Singulettgrundzustand eine erneute Spinumkehr erfordert. Die Lichtemission aus dem niedrigsten Triplettzustand wird als Phosphoreszenz bezeichnet.

Lichtemission aus dem Singulettzustand wird als Fluoreszenz bezeichnet. Diese erfolgt in der Regel aus dem niedrigsten angeregten Singulettzustand, somit ist das Fluoreszenzspektrum in diesen Fällen unabhängig von der Anregungswellenlänge. Der Übergang aus höheren angeregten Singulettzuständen in den niedrigsten angeregten Zustand erfolgt dann strahlungslos. Dies liegt daran, daß die Energiedifferenzen zwischen den höheren Singulettzuständen relativ gering sind. Der strahlungslose Übergang ist schneller als die Emission von Licht und daher unter diesen Umständen begünstigt. Im Gegensatz hierzu ist die Energiedifferenz zwischen dem niedrigsten angeregten und dem Grundzustand für eine strahlungslose Deaktivierung meist zu groß und es kommt zu einer Lichtemission. Die Lebensdauer des niedrigsten angeregten Zustands liegt in der Regel zwischen 10^{-9} s und 10^{-7} s. Die hier beschriebenen Vorgänge lassen sich in einem Termschema gemäß Abbildung 2-3 graphisch darstellen.

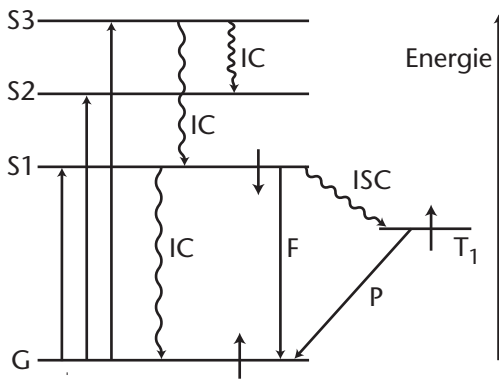


Abb. 2-3 Termschema. Ein Elektron wird vom Grundzustand G auf einen angeregten Singulettzustand S1, S2 ... überführt. Die Deaktivierung erfolgt strahlungslos (internal conversion, IC) zum tiefsten angeregten Singulettzustand und von diesem entweder durch Fluoreszenz (F) oder strahlungslos in den Grundzustand. Durch intersystem crossing (ISC) können sich Triplettzustände (T1) bilden, die durch Phosphoreszenz (P) in den Grundzustand zurückkehren.

2.2.1 Theorie der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

Normalerweise wird die Fluoreszenz gemessen, indem das Anregungslicht in ein hinreichend großes Probenvolumen eingestrahlt wird. Die Fluoreszenz wird dann durch ein entsprechendes optisches System von gestreutem Anregungslicht und anderem Hintergrundlicht getrennt. Alle Methoden, bei denen eine durchschnittliche Fluoreszenzintensität gemessen wird, haben den Nachteil, daß die erreichbare Auflösung durch das Hintergrundlicht begrenzt wird. Daher ist es in der Praxis schwierig mit Konzentrationen unter 10^{-9} M zu arbeiten. Dies ist insbesondere problematisch, wenn nur geringe Substanzmengen zur Verfügung stehen oder eine zu untersuchende Reaktion so schnell abläuft, daß sie in einem entsprechenden Konzentrationsbereich nicht verfolgt werden kann.

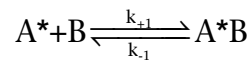
Diese Schwierigkeiten können experimentell umgangen werden, indem das Probenvolumen und damit die Anzahl der betrachteten Moleküle so klein wie möglich gemacht wird. Dieser Ansatz wird bei der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) verfolgt. Im folgenden wird die Theorie der FCS kurz vorgestellt. Die Darstellung stützt sich hierbei im wesentlichen auf Benutzerinformationen des Herstellers der FCS Apparatur (EVOTEC GmbH, 1995). Eine ausführliche Beschreibung der theoretischen Zusammenhänge findet sich bei Elson und Magde (1974) und Magde et al. (1974, 1978). Die technische Realisierung sowie Anwendungen werden von Eigen und Rigler (1994), Rigler et al. (1993) und Rigler (1995) vorgestellt.

Die Verringerung des Probenvolumens wird bei FCS durch Verwendung eines konfokalen Mikroskops als optische Hauptkomponente erreicht. Hauptmerkmal einer konfokalen Optik ist die hohe Schärfentiefe. Dies wird dadurch erreicht, daß durch Verwendung einer konfokalen Optik der Anteil des Lichts aus Schichten außerhalb der Brennebene minimiert wird. Ferner wird der hohe Streulichtanteil, welcher mit konventionellen Mikroskopen aufgenommene Bilder diffus erscheinen läßt, deutlich verringert.

Das Anregungslicht liefert ein stark gebündelter Laserstrahl passender Wellenlänge. Hierdurch wird ein Probenvolumen definiert, welches sich durch einen Zylinder beschreiben läßt. Die Höhe des Zylinders wird durch die Dicke der konfokalen Ebene bestimmt. Der Durchmesser ergibt sich aus dem Strahlprofil des Lasers, genauer aus der Strecke, über welche die normalverteilte Lichtintensität von ihrem Maximum auf den $1/e^2$ ten Teil abnimmt. Typischerweise liegt das hierdurch definierte Probenvolumen im Bereich von 0,5 fl.

In diesem Volumen halten sich jeweils zu einem gegebenen Zeitpunkt nur wenige Teilchen auf. Aufgrund von Diffusionsbewegungen und chemischen Reaktionen kommt es zu Konzentrationsfluktuationen im Probenvolumen, welche sich als Fluktuationen der Fluoreszenzintensität bemerkbar machen. Die quantitative Auswertung erfolgt wie bei der PCS über eine Autokorrelationsfunktion, welche die zeitlichen Schwankungen der Intensität beschreibt. Im Unterschied zur Lichtstreuung spielen jedoch systematische Interferenzeffekte keine Rolle, da die Kohärenzzeit sehr viel kleiner ist als die Fluoreszenzlebensdauer. Die in der Lichtstreuung auftretende Abhängigkeit der Streuintensität von der Größe der Partikel relativ zur Lichtwellenlänge wird nicht beobachtet (Elson und Magde, 1974).

Typischerweise wird in einem FCS Experiment die Bindung eines kleinen, fluoreszenzmarkierten Liganden, A^* , an einen viel größeren Rezeptor, B , untersucht. Die reversible, bimolekulare Reaktion:



kann durch folgende Autokorrelationsfunktion beschrieben werden (Meyer-Almes et al., 1998):

$$G(\tau) = \left[1 - T + T \exp\left(\frac{-\tau}{\tau_T}\right) \right] N^{-1} \left[\frac{1 - Y}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_f}\right) \sqrt{1 + \frac{r_0^2}{z_0^2} \cdot \frac{\tau}{\tau_f}}} + \frac{Y}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_b}\right) \sqrt{1 + \frac{r_0^2}{z_0^2} \cdot \frac{\tau}{\tau_b}}} \right] \quad (15)$$

mit

$$Y = \frac{[A^*B]}{[A^*] + [A^*B]}$$

In Gleichung 15 steht τ für die Relaxationszeit der Autokorrelationsfunktion, T für den Anteil der Moleküle im Tripletzustand mit der Relaxationszeit τ_T und N für die

mittlere Anzahl von fluoreszenzmarkierten Molekülen im Probenvolumen. Y ist der relative Anteil an gebundenem, markiertem Liganden. Die Diffusionszeiten für den Komplex und den freien Liganden werden durch τ_b und τ_f gegeben. Das Probenvolumen schließlich wird durch den Radius r_0 und die Höhe z_0 definiert.

