

# 4 Diskussion

## 4.1 Kolloidale Eigenschaften

In detergenzfreier, wässriger Lösung liegt hTfR hauptsächlich in Form von Partikeln mit einem hydrodynamischen Radius von 17 nm vor. Nur ca. 5% des Materials tritt in Form von Aggregaten mit größerem Radius auf. Kleinere Partikel, wie z. B. einzelne Rezeptordimere waren weder mit Lichtstreuung noch durch Ultrazentrifugation nachweisbar. Hieraus kann man schließen, daß die 17 nm Partikel unter diesen Bedingungen die dominierende Form darstellen.

Die hTfR Assoziate wurden erstmals auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen von rekonstituiertem hTfR in Phospholipidvesikeln entdeckt und grob charakterisiert, wobei jedoch nur die molare Masse und der Durchmesser bestimmt wurden, ohne ein spezifisches Modell für die Struktur der Partikel zu entwickeln (Fuchs et al., 1996, Fuchs et al., 1998). Durch Scanning-Transmissions-Elektronenmikroskopie wurde die molare Masse zu  $(1670 \pm 530)$  kD und der Durchmesser zu  $(31,5 \pm 2,9)$  nm bestimmt. Daraus wurde gefolgert, daß die Partikel aus 6-12 Rezeptordimeren bestehen müssen.

Zur genaueren Bestimmung der molaren Masse und um ein Strukturmodell für die Partikel zu entwickeln, wurden mit Ultrazentrifugationsexperimenten die molare Masse auf zwei unterschiedliche Arten bestimmt. Es ergaben sich  $(1722 \pm 87)$  kD im Sedimentationsgleichgewichts-Experiment und  $(1675 \pm 46)$  kD im Sedimentationsgeschwindigkeits-Experiment. Beide Werte stimmen innerhalb der Fehlergrenzen überein und stehen auch in Übereinstimmung mit den elektronenmikroskopischen Daten, wobei jedoch die Unsicherheit des Wertes für die molare Masse deutlich durch Ultrazentrifugation verringert werden konnte. Die aus der Primärsequenz berechnete molare Masse eines hTfR Monomers beträgt 93,18 kD. Hieraus läßt sich schließen, daß die Partikel aus 9 hTfR Dimeren bestehen.

Aus den im Sedimentationsgeschwindigkeits-Experiment bestimmten Diffusions- und Sedimentationskoeffizienten, und dem anhand der Primärstruktur berechneten partiellen spezifischen Volumen ergibt sich gemäß Gleichung 28 ein molares Reibungsverhältnis von  $1,687 \pm 0,021$ . Dieser relativ hohe Wert deutet auf eine stark asymmetrische Struktur oder eine Ringstruktur hin. Aufgrund der molaren Masse und dem partiellen spezifischen Volumen des hTfR läßt sich nach Gleichung 29 ein Volumen von  $2,050 \text{ nm}^3$  für das nicht hydratisierte Molekül berechnen. Wenn nun die hTfR Partikel kompakte Kugeln wären, müßten diese einen Radius von 7,9 nm haben (Gleichung 30). Dieser berechnete Radius steht im Widerspruch zu dem

durch PCS ermittelten Wert und ist auch mit dem hohen molaren Reibungsverhältnis nicht zu vereinbaren. Eine lineare Anordnung der hTfR Dimere im Partikel kann ebenso ausgeschlossen werden, da die elektronenmikroskopischen Aufnahmen eine ringförmige Struktur der Partikel nahelegen. Außerdem müßte bei Vorliegen einer linearen Struktur die Verteilung der gemessenen Sedimentationskoeffizienten breiter sein als experimentell beobachtet wurde. Daraus folgt, daß die hTfR Dimere in den Assoziaten mehr oder weniger ringförmig angeordnet sein müssen.

Um das wahrscheinlichste Strukturmodell für die Partikel durch Simulationsrechnungen zu finden, wurden die Untereinheiten des Rezeptors als kugelförmig angenommen. Das Gesamtvolumen eines Partikels kann dann durch 18 Kugeln repräsentiert werden, wobei der Radius einer Rezeptoruntereinheit auf der Basis der Primärstruktur und der experimentellen Daten zu 3,4 nm berechnet wurde.

Für verschiedene Strukturmodelle wurden geometrische Anordnungen konstruiert und sowohl Sedimentations- als auch Diffusionskoeffizienten berechnet und mit den experimentellen Befunden verglichen. Die beste Übereinstimmung zwischen berechneten und experimentellen Daten liefert die in Abb. 4-1 dargestellte Anordnung. In diesem Modell sind die 9 hTfR Dimere so angeordnet, daß sie eine

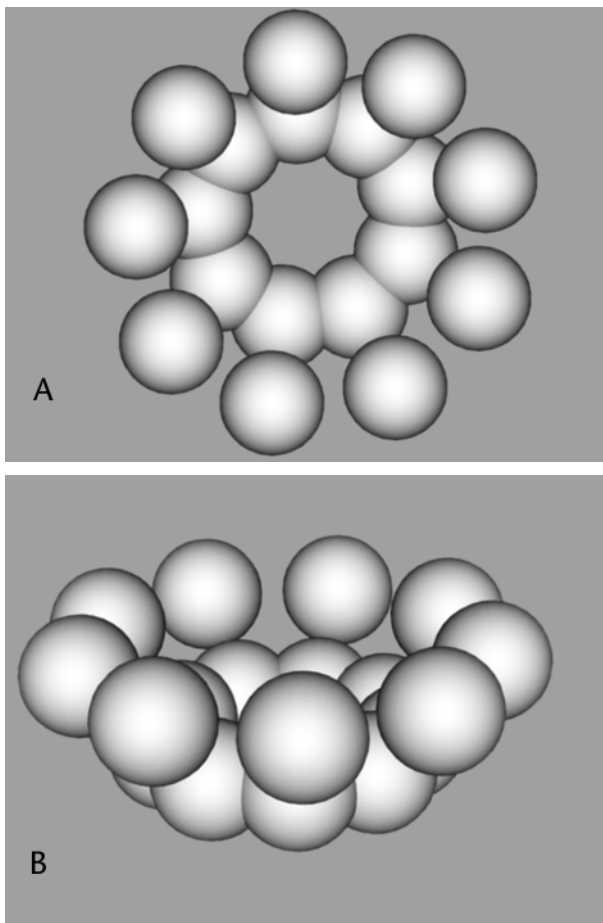


Abb. 4-1 *Auf- und Seitenansicht des Strukturmodells für das 17 nm hTfR Partikels. Die Monomere werden durch Kugeln mit einem Radius von 3,4 nm dargestellt. Die insgesamt 9 hTfR Dimere sind kreisförmig um einen zentralen Kanal angeordnet, wobei die Dimere um 52° gegen die Mittelachse geneigt sind. Der Radius der Struktur beträgt 17 nm und ihre Höhe 13 nm. Die Simulationsrechnungen ergeben einen Sedimentationskoeffizienten von 30,98 S und einen Diffusionskoeffizienten von  $1,623 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ . Beide Werte stehen in guter Übereinstimmung mit den experimentell bestimmten Daten des hTfR Partikels. Auch der Radius entspricht dem experimentellen Wert.*

torus-förmige Struktur bilden. Die Dimere sind ringförmig um einen zentralen Kanal angeordnet, der von Lösungsmittel durchflossen wird. Der Radius dieser Struktur beträgt 17 nm und ihre Höhe 13 nm. Die Dimere sind um  $52^\circ$  gegen eine Ebene parallel zur Mittelachse der Struktur gedreht. Prinzipiell wären auch andere Drehwinkel denkbar; die dadurch entstehenden Strukturen weisen jedoch Sedimentationskoeffizienten auf, die 1 S bis 2 S von den experimentell bestimmten abweichen. Das hier vorgeschlagene Modell liefert einen rechnerischen Sedimentationskoeffizienten von 30,98 S und einen Diffusionskoeffizienten von  $1,623 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ . Beide Koeffizienten befinden sich in guter Übereinstimmung mit den experimentell bestimmten Werten von  $(30,4 \pm 0,5) \text{ S}$  und  $(1,610 \pm 0,017) \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ . Auch der Radius des Modells entspricht dem experimentell bestimmten Wert für die hTfR Partikel.

## 4.2 Aggregation

Aggregationsprozesse und die dadurch entstehenden Strukturen lassen sich mit Hilfe der fraktalen Geometrie charakterisieren. Die fraktale Dimension dient in diesem Zusammenhang zur Beschreibung der geometrischen Eigenschaften von Aggregaten und erlaubt Rückschlüsse auf den Mechanismus der Aggregation. Obwohl ursprünglich die Aggregation anorganischer Systeme, wie z. B. Silica und kolloidalem Gold, mit Hilfe der fraktalen Geometrie beschrieben worden ist, hat sich dieses Konzept in der jüngeren Vergangenheit erfolgreich auf die Aggregation von Proteinen übertragen lassen (Feder et al., 1984, Horne, 1987, Rarity et al., 1989, Georgalis et al., 1993).

Durch die fraktale Geometrie lassen sich komplexe Strukturen mathematisch beschreiben. Die fraktale Dimension stellt die Kerngröße dar und nimmt in der Regel nichtganzzahlige Werte an, wobei die geläufigen Dimensionen der euklidischen Geometrie als Grenzfälle einer ganzzahligen fraktalen Dimension betrachtet werden.

Allgemein lassen sich Fraktale als selbstähnliche Strukturen beschreiben (Mandelbrot, 1982). Dies bedeutet, daß die Eigenschaften eines Fraktals unabhängig von der verwendeten Größenskala sind und gilt uneingeschränkt bei nichtzufälligen, mathematisch berechneten Fraktalen, wie z. B. der bekannten Mandelbrot Menge. Hier wiederholen sich immer die gleichen Strukturelemente, gleichgültig bei welcher Vergrößerung die Funktion betrachtet wird. Bei zufälligen Fraktalen, wie sie z. B. durch Aggregationsprozesse entstehen, können in Abhängigkeit von der verwendeten Größenskala unterschiedliche Struktureigenschaften, wie z. B. massen- und

oberflächenfraktale Dimension, beobachtet werden (Hurd, 1987). Ferner existiert hier eine bestimmte Größenordnung, wobei es sich z. B. um die Größe eines Monomers handeln kann, unterhalb der die fraktalen Eigenschaften nicht mehr erkennbar sind.

Gemäß der DLVO Theorie (für einen Überblick s. Hunter, 1987) beruht die Aggregation von identischen kolloidalen Partikeln auf einem Gleichgewicht zwischen anziehenden London Wechselwirkungen und abstoßenden Coulomb Kräften. Die anziehenden Wechselwirkungen sind betragsmäßig stärker als die abstoßenden, fallen dafür aber mit der sechsten Potenz des Abstands zwischen zwei Partikeln ab, während die Coulomb Wechselwirkungen nur mit dem Quadrat des Abstands geringer werden. Die Beträge und damit das Gleichgewicht zwischen beiden Kräften hängen von der Struktur und der Ladungsverteilung auf der Oberfläche der Partikel ab weiterhin bestimmt die Zusammensetzung des Lösungsmittels und damit z. B. die Beschaffenheit der Ionenschichten, welche jedes Teilchen umgeben, die Stabilität einer kolloidalen Lösung.

Die Partikel in einer Lösung diffundieren aufgrund der Brownschen Molekularbewegung auf zufälligen Bahnen durch das Lösungsmittel. Sie besitzen eine bestimmte kinetische Energie, die unter anderem von der Temperatur der Lösung abhängt. Die Frage, ob es zu einer Aggregation kommt, hängt nun davon ab, ob die kinetische Energie der Teilchen groß genug ist, um bei einem Zusammenstoß die Coulombkräfte soweit zu überwinden, daß die anziehenden Wechselwirkungen wirksam werden können.

Falls die anziehenden Wechselwirkungen sehr viel stärker als die abstoßenden sind, führt jeder Kontakt zwischen zwei Teilchen zur Aggregation. Die Geschwindigkeit der Aggregation ist nur durch die Diffusionsgeschwindigkeit der Partikel bestimmt. Daher wird dieser Mechanismus als "Diffusion limited colloidal aggregation" oder DLCA bezeichnet. Der Radius  $R_h$  der aus Monomeren mit dem Radius  $R_0$  gebildeten Aggregate nimmt hierbei gemäß eines Potenzgesetzes mit der Zeit  $t$  zu. Es gilt:

$$R_h(t) = R_0(1 + Ct)^{\frac{z}{d_m}} \quad (42)$$

$C$  ist eine Konstante, die charakteristisch für das jeweilige System ist und  $d_m$  ist die fraktale Dimension der gebildeten Aggregate. Der Parameter  $z$  bezeichnet die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Kontakt zwischen den Partikeln zur Aggregation führt. Im Fall der DLCA ist dieser Parameter definitionsgemäß gleich eins.

Die fraktale Dimension kann aus der Steigung einer doppelt-logarithmischen Auftragung des Radius gegen die Zeit erhalten werden. Für Aggregationsprozesse, die gemäß eines DLCA Mechanismus ablaufen, erhält man immer eine fraktale Dimension von 1,8 (Weitz und Oliveria, 1984, Weitz et al., 1985, Weitz und Lin, 1986).

Diese relativ lockeren Strukturen entstehen dadurch, daß alle Kontakte zwischen Partikeln zur Aggregation führen. Ein Partikel, welches mit einem wachsenden Aggregat in Kontakt kommt, lagert sich bevorzugt an der Peripherie der wachsenden Struktur an und hat praktisch keine Gelegenheit, bis in innere Regionen des Aggregates vorzudringen. Dieser Sachverhalt ist schematisch in Abb. 4-2 dargestellt. In der Praxis findet sich DLCA Aggregation in vielen anorganischen Systemen, aber auch während der Präkristallisationsphase von Lysozym (Georgalis et al, 1992, Georgalis et al., 1993).