Radius und Höhe des Probenvolumens werden jeweils vor Beginn der Messungen experimentell bestimmt. Hierzu wird eine Standardprobe mit bekanntem Diffusionskoeffizienten vermessen. Man erhält den sogenannten Strukturparameter, SP , als Proportionalitätsfaktor zwischen r_0 und z_0 :

$$z_0 = SP r_0 \quad (16)$$

Aus der gemessenen Diffusionszeit des Standards, τ_{diff} , und dem bekannten Diffusionskoeffizienten ergibt sich r_0 direkt nach folgender Gleichung:

$$\tau_{diff} = \frac{r_0^2}{4D} \quad (17)$$

Nachdem das Probenvolumen bekannt ist, können alle anderen Parameter in Gleichung 15 durch eine nichtlineare Anpassung bestimmt werden. Relevant sind hierbei die Diffusionszeiten des freien Liganden und des Komplexes. Diese müssen hinreichend unterschiedlich sein, damit eine eindeutige Identifizierung der beiden Komponenten möglich ist. In der Praxis ist dies ab einem Verhältnis von 1:7 der relativen Molmassen des Liganden und des Rezeptors gegeben. Daneben kann aus der Diffusionszeit der beiden Komponenten gemäß Gleichung 17 ein apparenter Diffusionskoeffizient und hieraus nach der Stokes–Einstein Gleichung ein apparenter hydrodynamischer Radius berechnet werden. Y gibt dann schließlich das Konzentrationsverhältnis zwischen Ligand und Komplex an, welches für die weitere Auswertung der Bindungsexperimente benötigt wird.

2.2.2 Experimentelle Durchführung

Die FCS Experimente wurden mit einem ConfoCor Fluoreszenzkorrelationsspektrometer (Carl Zeiss Jena, Evotec Biosystems) durchgeführt. Das Gerät besteht aus einer Anregungseinheit, einer Optik- und Detektionseinheit, einer Motoreinheit sowie einem Mikrocomputer zur Steuerung des gesamten Geräts.

Die Anregung der Probenlösung erfolgt durch einen Argon-Ionen-Laser, der Licht mit den Wellenlängen 488 nm und 514 nm emittiert. Das Anregungslicht wird über einen Monomode-Lichtleiter in das optische System eingestrahlt. Die Wellenlänge

muß gemäß dem verwendeten Fluoreszenzfarbstoff gewählt werden und wird über einen Filterschieber eingestellt.

Das Kernstück des ConfoCor Systems stellt die Optik- und Detektionseinheit dar. Der Anregungsfilter selektiert aus dem ankommenden Laserlicht die für die Anregung erforderliche Wellenlänge. Der Strahlteiler reflektiert die Anregungsstrahlung in Richtung Probe. Er ist durchlässig für die emittierte Fluoreszenzstrahlung, wohingegen von der Probe reflektierte Anregungsstrahlung größtenteils absorbiert wird. Der nachgeschaltete Emissionsfilter absorbiert die Restbestandteile der Anregungsstrahlung sowie langwellige Strahlung, die durch Raman-Streuung entsteht. Die Fluoreszenzstrahlung wird durchgelassen und auf den Detektor gelenkt.

Die Probe befindet sich in einer Lab-Tec Zelle (Nunc GmbH), welche direkt über dem Objektiv positioniert wird. Das C-Apochromat 40×1.2 Wasser Immersion Objektiv dient zur Fokussierung des Anregungslichts auf die Probe und bildet zusammen mit den nachgeschalteten optischen Elementen das Probenvolumen auf dem Detektor ab. Die Fluoreszenzstrahlung wird an einem definierten Punkt der optischen Achse fokussiert. Die dort befindliche Lochblende begrenzt das auf den Detektor abgebildete Volumen in allen drei Raumrichtungen. Der Detektor besteht aus einer Avalanche Photo Diode, welche sich zur Detektion einzelner Photonen eignet. Das Detektorsignal wird danach von einer Autokorrelatorkarte ausgewertet. Die optische Einheit ist in Abbildung 2-4 schematisch dargestellt.

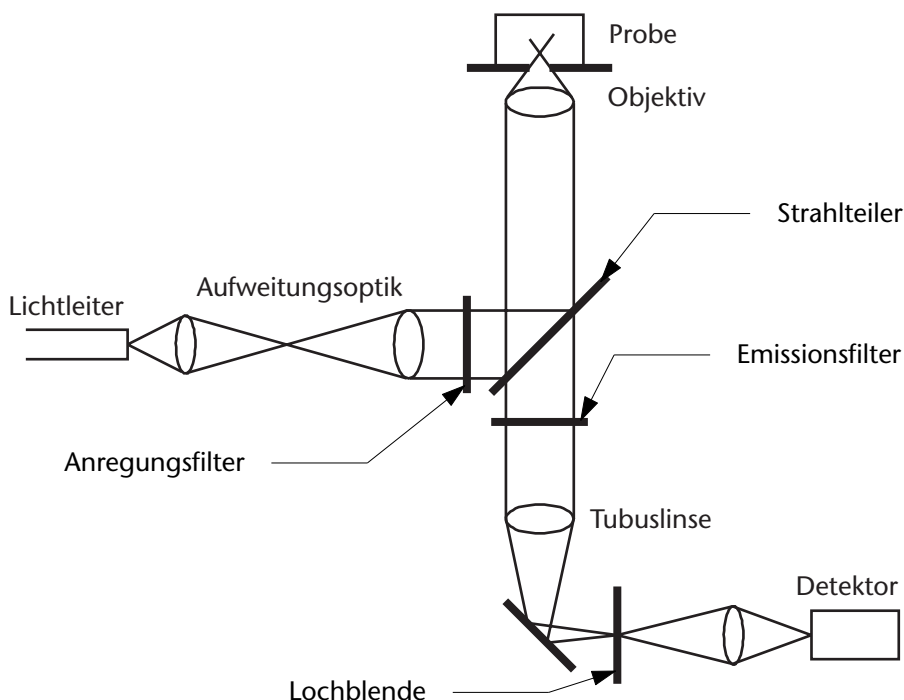


Abb. 2-4
Schematische Darstellung des optischen Systems des ConfoCor Fluoreszenzkorrelations-spektrometers.

Die Probenzelle befindet sich auf einem Probenträger, welcher mit Halterahmen auf den Probentisch aufgesetzt wird. Der Probentisch kann mit Hilfe der Motoreinheit computergesteuert bewegt werden. Daneben wird auch die Position sowie der Durchmesser der Blende von der Motoreinheit verändert. Dies ist während der Justage des optischen Systems nötig. Das komplette Gerät wird von einem PC-kompatiblen Microcomputer gesteuert, der auch für die Datenerfassung und die Auswertung verwendet wird.

Zu Beginn jeder Meßreihe wurde das optische System jeweils neu justiert und der Strukturparameter mit einem Rhodamin 6G Standard mit einem Diffusionskoeffizienten von $2,8 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (Rigler et al., 1993).

Als Fluoreszenzsonde wurde mit Bodipy FL bzw. Tetramethylrhodamin markiertes humanes Ferritransferrin verwendet (Molecular Probes Europe). Abbildung 2-5 zeigt die Strukturformeln der beiden Farbstoffe. Im Fall von BODIPY FL erfolgte die Anregung bei 488 nm. Die Fluoreszenz wurde im Bereich zwischen 500 nm und 590 nm detektiert. Tetramethylrhodamin wurde bei 514 nm angeregt und die Detektion erfolgte zwischen 520 nm und 610 nm.

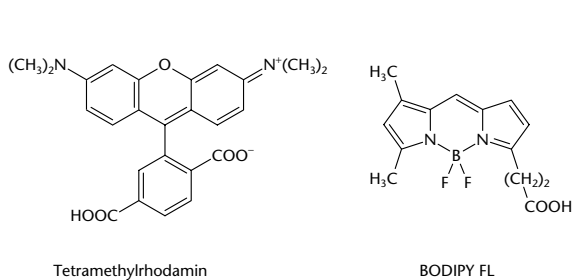


Abb. 2-5 Strukturformeln für Tetramethylrhodamin und BODIPY FL

Das Probenvolumen betrug generell 100 µl. Die Probe wurde in eine Kammer der Probenzelle eingefüllt und die Messung unmittelbar danach gestartet. Vor Beginn der eigentlichen Messungen wurden die Diffusionszeiten des freien Farbstoffes, des markierten Transferrins und des Komplexes aus Transferrin und Transferrinrezeptor in separaten Experimenten bestimmt. Die Akkumulationszeit für die Spektren betrug generell 30 s. Jede einzelne Messung wurde zehnmal wiederholt und die Diffusionszeiten gemittelt. Die hier erhaltenen Diffusionszeiten wurden bei der Anpassung der Bindungsexperimente als Parameter vorgegeben und fixiert. Dies war nötig, da die nichtlineare Anpassung der Daten gemäß Gleichung 15 sonst keine stabile Parameterschätzung lieferte.