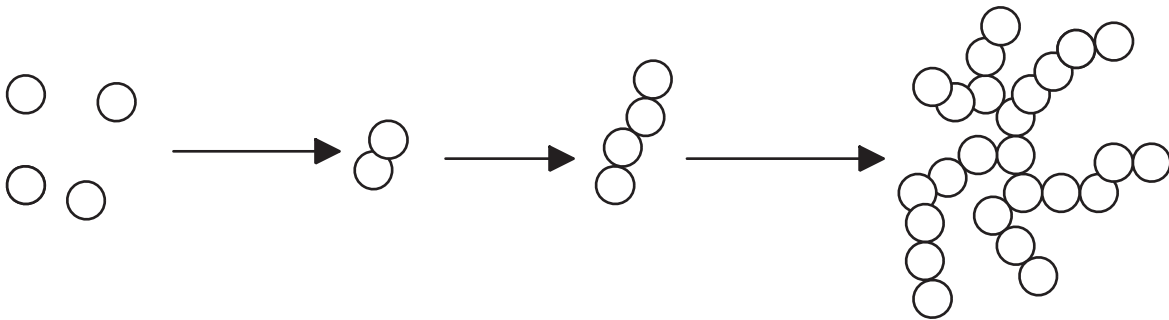


Abb. 4-2 Schema einer DLCA Aggregation. Jeder Kontakt zwischen Partikeln führt zur Anlagerung. Die Wachstumsgeschwindigkeit der Aggregate ist nur durch die Diffusionsrate bestimmt. Partikel, die in Kontakt mit einem wachsenden Aggregat kommen, lagern sich bevorzugt an die Peripherie an. Hierdurch kommt es zu lockeren Strukturen mit einer fraktalen Dimension von 1,8.

Falls die abstoßenden Kräfte gegenüber den anziehenden nicht vernachlässigt werden können, führt nicht mehr jeder Kontakt zwischen Partikeln zur Anlagerung. Die Geschwindigkeit des Wachstums der Aggregate hängt in diesem Fall von dem Anteil der Begegnungen zwischen den Teilchen ab, welcher zu einer Anlagerung führt. Daher wird dieser Mechanismus als "Reaction limited colloidal aggregation" oder RLCA bezeichnet. Der Radius der gebildeten Aggregate nimmt hierbei exponentiell mit der Zeit zu. Es gilt:

$$R_h(t) = R_0 \exp(C\alpha t) \quad (43)$$

Hierbei ist  $\alpha$  die Wahrscheinlichkeit für eine Anlagerung nach einem Kontakt. Ein typischer Wert für die fraktale Dimension der nach diesem Mechanismus gebildeten Aggregate ist 2,1 (Lin et al., 1989, Lin et al., 1990). Die hier gebildeten Strukturen sind kompakter als beim DLCA Mechanismus. Dies kann man dadurch erklären, daß nicht jeder Kontakt zur Anlagerung führt und die Partikel die Möglichkeit haben, bis ins Innere des Aggregates vorzudringen. Die RLCA Aggregation ist schematisch in Abb. 4-3 dargestellt. Es ist zu beachten, die fraktale Dimension nicht aus ei-

ner Auftragung des Radius gegen die Zeit ermittelt werden kann. Man muß diese daher mit Hilfe anderer Auswerteschemata bestimmen.

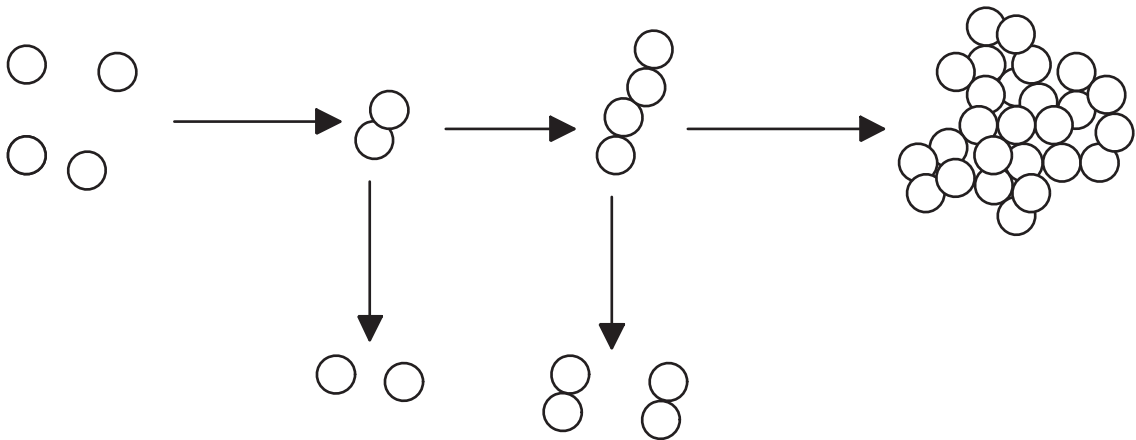


Abb. 4-3 Schema einer RLCA Aggregation. Ein Kontakt führt nur noch mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit zur Anlagerung. Die Geschwindigkeit der Aggregation hängt von der Zahl der zur Anlagerung führenden Kontakte ab. Die entstehenden Aggregate sind kompakter als bei einer DLCA Aggregation, weil Partikel leichter in Innere der Struktur vordringen können. Die fraktale Dimension beträgt 2,1.

Die hTfR Partikel besitzen bei 293,2 K einen Radius von 17 nm. Erhöhung der Temperatur auf 340,2 K führt zur spontanen Aggregation (Abb. 3-4). Der Verlauf der Aggregation kann mit Hilfe der PCS problemlos verfolgt werden. Die Autokorrelationsfunktionen, welche während verschiedener Stadien der Aggregation aufgenommen wurden, unterscheiden sich deutlich voneinander und die Partikelverteilungen können bestimmt werden (Abb. 3-5). Allerdings erhöht sich im Verlauf der Aggregation die Polydispersität der Probe, was sich negativ auf die Genauigkeit der Bestimmung des Radius auswirkt. Der erhöhte Meßfehler ist bis zu einem Partikelradius von 1  $\mu\text{m}$  akzeptabel. Bei größeren Partikeln können jedoch kaum noch Aussagen über den Radius gemacht werden (Martin und Ackerson, 1985, Martin und Leyvraz, 1986).

Im Fall eines DLCA Mechanismus kann die fraktale Dimension aus der Zeitabhängigkeit des Radius der Aggregate ermittelt werden. In einer doppelt-logarithmischen Auftragung ergibt sich eine Gerade. Der reziproke Wert ihrer Steigung ist gleich der fraktalen Dimension. Eine solche Darstellung findet sich in Abb. 3-6A. Die Steigung beträgt hier  $1,90 \pm 0,02$ . Dieser Wert ist mit einer DLCA Aggregation nicht vereinbar, da hier die Steigung etwa 0,56 betragen müßte. Andererseits folgt für die hier betrachtete späte Phase der Aggregation die Abhängigkeit des Radius von der Zeit einem Potenzgesetz. Da diese Umstände nicht allein zu interpretieren sind, können

aus Abb. 3-6A keine Rückschlüsse auf den Aggregationsmechanismus gezogen werden.

Anders ist die Situation in der Anfangsphase der Aggregation. Hier besteht eine exponentielle Abhängigkeit des Radius von der Zeit (Abb. 3-6B). Diese Abhängigkeit deutet auf eine Aggregation nach einem RLCA Mechanismus hin. Eine nichtlineare Anpassung liefert einen Wert von 13 nm für die kleinste aggregierende Einheit. Dieser Wert stimmt recht gut mit dem Radius der hTfR Partikel überein. Für das Produkt  $C\alpha$  ergibt sich dann ein Wert von  $(5,13 \pm 0,08) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ . Die fraktale Dimension der Aggregate läßt sich anhand einer Auftragung gemäß Abb. 3-6B jedoch nicht ermitteln. Hierzu muß man eine Auswertung verwenden, welche von Pusey und Rarity (1987) vorgeschlagen wurde. Die Streuintensität wird doppelt-logarithmisch gegen den Radius aufgetragen. Sofern die Partikel nicht zu groß sind, ergibt sich eine Gerade, deren Steigung der fraktalen Dimension entspricht. Eine solche Darstellung findet sich in Abb. 3-7A. Die Steigung der Regressionsgerade beträgt  $2,18 \pm 0,03$ . Dieser Wert spricht stark für das Vorliegen eines RLCA Mechanismus während der Anfangsphase der Aggregation.

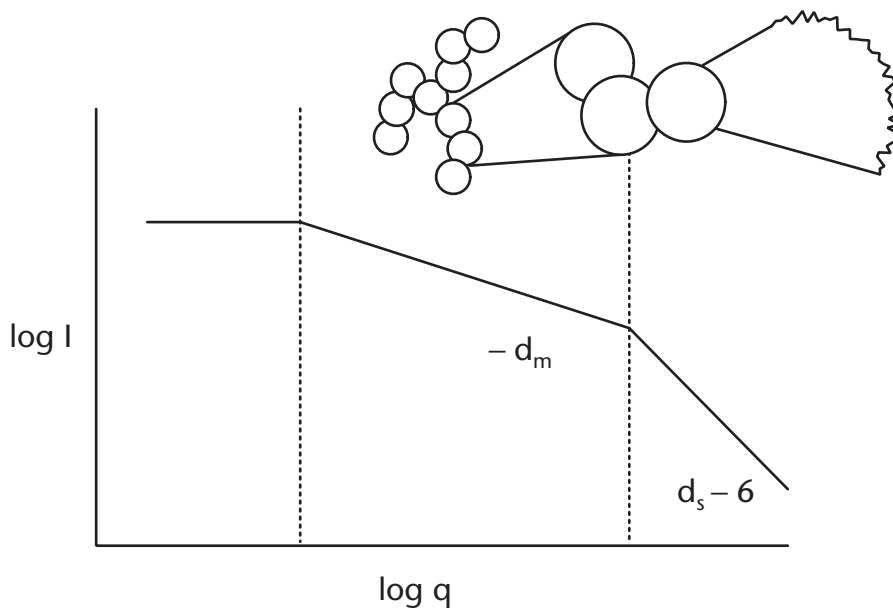


Abb. 4-4 Je nach Größenskala kann man verschiedene Eigenschaften fraktaler Systeme betrachten. Wenn die Partikel klein gegenüber der Lichtwellenlänge sind besteht keine Abhängigkeit zwischen Streuintensität und Streuvektor. Werden die Partikel größer erkennt man zuerst die massenfraktale Dimension  $d_m$  und dann die oberflächenfraktale Dimension  $d_s$ . Diese beschreibt die Rauigkeit der Oberfläche oder genauer die Geometrie der Begrenzungen der Poren in einer Oberfläche.

Die geometrischen Eigenschaften von größeren Aggregaten für die gilt:

$$qR_h > 1 \quad (44)$$

können über die Abhängigkeit der Streuintensität vom Streuvektor bestimmt werden. Diese liefert einen charakteristischen Exponenten, der von der Größe und der Struktur der Partikel sowie von der räumlichen Auflösung des Experiments abhängt. In Abb. 3-7B ergibt sich ein charakteristischer Exponent von  $-(3,38 \pm 0,04)$ . Solche nicht-ganzzahligen Werte wurden auch bei Experimenten zur Aggregation von Silica (Schaefer et al., 1984) und Holzkohlenpartikeln (Bale und Schmidt, 1984) gefunden; sie kommen durch Streuung an porösen Strukturen zustande.

Der charakteristische Exponent hängt von der fraktalen Dimension der Aggregate und der Größenskala, auf der die Experimente durchgeführt werden, ab. Dieser Zusammenhang ist schematisch in Abb. 4-4 dargestellt. Da der Streuvektorbereich von den experimentellen Bedingungen, z. B. Streuvektor und Lichtwellenlänge, vorgegeben ist, können bestimmte Eigenschaften der Partikel in einem gegebenen Experiment untersucht werden. Welche das im Einzelfall sind, hängt davon ab, wie groß der Radius der Partikel im Vergleich zum Streuvektor ist. Die experimentellen Bedingungen definieren damit ein Fenster, in welchem die entsprechenden Partikel während ihrer Entwicklung sichtbar sind. Verlassen die Partikel diesen Bereich, ist ihr weiteres Verhalten nicht mehr zu beobachten.

Wenn die Massenverteilung homogen erscheint, ist die massenfraktale Dimension  $d_m$  gleich 3. Für den Exponenten gilt dann:

$$p = -6 + d_s \quad (45)$$

Hierbei steht  $d_s$  für die oberflächenfraktale Dimension, welche die Rauigkeit der Aggregate beschreibt. Glatte Partikel weisen eine oberflächenfraktale Dimension von 2 auf, woraus sich ein charakteristischer Exponent von  $-4$  ergibt. Allgemein nimmt die oberflächenfraktale Dimension Werte zwischen 2 und 3 an. Im Fall der hier betrachteten Aggregate ergibt sich ein Wert von 2,62.

Nach der thermisch induzierten Aggregation wurden die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt und 18 Stunden nach Beendigung der Lichtstreuexperimente lichtmikroskopisch untersucht. Hierbei ergab sich, daß neben den erwarteten großen, fraktalen Aggregaten auch kleine, dendritische Partikel sichtbar waren (Abb. 3-8). Diese zeigten Doppelbrechung, was auf eine kristalline Struktur hindeutet. Um das Vorhandensein kristalliner Strukturen zu erklären, muß man irgendeine Art von Nukleationsprozess annehmen. Dieser impliziert die Bildung von gleichmäßig dichten Partikeln mit glatter Oberfläche (Schaefer et al., 1989). Einen detaillierteren Einblick in die Prozesse, die zur Bildung kristalliner Strukturen führen, liefern zeitauf-



gelöste statische Lichtstreuungsmessungen (Abb 3-9A). Hier wurde während der gesamten Aggregation die Streuintensität als Funktion des Streuvektors gemessen. Die erhaltenen Kurven bestehen aus zwei Segmenten mit unterschiedlichen Steigungen. Die Änderungen dieser beiden Steigungen mit der Zeit ist in Abb. 3-9B dargestellt. Die obere Kurve beginnt bei einem Wert von ca.  $-2$  und endet bei einem Wert von  $-4$ . Die untere Kurve hingegen beginnt bei  $-5$  und nähert sich dann ebenfalls einem Endwert von  $-4$ . Dieses Verhalten läßt sich interpretieren, indem man das Auftreten von mindestens zwei verschiedenen Partikelarten bzw. Wachstumsmechanismen annimmt.