Die Experimente zur Gleichgewichtsbindung wurden analog durchgeführt. Rezeptor und fluoreszenzmarkiertes Transferrin wurden im entsprechenden Verhältnis gemischt. Die Proben wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um eine Gleichgewichtseinstellung zu ermöglichen. Danach wurden 100 µl des Reaktionsansatzes eingesetzt. Wie zuvor betrug die Akkumulationszeit für die Autokorrelationsfunktionen 30 s. Jede Messung wurde zehnmal wiederholt und die erhaltenen Werte für den relativen Anteil des Komplexes gemittelt.

Assoziationskinetiken wurden aufgenommen, indem 90 µl hTfR Lösung zu 10 µl einer Lösung von fluoreszenzmarkiertem Transferrin hinzugegeben wurden. Die Kon-

zentrationen waren jeweils so gewählt, daß die Bindung nach pseudo-erster Ordnung ablief (s. 2.6.2). Unmittelbar nach dem Mischen wurden die Messungen gestartet. Die Reaktion wurde für mindestens 50 min verfolgt, bei einer Akkumulationszeit von 30 s pro Autokorrelationsfunktion. Der relative Anteil an freiem Transferrin wurde durch Anpassung von Gleichung 15 ermittelt, wobei die Diffusionszeiten für freies Transferrin und den Komplex auf die in einem Vorversuch ermittelten Werte fixiert wurden.

Zur Messung der Kinetik der Verdrängung von markiertem durch unmarkiertes Transferrin wurde zunächst hTfR mit markiertem Transferrin im stöchiometrischen Verhältnis 1:2 gemischt. Nach einer einstündigen Inkubation war kein freies Transferrin mehr in der Lösung nachweisbar, d. h. alles Transferrin lag im Komplex mit hTfR vor. Zur Messung wurde eine Lösung, die 23 nm Komplex enthielt, mit unterschiedlich konzentrierten Lösungen von humanem Transferrin versetzt, so daß das Gesamtvolumen jeweils 100 µl betrug. Die Aufnahme der Autokorrelationsfunktionen wurde unmittelbar nach dem Mischen gestartet und die Reaktion für 50 min verfolgt, wobei die Akkumulationszeit jeweils 30 s betrug. Der relative Anteil an Komplex wurde dann wiederum durch nichtlineare Anpassung ermittelt.

Da das ConfoCor System über keine Möglichkeit verfügt die Probe zu temperieren, wurden alle Messungen bei Raumtemperatur durchgeführt. Dies ist insofern unproblematisch, als die durch geringe Temperaturschwankungen ausgelösten Intensitätsfluktuationen vernachlässigbar sind (Magde et al., 1974). Nachteilig ist jedoch, daß temperaturabhängige Messungen, z. B. zur Bestimmung der Aktivierungsenergie, prinzipiell nicht durchgeführt werden konnten.

2.3 Kalorimetrie

Mit Hilfe thermodynamischer Methoden lassen sich grundlegende Aspekte der Struktur und Funktion biologischer Moleküle untersuchen. Dies gilt insbesondere für die Analyse von Triebkräften biochemischer Reaktionen und Bindungsphänomenen sowie für Prozesse der Strukturbildung in biologischen Systemen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die thermische Denaturierung des hTfR mit Hilfe der Differenz Scanning Kalorimetrie (DSC) und die Rezeptor-Ligand Wechselwirkung durch Differenz-Titrations-Kalorimetrie (DTC) analysiert. Eine detaillierte Beschreibung der Theorie sowie weiterer Anwendungsmöglichkeiten findet sich bei Hemminger und Höne (1980) und bei Pfeil (1996).

2.3.1 Differenz Scanning Kalorimetrie

Bei einem DSC Experiment wird eine Probe, deren stoffliche Zusammensetzung während des Experiments gleich bleibt, einer definierten Aufheizung unterworfen. Dies geschieht mit dem Ziel, thermotrope Übergänge in der Probe nachzuweisen und die mit diesen verbundenen Enthalpieänderungen zu bestimmen.

Ein Scanning Kalorimeter besteht im wesentlichen aus je einer Meß- und Referenzzelle, die exakt das gleiche Volumen besitzen. Beide Zellen sind an Temperaturfühler und Heizelemente angeschlossen und werden im Verlauf des Experiments durch genau dimensionierte Heizwicklungen simultan aufgeheizt. Treten nun aufgrund einer Phasenumwandlung Temperaturdifferenzen zwischen beiden Zellen auf, werden diese durch eine Änderung des Heizstroms exakt kompensiert. Als primäre Meßgröße dient die Änderung des Heizstroms und daraus abgeleitet die Heizleistung. Eine schematische Darstellung des Aufbaus eines Scanning-Kalorimeters gibt Abbildung 2-6.

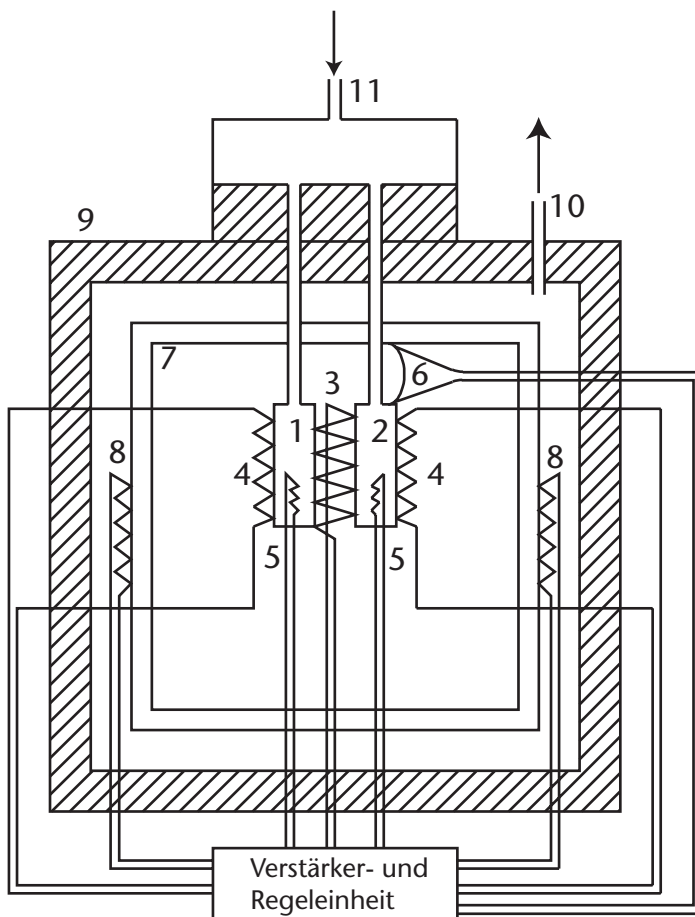


Abb. 2-6 Aufbau eines Scanning-Kalorimeters. 1, 2: Meß- und Referenzzelle, 3: Differentialthermoelemente zwischen den Zellen, 4: Heizelemente, 5: Zusatzheizelemente, 6: Differentialthermoelement zwischen Zelle und adiabatischem Schirm, 7: adiabatischer Schirm, 8: Heizelemente für den adiabatischen Schirm, 9: thermische Isolierung und Thermostat, 10: Anschluß zur Vakuumpumpe, 11: Anschluß für Stickstoff

Während der Messung werden Meß- und Referenzzelle gemäß der vorgegebenen Heizrate erwärmt. Die Temperaturdifferenz zwischen den Zellen wird mit einem sehr empfindlichen Thermoelement gemessen, welches ein zur Temperaturdifferenz proportionales Spannungssignal liefert. Dieses Spannungssignal wird verstärkt und betreibt die Zusatzheizelemente, bis beide Zellen dieselbe Temperatur haben. Das Quadrat der Spannung, U , mit dem die Zusatzheizung betrieben wird, ist gemäß Gleichung 18 proportional zur Leistung, P , die nötig ist, um die Temperaturdifferenz zwischen den Zellen auszugleichen.

$$P = UI = \frac{U^2}{R} \quad (18)$$

I steht hierbei für die Stromstärke und R für den elektrischen Widerstand.

Die Leistung wird als Funktion der Zeit und entsprechend der eingestellten Empfindlichkeit gegen die Temperatur aufgetragen. Für die Temperatur, T , der Probe zu einer beliebigen Zeit t gilt:

$$T = \kappa t \quad (19)$$

Die Scangeschwindigkeit κ ergibt sich aus der kontinuierlichen Messung der Temperatur der Probenzelle. Die Wärmekapazität unter konstantem Druck, c_p , ergibt sich aus der Leistung und der Scangeschwindigkeit:

$$c_p = \frac{U^2}{R} \kappa^{-1} = \left(\frac{\partial H}{\partial T} \right)_p \quad (20)$$

Die Wärmekapazität ist gleichzeitig die partielle Ableitung der Enthalpie, H , nach der Temperatur bei konstantem Druck. Trägt man nun c_p gegen die Temperatur auf, erhält man durch Integration die Enthalpie des Phasenübergangs.

Die DSC Messungen wurden mit einem MicroCal MC-2 Scanning-Kalorimeter (MicroCal) durchgeführt. Die Probe wurde mit einer Geschwindigkeit von 30 K/h aufgeheizt und die Wärmekapazität als Funktion der Temperatur zwischen 312,2 K und 358,2 K bestimmt. Die erhaltenen Wärmekapazitäten wurden mit dem Programm Origin (MicroCal) weiter ausgewertet. Unter Berücksichtigung der Proteinkonzentration und des Probenvolumens von 1,2249 ml wurde die molare Wärmekapazität errechnet und gegen die Temperatur aufgetragen. Nach Kompensation der Basisliniendrift ergab sich die Phasenumwandlungstemperatur als Maximum und die Änderung der molaren Enthalpie als Fläche unter der DSC Kurve. Beide Parameter wurden durch numerische Differenzierung bzw. Integration der Kurve mit Hilfe von Origin bestimmt.

2.3.2 Differenz-Titrations-Kalorimetrie

Die Bindung zwischen einem Liganden und einem Rezeptor kann im DTC Experiment durch die Messung des Wärmeumsatzes verfolgt werden. Hierzu wird der vorgelegte Rezeptor schrittweise mit seinem Liganden titriert. Als Meßgröße dient die Änderung des Wärmeumsatzes bei der Bindung als Funktion der Änderung der Ligandenkonzentration in jedem Titrationschritt. Hierdurch können prinzipiell alle thermodynamischen Parameter der Bindungsreaktion durch ein einziges Experiment bestimmt werden (Wiseman et al., 1989).

Der Aufbau eines Differenz-Titrations-Kalorimeters ist in Abbildung 2-7 dargestellt.

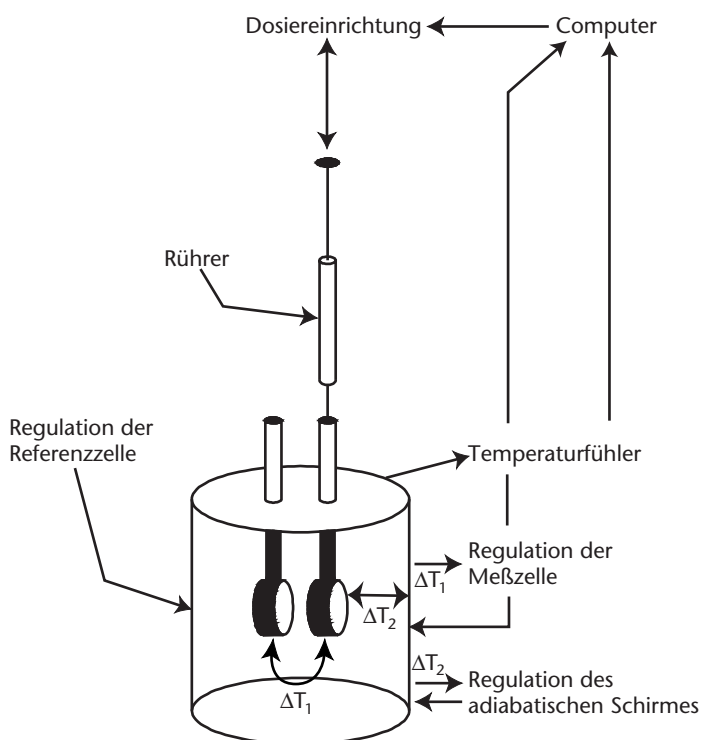


Abb. 2-7 Schematischer Aufbau eines Differenz-Titrations-Kalorimeters

Das Kalorimeter besitzt zwei identische Zellen innerhalb eines evakuierten Gefäßes, die thermisch gegen die Umgebung isoliert sind. Eine Zelle enthält die Probe, die andere dient als Referenz. Eine festgelegte Menge des Liganden wird über eine Injektionspritze in die Probenzelle eingebracht. Am Ende der Dosiereinrichtung befindet sich fest montierter Rührer, der sich mit 400 U/min dreht und für eine sofortige Durchmischung der Probe sorgt.

Der Referenzzelle wird elektrisch mit einer sehr geringen konstanten Heizrate Wärme zugeführt. Die Temperaturdifferenz, ΔT_1 , zwischen beiden Zellen wird von einem Thermoelement gemessen und in ein entsprechendes Spannungssignal umgewandelt. Die hier gemessene Spannung wirkt nach Verstärkung, zusammen mit

der elektrischen Beheizung der Meßzelle, der Temperaturdifferenz entgegen. Dieses Verfahren wird als Feedback Heizung bezeichnet und dient dazu, die Temperaturdifferenz zwischen den Zellen zu minimieren. Eine zur Stärke der Feedback Heizung proportionale Spannung wird gemessen und als Funktion der Zeit aufgetragen. Kommt es nun im Lauf der Reaktion zu einer Wärmefreisetzung oder zu einem Wärmeverbrauch, weicht die Stärke der Feedback Heizung von der Basislinie ab. Es ergibt sich entweder ein negatives (exotherme Reaktion) oder ein positives Signal. Das Integral über die Signalfäche ist ein Maß für die innerhalb der Probe erzeugte oder verbrauchte Wärmemenge.

Zur Verringerung von Wärmeverlusten an die Umgebung wird auch die Temperatur der adiabatischen Abschirmung um die Zellen reguliert. Ein Thermoelement mißt kontinuierlich die Temperaturdifferenz ΔT_2 zwischen der Abschirmung und den Zellen. Über eine zweite Feedback Heizung werden auftretende Temperaturdifferenzen zwischen Schirm und Zellen korrigiert.

Alle Messungen wurden mit einem OMEGA Mikrokolorimeter (Microcal) mit einem Zellvolumen von 1,3592 ml durchgeführt. Zur Bestimmung der bei der Zufuhr der Transferrinlösung entstehende Verdünnungswärme diente ein unabhängiges Experiment, bei dem die Meßzelle lediglich mit Puffer gefüllt war. Die Rezeptorlösung wurde mit einer Hamiltonspritze in die Probenzelle eingefüllt. Als Referenz diente bei allen Messungen PBS Puffer (s. 2.6.1). Während des Experiments wurde Ferritransferrin aus einer 250 μ l Spritze zugeführt. Die Titration erfolgte jeweils in 7 μ l Schritten in einem Abstand von jeweils drei Minuten. Die entstandene Wärmemenge wurde gemessen und als Funktion der Zeit aufgetragen.