1. handelt es sich um kleine, glatte Partikel, welche von Grenzflächenschichten (interfacial layers) umgeben sind. Bei Auftreten solcher Grenzflächenschichten, kann die oberflächenfraktale Dimension Werte unter 2 annehmen, womit erklärt werden kann, daß der charakteristische Exponent Werte im Bereich von  $-5$  annimmt. Diese kleinen Partikel wachsen weiter und bilden schließlich größere Partikel mit relativ glatter Oberfläche.

2. Dieser Prozeß ist eine RLCA Aggregation, wobei zunächst Partikel mit einer fraktalen Dimension von ca. 2,1 gebildet werden. Dies äußert sich in einem charakteristischen Exponenten von  $-2$ . Im weiteren Verlauf der Aggregation kommt es zu Umordnungen, wobei die Partikel kompakter werden und schließlich ein charakteristischer Exponent von  $-4$  beobachtet werden kann. Mit diesem sicherlich stark vereinfachenden Modell kann die Bildung von gleichmäßig dichten, glatten Partikeln erklärt werden. Zumindest ein Teil dieser Partikel könnte kristalline Strukturen ausbilden. Ähnliche Ergebnisse zeigten Studien zur Kristallisation von Zeolithen (Dokter et al., 1995). In dieser Arbeit wurden charactersichtische Exponenten von  $-1,5$  zu Beginn der Aggregation beobachtet. Die Exponenten erreichten in der Endphase schließlich Werte von  $-4$ . Dieses Verhalten wurde mit der Annahme von 2 Restrukturierungsschritten erklärt, welche von fraktalen Aggregaten zu kristallinen Strukturen führen.

Die Erhöhung der Temperatur führt nicht nur zur Aggregation, sondern möglicherweise auch zu einer Konformationsänderung. Um diese Auswirkungen zu untersuchen, wurden CD-Spektren bei verschiedenen Temperaturen aufgenommen (Abb. 3-11). Es ist zu erkennen, daß sich der Anteil der  $\alpha$ -helikalen Regionen des hTfR mit steigender Temperatur vermindert. Allerdings sind die temperaturinduzierten Änderungen der CD-Spektren noch vergleichsweise moderat, wenn man sie mit dem Spektrum vergleicht, welches nach vollständiger Denaturierung durch SDS gemessen wurde (Abb. 3-11B). Dennoch ist die Frage, ob das Protein bei einer Temperatur von 340,2 K denaturiert vorliegt, nur sehr schwer zu beantworten. Es wurde für verschiedene Membranproteine gezeigt, daß eine Denaturierung nicht notwendigerweise mit einer grundlegenden Änderung der Konformation verbunden ist (Haltia und Freire, 1995). Generell sind die membrandurchspannenden Bereiche

von Membranproteinen relativ stabil gegen Denaturierung, während sich die extrazellulären Bereiche eher wie globuläre Proteine verhalten. Im DSC Experiment (Abb. 3-10) war nur ein Phasenübergang zu erkennen mit einer Übergangstemperatur, welche um ein Grad über der Temperatur lag, bei der die Aggregation beginnt. Es kann aufgrund dieser Messungen nicht ausgeschlossen werden, daß Aggregation und Denaturierung bei unterschiedlichen, wenn auch nahe beieinander liegenden Temperaturen ablaufen und lediglich die Auflösung der DSC Messungen zu gering war.

Unter den Bedingungen, bei denen die Lichtstreuexperimente durchgeführt wurden, ist ein Teil des Materials möglicherweise denaturiert. Gegen eine vollständige Denaturierung spricht das Auftreten von kristallinen Strukturen, die mit denaturiertem Material normalerweise nicht beobachtet werden. Ferner haben Feder et al. (1984) gezeigt, daß während der temperaturinduzierten Aggregation von Immunglobulinen (IgG) ca. 60% des Materials in nativer Form vorliegt. Dies spricht gegen eine vollständige Denaturierung des hTfR bei 340,2 K.

Die Aggregation von hTfR kann nicht nur thermisch induziert werden, sondern auch durch N-deglykosylierung und durch Erniedrigung des pH Werts. Unter beiden Bedingungen wurde das Aggregationsverhalten des hTfR mit Hilfe von PCS und statischer Lichtstreuung untersucht, wobei jedoch keine zeitaufgelösten Experimente durchgeführt werden konnten. Die Deglykosylierung erfordert eine längere Präparation, bevor die Proben im Lichtstreuexperiment eingesetzt werden können. Der pH-Wert kann zwar durch direkte Zugabe einer Säure schlagartig erniedrigt werden, doch sind dann von Anfang an lediglich sehr große Aggregate zu erkennen und die Experimente liefern keine auswertbare Kinetik. Möglicherweise liegt dies daran, daß bei Zugabe von Säure kurzfristig (bis eine Durchmischung erfolgt) ein sehr niedriger pH Wert auftritt, welcher zur sofortigen Aggregation führt.

Aus den genannten Gründen konnten unter diesen Bedingungen nur die Radien der Aggregate und die charakteristischen Exponenten nach Beendigung der Aggregation bestimmt werden. Es ergab sich, daß die Exponenten ähnliche Werte annehmen wie bei der thermisch induzierten Aggregation. Es wurde jedoch in keinem der Ansätze kristallines Material, sondern nur fraktale Aggregate gefunden. Man kann aufgrund dieser Ergebnisse über den Reaktionsmechanismus spekulieren. Es erscheint am wahrscheinlichsten, daß unter diesen Bedingungen eine reine RLCA Aggregation stattfindet, die möglicherweise von Umlagerungsschritten gefolgt oder begleitet wird. Die Überlegungen zur Denaturierung können sinngemäß auch auf diese Experimente übertragen werden. Die beobachteten CD-Spektren (Abb. 3-15) weisen geringere Änderungen gegenüber denen der nativen Form auf als im Fall der Temperaturerhöhung. Trotzdem müssen Konformationsänderungen als wahrscheinlich angenommen werden.

Die Aggregation des hTfR lässt sich in einem einfachen Modell beschreiben. Wie schon vorher gesagt, hängt die Stabilität der Partikel in einer kolloidalen Lösung von dem Gleichgewicht zwischen anziehenden und abstoßenden Wechselwirkungen und der thermischen Energie der Teilchen ab.