Prinzipiell kann mit Hilfe der Differenz-Titrations-Kalorimetrie die Thermodynamik einer Bindungsreaktion vollständig charakterisiert werden. Hierbei besteht jedoch die Einschränkung, daß die Bindungskonstante nicht über 10^8 M^{-1} liegen darf (Wiseman et al., 1989). Dies liegt daran, daß dann zur Bestimmung der Bindungskonstante die Konzentration des Rezeptors unter die Nachweisgrenze abgesenkt werden müßte. Da die Bindungskonstante des vorliegenden Systems eine Größenordnung über dem Schwellenwert liegt, konnte nur die Bindungsenthalpie bestimmt werden. Dies geschah durch Integration über die jeweilige Signalfäche. Die Bindungsenthalpie konnte hiermit für jede Injektion berechnet werden, wobei Verdünnungseffekte durch die Volumenänderung während der Titration Berücksichtigung fanden. Wurden die erhaltenen Werte für die Enthalpie wurden gegen die laufende Nummer der Injektion aufgetragen lieferte der Achsenabschnitt einer linearen Regression durch diese Werte die mittlere Bindungsenthalpie.

2.4 Analytische Ultrazentrifugation

Die Bewegung suspendierter Partikel in einem Schwerfeld hängt vom Gleichgewicht zwischen der Gravitationskraft und dem Auftrieb des Teilchens in Lösung ab. Hierbei ist die Gravitationskraft proportional zur Masse des Teilchens, während der Auftrieb vom Volumen und der Dichte des verdrängten Lösungsmittels abhängt. Die Sedimentations- oder Flotationsbewegungen von Proteinen sind im Erdschwerfeld zu gering, um gemessen werden zu können. Aus diesem Grund werden solche Vorgänge mit Hilfe von Ultrazentrifugen untersucht. In einer Ultrazentrifuge hängt die Gravitationskraft, welche auf ein Teilchen wirkt, vom Abstand der Probe von der Rotorachse, r , sowie von der Winkelgeschwindigkeit, ω , ab. Letztere ist wie folgt definiert:

$$\omega = \frac{2\pi n}{60} \quad (21)$$

n bezeichnet hier die Drehzahl des Rotors pro Minute. Hiermit ergibt sich für die Sedimentationskraft, F_{sed} , die auf ein Teilchen wirkt:

$$F_{sed} = m r \omega^2 (1 - \bar{v} \rho) \quad \text{mit } \bar{v} = \frac{V}{m} \quad (22)$$

m steht für die Masse des Teilchens, V für sein Volumen, ρ für die Dichte des von dem Teilchen verdrängten Lösungsmittels und \bar{v} für das partielle spezifische Volumen des Teilchens. Mit steigender Umdrehungsgeschwindigkeit nimmt die Sedimentationsgeschwindigkeit der Teilchen zunächst zu. Da aber eine Reibungskraft der Beschleunigung entgegenwirkt, bewegen sich die Teilchen nach einiger Zeit gleichförmig. Die Sedimentationskraft ist dann gleich der Reibungskraft, F_{reib} . Die Reibungskraft hängt von der Sedimentationsgeschwindigkeit und vom molaren Reibungsfaktor f ab, welcher über die Boltzmannkonstante k_B und die Temperatur T mit dem Diffusionskoeffizienten D verknüpft ist:

$$F_{reib} = f \frac{dr}{dt} \quad \text{mit } f = \frac{k_B T}{D} \quad (23)$$

$\frac{dr}{dt}$ bezeichnet die Sedimentationsgeschwindigkeit. Im Gleichgewichtsfall gilt:

$$F_{sed} = F_{reib} = m r \omega^2 (1 - \bar{v} \rho) = f \frac{dr}{dt} \quad (24)$$

Hierdurch läßt sich ein Ausdruck für die Sedimentationsgeschwindigkeit gewinnen, indem man m durch die molare Masse, M , und die Avogadrokonstante, N_A , substituiert:

$$\frac{dr}{dt} = \frac{Mr\omega^2(1 - \bar{v}\rho)}{N_A f} \quad (25)$$

Molmasse, partielles spezifisches Volumen, Dichte und molarer Reibungsfaktor sind proteinspezifische Konstanten. Die variablen Größen in Gleichung 25 lassen sich zum Sedimentationskoeffizienten s zusammenfassen:

$$s = \frac{dr}{dt} \cdot \frac{1}{r\omega^2} \quad (26)$$

Der Sedimentationskoeffizient hat die Dimension einer reziproken Zeit und wird in Svedberg-Einheiten angegeben. Er stellt ebenfalls eine proteinspezifische Größe dar. Die beschriebenen Zusammenhänge lassen sich durch die Svedberg-Gleichung, welche die molare Masse mit dem Sedimentations- und dem Diffusionskoeffizienten eines Proteins verknüpft, zusammenfassen:

$$M = \frac{(sRT)}{(D(1 - \bar{v}\rho))} \quad (27)$$

hierbei ist R die Gaskonstante.

Eine detaillierte Beschreibung der Theorie der Ultrazentrifugation, sowie der zugrundeliegenden Technik findet sich bei Cantor und Schimmel (1980) und Behlke (1996).

2.4.1 Experimentelle Durchführung

Der Sedimentations- und der Diffusionskoeffizient eines Proteins läßt sich durch ein Sedimentationsgeschwindigkeits-Experiment bestimmen. Hierbei betrachtet man die Sedimentation einer homogenen Proteinfraktion von der Radiusposition der Lösungsoberfläche (Meniskus) zum Boden der Meßzelle. Die Proteinmoleküle reichern sich im Lauf des Experiments am Boden an und es bildet sich eine sedimentierende Grenzschicht zwischen Lösungsmittel und gelöster Substanz. Die Lage dieser Grenzschicht kann zeitabhängig durch Absorptionsmessung bestimmt werden. Es ergeben sich sigmoidale Kurven, aus denen durch nichtlineare Regression Sedimentations- und Diffusionskoeffizienten bestimmt werden können. Aus diesen beiden Werten kann die molare Masse des Proteins mit Hilfe der Svedberg-Gleichung ermittelt werden.

Neben der molaren Masse läßt sich auch das Reibungsverhältnis, f/f_0 eines Makromoleküls berechnen:

$$\frac{f}{f_0} = \sqrt[3]{\frac{1 - \rho\bar{v}}{D^2 s \bar{v}}} \quad (28)$$

Das Reibungsverhältnis hängt von der Struktur des Proteins ab. Für eine Kugel ist dieses Verhältnis gleich 1. Es nimmt mit zunehmender Abweichung der Proteinstruktur von der Kugelform immer größere Werte an. Neben dem Reibungsverhältnis läßt sich auch das Volumen des nicht hydratisierten Moleküls berechnen. Dieses ist direkt proportional zur molaren Masse des Moleküls:

$$V = \frac{M\bar{v}}{N_A} \quad (29)$$

für kugelförmige Partikel ergibt sich damit ein Radius, R , von:

$$R = \sqrt[3]{\frac{3M\bar{v}}{4\pi N_A}} \quad (30)$$

Zur Durchführung der Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimente wurde eine analytischen Ultrazentrifuge XL-A (Beckman) mit Absorptionsoptik und Standardzellen verwendet. Das Probenvolumen betrug 300 μl mit einer Proteinkonzentration von 0,85 mg/ml. Alle Experimente wurden bei 6000 U/min und bei einer konstanten Temperatur von 293 K durchgeführt. Die Absorption wurde jeweils bei 270 nm, 275 nm und 280 nm bestimmt und gegen den Abstand von der Rotorachse aufgetragen. Sedimentations- und Diffusionskoeffizient wurden durch nichtlineare Anpassung mit Hilfe des Programms LAMM (Behlke und Ristau, 1997a) bestimmt und die molare Masse von hTfR gemäß der Svedberg-Gleichung berechnet. Hierzu muß das partielle spezifische Volumen bekannt sein. Dieses läßt sich rechnerisch bestimmen, wenn die Aminosäuresequenz eines Proteins bekannt ist (Cohn und Edsall, 1943). Ebenso wurden die bekannten posttranslationalen Modifikationen des hTfR berücksichtigt (Omary und Trowbridge, 1981; Do und Cummings, 1992; Hayes et al., 1992; Hayes et al., 1997).