In detergenzfreier Lösung bei pH 7,5 sind die hTfR Partikel über eine nahezu unbegrenzt lange Zeit stabil. Das bedeutet, daß die abstoßenden Wechselwirkungen so stark sind, daß Kontakte zwischen zwei Partikeln praktisch nie zu einer Anlagerung

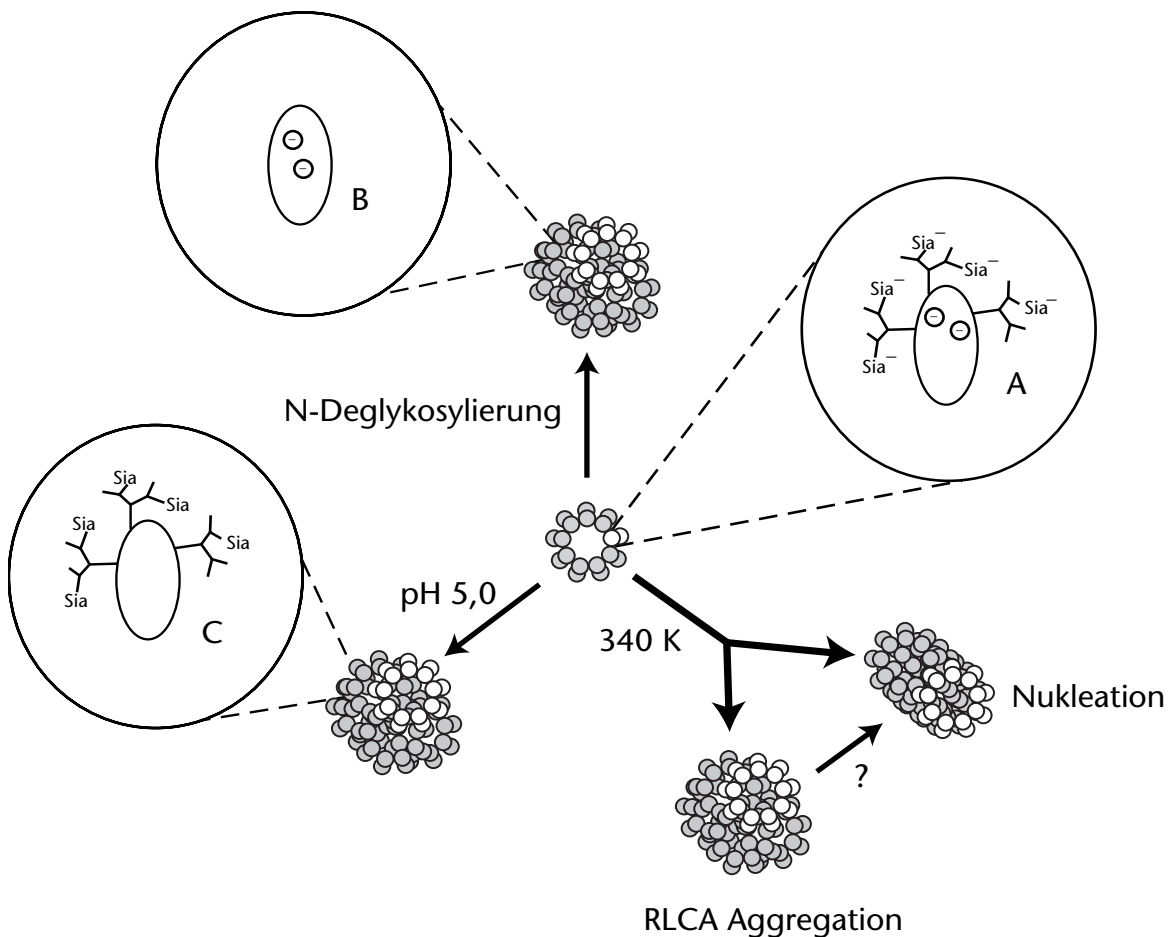


Abb. 4-5 Modell zur Aggregation von hTfR Partikeln. Bei neutralem pH sind die Partikel negativ geladen. N-Deglykosylierung und pH Absenkung vermindern die Ladungsdichte auf der Oberfläche und begünstigen eine Aggregation. Bei Erhöhung der Temperatur erhöht sich die kinetische Energie der Teilchen und eine höhere Zahl der Kontakte führt zur Anlagerung. Eine Bildung von Kristallkeimen aus fraktalen Aggregaten ist nach den vorliegenden experimentellen Daten nicht ausgeschlossen. Die hier beschriebenen Prozesse werden eventuell auch von Konformationsänderungen begünstigt.

führen. Der isoelektrische Punkt des hTfR liegt zwischen 5,2 und 6,0 (Snyder und Rogers, 1985), so daß hTfR bei neutralem pH negative Ladungen an der Oberfläche trägt. Ein Teil der negativen Ladungen könnte in Form von Sialinsäureresten auf den N-glykosydisch gebundenen Kohlehydratketten liegen. Nach N-Deglykosylierung wird negative Ladungsdichte vom hTfR entfernt. Hierdurch werden die abstoßenden Coulombkräfte so stark vermindert, daß Kontakte zwischen den Partikeln zur Anlagerung und damit zur Aggregation führen. Ein ähnlicher Vorgang spielt sich bei einer Absenkung des pH-Wertes ab. Negative Ladungen an der Oberfläche der Partikel werden durch Protonierung neutralisiert. Dies führt ebenfalls zu einer Schwächung der Coulombkräfte und zur Aggregation.

Eine zweite Möglichkeit die Zahl der Kontakte, welche zur Anlagerung führen zu erhöhen, besteht in einer Erhöhung der kinetischen Energie der Partikel. Bei Anheben der Temperatur über einen bestimmten Schwellenwert besitzen die Teilchen eine ausreichend hohe Energie, so daß die Partikel sich beim Kontakt soweit annähern, daß die anziehenden, jedoch nur kurzreichweitigen, Wechselwirkungen dominieren. Wieder ist das Resultat eine Aggregation. Alle hier beschriebenen Prozesse könnten durch Konformationsänderungen oder partielle Denaturierung, wobei hydrophobe Bereiche der Proteinketten an die Oberfläche geraten, unterstützt werden. Das hier vorgeschlagene Modell ist in Abb. 4-5 nochmals schematisch dargestellt.

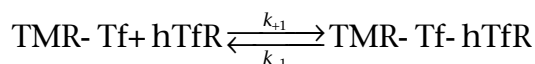
### 4.3 Rezeptor-Ligand Wechselwirkungen

In detergenzfreier Lösung bildet hTfR Partikel, welche aus 9 hTfR Dimeren bestehen. Durch die Bildung dieser supramolekularen Strukturen ist der Unterschied der molaren Masse zwischen den Partikeln und ferri-Transferrin groß genug, um die Rezeptor-Ligand Wechselwirkungen mit Hilfe der FCS zu untersuchen, wobei zwischen markiertem Transferrin und dem Rezeptor-Ligand Komplex unterschieden werden kann. Die relativen Anteile beider Komponenten sind durch Auswertung der Autokorrelationsfunktionen bestimmbar. Hierbei ist es jedoch nicht möglich, zwischen Komplexen mit unterschiedlichen Sättigungsgraden zu unterscheiden.

Der Anteil an gebundenem TMR-Tf zeigt eine Abhängigkeit von der eingesetzten hTfR Konzentration, wie man sie für die Bindung an gleiche und voneinander unabhängige Bindungsstellen erwartet. Aus der in Abb 3-17 gezeigten Bindungsstudie ergibt sich eine Dissoziationskonstante von  $7 \pm 3$  nM. Dieser Wert stimmt gut mit dem früher publizierten von 5 nM überein, welcher mit solubilisiertem Rezeptor unter Verwendung eines Radioimmunoassays bestimmt wurde (Anderson et al., 1986, Kanevsky et al., 1997) Aus der guten Übereinstimmung des mit FCS bestimmten

Wertes mit den Literaturdaten kann man schließen, daß die Bindungsstellen im wesentlichen an der Außenseite der Partikel lokalisiert und alle gleichermaßen gut zugänglich sind.

Die Experimente zur Assoziationskinetik ergeben für den Anteil an freiem TMR-Tf mono-exponentielle Abklingkurven (Abb. 3-18A). Die reziproke Relaxationszeit hängt linear von der eingesetzten hTfR Konzentration ab (Abb. 3-19). Dieses Verhalten läßt sich durch eine reversible bimolekulare Bindungsreaktion zwischen TMR-Tf an gleiche und voneinander unabhängige Bindungsstellen an der Oberfläche der hTfR Partikel erklären. Für die Reaktion gilt dann:

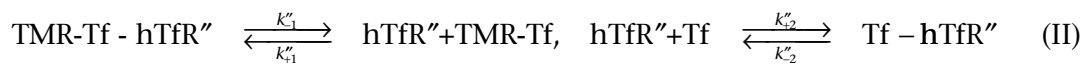
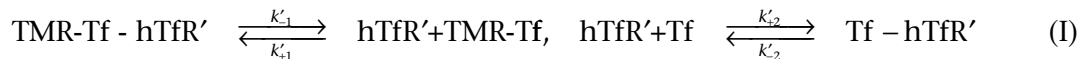
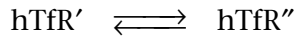


Die Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten  $k_{+1}$  und  $k_{-1}$  wurden aufgrund von Abb. 3-19 zu  $(1,1 \pm 0,1) \times 10^4 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$  und  $(6 \pm 4) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  bestimmt. Aus dem Quotienten  $k_{-1} / k_{+1}$  läßt sich die Dissoziationskonstante zu  $55 \pm 41 \text{ nM}$  berechnen. Die Abweichung von der direkt bestimmten Dissoziationskonstante und der sehr große Fehler sind auf die ungenaue Bestimmung der sehr kleinen Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante zurückzuführen.

Die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante sollte im Fall einer einfachen, diffusionskontrollierten Reaktion im Bereich von  $10^8 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$  liegen. Die für die Bindung von TMR-Tf an hTfR bestimmte Assoziationsgeschwindigkeitskonstante liegt um vier Größenordnungen unter diesem Wert. Daraus kann man schließen, daß es während der Reaktion zu Isomerisierungs- oder Umordnungsschritten kommt, welche die Geschwindigkeit der Reaktion beschränken.

Leider gibt es in der Literatur keine Angaben zu Geschwindigkeitskonstanten für die hier betrachtete Reaktion. Der Effekt der Fluoreszenzmarkierung des Liganden ist daher schwer abzuschätzen. Für den Fall der Bindung von TMR markiertem Bungarotoxin an den Acetylcholinrezeptor beobachteten Rauer et al. (1996) eine geringe Abnahme der Assoziationsgeschwindigkeitskonstante, verglichen mit dem für unmarkiertes Bungarotoxin erhaltenen Wert. Dies wurde durch sterische Hinderung erklärt. Man kann nicht ausschließen, daß solche Effekte auch in dem hier betrachteten System eine Rolle spielen, muß jedoch bedenken, daß TMR sehr klein im Vergleich zum Transferrin ist und an der Bindungsoberfläche sitzen müßte, um einen starken Effekt auszuüben. Daher ist diese Art der Beeinflussung der Geschwindigkeitskonstante weniger wahrscheinlich. Insgesamt erscheint die hier vorgestellte Interpretation der Assoziationskinetik unter Bedingungen pseudo-erster Ordnung sinnvoll. Die lineare Beziehung zwischen den Geschwindigkeitskonstanten und der hTfR Konzentration läßt sich unter den vorliegenden Bedingungen nur mit einer reversiblen bimolekularen Reaktion erklären.

Die Interpretation des Dissoziations-Austausch Experiments ist wesentlich schwieriger. In Gegenwart eines großen Überschusses von unmarkiertem ferri-Transferrin beobachtet man für die Abnahme der Konzentration des TMR-Tf-hTfR Komplexes doppelt-exponentielle Abklingkurven. Desweiteren ist die Kinetik der Verdrängungsreaktion von der Konzentration des unmarkierten Transferrins unabhängig. Dieses Verhalten kann man mit einem Mechanismus erklären, welcher zwei verschiedene Konformationen des hTfR voraussetzt. Es ergibt sich folgendes Reaktionsschema mit insgesamt sechs verschiedenen Zuständen:



Im Rahmen des Modells wird angenommen, daß Tf an beide hTfR Konformationen hTfR' und hTfR'' binden kann. Ferner ist die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation von Tf von der Konformation des hTfR abhängig. Damit gibt es zwei Möglichkeiten, (I) und (II), für die Verdrängung von TMR-Tf durch Tf.

Eine kinetische Auswertung von Reaktion (I) ergibt folgenden Ausdruck (Gutfreund, 1995):

$$\frac{1}{\tau} = \dot{k}_{-1} + \dot{k}_{-2} \quad (46)$$

mit

$$\dot{k}_{-1} = \frac{k'_{-1}}{1 + \frac{k'_{+1}[\text{TMR-Tf}]}{k'_{+2}[\text{Tf}]}} \quad (47)$$

und

$$\dot{k}_{-2} = \frac{k'_{-2}}{1 + \frac{k'_{+2}[\text{Tf}]}{k'_{+1}[\text{TMR-Tf}]}} \quad (48)$$

Wenn die Bedingungen so gewählt werden, daß  $[\text{Tf}] \gg [\text{TMR-Tf}]$  und wenn  $k'_{+1} \approx k'_{+2}$  ist reduziert sich der Ausdruck für die reziproke Relaxationszeit auf:

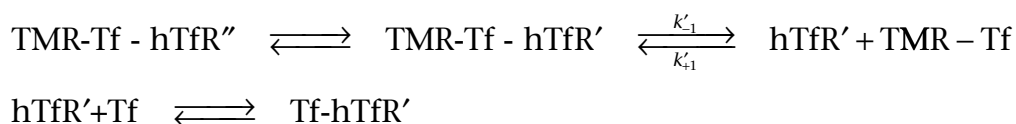
$$\frac{1}{\tau} = k'_{-1} \quad (49)$$

Für Reaktion (II) gilt sinngemäß die gleiche Argumentation.

Das vorgeschlagene Reaktionsschema berücksichtigt die doppelt-exponentiellen Abklingkurven, die bei der Verdrängung von TMR-Tf durch Tf auftreten und erklärt die Unabhängigkeit der Reaktion von der Konzentration des eingesetzten Tf.

Alternative Modelle, in welchen die Bindung von unmarkiertem Tf geschwindigkeitsbestimmend ist, können ausgeschlossen werden, da man dann eine Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit mit zunehmender Tf Konzentration beobachten müßte. Bei dem hier vorgeschlagenen Mechanismus hängt die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion nur von der Geschwindigkeit der Dissoziation des Komplexes TMR-Tf-hTfR ab.