Außer durch ein Sedimentationsgeschwindigkeits-Experiment kann man die molare Masse eines Moleküls auch direkt mit Hilfe eines Sedimentationsgleichgewicht-Experiments bestimmen. Die experimentellen Bedingungen sind so gewählt, daß nur eine relativ geringe Sedimentationskraft auf die Makromoleküle wirkt. Dem Stofftransport in Richtung Zellenboden steht ein Rücktransport durch Diffusion gegenüber. Diese beiden Effekte sind gleich groß, sobald ein Gleichgewicht erreicht ist. Es bildet sich ein Konzentrationsgradient für das gelöste Makromolekül aus. Die Abhängigkeit der molaren Masse vom Konzentrationsgradient läßt sich bei Detektion durch eine Absorptionsoptik wie folgt formulieren:

$$M = \frac{2RT}{(1 - \rho\bar{v})\omega^2} \cdot \frac{d}{dr^2} \ln c \quad (31)$$

wobei c die Konzentration bezeichnet, welche natürlich proportional zur gemessenen Absorption, A , ist. Die Konzentrationsverteilung im Sedimentationsgleichgewicht läßt sich durch eine Exponentialfunktion beschreiben:

$$A(r) = A_0 e^{MK(r^2 - r_0^2)} \quad \text{mit } K = \frac{(1 - \rho \bar{v}) \omega^2}{2RT} \quad (32)$$

$A(r)$ ist die Absorption gemessen bei einem bestimmten Abstand von der Rotorachse und A_0 die Absorption am Meniskus.

Gemäß dieser Gleichung läßt sich die molare Masse durch nichtlineare Regression direkt aus einer Auftragung der Absorption gegen den Radius bestimmen.

Alle Messungen wurden in einer analytischen Ultrazentrifuge XL-A (Beckman) mit Absorptionsoptik durchgeführt. Es wurde eine Sechskanalzelle mit einer optischen Schichtdicke von 12 mm verwendet. Das Probenvolumen betrug jeweils 100 μl , die Proteinkonzentration 0,85 mg/ml. Die Temperatur wurde bei 283 K konstant gehalten. Zur Einstellung des Sedimentationsgleichgewichts wurde die Probe zunächst für zwei Stunden bei 4000 U/min zentrifugiert. Danach wurde die Messung bei einer Gleichgewichtsumdrehungszahl von 3000 U/min fortgesetzt. Die Absorptionsmessungen erfolgten bei 270 nm, 275 nm und 280 nm. Die molare Masse wurde durch nichtlineare Anpassung der erhaltenen Absorptionsverteilungskurven an Gleichung 32 bestimmt. Für die Anpassung wurde das Programm Polymole (Behlke et al., 1997b) verwendet.

Zur Aufstellung eines Strukturmodells wurden die hydrodynamischen Eigenschaften verschiedener Modelle mit dem Programm Hydro (Garcia de la Torre et al., 1994) berechnet. Zum Zweck der Modellrechnung wurden die hTfR Untereinheiten als Kugeln beschrieben, wobei jeweils zwei Kugeln ein Dimer repräsentieren. Jede Kugel kann durch einen Radius und durch einen Satz kartesischer Koordinaten für den Mittelpunkt definiert werden. Zusammen mit weiteren experimentellen Randbedingungen wie der molaren Masse, der Viskosität des Lösungsmittels und der Temperatur wurden dann Diffusions- und Sedimentationskoeffizienten für verschiedene Anordnungen berechnet und mit den experimentellen Daten verglichen.

2.5 Circular dichroismus (CD)

Die CD-Spektroskopie ist eine Form der Absorptionsspektroskopie, wobei die unterschiedliche Absorption von links und rechts circular polarisiertem Licht durch eine Probe als Meßgröße dient. Circular dichroismus tritt während der Wechselwirkung von polarisiertem Licht mit chiralen Molekülen auf. Bei Proteinen tragen insbeson-

dere die asymmetrischen Elemente im Bereich des Peptidrückgrats sowie die aromatischen Aminosäuren zum Circular dichroismus bei. Die genaue Form der CD-Spektren hängt wesentlich von der Elektronenkonfiguration ab, welche wiederum maßgeblich von den Sekundärstruktur-Elementen (α -Helix und β -Faltblatt) der Peptidkette bestimmt wird. Aus diesem Grund stellt die CD-Spektroskopie eine äußerst empfindliche Methode dar, um die Sekundärstruktur und insbesondere Änderungen der Sekundärstruktur von Proteinen zu messen. Neben dem Peptidrückgrat tragen auch die aromatischen Aminosäuren zum Circular dichroismus bei. Die aromatischen Reste sind von sich aus nicht asymmetrisch. Es kann jedoch in einem gefalteten Protein zu Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Resten und ihrer Umgebung kommen, wobei eine asymmetrische Elektronenkonfiguration induziert wird. Ein CD-Spektrum kann daher in zwei spektralen Bereichen beobachtet werden. Im Absorptionsbereich der Papierhandlungen von 160 nm bis 230 nm und der aromatischen Aminosäuren zwischen 240 nm und 300 nm. Eine detaillierte quantenmechanische Beschreibung der hier skizzierten Zusammenhänge findet sich bei Cantor und Schimmel (1980).

Während die magnetischen und elektrischen Feldvektoren von unpolarisiertem Licht senkrecht zur Ausbreitungsrichtung isotrop im Raum verteilt sind, schwingen die Feldvektoren von linear polarisiertem Licht nur in einer Ebene. Aus linear polarisiertem Licht kann circular polarisiertes Licht erzeugt werden, indem man ein sogenanntes $\lambda/4$ -Plättchen in den Strahlengang einbringt. Hierbei fällt das linear polarisierte Licht so auf das $\lambda/4$ Plättchen, daß seine Polarisationssebene einen Winkel von 45° bzw. 135° zu dessen optischer Achse bildet. Unter diesen Bedingungen und bei geeigneter Dicke des Plättchens entstehen zwei linear polarisierte Wellenzüge mit einem Gangunterschied von 90° bzw. einem Viertel der Wellenlänge des einfallenden Lichts. Deren Überlagerung führt zu circular polarisiertem Licht, wobei bei 45° Einstrahlung in das $\lambda/4$ -Plättchen rechts circular polarisiertes Licht entsteht, während für eine links circular Polarisierung unter einem Winkel von 135° einfallend sein muß. Die Überlagerung einer links und einer rechts polarisierten Lichtwelle gleicher Amplitude ergibt wieder linear polarisiertes Licht. Sind die Amplituden ungleich entsteht elliptisch polarisiertes Licht. In diesem Fall ändert der Feldvektor seine Größe beim Durchlaufen einer vollen Schwingung und die Spitze des Feldvektors beschreibt eine Ellipse.

Die primäre Meßgröße in einem CD-Experiment ist die Absorptionsdifferenz, ΔA , bei unterschiedlicher Absorption von links bzw. rechts circular polarisiertem Licht durch eine chirale Probe. Aus historischen Gründen wird die Absorptionsdifferenz zumeist in die Elliptizität, Θ , umgerechnet. Die Elliptizität sagt aus, in welchem Maß die Probe linear polarisiertes Licht in elliptisch polarisiertes Licht umwandelt. Sie wird gewöhnlich in Milligrad angegeben. Für den Zusammenhang zwischen Absorptionsdifferenz und Elliptizität gilt:

$$\Theta = c \cdot 1000 \cdot \Delta A \text{ mit } c = \frac{\ln 10 \cdot 180}{4\pi} \quad (33)$$

Die Form eines CD-Spektrums hängt wesentlich von der Sekundärstruktur des jeweiligen Proteins ab. Durch eine quantitative Auswertung der Spektren läßt sich der Anteil bestimmter Sekundärstrukturelemente wie z.B. α -Helix oder β -Faltblatt in einem Protein bestimmen. Hierzu existieren verschiedene mathematische Methoden, die davon ausgehen, daß ein CD-Spektrum als lineare Kombination der verschiedenen Sekundärstrukturen beschrieben werden kann. Es ist jedoch nötig, einen Satz von Basisstrukturen vorzugeben. Dabei handelt es sich entweder um CD-Spektren von Proteinen mit bekannter Struktur oder um Spektren von Modellpeptiden. Auf der Basis dieser Daten läßt sich der Anteil der jeweiligen Sekundärstrukturelemente für das untersuchte Protein berechnen.

In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch aus mehreren Gründen auf eine quantitative Analyse verzichtet. Zum einen existieren verlässliche Basissätze nur für globuläre Proteine, da Röntgenstrukturdaten und CD-Spektren einer ausreichend großen Zahl von Membranproteinen nicht vorliegen. Zum anderen können sich CD-Spektren in aggregierten Systemen unvorhersehbar gegenüber dem nicht aggregierten Molekül ändern (Manning, 1989). Ferner ist es für eine quantitative Auswertung nötig, Spektren ab 190 nm bzw. zur verlässlichen Bestimmung von nicht α -helikalen Strukturen ab 180 nm aufzunehmen (Johnson, 1990). Dies war jedoch mit hTfR unmöglich, da bei Wellenlängen unter 194 nm die Signalintensität zu groß wurde und nicht mehr detektiert werden konnte. Eine weitere Verringerung der Proteinkonzentration war allerdings nicht möglich, weil dann die Signalintensität im Bereich über 194 nm zu gering geworden wäre. Aus den genannten Gründen konnten daher die aufgenommenen Spektren nur qualitativ beurteilt werden.

Neben der quantitativen Analyse des Sekundärstrukturgehalts stellt die CD-Spektroskopie eine empfindliche Methode dar, Konformationsänderungen, die z. B. durch thermische Denaturierung, pH-Wert Änderungen oder Rezeptor-Ligand Wechselwirkungen hervorgerufen werden, zu untersuchen. Hier ist es möglich auch ohne eine quantitative Auswertung Rückschlüsse auf Strukturveränderungen zu ziehen. Daher wurde dieser Ansatz in der vorliegenden Arbeit verfolgt.

2.5.1 Experimentelle Durchführung

Alle CD-Spektren wurden zwischen 195 nm und 250 nm mit einem JASCO J-600 Spektropolarimeter aufgenommen. Die optische Schichtdicke betrug immer 2 mm. Die Spektren wurden mit einer Geschwindigkeit von 5 nm/min in 0,2 nm Schritten aufgenommen. Zur Temperaturkontrolle diente ein Lauda RC6 Thermostat. Für alle

Experimente wurde eine Proteinkonzentration von 50 µg/ml eingesetzt. Es wurden jeweils 5 Spektren hintereinander aufgenommen und dann gemittelt.

2.6 Proteinreinigung und Probenvorbereitung

Die Präparation von hTfR erfolgte aus humaner Plazenta nach einem von Turkewitz (1988a) angegebenen Protokoll. Es wurden einige Modifikationen an diesem Standardprotokoll vorgenommen, welche die Ausbeute erhöhten bzw. den Zeitaufwand für die Präparation verringerten.

2.6.1 Reinigung des Transferrinrezeptors

Die für die Präparation verwendeten humanen Plazenten wurden von der Frauen- und Polyklinik, Charité, Campus Virchow-Klinikum zur Verfügung gestellt. Die für die Herstellung von Puffern gebrauchten Salze wurden von Merck, Darmstadt, bezogen, waren generell von p. a. Qualität und wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt. Für alle Lösungen wurde generell Wasser aus einer Milli-Q Anlage (Millipore) benutzt. Es wurden folgende Standardpuffer verwendet:

PBS	10 mM Phosphat (Na_2HPO_4 und KH_2PO_4), 150 mM NaCl, pH 7,5
Kopplungspuffer	100 mM Carbonat (Na_2CO_3 und NaHCO_3), 500 mM NaCl, pH 8,3
Inaktivierungs- lösung	1 M Ethanolamin, mit HCl auf pH 8 eingestellt
Elutionspuffer 1	10 mM Citrat, 150 mM NaCl, 0,2 mM Desferral, pH 5,0
Elutionspuffer 2	50 mM Hepes, 10 mM CHAPS, 2 M KCl, pH 7,5

Aus den Plazenten wurde unter Eiskühlung das Parenchym präpariert. Haut, Bindegewebe und Reste der Nabelschnur wurden entfernt und verworfen. Das Paren-

chym wurde in kleine Stücke geschnitten und mit Stickstoff schockgefroren. Das Material wurde bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Das Parenchym von jeweils zwei Plazenten wurde in PBS mit einer Endkonzentration von $0,5\text{ mM}$ PMSF (Proteaseinhibitor) und $0,1\text{ mM}$ DTT (Antioxidans) (beides von Sigma) aufgetaut. Das Auftauen erfolgte entweder bei Raumtemperatur oder bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht. Das aufgetaute Gewebe wurde in einem Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel) bei einer Drehzahl von 13000 U/min homogenisiert. Danach wurde das Homogenat für 90 min bei 17000 g zentrifugiert (Sorvall RC5C Kühlzentrifuge, GSA Rotor).

Das Pellet wurde in PBS (mit $0,5\text{ mM}$ PMSF und $0,1\text{ mM}$ DTT) resuspendiert und mit einer 20% Lösung von Triton X-100 in PBS auf eine Endkonzentration von 1% Triton X-100 gebracht. Die Suspension wurde 30 min lang leicht gerührt und anschließend 35 min bei 17000 g zentrifugiert. Der Überstand enthält die solubilisierten Membranproteine. Der hTfR ist im Überstand jedoch zumeist noch mit seinem Liganden Transferrin komplexiert. Zur Entfernung des Transferrins wurde der Überstand mit 1 M HCl auf $\text{pH } 5.0$ gebracht, danach wurde der Eisenchelator Desferral (Deferoxaminmesylat) (Sigma) zugegeben, so daß dessen Konzentration $0,2\text{ mM}$ betrug. Die gesamte Lösung wurde 15 min lang gerührt. Hierdurch werden Fe(III)-Ionen komplexiert und das Transferrin von der ferri- in die apo-Form übergeführt. Danach wurde mit 1 M NaOH ein pH -Wert von 8.0 eingestellt, was zur Dissoziation des apo-Transferrins vom hTfR führt. Durch Zugabe von Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ wird hTfR, nicht jedoch Transferrin, ausgefällt. Die Mischung wurde nach Zugabe des Ammoniumsulfats noch für 30 min gerührt, um die Fällung zu vervollständigen. Danach wurde das Präzipitat durch eine 20 minütige Zentrifugation bei 17000 g abgetrennt. Nach der Zentrifugation schwimmt das Pellet auf der sehr dichten Lösung und wurde durch Abgießen vorsichtig von dieser getrennt. Für die Weiterbearbeitung muß das Pellet wieder suspendiert werden. Hierzu wurde es in PBS aufgenommen und 90 min lang bis zur vollständigen Resuspension gerührt. Die Suspension wurde gegen 5 l PBS über Nacht dialysiert und danach nochmals für zwei Stunden bei 17000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf $\text{pH } 7,5$ eingestellt und für die Affinitätschromatographie verwendet.

Der Hauptschritt der Reinigung erfolgte über eine Affinitätschromatographie. Hierzu mußte die Säule jeweils frisch vorbereitet werden. Als Säulenmaterial diente cyanbromidaktivierte Sepharose 4B (Sigma). $1,8\text{ g}$ dieses Materials wurde für 15 min unter leichtem Rühren in 1 mM HCl vorgequollen, anschließend mit 200 ml HCl und 200 ml Kopplungspuffer in einer Glasfritte G4 gewaschen und mit 10 ml einer ferri-Transferrinlösung (10 mg/ml) für 2 Stunden unter leichtem Schütteln inkubiert. Die ferri-Transferrinlösung wurde hergestellt, indem eine entsprechende Menge ferri-Transferrin (Sigma) in PBS gelöst und die Lösung über Nacht gegen 1 l Kopp

lungspuffer dialysiert wurde. Nach der Inkubation wurde das Säulenmaterial mit 200 ml Kopplungspuffer gewaschen. Eventuell noch vorhandene freie Bindungsstellen wurden durch eine zweistündige Inkubation des Materials mit Inaktivierungslösung abgesättigt. Danach wurde das Material mit 500 ml Kopplungspuffer, 200 ml Wasser und 200 ml PBS gewaschen und schließlich in PBS aufgenommen.