Ein weiterer alternativer Mechanismus könnte mit einer langsamen Änderung der Konformation des TMR-Tf-hTfR Komplexes beginnen. Danach dissoziiert der Komplex und TMR-Tf wird freigesetzt. Die Reaktion läuft dann nach folgendem Schema ab:



Der schnelle Prozeß wäre die Freisetzung von TMR-Tf von der hTfR' Konformation, während der langsamere Prozeß die Umwandlung der hTfR'' Konformation in die hTfR' Konformation darstellt. Dieser Mechanismus ist zwar denkbar, jedoch mathematisch nicht von dem zuvor vorgeschlagenen zu unterscheiden. Streng genommen ist dieser Mechanismus sogar ein Spezialfall von jenem, bei dem angenommen wird, daß TMR-Tf nicht direkt von der hTfR'' Konformation abdissoziieren kann.

Neben den kinetischen Kenngrößen der Reaktion zwischen hTfR und TMR-Tf wurden auch die grundlegenden thermodynamischen Parameter der Komplexbildung gemessen. Aus den experimentell gefundenen Bindungskonstanten und der Enthalpie der Bindungsreaktion lassen sich die Änderungen der freien Enthalpie und der Entropie berechnen. Die Rechnung ergab eine leichte Abnahme der Entropie, was aber durch den großen Enthalpieanteil überkompensiert wurde. Daraus läßt sich folgern, daß die Bildung spezifischer nicht-kovalenter Bindungen zwischen Rezeptor und Ligand die treibende Kraft für die Komplexbildung ist. Demgegenüber spielen Änderungen der Solvatisierung der Moleküle keine große Rolle. Diese Prozesse sind eine der Haupttriebkraft für hydrophobe Wechselwirkungen und müßten eine starke Entropieänderung hervorrufen.

## 4.4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Studie sind die kolloidalen Eigenschaften des humanen Transferrinrezeptors und die Wechselwirkungen mit seinem Liganden Transferrin in detergenzfreier Lösung untersucht worden.

Mit Hilfe der Photonenkorrelationsspektroskopie konnte bestätigt werden, daß hTfR in detergenzfreier Lösung als ein Partikel mit einem Radius von 17 nm vorliegt. Dieses Partikel besteht aus insgesamt 9 Rezeptordimeren, wie Bestimmungen der molaren Masse der Partikel mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation zeigen. In den Partikeln sind die Rezeptordimere ringförmig um einen zentralen Kanal angeordnet, dabei sind sie um  $52^\circ$  gegen die Mittelachse gedreht. Hierdurch entsteht eine torus-förmige Struktur. Dieses mit Hilfe von hydrodynamischen Simulationsrechnungen entwickelte Modell reproduziert alle experimentell bestimmten Parameter der hTfR Partikel, wie den Radius und den Sedimentations- und Diffusionskoeffizienten.

Die Aggregation der hTfR Partikel läßt sich auf verschiedene Arten induzieren. Behandlungen, welche die Oberflächenladung der Partikel reduzieren, verringern die abstoßenden Wechselwirkungen und begünstigen eine Aggregation. Leider konnten sowohl im Fall der pH-abhängigen, als auch im Fall der durch N-Deglykosylierung induzierten Aggregation keine zeitaufgelösten Experimente durchgeführt werden. Daher konnte unter diesen Bedingungen lediglich der Endzustand der Aggregation beschrieben werden, was die Möglichkeiten einer Interpretation stark einschränkt.

Eine andere Möglichkeit, die Aggregation zu begünstigen, liegt in der Erhöhung der kinetischen Energie der kolloidal gelösten Teilchen. Genau dies geschieht bei Erwärmung der Lösung. In diesem Fall konnten detaillierte zeitabhängige Messungen vorgenommen werden. Die experimentellen Befunde lassen sich mit der Koexistenz von mindestens zwei Aggregationsprozessen beschreiben. Hierbei handelt es sich um eine Aggregation nach RLCA Mechanismus und eine Keimbildung. Dementsprechend entstehen fraktale Aggregate und kristalline Strukturen, wobei eventuell eine Umwandlung von fraktalen in kristalline Strukturen auftritt. Die Aggregationsprozesse werden möglicherweise von Konformationsänderungen des Proteins unterstützt bzw. begleitet, wobei es hier jedoch schwierig ist zwischen Ursache und Wirkung zu unterscheiden.

Die Bindung von Transferrin an hTfR Partikel läßt sich mit Hilfe der FCS untersuchen. Die ermittelte Dissoziationskonstante stimmt gut mit dem aus der Literatur bekannten Wert überein. Bei der Reaktion zwischen Tf und hTfR handelt es sich um eine reversible, bimolekulare Bindung an gleiche und unabhängige Bindungsstellen. Dies ist mit dem vorher erwähnten Modell der hTfR Partikel zwanglos vereinbar, wenn man annimmt, daß die Bindungsstellen an der Oberfläche der Partikel lie-



gen und der Lösung zugewandt sind. Trotzdem ist nicht auszuschließen, dass die Bindung mit Konformationsänderungen verbunden ist. Diese muß man annehmen, um die experimentellen Befunde des Dissoziations-Austausch Experiments zu erklären, in dem TMR-Tf von unmarkiertem Tf verdrängt wird.

Die vorliegende Studie stellt eine grundlegende Charakterisierung des hTfR in detergenzfreier Lösung dar und bereitet eine Basis für weitergehende biophysikalische Untersuchungen der Struktur und Funktion des hTfR, wie sie zur Zeit im Rahmen eines Antrags für ein Habilitationsprojekt am Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft vorbereitet werden.

Im Mittelpunkt der darin vorgeschlagenen Studien steht die weitere Untersuchung der Kinetik und Gleichgewichtsbindung von Tf an hTfR sowie die Verfeinerung des Strukturmodells für hTfR und seines Komplexes mit Tf in Lösung. Besonders aufschlußreich dürfte dabei der Vergleich zwischen detergenzfreiem, solubilisiertem und rekonstituiertem hTfR sein. Hierzu können die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Techniken benutzt werden, wobei die Untersuchungen auf solubilierte und in Vesikeln rekonstituierte Formen des hTfR ausgedehnt werden müssen.

Zur Charakterisierung der Bindungsstelle des hTfR für Tf können Fragmente des Rezeptors durch limitierte Proteolyse erzeugt werden. Diese werden auf ihre Fähigkeit untersucht an eine Tf-Sepharose 4B Affinitätsäule zu binden oder auf Tf-Bindung im FCS Experiment. Fragmente, die mit hoher Affinität Tf binden, könnten sequenziert werden, so daß die Bindungsstelle des hTfR für Tf anhand überlappender Fragmente und der bekannten Aminosäuresequenz des hTfR kartiert werden kann.

Für detergenzfreien, solubilisierten und rekonstituierten hTfR können mit Röntgen- und Neutronenkleinwinkelstreuung, Kryo-Elektronenmikroskopie, analytischer Ultrazentrifugation sowie Messungen der Fluoreszenz- und Fluoreszenzanisotropie-Lebensdauern neue Strukturmodelle für den kompletten Rezeptor unter verschiedenen Bedingungen abgeleitet bzw. das vorhandene Modell des extrazellulären Bereichs überprüft werden. Diese Modelle sollten die Anordnung und Orientierung der Untereinheiten (Bindungsstellen) des hTfR beinhalten. Die Dynamik der Bindung von Tf an hTfR könnte dadurch zusammen mit weiteren Experimenten zur Kinetik der Rezeptor-Ligand Wechselwirkung vollständig beschrieben werden.