Für die Affinitätschromatographie wurden zwei C10/10 Säulen (Pharmacia) verwendet. Die erste diente als Vorsäule und war mit ca. 4 ml Sepharose CL-4B (Pharmacia) gefüllt. Diese Vorgehensweise war nötig, um Schwebstoffe abzufangen, welche sonst die Hauptsäule verstopft hätten. In die zweite Säule wurden 8 ml der ferri-Transferrin-Sepharose gefüllt. Jede Säule war an eine peristaltische Pumpe angeschlossen. Die hTfR-haltige Lösung passierte zuerst die Vorsäule, wurde in einem Zwischengefäß aufgefangen und auf die Hauptsäule geleitet. In der Regel wurde dieser Vorgang über Nacht durchgeführt, wobei die Flußraten so eingestellt wurden, daß ein Trockenlaufen der Säulen vermieden wurde. Nachdem die gesamte Lösung die Hauptsäule passiert hatte, wurde diese mit ca. 100 ml 0,2% Triton X-100 in PBS und anschließend mit 300 ml PBS gewaschen. Die Elution des hTfR erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurde die Säule mit Elutionspuffer 1 gespült, bis das Säulenmaterial farblos war. Dieser Schritt diente dazu, das ferri-Transferrin in apo-Transferrin umzuwandeln und die Bindung zwischen Transferrin und hTfR zu schwächen. Danach wurde die Säule mit ca. 100 ml PBS gespült. Die abschließende Elution erfolgte mit Elutionspuffer 2 und wurde mit Hilfe eines Durchflußphotometers beobachtet. Bei der Elution wird hTfR nahezu vollständig vom Säulenmaterial entfernt. Die hTfR Lösung wurde danach über Nacht gegen PBS dialysiert, um noch vorhandenes CHAPS zu entfernen. Die Reinheit des erhaltenen Materials wurde durch SDS Gelelektrophorese überprüft (Laemmli, 1970).

Nach der Präparation ist das Protein elektrophoretisch einheitlich, in der dynamischen Lichtstreuung sind jedoch größere Aggregate erkennbar. Hierbei handelt es sich vermutlich um denaturiertes Protein. Um diese Aggregate abzutrennen, wurde die Protein-Lösung durch Gelfiltration über eine Sephacryl S-400 Säule weiter gereinigt. Hierbei konnte eine 99,99 prozentige Homogenität bezüglich der Masse (Abschätzung mit Hilfe von statischen Lichtstremessungen) erzielt werden. Nach Abschluß jeder Präparation wurde die Proteinkonzentration mit Hilfe des Pierce BCA protein assays (Pierce) bestimmt. Das gereinigte Material wurde aliquotiert und bei 4 °C gelagert.

2.6.2 Probenvorbereitung

Photonenkorrelationsspektroskopie und statische Lichtstreuung

Für die Photonenkorrelationsspektroskopie und die statische Lichtstreuung wurde generell eine Proteinkonzentration von 50 µg/ml verwendet, wobei die Proteinlösungen mit einer entsprechenden Menge PBS, pH 7,5, verdünnt wurden. Um in einer Probe befindlichen Staub zu entfernen, wurde diese vor Beginn der Messungen durch einen Sterilfilter (Minisart, Sartorius) filtriert. Hierbei wurden generell Filter mit 200 nm oder 800 nm Porengröße verwendet. Mit Ausnahme der Experimente zur pH induzierten Aggregation wurden alle Messungen bei einem pH-Wert von 7,5 durchgeführt. Bei Anwendung niedrigerer pH-Werte wurde die Probe über Nacht gegen PBS mit dem entsprechenden pH-Wert dialysiert. Eine direkte Einstellung des pH-Werts erwies sich als unpraktikabel, da unter diesen Bedingungen keine auswertbaren Autokorrelationsfunktionen erhalten wurden.

Zur Untersuchung des Einflusses der N-Glykosylierung auf die Stabilität des hTfR wurden die N-Glykane quantitativ entfernt. Hierzu wurde eine hTfR-Lösung (700 µg/ml) für 18 Stunden mit PNGase F (10 U/ml) (Boehringer Mannheim) bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde in PBS (pH 7,5) mit 3 mM CHAPS durchgeführt. Zur Entfernung des CHAPS wurde das Material nach Beendigung der Inkubation über Nacht gegen PBS dialysiert. Die Vollständigkeit der Deglykosylierung wurde durch SDS-Gelelektrophorese nachgewiesen.

Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

Tetramethylrhodamin bzw. BODIPY markiertes ferri-Transferrin wurde von Molecular Probes Europe bezogen. Da beide Substanzen noch freien Farbstoff enthielten, welcher die Auswertung der FCS Messungen stark beeinträchtigte, wurden die markierten Transferrine weiter gereinigt. Dies geschah mit Hilfe von PD-10 Säulen (Pharmacia). Das Material wurde insgesamt fünfmal auf die Säule aufgegeben. Nach jedem Durchlauf wurde es mit Hilfe eines Ultrafree-4 Zentrifugenfilters, 30kD molare Ausschlußmasse (Millipore) wieder aufkonzentriert. Während im Fall des TMR-markierten Transferrins die Konzentration des freien Farbstoffs auf unter 5%, bezogen auf die Teilchenzahl, abgesenkt werden konnte, enthielt das BODIPY-markierte Transferrin nach der Reinigung noch immer 30% freien Farbstoff. Aus diesem Grund wurden alle kinetischen Experimente nur mit TMR-markiertem Transferrin durchgeführt.

Zur Bestimmung der Bindungskonstante wurde eine Lösung mit 23 nM TMR-Transferrin eingesetzt. Diese wurde vor Beginn der Messungen eine Stunde lang bei Raumtemperatur mit einer hTfR Lösung (1nM bis 2 µM bezogen auf die Zahl der Bindungsstellen) inkubiert. Das gesamte Probenvolumen betrug durchgehend je 100 µl. Zur Messung der Assoziationskinetiken wurden 90 µl einer hTfR Lösung zu

10 µl einer TMR-Transferrin Lösung gegeben. Die Konzentrationen beider Lösungen waren jeweils so gewählt, daß die Reaktion pseudo-erster Ordnung in Bezug auf hTfR war.

Zur Durchführung der Dissoziations-Austausch Experimente wurde zuerst der Komplex zwischen TMR-Transferrin und hTfR dargestellt. Hierzu wurden hTfR und TMR-Transferrin im Verhältnis 1:2 gemischt und 60 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. In der Lösung war danach kein freies TMR-Transferrin mehr nachweisbar. Der Komplex wurde dann mit unterschiedlichen Konzentrationen von unmarkiertem ferri-Transferrin versetzt. Das Probenvolumen betrug auch hier jeweils 100 µl.

Kalorimetrie

Zur Messung der Bindungsenthalpie der Reaktion zwischen ferri-Transferrin und hTfR wurde eine Lösung von hTfR in PBS mit Hilfe einer Centriprep 30 Einheit (AMICON) auf eine Konzentration von 4,4 mg/ml aufkonzentriert. Diese Lösung wurde im Differenz-Titrations-Kalorimeter mit einer Lösung von 40,7 mg/ml ferri-Transferrin in PBS titriert.

Für die DSC Experimente wurde eine Lösung von 4,5 mg/ml von hTfR in PBS verwendet. Die Probe wurde extensiv gegen PBS dialysiert. Der Dialysepuffer diente dann als Referenz während der DSC Messungen. Wieder wurde zum Aufkonzentrieren eine Centriprep 30 Einheit verwendet. Alle kalorimetrischen Messungen wurden bei einem pH-Wert von 7,5 durchgeführt.

Ultrazentrifugation

Für die analytische Ultrazentrifugation wurde die verwendete hTfR Lösung auf eine Konzentration von 0,85 mg/ml eingestellt. Alle Experimente wurden in PBS, pH 7,5 durchgeführt.

CD-Spektroskopie

Phosphatpuffer weisen eine relativ starke Absorption im kurzwelligen UV-Bereich auf. Daher sind sie zur Aufnahme von CD-Spektren im allgemeinen ungeeignet. Stattdessen wurde ein 10 mM Natriumkacodylatpuffer mit 150 mM Kochsalz verwendet. Die Proben wurden jeweils über Nacht gegen diesen Puffer dialysiert. Für alle Experimente wurde eine Proteinkonzentration von 50 µg/ml eingesetzt, welche durch entsprechende Verdünnung der Ausgangslösung erhalten wurde.